

노루궁뎅이 버섯의 Proteasome 저해 작용

이한나 · 김유진 · 심상희*

영남대학교 생명공학부

Proteasome Inhibition Activity of *Hericiium erinaceum*

Hanna Lee, YuJin Kim and Sang Hee Shim*

School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea.

Abstract – Recently proteasome inhibitors have been emerged as potential anticancer agents. In a continuous study on exploring proteasome inhibitors from natural products, fruiting body of *Hericiium erinaceum* was investigated. The MeOH extracts of the fruiting body of *Hericiium erinaceum* was fractionated with several solvents and the fractions were evaluated on the activity to screen the proteasome inhibitors. The n-Hexane and CHCl₃ frs. showed potent activity, of which chemical investigations led to ergosterol peroxide (1), hericenones C (2) and D (3). Their structures were determined by spectroscopic methods such as ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and FABMS spectra.

Key words – proteasome inhibitor, *Hericiium erinaceum*, ergosterol peroxide, hericenone C, hericenone D

노루궁뎅이 버섯 (*Hericiium erinaceum*)은 분류학상 민주름버섯목 (Aphyllorphorales), 턱수염버섯과 (Hydnaceae), 산호침버섯속 (*Hericiium*)에 속한다. 중국에서는 윈숭머리버섯 (Monkeyhead mushroom) 또는 곰머리버섯으로 알려져 있으며 일본에서는 Yamabu shitake로 불려지고 있다. *Hericiium erinaceum* 자실체는 목재 백색 부후성으로 가을 철에 떡갈나무, 너도밤나무 등 활엽수의 상치부위에 발생한다. 자실체의 크기는 5~30 cm 정도로 처음에는 계란형 또는 반구형이나 점차 성장하면서 자실체 윗면에는 짧은 털이 뽀뽀히 나고, 앞면에는 2~6 cm 길이의 수많은 수염털 (spines)이 향지성(向地性)으로 자란다. 자실체는 초기에 백색을, 후에 담황색을 띤다. 자실층은 침 표면에 발달되었고 조직은 백색이고 스펀지 모양이다.¹⁾

노루궁뎅이 버섯은 약간 쓴맛이 있으나 중국에서는 식용으로도 유명해 고가의 고급식용 및 약용버섯으로 미식가들에게 인기가 있는 버섯이다. 한국, 일본, 중국, 동남아시아, 유럽, 북아메리카 등에 분포되어 있으며, 톱밥을 이용한 인공재배와 균사체 심층 발효배양이 가능하다.¹⁾

노루궁뎅이 버섯의 약리 작용에 관하여는 많은 연구가 이루어져 왔다. Yang 등²⁾은 *H. erinaceum*의 약효가 신체의

면역체계를 강화시키고 위궤양, 십이지궤양, 만성장염 및 위암, 식도암의 치료에도 효과적이라고 보고하였고, Ahn³⁾은 항암 및 면역기능을 촉진시키며 임상치료에서 위궤양, 만성 위염, 신경쇠약, 소화불량, 신체허약, 만성 위염, 위암, 식도암에 효능이 있다고 보고하였다. Kawagishi 등^{4,5)}은 노루궁뎅이 버섯의 추출물로부터 nerve growth factor (NGF)로서 중추 신경 재생과 치매의 치료제로서 이용 가능한 물질을 분리하였다. 그리고 사재훈 등⁶⁾은 노루궁뎅이버섯 클로로포름 추출물의 자외선 차단효과, 75% 에탄올 추출물의 항산화 활성 등을 보고하였다.

노루궁뎅이 버섯의 성분에 관한 연구도 상당히 진행되어 왔다. 알려진 성분으로는 9,10-dihydroxy-8-oxo-12-octadecenic acid 와 chitin, heteroxyloglucan, galactoxyloglucan, glucoxy-lanprotein, glucoxy-lan, xylan 등의 다당체,⁷⁾ erinacines A, B, C, D,⁸⁾ hericenones A, B, C, D, E, F, G, H⁹⁻¹¹⁾ 등이 있으며, 이들 성분들에 의해 항암, HeLa 세포 증식 억제, 항염, 항균 등의 약리작용이 나타나는 것으로 알려져 왔다.

항암 치료에 있어 ubiquitin protease pathway (UPP)의 생물학적 역할이 최근 들어 중요하게 인식되었다. UPP는 진핵 세포에서 세포내 단백질을 분해하는 주요한 경로로 세포주기, 신호전달, 유전자 전이 및 세포 사멸 (apoptosis)에 중요한 역할을 하는 세포 단백질 조절에 중요한 역할을 한다.¹²⁾ Proteasome은 에너지 의존적 단백질 분해 기작의 중

*교신저자 (E-mail): shshim29@ynu.ac.kr
(Tel): 053-810-3028

심적인 효소군으로 20S core와 19S regulator로 구성되어 있으며, proteasome은 주로 내인성 단백질과 반응하기 때문에 proteasome의 단백질 분해 작용을 저해하면 NF- κ B의 signaling action이 차단됨으로써 암세포의 유사 분열이 저해되어 apoptosis에 의한 세포 사멸, angiogenesis 및 metagenesis의 저해가 일어나는 것으로 알려져 왔다.¹³⁾

실제로 정상 세포는 proteasome의 활성이 잠시 억제되더라도 세포분열 능력을 회복하는데 반해 여러 가지 암세포들은 proteasome의 활성이 잠시라도 억제되면 곧바로 사멸 과정으로 들어가는 것으로 전임상 실험 결과 밝혀졌다.¹⁴⁾ 이는 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미치는 기존의 다른 항암제와 달리 정상세포에 미치는 영향이 상대적으로 적음을 의미한다. 최초의 proteasome 저해제로 개발된 항암제는 bortezomib (VelcadeTM, Millenium)으로 2003년 미국 FDA에 허가를 받았다.¹⁵⁾ 이 분야는 항암제 연구 분야에서 최근 각광받고 있으며 계속 연구 진행 중이다.

본 연구실에서는 천연물로부터 proteasome 저해 작용이 있는 성분을 규명하는 연구를 진행해 왔으며 이 일환으로 노루궁뎅이 버섯의 메타놀 추출물을 극성에 따라 5개의 분획으로 나누고 각각의 분획물에 대해 proteasome 저해 효과를 측정하여 이를 보고하고자 한다. 또한 활성 분획에서 분리된 3종의 화합물의 구조에 대해서도 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 노루궁뎅이 버섯은 류충현 약용버섯에서 구입하여 사용하였다. 표본은 영남대학교 생명공학부의 천연물화학 연구실에 보관 중이다.

시약 및 기기 - NMR spectra는 Bruker ARX spectrometer (250 MHz)의 Bruker's standard pulse program을 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 나타내었다. 추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F254 (Merck) 및 RP-18 (Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 Merck의 70~230 Mesh의 silica gel을 사용하였다. Proteasome 저해 작용 측정을 위해 효소, 기질, buffer 등은 Biomol International LP의 20S Proteasome Assay Kit (AK-740)을 사용하였고 기질로 사용된 Suc-LLVY-AMC에서 유리된 AMC의 fluorescence를 측정하기 위한 fluorescence plate reader로 FLOUoptima가 사용되었다.

추출, 분획 및 분리 - 노루궁뎅이 버섯 330 g을 잘게 자른 후 메타놀로 추출하였다 (3 L×4 회). 메타놀 추출물을 농축한 후 극성에 따라 n-Hexane, Chloroform, Ethyl acetate,

n-BuOH 순으로 분획하였다. 이 중 n-Hexane 층 (10.2 g)에 대하여 n-Hexane 및 Ethyl acetate의 gradient 용매로 용리시켜 전부 26개의 분획을 얻었다. 이 중 22번 분획을 Ethyl acetate 및 MeOH 용매로 재결정하여 화합물 1을 분리하였다. 그리고 semipreparative HPLC를 이용하여 더욱 정제하였다. 또한 chloroform 층 (13.4 g)에 대하여 n-Hexane 및 Ethyl acetate의 gradient 용매로 용리시켜 전부 17개의 분획을 얻었다. 이 중 세번째 분획을 MeOH 용매로 재결정하여 화합물 2와 3 (102 mg)을 분리하였다.

화합물 1: white powder. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.78 (3H, d, J=6.7 Hz, H-28), 0.79 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, J=7.0 Hz, H-21), 0.86 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, d, J=6.9 Hz, Me-26), 0.97 (3H, d, J=6.6 Hz, H-27), 3.92 (1H, m, H-3), 5.15 (2H, m, H-22, 23), 6.22 (1H, d, J=8.5 Hz, H-7), 6.48 (1H, d, J=8.5 Hz, H-6); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 135.6 (C-6), 135.3 (C-22), 132.5 (C-23), 130.9 (C-7), 82.4 (C-8), 79.6 (C-5), 66.7 (C-3), 56.4 (C-17), 51.9 (C-14), 51.3 (C-4), 44.8 (C-13), 42.9 (C-24), 39.9 (C-20), 37.5 (C-12), 37.1 (C-1, 10), 34.9 (C-9), 33.3 (C-25), 30.3 (C-2), 28.9 (C-15), 23.6 (C-16), 21.1 (C-11), 20.8 (C-27), 20.2 (C-26), 19.9 (C-21), 18.4 (C-19), 17.8 (C-28), 13.1 (C-18).

화합물 2-3: white powder. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 12.36 (1H, s, OH), 10.08 (1H, s, CHO), 6.51 (1H, s, H-6), 6.07 (1H, s, H-6'), 5.30 (3H, s, H-2', H-1-CH₂), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.37 (2H, d, J=7.2 Hz, H-1'), 2.99 (1H, s, H-4'), 2.34 (2H, dd, J=7.7, 7.3 Hz, H-2), 2.12 (3H, s, H-7-CH₃), 1.84 (3H, s, H-8'), 1.78 (3H, s, H-3'-CH₃), 0.88 (3H, t, J=7.0 Hz, terminal CH₃); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 199.7 (C-5'), 193.3 (CHO), 173.4 (C-1), 163.7 (C-5), 163.2 (C-3), 155.6 (C-7'), 138.9 (C-1), 130.5 (C-3'), 126.4 (C-2'), 123.0 (C-6'), 117.5 (C-4), 113.1 (C-2), 105.7 (C-6), 63.1 (C-1-CH₂), 56.1 (OCH₃), 55.7 (C-4'), 34.4 (C-2''), 27.9 (C-8'), 21.8 (C-1'), 20.9 (C-7-CH₃), 16.6 (C-3'-CH₃), 14.3 (C-16" or 18"), 32.1, 29.7, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 25.1, 22.9 (C-3 to C-15 or C-17).

Proteasome 저해 작용 측정 - Biomol[®] International LP의 20S Proteasome Assay Kit (AK-740)의 사용설명서에 준하여 실험하였고 모든 구성 성분들은 사용 직전 assay buffer나 DMSO에 희석하여 사용되었다. Proteasome은 인간 적혈구에서 분리, 정제된 것이고 기질은 Suc-LLVY-AMC이며 사용된 assay buffer를 activation 시키기 위하여 SDS (sodium dodecyl sulfate)가 사용되었다. Positive control로는 20S Proteasome의 chymotrypsinlike activity의 비가역적 저해제인 epoximicin이 사용되었다. 보골지 및 염초보골지의 추출물, 분획들은 DMSO에 4 mg/mL의 용액으로 제조한 후

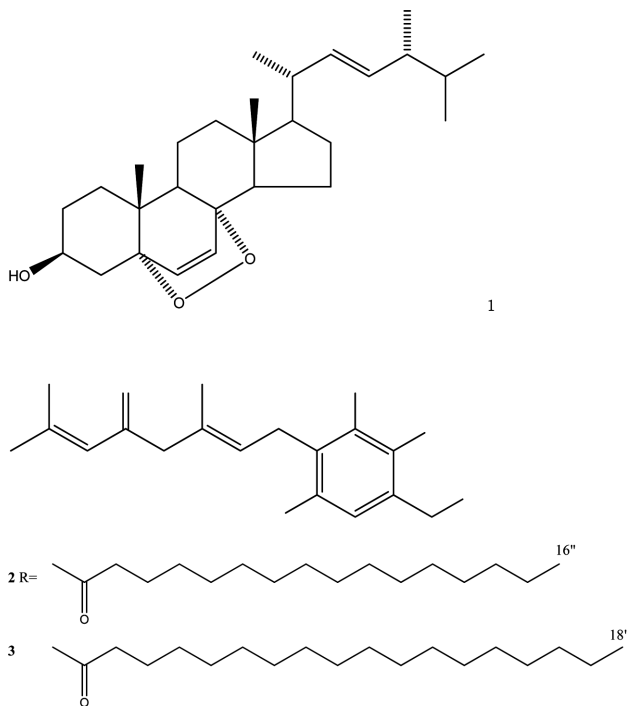


Fig. 1. Chemical structures of ergosterol peroxide (1), hericenone C (2), and hericenone D (3)

이 용액 10 μ L 에 assay buffer 70 μ L 를 가하여 제조되었다. 측정 시 먼저 assay buffer에 3% SDS를 가하여 activation 시킨 후 96 well에 sample, enzyme를 가한 후 37°C에서 10분간 incubation 시켰다. 그 후 기질 (Suc-LLVY-AMC)을 가하였고, 이로써 proteasome의 chymotrypsin-like activity는 효소-기질 반응의 결과 유리되는 AMC의 양을 fluorescence plate reader로 excitation 355 nm, emission 460 nm에서 측정함으로써 결정되었다.

결과 및 고찰

노루궁뎅이 버섯의 MeOH 추출물 및 극성에 따른 4개 분획물들의 proteasome inhibition activity를 측정한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 볼 수 바와 같이 노루궁뎅이 버섯의 MeOH 추출물은 91% 로 강한 proteasome 저해 작용을 나타냈다. 분획물들 중 n-Hexane 층, CHCl₃ 층 및 EtOAc 층이 각각 74%, 97%, 및 94% 로 강한 proteasome 저해 작용을 나타냈다.

가장 활성이 강한 CHCl₃ 분획물을 대상으로 column chromatography를 시행하여 2 종의 화합물을, n-Hexane 분획물로부터 1종의 화합물을 분리하였고 이들의 구조를 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR을 측정하여 결정할 수 있었다.

화합물 1의 ¹H-NMR spectrum에서 δ 0.79 및 δ 0.86에서 2개의 angular methyl기를, δ 0.78, 0.81, 0.88, 및 0.97에서

Table 1. Proteasome inhibitory activities of fractions from

Sample	Inhibition (%)
MeOH ex.	91
n-Hexane fr.	74
CHCl ₃ fr.	97
EtOAc fr.	94
BuOH fr.	60

Inhibition rates were calculated as percentages with respect to the control value.

4개의 secondary methyl기를 확인하여 이 화합물이 steroid 골격을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 δ 5.14와 5.17에서 multiplet으로 나타나는 olefinic proton들로 인해 sterol의 side chain에 이중결합이 있음을 추정 할 수 있었다. 그리고 δ 6.22와 δ 6.48에서 각각 doublet으로 olefinic signal들이 저자장 shift하여 나타나 이 주위에 peroxy group이 존재함을 추정할 수 있었다.

이상의 ¹H-NMR spectral data를 검토하고 문헌¹⁶⁻¹⁷과 비교하여 화합물1을 ergosterol peroxide로 동정하였다.

화합물 2 및 3의 ¹H-NMR spectrum에서 δ 12.38에서 chelated hydroxyl group을, δ 10.11에서 aldehyde group을, δ 3.91에서 benzene ring에 직접 치환된 methoxyl group을 확인할 수 있었고 δ 6.51에서 singlet으로 나타난 하나의 aromatic proton의 존재를 확인하여 이 화합물이 pentasubstituted phenyl group을 지니고 있음을 추정할 수 있었다. 또한 δ 1.78, 1.84 및 2.12에서 세 개의 methyl 기를, δ 5.30 및 6.07에서 두 개의 olefinic proton을 확인하여 이 화합물이 prenyl group을 지니고 있음을 추정할 수 있었다. 이 외에도 δ 1.25에서 long chain fatty acid의 (CH₂)_n에 기인한 signal을, δ 0.88에서 지방산의 terminal methyl group의 존재를 확인하여 이 화합물에 지방산이 acylation 되어 있음을 추정할 수 있었다. 이 화합물의 (+) FAB-MS spectrum에서 m/z 571 및 599에서 [M + H]⁺에 해당하는 pseudo-molecular ion peak이 나타나 지방산의 chain의 길이만 다른 (각각 palmitic acid 및 stearic acid) 두 화합물이 혼합물로서 존재함을 추정할 수 있었다.

이상의 (+) FAB-MS spectrum 과 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR data를 바탕으로 이 화합물을 노루궁뎅이 버섯에서 분리, 보고된 바 있는 hericenones C 및 D로 동정하였고 이는 기존에 보고된 문헌치와 잘 일치하였다.¹⁰

사 사

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구 (KRF-2007-E00113)이며 이에 감사를 표합니다.

인용문헌

1. 박완희, 이호득. (1999) 원색한국약용버섯도감, p. 442-443, (주) 교학사
2. Yang, Q. Y. and Jong, S. C. (1989) Medicinal mushrooms in China. *Mush. Sci.* **12**: (part 1), 631-643.
3. Ahn, D. K. (1992) Medicinal fungi in Korea. *Kor. J. Mycol.* **20**: 154-165.
4. Kawagishi, H., Shimada, A., Hosokawa, S., Mori, H., Okamoto, K., Sakamoto, H., Ishiguro, Y., Sakemi, S., Bordner, J., Kojima, N. and Furukawa, S. (1996) Erinacines E, F and G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, **37**: 7399-7402.
5. Kawagishi, H., Shimada, A., Shizuki, K., Mori, H., Okamoto, K., Sakamoto, H. and Furukawa, S. (1996) Erinacine D, a stimulator of (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Heterocycl. Commun.*, **2**: 51-54.
6. 사재훈, 신인철, 심태흠, 김태우, 이태욱, 한규석, 이태준, 오홍석, 김영진, 정의호. (2002) 노루궁뎅이 버섯의 영양성분 및 생리활성 탐색에 관한 연구. 강원도보건환경연구원보, **13**: 80-91.
7. Wang, Z., Luo, D., and Liang, Z. (2004) Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceum* Pers. *Carbohydr. Polym.*, **57**: 241-247.
8. Kawagishi, H., Shimada, A., Shirai, R., Okamoto, K., Ojima, F., Sakamoto, H., Isiguro, Y., and Furukawa, S. (1994) Erinacines A, B, and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.* **35**: 1569-1572.
9. Kawagishi, H., Ando, M., and Mizuno, T. (1990) Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, **31**: 373-376.
10. Kawagishi, H., Ando, M., Sakamoto, H., Yoshida, S., Ojima, F., Ishiguro, Y., Ukai, N. and Mizuno, T. (1991) Hericenones C, D, and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericeum erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, **32**: 4561-4564.
11. Ueda, K., Tsujimori, M., Kodani, S., Chiba, A., Kubo, M., Masuno, K., Sekiya, A., Nagai, K., and Kawagishi, H. (2008) An endoplasmic reticulum (ER) stress-suppressive compound and its analogues from the mushroom *Hericeum erinaceum*. *Bioorgan. Med. Chem.*, **16**: 9467-9470.
12. Myung, J., Kim, K. B., and Crews, C. M. (2001) The Ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.*, **21**: 245-273.
13. Almond, J. B. and Cohen, G. M. (2002) The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, **16**: 433-443.
14. Adams, J. (2004) The Proteasome: A suitable antineoplastic target. *Nat. Rev.*, **4**: 349-460.
15. Paramore, A. and Frantz, S. (2003) Fresh from the pipeline: Bortezomib. *Nat. Rev.*, 611-612.
16. Jin, W. B., Lerner, L., Chilton, J., Klingeman, H., and Towers, G. H. (1999) Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, **51**: 891-898.
17. Takei, T., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., and Kobori, M. (2005) Ergosterol Peroxide, an Apoptosis-Inducing Component Isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Bio-sci. Biotechnol. Biochem.*, **69**: 212-215.

(2008년 12월 14일 접수)