

## 茯苓의 Carboxyl Proteinase의 분리 정제 및 그 성질에 관한 연구(II)

閔 泰 鎮·朴 相 信·文 順 九  
東國大學校 化學科

### Studies on the Characterization of Carboxyl Proteinase in *Poria cocos*

Tae Jin Min, Sang Shin Park and Soon Ku Moon  
Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100, Korea

**Abstract:** The properties of carboxyl proteinase which was contained in *Poria cocos* (Schw.) Wolf were investigated by means of the purification with 0.65 ammonium sulfate saturation, DEAE-cellulose and Sephadex G-75 gel filtration. This enzyme was found to hydrolyze only peptide bond between glutamyl-L-tyrosine of carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine among the synthetic substrates of carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine, hippuryl-L-phenylalanine and hippuryl-L-arginine. This enzyme was inhibited by  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $CN^{-1}$ ,  $P_2O_7^{-4}$  ions, but stimulated by  $Hg^{+2}$  ion. Also, this enzyme was inhibited by organic compounds such as L-lysine, L-phenylalanine, hippuryl-L-phenylalanine, diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester (DAN) and 1,2-epoxy-3-(P-nitrophenoxy)propane(EPNP). In particular, the activity was inhibited by L-lysine till 20 minutes of preincubation time rapidly, and by DAN in the presence of  $Cu^{+2}$  ion more rapidly after 30 minutes than DAN in the absence of  $Cu^{+2}$  ion. L-Lysine was found to be a competitive inhibitor and its  $K_i$  value was determined to be 0.12 mmole by Dixon plot.

**Keywords:** *Poria cocos*, Carboxyl proteinase,  $K_i$  value, Dixon plot.

버섯은 예로부터 우리생활과 밀접한 관계가 있으며, 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔다. 버섯중의 단백질 및 효소에 관한 연구로서는 *Agaricus bisporus* (Baldy, 1972, 1975, 1976; Wood, 1980), 좀벌집버섯 (Terashita, 1977), 팽나무버섯(Terashita, 1978), 흰느타리버섯중의 protease(Min 등, 1983, 1985), 표고버섯 중의 carboxyl proteinase를 분리정제하여 그 특성을 보고(Terashita, 1981, 1981)한 바 있다.

茯苓 *Poria cocos*(Schw.) Wolf은 소나무의 땅속 뿌리에 자생하는 버섯으로서, 漢方藥材로 널리 이용되어 왔으며, 복령의 성분에 관한 연구로는 균사체로부터 분리한 polysaccharide의 항암효과(Kanayama 등, 1983), 복령중의 triterpenoids(Kanematsu 등, 1970,

1970), 복령중의 pachymic acid(Shibata 등, 1958), 이노시틴 및 항종양시험(高木 등, 1982) 등에 관한 많은 보고가 있다. Min 등은 복령중의 carboxyl proteinase를 분리정제하여 최적 pH, 최적 온도, pH 안정성, 열 안정성, 아미노산 조성 및 분자량 등을 측정하여 보고(1983)한 바 있다.

그리고 L-cysteine(Auld, 1971) 및 L-lysine(Wolf, 1962)은 carboxypeptidase의 억제제로 보고 되어 있고, diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester(DAN) (Rajagopalan, 1966; Lundbland, 1969; Fry, 1968; Bayliss, 1969; Knowles, 1968) 및 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane(EPNP) (Tang, 1971)은 pepsin의 강력한 억제제로 알려져 있다.

본 연구에서는 복령종의 carboxyl proteinase의 연장 연구로서, 합성기질에 대한 이 효소의 특이성을 보기 위하여, hippuryl-L-phenylalanine, hippuryl-L-arginine 에 대한 반응을 조사하고, 양이온 및 음이온 그리고 여러 유기화합물에 대한 반응을 조사하고, 양이온 및 음이온 그리고 여러 유기화합물에 의한 억제작용을 보기 위하여,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  등 금속이온 및  $CN^{-1}$ ,  $P_2O_7^{-4}$  등의 음이온에 의한 활성도 변화, L-lysine, L-phenylalanine, DAN 및 EPNP 등의 억제효과, 시간변화에 따른 억제효과 및 L-lysine에 대한  $K_i$ 값 등을 측정하였기에 이에 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 재 료

충남 보령군 청라에서 채취한 生 白茯苓을 사용하였으며, bovine albumin(BA), carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine(CBZ-Glu-Tyr), hippuryl-L-phenylalanine(H-Phe), L-lysine(Lys), hippuryl-L-arginine(H-Arg), L-phenylalanine(Phe), diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester(DAN), 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane (EPNP), acrylamide(AA) 등은 Sigma제품을 사용하였으며, Coomassie brilliant blue G-250(CBB), bromphenol blue(BPB), 3-phenyl propionic acid(PPA) 등은 Merck제품을 사용하였다.

#### Carboxyl Proteinase의 분리 정제

생 복령의 껍질을 벗겨 잘게 절단한 시료 2 kg을 사용하여, 이미 보고한 방법(Min 등, 1983)으로 정제하였으며, 최종 Sephadex G-75 gel 여과 단계에서는 43 ml의 효소용액을 얻어 냉동 건조시켰다. 위 모든 조작은 5°C 이하에서 실시하였다.

정제확인을 위하여 disc-PAG 전기이동(Min 등, 1983; Davis, 1964)한 결과를 densitometer(Toyo Model DMU-33C)로 slit; 0.2×2 mm, 620 nm하에서 측정하였고, 또한 HPLC(Waters Co.) I-125 단백질 column으로 정제확인(Min 등, 1983)하였다.

#### 효소 활성도 측정

정제과정에 따른 carboxyl proteinase의 활성도 측정은 bovine albumin-Folin법(Oda 등, 1974)과 3 mM CBZ-Glu-Tyr을 기질(pH 2.0)로 하여 Rosen법(1957)을 인용하여 실험하였고, 단백질정량은 Bradford법(1976)에 따라 실시하였다.

Folin법에서 활성도 단위는 37°C에서 매분당 반응 혼합물 1 ml가 1μg의 tyrosine을 유리시키는 효소의 양을

1단위로 하였다.

Rosen법에서의 활성도 단위는 이 효소의 최적온도 70°C에서 매 분당 반응 혼합물 1 ml가 1 μM의 tyrosine을 유리시키는 효소의 양을 1단위로 하였다.

#### 효소와 합성기질과의 반응

CBZ-Glu-Tyr, H-Phe 및 H-Arg을 기질로 하여, 최적 pH 2.0, 최적온도 70°C에서 10분간 반응시키고, 100°C 기름 증탕에서 3분간 가열하여, 효소 반응을 정지시킨 다음, syringe 여과(Millex filter 0.45 μm Millipore Co.)하여, 효소 단백질을 제거하고, 여액을 냉동 농축하여, 이를 n-BuOH : pyridine : H<sub>2</sub>O(1 : 1 : 1, v/v)를 전개용매로 하여 실온에서 180분 동안 종이크로마토그라피 하였다. 이를 3% ninhydrin 용액으로 발색시켜, 얻은 R<sub>f</sub> 값을 표준 아미노산 즉 Tyr, Phe 및 Arg의 R<sub>f</sub> 값과 비교 하였다.

#### 이온 및 유기화합물에 의한 효소의 활성도 변화

$Zn^{+2}$  등의 금속이온,  $CN^{-1}$ 이온 등의 음이온 및 Lys 등의 유기화합물에 의한 효소활성도 변화는 다음과 같이 실시하였다.

효소 용액에 0.1, 및 1.0 mmole의 금속이온, 음이온 및 유기화합물들을 각각 가하고, 0.01M KCl-HCl buffer용액(pH 2.0) 0.2 ml를 가하여 37°C에서 5분간 열 평형시킨 다음, 0.5 mmole CBZ-Glu-Tyr을 가하여, 최종부피를 0.6 ml로 한 다음, 70°C에서 10분간 반응시켜 Rosen법에 따라 흡광도를 측정하였다.

#### $K_i$ 값 측정

Rosen의 활성도 측정법에 따라, CBZ-Glu-Tyr 기질의 농도를 0.1, 0.5, 1.0 및 1.5 mmole로 각각 변화시키고, 억제제로 L-Lys의 농도를 0.1, 0.5 및 1.0 mmole로 각각 변화시켜 tyrosine 검량 곡선에 따라 산출하였다.

### 결과 및 고찰

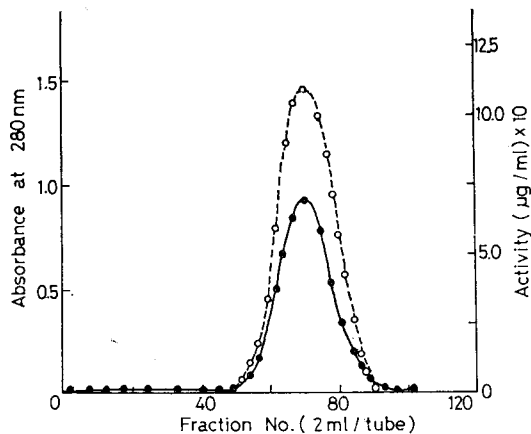
#### Carboxyl Proteinase의 분리정제

최종적으로 Sephadex G-75 gel 여과한 결과는 Fig. 1과 같다.

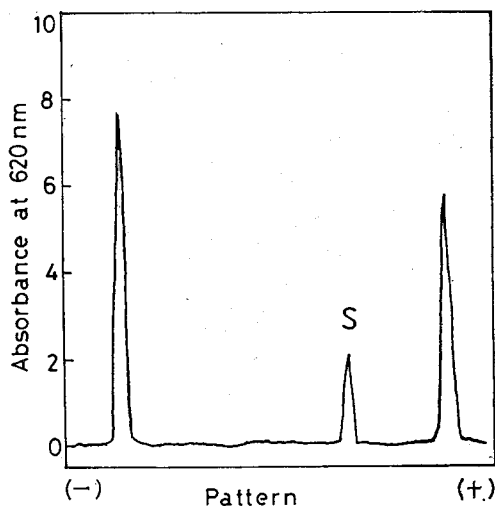
단일 단백질 분획 및 단일 활성분획을 보였으며, 이를 disc-PAG 전기이동 및 HPLC로 정제확인한 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. 각각 단일 peak를 보여 정제되었음을 알 수 있었다.

#### 효소와 합성기질과의 반응

CBZ-Glu-Tyr기질에 대한 이 효소의 특이성(Min 등, 1983)은 보고하였고, 다른 합성기질에 대한 특이



**Fig. 1.** Final fractionation of carboxyl proteinase (Fraction I) by Sephadex G-75 column chromatography. The enzyme solution was eluted on a Sephadex G-75 column chromatography (2.0×80 cm), equilibrated with 0.01 M McIlvaine buffer (pH 4.0).  
 ●—●—● : Absorbance at 280 nm.  
 ○---○---○ : Carboxyl proteinase activity.

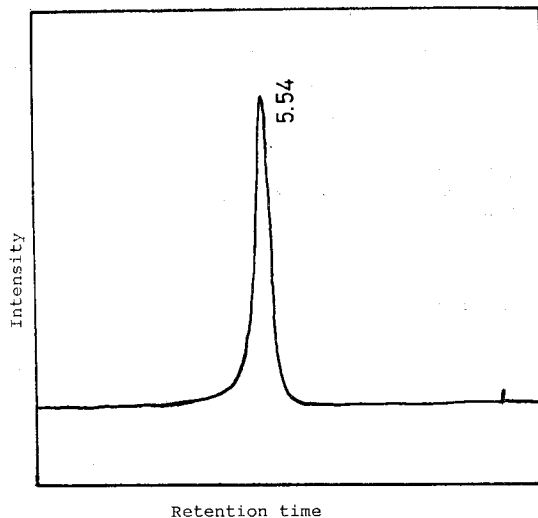


**Fig. 2.** Disc-PAGE pattern of carboxyl proteinase purified with Sephadex G-75 column chromatography.

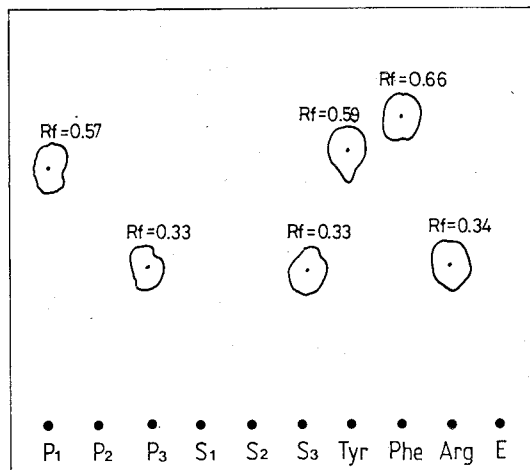
S : The pattern of disc-PAGE of carboxyl proteinase.

성을 관찰하기 위하여, H-Phe 및 H-Arg과 효소와의 반응성을 종이크로마토그래피한 결과는 Fig. 4와 같다.

이 효소는 H-Phe 및 H-Arg 기질에 대하여는 가수분해 시키지 못함을 보였고, CBZ-Glu-Tyr의 분해산물인 P<sub>1</sub>의 R<sub>f</sub> 값(0.57)과 표준 아미노산 Tyr의 R<sub>f</sub> 값(0.59)



**Fig. 3.** HPLC chromatogram of purified carboxyl proteinase.  
 Column : protein column I-125  
 Mobile phase : 0.05 M phosphate buffer (pH 6.8)  
 Flow rate : 2 ml/min  
 Intensity : 0.1  
 Chart speed : 1 cm/min  
 Wavelength : 280 nm



**Fig. 4.** Paper chromatogram of hydrolyzed products in reaction mixture of the three substrates and carboxyl proteinase.

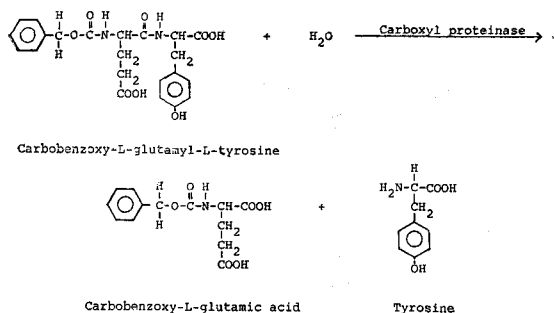
P<sub>1</sub> : Hydrolyzed product in reaction mixture of CBZ-Glu-Tyr and E.

P<sub>2</sub> : Hydrolyzed product in reaction mixture of H-Phe and E.

P<sub>3</sub> : Hydrolyzed product in reaction mixture of H-Arg and E.

S<sub>1</sub> : CBZ-Glu-Tyr, S<sub>2</sub> : H-Phe, S<sub>3</sub> : H-Arg.  
 Solvent : n-BuOH : Pyridine : H<sub>2</sub>O (1:1:1 v/v).  
 Coloring reagent : 3% ninhydrin in methylcellosolve.

과 유사함을 보여, 이 효소는 다음 반응식과 같이 CBZ-Glu-Tyr의 glutamyl-L-tyrosine 사이의 펩티드 결합을 분해시키는 특이성만을 가진 carboxyl proteinase임을 보여 주고 있다.



금속이온 및 음이온에 의한 효소의 활성도 변화

금속이온 및 음이온에 의한 효소 활성도 변화는 Table I 및 II와 같다.

이 효소는  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  및  $\text{CN}^{-1}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$  등에 의하여 효소 활성이 억제되었으며, 특히  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{CN}^{-1}$  이온은 그 농도가 증가함에 따라, 효소의 활성을 크게 억제함을 보였다. 그러나  $\text{Hg}^{+2}$  이온은 효소의 활성을 증가시켰다.

Table I. Effects of various metal ions on carboxyl proteinase activity.

Ion	Conc. (mM)	Rel. activity (%)
None		100
$\text{Zn}^{2+}$	0.1	88
	1.0	57
$\text{Fe}^{2+}$	0.1	83
	1.0	49
$\text{Ca}^{2+}$	0.1	53
	1.0	37
$\text{Co}^{2+}$	0.1	83
	1.0	78
$\text{Cu}^{2+}$	0.1	46
	1.0	36
$\text{Ni}^{2+}$	0.1	71
	1.0	43
$\text{Mg}^{2+}$	0.1	78
	1.0	37
$\text{Hg}^{2+}$	0.1	162
	1.0	166

Table II. Effects of various anions on carboxyl proteinase activity.

Ion	Conc. (mM)	Rel. activity (%)
None		100
$\text{CN}^{-}$	0.1	60
	1.0	43
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	1.0	43
$\text{HPO}_4^{2-}$	1.0	82
$\text{SO}_3^{2-}$	1.0	96
$\text{SO}_4^{2-}$	1.0	83

유기화합물에 의한 활성도 변화

L-Lys, L-Phe 등의 유기화합물에 의한 활성도 변화는 Table III과 같다.

Table III에서 L-Lys, L-Phe, DAN 및 EPNP 등은 모두 이 효소의 활성을 억제하였으며, 특히 L-Lys은 농도 증가에 따라 억제효과도 증가함을 보였다.

시간 변화에 따른 억제제에 의한 활성도 변화

이 효소에 억제제로 L-Lys, L-Phe 및 H-Phe을 각각 가하여, 항온처리 시간변화에 따른 이 효소의 활성도에 미치는 억제효과는 Fig. 5, 6 및 7과 같고, 이들을 종합 비교한 결과는 Fig. 8과 같다.

이 효소는 carboxypeptidase B의 억제제로 알려진 L-Lys(Wolf *et al.*, 1962)과 carboxypeptidase A의 억제제로 알려져 있는 L-Phe(Bergmeyer, 1974)에 의하여 모두 저해를 받았다.

Table III. Effects of various organic compounds on carboxyl proteinase activity.

Compound	Conc. (mM)	Rel. activity (%)
None		100
Lys	0.1	83
	1.0	57
Phe	0.1	74
	1.0	68
H-Phe	1.0	82
2-ME	1.0	94
PPA	1.0	47
DAN	0.1	65
DAN- $\text{Cu}^{2+}$	0.1	60
EPNP	0.1	20
H-Arg	0.1	85

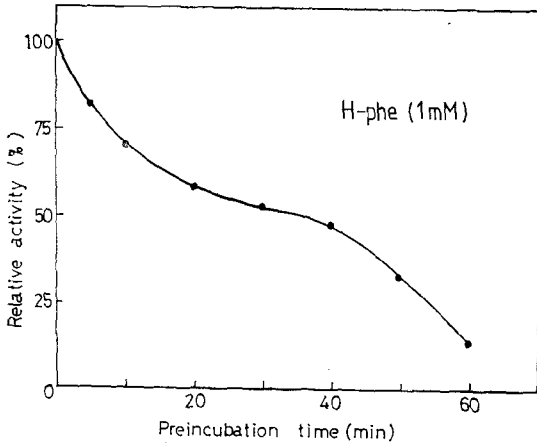


Fig. 5. Effect of carboxyl proteinase activity with hippuryl-L-phenylalanine depending on time.

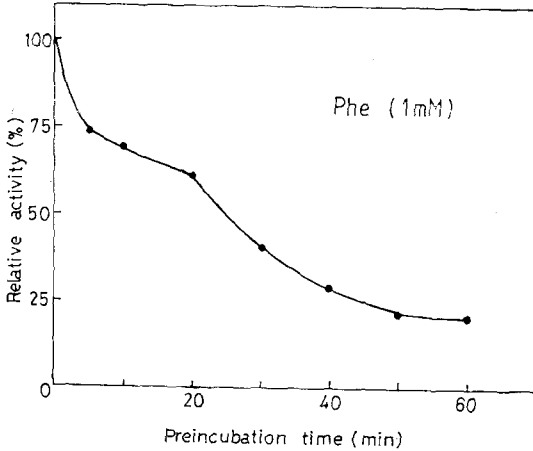


Fig. 6. Effect of carboxyl proteinase activity with L-phenylalanine depending on time.

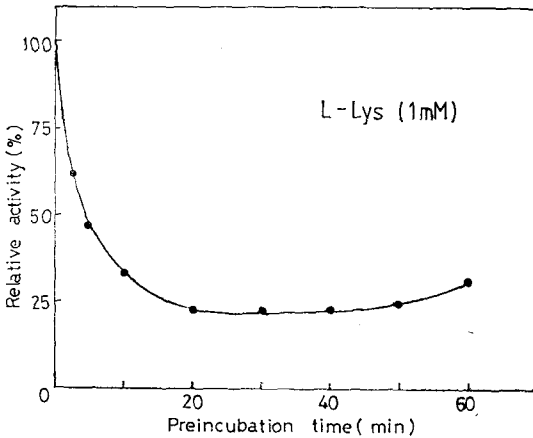


Fig. 7. Effect of carboxyl proteinase activity with L-lysine depending on time.

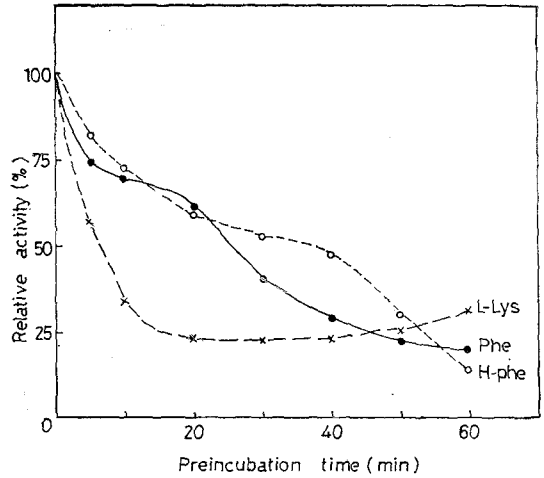


Fig. 8. Comparison of inhibition on carboxyl proteinase activity by various reagents.

●—● : L-Phenylalanine (1 mM)  
○- - -○ : Hippuryl-L-phenylalanine (1 mM)  
×- - -× : L-Lysine (1 mM)

Fig. 8에서와 같이 L-Lys(1 mM)은 항온(37°C)처리 시간 20분까지 효소의 활성을 크게 감소시켰고, 그 이상의 시간에서는 같은 경향을 보였으며, L-Phe(1 mM)에 대하여는 20분까지는 서서히 감소하다가 그 이상의 시간에서는 계속 감소함을 보였다. 또한 L-Phe에 hippuric acid가 결합된 H-Phe(1 mM)에 대하여는 40분까지는 서서히 감소하다가 40분 이상에서는 급격히 억제됨을 보였다.

시간 변화에 따른 DAN 및 DAN-Cu<sup>+2</sup>에 의한 활성도 변화

pepsin의 억제제로 알려진 DAN(Rajagopalan, 1966) 및 Cu<sup>+2</sup> 공존하에서의 DAN에 의한 항온(37°C)처리 시간 변화에 따른 효소 활성도의 변화는 Fig. 9와 같다.

이 그림에서 DAN(0.1 mmole) 및 DAN-Cu<sup>+2</sup>(0.1 : 0.08 mmole비)은 30분까지 거의 같은 경향으로 효소의 활성도를 감소시켰으나, 30분 이후부터는 Cu<sup>+2</sup> 공존하에서의 DAN은 Cu<sup>+2</sup>이 없을 때의 DAN에 비하여 효소활성도를 더욱 더 강력히 억제함을 보여 주었다.

K<sub>i</sub>값

억제제로 L-Lys(1 mM)을 사용하여 측정한 활성도 변화를 Dixon법(1953)에 따라 도식하여 얻은 결과는 Fig. 10과 같다.

L-Lys은 이 효소에 대하여 경쟁적 억제작용을 하고 있음을 보였으며, 이 때의 K<sub>i</sub>값은 0.12 mmole이었다.

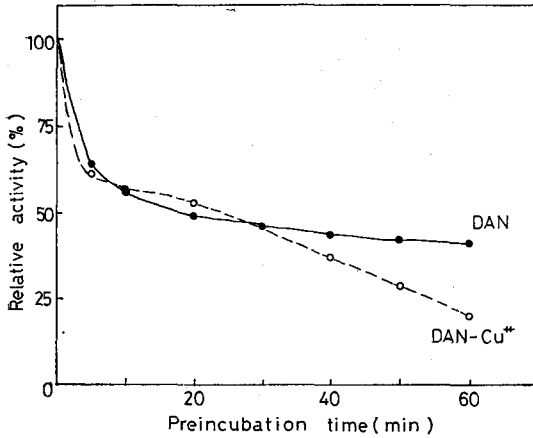


Fig. 9. Comparison of inhibition on carboxyl proteinase activity by DAN and DAN-Cu<sup>2+</sup>.  
 ●—● : DAN (0.1 mM)  
 ○---○ : DAN-Cu<sup>2+</sup> (0.1 : 0.08 mmole ratio)

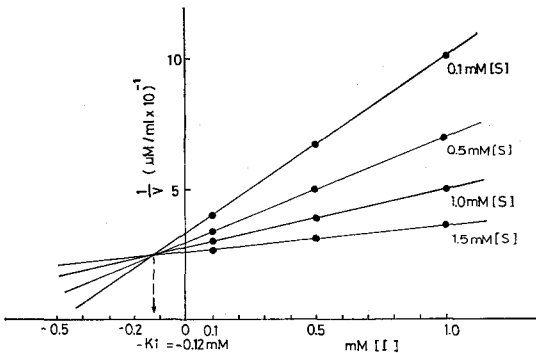


Fig. 10. Dixon plot for the inhibition of the carboxyl proteinase activity by L-lysine.  
 Substrate : Carbobenzoxy-L-glutamyl-L-tyrosine

결론

이상의 실험 결과를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

茯苓중의 carboxyl proteinase는 CBZ-Glu-Tyr, H-Phe 및 H-Arg의 합성기질과의 반응성을 확인하여 본 결과, CBZ-Glu-Tyr의 glutamyl-L-tyrosine 사이의 펩티드 결합만을 분해시키는 특이성을 보였다. Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, CN<sup>-1</sup> 및 P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>-4</sup> 등의 이온은 이 효소의 활성을 억제하였고, 특히 Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 CN<sup>-1</sup> 이온은 농도가 증가함에 따라, 효소의 활성을 크게 억제 하였다. 그러

나 Hg<sup>2+</sup>은 효소의 활성을 증가 시켰다. L-Lys, L-Phe, DAN 및 EPNP 등의 유기화합물들은 효소의 활성을 크게 억제 하였다. L-Lys, L-Phe 및 H-Phe 등은 항은 처리시간의 증가에 따라, 효소의 활성을 점차 감소시켰고, 특히 L-Lys은 20분까지 급격히 억제 작용을 보였으며, Cu<sup>2+</sup>이온 공존하에서의 DAN은 Cu<sup>2+</sup>이온이 없을때의 DAN에 비하여 30분 이후부터 효소의 활성을 감소시켰다. L-Lys은 이 효소에 대하여 경쟁적 억제 작용을 하였으며 K<sub>i</sub>값은 0.12 mmole 이었다.

문헌

Auld, D.S. and Vallee, B.L. (1971): *Biochem.* 10: 2892.  
 Baldy, P. (1972): *C.R. Acad. Sc., Paris* 275:2877.  
 Baldy, P. (1975): *Physiol. Plant* 34:365.  
 Baldy, P. (1976): *Planta* 130:275.  
 Bayliss, R.S., Knowles, J.R. and WyrRANDT, G.B. (1969): *Biochem. J.* 113:377.  
 Bergmeyer, H.U. (1974): *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York. pp.986.  
 Bradford, M.M. (1976): *Anal. Biochem.* 72:248.  
 Dixon, M. (1953): *Biochem.* 55:161.  
 Davis, B.J. (1964): *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121:404.  
 Fry, K.T., Kim, O.K., Spona, J. and Hamilton, G.A. (1968): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30:489.  
 Kanematsu, A. and Natori, S. (1970a): *Chem. Pharm. Bull.* 18:779.  
 Kanematsu, A. and Natori, S. (1970b): *Yakugaku Zasshi* 90:475.  
 Kanayama, H., Adachi, N. and Togami, M. (1983): *Chem. Pharm. Bull.* 31:1115.  
 Knowles, J.R. and WyrRANDT, G.B. (1968): *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 1:211.  
 Lundbland, R.L. and Stein, W.H. (1969): *J. Biol. Chem.* 244:151.  
 Min, T.J., Hong, S.I. and Kim, J.W. (1983a): *Kor. Biochem. J.* 16:42.  
 Min, T.J., Chung, K.S. and Kim, J.W. (1983b): *Kor. Biochem. J.* 16:205.  
 Min, T.J., Lee, S.Y. and Kim, J.W. (1985): *Kor. Biochem. J.* 18:142.  
 Oda, K. and Murao, S. (1974): *Agric. Biol. Chem.* 38:2435.

Min, Park and Moon: Characterization of Carboxyl Proteinase in *Poria cocos*

- Rajagopalan, T.G., William, H., Stein, W.H. and Stanford, M. (1966): *J. Biol. Chem.* **241**:4295.
- Rosen, H. (1957): *Arch. Biochem. Biophys.* **67**:10.
- Shibata, S., Natori, S., Fujita, K., Kitagawa, I. and Watanabe, K. (1958): *Chem. Pharm. Bull.* **6**:608.
- Tang, J. (1971): *J. Biol. Chem.* **246**: 4510.
- Terashita, T., Kono, M. and Murao, S. (1977): *Nippon Kingakkai Kaiho* **18**:129.
- Terashita, T., Kono, M. and Murao, S. (1978): *Kogaku Kaishi* **56**:175.
- Terashita, T., Oda, K., Kono, M. and Murao, S. (1981a): *Agric. Biol. Chem.* **45**:1929.
- Terashita, T., Oda, K., Kono, M. and Murao, S. (1981b): *Agric. Biol. Chem.* **45**:1937.
- Wolf, E.D., Schirmer, E.W. and Folk, J.E. (1962): *J. Biol. Chem.* **237**:3094.
- Wood, D.A. (1980): *J. General Microbiol.* **117**:327.
- 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男(1982): 和漢藥物學, 南山堂 pp.100.

<Received February 19, 1986;

Accepted March 21, 1986>