

영지와 잔나비겉상버섯의 원형질체 융합균주의 항암 성분에 관한 연구

정기호 · 박원봉* · 김하원 · 최응철 · 김병각

서울대학교 약학대학 미생물약품화학교실

*서울여자대학교

Studies on Antitumor Components of the Cultured Mycelia of Interspecific Protoplast Fusant F-2 of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma applanatum*

Kee-Ho Jeong, Won-Bong Park*, Ha-Won Kim, Eung-Chil Choi and Byong-Kak Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

ABSTRACT: On the five interspecific protoplast fusants of *Ganoderma lucidum* and *G. applanatum* was the antitumor test performed. The fusant F-2 was selected, to examine the cultured mycelia (protein bound polysaccharide) as antitumor components. When a dose of 20 mg/kg/day of each components purified from F-2 fusant was, *i.p.*, injected into ICR mice, the inhibition ratio of Fr. II against the solid form of sarcoma 180 increased to 1.5 times as compared with that of their parents. When Fr. II was examined for immunopotential activity, it increased the amount of the superoxide anion in activated macrophages to 1.2 times and the count of hemolytic plaque forming cells in the spleen to 4.3 times as compared with that of each control group. Its chemical analysis showed 85.2% polysaccharide which consisted of glucose, galactose, mannose, fucose and xylose, and 0.39% protein of 15 amino acids. The content of hexosamine was 0.39% and the molecular weight of Fr. V was 5.6×10^4 dalton.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, protoplast fusant, tumor inhibition, protein-bound polysaccharide, hemolytic plaque forming cell, macrophage, cultured mycelia.

담자균류의 항암성분에 관한 연구는 Roland 등 (1960)이 *Calvatia gigantea*로부터 calvacin을 분리 함으로써 시작되어, Gregory 등(1966)에 의해 광범위한 연구가 이루어졌다. Espenshade 등(1966)은 이들 항종양 담자균의 분리와 배양에 관한 연구결과를 발표하였고, Chihara 등(1970)은 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 sarcoma 180에 강력한 저지력을 지닌 다당체 lentinan을 분리 정제하였다. 한편 Komatsu 등(1969)은 *Schizophyllum commune*으로부터 항암성 다당체인 schizophyllan을 분리하였고, Tsukagoshi 등(1974)은 *Coriolus versicolor*의 배양균사로부터 항암성 단백다당체인 PS-K를 분리하였으며, Fujii 등(1978)은 *L. edodes*의 단백다당체 KS-2가

인터페론 유도작용이 있음을 보고하였다.

이들 담자균의 항암성분들이 면역에 미치는 영향에 관한 연구도 진행되었는바, Maeda 등(1970)은 lentinan이 cell-mediated response의 immunoaccelerator로 작용함을 밝혔으며 Hamuro 등(1980)은 lentinan과 같은 β -(1 \rightarrow 3) glucan이 복강세포를 활성화시켜서 암세포에 대해 독성작용을 나타낸다고 발표하였다.

한국산 담자균류의 항암성분에 대한 연구는 본 연구실에서 구름버섯, 표고버섯, 느타리버섯 등의 자실체의 고분자 추출물이 sarcoma 180에 대해 강한 종양억제 작용이 있으며, 이 성분들은 다당류와 단백질로 구성되어 있음을 보고함으로써 시작되어

(Kim *et al.*, 1980), 표고버섯균사의 액내배양시 항암성 단백다당체의 생성을 확인하였으며(Park *et al.*, 1979), 젓버섯아재비 및 메꽃버섯의 자실체로부터 항암성 단백다당체를 분리했고(Min *et al.*, 1980), 구름버섯 배양균사의 항암성분인 단백다당체의 면역증강 효과를 입증하였다(Shim *et al.*, 1979). 노랑치마아재비버섯의 항암성분연구(Chung *et al.*, 1985)와 *Lyophyllum decastes* 항암성분의 면역학적 연구(Lee *et al.*, 1987) 등 버섯의 항암성분연구에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 영지는 다공균과 *Polyporaceae*에 속하는 버섯으로 옛부터 동맥경화, 협심증, 뇌졸중, 신경쇠약, 위궤양, 소화불량 등의 만성병, 해소, 기침, 급성 병독성 간염 및 각종 암 등에 사용되어왔다. Kim 등(1980)에 의해 영지의 자실체에서 항암효과가 존재한다는 사실이 처음 밝혀진후 Kang 등(1981)은 영지 배양 균사체의 항암 효과를 실험하여 sarcoma 180에 대해 우수한 중앙억제력이 있음을 보고하였다. 또한 Miyazaki 등(1982)은 영지 자실체를 알칼리로 추출하여 수용성 heteroglycan을 분리하여 sarcoma 180에 대한 항암효과 및 구조를 해명하였고, Shin 등(1985)은 영지 열수추출물이 마우스의 면역세포수를 증강시킴을 밝혔으며, Hyun 등(1990)은 영지 자실체의 항암성분을 분리, 정제하고 그 항암성분이 마우스의 macrophage 및 용혈반 형성 세포를 활성화함을 밝혔다. 원형질체융합 기법에 의한 유전자 전이로 잡종이나 형질전환된 신품종의 육성이 가능하게 되었고(Peberdy *et al.*, 1989), 본 실험실에서도 영지속 균주의 원형질체 융합에 성공하였다(Park *et al.*, 1989).

저자들은 이러한 뛰어난 성분과 약효를 지닌 영지와 잔나비겉상버섯의 융합균주를 분양받아 5개의 융합균주에 대한 항암능력을 조사하여 그 중 다른 것에 비해 항암력이 높은 융합균주 F-2를 선발하여 모균주와 항암능력을 비교 조사하였으며 항암성분의 분리 및 정제와 면역학적 연구를 수행하였으며 그 화학적 특성에 대하여 구명하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

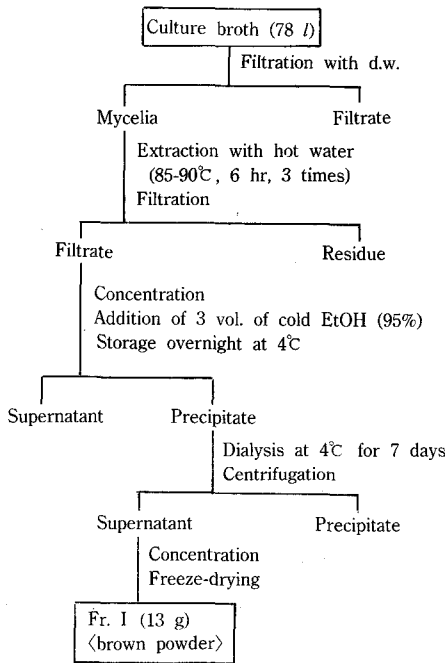
실험재료 및 배지조성 : *Ganoderma lucidum*

(Curt. ex Fr.) Karsten과 *Ganoderma applanatum* (Pers ex S.F. Gray) Karsten의 모균주와 영양요구성 균주 *Ganoderma lucidum* 108(paba⁻) : G1-108, *Ganoderma applanatum* 880(cys⁻, met⁻) : Ga-880 및 원형질체 융합균주 G1-108+Ga-880[No. 2] : F-2를 사용하였다. CCM 사면배지는 glucose 40g, peptone 5g, yeast extract 5g, KH₂PO₄ 0.46g, K₂HPO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, agar 20g을 증류수 1ℓ를 가해 121°C, 1.1 kg/cm²에서 15분간 고압증기 멸균하여 사용하였다. 균체배양으로는 glucose 40g, peptone 5g, yeast extract 5g, KH₂PO₄ 0.46g, K₂HPO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 0.5g을 증류수 1ℓ를 가해 121°C, 1.1 kg/cm²에서 15분간 고압증기 멸균하여 사용하였다.

배양방법 : 분양받은 균주를 CCM slant에 이식하여 27±1°C에서 7일간 배양된 균사를 무균적으로 100 ml의 액내배지와 분쇄하고 27°C에서 180 rpm으로 10일간 진탕배양하였다. 1차 배양하여 얻은 균사를 분쇄 후 100 ml 배지에 접종하고 1차 예비배양과 동일 조건으로 배양균사가 성숙할 때까지 10일간 진탕배양하였다. 2차 예비배양하여 얻은 균사를 분쇄하여 1000 ml 배지에 10%(v/v)로 접종하여 위의 조건으로 10일간 진탕배양하여 7ℓ의 배양액을 얻었다.

단백다당체의 추출 및 분리 : 본 배양후 배양액 7ℓ를 감압여과하여 배양균사를 얻고 이를 증류수로 3회 세척한 다음 증류수와 함께 균질화 후 mantle에서 6시간 동안 3회 열수 추출하였다. 감압여과의 추출액을 분리하고 감압농축한 후 3배의 95% ethanol을 가하고 4°C에서 24시간 방치하여 침전을 얻어서 Visking tube에 넣어 4°C에서 증류수로 7일간 투석하였다. 투석 후 원심분리하여 상정액과 불용성 침전으로 분리하고 상정액은 농축하여 동결건조하여 갈색 건조분말(이후 Fr. I이라 칭함) 13g을 얻었다 (Scheme 1).

DEAE-cellulose column chromatography : 상기에서 분리한 Fr. I(11g)을 DEAE-cellulose resin(Cl⁻ form, Sigma Chemical Company, U.S.A.)으로 packing시킨 column(6.0φ×43 cm)에 적용하여 탈이온수(pH 7.2)로 30 ml/hr의 유속으로 elution하여 effluent는 7 ml/fraction으로 분취하였다. 각 분획에 대한 흡광도는 625 nm에서 anthrone 반응, 595 nm

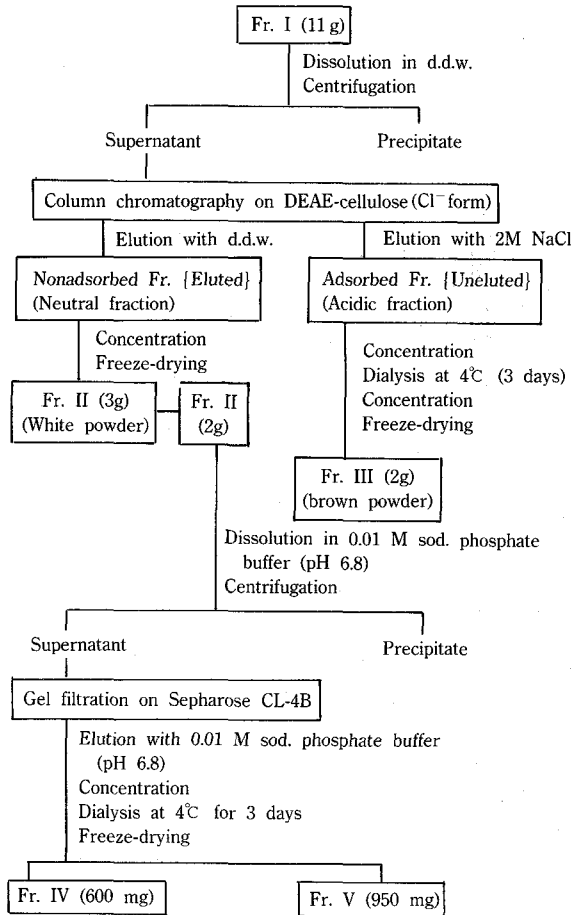


Scheme 1. Extraction and separation of antitumor fractions from the fusant F-2 mycelia of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma applanatum*.

에서 Bradford test를 실시하여 각각 다당체와 단백질 함량을 측정하였다. anthrone 반응 양성 분획들을 모아 농축, 동결건조하여 흰색분말 3g을 얻어 Fraction II라 하였고, DEAE-cellulose에 흡착된 성분은 2 M NaCl로 elution하여 갈색분말 2g을 얻어 Fraction III라 하였다.

Sephacrose CL-4B gel filtration chromatography : 상기에서 분리한 Fr. II(2g)를 더욱 정제하기 위하여 0.01 M 인산염 완충액(pH 6.8)에 용해시킨 후 Sephacrose CL-4B(Pharmacia Co.)로 충전시킨 column(2.7φ×87 cm)을 이용하여 0.01 M 인산염 완충액(pH 6.8)으로 50 ml/hr의 속도로 elution시켰으며 7 ml/fraction으로 분취하여 anthrone 반응 양성 분획들을 모아 농축, 동결건조하여 흰색분말의 Fraction IV(600 mg)와 Fraction V(950 mg)을 얻었다 (Scheme 2).

단백다당체의 항암실험 : 서울대학교 동물사육장에서 구입한 ICR 마우스(♂, 20-25g)를 사용하였다. ICR 마우스의 복강내에서 7일간 배양된 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 생리 식염수로 세

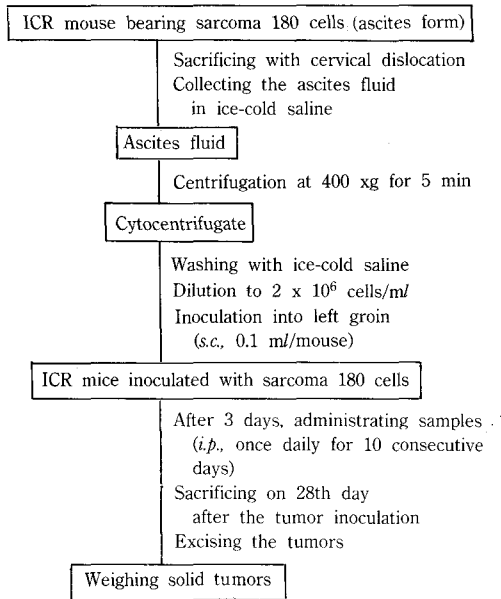


Scheme 2. Purification of the antitumor components from the cultured mycelia of the fusant F-2.

척하고 sarcoma 180 세포만을 분리하였다. 생리식염수로 2×10^6 cells/ml이 되도록 부유액을 만들고, 이 부유액 0.1 ml/씩을 건강한 정상 ICR 마우스의 왼쪽 서혜부에 피하 이식하였다.

약물투여는 종양세포를 이식하고 3일 후부터 매일 1회씩 10일간 연속하여 항암성분을 복강내에 주사하였다. 대조군에는 생리식염수를, 항암성분 투여군에는 생리식염수에 용해시킨 시료를 20 ml/kg씩을 0.1 ml/씩 주사하였다. 모든 주사약물은 121°C, 1.1 kg/cm²에서 15분간 고압증기 멸균하였다 (Scheme 3).

결과의 판정은 종양세포를 이식한지 28일째 되는 날 실험 동물을 치사시키고, 유발된 고형암을 적출한 후 그 중량을 측정하여 평균 종양 중량을 얻고 이



Scheme 3. Procedure of antitumor test *in vivo*.

로부터 다음식에 따라 종양 저지 백분율(percent inhibition ratio=I.R., %)을 계산하였다. I.R., % = (CW-TW)/CW×100, 여기서 CW는 대조군의 평균 종양 중량이며 TW는 투여군의 평균 종양 중량이다.

항암 성분의 작용기전에 대한 면역학적 연구 :

1) 마우스의 용혈반 형성 세포수에 미치는 영향 : 용혈반 형성 세포수의 측정은 Cunningham(1973)의 방법을 개량하여 다음과 같이 시행하였다(Jerne *et al.*, 1963). 실험동물은 ICR 마우스(♂, 20-25g)을 사용할 때, Scheme 4와 같이 실험하였다. ICR 마우스(♂, 20-25g)를 사용하였다. 시약은 HBSS(pH 7.3), 0.83% NH₄Cl solution, DEAE dextran (0.05%, Pharmacia Co.), Agar(0.5%, Difco, U.S.A.) 및 Sheep Red Blood Cells(SRBC) 이었다. SRBC는 한국국립보건원에서 구입하여 사용하였다.

약물투여 및 immunization : 각 실험군마다 6마리의 마우스를 사용하여 대조군에는 생리식염수를 항암성분 투여군에는 Fr. II 40 mg/kg씩을 매일 1회 5일간 연속적으로 복강내에 주사하여, 최종 시료 투여일로부터 7일 후에 SRBC(1×10⁷ cell/0.1 ml)를 복강내에 주사하여 면역화시켰다(Niels *et al.*, 1963; Kikuo *et al.*, 1975; Klaus *et al.*, 1987). 비장세포 부유액의 제조 : 5일 후에 마우스를 치사시켜 즉시

비장을 적출하여 빙냉의 HBSS와 함께 분쇄시켜 비장세포를 유리시키고 400 xg에서 5분간 원심분리하여 상정액을 제거 후 37°C의 0.83% NH₄Cl 용액에 부유시켜 3분간 방치 적혈구를 용해시키고 다시 원심분리하여 빙냉의 HBSS에 부유시켜 적혈구가 제거된 비장세포수를 측정하였다. 50% SRBC 제조 : Alsever's 용액에 현탁된 SRBC를 생리식염수로 3회 세척하고(400 xg, 5분) 50%(v/v)가 되도록 생리식염수에 부유시켰다. Agar 용액의 제조 : HBSS에 0.5% agar와 0.05% DEAE dextran을 넣어 녹인 후 이 액을 47°C로 유지하였다. 배양 혼합액의 제조 : 25 μl의 50% SRBC, 25 μl complement, 350 μl의 agar 용액과 150 μl 비장세포 부유액을 즉시 혼합하고 culture plate에 이 혼합액 150 μl를 가하고 microscopic cover glass를 덮어 굳혔다. 배양과 결과계산 : 위의 agar plate를 37°C에서 3시간 배양 후 형성된 용혈반 형성 세포수를 측정하였다(Scheme 5).

$$PFC/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C \cdot V_m \cdot a} \times 10^6$$

$$PFC/\text{total spleen cells} = (PFC/10^6 \text{ spleen cells}) \times C \times V_s/10^6$$

$$\text{단, } a = \frac{150}{550}$$

(배양혼합액중의 비장세포 부유액의 비율)

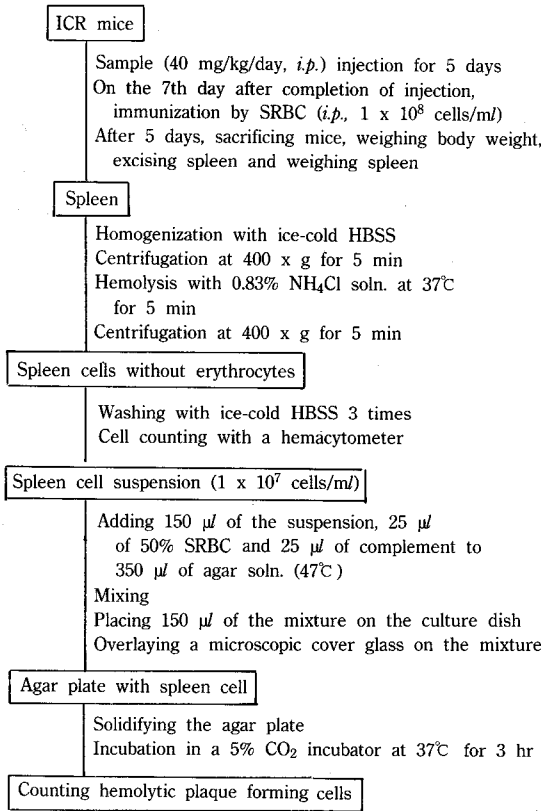
N : number of plaque observed in one cover glass

C : count of spleen cells in 1 ml of spleen cell suspensions

V_m : volume of incubation mixture filled into one cover glass (ml)

V_s : total volume of spleen cell suspension (ml)

2) 마우스의 macrophage(Mφ) 활성화에 미치는 영향 : ICR 마우스(♂, 20-25g)를 사용하였다. 시약 및 재료는 HBSS (pH 7.3), PBS (pH 7.3), Ferricytochrome C(Sigma Chem. Co., USA), 0.5% sodium dodecyl sulfate solution, Human serum(Sigma

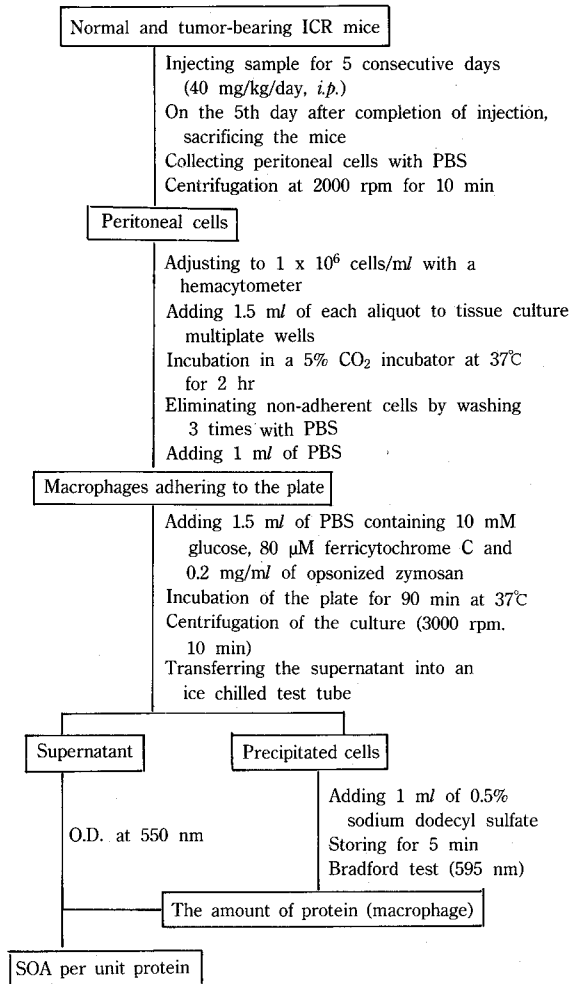


Scheme 4. Assay procedure of hemolytic plaque forming cells.

Chem. Co., USA), RPMI-1640 medium(Gibco Co., USA), Tissue culture multiplate well(Falcon Co., USA), Opsonized zymosan : Zymosan A(Sigma Chem. Co. USA)를 10 mg/ml로 PBS에 넣고 1시간 끓인 후 3회 씻고 50 mg/ml로 PBS에 녹이고 zymosan과 human serum을 1 : 4의 비율로 37°C에서 30분간 배양 후 원심분리하여 PBS로 최종농도가 10 mg/ml이 되도록 제조하였다.

① 종양이식 및 약물투여 : 12마리의 마우스를 4 실험군으로 나누어 2군은 sarcoma 180을 마우스의 왼쪽 서혜부에 이식하고 다른 2군은 정상으로하여 그들 각각을 다시 대조군과 약물투여군으로 나누어 생리식염수와 Fr. II 및 Fr. V(40 mg/kg/day) 항암성분을 매일 1회 5일간 연속 투여하였다(Sabato *et al.*, 1988 ; Richard *et al.*, 1975 ; Ito *et al.*, 1983).

② 복강세포중의 Mφ의 제조 : 약물투여 완료 후



Scheme 5. Procedure of superoxide anion assay in activated macrophages.

5일째 되는날 마우스를 치사시켜 HBSS로 복강세포를 취하여 1200 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전된 세포를 1×10⁶/ml로 RPMI-1640 배지에 37°C에서 2시간 배양 후 plate에 선택적으로 부착된 Mφ만을 취했다.

③ superoxide anion(SOA)양의 측정 : plate에 부착된 Mφ에 10 mM glucose, 80 μM ferricytochrome C와 0.2 mg/ml opsonized zymosan을 함유한 PBS 1.5 ml을 가하고 37°C에서 90분간 배양한 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액은 냉시 실험관에 옮겨 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 침전된 Mφ 세포는 0.5% sodium dodecyl sulfate 1

mL를 가해 5분간 방치 후 변성된 단백질 양을 Bradford test로 측정하였다. ferricytochrome C양은 550 nm 흡광도로 측정하여 단백질당 SOA양을 계산하였다(Scheme 5).

$$\Delta E_{550} = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{SOA nmol/well} = \text{O.D. at 550 nm} \times 15.87$$

$$\text{SOA nmol/mg protein} = (\text{O.D. at 550 nm} \times 15.87) / \text{M}\phi \text{ amount(mg)}$$

항암성분의 화학분석 :

1) 다당체 함량 측정 : 다당체의 함량은 Herbert 등(Herbert *et al.*, 1971)의 방법으로 anthrone 시약과 반응하여 발색된 색도를 625 nm에서 Shimadzu UV spectrophotometer로 측정하였다.

2) 단백질 함량 측정 : 단백질 함량은 Bradford test(Scopes, 1987)의 방법에 준하였고, bovine serum albumin(Sigma Chem. Co.)을 표준으로 사용하여 시료중의 단백질 함량을 측정하였다.

3) Hexosamine 함량 측정

(A) 시약 :

① 표준 glucosamine에 대한 시약 A : acetylacetone 1.5 ml에 0.5 N Na₂CO₃ 50 ml를 가하였다. 시료에 대한 시약 A: acetylacetone 1.5 ml에 1.25 N Na₂CO₃ 50 ml를 가하였다.

② 시약 B: conc. HCl 30 ml에 p-dimethylaminobenzaldehyde 1.6g을 녹인 후 30 ml 96% ethanol을 가한다.

(B) 방법

Elson-Morgan method에 준하여 실시하였다(Chaplin *et al.*, 1987). 각 시료 5 mg에 3 N HCl 1 ml을 넣고 질소 가스로 충전시킨 후 100°C에서 15 시간 가수분해하고 여과감압농축하여 건조시켜 1 ml H₂O에 녹였다. 각각의 시료와 표준 glucosamine 0.5 ml에 시약 A 1 ml를 가하고 96°C에서 1시간 반응시킨 후 상온에서 식히고 10 ml 96% ethanol과 1 ml 시약 B를 넣고 1시간 방치후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. glucosamine을 이용하여 작성한 standard curve로부터 총 hexosamine 함량을 계산하였다.

4) 단당류의 분석 : 다당체를 구성하고 있는 단당류의 분석은 Mitruka(1975)의 방법에 준하였으며 시료 5 mg을 4% HCl-MeOH와 함께 teflon-sealed cap tube에 넣고 질소로 충전시킨 후 80±5°C에서

20시간 동안 methanolysis시켰다. 여과하여 감압농축 후 1 ml의 pyridine에 녹인 다음 0.2 ml의 hexamethyldisilazane과 0.2 ml trimethylchlorosilane을 가하고 30초간 진탕한 뒤 30분 방치후 Gas Liquid Chromatography(GLC)를 실시하였다. 각 표준품 5 mg씩도 동일한 조작으로 GLC를 실시하고 각각의 단당류 성분은 relative retention time으로 동정하였고 정량은 peak 면적을 계산하여 구하였다(Scheme 6).

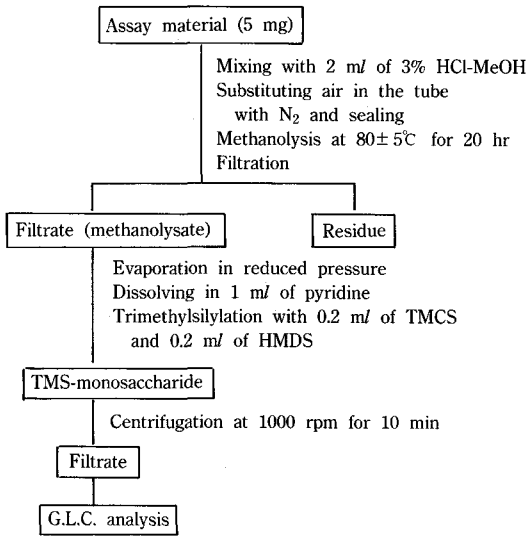
5) 아미노산 분석 : 단백질을 구성하는 아미노산을 분석하기 위해 시료 5 mg을 5 ml의 6 N HCl과 함께 teflon sealed cap tube에 넣고 질소로 충전한 다음 밀봉하여 110±5°C에서 24시간 가수분해시켰다. 얻어진 가수분해물을 여과하여 감압농축 건조 후 0.02 N HCl에 녹여 아미노산 자동 분석기로 분석하였다. 얻어진 chromatogram을 표준 아미노산 chromatogram과 비교하여 peak area method에 의해 정량하였다.

6) 원소분석 : 시료의 원소량은 Perkin-Elmer 원소분석기를 이용하여 정량하였다. 산소비율은 탄소, 수소와 질소치를 100에서 감하여 계산하였고, 각각의 상대량은 mole 비율로 나타내었다.

분자량 측정 : 중성다당체(Fr.II)의 분자량을 측정하기 위하여 Sepharose CL-4B gel filtration을 실시하여 정제하였다. Fraction V 분자량을 측정하기 위하여 표준 dextran 분자량 2,000,000과 480,000 그리고 60,000을 이용하여 인산염 완충액으로 40 ml/hr의 유속으로 elution시켜 elution volume을 구하였고, Fr. II도 동일 조건으로 실시하여 elution volume을 구해 표준품의 분자량에 대한 logarithm으로 Fraction V의 분자량을 구하였다(Cooper *et al.*, 1977).

결 과

원형질체 융합균주 F-2의 배양 균사로부터 단백질 다당체의 분리 및 정제 : 영지버섯과 잔나비겉살버섯의 원형질체 융합균주 F-2의 배양액 78l로부터 갈색분말(Fr. I) 13g을 얻었고, Fr. I(11g)을 DEAE cellulose 이온교환을 실시하여 중성 다당체 성분인 흰색분말(Fr. II) 3g과 산성 다당체 성분인 갈색분말(Fr. III) 2g을 얻었다. 그 elution 양상은 Fig. 1과



Scheme 6. Procedure of monosaccharide analysis.

같다. 또한 Fr. II(2g)를 Sepharose CL-4B gel filtration을 실시하여 고분자량의 Fr. IV(600 mg)와 저분자량의 Fr. V(950 mg) 두가지 성분을 얻었다. 그 elution 양상은 Fig. 2와 같다.

항암실험 : F-2의 배양 균사로부터 분리한 각 분획과 모균주들에 대하여 항암실험을 한 결과, F-2의 각 성분들은 28.77~64.59%, 모균주들은 40.81~49.11%의 종양 억제작용을 나타내었다(Table 1).

항암성분의 작용기전에 대한 면역학적 효과

1) 마우스의 용혈반 형성 세포수에 대한 영향 : Fr. II 투여군의 용혈반 형성세포(PFC)는 대조군에 비해 4.29배 증가하였다(Table 2).

2) macrophage 활성화에 대한 영향 : Fr. II 투여군의 superoxide anion 분비량은 대조군에 비해 정상군에서 1.21배 소량 증가하였으며, Fr. V 투여군도 1.17배 소량 증가하였다(Table 3). 복강 세포와 90분 배양 후 culture plate에 부착된 macrophage를 촬영하였다.

화학분석 결과 : 각 성분의 원소조성은 탄소, 수소, 질소 및 산소로 구성되었고 그 함량비는 Table 4와 같다. 각 성분의 다당체와 단백질 함량은 Table 5와 같고 hexosamine 함량은 glucosamine standard curve로부터 구하였다(Table 6). 각 성분의 단당류 분석 결과는 Table 7과 같이 서로 상이한 조성을 보였으며, 단백질을 구성하는 아미노산의 조성 역시

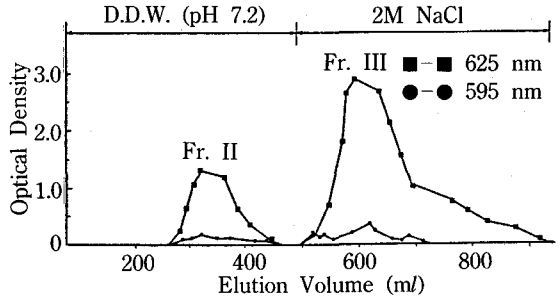


Fig. 1. The elution profile of Fraction I obtained from the mycelia of F-2 by DEAE-cellulose ion-exchange chromatography.

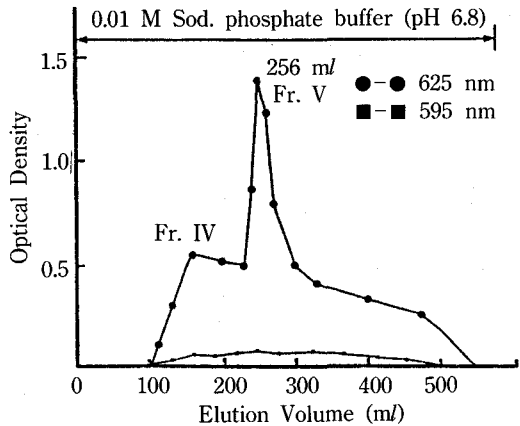


Fig. 2. The elution profile of Fraction II obtained from the mycelia of F-2 by Sepharose CL-4B gel filtration chromatography.

서로 다른 조성을 함유하였다(Table 8).

분자량 측정결과 : Sepharose CL-4B gel filtration chromatography에 의해 Fraction V의 분자량을 측정하였다. Fr. II의 elution 양상은 Fig. 2에 나타났다. 3개의 표준 dextran의 분자량과 elution volume으로부터 standard curve를 구했고, 그 결과 Fraction V의 분자량은 5.6×10^4 dalton이었다(Fig. 3).

고 찰

영지버섯과 잔나비겉상버섯의 원형질체 용합균주 F-2의 배양균사체로부터 분리된 단백질다당체 성분들은 모균주들에 비해 sarcoma 180 고형암에 대한 저지율이 뛰어났으며 특히 Fr. II는 가장 높은 64.59%의 종양저지율을 나타내어 모균주들 42.8%에 비해 1.5배의 종양저지 능력의 증가를 나타내었다.

Table 1. Antitumor activities of the fusant and their parents.

Fraction	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight (g) (Mean± S.D.)	Inhibition ratio (%)	Complete regression
Control	Saline	7.40± 0.70*	—	0/7**
Krestin	20	2.71± 1.16	63.38	1/7
GL	20	3.77± 1.23	49.11	0/7
GA	20	4.38± 1.14	40.81	0/8
GI-108	20	3.89± 0.93	47.43	0/8
Ga-880	20	4.16± 0.69	43.78	0/8
Fr. I	20	3.23± 0.92	56.35	0/7
Fr. II	20	2.62± 1.16	64.59	1/7
Fr. III	20	3.72± 0.56	49.73	0/8
Fr. IV	20	3.85± 1.30	47.97	0/7
Fr. V	20	3.36± 1.50	54.59	1/7

Fraction	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight(g) (Mean± S.D.)	Inhibition ratio(%)	Complete regression
Control	Saline	5.69± 0.70*	—	0/7**
Krestin	20	2.75± 1.02	51.62	0/7
Fr. I	20	2.74± 1.06	51.85	0/7
Fr. II	20	2.33± 0.85	58.97	0/7
Fr. IV	20	4.08± 1.09	28.77	0/7
Fr. V	20	2.97± 1.02	47.82	0/7

$p < 0.01$, *Mean± standard deviation, **Number of ICR mice used

Table 2. Effects of the antitumor component on the hemolytic plaque forming cells (PFC) in the spleen of ICR mice immunized with SRBC.

	Control group	Treated group
Body weight(g)	24.01± 1.36*	21.32± 1.82
Spleen weight(mg)	134.29± 42.71	136.17± 23.63
Spleen cell count(x10 ⁷)	3.29± 0.30	2.99± 0.10
PFC/10 ⁶ spleen cells	145.98± 43.73	489.10± 53.25
PFC/spleen(x10 ³)	3.37± 0.83	14.46± 4.38

*Mean± standard deviation, $p < 0.05$

마우스의 면역작용에 대한 영향은 Fr. II를 투여시 비장세포를 활성화하여 항체를 생성하는 용혈반 형성 세포(B cell) 수를 대조군에 비해 4.29배 증가시켰으며, Fr. II 및 Fr. V를 각각 투여시의 복강내 세포중의 macrophage의 활성화정도를 superoxide anion 분비량으로 측정된 결과 각각 대조군에 비해 1.21배와 1.17배 소량의 분비 증가가 있었으나 이 성분

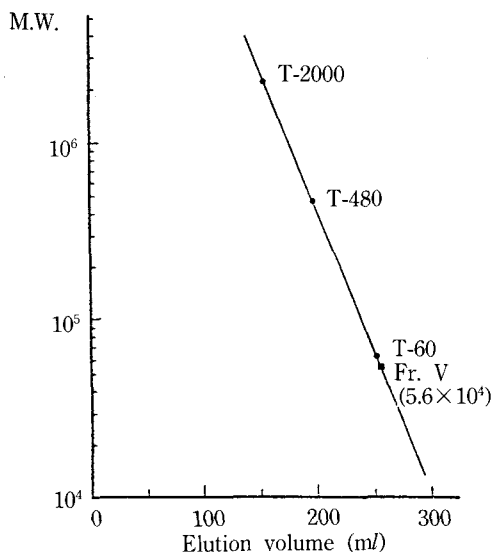


Fig. 3. Standard calibration curve for the determination of molecular weight of Fraction V. The elution volume was plotted against the logarithm of molecular weight.

Table 3-a. Effects of the antitumor component (Fr. II) on the release of SOA by induced macrophage (M ϕ) from normal and tumor-bearing mice.

	Group	M ϕ contents (mg/ml)	SOA released (nmol/mg protein)	Ratio (t/c)
Normal	control	0.058 \pm 0.001	102.401 \pm 0.343*	1.21
	treated	0.059 \pm 0.009	123.437 \pm 0.308	
Tumor	control	0.068 \pm 0.004	89.783 \pm 0.514	1.11
	treated	0.063 \pm 0.014	99.414 \pm 3.114	

*Mean \pm standard deviation, $p < 0.01$ **Table 3-b.** Effects of the antitumor component (Fr. V) on the release of SOA by induced macrophage (M ϕ) from normal and tumor-bearing mice.

	Group	M ϕ contents (mg/ml)	SOA released (nmol/mg protein)	Ratio (t/c)
Normal	control	0.013 \pm 0.001	481.934 \pm 12.649*	1.17
	treated	0.012 \pm 0.001	563.023 \pm 15.523	
Tumor	control	0.012 \pm 0.002	516.350 \pm 70.850	1.03
	treated	0.011 \pm 0.002	529.635 \pm 71.866	

*Mean \pm standard deviation, $p < 0.01$ **Table 4.** Elemental compositions of the fractions of the fusants and their parents.

Fraction	C	H	O	N
Fr. I	6.00*	10.08	6.68	0.26
Fr. II	6.00	10.26	6.70	0.02
Fr. III	6.00	9.68	6.50	0.12
Fr. IV	6.00	12.66	10.14	0.01
Fr. V	6.00	13.98	7.01	0.12
GL	6.00	9.38	6.31	0.08
GA	6.00	9.36	6.23	0.44
Gl-108	6.00	9.76	6.48	0.05
Ga-880	6.00	9.78	7.06	0.28

*Expressed as the mole ratio

들은 직접적인 M ϕ 활성증가를 나타냈다고 볼 수는 없으므로 B cell의 활성화에 의한 면역작용으로 항암작용을 나타낸다고 할 수 있다.

각 성분의 원소구성은 탄소, 수소, 질소와 산소로 구성되었고 다당체와 단백질 함량을 측정해본 결과 모균주에 비해 F-2의 crude 성분인 Fr. I은 94.42%의 다당체와 4.1%의 단백질을 함유하고 있었고 정제해나감에 따라서 점차 다당체와 단백질 함량이 감

Table 5. Polysaccharide and protein contents of the fractions of the fusants and their parents.

Fraction	Polysaccharide contents	Protein contents
Fr. I	94.42 \pm 7.58*	4.10 \pm 0.37 ^a
Fr. II	85.16 \pm 8.86*	0.39 \pm 0.35
Fr. III	97.41 \pm 5.11*	6.52 \pm 0.23
Fr. IV	50.53 \pm 0.42*	0.31 \pm 0.08
Fr. V	37.76 \pm 6.90*	0.41 \pm 0.31
GL	90.32 \pm 8.31**	3.17 \pm 0.05
GA	67.58 \pm 1.60**	6.72 \pm 0.04
Gl-108	81.39 \pm 8.14**	2.17 \pm 0.08
Ga-880	48.25 \pm 1.45**	5.48 \pm 0.25

*Mixture 1: Glucose (68.46%), Mannose (17.58%), Galactose (9.18%) and Fucose (4.79%)

**Mixture 2: Glucose (56.88%), Mannose (13.99%), Galactose (24.72%), Fucose (3.42%) and Xylose (0.98%)

^aMean \pm standard error (expressed as the weight percentage)

소하였다. 또한 다당류와 단백질의 결합도를 알아보기 위해 hexosamine양을 측정해본 결과 모균주와 융합균주 성분 모두에서 hexosamine이 검출된 것

으로 보아 이들 성분들은 다당체와 단백질이 결합된 단백다당체 물질임을 알 수 있었다.

이들 항암성분의 다당체를 구성하고 있는 단당류의 성분을 조사하기 위하여 GLC를 실시해본 결과 각 성분들의 단당류 함량이 서로 상이하였고 특히 항암력이 높은 Fr. II는 glucose, galactose, mannose, xylose와 fucose의 5종의 단당류로 구성되었고 다른 성분들도 2종 이상의 단당류로 구성된 것으로 보아 이들 다당체는 heteropolysaccharide임이 관찰되었다.

항암성분의 단백질을 구성하고 있는 아미노산의 조성을 확인해본 결과 이들 성분들은 16종 내외의 아미노산으로 구성되었으며 특히 serine, threonine,

alanine 같은 아미노산이 많이 함유되어 있었다.

각 성분들의 IR spectra는 모든 성분들이 3400 cm^{-1} 부근에서 O-H 신축진동, 1000 cm^{-1} 부근에서 C-H, C-O 변각운동, 1650 cm^{-1} 부근의 C-O 신축진동을 나타냈고, 2900 cm^{-1} 부근의 C-H 신축진동은 Fr. IV를 제외하고 모두 관찰되었다.

이상의 GLC, IR, 아미노산 분석결과에서 서로 다른 양상을 나타낸 것으로 보아 이들 성분들은 서로 상이한 물질임을 알 수 있었다.

결론

영지버섯과 잔나비겉상버섯의 원형질체 융합균주들에 대한 항암작용을 검색하였던 바, 모균주에 비해 항암능력이 좋은 융합균주 F-2를 선발할 수 있었으며 F-2의 균사체 배양 성분을 정제함으로써 모균주들에 비해 항암력이 1.5배 증가된 Fr. II를 얻었다.

Fr. II를 정제한 Fr. V의 분자량은 56,000 dalton 이었다. Fr. II는 94.42%의 다당류와 4.1%의 단백질로 구성되었으며, 그 다당체는 35.8% glucose, 34.13% galactose, 18.03% mannose, 7.14% fucose와 4.91% xylose의 5종의 단당류로 구성된 heteropolysaccharide이었으며, 그 단백질은 serine, alanine, threonine을 위시한 15종의 아미노산을 함유하고 있음이 확인되었다. 항암성분 Fr. II의 면역반응에 대한 영향을 조사해본 결과 용혈반 형성 세포수는 증가시켰으나, macrophage의 superoxide anion 분비증가는 거의 볼 수 없었으므로 이 항암성분은 B cell

Table 6. The contents of free hexosamine and N-acetylhexosamine of the fractions of the fusants and their parents.

Fraction	Hexosamine (% w/w)
Fr. I	0.83±0.02*
Fr. II	0.39±0.04
Fr. III	0.79±0.09
Fr. IV	0.04±0.01
Fr. V	0.30±0.04
GL	0.63±0.01
GA	0.99±0.01
GI-108	0.37±0.07
Ga-880	0.95±0.12

*Mean± standard deviation

Table 7. Monosaccharide contents of the polysaccharide moiety of the fractions of the fusants and their parents by G.L.C. analysis.

Fraction	Glucose	Galactose	Mannose	Fucose	Xylose
Fr. I	69.86*	20.29	9.85	N.D.**	N.D.
Fr. II	35.80	34.13	18.03	7.14	4.91
Fr. III	89.06	1.80	9.14	N.D.	N.D.
Fr. IV	71.05	28.95	N.D.	N.D.	N.D.
Fr. V	18.65	38.43	32.95	9.97	N.D.
GL	52.43	18.92	14.36	14.30	N.D.
GA	53.77	14.91	26.47	4.85	N.D.
GI-108	90.76	2.89	6.36	N.D.	N.D.
Ga-880	76.87	N.D.	23.13	N.D.	N.D.

*Expressed as the area percentage. **Not Detected

Table 8-a. Amino acid contents of the protein moiety of the fractions of parents types.

Amino acids	Retention time(min)	GL	GA	GI-108	Ga-880
L-Aspartic acid	8.46	8.06	10.81	8.59	9.39
L-Threonine	9.32	10.93	6.33	9.00	8.70
L-Serine	10.04	15.28	11.14	12.61	10.49
L-Glutamic acid	10.85	8.09	10.18	9.91	9.23
L-Glycine	15.92	10.31	15.23	11.29	11.46
L-Alanine	17.34	12.80	9.48	13.13	10.15
L-Cysteine	19.69	0.42	0.27	N.D.**	N.D.
L-Valine	22.56	6.33	5.83	5.55	8.08
L-Methionine	23.89	0.80	0.97	0.83	1.20
L-Isoleucine	26.01	2.23	2.01	2.05	2.54
L-Leucine	27.25	4.45	3.48	3.67	4.47
L-Tyrosine	29.24	1.05	1.43	0.95	1.32
L-Phenylalanine	30.61	1.35	1.67	1.31	2.03
L-Lysine	35.28	3.21	4.11	3.02	4.27
L-Histidine	39.25	1.18	1.27	0.96	0.95
L-Arginine	46.25	1.35	1.96	1.15	1.78

Table 8-b. Amino acid contents of the protein moiety of the fusant components.

Amino acids	Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. IV	Fr. V
L-Aspartic acid	10.79*	4.13	9.00	5.32	4.01
L-Threonine	6.61	10.39	8.71	4.02	7.76
L-Serine	11.07	18.84	9.97	5.87	13.06
L-Glutamic acid	7.32	3.98	6.78	6.78	3.46
L-Glycine	11.33	8.96	11.56	6.61	7.08
L-Alanine	9.64	17.73	10.72	8.52	11.25
L-Cysteine	N.D.**	N.D.	0.34	N.D.	N.D.
L-Valine	5.48	5.31	7.56	7.71	6.22
L-Methionine	0.85	1.54	1.11	N.D.	N.D.
L-Isoleucine	1.69	2.08	1.87	3.34	1.24
L-Leucine	3.32	3.70	4.20	4.99	2.30
L-Tyrosine	1.74	0.87	1.56	N.D.	0.38
L-Phenylalanine	1.64	1.77	1.58	2.42	1.18
L-Lysine	3.43	2.70	3.21	4.52	2.62
L-Histidine	1.41	0.47	0.99	N.D.	0.39
L-Arginine	1.70	1.06	1.58	N.D.	0.84

*Expressed as the mole percentage, **Not Detected

활성화 이외의 다른 기전에 의해 항암작용을 나타낼 수 있었다. 모균주와 융합균주 F-2에 대한 화학분석결과 다당체와 단백질 함량이 상이하었고, 단당류와 아미노산의 조성 및 peak pattern도 서로 상이한 것으로 보아 항암력이 높은 F-2는 모균주와는 다른 화학조성을 갖는 새로운 균주임을 입증할 수 있었다.

摘 要

영지버섯 *Ganoderma lucidum*과 잔나비겉상버섯 *Ganoderma applanatum*의 원형질체 융합균주 5개에 대하여 항암실험을 실시하여 그 중에서 다른 것에 비해 항암력이 높은 융합균주 F-2를 선발하였다. 그 항암성분을 조사하기 위하여 융합체의 균사를 액내 배양하고 열수추출물로부터 얻은 단백 다당체를 DEAE cellulose ion exchange column chromatography와 Sepharose CL-4B gel filtration을 이용하여 5가지 분획(Fr. I-V)으로 분리, 정제하여 모균주들과의 차이점을 비교, 분석하였다. 모균주와 분리한 각 성분들을 20 mg/kg/day 용량으로 마우스의 복강에 투여하였을 때 sarcoma 180 고형암에 대하여 균주보다 융합체 성분(Fr. II)의 종양억제율이 최고 1.5 배로 증가되었다. 그리고 마우스의 면역에 영향을 미치는 항암성분을 연구한 결과, 대조군에 비해 활성화된 대식세포에서 분비되는 superoxide anion의 양을 1.2배, 비장세포중의 용혈반 형성 세포수를 4.3 배로 증가시켰다. 화학분석에 의하면 이 성분은 glucose, galactose, mannose, fucose와 xylose로 구성된 다당류가 85.2%이며 15종의 아미노산으로 구성된 단백질이 0.39%이었고, hexosamine이 0.39%로 구성되었으며 분자량은 5.6×10^4 dalton이었다.

Acknowledgments

This research was supported in part by a grant from the Research Center for New Drug Development, Seoul National University and we gratefully acknowledge the support. This report is dedicated to the late Professor L. R. Brady, University of Washington for his encouragement and advice to our research.

참고문헌

- Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. 1987. *Carbohydrate Analysis*. IRL Press, Oxford, 174pp.
- Chihara, G., Hamuro, T., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**: 2776.
- Chung, K. S. and Kim, B. K. 1985. Studies on antitumor constituents of *Pluteus cervinus*. *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **10**: 1.
- Cooper, T. G. 1977. *The Tools of Biochemistry*. A Wiley-Interscience Publication, New York, 169 pp.
- Cunningham, A. 1973. Plaque assay for antibody producing cells. *Prog. Allergy* **17**: 5.
- Espenshade, M. A. and Griffith, E. W. 1966. Tumor inhibiting basidiomycetes isolation and cultivation in the laboratory. *Mycologia* **58**: 511.
- Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Ishida, N. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics* **31**: 1079.
- Gregory, F. J., Healy, E. M., Agerborg, H. P. K., Jr. and Warren, G. H. 1966. Studies on antitumor substances produced by *Basidiomycetes*. *Mycologia* **58**: 80.
- Hamuro, J., Rollinghoff, M. and Wagner, H. 1980. Induction of cytotoxic peritoneal exudate by T-cell immune adjuvants of the β -(1 \rightarrow 3) glucan-type lentinan and its analogues. *Immunology* **39**: 551.
- Herbert, D., Phipps, P. J. and Strange, R. E. 1971. *Method in Microbiology*. **5B**: 265pp.
- Hyun, J. W., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1990. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVII), Antitumor components of the basidiocarp of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **18**: 58.
- Ito, M., Hidehiko, S. and Saburo, Y. 1983. Superoxide anion and hydrogen peroxide release by macrophage from treated with *Nocardia rubra* cell wall skeleton. *Gann* **74**: 128.
- Jerne, N. K., Nordin, A. A. and Henry, C. 1963. *Cell-Bound Antibodies*. Wistar Institute Press, Philadelphia, 109 pp.
- Kang, C. Y., Shim, M. J., Choi, E. C., Lee, Y. N. and Kim, B. K. 1981. Studies on antineoplastic components of Korea basidiomycetes, mycelial culture and antineoplastic component of *Ganoderma luci-*

- dum. Kor. Biochem. J.* **14**: 101.
- Kikuo, N., Chikao, Y. and Kenji, T. 1975. Restoration of antibody formation capacities by PS-K in tumor bearing mice. *Gann* **66**: 365.
- Kim, B. K., Chung, H. S., Chung, K. S. and Yang, M. S. 1980. Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* **8**: 107.
- Klaus, C. G. B. 1987. *Lymphocytes*. IRL Press, Oxford, 119 pp.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakai, S. 1969. Host mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* **60**: 137.
- Lee, C. O., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1987. Immunological studies on the antitumor components of *Lycophyllum decastes* (I), *Yakhak Hoeji* **31**: 70.
- Maeda, Y. Y. and Chihara, G. 1970. Lentinan, a new immunoaccelerator of cell-mediated response. *Nature* **229**: 1971.
- Min, H. K., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1980. Studies on the constituents of the higher fungi of Korea, Components of *Russula pseudodelica* and *Microporus affinis*. *Kor. J. Mycol.* **8**: 13.
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. 1982. Structural examination of an alkali-extracted, water-soluble heteroglycan of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr. Res.* **109**: 290.
- Niels, K. J. and Albert, A. 1963. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science* **140**: 405.
- Park, D. W., Shim, M. J. and Kim, B. K. 1979. Studies on the constituents of the higher fungi of Korea (XVII), Production of antineoplastic components by the submerged culture of *Lentinus edodes*. *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **4**: 19.
- Park, S. H., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1989. Studies on protoplast and nuclear fusion of *Ganoderma* species. *Proc. Intern. Symp. on New Drug Development from Natural Products*. May 2-3.
- Peberdy, J. F. 1989. Fungi without coats-protoplasts as tool for mycological research. *Mycol. Res.* **93**: 1.
- Richard, B. J., Bernard, B. K. and Hara, P. M. 1975. The role of superoxide anion generation in phagocytic bacterial activity. *J. Clin. Investig.* **55**: 1357.
- Roland, J. F., Chmielewicz, Z. F., Weiner, B. A. and Gross, A. M. 1960. Calvacin: a new antitumor agent. *Science* **132**: 1897.
- Sabato, G. D. and Everse, J. 1988. Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Meth. Enzymol.* **132**, 407.
- Scopes, R. K. 1987. *Protein Purification*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, 306 pp.
- Shim, M. J., Park, E. K. and Kim, B. K. 1979. Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145.
- Shin, H. W., Kim, H. W., Choi, E. C., Toh, S. H. and Kim, B. K. 1985. Studies on inorganic composition and immunopotentiating activity of *Ganoderma lucidum* in Korea (XLIII). *Kor. J. Pharmacogn.* **16**, 181.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**, 557.

Accepted for publication on December 23, 1992