| 국내 · 외 기술정보 |

버섯의 항암기능 다당류 : 그 분리공정, 구조적 특성 및 항암활성에 대한 고찰

이 경 애
식품융복합연구본부 기능성연구단

버섯은 식용 및 약용 자원으로서 평가되어 왔으며, 많은 버섯 종에서 항암 물질이 확인되었다. 다당류는 가장 잘 알려지고 강력한 버섯유래의 항암 및 면역조절 기능의 물질이다. 지난 30년간 버섯 다당류의 분리공정, 구조적 특성 및 항암활성이 많이 연구되었으나, 활성성분의 고차구조나 화학조성과 항암활성간의 연관성은 아직 잘 확립되어 있지 않다. 이러한 연구는 아직 많은 실험실에서 진행 중 이며, 특히 항암성분으로서 다당류의 역할에 대해 많은 논쟁이 있다. 본 고찰의 목적은 유용한 정보를 요약하고, 당 연구 분야의 현재 연구 내용을 미래의 방향에 반영하고자 함이다.

Ⅰ. 서론

중국과 일본 등의 아시아 국가에서는, 영지(Ganoderma lucidum), 표고(Lenti nus edodes), 흰목이(Tremella fuciformis) 버섯과 같은 버섯류가 수백년간 채취, 배양되고 사용되었으며 식용과 약용 자원으로 여겨지고 있다. 식품과 약용 성분으로서 버섯에 대한 대부분의 전통적 지식은 이들 버섯종으로부터 유래한다. 전통적으로 버섯은 살이 많고, 우산형인 대형 균류의 자실체로서 정의되어 왔으며, 산뜻한 향과 질감으로 아시아 사람들에게는 2000년 이상 사용되어 왔다(Miles & Chang, 1997; Wasser, 1997). 문헌에 따르면 "버섯"이란 말은 다음과 같이 주로 여겨졌다: "육안으로 볼 수 있고 손으로 집을 수 있을 정도의 확실한 자실체를 가진 대형 균류"(Chang & Miles, 1992). 확실한 자실체를 가진 대형 균류는 통상 담자균류이며 드물게 자낭균류로 구성된다. 자낭균류인 트뤼플(Tuber 속)과 모렐(morel)자실체의 인공재배가 보고는 되었으나 자낭균류 버섯의 상업적인 재배는 아직 성공하지 못했다 (Hawksworth, 1998). 그러므로, 본 논문에 언급된 모든 버섯종은 담자균류에 속한다. 담자균류 버섯의 생체활성은 Lucas에 의해 1957년도에 처음 확인되었다(Lucas, 1957). Lucas는 종양세포인 Sarcoma S-180에 확실한 억제효과를 나타내는 물질을 그

물버섯(Boletus edulis)으로부터 분리하였다. 1966년도에 연구가 더욱 발전되어, Gregory는 200 여 종의 담자균류 버섯종의 자실체와, 버섯에 따른 적절한 액상발효에 따른 7000 여 배양배지로부터 활성물질을 분리하였다(Greg ory, 1966). 이들 활성 물질의 항암성 측정은 3종의 설치동물 모델에서 시행되어, 22 버섯종과 50 배양배지에서 분리한 다당류가 Sarcoma S-180, adenocarcinoma 755, leukemia L-1210 등의 종양 세포에 대한 억제효과를 보이는 것으로 나타났다. 그때부터, 과학자들은 G. lucidum(Miyazaki & Nishijima, 1981; Mizuno, 1997), Poria cocos(Kanayma, Togami, Adachi, Fukai, & Okumoto, 1986), L. edodes(Ch ihara, 1969; Chihara, Hamuro, Maeda, Arai, & Fukuoka, 1970; Hobbs, 2000), Cor iolas versicolor(Hiroshi & Takeda, 1993), Grifola frondosa(Cun et al., 1994; Mizuno, Ohsawa, Hagiwara, & Kuboyama, 1986; Mizuno & Zhuang, 1995), Auric ularia auricular-judae(Ukai et al., 1982, 1983) 등으로부터 항암 버섯 다당류를 분리해 내었다. 표 1에는 특정적인 버섯 다당류의 기원, 유형, 생체활성을 나열한다. 생체활성을 가진 다당류는 균류의 생활주기에 따른 3가지 형태인 균사체, 자실체, 균핵에서 모두 분리될 수 있다. 표 1에 나열된 28 종은 지난 30 년간 매우 많이 연구되었다. 그 중에서, 수종의 다당류와 다당류 결합체는 항암요법을 받는 환자의 임상적 치료를 위해 상업화되었다. Schizophyllan, lentinan, grifolan, krestin(다당-펩티드 결합체)과 PSK(다당-단백질 결합체)가 이런 것들이다. 버섯으로부터 분리된 천연 항암 다당류들은 여러 다른 당쇄결합을 갖거나, 단백질이나 펩티드와 결합되어 있는 산성 및 중성 다당류를 포함한다(Cun et al., 1994; Jong, Birmingham, &Pai, 1991; Mizuno& Zhuang, 1995). 기본적인 구조에 더하여, chain conformation과 같은 다당류의 고차구조 또한 항암활성에 중요한 역할을 한다 (Wasser, 2002). 대부분의 다당류는 작용기작이 알려지지 않았고 활성성분의 chain conformation 이 규명되지 않아서, 비특이적 생체활성 물질로서 분류되어 있다. 본 논문은 구조-생체활성 관계, 추출공정, 구조적 특징, 물리적 특성, 항암활성, 세포 메카니즘에 주안점을 두고 이 분야의 최근 연구를 고찰하고자 한다.

Ⅱ. 추출 및 정제 공정

버섯 다당류는 균류 세포벽의 구조적 성분으로서 존재한다. 균류의 세포벽은 두개의 주요 다당류로 구성된다: 하나는 chitin 또는 cellulose의 견고한 섬유질이며, 다른 하나는 매트릭스와 같은 β-glucan, α-glucan, glycoprotein 이다(Ruiz-Herrera, 1956). 수용성의 16 branched β-(13)-glucan인 schizophy llan은 세포벽의 바깥층에 약하게 붙어있어 세포외기질로 분비되는 세포외 다당류이다. 이러한 수용성 glucan은 바깥층을 채워 외부의 압력에 저항한다. Schi zophyllan의 안쪽층 다당류는 알칼리불용성이며 100℃에서 40% KOH에도 녹지 않고 남는다. 치마버섯(Schizophyllum commune)의 안쪽층 다당류는 chitinase를 처리하면 수용성 글루칸이 남는 glucan과 chitin결합체이다(Sietsman & Wessels, 1979; Wessels & Sietsman, 1979). 추출 방법의 선정은 세포벽 구조에 따라 다르다. 열수 추출이 가장 일반적인 방법이다. Mizuno(Mizuno, 1996)는 자실체나 배양 균사체로부터 다당류를 추출하는 효과적인 방법을 개발하였다. 일반적으로, 추출 방법은 버섯 원료에 80% ethanol을 처리하여 저분자

표 1. Source, type and bioactivity of some macrofungal polysaccharides

Fungi source	References	Polysaccharide source	Type	Main bioactivity
Pleurotus tuber-regium	Zhang, Cheung, & Zhang, 2001; Zhang, Chiu, Cheung, & Ooi, 2006; Zhang, Zhang, & Cheung, 2003	Sclerotium, mycelium	β-D-glucan	Hepato-protective, anti-breast cancer
Ganoderma lucidum	Miyazaki & Nishijima, 1981; Mizuno, 1997	Fruiting body, culture broth	Heteroglycan, mannoglucan, glycopeptide	Hyperglycemia, immunomodulating, antitumor, antioxidative, anti-decrepitude
Auricularia auricula	Ukai *et al.*, 1983; Ukai *et al.*, 1982	Fruiting body	Glucan	Hyperglycemia, immunomodulating, antitumor, antiflammatory, antiradiative
Schizophyllum commune	Yamamoto, 1981	Mycelium	Glucan, schizophyllan[a]	Antitumor
Hericum erinaceus	Kawagishi, Ando, & Mizuno, 1990; Mizuno, 1992; Mizuno, 1998	Fruiting body, mycelium	Heteroglycan, hetero-glycanpeptide	Hyperglycemia, immunomodulating, antitumor
Lentinus edodes	Chihara, 1969; Chihara *et al.*, 1970; Hobbs, 2000	Culture broth, fruiting body	Mannoglucan, polysaccharide–protein complex, glucan, lentinan[a]	Immunomodulating, antitumor, antiviral
Sclerotinia sclerotiorum	Palleschi, Bocchinfuso, Coviello, & Alhaique, 2005	Sclerotium	Glucan, scleroglucan (SSG)[a]	Antitumor
Polystictus versicolar	Cui & Chisti, 2003	Fruiting body, culture broth, mycelium	Heteroglycan, glycopeptide, krestin (PSK)[a]	Immunomodulating, antitumor, antiradiative, hyperglycemia, antiflammatory
Grifola frondosa	Cun *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1994; Zhuang, Mizuno, Ito, Shimura, & Sumiya, 1993	Fruiting body	Proteoglycan, glucan, galatomannan, heteroglycan, grifolan[a]	Immunomodulating, antitumor, antiviral, hepatoprotective
Inonotus obliquus	Kim *et al.*, 2005	Fruiting body, mycelium	Glucan	Antitumor, immunomodulating
Agaricus blazei	Mizuno, 1992; Mizuno, 1998	Fruiting body, mycelium	Glucan, heteroglycan, glucan protein, Glucomannan–protein complex	Antitumor
Flammulina velutipes	Zeng, 1990	Fruiting body, mycelium	Glucan–protein complex, glycoprotein	Antitumor, antiflammatory, antiviral, immunomodulating
Ganoderma applanatum	Nakashima, Umeda, & Kanada, 1979	Fruiting body	Glucan	Antitumor
Polypours umbellatus	Yang *et al.*, 2004	Mycelium	Glucan	Antitumor, immunomodulating
Clitopilus caespitosus	Liang, Miao, & Zhang, 1996	Fruiting body	Glucan	Antitumor
Pleurotus citrinopileatus	Wang, Hu, Liang, & Yeh, 2005	Fruiting body	Galactomannan	Antitumor
Trametes robiniophila	Zhang, 1995	Mycelium	Proteoglycan	Immunomodulating, hepatoprotective, anticancer
Tremella fuciformis	Huang, 1982	Fruiting body, mycelium, culture broth	Heteroglycan	Hyperlipidemia, hyperglycemia, immunomodulating, antitumor, anti-decrepitude, anti-thrombus
Tremella aurantialba	Liu, Xie, Su, Han, & Liu, 2003	Fruiting body, mycelium	Heteroglycan	Immunomodulating, hyperglycemia
Pleurotus ostreatus	Solomko, 1992	Fruiting body	Glycoprotein	Antitumor, hyperglycemia, antioxidant
Morchella esculenta	Duncan *et al.*, 2002	Fruiting body	Heteroglycan	Hyperglycemia, antitumor
Omphalia lapidescens	Saito, Nishijima, Ohno, Yadomae, & Miyazaki, 1992	Fruiting body	Glucan	Antiflammatory, immunomodulating
Phellinus linteus	Kim, Choi, Lee, & Park, 2004	Fruiting body	Glucan	Antitumor
Armillariella tabescens	Kiho, Shiose, Nagai, & Ukai, 1992	Mycelium	Heteroglycan	Antitumor
Dictyophora indusiata	Hara *et al.*, 1991	Fruiting body	Heteroglycan, mannan, glucan	Antitumor, hyperlipidemia
Peziza vericulosa	Mimura, Ohno, Suzuki, & Yadomae, 1985	Fruiting body	Proteoglycan, glucan	Immunomodulating, antitumor
Tricholoma mongolium	Wang, Ooi, Ng, Chiu, & Chang, 1996	Fruiting body	Glucan	Antitumor
Cordyceps sp	Hsu, Shiao, Hsieh, & Chang, 2002	Fruiting body, mycelium, culture broth	Glucan, heteroglycan	Antitumor, immunomodulating, antitumor, heperglycemia

[a] Commercially developed polysaccharide products.

물질을 제거하고, 물(100℃, 3h), 2% ammonium oxalate(100℃, 6h), 5% NaOH(80℃, 6h)로 연속적으로 추출한다. 열수 추출로는 수용성 다당류를 추출하며, 알칼리 추출로는 불수용성 다당류를 추출한다. 추출 방법은 다당류의 구조와 수용성에 기반하여 변화될 수 있다. 그러나 기본적으로는 약하거나 강한 추출조건(pH, 온도)으로 세포벽의 바깥층에서 안쪽층까지 세포벽을 부수는 것이다. 추출된 다당류는 ethanol 침전, 분획침전, 초산을 이용한 산 침전, 이온교환수지, gel 여과법과 affinity chromatography 등과 같은 여러 기술의 조합으로 정제하게 된다. Ethanol 침전은 다당류로부터 불순물을 제거한다. 산성 및 중성 다당류의 분리는 DEAE-cellulose column 같은 음이온 교환에 의해 달성될 수 있다. 혼합체내의 중성 다당류는 먼저 적절한 완충액에 의해 용출되며, 산성 다당류는 더 높은 염농도에서 용출된다. 중성 다당류는 gel 여과법과 affinity chromatography 방법에서 α-glucan(흡착분획)과 β-glucan(비흡착분획)으로 더 분리될 수 있다. Affinity chromatography는 생체선택적 흡착과 고정화된 ligand로부터 그 성분을 회수하는 공정이다. 이 공정으로 일부 탄수 화물에 대한 매우 특정적이고 효율적인 정제가 가능하다. Sigma-Aldrich사는 다양한 glycoprotein과 탄수화물에 매우 특정적인 친화성을 갖는 탄수화물결합 매트릭스를 개발하였다(http://www.sigma aldrich.com /Area_of_Interest /Life_S cience / Proteomics and Protein Expr /Protein Analysis/ Chromatography/ Affinity Chromatography.html). L2507과 L5147은 O-linked glycoprotein, 그리고 α-D-galactose를 함유한 glycoprotein의 정제에 사용된다. L8775의 특정성은 glycoconjugates 말단의 α-D-mannosyl 잔기의 비환원성 말단에 있다. L4018은 말단의 α-D-mannosyl과 α-D-glucosyl 잔기에 대해 친화성을 가지고 있으며, gel 여과법에서 α-와 β-glucans 분리에 이용된다. 넓은 다분산도(polydispersity)를 가진 다당류는 단계적인 침전이나 분취용 permeation chromatography에 의해 나뉘어져, 서로 다른 분자량이나 낮은 다분산도를 가진 다당류로 분리될 수 있다. 각각 경우에 특정적인 분획 공정은 분자량, 분지(branch)정도, 분지모양 등과 같은 원료 물질의 다당류 조성에 따라 다르다는 것을 유의해야 한다.

Ⅲ. 구조 및 물리적 특성

1. 구조적 특성 및 분석기법

강한 항암작용을 가진 다당류는 그 화학적 구조가 매우 다르다. 항암 활성은 homopolymer에서부터 매우 복잡한 heteropolymer까지 많은 형태의 다당류에서 보여진다(Ooi & Liu, 1999). 고등담자균류 버섯으로부터 여러 화학 구조를 가진 많은 항암, 면역촉진 다당류가 연구되었으며, 주요 형태가 표 2에 나타나있다. 이들 항암 다당류의 단당 형태에는 glucose, galactose, mannose, xylose, arabi nose, fucose, ribose와 glucuronic acid 등이 포함된다. 어떤 버섯에서는 다당류가 단백질이나 펩티드와 결합하여 다당-단백질이나 다당-펩티드 복합체를 형성하며, 매우 강한 항암활성을 나타낸다(Cui & Chisti, 2003). 잘 알려진 항암 1/3-β-glucans 이외에, 다른 구조를 가진 여러 생리활성의 glucan 등이 표 2에 설명되어 있다. 이들 glucan은 α- 또는 β-linked glucose 단위로 구성된 기본틀을 가지는 선형 또는 분지형 분자이며, 일부는 다른 위치에 붙은 side chain을

표 2. Chemical structures of antitumor mushroom polysaccharides

Polysaccharide	Linkages and types	Mushroom resources	Main chain	Branch	M_w
Homoglucans	(1→3)-β-D-glucan with 1−6 branches	*Lentinan from Lentinus edodes* (Mizuno, 1997)	(1→3)-β-D-glucan	(1→6)-β-	5×10^5
		Schizophyllan from Schizophyllum commune (Yamamoto, 1981)	(1→3)-β-D-glucan	(1→6)-β-	
		Grifola from Grifola frondosa (Zhuang *et al.*, 1994)	(1→3)-β-D-glucan	(1→6)-β-	5×10^5
		Scleroglucan from Sclerotium sclerotia (Palleschi *et al.*, 2005)	(1→3)-β-D-glucan	(1→6)-β-	
		An alkali-soluble glucan from Pleurotus tuber-regium (Zhang *et al.*, 2003)	(1→3)-β-D-glucan	(1→6)-β-	2×10^5
	Linear (1→3)-β-D-glucan	*Auricularia auricula* (Ukai *et al.*, 1983) *Lyophyllum decastes* (Ukawa, Ito, & Hisamatsu, 2000)	(1→3)-β-D-glucan	—	—
	Linear (1→6)-β-glucan	*Armillariella tabescents* (Kiho *et al.*, 1992)	(1→6)-β-D-glucan	—	—
	(1→3)-β-D-glucan with 1−2 or 1−6 branches	*Pachyman from Poria cocos* (Kanayma *et al.*, 1986)	(1→3)-β-D-glucan	(1→2)-β- or (1→6)-β-	1×10^5
	(1→3)-α-glucan	*Armillariella tabescens* (Ukawa *et al.*, 2000) *Linear α-(1-3)-glucan from Amanita muscaria* (Kiho *et al.*, 1992)	(1→3)-α-glucan	—	—
	(1→4)-α-; (1→6)-α-glucan		(1→6)-α-glucan	(1→4)-α-	—
	(1→4)-α-; (1→6)-β-glucan	*Agricus blazei* (Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	(1→6)-β-D-glucan	(1→4)-α-	—
	(1→6)-β-; (1→3)-α-glucan		(1→3)-α-glucan	(1→6)-β-	—
Heteroglucans	(1→3)-β-glucuronoglucan	*Ganoderma lucidum* (Mizuno, 1998)	(1→3)-β-glucuronoglucan	Glucuronic acid	5.3×10^4
	Xyloglucan	*Grifola frondosa* (Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang *et al.*, 1994)	Glucan	Xylose	—
		Polyporus confluens (Sugiyama *et al.*, 1992)			—
		Pleurotus pulmonarius (Wasser, 2002)			—
	Arabinoglucan	*Ganoderma tsugae* (Wang *et al.*, 1993)	Glucan	Arabinose	—
	Riboglucan	*Agricus blazei* (Mizuno, 1992; Mizuno, 1998) *Flammulina velutipes* (Zeng, 1990)	Glucan	Ribose	—
	Galactomannoglucan	*Hohenbuehelia serotina* (Ma, Mizuno, & Ito, 1991) *Leucopaxillus giganteus* (Wasser, 2002)	Glucan	Galactose, and mannose	—
	Galactoxyloglucan	*Hericium erinaceus* (Kawagishi, Kanao *et al.*, 1990; Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	Glucan	Galactose and xylose	—
	Mannoxyloglucan	*Grifolan frondosa* (Cun *et al.*, 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang *et al.*, 1994)	Glucan	Mannose and xylose	—
	Xylogalactoglucan	*Inonotus obliquus* (Kim *et al.*, 2005)	Glucan	Xylose, galactose	—

표 2. 계속

Polysaccharide	Linkages and types	Mushroom resources	Main chain	Branch	M_w
Heterogalactan	Glucogalactan	*Ganoderma teugae* (Peng, Zhang, Zeng, & Kennedy, 2005)	Galactan	Glucose	—
	Arabinogalactan	*Pleurotus citrinopileatus* (Wang *et al.*, 2005)	Galactan	Arabinose	—
	Fucogalactan	*Sarcodon aspratus* (Mizuno *et al.*, 2000)	Galactan	Fucose	—
	Mannogalactan	*Pleurotus pulmonarius* (Wasser, 2002)	Galactan	Mannose	—
	Fucomannogalactan	*Grifola frondosa* (Cun *et al.*, 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang *et al.*, 1994)	Galactose	Fucose mannose	—
Other heteroglycans	Xylan	*Hericium erinaceus* (Kawagishi, Kanao *et al.*, 1990; Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	Xylan	—	—
	Glucoxylan		Xylan	Glucose	—
	Mannogalactofucan	*Grifola frondosa* (Cun *et al.*, 1994; Mizuno & Zhuang, 1995; Zhuang *et al.*, 1994)	Fucan	Mannose and galactose	—
	Mannoglucoxylan	*Hericium erinaceus* (Kawagishi, Kanao *et al.*, 1990; Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	Xylose	Mannose, glucose	—
	(1→3)-α-mannan	*Dictyophora indusiata* (Hara *et al.*, 1991)	(1→3)-α-mannan	—	—
	Glucomannan		Mannan	Glucose	—
	(1→2)-β-; (1→3)-β-glucomannan	*Agricus blazei* (Kawagishi, Kanao *et al.*, 1990; Mizuno, 1992; Mizuno, 1998)	(1→3)-β-linked mannose	(1→2)-β-glucan	—
	Galactoglucomannan		Mannan	Galactose and glucose	—
Polysaccharide–protein/peptide complexes	Polysaccharide–peptide complex	*Coriolus versicolor* (Cui & Chisti, 2003)	α-1,4 and β-1,3 glucoside linkage; containing arabinose, rhmanose, but no fucose	Peptide mainly consists of aspartic and glutamic acids	1×10^5
	Polysaccharide–protein complex		α-1,4 and β-1,3 glucoside linkage; containing fucose, but no arabinose and rhmanose	Peptide mainly consists of aspartic and glutamic acids	1×10^5

포함한다. Heteroglucan의 side chain은 glucuronic glucuronic acid, xylose, galactose, mannose, arabinose, 또는 ribose를 포함하며, 다른 조합을 가지고 있을수도 있다. 생리활성 다당류의 또다른 큰 그룹은 heteroglycans이라고 불리우는데, 기본틀의 당 구성분에 따라 galactans, fucans, xylans, mannans로 분류된다. Heteroglycan의 side chains은 arabinose, Mannose, Fucose, galactose, xylose, glucuronic acid, 그리고 glucose moiety를 포함할 수 있으며, 여러 조합이 될 수 있다. 자연적으로 생성되는 다당류의 구조는 매우 변화가 많아서 분석을 위한 일반적인 시험법을 규정하는 것이 어렵다. 복잡한 다당류의 구성 단위(당 잔기에서 유래한)는 매우 비

슷한 구조를 나타내나 그들의 다양성(다양한 결합 형태)은 아미노산의 경우보다도 더욱 복잡하다. 다당류의 기본(일차)구조는 단당류의 조성, 당결합의 형태, 당결합의 위치, 단당류의 순서, 그리고 비당성분의 상태, 수, 위치 등에 의해 결정된다. 다당류의 일차구조 결정을 위한 분석 방법이 표 3에 나타나 있다(Varki et al., 1999). 단당류의 분석은 각 당류의 정확한 몰비를 제공하며, N- 나 O-glycans와 같은 특정한 올리고당류의 존재를 예상하게 한다. 단당류의 조성분석은 모든 당쇄결합의 분해, 단당의 분획, 각 단당의 확인과 정량으로 이루어진다. 몇가지 분석방법이 표 3에 나타나 있다. 1990년 초에, 단당류를 유도체화하지 않는 high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAECPAD) 방법이 기존의 방법을 보완하기 위해 개발되었다. 1990년 중반에는, reductive amination을 이용하여 단당류의 형광 유도체가 개발되었다. 이 기술은 온라인 형광검색을 통한 역상 HPLC의 응용, Gel 전기영동, 또는 고성능의 모세관 전기영동과 함께 일반적인 방법이 되었다. 형광물질을 이용한 다당류의 표식은 fentomole 범위로까지 탐지 감도를 증가시켰다. 당쇄 결합의 위치는 효소 분해, 메틸화 분석과 NMR 분광학에 의해 분석될 수 있다. Exoglycosidic 분해 방법은 높은 특이성의 일부 효소로 제한된다. 메틸화 분석에서, 다당류는 먼저 부분적으로 메틸화된 acetyl alditol로 변하고 나서 분석된다. 나타난 Chromatographic peak 는 retention time 과 electron impactemass spectrometry(EI-MS) 분열

표 3. Common methods for primary structure analysis (modified from reference (Varki et al., 1999, chap. 38))

Primary structure features	Methods	Derivatization	Information obtained
Monosaccharide composition (nature and number of monosaccharide, including absolute configuration of D or L, and ring size of pyranose or furanose)	GLC–FID Developed in early 1960s	Complete derivatization to produce volatile compounds; complete derivatization with chiral aglycone	Type, quantity and D or L configuration of monosaccharide
	GLC–MS Developed in 1970s	Complete derivatization to produce volatile compounds	Type and quantity of monosaccharides
	HPLC Developed in 1980s	Pre- and post-column derivatization: fluoresecent tagging of reducing end	Type and quantity of monosaccharides
	HPAEC-PAD Developed in early 1990s	Not needed	Type and quantity of monosaccharides
Configuration (α, β) of anomeric carbon	IR	Not needed	Configuration of α or β
	NMR	Not needed	Configuration of α or β
Positions of glycosidic linkages	Exoglycosidase digestion with specific enzymes (limited to a few enzymes of high specificity) with proper on-line detectors such as HPLC, HPCE	Fluorescent tag may need to be introduced at reducing end	Presence of residues in α or β linkages to specific positions of the underlying saccharides
	MS	Complete derivatization to produce volatile compounds	Linkage type and position might be inferred from specific fragmentations across sugar rings
	NMR	Not needed	Anomericity of each monosaccharide residue obtained from the chemical shift and coupling constant of H-1 linkage positions deduced from 2-D HMBC experiment
Sequence	NMR	Not necessary	Sequence may be inferred by comparison with standards; sequence deduced from 2-D HMBC experiment

패턴에 의해 확인된다. 이 분석유형은 분지점이 형성되는지, 어떤 잔기가 말단인지, 어떻게 각각의 단당이 치환되는지를 나타내준다. 메틸화 분석으로는 또한 각 단당의 링 크기를 결정할 수 있다. 그러나 메틸화 분석으로는 구성 잔기의 순서와 anomeric configuration 유형(즉 α 또는 β)은 알 수 없다. 각 당 잔기의 anomerity(α 또는 β)는 NMR 분광법에 의해 결정될 수 있다. 복잡한 탄수화물의 구조 분석에 대해 지금까지 꽤 많은 리뷰 논문과 책들이 있었다 (Cui, 2005; Vliegelhart & Dorland, 1983). 충분한(5-20 mg)정도로 다당류가 제공된다면, 특정 단당 잔기의 anomericity는 ^{1}H NMR 분광법에 의해 더욱 확실하게 결정된다. Anomeric resonance는 스펙트럼의 밝은 영역에서 나타나며 특징적인 쪼개짐을 보이는데, α-anomers보다 β-anomers에서 훨씬 크게 나타난다. NMR 분광법은 다른 방법과 연계없이 다당류의 전체 구조 결정을 할 수 있는 유일한 방법이다. 완전한 구조 규명은 올리고당의 완전한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼을 필요로 한다. 완전한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 2차원(2D) NMR 기술, 즉 1H에서의 corre lated spectroscopy(COSY)와 total correlated spectroscopy(TOCSY)과 ^{13}C에서의 Heteronuclear single-quantum coherence (HSQC)로 이루어진다. 2D heteronuclear multi-bond correlation(HMBC)는 순서결정에 중요하다. 그러나 HMBC는 매우 민감한 기법이 아니어서 상대적으로 많은 양의 샘플이 2D ^{1}H13C NMR 실험을 위해 필요하다. 만일 이 실험을 위해 충분한 샘플이 없는 경우에는 다당류 순서는 2D ^{1}H NMR에 의존할 수 밖에 없으며, through-space effects(nuclear overhauser effect, NOEs)를 결합 위치와 순서의 근거로 사용한다. 당단백에서 당부분의 구조 결정은 최근에 진행되었다 (Verbert, 1995). 다당-단백질 복합체는 sodium dodecyl sulfa te-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리되고 polyvinylidene한 difluoride (PVDF) 막에 전사될 때 하나 또는 이상의 확산 띠(band)를 보여 주는데 이것은 탄수화물부분 heterogeneity의 결과이다. 매우 높은 분자량의 일부 다당-단백질, -펩티드는 gel에 침투되지 않고 번져서 이동한다. 그런 경우에는 agarose gel이나 polyacrylamide-agarose gel의 혼합체가 사용될 수 있다. 단백질 염색시약으로 확인후에, 적절한 PVDF막 조각을 차례로 약산(0.2M trifluoroacetic acid, TFA), 2M TFA, 그리고 100℃, 24h 동안 6M HCl로 처리하여 산성 당유, 중성당류와 아미노산을 각각 방출시킨다. N- 과 O-glycans의 완전한 제거는 효소 및 hydr azinolysis, β-elimination, 또는 hydrogen fluoride 처리와 같은 화학적 처리에 의해 이루어진다(Ausubel et al., 1996; Jackson & Gallagher, 1997; Townsend & Hotchkiss, 1997). 최근 기기장치의 높은 민감도는 polyvinylidene diflu oride(PVDF)막에 전사된 다당-단백질 분해물의 온라인 조성분석을 가능케 한다 (Zdebska & Koscielak, 1999). 이 방법은 그 분해물이 쉽게 회수되게 하며 막에 결합된 펩티드나 단백질을 남기는 장점이 있다. 다당류의 기본구조 규명은 사용가능한 기술에 의존한다. 다양한 훈련으로 기술을 발전시켜야 할 것이다. 기본 구조를 위해 모든 정보들을 조합하는 것은 탄수화물 화학자에게 재미있는 도전이 될 것이다.

2. 입체구조(conformation)의 특성과 분석방법

다당류의 입체구조적 특성은 각 단당류의 구조,

단당류간의 연결, 2면각으로 결정되는 공간구조, 당결합의 비틀림각도, 원자간 거리, 동적인 매개변수 등을 포함한다. 대부분 버섯 다당류에서, 액상에서의 2차 및 고차 구조는 원래의 유연성 때문에 쉽사리 결정되지 않는다. 실험적, 이론적 두 시스템에서 다당류 동력학적 특성은 활발한 연구의 영역으로 남아있다. light scattering기술(light scattering, x-ray 및 neutron scattering), x-ray diffraction analysis, small-angle neutron scattering (SANS), atomic force microscopy(AFM) 및 고해상도 NMR 등과 같은 고기능의 기기 발달로 다당류의 입체구조와 3차 구조를 분자 수준에서 연구 하는 것이 가능하다. 분자 기계공학과 컴퓨터화된 energy minimization method에 의해, 다당류의 3D 구조를 모사하고 가시화하는 것이 가능하다.

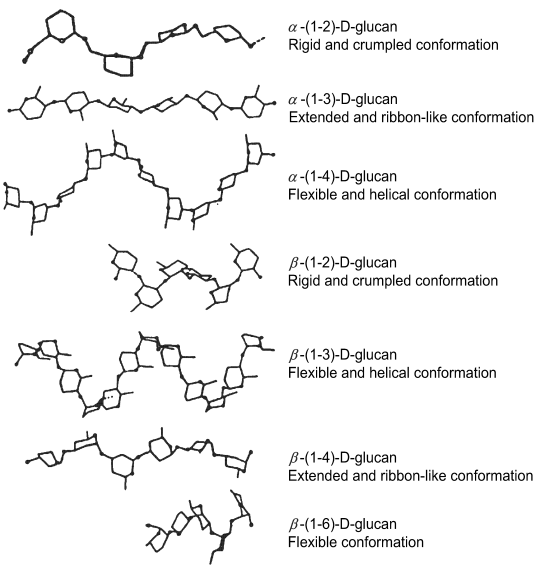

그림 1. Regular α- and β-glucan conformations, deduced from computer outputs. Modified from Rees and coworkers (Rees & Scott, 1971).

3. 입체구조와 chain rigidity

Laser light scatterings(LLS)와 SANS로부터 얻어진 분자 수준의 매개변수에 기초하여 Rees와 그인 동료들(Rees, 1969; Rees & Scott, 1969, 1971)은 선형 및 분지형 pyranosic glucans을 모사하고 가장 가능한 입체구조를 그렸다(그림 1). 그림 1은 다양한 당결합을 가진 glucan의 형태를 요약한다. 14-β-glucan과 13-α-glucan은 비슷한 extended, ribbon-like 형태를 가지고 있다. 13-β-glucan과 14-α-gl ucan은 유연한, 나선형 형태를 가지고 있다. 12-β-glucan과 12-α-glucan은 단단 하고 뒤틀린 형태를 가지고 있다. 많은 가능한 형태를 가지고 있기 때문에 16-β- 과 16-α-glucan은 다른 연결의 glucan과 아주 다르다. 이것은 16 결합을 통해 연결된 잔기가 둘이라기보다는 세개의 결합에 의해 분리되기 때문이며, 그것의 자유로운 회전성이 다른 연결의 것보다 훨씬 높다. 그러므로, 16 결합의 눈에 띄는 속성은 유연성이다. (13)-α-, (12)-α-, (12)-β-, (16)-β- 및 (16)-α-glucan 의 경우를 제외하고, glucan의 형태에 대한 대부분 Rees 등(Rees, 1969; Rees & Scott, 1969, 1971)의 예상은 실험적 분석에 의해 증명되었다. 이것은 주로 앞의 셋은 유기체의 세포에서 함축되는 기능이 약하며 자연상태에서는 자체 형태로 거의 있지 않는다는것 때문이다 (16)-β-과 -α-glucan은 추가적인 분석을 방해하는 전형적인 유연한 사슬 특성을 보여준다. Burton & Brant(Burton & Brant, 1983)은 다양한 결합을 가진 glucan의 입체구조적 분석에 energy함수를 도입하였다. 그들은 chain rigidity를 설명하기 위해 characteristic ratio(CN), persistence leng th(q) 및 configuration entropy(DSc)

를 포함하는 분자수준의 매개변수를 계산했다. 일부 glucan의 분자 매개변수가 표 4에 나타나 있으며, 그 extension과 유연성의 양적 비교를 할 수 있다. q값(q값이 클수록 chain rigidity 높음)에 의하면, glucans의 chain rigidity 순서는 다음과 같다: (14)-β- > (13)-α- > (14)-α- > (13)-β- > (16)-α- > (16)-β- . 이러한 결론은 Rees (Rees, 1969)의 것과 일치한다.

4. 나선형 구조

나선형 구조는 항암 버섯 다당류에 존재하는 중요한 구조이다. 암의 치료에 사용되어온 6개 버섯 다당류는 용액에서 3중 나선형 형태를 가진다. 이것들은 schizophyllan(Kashiwagi, Norisuye, & Fujita, 1981; Sato, Norisuye, & Fujita, 1983; Yanaki, Norisuye, & Fujita, 1980), scleroglucan(Sato et al., 1983), le ntinan(Saito, Yoshioka, Yakoi, & Yamada, 1990), curdlan(Saito et al., 1990), cinerean(Gawronski, Aguirre, Conrad, Springer, & Stahmann, 1996; Gawronski, Conrad, Springer, & Stahmann, 1996; Gawronski et al., 1997)과 (13)-β -D-xylan(Itou, Teramoto, Matsuo, & Suga, 1986)이다. 목이버섯(Aur icularia auricula)에서 분리한 선형 수용성 (13)-β-D-glucan은 용액에서 단일 나선형 사슬로 존재하나 역시 매우 강한 항암활성을 보였다(Zhang & Yang, 1995). 나선형 형태는 세포내에서 생물학적 인식에 중요한 역할을 함으로써 매우 중요한 요소로 고려되었으며, 그 구조와 구조변이에 대한 기본적인 이해가 의약적 응용을 위해 중요하다. 3개의 β-(13)-glucopyranosides 당 1개의 1/6 분지를 가지는 기본 구조의 (13)-β-D-glucan인 schizophyllan은 물에서 3중 나선구조를 가지는 것으로 나타났다 : the molecular parameters of 2170 nm^{-1} for molecular weight per contour length(ML), 150 nm for persistence length(q) and 0.30 nm for distance per turn of helix(h)(Kashiwagi et al., 1981). Schizophyllan은 물에서 3중 나선구조를 나타낼 뿐 아니라 dimethylsulfoxide(DMSO)에서는 random coil 구조를 나타내었다(Sato et al., 1983). 물이 DMSO에 추가되면, schizophyllan의 단일 사슬은 수소결합을 형성하여 뭉친다. 별도로 McIntire and Brant (McIntire & Brant, 1999), Young and Dong (Young & Dong, 2000)은 많이 희석된 용액에서 renaturation process를 통해 3중 나선 구조가 회복됨을 밝혔다. 3중 나선의 분리와 재형성은 3중 나선 다당류와 DNA/RNA간의 상호작용을 연구하도록 고무하였다 (Anada et al., 2004; Koumoto, Mizu, Sakurai, Kunitake, & Shinkai, 2004; Yang et al., 2005; Mizu, Koumoto, Kimura,

표 4. Quantitative comparison of extension and flexibility of several glucans

Polysaccharides	C_∞	q	ΔS_c	Description of conformation
α-(1-3)-D-glucan	32	70	0.15	Extended conformation, no pseudohelicity
β-(1-3)-D-glucan	3.1	15	1.1	Pseudohelical trajectory
α-(1-4)-D-glucan	5.0	28	−1.1	Pseudohelical trajectory, moderately compact chain
β-(1-4)-D-glucan	100	290	0.30	Extended conformation
α-(1-6)-D-glucan	1.5	7	4.0	Great randomness and tortuosity, frequent and random change in direction
β-(1-6)-D-glucan	1.7	6.9	3.4	Great randomness and tortuosity, frequent and random change in direction

Characteristic ratio (C_∞), persistance length (q) and configuration entropy (ΔS_c, cal/Kmol residue).

Sakurai, & Shinkai, 2004). Sakurai는 DMSO를 물에 첨가하여 분자간 수소결합을 방해함으로써 schizophyllan을 단일 사슬로 분리시켰다(Bae et al., 2004). 그 단일 사슬은 renaturation을 위해, polynucleotides(poly(C))를 포함한 수용액에 첨가하였다. 두 개의 단일 사슬이 한 poly(C)사슬을 포함하여 새로운 3중 나선 복합체를 형성할 수 있다는 것이 발견 되었다. 복합화 과정은 매우 화학량론적(stoichiometric)으로 진행되어 2 schizophyllan 단위체와 3 poly(C)단위체가 복합체에 결합된다(Sakurai, Mizu, & Shin kai, 2001). X-선 결정학적인 연구로부터의 결과 새롭게 형성되는 3중 나선 복합 체는 원래 다당류와 분자의 매개변수면에서 아주 비슷했으나 견고성이 더 높아 좋은 AFM 스펙트럼이 기대될 수 있다는 것을 나타내었다(Mizu, Koumoto, Kimura, Sakurai, & Shinkai, 2003). 이 흥미로운 발견은 과학자들이 3중 나선 다당류와 DNA 및 RNA의 상호작용을 통해 생물학적 기능을 연계하도록 한다. 일부 일본 과학자들은 schizophyllan의 단일 사슬이 poly(C), poly(A), poly(dA), poly(dT) 와는 거대분자 복합체를 형성하나, poly(G), poly(U), poly(I), poly(dG), poly (dC)와는 복합체를 형성하지 않는다는 것을 알아내었다(Saenger, 1984, chap. 6). 이 nucleotide specificity는 전자의 nucleotide들이 hydrogen-bonding site를 가지고 있지 않고 후자의 것들은 그 hydrogen-bonding site 를 분자내 결합에 사용하기 때문에 수소 결합이 복합체 형성에 필수적인 증거를 보여준다(Numata et al., 2003; Saenger, 1984, chap. 6). 이러한 특성은 schizophyllan의 단일 사슬이 2중 사슬 poly(C)/poly(G)의 poly(G)처럼 행동할 수 있다는 것을 이야기한다. 이러한 사실들은 anti-sense DNA drugs, nonvirus vectors, affinity chroma tography 등의 미래 유전공학에서 다당류 응용의 새로운 장을 열었다(Numata et al., 2003). 또다른 나선형 버섯 다당류인 lentinan (Bluhm & Sarko, 1977)의 X-선 회절분석은, 매 5개의 (1(3)-β-D-glucan에 2개의 1/6 분지를 갖는 (1(3)-β- D-glucan인 결정형 lentinan에 5개의 유형, 즉 1개의 단일나선, 2개의 이중나선, 2개의 삼중나선을 예상케 했다. Xu 등(Xu, Zhang, Zhang, & Wu, 2004)은 lentinan이 0.5M NaCl수용액에서는 3중 나선이며 DMSO에서는 단일 나선으로 현저하게 존재한다는 것을 LLS와 AFM (atomic force microscopy)에 의해 확인하였다. Zhang 등(Zhang, Zhang, & Xu, 2005)은 또한, 이 glucan의 3중 나선-단일 나선- random coil의 동적인 전이를 관찰했다. 3중 나선 형태를 가지는 다당류는 인체의 유방암(MCF-7), 전골수성 백혈병(HL-60), 간암(HpG2)과 같은 암의 치료를 위해 임상 적용되었다. 그들의 형태와 3차원 구조의 규명은 그 생물학적 기능을 이해하는데 중요할 것이다.

5. 입체구조 분석 방법

Chemical shifts, coupling constants, nuclear overhauser effects (NOEs), relaxation time과 같은 매개변수를 갖는 고해상도 NMR은 당류의 형태와 3차 구조를 연구하는데 적합한 방법이다. Coupling constants는 비틀림각도 등급 결정에, NOE 측정(Xu & Allen, 1996)은 근접한 proton 간 거리 결정에 사용된다. Relaxation time 측정으로는 용액 내 분자의 mobility와 behavior에 대한 정보를 얻는다. X-선 회절 방법은 보통 다당류의 결정구조를 묘사하는데 이용된다. 대부분의 다당류는 부정형이며 드물게 결정화한다. 단지 고차

구조에 견고성을 가지는 일부 나선형 다당류만이 결정을 형성하여 x-선 회절 분석을 할 수 있다. 대부분의 경우에서, x-선 회절 측정은 농축된 다당류 용액으로부터 제조된 섬유나 필름 형태를 사용하여 수행된다. 섬유 제조 중에, 그 분자는 나선축에 거의 평행하게 정렬된다. 이러한 형태 구성이 인위적일지라도, 얻어진 정보는 용액에서 다당류의 정연한 구조를 이해하는데 도움이 된다. 전형적인 x-선 회절 분석은 나선의 반복공간, 나선의 나사 대칭성, unit cell dimensions 및 lattice type 과 같은 나선 구조에 대한 정보를 제공할 수 있다. 그러나 x -선 자료의 해석은 관련된 단당이나 올리고당의 결정 구조로부터 나온 입체화학적 정보를 사용하는 분자의 모델링 분석을 요구한다(Rao, Qasba, Balaji, & Chandrasekaran, 1998, chap. 2). x-선 회절 구조의 예로서 curdlan(Deslandes & Marchessault, 1980)과 (13)-α-D-glucan(Ogawa, Okamura, & Sarko, 1981)이 있다. AFM은 지난 수십년간 고분자의 형태를 측정하는 중요한 방법이 되었다(Ando et al., 2001). AFM은 생리학적 환경과 비슷한 상황 아래에서 단백질, DNA, 다당류와 같은 생체 고분자의 모양과 구조를 직접적으로 연구케 하는 특정한 원자 probe를 사용한다. 생체물질의 현미경 관찰 중 많은 부분이 DNA 이중나선(Hansma, Laney, Bezanilla, Sinsheimer, & Hansma, 1995)에서 진행되었다. 단백질과 DNA에 비교해서, 다당류의 AFM 스펙트럼은 복잡한 구조, 특히 고분자 사슬에 분지와 비당 부분이 있으면 얻어지기 힘들다. 또한 probe 끝 반경이 나선의 간격보다 일반적으로 더 크다는 것, 분자의 구조가 유동적이라는 것, 이미지화 작업중에 변형되는 것 등에도 어려움이 있다. 성공적인 관찰은 AFM에 의해 상이 만들어질 수 있는 매우 견고한 구조를 가진 일부 3중 나선 다당류로 제한된다(Camesano & Wilkinson, 2001; McIntire & Brant, 1998). McIntire(McIntire & Brant, 1998) 와 Stokke(Stokke, Elgsaeter, & Kitamura, 1994)과 Zhang 등(Zhang, Chen et al., 2005)은 각각 AFM으로 세개의 3중 나선 (13)-β-D-glucans(scleroglucan, schizophyllan, lentinan)를 관찰하였고, 그들은 희석 용액의 특성으로부터 자연 상태의 glucan은 막대 형태를 나타내는 것을 알아내었다. 그러나 그 해상도는 이들 다당류의 나선도(helicity)를 관찰 하기에 충분하지 않았다. Kunitake & Ohira (Kunitake & Ohira, 2002)도 schi zophyllan 분자의 AFM 관찰로 나선의 패턴을 보고하였다. 그러나 관찰된 나선도는 결정학적인 자료와 일치하지 않았다. 전술한 바와 같이, schizophyllan의 단일 사슬이 DNA/RNA와 아주 견고한 결합체를 형성하면 좋은 AFM 스펙트럼이 기대될 수 있다. 이 발견은 AFM을 사용하여 다당류의 나선 구조를 직접적으로 관찰하는 좋은 방법을 제공하였다. McIntire (McIntire & Brant, 1998)는 기본적으로 16 분지 (13)-β-D-glucan의 구조를 가지는 scleroglucan의 3중 나선 구조를 성공적으로 관찰하였다. 그들은 또 이 다당류에 열을 처리하면 3중 나선-단일 나선-random coil로 전이를 한다는 것을 관찰했다. 더욱이, 최근의 실험(Piotr, Hongbin, Andres, Oberhauser, & Fernandez, 2002)에서 보면 force field이 전통적인 NMR이나 X-선 결정학 기술로 관찰할 수 없었던 이들 분자의 구조적 전이를 나타내는 것을 증명했다. 그러므로, AFM은 다당류의 분지와 분지의 길이, cross-linked network, 동적인 과정을 분석하는데에 더욱 적용되어야 한다. LLS와 SAXS(small-angle x-ray scattering)는 용액 내 고분자 사슬을 특징짓는데 널리 이용되어 왔다. 중량 평균분자량

(Mw), 회전반경($<s^2>^{1/2}$), 2차 virial coefficient (A2) 등도 측정될 수 있다(Johnson & Gabriel, 1994). 고분자의 모양은 구형이든 random coil 이든, 막대형태든 $<s^2>^{1/2}$ 나 분자량함수 [η]의 자료로부터 분석할 수 있다. 이러한 자료들은 unperturbed wormlike chains 에 대한 Yamakawa 이론에 의해 분석함으로써 molecular weight per contour length(ML), persistence length(q), distance per turn of helix(h)과 같은 분자수준의 매개변수를 제공할 수 있다. Small-angle neutron scattering(SANS)는 순수/혼합 고분자, phase-separated systems, miceller suspensions, 용액 특히 농축된 용액 등의 여러 고분자 시스템을 분석하는 유용한 방법이 되었다 (Higgins & Benoit, 1997). light scattering 과 달리 이것은 한정된 경우에만 유용하다. 중수소에 의해 labeling 된 고분자, 즉 중수소화된 고분자의 straight synthesis가 요구된다. 그래서 SANS는 LLS로 실패하는, 예를 들면 miceller suspensions 과 같은 불투명한 시스템으로 light scattering pattern 이 복잡한 경우에 적합하다. LLS 와 마찬가지로, SANS는 그 시스템의 정적인 구조에 대한 정보를 제공하나, 분자의 길이는 더 작다. 컴퓨터 프로그램으로 기본 구조에서부터 3D 구조를 산출하는 것이 개발되어 왔다 (Tvaroska, 1989). 컴퓨터 모델링은 연관된 다당류에서 고분자 골격 원자간의 공간적 상호작용(steric interactions)의 입체구조적 효과를 분석하는데 이용되었다. 그래서 그 입체구조의 99%는 배제되고 각 다당류중 남은 것들이 함께 놓여진다. 간단히 말하면, 그 시뮬레이션은 4 단계를 가진다(Perez, Kouwijzer, Mazeau, & Engelsen, 1996). 첫번째 단계는 단당류의 입체구조에 대한 묘사와 repeating unit에 적용되는 입체 공간의 정확한 묘사로 시작한다. 이 결과는 두번째 단계에 사용되며, 중간 단당체의 크기와 상대적 견고성 때문에 특정 연결부위에서의 회전이 어떤 조건에서는 가장 근접된 상호작용에도 독립적이라는 가정에 근거한 부정형의 고분자를 나타내게 된다. 세번째 단계에, 그 적절한 모델링 기술은 다당류 가닥(strand)의 ordered state 를 만드는 데 이용될 것이다. 그리고 나서, 열역학적으로 안정한 다중 가닥의 정렬을 확인하기 위해 다중 나선의 형성을 시도할 수 있다. Ordered states에서의 다당류 3D 구조 결정에 대한 최종적인 단계는 나선들과 대상 분자간의 가능한 상호작용의 조사이다. 분자 시뮬레이션은 예비적인 자료 분석을 통해 구조와 기능 사이의 의미있는 연관성을 자동적으로 찾을 수 있게 한다. 구조-기능이나 구조-특성의 연관성은 구조적 변경에 의한 변화를 예측하고 정형화하는데에 이용될 수 있다.

Ⅳ. 항암작용과 세포기작

100년전 일부 다당류가 암환자의 완전한 회복을 유도할 수 있다는 것이 발견되면서부터 종양과 암의 치료에서 다당류의 중요성이 인식되었다 (Nauts, Swift, & Coley, 1946). 1960년대에 Chihara (Chihara, 1969)에 의해 거대진균 다당류가 항암작용이 있다고 발표된 후, 여러 연구자들은 강한 항암활성을 가진, 구조적으로 다양한 다당류를 분리하였다. 전통적인 항암 약물과 달리 이 물질들은 숙주의 여러 면역반응을 활성화시켜 항암효과를 나타냄으로써 신체에 해를 주지 않는다(Wasser & Weis, 1999). 버섯 다당류는 Sarcoma 180 solid cancers, Ehrlich solid cancer, Sarcoma 37, Yoshida sarcoma, Lewis lung carcinoma 등

많은 종양에 광범위하게 억제효과를 나타내었다 (Wasser & Weis, 1999). 버섯 다당류가 항종양 효과를 나타내는 기작은 다음과 같이 제시될 수 있다. 1) 약용 버섯에서 분리된 다당류의 경구투여에 의해 암 발생을 억제 **(암 예방 작용)** 2) 생겨난 종양에 대한 면역성 증강 **(면역증강 작용)** 3) 종양 세포의 괴사를 유도하는 직접적인 항종양 작용 **(직접적 종양억제작용)** 약용 버섯 다당류의 **암 예방작용**은 느티만가닥버섯(Hypsizygus marmoreus)에서부터 발견되었으며 그 기작은 다당류의 면역보강 (immunopotentiation)작용 때문이었다(Ikekawa, 2001). 약용 버섯 다당류의 암 예방작용은 일본의 팽이버섯(Flammulina velutipes), 브라질의 신령버섯(Agaricus blazei)과 같은, 주로 약용 버섯을 재배하는 농부들에게서 관찰되었다(Ikekawa, 2001). 이 농부들의 암 사망율은 일반인보다 40%정도 훨씬 낮았다. 그리하여, 종양 접종전에 팽이버섯과 신령버섯의 다당류를 식이에 투여한 쥐와 정상 식이의 대조군 쥐에 대한 동물실험이 수행되었다. 실험 후에, 시험군 식이의 발암 개체 수와 대조군에서의 발암 개체수를 비교하였다(Ikekawa, 20). 암 발생 개체의 감소로서 다당류의 암예방 작용을 확인할 수 있다(01). 버섯 다당류는 주로 숙주생물의 면역반응을 활성화함으로써 항종양작용을 나타낸다(**면역증강작용**). 바꾸어 말하면, 버섯 다당류는 직접적으로 종양 세포를 죽이지 않는다. 버섯 다당류는 숙주의 중요한 시스템 전부 또는 일부를 지원하여 다양한 생물학적 스트레스에 적응하고 비특이적 활성을 나타내도록 돕는다. 버섯 다당류는 어떤 해도 발생시키지 않고 신체에 부가적인 스트레스도 주지 않아 biological response modifier로 여겨진다. 면역증강작용은 많은 버섯 다당류에서 발견되었다. 버섯 다당류는 종양크기를 50% 이상 줄이며 종양발생 쥐의 수명을 연장시키는 것으로 나타났다(Wasser, 2002). Lentinan은 종양 크기를 90% 이상 축소시키거나, 대부분의 시험동물에서 완전한 회복을 보였다. 또한 동종(allogenic)종양 뿐 아니라 여러 공동(synergic) 및 자생적(autochthonous) 종양에도 탁월한 항종양 활성을 보였다(Wasser, 2002). Schizophyllan은 Sarcoma 180의 고형암이나 복수(ascite)암 모두에 항종양 작용을 나타내었으며, Sarcoma 37 고형암, Erlich sarcoma, Yoshida sarcoma, Lewis lung carcinoma 에도 작용을 나타내었다(Wasser, 2002). 면역증강작용 실험의 대부분은 쥐에 종양세포를 접종하여 수행되었다(Ooi & Liu, 1999). 다당은 종양 발달후 짧은 기간동안 쥐의 복강에 투여되었다. 종양 크기의 축소나 회복되는 시험 동물의 수, 그리고 생존 기간의 연장 등이 억제효과로 즉 면역증강효과로서 측정되었다. 숙주 매개성 면역조절 작용(host-mediated immunomodulating activity)이 많은 연구에서 증명되었다. 다당류의 항종양 효과는 neonatal thymectomized mice(흉선의존성 면역 시스템이 없는 쥐)에서는 없으며, anti-lymphocyte serum 투여시 급격히 감소한다 (Maeda & Chihara, 1971). 이러한 결과는 다당류의 항종양 작용에 intact T-cell 구성요소가 요구되며, 그 작용은 흉선의존성 면역 메카니즘을 통해 이루어진다는 것을 의미한다. Lentinan의 숙주 매개작용의 가능한 경로가 제안되었으며(Chihara, 1992) 후에 S. P. Wasser(Wasser & Weis, 1999)에 의해 수정되었다. Lentinan에 의한 많은 양의 TNF-a(tumor necrosis factor), IL-1 (inter leu kin-1), IL-3(interleukin-3), IFN(interferon)의 증가 유도는 숙주 방어기작을 위한 immunocompetent cells이 성숙, 분화, 증식 (maturation, differenti ation, proliferation)되도

록 한다(Chihara, 1992). 또한, Lentinan은 종양 발생 숙주에서 helper T 세포의 억제된 활동을 정상 상태로 회복시켜 체액 면역 반응(humoral immune responses)의 완전한 회복으로 이끌 수 있다(Maeda, Watanabe, Chihara, & Rokutanda, 1988). 또한 lentinan에 의한 종양부위의 delayed-type hypersen sitivity반응, 이어진 natural killer cells이나 cytotoxic T lymphocytes와 같은 immune effector cells의 침윤이 lentinan 항종양작용의 주요 기작이라는 것이 보고되었다(Suzuki, Iwashiro, Takatsuki, Kuribayashi, & Hamuro, 1994). 최근에 lentinan이 adenocarcinoma-26 이 발생한 쥐에서 Kupffer cells을 활성화시킴으로써 hepatic metastasis를 억제하는 것으로 나타났다(Taki et al., 1995). 그러므로, 종양 억제에 대해 lentinan의 어떤 면역조절 효과가 종양억제에 가장 중요한지는 이후 밝혀져야 한다. Schizophyllan 은 조성, 항종양작용, 그리고 항종약작용 기작이 lentinan 과 유사하다(Jong et al., 1991). 그러나 schizophyllan에 의한 cytokines 유전자 발현의 kinetics는 peritoneal exudate cell, splenocytes, liver cells 에서 다르다(Nemoto, Ohno, Saito, Adachi, & Yasomae, 1993; Okazaki, Adachi, Ohno, & Yadomae, 1995). 잎새버섯(Grifola frondosa)에서 분리된 Grifolan은 schizophyllan과 기본 구조가 비슷하며, IL-6, IL-1과 TNF-a mac rophage의 mRNA level을 증가시키는 macrophage 활성을 촉진시킨다(Adachi, Oka zaki, Ohno, & Yadomae, 1994). **직접적인 종양억제작용**이 많은 버섯 다당류에서 보고되었다(Wang et al., 2002). *In vitro*에서 종양종에 대한 다당류의 증식억제 효과는 명확하지 않지만, 일부 연구에서 다당류와 종양세포를 같이 배양했을때 종양세포 내의 signal 발현이 변화되는 것으로 나타났다. 이때 세포주기가 억제 되고 세포괴사가 발생할 수 있으며, 이것은 *in vitro* 에서 다당류의 증식억제 작용을 설명한다(Chen & Chang, 2004; Li, Kim, Kim, & Park, 2004; Lin et al., 2003). 구름버섯(Trametes versicolor)에서 추출된 다당-펩티드 복합체인 PSP가 유방암 세포인 MAD-MB-231의 증식을 현저히 줄인다는 것이 보고되었다(Chow, Lo, Loo, Hu, & Sham, 2003). 상황버섯(Phellinus linteus)에서 분리한 단백질 결합 다당인 PBP가 대장암 SW480의 증식을 억제한다는 것도 밝혀졌다(Li et al., 2004). 또한, P. cocos, Lycium barbarum, Cladonia furcata 에서 분리된 다당류가 새로이 증식억제 작용이 있는 것으로 나타났다(Chen & Chang, 2004; Li et al., 2004; Lin et al., 2003; Zhang, Chen et al., 2005). 이러한 결과들은 버섯 다당류가 T 임파구의 증식과 면역보강(immunopotentiation)을 촉진할 뿐 아니라, 지난 30여 년간 연구로 종양 세포에 직접 작용하기도 한다는 것을 말한다(Zaidman, Yassin, Mahajna, & Wasser, 2005). 그러나 암 세포에 대한 다당류의 직접적인 효과는 모르는 것이 많다. 최근에 면역염색법으로 PSP가 p21 발현을 증가시키고 cyclin D1 발현을 감소시키는 것이 확인되었다(Chow et al., 2003). 분자생물학 기술은 또한 P. linteus 유래 PBP의 효과를 연구하는데 이용되었다. PBP의 직접적인 세포독성은 세포괴사의 유도, Bcl-2 감소에 따른 G2/M 세포주기의 억제, cytochrome c의 방출증가, cyclin B1 발현의 감소 등에 의해 이루어진다고 밝혀졌다(Li et al., 2004). Lycium Barbarum 다당류(LBP) 처리는 세포주기 S phase의 억제와 세포괴사유도로 인체 hepatoma QGY7703 세포 성장의 저해를 유도하였다(Zhang, Chen et al., 2005). Pleurotus tuber-regium 유래의 carbox-

ymethylated 다당류(CMPTR)에 대한 이전의 연구에서, CMPTR이 처리된 MCF-7 암세포는 세포주기와 관계된 단백질인 cyclin D1 과 cyclin E의 발현감소와 Bcl-2 발현감소, Bax 발현 증가를 보이는 것을 확인하였다. 이것은 CMPTR이 그 세포 주기를 막고 세포괴사를 생성시킴으로써 MCF-7의 증식을 직접적으로 억제할 수 있다는 것을 이야기한다. 다당류의 직접적인 세포독성에 대한 최근의 연구는 다당류가 양-, 시간- 의존적으로 암세포 증식을 직접적으로 억제하며, p21의 up-r egulation과 cyclin D1의 down-regulation을 통해 이루어진다고 한다. 또한 Bax protein의 pro-apoptosis의 up-regulation으로 암세포의 세포괴사를 직접적으로 유도한다(Zaidman et al., 2005).

Ⅴ. 구조-항종양 활성의 연관성

Glucan 주 사슬의 (13)-β- 결합과 (16)-β- 분지점과 같은 구조적 특성은 항종양 작용에 중요한 요소이다. 주로 16 결합을 가진 β-glucan은 적안 활성을 나타내며, 이는 고유의 유연성으로 인해 너무 많은 입체구조가 가능하기 때문인 것으로 보여진다. 그러나 항종양 다당류는 여러 화학적인 구조를 가질 수 있으며, hetero-β-glucans(Mizuno, Saito, Nishitoba, & Kawagashi, 1995), heteroglycan (Gao, Seljelid, Chen, & Jiang, 1996), β-glucan-protein(Kawagishi, Kanao et al., 1990), α-manno-β-glucan(Mizuno et al., 1995), α- glucan-protein(Mizu no et al., 1995), heteroglycan-protein complexes(Mizuno et al., 1996; Zhuang et al., 1993) 등이 있다. Glucose와 mannose를 포함하는 버섯 다당류는 glucose와 mannose에 높은 특이성을 가지는 인체 macrophage의 다당 수용체에 의해 항종양 작용을 할 수 있다는 것이 밝혀졌다(Lombard, 1994). (1(3)-β-glucan의 3중 나선구조는 면역 촉진작용에 중요한 특성으로 여겨진다. (1(3)-β-glucan은 2중 나선구조와 관련된 다양한 생물학적, 면역약리학적 작용을 나타낸다. 예를 들면, lentinan이 DMSO, urea, NaOH에 의해 변성되면 기본 1차 구조는 유지되나 3차 구조는 상실되고, 항종양효과도 변성이 진행됨에 따라 저하된다(Maeda et al., 1988). 항종양 작용과 3중 나선구조간의 연관성에 대해 동일한 결과가 schiz ophyllan에서도 얻어졌다(Yanaki, Ito, & Tabata, 1986). 그러나, 정확히 어떻게 (13)-β-glucan의 3중 나선구조가 항종양작용에 영향을 주는지는 아직 명확하지 않은 채로 남아있다. Macrophage nitrogen oxide synthesis, limulus factor G activation과 같은 많은 생물학적, 면역약리학적 작용들이 3중 나선구조에 의존한다. 반면 interferon-ɣ,colony stimulating factor(Yadomae & Ohno, 2000) 와 같은 작용들은 3중 나선구조에 의존하지 않는다. (13)-β-glucan의 골격 구조가 3차 구조보다 중요하다는 것이 밝혀졌으며, 이로써 (13)-β-glucan과 골격 구조가 비슷한 (13)-α-mannan이 (13)-β-glucan에 필적하는 항종양 작용을 갖는지 설명할 수 있다. Mizuno는 높은 분자량의 glucan이 낮은 분자량의 것보다 더 효과적인 것으로 나타났다고 하였다. 그러나 고분자량(500-2000 kDa)에 매우 의존적인 약용 기능의 (13)-β-glucan(Mizuno et al., 1996)과 달리 (13)-α-glucuronoxylomannan과 같은 일부 버섯 다당류의 약용 기능은 분자량에 크게 의존적이지 않다. 분자량 53-1000 Da 정도 분자량의 Glucuronoxylomannan을 포함하는 분해산물 분획 도 높은 분자량의 분해산물 분

획정도로 효과적이다(Gao et al., 1996). Gao는 분자량의 차이가 heteroglycans의 활성에 확실한 영향을 주는 것은 아니라고 보고하였다(Gao et al., 1996).

Ⅵ. 향후 전망

다당류는 단당 잔기들의 중합체가 당쇄결합에 의해 연결된, 구조적으로 다양한 고분자 부류이다. 단백질이나 핵산과 비교하여, 다당류는 구조적 다양성에 매우 큰 잠재력을 가지며 생물학적 정보 수행에 있어 높은 기능성을 갖는다(Ohno, 2005). 이러한 다양성은 고등 생물의 세포간 다양한 상호작용의 세밀한 조절 기작에서 많은 유연성을 부여한다. 또 이러한 다양성은 구조적 복잡성을 부여함으로써 또다른 대표적 생체고분자인 단백질과 핵산에 비교하여 훨씬 늦게 연구가 가능하게 하였다(Varki et al., 1999, chap. 38). 미래의 도전분야는 다당류의 3D 구조와 구조-기능간의 관계를 규명하는 것이다. 이것으로 과학자들이 다당류의 생물학적 역할을 밝히고 그 3D 구조에 기반하는 고기능의 항종양 약물을 설계하기 위한 기회를 갖게된다. 이 분야에서 미래에 도전할 것은 고해상도 기기분석 방법에 의해 얻어진 기본 구조에 대한 자료들을 모두 모아 컴퓨터 처리에 의한 방법으로 클러스터를 구성하는 것이다. 이러한 구성은 분지의 정도나 견고성과 같은 구조적 특성이 어떻게 항종양 작용의 특정형태를 나타내는지 이해할 수 있도록 할 것이다. 또한, 화학적 방법이나 분자생물학적기법을 통해 그러한 구조적 특성을 조절하게 되면 특성이 매우 달라질 것으로 예상되는 다당류를 새로 만들수도 있게 될 것이다.

〈출처: M. Zhanga, S.W. Cuia,*, P.C.K. Cheungb and Q. Wanga a Food research program, Agriculture and Agri-Food Canada, 93 Stone Road West, Guelph,Ontario, Canada, NIG 5C9 (Tel.: D1 519 780 8028; fax: D1 519 829 2600; e-mail: cuis@agr.gc.ca)bThe Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, HK, China〉