

Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme from *Tricholoma sejunctum*

Jun-Ho Kim[†]

Department of Chemistry, SangJi University, Wonju 220-702

Fibrinolytic enzyme has been purified from the edible mushroom, *Tricholoma sejunctum* using DEAE-cellulose chromatography, Phenyl-Sepharose chromatography and Mono-S column chromatography. The apparent molecular mass of purified enzyme was estimated to be 17100 Da by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and 19000 Da by gel filtration, indicating that it was a monomer. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was Ala-Thr-Tyr-Lys-Ile-X-Ser-Ala-Thr-His-Gln-X-X-Leu-Val. It has a pH optimum at pH 9.5, suggested that purified enzyme was a alkaline protease. The activity of purified enzyme was inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline, indicating that purified enzyme is a metalloprotease. The activity of purified enzyme was increased by Zn²⁺ and Co²⁺, however, the enzyme activity was totally inhibited by Hg²⁺.

Key Words: Fibrin plate assay, Fibrinolytic enzyme, *Tricholoma sejunctum*

서 론

혈관 벽이 손상되면 혈소판의 응집이 일어나고 여기에 섬유소원이 붙어 혈소판은 더욱 응집된다. 이 혈소판에서 나온 thrombin이 섬유소원을 섬유소로 만들어 혈소판과 섬유소의 응집체인 섬유소 혈전 (fibrin clot)이 형성되어 출혈을 막게 된다. 이런 지혈 과정을 거친 후 조직은 재생되고 생성되었던 혈전은 혈관 내 plasmin에 의해 용해되지만 완전한 용해가 이루어지지 않아 혈관을 따라 흐르며 혈액의 흐름을 차단하여 혈관계 질환을 초래하는데 이 혈전에 의한 질환이 인간의 가장 큰 사망 원인으로 알려져 큰 관심을 불러 일으키고 있다¹⁾. 따라서 이 혈관계 질병은 혈전용해제를 사용하여 혈전을 용해시킴으로써 치료할 수 있다²⁾.

현재 사용되고 있는 혈전용해제로는 urokinase와 tPA와 streptokinase가 있는데 이들은 혈전에 대한 선택성이 적어 장기간 복용 시 용혈현상이라든가 면역반응과 같은 부작용을 나타내고 있어 새로운 혈전용해제의 개발이 필요하게 되었다. 근래에 혈전과 섬유소원을 직접 용해하는 효소를 뱀독³⁾과 지렁이^{19,20,22)}로부터 분리 정제하였다는 보고가 있으며 또 한 식품 중에서도 이 혈전용해 물질을 찾고자 하는 연구가

진행되고 있는데 이런 식품으로는 발효식품인 청국장¹⁶⁾, 된장¹⁵⁾, 젓갈⁹⁾, 나토²⁴⁾ 등이 있다.

본 연구실에서는 새로운 종류의 혈전용해 물질을 버섯으로부터 찾고자 하였다. 버섯은 현재 세계적으로 약 15,000여 종이 존재하며 한국에는 약 1,500여종이 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 한국에 자생하는 야생버섯 중 약용으로 사용 가능한 버섯은 불로초 (영지)¹⁷⁾, 구름버섯, 목질진흙버섯 (상황)⁷⁾, 동충하초¹⁰⁾, 복령²³⁾ 등 100여종이 알려져 있으며 이들은 면역능을 증진시키는 효과와 더불어 항균²¹⁾과 항암⁸⁾ 효과도 큰 것으로 알려져 있다.

식용버섯인 *Flammulina velutipes* (Fr) Sing에 섬유소 (fibrin)를 분해하는 단백질분해효소가 있다는 Gavrilova 등의 보고⁵⁾에 따라 본 실험실에서는 치악산에 자생하는 버섯 65종과 원주 근교 현계산 등에서 채집한 50종의 버섯에 대한 fibrin 분해 활성을 검색 후 발표한 바 있다²⁾. 이들 보고에 따라 활성이 큰 뽕나무버섯^{13,14)}과 할미송이¹¹⁾버섯으로부터 혈전용해 물질을 분리 정제하고 그 특성을 발표하였다. 본 논문은 혈전용해능이 큰 버섯으로 알려진 쓴송이버섯으로부터 혈전용해 물질을 분리 정제하고 그 특성을 연구하여 결과를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 버섯시료는 2001년 10월 원주 현계산에서 채집하여 분류동정 후 시료로 사용하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin (P 4895, 3 units), plasminogen, thrombin,

*는 문 접수: 2002년 10월 16일
수정재 접수: 2002년 12월 6일

[†]별책 요청 저자: 김준호, (우) 220-702 강원도 원주시 우산동 660, 상지대학교 이공과대학 화학과
Tel: 033-730-0423, Fax: 033-730-0403
e-mail: jhokim@mail.sangji.ac.kr

bovine serum albumin, agarose, glycine, Sephadex G-150와, protease inhibitor는 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) 제품을, DEAE-cellulose는 Whatman (Maidstone England) 제품을, LMW Electrophoresis calibration Kit는 Pharmacia (Little Chalfont Buckinghamshire, England) 제품을 사용하였다.

2. 혈전용해효소의 정제

모든 정제 과정은 4°C에서 수행하였으며 정제 과정마다 혈전용해능과 단백질 농도를 측정하였다. 채집한 버섯을 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)에 넣고 잘게 부수고 원심분리하여 얻은 상등액을 같은 완충용액으로 평형된 DEAE-cellulose column (20×200 mm)에 흘려 보내고 완충용액 200 mL로 씻어준 후 0~0.5 M NaCl의 농도 기울기로 용출시켰다.

활성 부분을 모아 PM 10 막을 사용하는 ultrafiltration (Amicon: a Grace company, Beverly, U.S.A)에 의해 농축시키고 이를 1.4 M ammonium sulfate를 포함하는 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 포화된 Phenyl Sepharose column (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden; HiTrap Phenyl FF: 1 ml)에 흘려 보낸 후 1.4~0 M ammonium sulfate의 농도 기울기로 흘려 주고 활성 부분은 모아 20 mM sodium phosphate 완충액 (pH 6.0)에 투석시킨 후 동일한 완충용액으로 미리 평형시킨 fast protein liquid chromatography (FPLC: Water corporation, Milford, U.S.A)의 Mono S column (5.0×100 mm)에 주입하였다. 완충용액 3 ml로 씻어준 후 0~0.1 M NaCl 농도 기울기로 용출시켰다. 각 분획의 효소활성을 측정한 후 활성이 큰 부분을 모아 실험에 사용하였다.

3. 단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry 등의 방법¹⁸⁾에 의하여 측정하였으며 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

4. 혈전용해활성의 측정

Haverkate-Trass의 fibrin plate법¹⁹⁾에 따라 2% gelatin 용액에 녹인 0.7% (w/v) fibrinogen 용액 10 ml와 0.05 M barbital 완충용액 (pH 7.5)에 녹인 thrombin (100 NIH units) 50 µl을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin막을 만들었다. 효소용액을 20 µl 씩 fibrin plate 위에 점적한 후 36°C에서 8시간 방치하였다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 상대적인 활성을 측정하였다. 표준대조구로는 plasmin을 사용하고 plasmin을 연속적으로 희석하여 얻은 표준곡선에 따라 활성을 계산하였다.

5. 분자량 결정

분리한 단백질의 순도와 분자량은 전기영동을 실시하여 결

정하였으며 전기영동은 4.5%의 stacking gel과 12%의 separating gel로 이루어진 SDS-PAGE를 사용하였다. Gel은 coomassie brilliant blue R-250과 silver staining kit로 염색하였으며, 표준 단백질로는 phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (BSA) (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) α-lactalbumin (14.4 kDa)를 사용하였다. Gel-filtration에 의한 분자량 측정은 Sephadex G-150을 사용하였고 size marker로는 bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrom C (12.4 kDa), aprotinin (6.5 kDa)을 이용하였다.

6. N-terminal amino acid analysis

분리된 효소의 amino acid sequencing은 기초과학 지원연구소 (서울)에 precise protein sequencing system을 사용하여 수행되었다.

7. 최적 pH

효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 완충용액으로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0~7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.5), 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5~10.0)를 사용하였고 기질로 L-lysine pNA를 사용하여 35°C에서 혈전용해효소와 반응하는 가수분해활성을 조사하였다. 즉 3 mM의 기질 50 µl에 해당하는 buffer 925 µl와 효소 25 µl을 넣고 섞은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

8. 최적 온도

Fibrin plate 방법을 이용하여 온도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정하였다. 30°C에서 80°C까지 incubator의 온도를 변화시키며 효소를 점적한 plate을 넣고 3시간 후에 plate의 용해면적을 측정하여 효소의 활성을 비교하였다.

9. 효소활성에 미치는 금속 2가 이온의 영향

정제한 효소의 활성에 대한 금속 이온의 영향을 알아보기 위하여 2 mM의 CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, MgCl₂, FeCl₂, HgCl₂, EDTA와 1,10-phenanthroline을 같은 부피의 혈전용해효소용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적하고 36°C incubator에서 8시간 반응시킨 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

결 과

1. 혈전용해효소의 정제

혈전용해효소는 Table 1에서와 같이 3단계로 거쳐 분리 정제하였다. 효소용액을 DEAE-cellulose에 주입한 결과 활성을 갖는 대부분의 효소는 관에 붙지 않고 흘러 나왔다 (Fig. 1) Phenyl Sepharose 관을 이용한 결과 ammonium sulfate의 낮은

Table 1. Purification of Fibrinolytic Enzyme from *Tricholoma sejunctum*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Extract	304	37.696	0.124	100	1
DEAE-cellulose	1.895	3.891	2.053	10.32	16.556
Phenyl Sepharose	0.222	0.773	3.482	2.051	28.065
Mono S (FPLC)	0.012	0.137	11.417	0.365	92.339

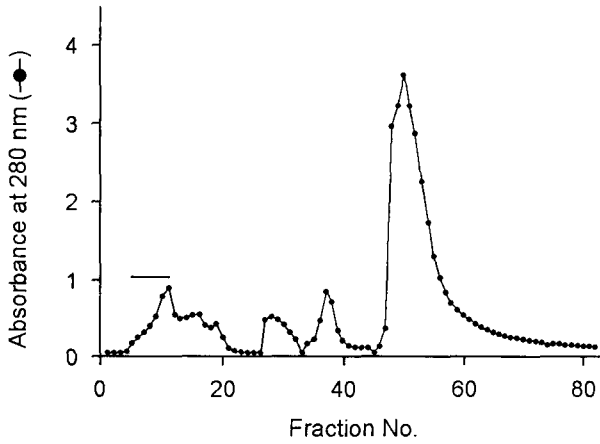


Fig. 1. Elution profiles of fibrinolytic enzyme with DE-52 cellulose column. Fractions containing fibrinolytic activity were pooled, as indicated by bars in the chromatogram.

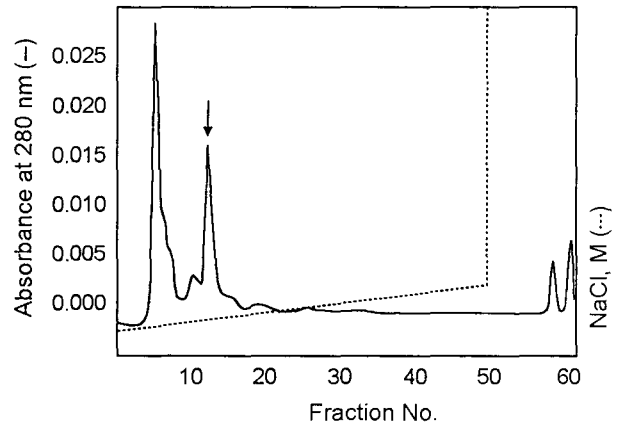


Fig. 3. FPLC chromatogram of purified fibrinolytic enzyme by Mono-S ion exchange column.

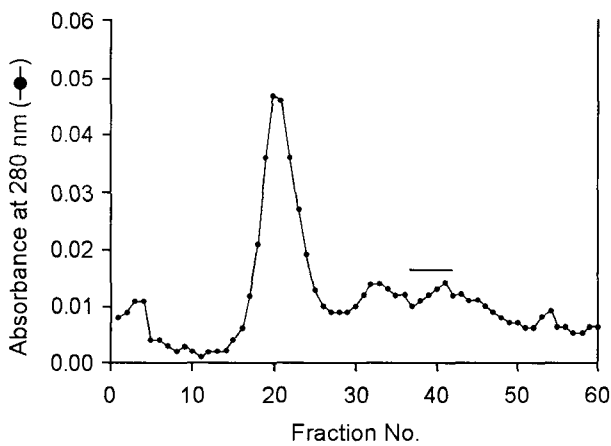


Fig. 2. FPLC chromatogram of the pooled fraction from DE-AE-cellulose chromatography on Phenyl Sepharose.

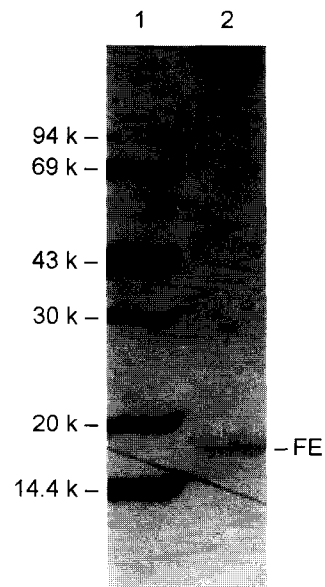


Fig. 4. SDS-PAGE of the purified enzyme. Lane 1. protein marker; lane 2. fibrinolytic enzyme (FE).

농도에서 활성 부분이 나타났다 (Fig. 2). 이 부분을 FPLC의 Mono S column을 이용하여 분리한 결과 (Fig. 3) 활성 부분의 SDS-PAGE는 비교적 순수한 단일 띠가 나타남으로 그 순도를 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 또한 분리 정제한 혈전용해효소의 비활성은 11.42 U/mg로 나타났다.

Table 2. Effects of Various Divalent Ions on Protease Activity under the concentration of 1 mM

Reagents	Residual activity (%)
None	100
Ca ²⁺	90
Co ²⁺	122
Zn ²⁺	145
Cu ²⁺	43
Mg ²⁺	97
Fe ²⁺	52
Hg ²⁺	0
1,10-phenanthroline	0
EDTA	0

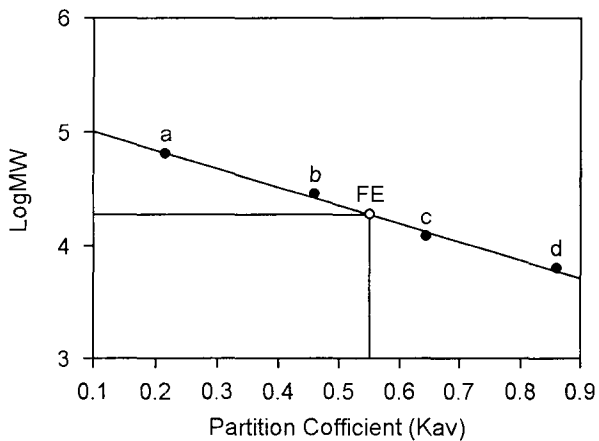


Fig. 5. Molecular weight determination of fibrinolytic enzyme by Sephadex G-150 column chromatography. Markers for molecular weight are; a) bovine serum albumin (66 Kd), b) carbonic anhydrase (29 Kd), c) cytochrom C (12.4 Kd), d) aprotinin (6.5 Kd).

2. 분자량 측정

SDS-PAGE로 효소의 분자량이 17100 Da인 것을, gel-filtration의 결과로 19000 Da인 것을 알게 되었으며, SDS-PAGE와 gel-filtration의 결과로부터 이 효소가 단량체로 이루어진 것을 알 수 있었다 (Fig. 5).

3. N-terminal amino acid 서열 분석

이 효소의 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분석 결과는 Ala-Thr-Tyr-Lys-Ile-X-Ser-Ala-Thr-His-Gln-X-X-Leu-Val 이었다.

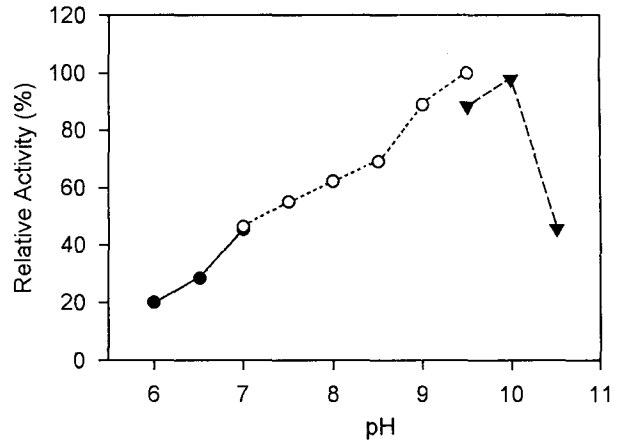


Fig. 6. Effect of pH on the fibrinolytic activity of purified enzyme. 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0~7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.5), and 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5~10.0) were used with L-lysine-pNA substrate. The maximum activity was expressed as 100%.

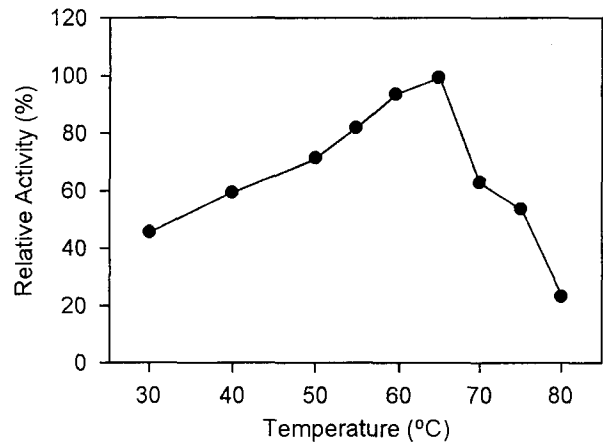


Fig. 7. Effect of temperature on the fibrinolytic activity of purified enzyme. The purified enzymes was incubated at temperatures from 30°C to 80°C for 3 hrs. Maximum activity was expressed as 100%.

4. 최적 pH

기질로 L-lysine pNA을 이용하여 pH 변화에 따른 효소활성을 조사한 결과 Fig. 6과 같이 pH 9.5에서 최적의 활성을 보여주는 alkaline protease로 나타났다.

5. 최적 온도

Fibrin plate 방법을 이용하여 온도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정한 결과 Fig. 7과 같이 65°C에서 최대활성을 보였으며 70°C 이상에서 활성이 현저히 감소하였고 80°C에서도 약간의 활성을 나타냈다.

6. 효소활성에 미치는 금속 2가 이온의 영향

Table 2와 같이 Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 의 경우 활성이 증가하였으나 Ca^{2+} 경우는 약간 감소한 반면 Cu^{2+} 와 Fe^{2+} 에 의해 급격히 감소하다가 Hg^{2+} 의 경우는 활성이 나타나지 않았다. 또한 EDTA와 1,10-phenanthroline를 첨가한 경우에도 효소의 활성이 전혀 활성이 나타나지 않았다.

고 찰

분리한 효소의 비활성은 (11.42 U/mg) 이미 발표된 뽕나무버섯 (17.02 U/mg)이나 할미송이버섯 (32.7 U/mg, 43.4 U/mg) 보다는 작지만 발효식품인 젓갈 (1.4 U/mg), 청국장 (1.84 U/mg) 으로부터 분리한 효소들보다는 매우 큰 것을 알 수 있었다. 그러나 할미송이버섯은 활성이 매우 크지만 약간의 독성을 갖고 있어 식용으로의 사용이 힘든 반면 뽕나무버섯이나 쓴송이버섯은 식용이 가능하다. 뽕나무버섯의 경우 버섯 균사가 사물 기생과 더불어 활물 기생도 하므로 야생에서 대량 채배 시에는 다른 나무의 성장에 문제를 야기할 수 있는 단점이 있다. 또한 분리한 효소의 분자량 (17.1 kDa) 크기는 팽나무버섯 (30 kDa), 뱀독 (51 kDa), 청국장 (28.2 kDa), 젓갈 (41 kDa), Shiokara (35 kDa), 지렁이 (20 kDa), 발효식품인 natto (20 kDa) 보다 작고, 지금까지 발표된 혈전용해효소 중 가장 작은 크기의 뽕나무버섯 (18.5 kDa)의 혈전용해효소보다도 작았다. 크기가 작으면 혈전용해제로 사용 시 흡수가 용이한 장점이 있다.

이 효소의 구조를 확인한 결과 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분석 결과는 Ala-Thr-Tyr-Lys-Ile-X-Ser-Ala-Thr-His-Gln-X-X-Leu-Val로 지금까지 발표된 효소들의 구조와 비교한 결과 (GENBANK, SwissProt) 아직까지 발견되지 않은 새로운 효소였다. pH에 따른 활성도 비교는 뽕나무버섯은 pH 7.0에서 할미송이버섯은 pH 7.5에서 가장 활성이 큰 반면 쓴송이버섯의 경우는 pH 9.5에서 가장 활성이 좋은 alkaline protease였다. 최적 온도를 조사한 결과는 뽕나무버섯과 할미송이버섯은 55°C에서 가장 큰 활성을 보인 반면 쓴송이버섯은 65°C에서 최대의 활성을 나타냈다.

Table 2의 결과로부터 Hg^{2+} , EDTA와 1,10-phenanthroline에 의해 효소의 활성이 사라지는 결과로부터 이 효소는 활성 중심에 metal ion을 갖는 metalloprotease로 추정된다. 이 결과는 이미 발표된 할미송이버섯, 뽕나무버섯과 비슷한 결과로 이런 metalloprotease의 중심에는 많은 경우 Zn^{2+} 이 존재하지만 Co^{2+} 의 경우도 알려져 있다⁴⁾. 따라서 이 실험에서 분리한 효소는 활성은 크고 분자 크기가 작은 새로운 혈전용해효소로 확인되었다. 이를 이용하여 혈전용해제를 개발할 경우 독성이 있는 할미송이버섯이나 채배 시 다른 나무의 성장에 해를

줄 수 있는 뽕나무버섯과는 달리 많은 장점을 갖고 있어 이 쓴송이버섯을 이용한 새로운 혈전용해제의 개발은 가능성이 클 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 상지대학교 교내연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Ahn DK (1992): Medical fungi in Korea. *Kor J Mycol*, **20**: 154-166.
- 2) Chung KH and Kim DS (1992): Fibrinolytic and coagulation activities of Korean Snake Venoms. *Kor Biochem J*, **25**: 696-701.
- 3) Daka MD and Semba CP (1995): Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J Vasc Interv Radiol*, **6**(Suppl): 73-77.
- 4) El-Aassar SA (1995): Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidoroseum*. *Biotechnol Lett*, **17**: 943-948.
- 5) GavriloVA VP and Falina NN (1975): Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes* (Fr) Sing. *Mikol Fitopatol*, **9**: 431-433.
- 6) Haverkate F and Traas DW (1974): Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb Haemost*, **32**: 356-365.
- 7) Ikekawa J, Nakamishi M, Uehara N, Chihara G and Fukuoka F (1968): Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann*, **59**: 155-157.
- 8) Kim BK, Kim JS, Choi EC, Kim HR, Lee KL, Lee CO, Chung KS and Shim MJ (1983): Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XXXVII). *Kor J Mycol*, **11**: 151-157.
- 9) Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK and Kong IS (1997): Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish. *J of Ferment and Bioengin*, **84**(4): 307-312.
- 10) Kim HW, Kim YH, FU CX, Nam KS, Lee SJ, AN HS, Jeong EH, Yun SH, Sung SK, Lee SJ and Hyun JW (2001): *In vitro* Antitumor activity of Ergosterol Peroxide isolated from *Cordyceps militaris* on cancer cell lines from Korea patients. *Kor J Mycol*, **28**(1): 61-66.
- 11) Kim JH (2000): Purification and characterization of fibrino-

- lytic enzymes from *Tricholoma saponaceum*. *Kor J Mycol*, **28(1)**: 60-65.
- 12) Kim JH, Lee HY, Yoo KH, Kim YS, Seok SJ and Kim YS (1998): The Screening of fibrinolytic activities of extracts from Mushrooms in Mt. Chiak. *Kor J Mycol*, **26**: 589-593.
- 13) Kim JH and Kim YS (1998): Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*. *Kor J Mycol*, **26(4)**: 583-588.
- 14) Kim JH and Kim YS (1999): A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci Biotech Biochem*, **63(12)**: 2130-2136.
- 15) Kim SH (1998): New trends of studying on potential activities of Doen-Jang. *Korea Soybean Digest*, **15(1)**: 8-15.
- 16) Kim YT, Kim WK and Oh HS (1996): Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from *ChungkookJang*. *Appl Environ Microbiol*, 2482-2488.
- 17) Lee JW, Baek SJ, Bang KW, Kim YS, Kim KS and Chun UH (2001): Immunomodulatory activities by difference in molecular size of the proteoglycan extracted from *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor J Mycol*, **29**: 15-21.
- 18) Lowry OH, Rosenbrough NJ and Randall AJ (1951): Protein Measurement with the folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 19) Mihara H, Nakajima N and Sumi H (1993): Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotech Biochem*, **57(10)**: 1730.
- 20) Mihara H, Sumi H, Yoneta T, Mizumoto H, Ikeda R, Seiki M and Maruyama M (1991): A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn J Physiol*, **41**: 461.
- 21) Park SS, Lee KD and Min TJ (1995): Study on the Screening and Development of Antibiotics in the Mushrooms. - The Screening of Bacterial Antibiotics in Basidiomycetes (I). *Kor J Mycol*, **23(1)**: 28-36.
- 22) Park YD, Kim JW, Min BG, Seo JW and Jeong JM (1998): Rapid purification and biochemical characteristics of *Lumbricinase III* from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol Lett*, **20(2)**: 169-172.
- 23) Rhee SD, Cho SM, Park JS, Han SB, Jeon YJ, Kim HM and Kim GP (1999): Chemical composition and biological activities of immunostimulants purified from alkali extract of *Poria cocos* sclerotium. *Kor J Mycol*, **27**: 293-298.
- 24) Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H and Muraki HA (1987): A noble fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, **43**: 1110-1111.
-