

버들송이로부터 분리한 Nucleoside계 화합물의 지질과산화 저해활성

이인경 · 윤봉식 · 유익동*
생명공학연구소 세포기능제어 연구실

A Nucleoside with Lipid Peroxidation Inhibitory Activity from *Agrocybe cylindracea*. Lee, In-Kyoung, Bong-Sik Yun, and Ick-Dong Yoo*. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea - In the screening for lipid peroxidation inhibitors from edible mushroom, *Agrocybe cylindracea*, a bioactive compound AG 8 was isolated. The AG 8 was purified from methanol extract of its fruit body by Diaion HP-20 column chromatography, ethyl acetate extraction, and silica gel column chromatography, consecutively. Based on various NMR studies including ¹H irradiation and HMBC experiments, the AG 8 was identified as MTA, 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. This compound inhibited lipid peroxidation with an IC₅₀ value of 3.2 µg/ml. The MTA was isolated for the first time from basidiomycetes.

Key words: *Agrocybe cylindracea*, 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine, mushroom, NMR, lipid peroxidation inhibitor

버들송이(*Agrocybe cylindracea*)는 주름버섯목(Agaricales) 소풍버섯과(Bolbitiaceae)에 속하는 담자균류로서 맛과 향이 뛰어난 식용 버섯이다. 버들송이는 봄에서 가을까지 활엽수의 마른 줄기나 썩은 부분에서 자라며 갓은 둥근 모양으로 직경이 2~5 cm 정도이고 황갈색의 표면에 섬유 상의 백색 줄무늬를 지니고 주름이 있으며 포자는 암갈색의 전형적인 버섯의 형태를 갖추고 있다[8]. 이 버섯은 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 광범위하게 분포하며 최근 병재배를 통한 인공재배 방법이 개발되어 대량으로 양산되고 있다[5, 10]. 버들송이에 대한 연구는 탄수화물, 단백질, 지방, 아미노산 조성 등의 성분분석[2, 13]과 면역증강활성, hypoglycemic 활성을 갖는 다당체[4, 14], 또는 단백다당체[1] 등이 분리 보고되었다.

한편 *Agrocybe cylindracea*로부터 저분자 생리활성물질의 탐색연구는 필자들에 의해 수행되었는데 prolyl endopeptidase 저해물질인 alkaloid 구조를 갖는 agrocybenin[7]과, 지질과산화 저해활성을 갖는 indole 계열의 화합물[6]이 분리 보고되었다. 필자들은 버들송이 자실체를 이용하여 계속적으로 생리활성물질 탐색을 수행하던 중 지질과산화 저해활성을 나타내는 화합물 AG 8을 분리하였고 다양한 NMR 기기분석에 의하여 화학구조와 생물활성을 규명하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

*Corresponding author
Tel. 82-42-860-4330, Fax. 82-42-860-4595
E-mail: idyoo@kribb4680.kribb.re.kr

버들송이(*Agrocybe cylindracea*)는 대전 농촌지도소 및 대전 근교의 버섯 재배사로부터 성숙된 자실체를 수확 직후 분양받아 즉시 실험실로 운반하여 세절한 다음 methanol로 추출하고 그 추출분획을 분리 정제용 시료로 사용하였다.

추출 및 분리

버들송이로부터 화합물 AG 8의 분리 정제 과정을 Fig. 1에 나타내었다. 버들송이 9 kg을 세절한 후 methanol을 가하여 실온에서 3회 추출한 다음 용매를 감압하에서 제거하였다. 용매를 제거시킨 잔여물을 Diaion HP-20 resin에 흡착시킨 후 50% methanol로 활성물질을 용출하여 감압하에서 농축하였다. 활성분획에 ethyl acetate를 가하여 용매 추출하고 용매 층은 다시 농축 후 silica gel column(70~230 mesh, Merck, 4×20 cm) chromatography(chloroform:methanol=50:1~2:1)를 행하였다. 활성 분획은 다시 chloroform:methanol(10:1)을 전개용매로 하여 2차 silica gel column(230~400 mesh, Merck, 2×13 cm) chromatography를 실시하여 화합물 AG 8을 30 mg 분리하였다.

지질과산화 저해활성 측정

지질과산화 저해활성은 Ohkawa 등의 방법[9]으로 측정하였다. Rat 간 microsome을 지질원으로 하여 Fe²⁺에 의한 지질과산화 결과 생성된 malondialdehyde(MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 530 nm에서 분광학적으로 정량하였으며, 지질과산화 억제활성은 시료에 의하여 감소된 MDA의 양을 정량하여 환산하였다.

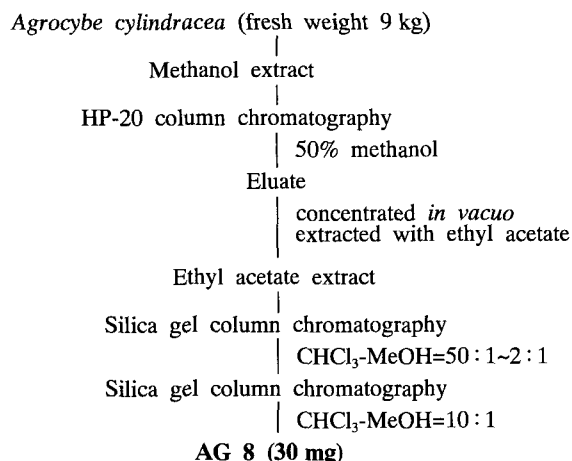


Fig. 1. Purification procedure of AG 8 from the fruit body of *Agrocybe cylindracea*.

기기 분석

UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 UVICON사의 KONTRON UV spectrophotometer로 측정하였으며, FAB-MS는 thio-glycerol을 matrix로 하여 CONCEPT-1S Mass spectrometer(Kratos Co. England)를 사용하여 측정하였다. NMR 측정은 Varian Unity 300 NMR spectrometer를 사용하였으며 내부표준물질은 tetramethylsilane을, 용매로는 CD₃OD를 사용하였다

결과 및 고찰

AG 8의 화학구조 분석

버들송이로부터 분리한 화합물 AG 8의 UV spectrum을 조사한 결과 260 nm에서 최대흡수피크를 나타내었으며 FAB-MS 측정 결과 m/z 298에서 (M+H)⁺가 관찰되어 본 화합물의 분자량이 297인 것으로 추정되었다(Fig. 2). ¹H NMR 측정 결과 8.10 및 8.22 ppm에서 방향족성 methine proton signal이 관찰되었고 5.90, 4.68, 4.24, 4.13 ppm에서 산소와 결합한 methine proton들이 관찰되었다. 또한, 2.80, 2.90 ppm에 methylene proton 및 2.03 ppm에 methyl proton signal이 관찰되었다. ¹³C NMR 측정 결과 153.7 및 141.2 ppm에서 특이적으로 저자장 이동한 methine 탄소가, 그리고 157.3, 150.7, 120.5 ppm에서 *sp*² 4급탄소가 각각 관찰되었다. 또한 90.0, 85.5, 74.8, 74.0 ppm에서 수소와 결합한 methine proton signal이 관찰되었으며 37.4 ppm에 methylene proton 및 16.5 ppm에 methyl proton signal이 관찰되었다(Table 1). 수소-수소간의 연결성을 조사하기 위하여 4.13 ppm의 proton에 irradiation한 결과 2.80, 2.90 ppm 및 4.24 ppm의 proton이 decoupling되었으며 또한 4.24 ppm에 irradiation한 결과 4.68 및 4.13 ppm에서

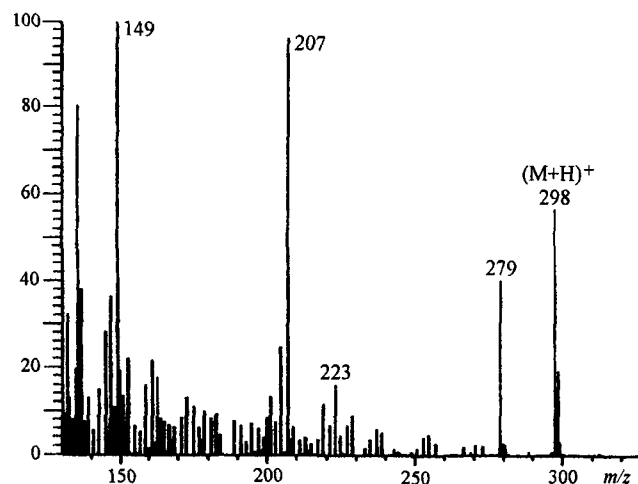


Fig. 2. FAB-Mass spectrum of compound AG 8.

Table 1. ¹H and ¹³C NMR spectral data for AG 8 (measured on 300 MHz in CD₃OD)

No	δ^{C}	δ^{H}
2	153.7	8.10(s)
4	157.3	
4a	120.5	
6	141.2	8.22(s)
7a	150.7	
1'	90.0	5.90(d, 5.1)
2'	74.8	4.68(t, 5.1)
3'	74.0	4.24(t, 5.1)
4'	85.5	4.13(ddd, 6.2, 5.4, 5.1)
5'	37.4	2.80(dd, 14.1, 6.2)
		2.90(dd, 14.1, 5.4)
S-CH3	16.5	2.03(s)

decoupling이 관찰되어 1'에서 5'위까지의 연결성이 밝혀졌다. 이상의 UV, Mass, ¹H 및 ¹³C NMR분석, irradiation 실험에 의하여 본 화합물은 nucleoside계의 화합물임이 추정되었으며 data base의 검색 결과 그 중에서도 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine(MTA)와 매우 유사한 화합물임을 알 수 있었다. 따라서 동일 화합물 여부를 규명하기 위하여 HMBC 실험을 실시하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 8.10 ppm의 proton으로부터 157.3 및 150.7 ppm의 4급탄소에 long range coupling이 관찰되었고 8.22 ppm의 proton으로부터 150.7 및 120.5 ppm에 long range coupling이 관찰되어 adenine moiety의 존재를 알 수 있었다. 또한 5.90 ppm의 methine proton으로부터 adenine의 6번 및 7a번 탄소에 long range coupling이 관찰되어 adenine의 7위에 1' 탄소가 결합하고 있음이 입증되었다. 또한 각각의 long range coupling으로부터 5원환의 존재가 밝혀졌으며 2.80 ppm의 methylene proton으로부터 3', 4'의 탄소 및 16.5

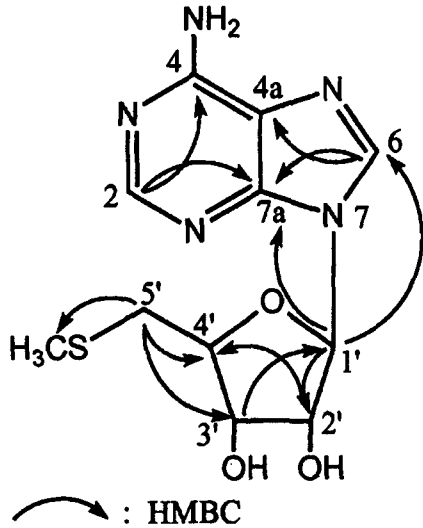


Fig. 3. HMBC data for compound AG 8.

ppm의 methyl 탄소에 long range coupling이 관찰되어 AG 8의 전체 화학구조가 밝혀졌다. 이상의 구조 해석으로부터 AG 8은 분자량이 297, 분자식이 C₁₁H₁₅N₅O₃S인 nucleoside계 화합물인 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine(MTA)과 동일 화합물임이 입증되었다.

지질과산화 저해활성

AG 8의 지질과산화 저해활성은 rat의 간 microsome을 지질원으로 사용한 TBA법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 AG 8의 지질과산화 저해활성은 IC₅₀ 값이 3.2 µg/ml이었다. 이는 양성 대조구로 사용한 vitamin E의 IC₅₀ 값 1.1 µg/ml 보다 3배정도 낮은 활성이었다(Fig. 4).

MTA는 효모에서 처음 분리된 nucleoside계열의 화합물로 methionine이 그 전구체이며 MTA phosphorylase

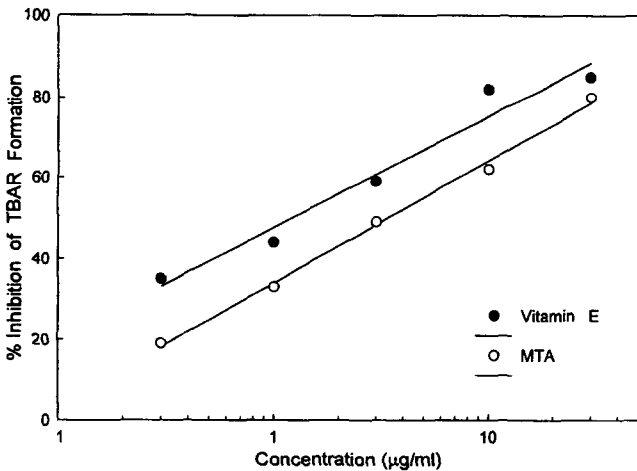


Fig. 4. The inhibitory effects of AG 8 against lipid peroxidation in rat liver microsome.

에 의해 체내에서 분해된다[12]. 특히, 고등동물에서는 purine과 methionine의 대사과정에 관여하는 효소의 조절 물질로서의 기능을 가질뿐 아니라, T세포 증식 자극 물질인 phytohemagglutinin(PHA), concanavalin A(Con-A)에 대한 가역적인 반응으로 human lymphocyte의 DNA 복제 및 단백질 합성을 저해한다[11]. MTA는 효모, 세균, 식물, 성숙된 과일, 동물 세포 등에서 각기 다른 생합성 경로에 의해 생성되어 존재하는 것이 알려져 있으나 담자균류에서는 MTA와 유사한 구조를 갖는 5'-deoxy-5'-methylsulphinyladeniosine과 5'-deoxy-5'-methyl-sulphonyl-adenosine이 *Ganoderma lucidum*에서 분리된 것[3] 이외에는 보고된 바 없다. 본 연구에 의하여 MTA가 담자균류에도 존재함이 밝혀졌다.

요 약

식용버섯인 버들송이(*Agrocybe cylindracea*)로부터 새로운 생리활성물질을 탐색하던 중 버들송이 자실체의 methanol 추출물로부터 Diaion HP-20 column chromatography, ethyl acetate extraction 및 silica gel column chromatography를 행하여 AG 8을 분리하였다. 분리된 AG 8의 구조해석을 위하여 Mass, ¹H 및 ¹³C NMR, irradiation 실험 및 HMBC를 실시한 결과 분자량이 297, 분자식이 C₁₁H₁₅N₅O₃S인 nucleoside계 화합물 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine(MTA)으로 동정하였다. AG 8의 지질과산화 저해활성은 IC₅₀ 값이 3.2 µg/ml이었으며 양성 대조구인 vitamin E 보다 3배 정도 낮은 활성을 보여주었다. 본 화합물은 고등동물의 대사과정에 관여하는 효소 대사 조절물질로 고등동물을 비롯한 각종 생물체에 존재하는 것이 보고 되었으나 담자균류로부터는 본 연구에 의하여 처음 분리되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 주관하는 농업특정 연구개발 연구사업비(농특세)로 수행되었으며 연구비(AG 490M)를 지원하여 주신 농림부에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ha, H. C., S. Park, C. W. Lee, I. C. Jung, S. H. Kim, Y. I. Kwon, and J. S. Lee. 1995. Isolation and purification of protein-bound polysaccharides from the sawdust of *Agrocybe cylindracea*. *Kor. J. Mycol.* **23**: 121-128.
- Hayakawa, T., H. Yoshimura, M. Kanetaka, and N. Sato. 1991. Chemical composition of yanagimatsutake (*Agrocybe cylindracea*) cultivated on sawdust medium. *Nippon No-geikagaku Kaishi* **65**: 747-754.

3. Kawagishi, H., F. Fukuhara, M. Sazuka, A. Kawashima, T. Mitsubori, and T. Tomita. 1993. 5'-deoxy-5'-methylsulphinyladenine, a platelet aggregation inhibitor from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **32**: 239–241.
4. Kiho, T., S. Sobue, and S. Ukai. 1994. Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of *Agrocybe cylindracea*. *Carbohydr. Res.* **251**: 81–87.
5. Kim, H. K., J. S. Park, Y. S. Kim, and Y. H. Park. 1989. Studies on the artificial cultivation of *Agrocybe aegerita* (Brig.) using sawdust substrate. *Kor. J. Mycol.* **17**: 124–131.
6. Kim, W. G., I. K. Lee, J. P. Kim, I. J. Ryoo, H. Koshino, and I. D. Yoo. 1997. New indole derivatives with free radical scavenging activity from *Agrocybe cylindracea*. *J. Natural Products* **60**: 721–723.
7. Koshino, H., I. K. Lee, J. P. Kim, W. K. Kim, J. Uzawa, and I. D. Yoo. 1996. Agrocybenin, novel class alkaloid from the Korean mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Tetrahedron Lett.* **37**: 4549–4550.
8. Lee, J. Y. 1988. *Coloured Korean Mushrooms* I, p. 137. Academic Press.
9. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351–358.
10. Park, S. and J. S. Lee. 1990. Optimization of sawdust media composition and culture conditions for the mycelial growth and primordia formation of *Agrocybe cylindracea*. *Kor. J. Mycol.* **18**: 198–202.
11. Vandembark, A. A., A. J. Ferro, and C. L. Barney. 1980. Inhibition of lymphocyte transformation by a naturally occurring metabolite 5'-methylthioadenosine. *Cell. Immunol.* **49**: 26.
12. Williams-Ashman, H. G., J. Seidenfeld, and P. Galletti. 1982. Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem. Pharmacol.* **31**: 277–288.
13. Yoshida, H., S. Fujimoto, and J. Hayashi. 1992. Carbohydrate and organic acid contents in the vegetative mycelia of *Agrocybe cylindracea*: Studies on the use for food of the vegetative mycelia of basidiomycotina; Part I. *J. of the Japanese soc. for food sci. and technol.* **39**: 601–607.
14. Yoshida, I., T. Kiho, S. Usui, M. Sakushima, and S. Ukai. 1996. Polysaccharides in fungi. XXXVII. Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (1 → 3)-alpha-D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. *Biol. Pharm. Bull.* **19**: 114–121.

(Received October 27, 1998)