

천년초에서 분리한 항전이 다당의 구조 분석

최정호 · 신광순[†]

경기대학교 식품생물공학과

Structural Analysis of Anti-metastatic Polysaccharides Isolated from *Opuntia humifusa*

Jung-Ho Choi and Kwang-Soon Shin[†]

Dept. of Food Science & Biotechnology, Kyonggi University, Gyeonggi-do 443-760, Korea

Abstract

To examine the new practical utilization of mucilages in *Opuntia humifusa*, polysaccharides were isolated from *O. humifusa* and their anti-metastatic activity and structural analysis were carried out. In experimental lung metastasis of B16BL6 melanoma cells, prophylactically intravenous (*i.v.*) administration of the crude polysaccharide (CNC-0) from *O. humifusa* significantly inhibited lung metastasis in a dose-dependant manner. The main polysaccharide, CNC-Ia was purified to homogeneity from CNC-0 by two successive column chromatographies using DEAE-Sepharose FF and Sephadex G-100 and its structure was characterized. Molecular mass of CNC-Ia was estimated to be 700 kDa and it mainly consisted of arabinose, galactose and xylose in addition to two minor sugars such as rhamnose and fucose. Methylation analysis indicated that CNC-Ia comprised at least 18 different glycosyl linkages such as terminal Araf, 5-linked Araf, 4-linked Galp and terminal Xylp in addition to three characteristic linkages such as full branched Araf, 3,4,6-branched Galp and full branched Galp. To analyze the fine structure of CNC-Ia, it was sequentially digested by exo- α -L-arabinofuranosidase and endo- β -1,4-D-galactanase. These analyses suggested that CNC-Ia belongs to be a highly branched Type I arabinogalactan which has a (1 \rightarrow 4)- β -galactan backbone with arabinosyl oligosaccharide side chains.

Key words: *Opuntia humifusa*, polysaccharide, anti-metastatic activity, structure, arabinogalactan

서 론

탄수화물은 이제까지 생체 구조물질이나 에너지원으로써의 역할만이 강조되어 왔으나, 최근 세포 표면의 당단백질이나 당지질에 결합해 있는 당쇄(carbohydrate chains)가 세포간의 인식과 접촉을 통하여 세포의 분화, 정보 전달, 감염 및 암화, 암전이 등을 포함한 생명현상에 깊이 관여한다는 사실(1,2)이 밝혀지고 있어 이에 대한 관심이 집중되고 있다. 또한 과거 식이섬유로써 밖에 그 기능을 평가받지 못했던 담자균류, 생약재, 식용식물 및 해조류 유래의 다당류에서 항보체 활성(3), 항종양 활성(4,5), 식작용 증강활성(6) 등의 면역 조절기능과 혈당강하 활성(7) 등 여러 약리작용이 발견되고 있어 주목되고 있는데 이들은 주로 신체의 항상성(homeostasis) 유지와 기능의 조절 역할을 담당하는 biological response modifier(BRM)로써 작용하여 치료효과를 낸다고 알려져 있다. 이들 당쇄 및 다당류가 갖는 생리활성의 규명과 그 작용기구의 해석에는 당쇄구조에 대한 연구가 필수적으로 요구되고 있지만 이에 대한 연구는 타 생체 고분

자 화합물인 단백질 및 핵산에 비해 매우 복잡하여 신속한 연구의 진행이 어려운 부분으로 평가되고 있다(8). 당쇄의 구조 결정은 구성당의 다양성, 배열순서(sequence), 아노머 형태(anomeric configuration), 당류간의 연결위치(linkage position)뿐만 아니라, 분지쇄(branching) 구조와 특정 잔기의 수식 등에 기인하여 상당히 복잡한 양상을 갖게 되어(9) 분석과 응용에 큰 어려움을 안고 있다.

천년초(*Opuntia humifusa*)(10)는 충남지역에서 중소단위로 생산되고 있는 선인장류로서, 길고 굵은 가시가 많고 높이가 약 1~2 m까지 자라는 제주도의 백년초(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)(11)와 달리, 솜털 가시를 가지며 토양에서 약 30 cm 정도로 자라는 특성이 있다. 천년초는 여름에는 수분이 풍부한 지역에서 성장 번식하고, 휴면기인 겨울에는 비닐하우스가 없는 노지에서도 생존하며, 병충해에도 강한 특징을 갖는다고 알려져 있다. 천년초의 가장 큰 특징은 점질 다당을 다량으로 함유하고 있다는 점으로 이를 이용한 가공식품 및 기능성 소재 개발 등이 추진되고 있다. 천년초 추출물의 생리활성에 대한 연구로는 항산화 활성(12), 간 손

[†]Corresponding author. E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr
Phone: 82-31-249-9655, Fax: 82-31-249-9655

상 예방 효과(13), 병원성 식중독 미생물에 대한 항균 효과(14), 항동맥경화 효과(15) 등이 보고되어 있으며, 식품에의 응용연구로는 천년초 분말의 첨가에 의한 식빵의 노화 억제 효과(16)가 보고되기도 하였다. 그러나 천년초 추출물이 타 식물체에서 볼 수 없는 고 점도의 물성으로 인해 개발 및 응용에 큰 어려움이 되고 있다.

최근 저자 등은 천년초의 점질 조다당이 마우스의 폐암전이 모델에서 강력한 항전이 활성을 나타냄을 확인하였으며 따라서 본 연구에서는 이들 결과와 함께 활성물질로 추정되는 천년초 다당을 분리 정제하고, 그들의 구조 분석을 행함으로써 천년초를 새로운 기능성 소재로 개발하기 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 천년초(*Opuntia humifusa*)는 2009년 초 충남 연기군에서 생산된 것을 (주)월드웨이(Cheoneui-myeon, Chungnam, Korea)로부터 공급받아, 토사 일부와 잔가시를 제거하고 물로 세척하여 실험재료로 사용하였다.

일반분석 방법

중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(17)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법(18)으로, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Bradford법(19)으로, 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)의 신속한 정량을 위해서는 thiobarbituric acid(TBA) 비색정량법(20)을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다. 한편 분자량 및 정제도 측정에 사용한 HPLC는 Asahi-pak GS-520+GS-320+GS-220(각 0.76×30 cm, Showa Denko Co., Tokyo, Japan)을 장착한 SP 930D(Young-Lin Co. Ltd., Anyang, Korea)를 사용하여 0.2 M NaCl를 용매로 0.5 mL/min로 용출하였으며 정제다당의 분자량은 standard pullulans(P-800, P-400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5; Showa Denko Co.)를 표준물질로 하여 얻어진 표준곡선과 비교하여 측정하였다. 구성당 분석은 다당시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 121°C에서 1.5시간 가수분해하여 각각 alditol acetate 유도체(21)로 전환시킨 후, GC로 분석하였다. GC의 분석은 SP-2380 capillary column(0.2 μm film, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC ACME-6100(Young-Lin Co.)을 이용하였으며 표준 온도조건[60°C(1 min), 60°C→220°C(30°C/min), 220°C(12 min), 220°C→50°C(8°C/min), 250°C(15 min)]에서 분석을 실시하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비, flame ionization detector(FID)에 대한 반응계수 및 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다. Arabino-β-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위한 β-glucosyl Yariv

reagent[1,3,5-tri-(4-β-glucopyranosyl-oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene, Biosupplies, Parkville, Australia]와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke의 방법(22)에 single radial 겔 확산법으로 측정하였다.

천년초 항전이 다당의 분리 및 정제

(주)월드웨이로부터 제공받은 천년초 생체 500 g에 80% ethanol 1 L를 가하여 마쇄하고 2시간 동안 방치하여 재료 중의 chlorophyll 색소를 용출시킨 후, 5,000 rpm에서 15분간 원심분리(SUPRA 30K, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)하여 상등액을 제거하였다. 천년초 잔사는 재차 80% 및 95% ethanol로 각각 2회 세척하고 그 잔사를 methanol과 chloroform의 혼합용액(v/v, 1:1)과 acetone으로 각각 1회 세척하여 건조하였으며 탈색된 천년초 건조분말(AIR: alcohol insoluble residue) 143 g을 얻었다. AIR은 50배 부피의 증류수를 가하고 상온에서 12시간 용해성 다당류를 추출하였으며, 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 여기에 최종농도가 80%가 되도록 에탄올을 첨가하여 하룻밤 방치한 후, 발생한 침전물을 회수하고 80% 에탄올을 이용, 2~3회 세척하였다. 침전물은 소량의 증류수에 용해하여 Spectra/Por 2 투석막(MWCO: 12,000~14,000, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)을 이용하여 2~3일간 투석을 행하고 동결건조를 거쳐 조다당 시료인 CNC-0(33.3 g, 수율: 6.6%)를 얻었다. CNC-0는 증류수로 평형화된 DEAE-Sepharose FF(Cl⁻ form, 2.5×25 cm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 흡착시킨 후 증류수, 0.05~2.0 M의 NaCl 용액으로 단계적으로 용출시켰으며, 각 용출획분은 투석과 동결건조를 거쳐 8개 획분으로 분획하였다. 이들 중 수율이 가장 양호했던 CNC-I 획분은 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-100(2.5×90 cm, Amersham Biosciences)에 loading하고 동일 buffer를 이용하여 용출시켜 분자량이 상이한 2개 획분, CNC-Ia 및 CNC-Ib로 분획하였다. 이중 고수율 고분자 다당인 CNC-Ia획분을 대상으로 농축, 투석 및 동결건조를 행하여 분석용 정제시료로 사용하였다(Fig. 1 참조).

Methylation analysis에 의한 구조 및 결합위치 결정

다당시료의 결합위치 결정을 위한 methylation analysis는 Hakomori 방법(23)을 실험실 여건에 맞게 일부 변형하여 실시하였다. 건조된 다당 시료 1 mg에 1 mL의 무수 DMSO(dimethylsulfoxide)를 가하고 교반하여 용해시킨 후, 실험실에서 NaH와 DMSO로부터 합성한 500 μL의 methylsulfinyl carbanion(MSCA)를 가하여 4시간 동안 반응시켰다. 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환되도록, 필요한 경우 MSCA를 수차례 첨가하였고 잔존량은 triphenylmethane으로 확인하였다. Methyl화 다당은 Sep-Pak C₁₈ cartridge(Waters Associates, Milford, MA, USA)를 이용, 회수하고

2 M TFA로 121°C에서 2시간 가수분해 후, 환원 및 acetyl화 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하고 GC-MS로 분석하였다. GC-MS 분석은 SP-2380 capillary column(Supelco)을 장착한 Agilent 6890N GC system과 5973N mass spectrophotometer(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 최적온도 조건[60°C(1 min), 60°C→150°C(30°C/min), 150°C→250°C(1.5°C/min)]에서 분석하였다(He 압력: 0.5 mL/min). 메틸화된 시료의 유도체는 GC-MS에 의한 fragment ion 분석과 GC의 상대보유시간을 조합하여 동정하였으며, 각 화합물의 mole%는 peak 면적과 분자응답계수로부터 산출하였다(24).

CNC-Ia의 구조 해석을 위한 효소처리

CNC-Ia의 상세구조를 추정하기 위해서는 구조분석이 용이한 단편으로 분해(25)하여 해석해야 하므로 이를 위해 일련의 효소처리에 의한 가수분해를 행하였다. 이때 사용한 효소는 천연초 유래 다당 CNC-Ia의 구성당 분석 결과를 참조하여 분해에 적절하다고 추정되는 2개 효소[exo- α -L-arabinofuranosidase(exo-Arafase, *Aspergillus niger* 기원, Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland) 및 endo- β -1,4-D-galactanase(endo-galnase, *Aspergillus niger* 기원, Megazyme)]를 선정하였으며 제조사가 제공한 처리조건을 실험실 조건에 맞게 응용하여 사용하였다(Fig. 1 참조).

Exo-Arafase 처리: CNC-Ia 시료 20 mg에 50 mM ammonium formate buffer(pH 4.0)에 용해시키고 1 unit의 exo-Arafase를 가하여 40°C 항온수조에서 48시간 가수분해를 행하고, 100°C로 20분간 증탕하여 잔존 효소활성을 정지시켰다. 이 반응물을 원심분리 하여 얻은 상등액은 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)로 평형화된 SuperdexTM 200 GL column(Amersham Biosciences)을 이용하여 HPLC 상에서 분획하여 분자량 및 구성성분이 상이한 2개 획분, AFN-I과 AFN-II를 획득하였다.

Endo-Galnase 처리: Exo-Arafase 처리에서 얻어진 AFN-I 시료는 50 mM ammonium formate buffer(pH 4.2)에 용해시킨 후, endo-Galnase 10 unit을 가하여 50°C에서 48시간 처리하고 동일 column을 이용, HPLC상에서 분획하여 2개 획분, GN-I 과 GN-II를 얻었으며 이를 CNC-Ia 전체 구조 해석에 사용하였다.

실험동물 및 세포 배양

생후 5~6주령의 자생 BALB/c를 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 분양받아 일주일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. 마우스는 사육조에 5~10마리씩 넣어 온도 23±3°C, 습도 55~70%에서 사육하였으며 물과 사료는 자유 급식 형태로 유지하였다. 종양세포주인 B16-BL6 melanoma는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였으며 배양은 7.5% fetal bovine serum, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-

glutamine이 함유된 Eagle's minimal essential medium 배지(EMEM, Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA)를 이용하여 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기에서 배양하였다.

항전이 활성화

시료의 항전이 활성화는 폐(lung)에 대한 고전이성 종양세포주인 B16-BL6 melanoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다(26). 실험동물로 각각 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종을 위해 B16-BL6 melanoma(4×10⁴ cells) 세포를 정맥 주사(*i.v.*)하였고 시료는 종양 접종 2일전에 각 농도별로 1회 미정맥을 통하여 주사하였다. 종양 접종 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 종양의 군집 수를 측정하였다. 한편, 시료에 의한 항종양 전이 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교하여 산출하였다.

결과 및 고찰

천년초 조다당의 항전이 활성화

천년초를 탈색 처리하여 얻어진 건조분말(AIR)을 냉수 추출하고, 에탄올 침전, 투석 및 동결건조를 행하여 얻어진 조다당 CNC-0를 대상으로 B16BL6 melanoma를 이용하여 폐로의 암전이에 대한 억제 활성을 관찰하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 시료를 투여하지 않은 대조군에서는 평균 99.2개의 전이암 colony가 관찰된 반해, 100, 10 및 1 µg/mouse 농도로 CNC-0를 1회 투여한 군에서는 각각 37.3, 14.0, 7.0개의 colony가 관찰되었다. 이러한 사실은 종양접종 2일전 100, 10 및 1 µg/mouse의 정맥투여로 각각 92.2%, 85.2% 및 61.9%의 유의한 예방적 전이억제 활성을 보인 결과이었다. 식물유래 생체조절물질(BRM)은 종양의 증식 혹은 전이를 억제하기 위한 주요한 도구로 많이 사용되어 왔다(26,27). 실질적으로 BRM들은 외래물질에 대한 숙주의 방어력을 증진시킴으로써 종양에 대한 면역요법제제로 이용하고 있는데(28,29) 마우스를 이용한 종양의 실험전이 모델에서 식물추출물을 포함하는 BRM에 의한 종양의 억제결과는

Table 1. Inhibitory effect of CNC-0 on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation of B16BL6 melanoma cells

| Dose (µg/mouse) | Number of lung metastasis | | |
|-----------------|--------------------------------|--------|------------|
| | CNC-E (prophylactic on day -2) | | Inhibition |
| | Mean±SD | Range | |
| Untreated | 99.2±13.2 | 86~112 | 0.0 |
| 1 µg | 37.3±0.6 | 37~38 | 61.9** |
| 10 µg | 14.0±2.4 | 11~14 | 85.2*** |
| 100 µg | 7.0±0.0 | 7 | 92.2*** |

Groups of five BALB/c mice were administered *i.v.* with the indicated doses of CNC-I two days before *i.v.* inoculation of 4×10⁴ cells. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation. ***p<0.001, **p<0.01, compared with untreated control.

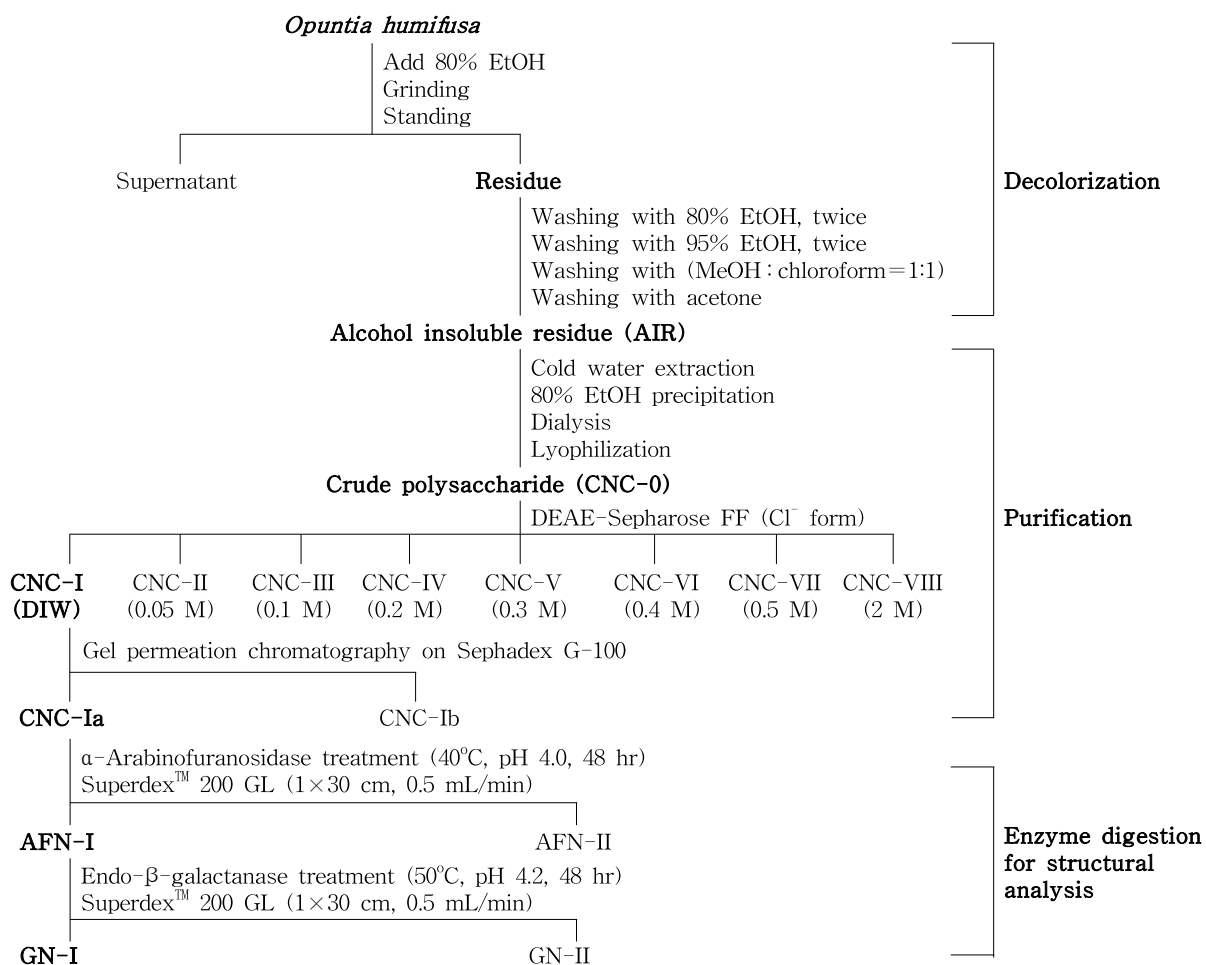


Fig. 1. Scheme for the purification of polysaccharides from *Opuntia humifusa* and sequential enzymatic digestion for structural analysis.

주로 macrophage 혹은 NK-세포 등 비특이적 면역작용세포의 활성화에 기인하는 것으로 보고되어 있다(27,29,30). Table 1의 결과에서 CNC-0의 예방적 암전이 억제활성이 10 및 100 µg의 저농도 혈관투여에 의하여 85% 이상의 높은 전이억제 효과를 보인 결과는 타 식물추출물에 비하여 매우 우수한 결과로 판단된다.

천년초 유래 향전이 다당의 정제 및 화학적 특성

천년초 유래 조다당이 갖는 향전이 활성의 본체를 규명하기 위해 CNC-0를 대상으로 각종 chromatography를 이용하여 정제를 행하고 정제다당의 구조적 특성을 규명하고자 하였다. 천년초 유래 조다당 CNC-0는 DEAE-Sepharose FF를 이용하여 음이온 교환 chromatography를 행하여 비흡착 1개획분 CNC-I과 0.05~2.0 M의 NaCl 용액으로 용출되는 7개의 흡착획분(CNC-II~CNC-VIII)으로 분획할 수 있었다. 본 정제 과정에서 높은 수율을 보였던 CNC-I은 Sephadex G-100을 이용하여 겔 여과를 행하여 분자량이 상이한 CNC-Ia 및 CNC-Ib로 정제할 수 있었다(Fig. 1). 천년초에서 정제한 다당, CNC-Ia는 CNC-Ib에 비해 월등한 수율

로 얻어졌으며 이 획분의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 HPLC를 행한 결과(Fig. 2), 단일 peak를 나타내어 비교적 순수하게 정제된 분자량 700 kDa의 고분자 다당체임을 확인

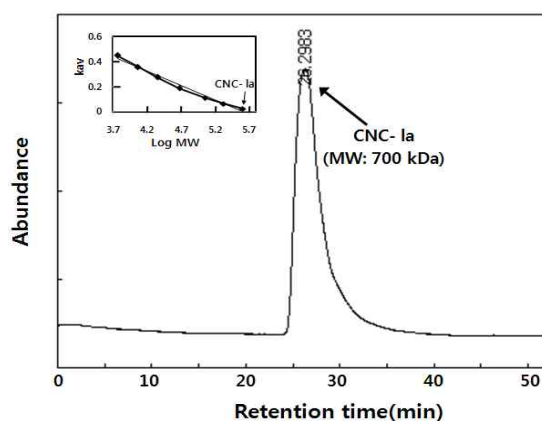


Fig. 2. HPLC chromatogram and molecular weight of CNC-Ia purified from *Opuntia humifusa*. CNC-Ia was injected into combined columns (0.76×30 cm, each) of Asahi-pak GS-520+GS-320+GS-220 and then eluted with 0.2 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min.

Table 2. Chemical properties of CNC-Ia purified from *Opuntia humifusa*

| Chemical property | CNC-Ia (%) |
|-------------------------------|------------|
| Molecular weight | 700 kDa |
| Neutral sugar | 87.21 |
| Uronic acid | 12.79 |
| Protein | — |
| KDO | — |
| Component sugar ¹⁾ | (mole%) |
| Rhamnose | 3.20 |
| Fucose | 0.03 |
| Arabinose | 49.23 |
| Xylose | 15.08 |
| Galactose | 32.46 |

¹⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetates. Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

할 수 있었다. 천연초 유래 정제 다당 CNC-Ia의 화학 조성을 살펴본 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 중성당 87.2%, 산성당 12.8%로 구성되어 있었으며 일반적으로 식물 추출물에서 검출되는 단백질 및 KDO는 함유하고 있지 않았다. 한편 CNC-Ia를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과, CNC-Ia는 arabinose, galactose 및 xylose를 각각 49.2%, 32.5%, 15.1%의 높은 비율로 함유하고 있었으며, 그 외 rhamnose와 fucose가 미량 검출되었다. CNC-Ia의 구성당 분석 결과로 미루어, 이들은 고도로 분지된 arabinogalactan으로 존재할 가능성을 강력히 시사한다. 일반적으로 arabinogalactan은 고등식물에서 주로 발견되는 다당류의 일종(30)으로, 구조적 특성에 따라 I형, II형 및 기타형으로 구분된다(31). I형 arabinogalactan은 측쇄(side chain)에 arabonosyl oligosaccharide잔기를 갖는 β -(1 \rightarrow 4)-D-galactan 주쇄로 구성된 다당을, II형은 β -(1 \rightarrow 3)-D-galactan 주쇄에 galactose의 C6 위치에서 β -(1 \rightarrow 6)-D-galactosyl 측쇄 및 비환원 말단 arabinose 잔기를 갖는 arabino- β -3,6-galactan을, 그리고 기타형은 arabino-galactan 측쇄를 갖는 pectic polysaccharide를 지칭한다. CNC-Ia가 arabinose와 galactose를 높은 비율로 함유하고 있는 사실로부터, CNC-Ia는 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 시사되었으므로 이들이 어떤 구조로 존재하는지를 추정하기 위해 II형의 arabino- β -3,6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성하는 것(22)으로 알려져 있는 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하였다. 표준 arabino- β -3,6-galactan인 gum arabic의 경우 침전환을 형성하였지만 CNC-Ia는 어떤 침전환도 관찰되지 않았다(data는 제시하지 않았음). 따라서 CNC-Ia은 적어도 II형 arabinogalactan 구조는 아님을 추측할 수 있었다.

CNC-Ia의 methylation analysis에 의한 당쇄 결합 양식 해석

다당의 구조 분석에 있어서 당쇄의 결합양식은 다당체의 기본 구조를 해명한다는 점에서 가장 중요한 분석으로 알려

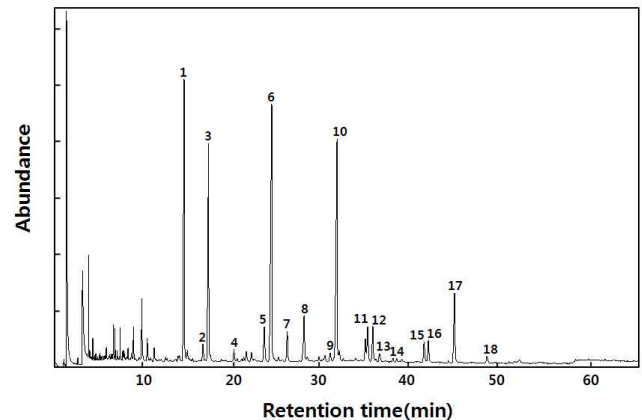


Fig. 3. Total ion chromatogram on GC-MS of partially methylated alditol acetates derived from CNC-Ia purified from *Opuntia humifusa*.

져 있다(23). CNC-Ia를 구성하는 당쇄의 결합양식을 분석하기 위해 methylation analysis를 행하고 GC-MS로 분석한 결과는 Fig. 3과 4 및 Table 3에 제시한 바와 같다. CNC-Ia는 총 18종의 당쇄 결합이 검출되었으며 arabinose(Ara) 결합 및 galactose(Gal) 결합이 높은 비율로 확인되었다. 특히 arabinose 잔기의 경우 비환원 말단에 존재함을 의미하는 T-Ara(terminal arabinofuranoside)가 높은 비율로 검출되었는데 이러한 사실은 측쇄(side chain)가 arabinose 또는 이들의 oligo당이 고도로 분지된 arabinan 형태로 존재함을 추정할 수 있었다. 또한 5-linked-Ara가 높은 비율로 존재

Table 3. Methylation analysis of CNC-Ia purified from the crude polysaccharide of *Opuntia humifusa*

| Glycosyl residue | Peak No. in Fig. 3 | Position of methyl group | Deduced glycosidic linkage | CNC-Ia (Mole%) ¹⁾ |
|------------------|--------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Arabinose | 1 | 2,3,5 | T-Ara ²⁾ | 18.11 |
| | 4 | 3,5 | 2-Araf | 1.22 |
| | 6 | 2,3 | 5-Araf | 22.46 |
| | 7 | 5 | 2,3-Araf | 2.72 |
| | 11 | — | Full branched Araf | 2.78 |
| Galactose | 5 | 2,3,4,6 | T-Galp | 3.10 |
| | 8 | 2,4,6 | 3-Galp ³⁾ | 0.50 |
| | 9 | 2,3,6 | 4-Galp | 17.02 |
| | 10 | 2,3,4 | 6-Galp | 1.55 |
| | 13 | 3,4 | 2,6-Galp | 0.92 |
| | 12 | 2,6 | 3,4-Galp ⁴⁾ | 2.47 |
| | 14 | 3,6 | 2,4-Galp | 0.45 |
| | 15 | 2,3 | 4,6-Galp | 1.50 |
| | 16 | 2,4 | 3,6-Galp | 1.54 |
| 17 | 2 | 3,4,6-Galp | 4.45 | |
| | 18 | — | Full branched Galp | 0.47 |
| Rhamnose | 2 | 3 | T-Rhap | 3.55 |
| Xylose | 3 | 2,3,4 | T-Xylp | 15.18 |
| Total | | | | 100.00 |

¹⁾Calculated from the peak areas and molecular response factors of each partially methylated alditol acetate in GC and GC-MS.

²⁾T-Araf means non-reducing terminal arabinofuranoside.

³⁾3-Galp means 2-linked galactopyranoside.

⁴⁾3,4-Galp means 3,4-branched galactopyranoside.

하는 사실로부터 측쇄에 붙어 있는 arabinose 잔기는 (1→5)-결합으로 연결되어 존재함을 알 수 있었다. 특이한 사항은 full branched-Ara가 상대적으로 높게 검출된 사실 (2.78%)로써, 이는 (1→5)-결합으로 연결된 arabinose 잔기의 C2와 C3 위치에서 또 다시 측쇄가 분지됨을 알 수 있었다. 이는 오탄당인 arabinose가 결합 가능한 모든 위치에서 분지된다는 결과로 타 다당에서는 거의 찾아볼 수 없는 특징적 결합으로 고도로 분지됨을 반증하고 있다[Fig. 4(A)].

한편 CNC-Ia는 galactose 결합 또한 높은 비율로 검출되었다. 이중 T-Galp(terminal galactopyranoside)가 낮은 비

율로 검출된 것은 galactan chain이 천년초 다당 CNC-Ia의 주쇄(main chain)를 구성하고 있음을 지적하였다. 특히 4-linked-Galp 잔기가 17.02%로 높게 검출된 것(Table 3)은 CNC-Ia의 주쇄가 (1→4)-galactan 형태로 존재하며, 3,4-branched-Galp, 2,4-branched-Galp, 4,6-branched-Galp, 3,4,6-branched-Galp의 존재는 (1→4)-galactan main chain의 C3, C2, C6 및 C3과 C6 위치에서 각각 arabinan 측쇄가 연결되어 존재할 가능성이 확인되었다. 특히 (1→4)-galactan에서는 full branched-Galp가 검출되었는데[Table 3 및 Fig. 4(C)] 이는 (1→4)결합으로 연결된 galactan 사슬 중 C2, C3,

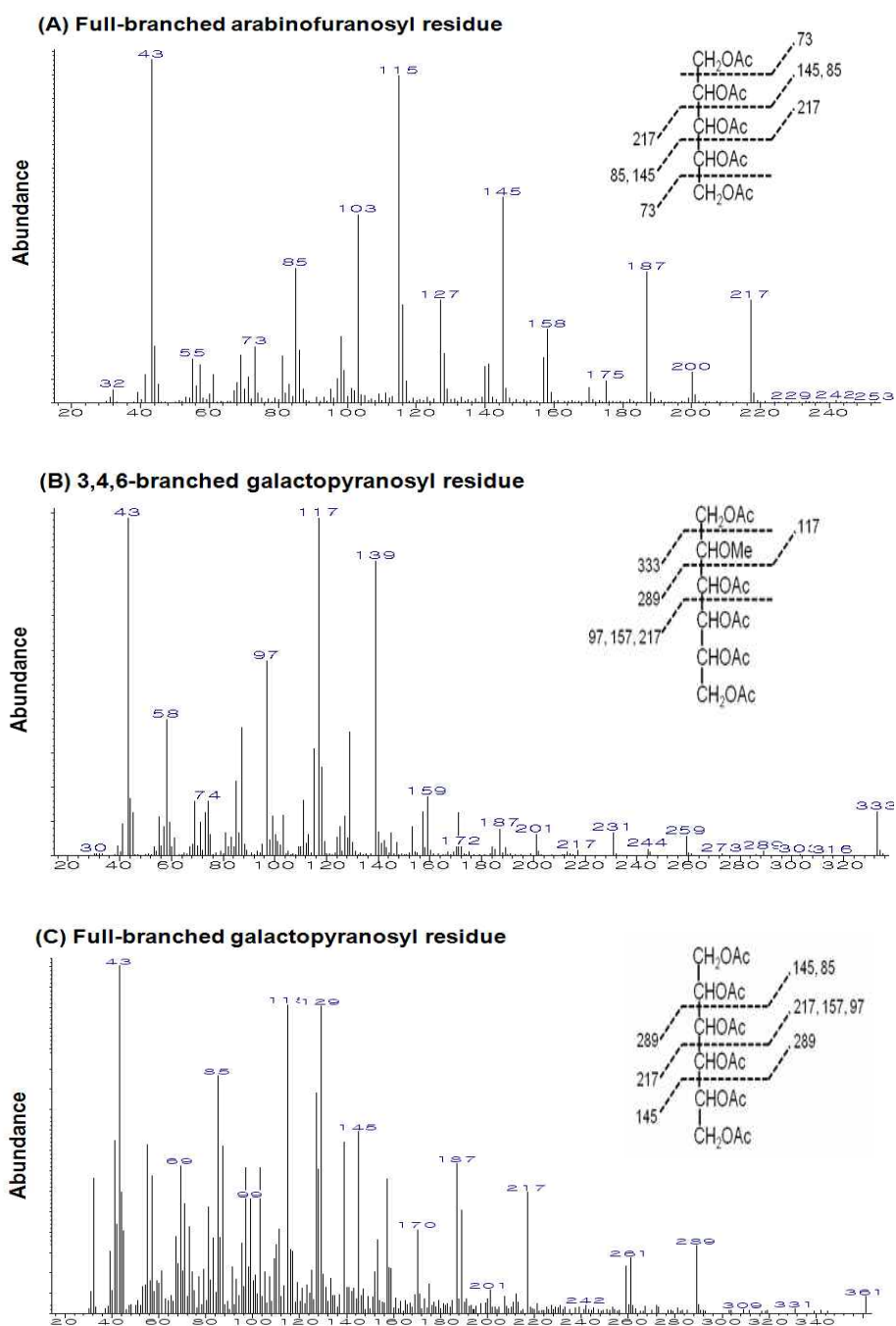


Fig. 4. GC-MS fragment ion patterns of three characteristic glycosidic-linkages of CNC-Ia purified from *Opuntia humifusa*. The resulting partially methylated alditol acetates of CNC-Ia were analyzed by GC-MS using an SP-2380 capillary column. (A) 1,2,3,4,5-penta-O-acetyl-arabitol, (B) 1,3,4,5,6-penta-O-acetyl-2-mono-O-methyl-galactitol, (C) 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetyl-galactitol.

C6 위치에서 3가닥의 사슬이 측쇄로 분지됨을 나타내는 것으로 이처럼 완전히 분지된 galactose 잔기의 존재는 천연초다당에서 나타나는 특이 결합임을 인정할 수 있었다. CNC-Ia가 분자량 70만의 다당체이며 고도의 점성을 보유한 특성을 보인 것은 아마도 주쇄 및 측쇄의 고도 분지 구조에 기인한 것으로 판단된다. 한편 xylose 잔기는 모두 T-Xylp (terminal xylopyranoside)만으로 검출되었는데 이는 본 잔기가 pyranose 형태로 측쇄의 말단에 존재함을 시사한다. 이상의 결과들은 CNC-Ia가 고도로 분지된 arabinogalactan으로 존재(31)할 가능성이 매우 높음을 강력히 시사한다.

Exo- α -L-arabinofuranosidase 처리 및 해석

다당은 고분자의 특성에 기인하여 전체구조를 한 번에 분석할 수 있는 방법이 개발되어 있지 않으므로, 화학적 또는 효소처리에 의해 단편을 조제하고 각 단편의 미세구조를 규명하여 최종적으로 전체 구조를 추정하는 것이 일반적이다 (8). 따라서 본 연구에서는 활성다당 CNC-Ia를 각종 효소를 처리하여 단편화하고 이들을 정제, 분석하고자 하였다. CNC-Ia의 측쇄 부분의 말단 잔기를 절단할 목적으로 exo-Arafase를 처리하고 Superdex 200 GL column을 이용한 HPLC를 행한 결과, Fig. 5(A)에 나타난 바와 같이 AFN-I 및 AFN-II의 2개획분으로 정제할 수 있었다. CNC-Ia의 exo-Arafase 처리 단편 획분들의 구성당을 분석한 결과는

Table 4와 같다. 저분자 획분인 AFN-II의 경우 대부분 arabinose로 구성되어 있고 그 외 galactose가 일부 함유되어 있었으며, 고분자 획분인 AFN-I은 상대적으로 arabinose의 함량이 급격히 감소된 결과를 보여주었다. Exo-Arafase는 α -glycosidic linkage로 연결된 arabinofuranoside chain에서 비환원성 말단부터 한 분자씩 arabinose를 제거하여 monomer arabinofuranose를 반응물로 만들어 내는 exo-type의 효소이므로 AFN-II는 모두 furanose로 존재하는 arabinose와 일부 이에 연결된 galactose로 구성되어 있음을 추정할 수 있었다. 또한 CNC-Ia 주쇄에 붙어있는 arabinooligosaccharide가 비환원 말단으로부터 분해된 결과로, AFN-I은 arabinan 사슬이 제거된 다당 형태 또는 말단 arabinose 잔기가 제거되어 짧은 arabinose가 결사슬로 붙어 있는 galactan으로 존재함을 추정할 수 있었다. 그러나 exo-Arafase의 처리가 CNC-Ia에 존재하는 모든 arabinose를 절단할 수는 없었는데 이러한 사실은 측쇄의 arabinan의 말단 혹은 또 다른 측쇄로 xylose 잔기가 결합되어 있을 가능성을 강력히 시사한다. Table 3의 methyl화 분석 결과에서도 T-Xylp이 높은 비율로 검출된 사실과 일반적으로 exo-type의 효소가 분지쇄 부위에 이르면 입체구조적 장애 (steric hindrance)를 받아 절단이 어려운 특징을 보이는 점 등은 이러한 사실을 잘 뒷받침해 주었다.

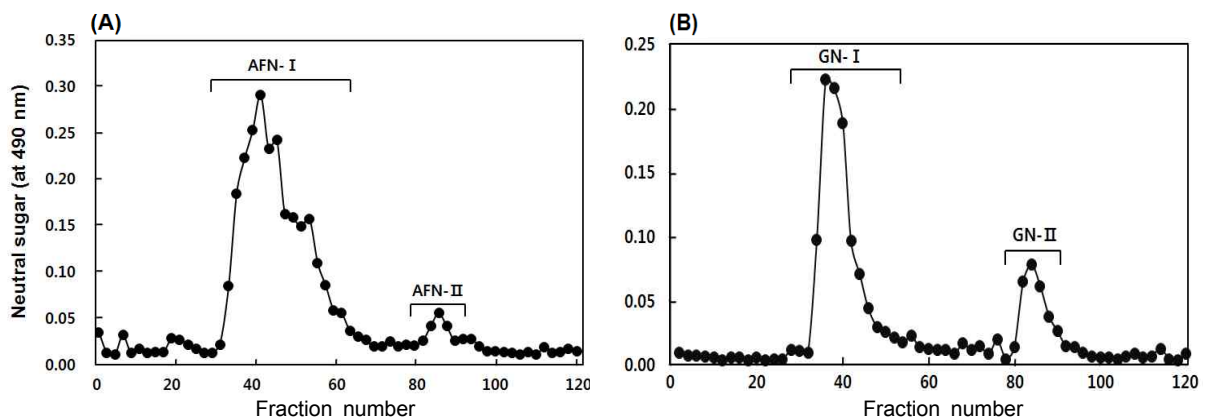


Fig. 5. Elution patterns on Superdex 200 GL of AFN (A) and GN (B) fractions obtained after sequential enzymatic digestion of CNC-Ia from *Opuntia humifusa*. (A) CNC-Ia was treated with α -Arafase. (B) AFN-I obtained after α -Arafase was redigested with β -Galnase.

Table 4. Sugar composition of subfractions obtained after sequential enzymatic digestion of CNC-Ia from *Opuntia humifusa* (Mole%)

| Component sugar ¹⁾ | Native CNC-Ia | After α -Arafase | | After β -Galnase | |
|-------------------------------|---------------|-------------------------|--------|------------------------|-------|
| | | AFN-I | AFN-II | GN-I | GN-II |
| Rhamnose | 3.20 | 6.92 | 4.30 | 6.91 | 8.36 |
| Fucose | 0.03 | 1.11 | 0 | 0 | 0 |
| Arabinose | 49.23 | 39.78 | 64.06 | 46.17 | 41.96 |
| Xylose | 15.08 | 16.78 | 8.04 | 20.92 | 18.37 |
| Galactose | 32.46 | 35.41 | 23.60 | 26.00 | 31.32 |

¹⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetates. Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

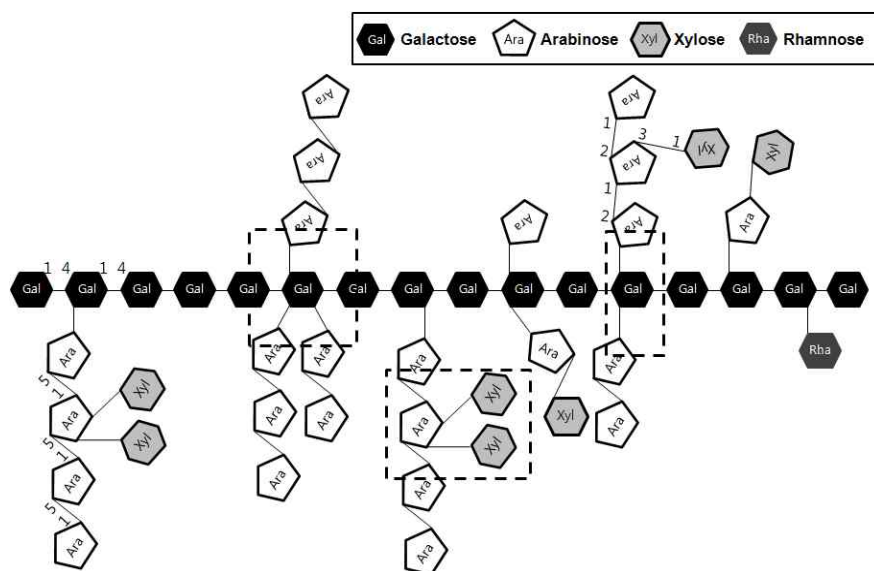


Fig. 6. A proposed structure of anti-metastatic polysaccharide, CNC-Ia purified from *Opuntia humifusa*. Squares with dotted lines indicate characteristic glycosidic-linkages in CNC-Ia.

Endo-β-(1→4)-galactanase 처리 및 해석

Exo-Arafase 처리 후, 고분자로 남아 있던 AFN-I은 endo-Galnase로 재차 처리하고 동일 column을 이용, 분획한 결과, Fig. 5(B)에 나타난 바와 같이 GN-I과 GN-II의 2개 획분으로 분획할 수 있었다. AFN-I이 endo-Galnase 처리에 의해 단편을 생성했다는 사실(Table 4)은 면역 활성다당 CNC-Ia 중에 β-(1→4)-galactan chain이 존재할 가능성과 측쇄로 비환원 말단 arabinose를 갖는 β-(1→4)-galactan이 main chain으로 존재할 가능성이 강력히 시사되었다.

천년초의 면역활성 다당 CNC-Ia의 전체구조 추정

CNC-Ia의 결합양식 분석과 2차례의 효소처리 과정을 거쳐 얻어진 단편의 구조적 해석을 행하고 이들로부터 얻어진 모든 정보를 종합한 결과, 천년초의 주 다당체 CNC-Ia의 예상되는 전체구조는 Fig. 6에 도식화한 바와 같다. 즉 CNC-Ia은 ① 주쇄는 β-(1→4)결합으로 연결된 galactan으로 존재하며 주쇄의 대부분은 galactose의 C6 위치에서 한 가닥, C3 및 C6 위치에서 두 가닥 또는 C2, C3, C6 위치에서 동시에 세 가닥의 측쇄가 연결되어 존재한다. ② 측쇄는 주로 α-(1→5)결합으로 연결된 짧은 arabinofuranoside로 구성된 oligo당으로 존재하며 일부 α-(1→2) 결합의 arabinose 사슬이 연결되어 있다. ③ α-(1→2) 결합으로 연결된 arabinose 잔기의 C3 위치에서 한가닥 또는 α-(1→5)결합의 arabinose 사슬의 C2 및 C3 위치에서 두 가닥(full-branched)의 비환원 말단 xylopyranoside가 다시 연결된 구조로 존재함을 추정할 수 있었다. 결론적으로 천년초 유래 다당 CNC-Ia는 큰 의미에서 Type I arabinogalactan에 속하는 다당이나 galactan 주쇄가 arabinan 측쇄에 의해 고도로 분지된 구조를 형성하고 있으며 arabinan 측쇄는 다시 비환원말단의 xylopyranoside가 고도로 결합된 특이 다당류로 최종 제안되었다.

요 약

천년초에 존재하는 점질다당의 새로운 이용방안을 모색하기 위해 천년초로부터 다당을 분리하여 항전이 활성을 평가하고 구조 분석을 행하였다. B16BL6 종양세포를 이용한 폐암 전이모델에서 천년초 조다당 CNC-0는 농도 의존적으로 높은 항전이 활성을 나타냈다. 천년초 조다당 CNC-0는 DEAE-Sephrose FF 및 Sephadex G-75를 이용한 연속적 chromatography를 행하여 CNC-Ia으로 정제하고 이들의 구조적 특성을 검토하였다. CNC-Ia는 분자량 약 700 kDa의 다당체로 구성당 조성을 확인한 결과, arabinose, galactose 및 xylose를 높은 비율로 함유하고 있었으며 rhamnose와 fucose를 미량 함유하고 있었다. 본 당쇄의 결합양식을 규명하기 위해 methylation analysis를 행한 결과 CNC-Ia은 terminal Ara₄f, 5-linked Ara₄f, 4-linked Gal₆p, terminal Xyl₆p 와를 포함한 총 18종의 결합으로 구성되어 있었으며 full branched Ara₄f, 3,4,6-branched Gal₆p 및 full branched Gal₆p 와 같은 3종의 CNC-Ia 고유의 특징적 결합을 포함하고 있었다. 또한 CNC-Ia의 미세구조를 규명하기 위해 exo-α-L-arabinofuranosidase와 endo-β-1,4-D-galactanase를 이용한 연속 가수분해 및 해석도 행하였다. 이상의 결과로부터 천년초 유래 다당 CNC-Ia는 β-(1→4)-galactan 주쇄에 arabinose oligo당이 측쇄로 분지된 Type I arabinogalactan으로 판단되었으며 주쇄 및 측쇄 모두 고도로 분지된 특징이 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 (주)월드웨이의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

1. Ruoslahti E. 1989. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 264: 13369-13372.
2. Paulson JC. 1989. Glycoprotein: What are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci* 14: 272-276.
3. Zhu H, Zhang YY, Zhang JW, Chen DF. 2008. Isolation and characterization of an anti-complementary protein-bound polysaccharide from the stem barks of *Eucommia ulmoides*. *Int Immunopharmacol* 8: 1220-1230.
4. Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VE, Chang ST. 1995. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from mycelia culture of *Tricholoma* sp., a local edible mushroom. *Life Sci* 57: 269-281.
5. Iino K, Ohno N, Suzuki I, Sato K, Okigawa S, Yadomae T. 1985. Structure-function relationship of antitumor β -1,3-glucan obtained from matted mycelium of cultured *Gripora frondosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33: 4950-4956.
6. Yadomae T. 2000. Structure and biological activities of fungal β -1,3 glucans. *Yakukaku Zasshi* 120: 413-431.
7. Hikino H, Kobayashi M, Suzuki Y, Konno C. 1989. Mechanism of hypoglycemic activity of Aconitan A, a glycan of *Aconitum carmichaeli* roots. *J Ethnopharmacol* 25: 295-304.
8. Aspinall GO. 1982. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In *The Polysaccharides*. Aspinall GO, ed. Academic Press, New York, USA. Vol 1, p 35-45.
9. Lee CK, Gray GR. 1988. A general strategy for the chemical sequencing of polysaccharides. *J Am Chem Soc* 110: 1292-1301.
10. Lee KS, Oh CS, Lee KY. 2005. Antioxidative effect of the fractions extracted from a cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Sci Technol* 37: 474-478.
11. Lee YC, Pyo YH, Ahn CK, Kim SH. 2005. Food functionality of *Opuntia ficus-indica* var. cultivated in Jeju island. *J Food Sci Nutr* 10: 103-110.
12. Kim SY. 2003. Studies on the separation of antioxidative and anti-microbial compounds of Korean perennial cactus Cheonnyuncho. *PhD Dissertation*. Hoseo University, Asan, Korea. p 34-58.
13. Park MK, Lee YJ, Kang ES. 2005. Hepatoprotective effect of *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*) extract in rats treated carbon tetrachloride. *Korean J Food Sci Technol* 37: 822-826.
14. Lee KS, Kim MG, Lee KY. 2004. Antimicrobial effect of the extracts of cactus Chounnyuncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1268-1272.
15. Kwon DK, Song YJ. 2005. Effect of *Opuntia humifusa* supplementation on endurance exercise performance in rats fed a high-fat diet. *Korean J Exer Nutr* 9: 183-188.
16. Kim KT, Choi AR, Lee KS, Joung YM, Lee KY. 2007. Quality characteristics of bread made from domestic Korean wheat flour containing cactus Chounnyuncho (*Opuntia humifusa*) powder. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 461-468.
17. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
18. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54: 484-489.
19. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
20. Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative. *Anal Biochem* 85: 595-601.
21. Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatography method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol* 49: 926-936.
22. Holst GJ, Clarke AE. 1985. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal Biochem* 148: 446-450.
23. Hakomori S. 1964. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulphonyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J Biochem (Tokyo)* 55: 205-208.
24. Sweet DP, Shapiro RH, Albersheim P. 1975. Quantitative analysis by various g.l.c. response factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr Res* 40: 217-225.
25. McCleary BV, Matheson NK. 1987. Enzymatic analysis of polysaccharide structure. *Adv Carbohydrate Chem Biochem* 44: 147-276.
26. Yoo YC, Saiki I, Sato K, Azuma I. 1994. MDP-Lys (L18), a lipophilic derivative of muramyl dipeptide, inhibits the metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumours in mice. *Vaccine* 12: 175-180.
27. Suto T, Fukuda S, Moriya N, Watanabe Y, Sasaki D, Yoshida Y. 1994. Clinical study of biological response modifiers as maintenance therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 33: 145-148.
28. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Kim JB. 1998. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol* 20: 163-172.
29. Saiki IA. 2000. Kampo medicine "Juzen-taiho-to" - prevention of malignant progression and metastasis of tumor cells and the mechanism of action. *Biol Pharm Bull* 23: 677-688.
30. Aspinall GO. 1973. Carbohydrate polymers of plant cell wall. In *Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides*. Loewus F, ed. Academic Press, New York, USA. p 95-115.
31. Clarke AE, Anderson RL, Stone BA. 1979. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* 18: 521-540.

(2010년 12월 10일 접수; 2010년 12월 15일 채택)