

## 양송이에서 분리한 보체계와 대식세포 활성화 다당류의 구조적 특성

김병희 · 권미향\* · 임왕진 · 성하진 · 양한철  
고려대학교 생명공학원, \*고려대학교 생명공학연구소

### Structural Characterization of the Anti-Complementary and Macrophage Activating Polysaccharides Isolated from *Agaricus bisporus*

Byung-Hee Kim, Mee-Hyang Kweon\*, Wang-Jin Lim, Ha-Chin Sung and Han-Chul Yang  
Graduate School of Biotechnology, Korea University  
\*Institute of Biotechnology, Korea University

#### Abstract

Three kinds of anti-complementary system and macrophage activating polysaccharides, AB-20-Ia, AB-20-IIa-2a and AB-20-IVa-2 were isolated from the fruit body of *Agaricus bisporus* and their structures were characterized. The proteoglycan, AB-20-IVa-2 showing the most potent anti-complementary and macrophage activity was composed of glucose, galactose, mannose, xylose, fucose and arabinose in a molar ratio of 3.48 : 1.83 : 1.00 : 0.79 : 0.74 : 0.11 and its main component amino acids were phenylalanine (34.72%) and valine (27.84%). The neutral polysaccharides, AB-20-Ia and AB-20-IIa-2a showing lower activity than AB-20-IVa-2, consisted of xylose, glucose, mannose, fucose and arabinose in molar ratios of <0.05 : <0.05 : 2.07 : 1.00 : 2.72 and 2.16 : 1.58 : 1.00 : 0.20 : 0.14, respectively. The molecular weights of AB-20-Ia, AB-20-IIa-2a and AB-20-IVa-2 were 840,000, 750,000 and 650,000 respectively. In the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra of AB-20-Ia and AB-20-IIa-2a, AB-20-Ia showed only β-configuration (<sup>1</sup>H: 4.8 ppm, <sup>13</sup>C: 107.0 ppm) in the anomerization of the glycosidic linkages, while AB-20-IIa-2a had both α-anomer (<sup>1</sup>H: 5.4 ppm, <sup>13</sup>C: 102.0 ppm) and β-anomer. Especially, AB-20-Ia and AB-20-IIa-2a showed acetyl signals (<sup>1</sup>H: 2.5 ppm, <sup>13</sup>C: 21.0 ppm). In the methylation analysis of the three polysaccharides, high proportion of 1,6-linked glucofuranosyl residues were detected in AB-20-Ia, whereas 1,6-linked glucopyranosyl residues and branches linked at position 4 of those mainly contained in AB-20-IIa-2a. AB-20-IVa-2 consisted mainly of 1,2-linked xylofuranosyl residues and 1,6-linked glucopyranosyl residues and branches linked at position 3 of those.

Key words: *Agaricus bisporus*, polysaccharides, complement system, macrophage

#### 서 론

면역계(immune system)는 크게 innate immunity와 adaptive immunity로 분류되는데 innate immunity는 macrophage에 의한 탐식작용(phagocytosis), 보체계(complement system) 활성화의 부경로(alternative pathway)에 의해 주도되는 선천적 면역 반응이다. Adaptive immunity는 innate immune system을 통과한 pathogen에 대한 면역 반응으로 다시 체액성 면역(humoral immunity)과 세포성 면역(cellular immunity)으로 분류되는데 체액성 면역은 B cell에서 생성되는 항체에 의

한 혈액 내 반응으로 여기에 보체계 활성화의 고전적 경로(classical pathway)가 관여하며, 세포성 면역은 Tc (cytotoxic T cell)와 T<sub>H</sub>1 (helper T cell)에 macrophage가 항원을 presentation하면서 일어나는 생체 내 tissue에서의 면역 반응이다<sup>(1)</sup>. 이처럼 보체계와 macrophage는 체액성 면역, 세포성 면역에 모두 관여하는 면역계의 주요 인자로 macrophage 등의 탐식세포(phagocytic cell)에는 보체계 활성화 과정에서 생긴 분해산물이 결합하는 complement receptor (CR)가 존재하는데 이는 보체계가 macrophage와 같은 주요 면역계 세포들의 면역 반응에 직접적으로 관여하고 있음을 의미한다<sup>(2-4)</sup>. 실제로 pathogen의 opsonization과 염증세포의 염증부위로의 집적 등은 보체와 macrophage가 함께 관여하는 면역작용으로 알려져 있다<sup>(4)</sup>.

Corresponding author: Han-Chul Yang, Graduate School of Biotechnology, Korea University, 5-1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701

본 연구에서는 보체계를 활성화시키는 단백다당이 존재한다고 이미 보고된 양송이 자실체의 알칼리 추출물에서<sup>(6)</sup> 보체계와 macrophage 활성화 다당들을 분리, 정제하고 구조적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 시약

양송이(*Agaricus bisporus*) 자실체는 충남 부여가 원산지로 경동시장에서 구입, 동결건조하여 사용하였다. 항보체 활성 측정시 이용되는 양의 감작 적혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 Bio test사로부터 구입하였고, 혈청(normal human serum, NHS)은 실험실의 건강한 성인의 혈액으로부터 제조하여 사용하였다. Macrophage 활성화 측정시 이용되는 시약인 RPMI medium 1640과 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL사로부터 구입하였고, lipopolysaccharide (from *E. coli* 026:86, LPS)와 *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP)는 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

### 일반 성분 분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법<sup>(6)</sup>으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법<sup>(7)</sup>으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법<sup>(8)</sup>으로 각각 정량하였다. 구성당 분석은 시료를 Jones 등의 방법<sup>(9)</sup>에 따라 2 M trifluoroacetic acid (TFA)로 121°C에서 1.5시간 가수분해한 후, sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>)를 이용하여 alditol로 환원시킨 후, acetic anhydride ((CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O)를 이용하여 각각 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas chromatography (GC)로 구성당을 분석하였다. GC의 분석은 3% OV-225 chromosorb WHP 100/120의 packed column이 장착된 Shimadzu GC 14A를 이용하고 최적온도조건(column temp. 205°C, injector temp. 230°C, detector temp. 230°C)에서 실시하였다. 구성당의 molar ratio는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다. 구성아미노산의 분석은 시료를 6 N HCl에 용해시켜 질소 가스를 충전, 밀봉하여 105°C에서 24시간 동안 가수분해한 후 감압 건조하여 건조된 시료에 증류수 2 mL을 가한 다음 중화, 여과하여 침전을 제거한 시료에 iodoacetic acid와 ortho-phthalaldehyde(OPA)-mercaptoethanol reagent를 가하여 혼합, 반

응시켜 OPA 유도체로 전환시켜 HPLC로 아미노산 분석을 실시하였으며, HPLC의 분석 조건은 Waters Nova-pak C18 column이 장착된 Gilson HPLC/Fluorescence detector (EX/EM=338 nm/455 nm)를 사용하였고, 17개의 표준 아미노산들의 retention time과 비교하여 시료 중의 구성 아미노산을 분석하였다.

### 면역 활성 측정

항보체 활성은 Mayer법<sup>(10)</sup>을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption)후 남은 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였으며, 활성정도는 NHS와 buffer, 시료 대신 탈이온수만을 반응시킨 대조군의 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH<sub>50</sub>%)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH<sub>50</sub>%)로서 나타내었다. Macrophage 활성화는 mouse의 복강 내에서 회수한 macrophage를 세포수가 1×10<sup>6</sup>개/mL이 되도록 RPMI-1640 medium에 재분산시키고, 이 분산액을 96-well plate의 각 well에 200 μL씩 분주한 후, 37°C에서 2시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양하여 macrophage cell이 well 기벽에 monolayer을 형성하면 non-adherent cell은 RPMI-1640 medium으로 두 번 세척하여 제거한 후, 10% FBS (fetal bovine serum)을 함유한 RPMI-1640 medium을 각 well에 200 μL씩 분주하고 시료(20 μL)를 가하여 37°C에서 24시간 CO<sub>2</sub> 배양하여 macrophage를 활성화시킨 후, 이렇게 활성화된 macrophage의 monolayer에 0.1% triton X-100 (25 μL)을 가하여 macrophage의 세포막을 용해시켜 이 때 분비되는 lysosome의 phosphatase의 기질로서 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate (150 μL)을 0.1 M citrate buffer (50 μL)와 같이 넣어주어 1시간 동안 산성상태에서 반응시키고 0.2 M borate buffer를 가하여 반응을 정지시킨 후, ELISA reader (Bio-rad 3550-UV)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 macrophage 활성화 정도를 나타내었다<sup>(11)</sup>.

### 활성 다당의 추출 및 정제

동결건조하여 분쇄한 양송이 자실체를 65°C에서 1시간 동안 5% urea를 함유한 10% NaOH 용액으로 환류 추출한 후, 중화, 원심분리한 후, 상등액을 투석하여 얻은 AB-0를 methanol 환류, acetone 농도별 침전<sup>(12)</sup>, 이온교환 및 겔여과 크로마토그래피, HPLC 등을 이용하여 보체계와 macrophage 활성화 다당류인 AB-20-Ia, AB-20-IIa-2a, AB-20-IVa-2를 얻어 본 실험

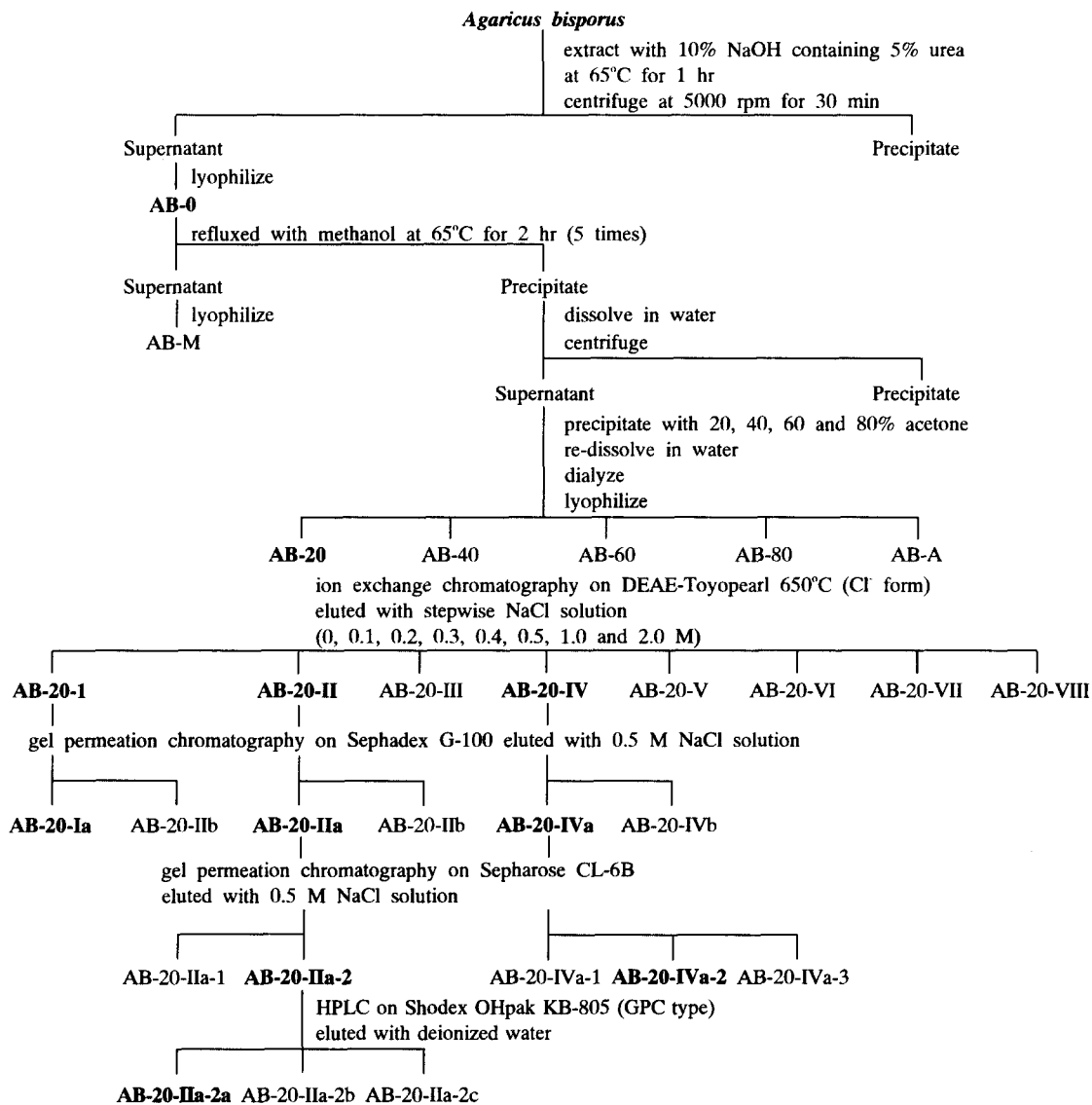


Fig. 1. Purification scheme of the anti-complementary system and macrophage activating polysaccharides from *Agaricus bisporus*.

의 정제다당으로 사용하였다(Fig. 1).

정제다당의 분자량 측정

정제 다당의 분자량은 분자량이 각각 200만, 50만, 7만, 4만, 1만 dalton인 dextran을 표준물질로 사용하여 Sepharose CL-6B column (2.5×85 cm)에서 구한 표준 곡선과 Kav 값을 비교하여 측정하였다.

Nuclear magnetic resonance (NMR) 분석

정제 다당의 아노머 배위 양식과 당쇄 결합 양식을 조사하기 위하여 dimethylsulfoxide-d<sub>6</sub> 0.5 mL에 용해시킨 후, 내부 기준 물질로 TSP (sodium 3-trimethylsilyl-propane-1-sulphonate-d<sub>4</sub>)를 혼합하여 Bruker AMX-500 NMR (500 MHz)를 이용하여 내부온도 30°C에서 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 분석을 실시하였다.

다당류의 당쇄결합 분석

정제 다당들의 당쇄 결합 양식을 조사하기 위하여

Hakomori 방법<sup>(13)</sup>에 따라 methyl화를 실시하였다. 즉, pyrex tube에 AB-20-Ia, AB-20-IIa-2a, AB-20-IVa-2를 각각 2 mg을 넣고 무수 dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 mL을 첨가하고 tube 내부를 질소로 충전한 다음 시료를 완전히 녹인 후, carbanion을 사용하여 다당을 완전히 polyalkoxide로 전환시킨 후, methyl iodide (CH<sub>3</sub>I) 1.5 mL을 첨가하고 sonication한 다음 12시간 동안 교반시키면서 methyl화한 후, Sep-pak C18 cartridge를 이용하여 methyl화된 시료를 회수하였다. methyl화된 다당에 2 M TFA 1.5 mL을 가하여 121°C에서 1.5시간 동안 가수분해 후, 환원 및 acetyl화 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하여 GC-MS로 분석하였다. GC-MS 분석은 Ultra 1 (100% dimethyl polysiloxane gum phase) capillary column이 장착된 Hewlette-Packard 5890 II GC와 5988 MS detector를 이용하여 최적온도조건[60°C (1 min, 15°C/min) → 160°C (6 min, 10°C/min) → 210°C]에서 분석하였다(He 유속: 0.5 mL/min). 각 peak에 해당하는 성분은 MS에 의한 fragment ion 분석과 TIC (total ion chromatogram)의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며, 각 화합물의 abundance %는 peak 면적과 응답계수로 부터 산출하였다<sup>(14)</sup>.

## 결과 및 고찰

정제다당의 항보체 활성과 macrophage 활성능 양송이 자실체의 알칼리 추출물로부터 정제한 AB-

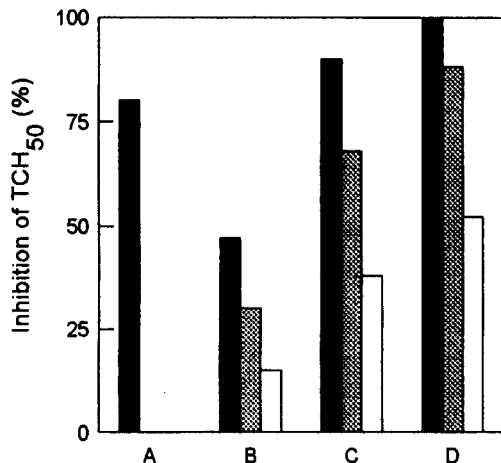


Fig. 2. Anti-complementary activity of polysaccharides purified from *Agaricus bisporus*. A: CAP-0, B: AB-20-Ia, C: AB-20-IIa-2a, D: AB-20-IVa-2. ■: 1000 µg/mL, ▨: 500 µg/mL, □: 100 µg/mL.

20-Ia, AB-20-IIa-2a, AB-20-IVa-2의 항보체 활성을 측정된 결과, 1000 µg/mL의 농도에서 각각 47.0%, 90.0%, 106.8%의 ITCH<sub>50</sub> 값을 나타내었는데 특히, AB-20-IVa-2는 500 µg/mL의 농도에서도 88.2%의 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2). 이는 항보체 활성 측정에서 positive control로 사용한 고추(*Capsicum annuum L.*)의 냉수추출물을 ethanol 침전하여 얻은 조다당 CAP-0의 80.0%보다 활성이 높은 것이다. 한편, 이 정제다당들의 macrophage 활성능을 측정된 결과, 100 µg/mL의 농도에서 negative control로 사용한 생리식염수의 활성을 100.0%로 보았을 때, 각각 191.6%, 245.0%, 210.8%의 상대활성을 나타내었다(Fig. 3). 이들 활성은 강력한 활성화 물질로 알려진 본 실험의 positive control로 사용된 gram 음성균의 세포벽 성분인 lipopolysaccharide (from *E. coli* 026: 86, LPS)의 활성인 230.0%와 비슷한 수준으로 이 3종의 정제다당들이 비교적 강한 macrophage 활성능을 갖고 있는 것으로 조사되었다. 특히, AB-20-IVa-2는 100 µg/mL보다 10 µg/mL의 농도에서 LPS보다 높은 수준인 255.0%의 활성을 보였는데, 이는 시료의 농도가 높아지면 오히려 독성작용에 의해 macrophage cell에 상해를 주어 활성이 낮아지는 것으로 추정되어지므로, AB-20-IVa-2가 가장 높은 macrophage 활성능을 갖고 있는 것으로 생각되었다. Macrophage는 이물질을 인식할 수 있는 서로 다른 receptor들을 지니고 있기 때문에 식품이나 천연물인 macrophage의 활성화에 대하여 직접적으로 관여할

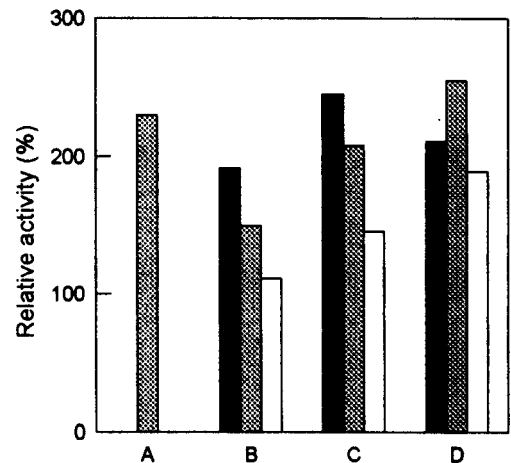


Fig. 3. Macrophage lysosomal enzyme activity of polysaccharides purified from *Agaricus bisporus*. A: LPS10, B: AB-20-Ia, C: AB-20-IIa-2a, D: AB-20-IVa-2. ■: 100 µg/mL, ▨: 10 µg/mL, □: 1 µg/mL.

수도 있지만 보체나 다른 림프구의 활성을 통한 2차적 작용에 의한 것일 수도 있다. 한편, gram 양성균의 세포벽 성분인 peptidoglycan과 그 유도체들이 다양한 면역조절작용을 유도하고 adjuvant의 역할을 할 수 있으며 macrophage를 활성화하며<sup>(15)</sup>, mannose를 함유한  $\beta$ -1,4-linked D-mannuronic acid,  $\beta$ -1,3- glucan 같은 다당류들로 단구와 대식세포의 cytokine 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>(16)</sup>. 따라서 양송이 정제 다당류들의 두가지 면역활성의 결과를 종합할 때, AB-20-IVa-2가 항보체 활성화와 macrophage 활성능이 모두 가장 높고, AB-20-Ia는 항보체 활성은 낮으나 macrophage 활성능은 비교적 높은 다당으로 평가되나 이들의 생리효능은 상호관련된 두 면역체계에서 어떠한 방향으로 진행될 지는 현재로서는 명확하지는 않다고 하겠다.

정제다당의 화학적 조성

3종의 정제다당의 일반성분을 분석한 결과, AB-20-Ia과 AB-20-IIa-2a는 총당 함량이 100%인 순수다당임에 비해 AB-20-IVa-2는 56.6%의 당과 35.3%의 단백질 함량을 갖는 단백다당이었다(Table 1). 각 다당의 주요 구성당은 AB-20-Ia는 glucose > xylose > mannose, AB-20-IIa-2a는 xylose > glucose > mannose 순으로 함유되었고, 두 다당 모두에 galactose는 함유되어 있지 않았다. AB-20-IVa-2는 fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose가 몰비율로 0.74 : 0.11 : 0.79 : 1.00 : 1.83 : 3.48로 함유되어 있었으며(Table 1), 단백질 부분의 주요 구성아미노산은 phenylalanine (34.72%)과 valine (27.84%)이었다(Table 2). 한편, AB-20-Ia, AB-20-IIa-2a, AB-20-IVa-2의 분자량을 조사한

Table 1. Chemical sugar composition of the anti-complementary system and macrophage activating polysaccharides purified from *Agaricus bisporus*

	AB-20-Ia	AB-20-IIa-2a	AB-20-IVa-2
Total sugar (%)	100.0	100.0	56.6
Protein (%)	- <sup>1)</sup>	-	35.3
Uronic acid (%)	-	-	6.5
Sugar composition (molar ratio) <sup>2)</sup>			
Fucose	< 0.05	0.20	0.74
Arabinose	< 0.05	0.14	0.11
Xylose	2.07	2.16	0.79
Mannose	1.00	1.00	1.00
Galactose	-	-	1.83
Glucose	2.72	1.58	3.48

<sup>1)</sup>Not detected.

<sup>2)</sup>Sugar composition of AB-20-ia, AB-20-IIa-2a and AB-20-IVa-2 were analyzed by alditol acetate method.

Table 2. Amino acid composition of the anti-complementary system and macrophage activating polysaccharide, AB-20-IVa-2 purified from *Agaricus bisporus*

Amino acids	AB-20-IVa-2 (mole %)
Asx	3.31
Glx	3.08
His	1.15
Ser	0.45
Gly	6.58
Arg	0.88
Thr	1.02
Ala	6.96
Tyr	0.02
Met	4.38
Val	27.84
Phe	34.72
Leu	4.36
Ile	4.91
Lys	0.28

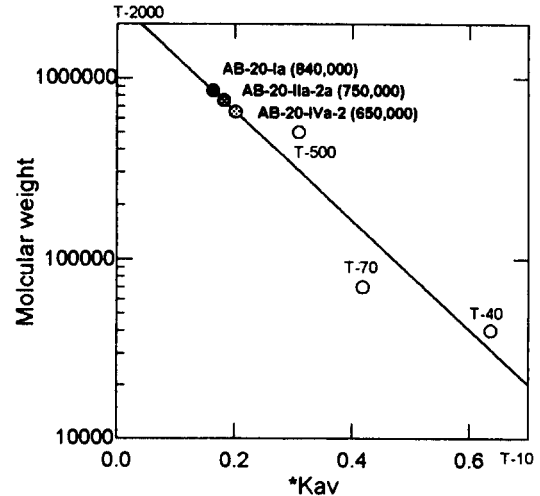


Fig. 4. Molecular weight of polysaccharides purified from *Agaricus bisporus*. The column (2.5×85 cm) of Sepharose CL-6B was eluted with 0.5 M NaCl solution at flow rate of 0.2 mL/min and T-2000, T-500, T-70, T-40, and T-10 are standard dextrans of 2,000,000, 500,000, 70,000, 40,000 and 10,000 Da molecular weight.

결과, 각각 84만, 75만, 65만 정도로 측정되었다(Fig. 4).

정제다당의 anomer 배위 양식

Macrophage 활성화 다당인 AB-20-Ia와 AB-20-IIa-2a의 anomer 배위 양식과 당쇄 결합 양식, 그리고 치환기를 조사하기 위하여 각각의 <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 분석하였다(Fig. 5, 6). AB-20-Ia와 AB-20-IIa-2a의 anomer 배위 양식은 AB-20-Ia가  $\beta$ 형('H: 4.7~4.8 ppm,

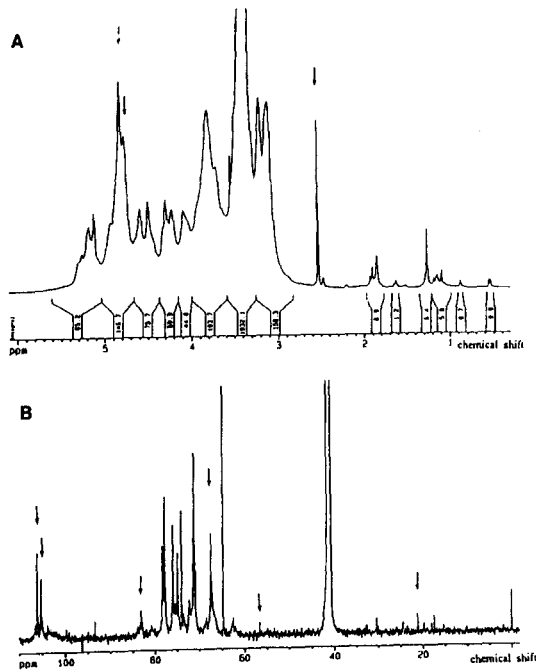


Fig. 5.  $^1\text{H-NMR}$  (A) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (B) spectra of macrophage activating polysaccharide, AB-20-Ia purified from *Agaricus bisporus*. Chemical shifts ( $\delta$ , p.p.m.) were expressed relative to that of an internal standard, sodium 3-(trimethylsilyl) propane-1-sulphonate- $d_4$  (TSP).

$^{13}\text{C}$ : 105.0~107.0 ppm)만 존재하는데 비해서 AB-20-IIa-2a는  $\alpha$ 형( $^1\text{H}$ : 5.4 ppm,  $^{13}\text{C}$ : 102.0 ppm)과  $\beta$ 형이 혼재하며  $\beta$ 형이 다소 우세하게 존재하였다. 당쇄 결합 양식은 AB-20-Ia에는 2번 탄소의 glycosylation에 의한 C-2 downfield signal ( $^{13}\text{C}$ : 83.0 ppm)과 6번 탄소의 glycosylation에 의한 C-6 downfield signal ( $^{13}\text{C}$ : 64.7 ppm)이 확인되었으며, AB-20-IIa-2a에는 C-6 downfield signal이 관찰되었다. 따라서, AB-20-Ia의 당쇄 결합은  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 2)와  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 6)의 형태로 추정되었고, AB-20-IIa-2a는 (1 $\rightarrow$ 6)의 당쇄결합이 우세한 것으로 판단되었다. 한편, AB-20-Ia와 AB-20-IIa-2a에는 모두 acetyl화된 당에서 유래된 acetyl signal ( $^1\text{H}$ : 2.5 ppm,  $^{13}\text{C}$ : 21.0 ppm)이 검출되었으며, AB-20-IIa-2a가 AB-20-Ia보다 그 비율이 훨씬 높았는데 이것이 AB-20-IIa-2a의 macrophage 활성화에 관여하는지는 확인되지 않았다. 또, AB-20-Ia와 AB-20-IIa-2a에는 deoxygenation된 당에서 유래된 methyl signal ( $^1\text{H}$ : ~1.5 ppm,  $^{13}\text{C}$ : ~15.0 ppm)이 검출되지 않았으며, 이는 두 다당 모두 구성당에서 fucose의 함량이 전혀 없거나 미량인 결과와 일치하였다(Table 1). 특이적으로 두 다당에 모두  $\text{CH}_3\text{O}$ -기( $^{13}\text{C}$ : 56.7 ppm)가 존재하는 것이 확인되었다(Fig. 5, 6).

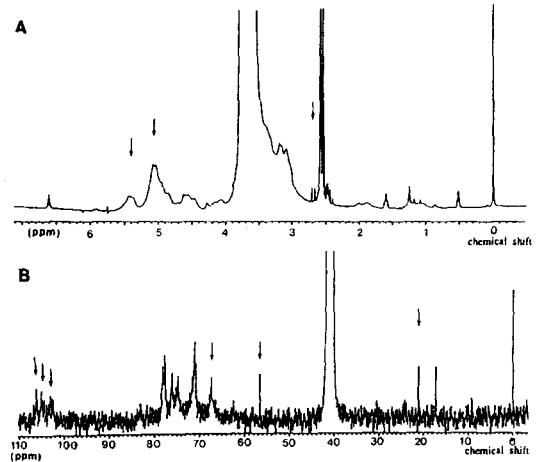


Fig. 6.  $^1\text{H-NMR}$  (A) and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra (B) of macrophage activating polysaccharide, AB-20-IIa-2a purified from *Agaricus bisporus*. Chemical shifts ( $\delta$ , p.p.m.) were expressed relative to that of an internal standard, sodium 3-(trimethylsilyl) propane-1-sulphonate- $d_4$  (TSP).

#### 정제다당의 당쇄 결합 양식

3종의 정제다당의 당쇄 결합 양식과 함량을 분석하기 위하여 각각을 methyl화 분석을 통하여 조사하였다. Table 3의 결과에서, AB-20-Ia의 주요 당쇄 결합 양식은 1,6-linked glucofuranose이고 1,2-linked xylofuranose, 1,3-linked xylopyranose, 1,6-linked mannopyranose, 1,4-glucopyranose 등도 일부 존재하였다. 또, 1,2-linked xylofuranose의 3번 탄소 위치에 branching point가 존재하고 당사슬의 비환원당 말단에는 xylofuranose, xylopyranose, glucopyranose가 위치하는 것이 확인되었다. 따라서, NMR 분석 결과(Fig. 5, 6)와 종합해 볼 때, AB-20-Ia의 주쇄(main chain)는 주로  $\beta$ -1,6-linked glucofuranosyl 잔기로 이루어져 있는 것으로 추정되었다(Table 3). 한편, AB-20-IIa-2a의 주요 당쇄 결합 양식은 1,6-linked glucopyranose로 branching point는 4번 탄소 위치에 존재하는 것이 확인되었고, 비환원당 말단에는 AB-20-Ia와 유사하게 xylofuranose, xylopyranose, glucopyranose의 순으로 많이 존재하였다. 따라서, NMR spectrum에서의 결과와 종합할 때 AB-20-IIa-2a는 1,6-linked glucofuranosyl 잔기가 주쇄를 이루고 여기에 측쇄(side chain)들이 1,4 결합으로 연결된 다당으로 추정되었다(Table 3). 한편, 이 두 다당의 당쇄 결합 양식을 비교해 볼 때, 두 다당 모두 1,6 결합의 glucosyl 잔기가 주요 당쇄 결합 양식이었으나 AB-20-Ia는 glucose가 furanose의 형태로 존재하는데 비해서 AB-20-IIa-2a는 pyranose의 형태를 갖는

**Table 3. Glycosidic linkage composition of anti-complementary system and macrophage activating polysaccharides purified from *Agaricus bisporus***

Methylated alditol acetate	Retention time (min)	Glycosidic linkage	Abundance (%) <sup>1)</sup>
<b>AB-20-Ia</b>			
2,3,4-tri-OMe-Xyl	16.392	(T)Xylp1→ <sup>2)</sup>	8.44
2,3,5-tri-OMe-Xyl	18.293	(T)Xylf1→	9.07
2,3,4,6-tetra-OMe-Glc	19.019	(T)Glc p1→	6.10
2,4-di-OMe-Xyl	19.700	→3Xylp1→	4.81
3,5-di-OMe-Xyl	20.618	→2Xylf1→	1.69
2,3,5-tri-OMe-Man	20.701	→6Manf1→	2.56
2,3,5-tri-OMe-Glc	20.950	→6Glc f1→	18.90
5-OMe-Xyl	21.076	3 ↑	3.69
2,3,4-tri-OMe-Man	21.361	→6Manp1→	4.41
2,3,6-tri-OMe-Glc	22.004	→4Glc p1→	3.64
<b>AB-20-IIa-2a</b>			
2,3,4-tri-OMe-Xyl	16.474	(T)Xylp1→	7.34
2,3,5-tri-OMe-Xyl	18.440	(T)Xylf1→	9.71
2,3,4,6-tetra-OMe-Glc	19.142	(T)Glc p1→	6.22
2,4-di-OMe-Xyl	19.809	→3Xylp1→	2.38
2,3,4-tri-OMe-Glc	21.239	→6Glc p1→	27.82
2,3,6-tri-OMe-Man	22.401	→4Manp1→	5.28
		→6Glc p1→	
2,3-di-OMe-Glc	23.561	4 ↑	2.78
<b>AB-20-IVa-2</b>			
2,3,4-tri-OMe-Xyl	16.564	(T)Xylp1→	4.29
2,3,5-tri-OMe-Xyl	18.491	(T)Xylf1→	7.99
2,3,4,6-tetra-OMe-Glc	19.197	(T)Glc p1→	11.43
2,3-di-OMe-Fuc	19.862	→4Fuc p1→ or →5Fuc f1→	4.12
3,5-di-OMe-Xyl	21.014	→2Xylf1→ →2Xylp1→	10.91
5-OMe-Xyl	21.192	3 ↑	8.06
2,3,4-tri-OMe-Glc	22.268	→6Glc p1→ →3Manp1→	7.94
2,4-di-OMe-Man	23.870	6 ↑	7.70
		→3Glc p1→	
2,6-di-OMe-Glc	25.030	4 ↑	1.64

<sup>1)</sup>Calculated from abundance of total ion of the each sugar derivative obtained from EI-MS spectra.

<sup>2)</sup>Nonreducing terminal residues are indicated by T.

큰 차이를 보였는데, 이것이 이들의 macrophage 활성화 차이에 일부 관여하는지 아직 확인된 바는 없다. 보체계와 macrophage를 모두 강하게 활성화시키는 다당인 AB-20-IVa-2의 경우에는 주요 당쇄 결합 양식이 1,2-linked xylofuranose와 1,6-linked glucopyranose이며 branching point는 1,2-linked xylofuranose의 3번 탄소,

1,3-linked mannopyranose의 6번 탄소와 1,3-linked glucopyranose의 4번 탄소에 위치하였으며, 비환원당 말단은 AB-20-Ia, AB-20-IIa-2a와 동일하였는데, 다만 glucopyranose가 가장 많은 것이 두 다당과의 차이점이다. 따라서, AB-20-IVa-2는 1,2-linked xylofuranosyl 잔기와 1,6-linked glucopyranosyl 잔기가 주쇄를 이루고 이 xylofuranosyl 잔기에 측쇄들이 1,3 결합으로 연결된 다당으로 추정되었다(Table 3).

### 요 약

양송이의 알칼리 추출물에서 면역계의 주요인자인 보체계와 macrophage를 활성화시키는 다당들을 분리, 정제하고 구조적 특성을 비교하였다. AB-20-IVa-2는 항보체 활성화와 macrophage 활성능을 동시에 나타내는 단백다당으로 주요 구성당은 glucose > galactose > mannose 순으로 함유되어 있고 주요 구성아미노산은 phenylalanine (34.72%)과 valine (27.84%)이었다. AB-20-Ia와 AB-20-IIa-2a는 macrophage 활성을 갖고 있는 순수다당으로 AB-20-Ia의 주요 구성당은 glucose > xylose > mannose이고 AB-20-IIa-2a는 xylose > glucose > mannose이었다. AB-20-Ia, AB-20-IIa-2a, AB-20-IVa-2의 분자량은 각각 84만, 75만, 65만 정도로 추정되었다. AB-20-Ia, AB-20-IIa-2a, AB-20-IVa-2의 구조적 특성을 비교하기 위하여 NMR 분석, methyl화 분석을 통해 anomer 배위 양식과 당쇄 결합 양식을 조사하였다. AB-20-Ia는 β-anomer 형태로 존재하는데 비해서 AB-20-IIa-2a는 α와 β-anomer 모두 확인되었으며 β의 비율이 좀 더 높았다. 또, AB-20-Ia와 AB-20-IIa-2a 모두 구성당 잔기에 acetyl기가 존재하였으며 특히, macrophage 활성능이 더 강한 AB-20-IIa-2a에 더 높은 비율로 함유되어 있었다. 이 정제 다당들의 당쇄 결합 양식은 AB-20-Ia는 주로 β-1,6-linked glucofuranosyl 잔기가 주쇄를 구성하고 있고, AB-20-IIa-2a는 1,6-linked glucopyranosyl 잔기가 주쇄를 이루고 여기에 측쇄들이 1,4 결합으로 연결된 다당으로 추정되었다. 또, AB-20-IVa-2는 1,2-linked xylofuranosyl 잔기와 1,6-linked glucopyranosyl 잔기가 주쇄를 이루고 이 xylofuranosyl 잔기에 측쇄들이 1,3 결합으로 연결된 다당으로 추정되었다.

### 감사의 글

본 연구는 농진청 농업특정연구개발사업의 연구비에 의해 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문헌

1. Playfair, J.H.L.: Natural and adaptive immune mechanisms. In *Immunology at a Glance*, 5th ed., Blackwell Scientific Publications. London, p.2 (1992)
2. Gigli, I. and Nelson, R.A.J.: Complement dependent immune phagocytosis 1. requirements for C1, C4, C2. *Exp. Cell Res.*, **151**, 45-55 (1968)
3. Lay, W.H. and Nussenzweig, V.: Receptors for complement on leukocytes. *J. Exp. Med.*, **128**, 991-998 (1968)
4. Janeway, C.A. Jr and Travers, P.: The complement system in humoral immunity. In *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications. London, p.8-40 (1995)
5. Kweon, M.H., Lim, E.J. and Sung, H.J.: Studies on biological polysaccharides isolated from *Agaricus bisporus* (in Korean). *J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol.*, **41**, 60-66 (1998)
6. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-355 (1956)
7. Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G.: New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54**, 484-491 (1973)
8. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-270 (1951)
9. Jones, T.M. and Albersheim, P.O.: A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol.*, **49**, 926-932 (1972)
10. Kabat, E.E. and Mayer, M.M.: Complement and complement fixation. In *Experimental Immunochimistry*, Charles C. Thomas Publisher. Illinois, p.133-150 (1964)
11. Suzuki, I., Tanaka, H., Kinoshita, A., Oikawa, S., Osawa, M. and Yadomae, T.: Effect of orally administered  $\beta$ -glucan on macrophage function in mice. *Int. Soc. Immunopharmac.*, **12**, 675-680 (1990)
12. Bollag, D.M. and Edelstein, S.J.: Concentrating protein solutions. In *Protein methods*. 1st ed., Wiley-Liss. New York, p.74-75 (1991)
13. Hakomori, S.: A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulphonyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205-213 (1964)
14. Sweet, D.P., Shapiro, R.H. and Albersheim, P.: Quantitative analysis by various g.l.c. response factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.*, **40**, 217-224 (1975)
15. Heumann, C., Barras, C., Severin, A., Glauser, M.P. and Tomasz, A.: Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect. Immun.* **62**, 2715-2722 (1994)
16. Otterlei, M., Sundan, A., Skjak-Brak, G., Ryan, L., Smidsrod, O. and Espevik, T.: Similar mechanisms of action of defined polysaccharides and lipopolysaccharides. *Infect. Immun.*, **61**, 1917-1925 (1993)

---

(1998년 2월 20일 접수)