

뽕나무버섯으로부터 Fibrinolytic enzyme의 정제 및 특성 연구

김준호* · 김양선¹

*상지대학교 이공과대학 화학과, ¹세명대학교 교양학부

Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme from *Armillariella mellea*

Jun-Ho Kim* and Yang-Sun Kim¹

*Department of Chemistry, Sang Ji University, Wonju 220-702

¹College of General Education, Semyoung University, Chechon 390-230, Korea

ABSTRACT: A fibrinolytic enzyme has been isolated from the edible honey mushroom, *Armillariella mellea* and purified. The apparent molecular mass of purified enzyme was estimated to be 19800Da by SDS polyacryl amide gel electrophoresis and 19900Da by gel filtration, indicating that it was a monomer. The enzyme was optimal at pH 7, suggesting that the purified enzyme was a neutral proteinase. It shows the maximum fibrinolytic activity at 55°C, is completely inactivated above 65°C, and still indicates 40% of activity at 37°C. The fibrinolytic activity has been decreased by the addition of EDTA. Fifteen amino acid sequence was determined by protein sequencing techniques.

KEYWORDS: *Armillariella mellea*, Fibrinolytic enzyme, Fibrin plate assay, Fibrinolytic activity.

혈전은 혈액의 흐름을 방해함으로써 여러 가지 혈관계 질환을 유발하는데 이 혈전은 한번 생성되면 쉽게 용해되지 않는다. 지금까지 사용되고 있는 혈전 용해제인 Urokinase, Streptokinase, tPA (tissue type plasminogen activator)는 혈전을 용해시키는 plasmin을 plasminogen으로부터 만드는데 관여하는 plasminogen activator로서 혈전 자체에 대한 선택성은 적은 것으로 알려져 왔다(김, 1986). 따라서 혈전에 대한 선택성이 높으며, 좀 더 효율적인 새로운 혈전용해제의 개발이 필요하여 이 분야에 활발한 연구가 진행되고 있다. 최근에는 뽕독과(Chung와 Kim, 1992)과 지렁이(Mihara: 1991, 1993)로부터 혈전용해효소의 분리가 보고되었으며 또한 전통식품인 청국장에도 혈전용해효소가 포함되어 있음이 발표되었다(Kim, 1995).

버섯은 여러 종류의 생리활성 물질을 함유하고 있어 일찍부터 관심을 끌었으며 최근에는 버섯으로부터 항암, 항균 물질의 연구가 활발히 진행되고

있다(Kim, 1983). 또한 버섯은 여러 종류의 효소를 갖고 있는 것으로 알려졌는데, 그 중에서 식용버섯인 *Flammulina velutipes* (Fr) Sing에 혈전 성분인 섬유소(fibrin)를 분해시키는 단백질 분해효소가 있는 것으로 Gavrilova(1975)의 발표에 의해 보고된 바 있다.

이에 따라 본 연구실에서는 버섯으로부터 혈전용해 효소를 찾고자하여, 치악산에 자생하는 65종의 야생버섯 추출물로부터 fibrinolytic activity을 검색하였다. 그 결과 9종의 버섯이 혈전용해 효과를 보여주었는데(Kim, 1998), 그 중에서 활성이 크며, 식용 버섯이고 인공재배가 가능한 뽕나무버섯, *Armillariella mellea*을 선택하여 fibrinolytic enzyme을 분리하고 정제한 후, 그 특성을 연구하여 발표하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 버섯시료는 1997년 9월

*Corresponding author

19일 강원도 치악산 구룡사 계곡에서 채집하여 분류하고 동정한 다음에 시료로 사용하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin(P 4895, 3 units), thrombin, bovine serum albumin, agarose, glycine, ammonium sulfate, Sephadex G-150은 Sigma 제품을 DEAE-cellulose는 Whatman 제품을, LMW Electrophoresis calibration Kit는 Pharmacia 제품을 사용하였다.

Fibrinolytic enzyme의 정제

모든 정제 과정은 4°C에서 수행되었으며, 각 정제 과정마다 fibrinolytic activity와 단백질 농도가 측정되었다. 채집한 버섯을 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 넣고 잘게 부순 다음 원심 분리하여 얻은 상등액에 Ammonium Sulfate 결정을 가하여 포화농도의 30~80%로 처리하고, 10000×g에서 30분간 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물을 모아 소량의 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 녹여 24시간동안 투석시켰다. 이 효소 용액을 DEAE-cellulose column(20×200 mm)에 흡착시킨 다음 NaCl을 사용하여 0~1.0M의 농도 기울기로 용출시켰으며 활성 부분을 모아 냉동건조 후 1M NaCl을 포함하는 20 mM Sodium Phosphate buffer(pH 7.0)에 24시간 투석시키고 Sephadex G-150 column(25×700 mm)에 흘려주었다. 활성부분은 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 24시간 투석시키고 동일한 완충용액으로 미리 평형시킨 fast protein liquid chromatography (FPLC)의 Mono Q column(5.0×100 mm)에 주입하였다. 완충 용액 5 ml로 씻어준 후 0~0.55M NaCl 농도 기울기로 효소를 용출시켰다. 각 분획의 부피는 1 ml이고 유속은 1 ml/min이었다. 이 과정에서 얻은 fibrinolytic enzyme를 전기영동하여 단일 물질임을 확인한 후 효소원으로 사용하였다.

단백질의 농도 측정

단백질의 농도는 Lowry법(Lowry, 1951)을 이용하여 측정하였고 bovine serum albumin을 사용하여 표준곡선을 그렸다.

Fibrin 분해활성의 측정(Fibrin plate assay)

Haverkate-Trass의 fibrin plate법(1974)에 따라 2% gelatin용액에 0.7%(W/V) fibrinogen용액 10 ml와 0.05M barbital 완충용액(pH 7.5)에 녹인 thrombin(100 NIH units)을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin막을 만들었다. 효소 용액을 20 µl씩 fibrin plate 위에 점적한 후 37°C에서 8시간동안 두었다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 상대적인 활성도를 측정하였다. 표준 대조구로는 plasmin을 사용하였다. Plasmin(sigma P4895, 3 units)을 연속적으로 희석하여 얻은 표준곡선에 따라 활성도를 계산하였다.

분자량 결정

분리한 단백질의 분자량은 전기영동과 gel filtration으로 측정되었다. 전기영동은 4.5%의 stacking gel과 12%의 separating gel로 이루어진 SDS-PAGE를 사용하였다. Gel은 coomassie blue R-250으로 염색하였으며, 표준 단백질로는 phosphor-ylase b(94 kDa), bovine serum albumin(BSA)(67 kDa), ovalbumin(43 kDa), carbonic anhydrase(30 kDa), soybean trypsin inhibitor(20.1 kDa), α-Lactalbumin(14.4 kDa)을 사용하였다. Gel-filtration에 의한 분자량 측정은 Sephadex G-150을 사용하였고 size marker로는 bovine serum albumin(66 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), cytochrom C(12.4 kDa), aprotinin(6.5 kDa)을 사용하였다.

Native PAGE(Zymography)

SDS가 첨가되지 않은 4.0%의 stacking gel과 10%의 separating gel로 이루어진 PAGE를 이용하고 정제된 효소를 열처리하지 않은 상태에서 시료로 사용하였다. 전기영동 후 PAGE를 fibrin plate위에 놓고 적당한 습기가 유지되도록 구성된 37°C의 incubator에 넣어 fibrin plate가 용해되는 것을 관찰하였다.

최적 pH와 최적 온도

효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 완충용액으로 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0~7.0), 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.0~pH 9.5), 0.1M

carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.5~10.0)를 사용하였고 기질로는 N-Succinyl Ala-Ala-Pro-Phe pNA를 사용하여 실온에서 fibrinolytic enzyme과 반응하는 가수분해 활성을 조사하였다. 3 mM의 기질 50 μ l에 해당하는 buffer 925 μ l에 효소 25 μ l을 넣고 섞은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 온도 변화에 따른 활성도 변화는 35°C에서 60°C까지 incubator의 온도를 변화시키며 incubator에 효소를 점적한 plate을 넣고 3시간 후 plate의 용해면적을 측정하여 효소의 활성을 비교하였다.

효소활성에 미치는 금속이온의 영향

정제한 효소의 활성에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 CaCl_2 , CoCl_2 , ZnCl_2 , CuSO_4 , MgSO_4 , FeCl_2 , HgCl_2 , EDTA를 각각 2 mM이 되도록, 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 첨가한 뒤, 같은 부피의 fibrinolytic enzyme 용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적하고 37°C incubator에서 8시간 동안 넣은 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

N-terminal amino acid의 분석

분리된 효소의 amino acid sequencing은 정제된 시료를 기초과학연구원 연구소에 의뢰하여 Applied biosystem사의 precise protein sequencing system을 사용하여 수행되었다.

결과 및 고찰

Fibrinolytic enzyme의 정제

뿔나무버섯내의 fibrin 분해효소는 Table 1에서와 같이 4단계를 거쳐 분리 정제하였으며, Fig. 1A

의 native-PAGE에서 보여지는 바와 같이 한가지 분해효소가 존재함을 확인할 수 있었다.

1단계에서 버섯추출물에 30~80%의 ammonium sulfate를 첨가한 결과 전체 효소의 40.744%가 회수되었으며 정제배수는 2.41이었다. 2단계에서는 1단계에서 얻어진 활성의 효소 용액을 DEAE-cellulose에 주입하여 활성을 갖지 않는 대부분의 효소는 아래로 흘러주었으며 붙어있는 작은 양의 활성을 갖는 효소를 0~1.0M의 NaCl 농도 기울기로 용출시켜 분리하였다. 이 때, 원액의 전체 효소활성 중 17.02%가 회수되었고, 비활성은 1.83 U/mg protein이고 정제 배수는 10.75이었다. 3단계에서

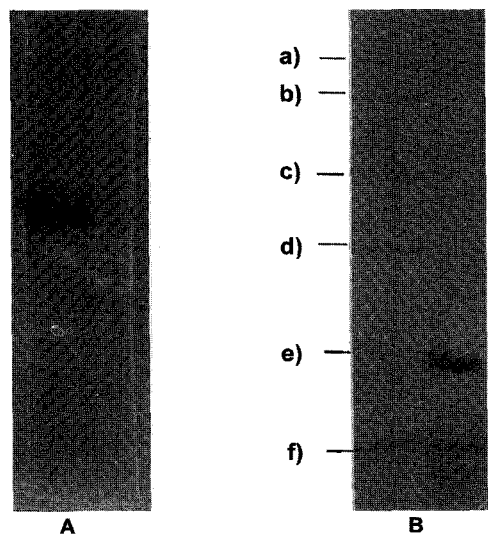


Fig. 1. A) Native-PAGE and B) SDS-PAGE of purified enzyme. The standard markers for the determination of molecular weight; a) phosphoryrase b (94 Kd), b) BSA(69 Kd), c) ovalbumin (43 Kd), d) carbonic anhydrase (30 Kd), e) soybean trypsin inhibitor (20 Kd), α -lactalbumin (14.4 Kd).

Table 1. Purification of fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Crude extract	420.12	71.2	0.17	100	1
Ammonium sulfate (30~80%)	70.77	29.01	0.410	40.744	2.412
DEAE-cellulose	6.63	12.12	1.828	17.023	10.753
Sephadex G-150	0.154	1.09	7.079	1.531	41.640
Mono Q(FPLC)	0.040	0.52	17.020	0.955	100.118

활성이 있는 부분을 Sephadex G-150에 주입하여 분리한 결과 비활성은 7.08 U/mg protein으로써 원액보다 41.64배 정제되고 회수비율은 1.53%인 효소를 분리할 수 있었다. 최종단계로 Mono Q column을 사용하여 FPLC로 분리하였는데 그 결과가 Fig. 2에 보여진다. 이 때 활성을 갖는 fibrinolytic enzyme의 비활성은 17.02 U/mg이었으며 100.12배 정제되었고 회수율은 0.96%이었다. 최종단계 후 얻어진 fibrinolytic enzyme은 전기영동을 하여 단일 띠가 나타남으로써 그 순도를 확인하였는데 그 결과가 Fig. 1B에 보여진다. 따라서 뽕나무 버섯에는 총 단백질의 약 0.96% 이상에 해당하는 fibrinolytic enzyme이 존재함을 알 수 있었다.

분자량 측정

정제된 효소의 순도와 분자량은 SDS-PAGE 결과를 통하여 Fig. 1B에서 보여지며, 최종물질인 단

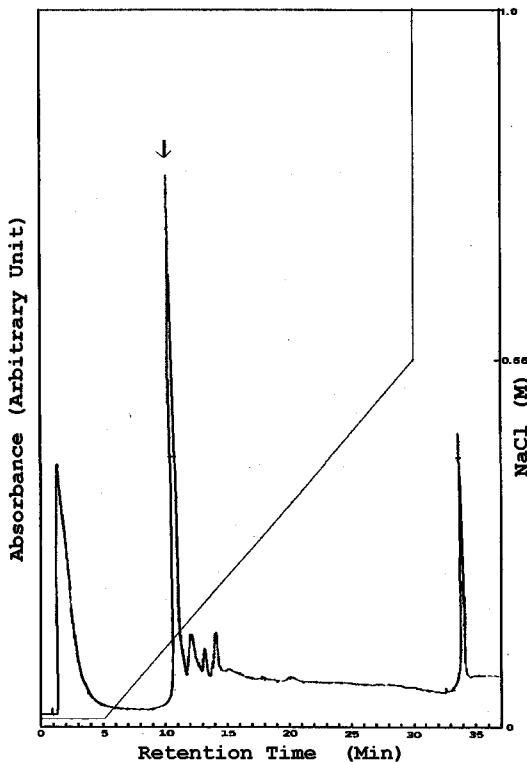


Fig. 2. FPLC chromatogram of purified fibrinolytic enzyme by Mono-Q ion exchange column.

일 띠의 분자량은 19,800Da이었다. 또한 Fig. 3의 gel-filtration을 이용하여 분자량을 측정한 결과는 19,900Da이었다. 이와 같은 결과로부터 이 효소는 단량체로 이루어진 것을 예측할 수 있다. 뽕나무버섯에서 인슐린의 B chain의 Pro-Lys을 분리하는 효소가 추출되었는데(Lewis, 1978) 이 효소의 분자량은 13500Da으로 본 연구에서 정제한 혈전용해 효소와는 큰 차이가 나타났다. 또한 뱀독(Chung과 Kim, 1992), 지렁이(Mihara: 1991, 1993), 청국장(Kim, 1995)과 *Flammulina velutipes*(Shin, 1998)에서 정제한 혈전용해효소의 분자량은 각각 51000Da, 35000Da, 28000Da, 33000Da으로 뽕나무버섯에서 정제한 효소는 이들에 비하여 분자량이 작은 것을 알 수 있다.

또한 SDS가 첨가되지 않은 4.0%의 stacking gel과 10%의 separating gel로 이루어진 PAGE를 사용하여 정제된 효소를 Native-PAGE한 결과도 Fig. 1A에서 보여지는 바와 같은 하나의 band가 나타났다. 즉, 정제된 효소의 native-PAGE로부터 실험에서 정제된 효소가 fibrin을 분해하는 효소임을 재확인할 수 있었다.

최적 pH

기질로 N-Succyl Ala-Ala-Pro-Phe pNA을 이용하여 pH의 변화에 따른 활성 변화를 측정한 결과 Fig. 4와 같이 pH 7.0에서 최적의 활성을 보여주었

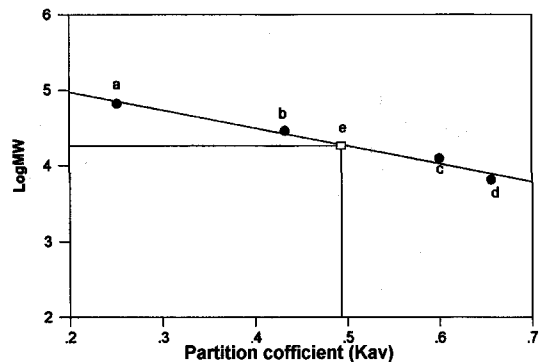


Fig. 3. Molecular weight determination of fibrinolytic enzyme by Sephadex G-150 column chromatography. Markers for molecular weight are; a) bovine serum albumin (66 Kd), b) carbonic anhydrase (29 Kd), c) cytochrom C (12.4 Kd), d) aprotinin (6.5 Kd).

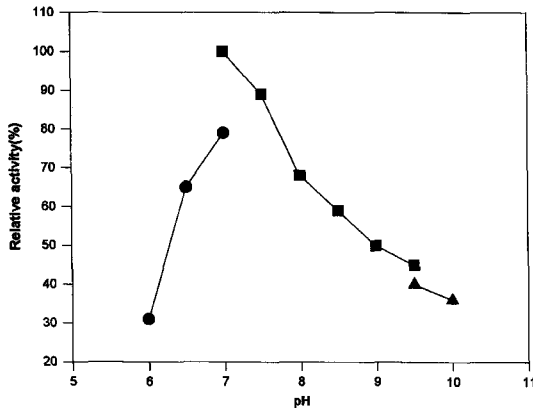


Fig. 4. Effect of pH on the fibrinolytic activity of purified enzyme. 0.1M sodium phosphate buffer (pH 6.0~pH 7.0), 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.0~pH 9.5), and 0.1M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5~pH 10.0) were used with Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA substrate. The maximum activity was expressed as 100%.

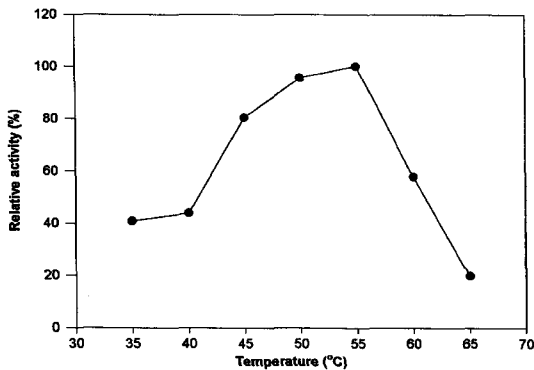


Fig. 5. Effect of temperature on the fibrinolytic activity of purified enzyme. The purified enzymes was incubated at temperatures from 30°C to 65°C for 3hrs. Maximum activity was expressed as 100%.

으며, pH 7 이상에서도 비교적 높은 활성을 유지하지만 pH 6 이하에서는 매우 작은 활성을 나타냈다. 따라서 이 효소는 중성과 염기성에서 활성이 큰 효소임을 알 수 있었다.

최적 온도

Fibrin plate 방법을 이용하여 온도변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 55°C에서 최대활성을 보였으며 60°C 이

상의 온도에서는 활성이 현저히 감소하였고 65°C에서는 거의 나타나지 않았다. 37°C에서는 최적조건에서의 약 40%에 해당하는 활성을 보여주었다. 따라서 다소 감소하기는 하지만 체내에서도 효소가 활성을 나타낼 수 있을 것이다.

정제한 효소는 4°C에서 5일 동안 안정하였으나, Amicon을 이용한 농축 시에는 활성이 많이 감소하여 동결건조의 방법을 이용하여 농축시켰다.

효소활성에 미치는 금속이온의 영향

효소의 활성에 미치는 금속(II) 이온들의 영향을 실험한 결과를 Table 2에 나타내었다. 금속 이온을 첨가하지 않았을 때의 활성을 100으로 하여, 그 상대적인 활성도를 측정하였을 때 Co^{2+} 는 약 18% 증가하였으며, Mg^{2+} 과 Zn^{2+} 는 약 10%, Ca^{2+} 과 Fe^{2+} 은 약 4%대의 증가율을 보여주었다. 반면 Cu^{2+} 이온을 첨가하였을 때는 활성이 8% 정도 감소하는 것을 보여주었고, Hg^{2+} 를 첨가한 경우에는 활성이 완전히 사라짐을 볼 수 있었다. EDTA를 첨가한 경우 효소의 활성이 상당히 저하되는 것으로 보아 이 효소는 metalloprotease로 추정된다.

N-terminal amino acid 서열 분석

15번째까지의 N-terminal amino acid sequencing의 분석결과는 X-X-T-N-G-X-T-X-S-R-Q-T-T-L-V이었다. 이것은 지금까지 발표된 다른 버섯종의 amino acid sequencing의 결과와 일치하지 않았다(Choi, 1998). 또한 뱀독(Chung과 Kim, 1992),

Table 2. Effect of various divalent ions on fibrinolytic activity

Reagents	Concentration	Residual
None		100
Ca^{2+}	1 mM	104.3
Co^{2+}	1 mM	118.8
Zn^{2+}	1 mM	110.6
Cu^{2+}	1 mM	92.3
Mg^{2+}	1 mM	110.3
Fe^{2+}	1 mM	104.7
Hg^{2+}	1 mM	0
EDTA	1 mM	10.6

지령이(Mihara, 1991, 1993), 청국장(Kim, 1995)에서 얻어진 혈전용해효소와도 공통점을 찾을 수 없었으며, computer aided homology test (GENEBANK, Swissport)의 결과에서도 같은 구조를 갖는 효소를 발견 할 수 없었는데, 좀 더 정확한 결과를 얻기 위해서는 첫 번째 아미노산이 정확하게 결정되어야 할 것 같다.

위의 결과로부터 이 효소는 지금까지 알려진 것과는 다른 새로운 효소라고 예측된다. 따라서 식용버섯인 팽나무버섯으로부터 분리 정제 후 특성을 연구한 결과 이 효소는 새로운 혈전용해제의 개발에 응용이 될 수 있으리라 여겨진다.

적 요

팽나무버섯 추출물에서 fibrinolytic enzyme을 분리 정제하였다. 이 효소의 분자량은 약 19800Da 이고 pH 7.0에서 최고의 활성을 보여주는 neutral protease로 55°C에서 최대 활성을 나타냈다. EDTA에 의해 활성이 저해되는 것으로 보아 metalloprotease로 추정되며 Hg²⁺의 영향을 받아 활성이 상실되었다. N-terminal amino acid 분석 결과 15번째까지의 아미노산 잔기 순서는 X-X-T-N-G-X-T-X-S-R-Q-T-T-L-V 이었으며 지금까지 알려진 것과는 다른 새로운 효소이다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 많은 도움을 주신 농업 진흥청의 김양섭 박사님과 석순자 연구원, FPLC와 amino acid sequencing을 수행하신 기초과학지원센터의 채권석 연구원, 조미숙양께 진심으로 감사를 드립니다.

참고문헌

- 김유삼. 1986. 플라즈미노젠 활성화제의 Gene Cloning. 한국생화학회 (유전자재조합 실용화 기술집): 269-298
- Gavrilova, V. P. and Falina, N. N. 1975. (Russ) Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes* (Fr) Sing. *Mikol. Fito-patol.* 9: 431-433.
- Chung, K. H. and Kim, D. S. 1992. Fibrinolytic and Cogulation Activities of Korean Snake Venoms. *Korean Biochem. J.* 25: 696-701.
- Haverkate, F. and Traas, D. W. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemostas.* 32: 356.
- Kim, B. K., Kim, J. S., Choi, E. C., Kim, H. R., Lee, K. L., Lee, C. O., Chung, K. S. and Shim, M. J. 1983. Studies on constituents of the Higher Fungi of Korea (XXXVII) *Korean Journal of Mycology* 11: 151-157.
- Kim, J. H., Lee, H. Y., Yoo, K. H., Kim, Y. S., Seok, S. J. and Kim, Y. S. 1998. The Screening of Fibrinolytic Activities of Extracts from Mushroom in Mt. Chiak. (submitted to *Korean Journal of Mycology*).
- Kim, Y. T., Kim, W. K. and Oh, H. S. 1995. Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from ChungKookJ-jang. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1-5.
- Lewis, W. G., Basford, J. M. and Walton, P. L. 1978. Specificity and inhibition Studies of *Armillaria mellea* protease. *Bichim. Biophys. Acta*, 522: 551-560.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, A. J. 1951. Protein Measurement with the folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Mihara, H., Nakajima, N. and Sumi, H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem* 57: 10, 1730.
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. and Maruyama, M. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japanese journal of Physiology.* 41: 461.
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1998. Purification and Partial Characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *Journal of Microbiology.* 36: 20-25.
- 김유삼. 1986. 플라즈미노젠 활성화제의 Gene Cloning. 한국생화학회 (유전자재조합 실용화 기술집): 269-298