

황기 지상부에서 분리되어진 장관면역 활성 다당체의 구조분석

강원대학교 : 홍순열, 백현, 유창연, 임정대*, 정선균농업기술센터 : 최대성, 최유순
건국대학교 : 정일민

Relevant Structural Feature of Gut Mucosal Immune Activation Polysaccharide Isolated from Aboveground Parts of *Astragalus membranaceus*

Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University :

Soon Yeoul Hong, Hyeon Baek, Jung Dae Lim*

Division of Applied Plant Science, Kangwon National University : Chang Yeon Yu

JEONGSEON Agricultural technology & Extension Center : Dae-Sung Cheoi, Yu-Soon Cheoi

Konkuk University : Ill-Min Chung

실험목적

- 황기 지상부로부터 6개의 다당성분을 분리하고 장관면역 활성을 Peyer's patch를 매개로 하는 기작을 이용하는 AMA-1-b-PS2 (시료농도 10 μg/mL, 대조군의 11배, 시료농도 50 μg/mL 이상의 경우, 대조군의 60 배)을 AMA-1-b-PS2는 Peyer's patch의 세포를 활성 성분이 자극한 후 이러한 활성화된 세포에서 생산된 cytokine 및 lymphokine류가 골수세포 증식에 영향을 끼치는 것으로 확인한 바 있음
- AMA-1-b-PS2는 arabinose와, galactose 간의 교호적인 결합으로 이루어진 주쇄에 다양한 종류의 중성당이 측쇄로 결합되어 있는 형태의 펙틴계통의 다당류일 것으로 추정되어 exo-β-D-(1→3)-galactannase <GNase> 및 exo-α-L-arabinofuranosidase <AFase>의 효소처리를 통해 분획을 획득하고 각 분획에 대하여 methylation하여 mass spectra 분석을 수행하였으며 uronic acid 부분의 결합구조를 확인하여 그 미세구조 분석을 실시함

재료 및 방법

- 황기 지상부 기원의 장관면역 활성 다당체(AMA-1-b-PS2)를 larch wood와 acacia의 arabino-3,6-galactan을 대상으로 하여 골수세포 증식능을 검정 비교
- AMA-1-b-PS2를 대상으로 exo-α-L-arabinofuranosidase <AFase>로 처리하여 가수분해를 수행한 이후 Bio-gel P-6(1.5×90cm)의 column을 사용하여 AH-AMA-1-b-PS2을 얻었으며 exo-β-D-(1→3)-galactannase <GNase>로 처리, 가수분해하여 AH-1과 중간정도의 분자량의 AH-2(oligosaccharide), 작은 분자량의 AH-3(oligosaccharide)을 얻을 수 있었음
- 큰 분자량을 지닌 AH-1를 대상으로 하여 다시 AFase를 처리하여 2AH-1을 얻었으며 GNase를 처리하고 Bio-gel P-6를 이용하여 2AH-1-A를 획득하였음
- 다당시료를 탈에스테르화하여 Hakomori방법(1964)의 변형법으로 메틸화를 수행하였으며 uronic acid 부분의 결합구조를 확인하기 위해 TFH에 용해된 1M lithium tetra hydrodeutride를 이용해 C₆위치를 d₂로 표지하여 Mass spectra 분석을 수행함
- 메틸화된 산물을 TFA로 가수분해하여 GLC와 GLC-EIMS를 이용하여 분석

.....
주저자 연락처(Corresponding author) : 임정대, E-mail : ijdae@kangwon.ac.kr, Tel : 82-33-570-6493

실험결과

1. 골수세포 증식능을 검정 비교한 결과 AMA-1-b-PS2는 (100µg/ml 처리 시, 대조군에 2.4 배) 높은 골수세포 증식효과를 지닌 반면 larch wood와 acacia의 arabino-3,6-galactan의 경우에는 활성을 나타내지 않아 AMA-1-b-PS2의 미세구조가 골수세포 증식에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 판단되었음
2. AMA-1-PS2에 AFase를 처리하여 얻은 AH는 arabinose가 약 61% 파괴되었으며 AH에 GNase를 처리하여 얻은 AH-1은 분해되는 galactose의 비율(3.6%)이 매우 작았으며 산물 AH-1에 대해 다시 GNase를 처리한 2AH-1가 galactose 함량이 약 31% 감소하여 단계적인 GNase 처리에 의해 AMA-1-b-PS2가 가수분해 되어질 수 있음을 확인하였고 2AH-1A의 methylation 분석에 의해 AH에 비해 3-linked가 약 66%, 3,6 branch galactose가 약 72% 파괴된 것을 확인할 수 있었음
3. 결과적으로 AMA-1-b-PS2는 3-linked galactose 구조와 3,6 branch galactose의 당쇄구조가 교호적으로 존재하며 galactose가 풍부한 oligosaccharide가 연결되어 있는 arabinogalactan complex polysaccharide 형태임을 확인하였으며 이상의 결과를 종합하여 AMA-1-b-PS2의 구조를 도식화(Fig1.)하였음

Table 1. Methylation analysis of the products derived from AMA-1-b-PS2 with AFase and GNase.

Glucosyl residue	Deduced linkage	AMA-1-a-PS2	AH-AMA-1-b-PS2	AH-1	2AH-1-A
Ara	terminal (<i>f</i>)	32.8	8.2	5.2	5.5
	terminal (<i>p</i>)	1.4	1.0	-	-
	4 or 5	5.2	20.0	2.6	2.4
	3,4 or 3,5	3.5	-	-	-
Fuc	3	0.6	0.7	-	1.3
	terminal	1.3	4.6	4.9	4.8
	3	6.2	5.8	5.9	2.1
Gal	4	5.9	12.6	12.9	13.8
	6(<i>f</i>)	1.9	2.1	3.6	3.6
	6(<i>p</i>)	0.9	9.4	11.3	9.4
	2,6	0.4	0.5	1.1	-
	3,6	20.6	4.5	4.8	5.7
	4,6	2.1	2.6	3.1	4.4
Glc	terminal (<i>f</i>)	8.6	9.6	15.6	15.3
	terminal	3.4	4.1	5.6	5.2
	3	0.2	1.7	3.4	3.8
	4	1.0	1.9	3.6	3.9
	6	-	3.3	6.3	7.1
Man	3,4,6	0.5	1.0	1.8	2.0
	terminal	0.3	0.5	2.1	2.4
	2	0.4	0.6	1.8	2.2
	4	-	1.6	-	-
Rha	terminal	1.0	0.9	0.9	1.1
	2	0.5	0.6	0.9	1.0
	3	0.2	0.3	-	0.6
Xyl	terminal (<i>p</i>)	0.6	0.7	1.0	0.8
	2	0.2	0.3	0.4	0.5
	4 or 5	0.3	0.9	1.2	1.1

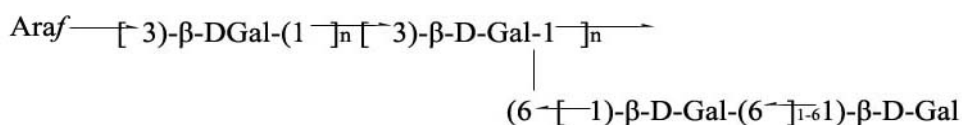


Fig. 1. A proposed structure of AMA-1-b-PS2