

SCIENCE

브로콜리(브라시카 올레라세아 var. 이탈리아)에서 추출한 천연 면역 자극제에 대한 구조적 분석

Structural analysis of an innate immunostimulant from broccoli, Brassica oleracea var. italica.

마코토 우라이¹, 게이코 카타오카², 사토시 니시다³, 카즈히사 세키미즈^{1,2,3}

Kazuhisa Sekimisu et al., 2017, Drug Discoveries & Therapeutics.; 11(5):230-237.

1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo. (도쿄대학교 의학부 대학원)

2. Genome Pharmaceuticals Institute Co., Ltd. (게놈 제약 연구소)

3. Teikyo University Institute of Medical Mycology (테이쿄 대학 의진균 연구소)

전세계적으로 채소류는 건강식의 일부로 섭취하고 있으며, 일부에서는 또한 전통 의학의 일환으로 사용되고 있다. 저자들은 누에 근육 수축 분석 시험 시스템을 이용하여 다양한 채소류에서 얻은 온수 추출물의 천연 면역 자극 작용을 평가했으며, 브로콜리인 브라시카 올레라세아 var. 이탈리아 (*Brassica oleracea var. italica*)에 강력한 천연 면역 자극제가 함유되어 있다는 사실을 발견했다. 저자들은 브로콜리에서 이 천연 면역 자극제를 정제하여 화학 분석 및 NMR 스펙트럼 분석을 통해 화학적 구조의 특징을 묘사했다. 이 천연 면역 자극제는 갈락투론산, 갈락토오스, 글루코오스, 아라비노오스 및 람노오스로 구성되어 있으며, 펙틴과 유사한 다당류의 구조를 갖추고 있다. 천연 면역 자극 작용에 연관된 구조적 모티프를 밝히기 위해 저자들은 화학적 처리 및 효소에 의한 처리를 통해 구조를 변경했으며, 이러한 작용은 펙티나아제 소화에 의해 약화된다는 것을 알아내었다. 이러한 발견은 브로콜리에서 정제한 펙틴과 유사한 다당류가 천연 면역 자극 작용을 하고 있으나 여기에는 폴리갈락투론산 구조가 필요하다는 점을 시사하고 있다.

키워드: 천연 면역 자극 작용, 펙틴 다당류, 폴리갈락투론산, 누에 근육 수축 분석 시험, 구조, 채소

1. 서론

천연 면역성은 동물이 미생물에 의한 감염이나 종양의 진전을 막는 방어체의 최일선이다. 천연 면역성을 자극하는 것은 전염병이나 암을 예방하는 효과적인 방법이 될 수 있다. 천연 면역성을 자극하는 약품은 특히 노인들이 건강을 유지하는데 도움을 줄 수 있을 것이다. 약초나 버섯은 그 임상학적 약효 덕분에 항종양 약품이나 면역 제어 약품의 잠재적 공급원이었으며, 지금까지 활성 물질들을 추출해왔다(1). 그러나, 편리한 방법을 사용하여 광범위한 검사를 거쳐 천연 자원에서 화합물의 천연 면역 자극 작용을 평가한 연구는 거의 없다. 저자들은 누에 나방(뽕믹스 모리 (*Bombyx mori*))의 유충을 신약 후보 발견을 위한 동물 모델로 사용하는 것을 옹호하고 있으며(2), 이전에도 누에 감염 모델을 이용하여 토양 박테리아인 리소박터 sp. (*Lysobacter* sp.) RH21805의 배양액 중 상층액에서 살균 항생물질인 라이소신 E (lysocin E)를 분리한 바 있었다(3). 효모 β -글루칸과 박테리아의 펩티도글리칸을 누에 뽕믹스 모리에 주입하면 유충의 근육 수축을 초래하는 곤충 시토킨 마비성 펩티드의 발달을 유도하게 된다(4,5). 저자들은 천연 면역성의 활성화에 연관된 근육 수축을 바탕으로 하여 누에를 이용한 분석 시험을 정립했으며(6), 녹차 추출물에서 천연 면역 자극 작용이 있는 다당류 하나를 정제했다(7). 저자들은 또한 누에 근육 수축 분석 시험을 사용하여 천연 원료에서 뽑은 다당류의 작용도 평가했다(8). 누에 근육 수축 분석 시험은 천연 면역 자극제를 평가하는데 있어서 몇 가지 장점이 있다(6~8).

이 시스템은 혈액 림프 내에 존재하는 리포 다당류(LPS) 흡수 단백질 때문에 리포 다당류에 반응하지 않으며, 그에 따라 분석 시험에 대한 잠재적인 LPS 오염은 무시할 수 있다. 더욱이, 이 방법은 누에의 몸체를 이용한 생체 분석 시험을 기반으로 하고 있기 때문에 독성 작용이 있는 화합물이나 미약한 약물 동력 등을 후보 화합물에서 배제할 수 있다. 전세계적으로 상당량의 영양소, 비타민, 미네랄 및 식이섬유를 함유하고 있는 채소류를 건강식의 일환으로 섭취하고 있다. 또한 일부 채소류는 종종 전통 의학에서 사용되고 있다. 저자들은 채소류가 영양학적 가치뿐만 아니라 약초들과 비슷하게 천연 면역 자극제 작용으로 인해 건강에 기여하고 있다는 가설을 세웠다. 경험적으로 채소류는 인체에 무해한 것으로 간주되고 있다. 본 연구에서 저자들은 누에 근육 수축 분석 시험 시스템을 사용하여 다양한 채소류에서 얻은 온수 추출물의 천연 면역 자극 작용을 평가했으며, 브로콜리인 브라시카 올레라세아 var. 이탈리아에 강력한 천연 면역 자극제가 함유되어 있다는 사실을 발견했다. 더욱이, 저자들은 브로콜리의 온수 추출물에 들어 있는 천연 면역 자극제를 정제하여 그 화학적 구조의 특징을 묘사했다. 저자들은 또한 천연 면역 자극 작용에 연관된 구조적 모티프를 밝혔다.

2. 재료 및 방법

2.1. 채소류의 온수 추출

본 연구에서 사용한 채소류는 일본 내의 지방 시장에서 구매했으며, 그 리스트는 표 1에 실려 있다. 구매한 채소의 식용부를 작은 조각으로 자른 뒤 1L의 물과 함께 121°C에서 15분 동안

가압 멸균 처리를 했다(7,9). 이 샘플은 냉각시킨 뒤 4°C에서 10분 동안 8000×g로 원심 분리했다. 상층액은 냉동 건조시켰다.

2.2. 누에 근육 수축 분석 시험

누에(뽕믹스 모리, 후요 투쿠바네) 알은 에히메 산수(일본 에히메)에서 구매했으며, 유충은 인조 사료로 27°C에서 사육했다(실크메이트 2S, 니혼 노산, 일본, 요코하마). 누에 근육 수축 분석 시험은 이전에 설명한 것처럼(4) 천연 면역성의 활성화 정도를 평가하기 위해 수행했다. 샘플들은 소독한 염수에 용해시켰으며, 각각의 샘플 중 100 μ L를 표본의 체액에 주입했다. 근육 수축 값은 공식 (xy/x) 에 따라 각 표본의 주입 전과 후 최대 길이를 측정하여 계산했다. 1 작용 단위는 0.15의 값으로 근육 수축을 일으키는 것으로 정의했다. 이 샘플들의 구체적인 작용은 희석한 샘플들을 가지고 적정 곡선을 만들어 밝혔다.

2.3. 브로콜리에서 얻은 천연 면역 자극제의 정제

앞에서 설명한 온수 추출을 시도하기 전에 브로콜리의 식용 부분(꽃차례&줄기)를 전자레인지(600 W)에서 5분 동안 가열한 다음 밀라Q 정제수로 세척했다(9). 이 온수 추출물에 에탄올 볼륨 두 개를 가한 후 혼합물을 원심분리했다. 밀라Q 정제수에 용해된 침전물을 밀라Q 정제수를 이용해 투석한 다음 냉동 건조시켰다. 이렇게 냉동 건조된 샘플을 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 용해한 다음 DEAE-셀룰로오스 컬럼 크로마토그래피(DF-52, 와트만)를 했다. 이 컬럼을 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 세척한 후에는 동일한 완충액에 선행 구배에 따라(0~0.4 M) NaCl을 용해하여 용출시킨다. 탄수화물을 함유한 부분을 페놀-H₂SO₄ 법을 사용하여 모니터링한(10) 다음 밀라Q 정제수를 기해 투석하고 냉동 건조시킨다.

2.4. 단당류 분석

샘플들은 100°C에서 3시간 동안 4 M 트리플루오로아세트산을 이용해 가수 분해시킨다. 단당류는 ABEE 라벨링 키트(세이카카쿠사, 일본, 도쿄)를 이용하여 아미노벤조산 에틸에스테르(ABEE)로 표시하며, ABEE로 표시된 당류는 고속 액체 크로마토그래피(HPLC; 1500 HPLC 시스템, 워터스, 밀포드, MA) 장치를 제조업체의 매뉴얼에 따라 작동하여 ODS 컬럼으로 분리한다(호네팩 C18, 75 mm × 4.60 mm, 세이카카쿠사, 일본, 도쿄).

2.5. 핵자기 공명(NMR) 실험

모든 NMR 스펙트럼은 ECA 500 기기(JEOL 사, 일본, 도쿄)를 이용하여 500 MHz (¹H) 및 125 MHz (¹³C)에서 기록했다. 화학 변위(chemical shift)는 δ 단위로 측정했으며, D₂O 용액에서 측정된 샘플들의 내부 기준으로 아세트(δ ¹H 2.23, δ ¹³C 31.1)을 사용했다. 신호 값은 이차원 동핵 상관 스펙트로스코피(homonuclear correlation spectroscopy), 총 상관 스펙트로스코피(total correlated spectroscopy), 이중핵 다중 양자 결합력(heteronuclear multiple quantum coherence), 및 이중핵 다중 결합(heteronuclear multiple bond coherence) 실험을 바탕으로 지정했다. 중첩 신호의 ¹H NMR 화학 변위는 이차원(²D) 스펙트럼에서 크로스 피크의 중심부에서 구했다.

2.6. 메틸화 분석

메틸화 반응을 하기 전에 샘플 내의 갈락투론산은 메틸 에스테르화시켰으며, 이전에 설명한대로 NaBD4를 사용하여 (6,6-디데테로)갈락토오스로 환원시켰다 (11). 다당류의 메틸화는 치유카누(Ciucanu) 법에 따라 수산화 나트륨 및 CH3I를 사용하여 수행했다 (12). 그 다음에 메틸화된 다당류는 가스 크로마토그래피 / 질량 스펙트럼 분석 (GLC-MS)을 하기 전에 가수 분해 및 환원, 그리고 아세틸화를 시켰다. GLC-MS 분석은 용융 실리카 모세관 컬럼 (Rtx-5, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm; 레스텍, 시마즈 사)이 장착된 QP-2010 플러스 기기 (시마즈 사, 일본, 교토)를 사용하여 실시했다.

2.7. 천연 면역 자극제의 구조적 변경

샘플 내의 아라비노푸라노오스 잔류물은 선별적으로 옥살산을 사용하여 가수 분해했다 (13). 이 가수 분해물은 중화시킨 다음 밀라-Q 정제수를 이용하여 투석하고 냉동 건조시켰다. 폴리갈락투론산 성분은 검정곰팡이 (아스페르질루스 니제르 (*Aspergillus niger*) (시그마 알드리치)에서 얻은 펩티나아제를 제조업체의 매뉴얼에 따라 사용하여 소화시켰다. 가수 분해된 물질은 0.2 M 아세트산을 용리제로 사용하여 바이오젤 P4 (900 × 15 mmφ) 상에서 겔 여과 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분별했다. 탄수화물이 함유된 부분은 페놀-H2SO4 법을 이용하여 모니터링했으며, 합친 후 냉동 건조했다.

3. 결과

3.1. 다양한 채소류의 온수 추출물에서의 천연 면역 자극 작용에 대한 평가

일본의 지방 시장에서 구입한 17종의 채소류 중 식용 부분에서 온수를 이용하여 추출했다. 이 온수 추출물의 천연 면역

채소의 종류	구체적인 작용 (개체수/mg)
<i>Allium fistulosum</i> (리크: 파와 비슷하게 생긴 백합목 식물)	1
<i>Allium sativum</i> (마늘)	0.0
<i>Brassica oleracea var. capitata</i> (양배추)	< 0.4
<i>Brassica oleracea var. italica</i> (브로콜리)	7
<i>Brassica rapa var. glabra</i> (배추)	0.3
<i>Capsicum annuum var. grossum</i> (피망)	0.3
<i>Cucumis sativus</i> (오이)	0.8
<i>Cucurbita moschata</i> (호박)	< 0.1
<i>Daucus carota</i> (당근)	0.6
<i>Lycopersicon esculentum</i> (방울토마토)	0.5
<i>Petroselinum crispum</i> (파슬리)	0.7
<i>Pisum sativum</i> (완두콩)	< 0.2
<i>Raphanus sativus var. longipinnatus</i> (일본무: 단무지 제조 시 쓰임)	0.2
<i>Siraitia grosvenorii</i> (나한과: 천연 감미료 중 하나)	0.6
<i>Solanum melongena</i> (가지)	0.5
<i>Spinacia oleracea</i> (시금치)	< 0.2
<i>Zingiber officinale</i> (피망)	< 0.3

Table 1. 다양한 채소류에서 추출한 온수 추출물의 근 수축 작용

구분	총 작용(개체수)	양(mg)	구체적인 작용(개체수/mg)
온수 추출물	50,000	800	63
에탄올 추출물	11,000	250	44
DEAE-셀룰로오스 크로마토그래피 (산성 부분)	13,000	100	130

Table 2. 브로콜리에서 얻은 천연 면역 자극제의 정제에 대한 요약

자극 작용은 누에 근육 수축 분석 시험을 이용해 평가했다. 면역 자극 작용은 채소의 종에 따라 차이가 났으며, 브로콜리인 브라시카 올레라세아 var. 이탈리아의 추출물이 해당 작용에서 7 단위/mg로 채소들 중 가장 높은 값을 보여주었다 (표 1). 다음에 저자들은 브로콜리에서 활성 화합물을 정제하려 시도했다.

3.2. 브로콜리에서 얻은 천연 면역 자극제의 정제

이 천연 면역 자극제는 누에 근육 수축 작용을 모니터링하면서 브로콜리의 식용 부분 (꽃차례 및 줄기)에서 얻은 온수 추출물을 정제해 얻었다. 브로콜리에서 천연 면역 자극제를 정제한 과정은 표 2에 요약되어 있다. 먼저 온수 추출물에서 에탄올 침전법을 이용해 해당 작용을 발견했다. 이는 이 활성 기질이 고분자량 화합물, 아마도 다당류라는 것을 말해주고 있다. 다음에 저자들은 NaCl의 선형 구배를 이용해 DEAE-셀룰로오스 컬럼 크로마토그래피로 용출했으며, 탄수화물로 용출한 부분은 페놀-H2SO4 법으로 검출했다. 이 절차에서 NaCl 농도 0 M (흡수되지 않은 부분) 및 ~0.2 M (산성 부분, AF)에서 두 개의 커다란 피크가 나타났으며, 이 피크가 포함된 부분은 합친 다음 투석하고 냉동 건조시켰다 (데이터는 표시하지 않음). 이 작용은 두 개의 피크 모두에서 발견되었다. AF는 밑에서 설명한대로 균질한 다당류로 구성되어 있을 수 있기 때문에 저자들은 이 부분의 특징에 대해 좀더 기술했다. 흡수되지 않는 부분에 대한 분석은 다른 곳에서 할 수도 있다. 해당 작용은 AF에서 130 단위/mg으로 증가했다 (표 2)

3.3. 브로콜리에서 얻은 천연 면역 자극제의 구조 분석

AF의 다당류 함량은 트리플루오로아세트산 가수 분해를 한 다음 HPLC 분석을 실시해 측정했다. 결과적으로 갈락투론산 (GalA), 아라비노오스 (Ara), 갈락토오스 (Gal), 람노오스 (Rha), 및 글루코오스 (Glc)가 검출되었으며, 이 화합물들의 몰 비율은 12 : 7.3 : 4.9 : 1.2 : 1.0였다. 이러한 결과는 AF 내에서 천연 면역 자극제의 구조가 펩티고 유사한 다당류라는 점을 시사하고 있다 (14).

저자들은 NMR을 이용해 추가적으로 구조 분석을 실시했다. 1H 및 13C NMR 분석에서는 AF에서 검출된 신호의 패턴이 단백질이나 지질이 아닌 다당류라는 것을 보여주고 있다 (그림 2). 2D NMR 실험을 통해 주요 신호들을 지정할 수 있다 (표 3). 다당류 분석에 따르면 AF에서 가장 양이 많은 성분인 GalA 잔류물의 회전 시스템이 세계 검출되었다. GalA의 아노머 양자 및 탄소의 화학 변위는 각각 5.07 ppm 및 99.8 ppm에서 검출되었으며, 이는 GalA 잔류물이 α 구성을 하고 있다는 점을 시사하고 있다.

이 회전 시스템의 화학 변위는 GalA 잔류물이 이 부분에 피라노오스 형으로 α -1,4-폴리갈락투론산으로 존재하고 있다는 것을 보여주고 있다 (15,16). 식물성 펙틴에서 호모갈락투로난의 특징적 구조인 GalA 메틸 에스테르의 메틸 신호는 검출되지 않았다. 그 다음에 저자들은 단당류 분석에서 검출된 당류 잔류물의 구체적인 연결성을 밝히기 위해 메틸화 분석을 실시했다. 기체 액체 크로마토그래피 및 질량 분석을 통해 부분적으로 메틸화된 알디톨 아세테이트 유도체에서 13개의 피크가 검출되었다(추가 그림 1).

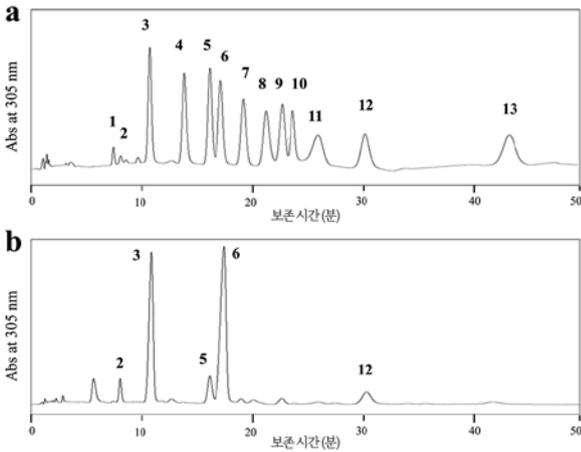


Figure 1. NPV 감염 이후 살아남은 누에에서 확인한 GE-3의 치료적 효과 (a) 표준 샘플 및 (b) AF. 표준 샘플 : 1, D-갈락투론산; 2, D-갈락투로스; 3, D-갈락토오스; 4, D-만노오스; 5, D-글루코오스; 6, L-아라비노오스; 7, D-리보오스; 8, N-아세틸-D-만노사민; 9, D-크실로오스; 10, N-아세틸-D-글루코사민; 11, L-푸코오스; 12, L-람노오스; 및 13, N-아세틸-D-갈락토사민

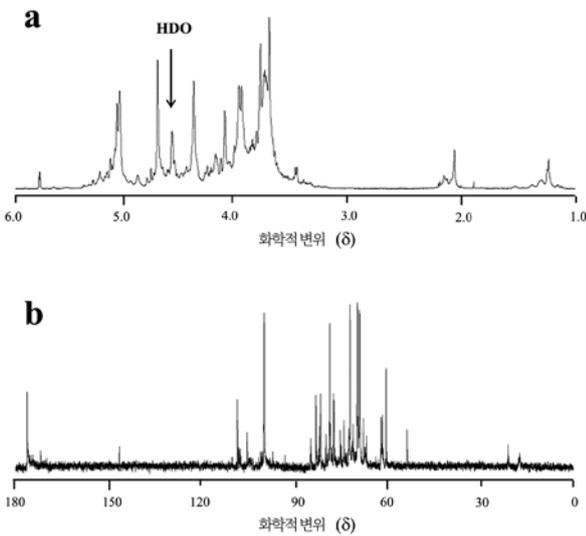


Figure 2. 산성 부분의 NMR 스펙트럼 (a) 500 MHz ^1H NMR, (b) 40°C 의 D_2O 에서 기록된 125 MHz ^{13}C NMR 스펙트럼.

글리코실 잔류물	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
$\rightarrow 4$ - α -GalpA-(1 \rightarrow)	5.07 99.8	3.76 69.1	3.98 69.8	4.41 78.8	4.73 72.2	- 176.2
$\rightarrow 5$ - α -Araf-(1 \rightarrow)	5.09 108.3	4.13 NA	4.02 NA	4.21 NA	3.84 61.7	- -

NA: 지정되지 않음

Table 3. 40°C 에서 D_2O 에 기록된 산성 부분에 대한 ^1H 및 ^{13}C NMR 화학 변위 (ppm)

검출된 피크의 보존 시간 및 질량 세분화 패턴에 따라 당류 잔류물의 연결성을 결정했다 (표 4). 검출된 당류 연결성의 데이터 세트는 AF 내에 있는 천연 면역 자극제의 구조가 밑에서 설명하고 있는 대로 람노갈락투로난 I (RG-I) 구조를 가진 호모갈락투로난으로 구성된 펙틴과 유사한 다당류라는 것을 시사하고 있다. 이전에 보고된 펙틴 구조를 바탕으로 (14), 저자들은 그림 3에 실린 것처럼 브로콜리에서 얻은 천연 면역 자극제의 구조 모델을 제안한다. 4-GalpA 및 5-Araf 잔류물이 풍부한 것은 NMR 분석 결과와도 일치하며, 이러한 결과는 4-GalpA 잔류물이 α -1,4-폴리갈락투론산 구조를 가지고 있고, 5-Araf 잔류물은 α -1,5-아라비난 구조를 가지고 있다는 점을 시사하고 있다. 2,4-Rhap 잔류물이 검출된 것은 AF가 RG-I 구조를 가지고 있다는 것을 시사하며, 다시 말해 $\rightarrow 4$ - α -GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -Rhap-(1 \rightarrow C-4 위치에서 Rha 잔류물이 갈락탄 및 아라비난 체인을 대체하고 있다 (14,17). T-Araf, 3-Araf, 및 3,5-Araf 잔류물의 존재는 α -1,5-아라비난 체인이 C-3 위치에서 부분적으로 분기되었음을 시사하고 있다 (14,17). T-Galp, 4-Galp, 3-Galp, 6-Galp, 및 3,6-Galp의 검출은 AF 내에 β -1,4-갈락탄 및 β -1,3/6-갈락탄 구조가 존재하고 있음을 시사하고 있다 (14,17). 저자들은 메틸화 분석을 바탕으로 소량 성분으로 검출된 T-Rhap 및 T-Glcp 잔류물이 결합된 장소에 대해서는 제안을 할 수 없다.

3.3. 브로콜리에서 얻은 천연 면역 자극제의 구조적 변경이 작용에 미친 효과

천연 면역 자극 작용에 연관된 구조적 모티프를 정하기 위해 저자들은 화학적으로 또는 효소 처리를 통해 천연 면역 자극제의 구조를 변경시켰다. 이 다당류 구조를 변경하기 위해 사용한 방법은 그림 3에 실려 있다. α -1,4-폴리갈락투론산 및 아라비난은 천연 다당류의 주요 구조이며, 그렇기 때문에 저자들은 이 성분을 제거하려 시도했다. 먼저 이 다당류에서 아라비노푸라노오스 결합을 가수 분해하여 아라비난 체인을 제거하기 위해 옥살산 처리를 실시했다. 옥살산으로 처리한 부분에 대한 NMR 분석 결과, 천연 다당류에서 검출된 Ara 잔류물의 신호가 (표 3) 완전히 사라졌음을 (그림 4) 보여주고 있다. 이 부분에 대한 단당류 분석에서는 또한 이 부분 내의 Ara 잔류물이 천연 다당류에 비해 크게 감소했음을 보여주고 있다 (표 5). 이 부분의 천연 면역 자극 작용은 누에 근육 수축 분석 시험을 사용하여 평가했으며, 이 작용은 옥살산 처리의 영향을 받지 않았다 (표 5). 이러한 발견은 AF 내에 존재하는 아라비난 구조가 천연 면역 자극 작용에는 기여하지 않고 있다는 것을 시사하고 있다.

피크	유도체	구조특성	몰(Mol) %
1	1,4-다-O아세틸-2,3,5-트리-O메틸 아라비톨	T-Araf	5.7
2	1,5-다-O아세틸-2,3,4-트리-O메틸 람나톨	T-Rhap	1.3
3	1,3,4-트리-O아세틸-2,5-다-O메틸 아라비톨	3-Araf	1.0
4	1,4,5-트리-O아세틸-2,3-다-O메틸 아라비톨	5-Araf	16
5	1,5-다-O아세틸-2,3,4,6-테트라-O메틸 글루시톨	T-Glcp	3.7
6	1,5-다-O아세틸-2,3,4,6-테트라-O메틸 갈락티톨	T-Galp	3.6
7	1,3,4,5-테트라-O아세틸-2-모노-O메틸 아라비톨	3,5-Araf	4.4
8	1,2,4,5-테트라-O아세틸-3-모노-O메틸 람나톨	2,4-Rhap	3.2
9	1,4,5-트리-O아세틸-2,3,6-트리-O메틸 (6,6-디우테로) 갈락티톨b	4-GalpA	46
10	1,4,5-트리-O아세틸-2,3,6-트리-O메틸 갈락티톨	4-Galp	5.1
11	1,3,5-트리-O아세틸-2,4,6-트리-O메틸 갈락티톨	3-Galp	3.7
12	1,5,6-트리-O아세틸-2,3,4-트리-O메틸 갈락티톨	6-Galp	1.5
13	1,3,5,6-테트라-O아세틸-2,4-다-O메틸 갈락티톨	3,6-Galp	4.5

Table 4. 산성 부분의 메틸화 분석

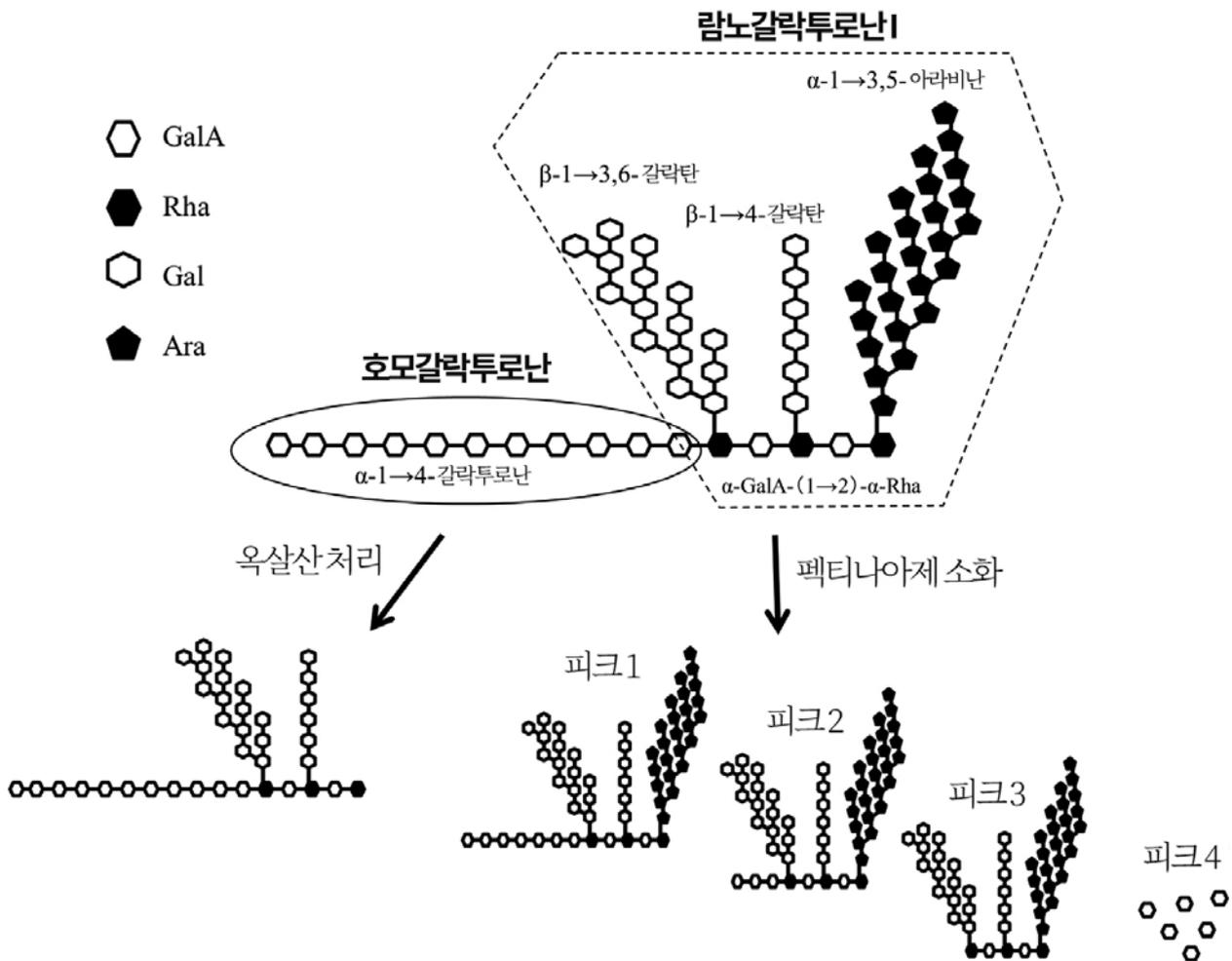


Figure 3. 산성 부분의 구조 모델 및 구조적 변경 계획

다음에는 α -1,4-폴리갈락투론산 구조를 약화시키기 위해 천연 다당류에 대한 펙티나아제 소화를 실시했다. 소화된 샘플은 겔 여과 크로마토그래피 (바이오젤 P-4)를 이용해 분류시켰으며, 그림 5에 실려 있듯이 최초로 용출된 부분에서 나타난 4개의 피크가 탄수화물이 함유된 부분으로 나타났다. 각각의 피크에 대한 다당류 분석에서는 피크 1과 피크 2에 포함된 GalA 잔류물의 몰 비율이 천연 다당류에 비해 감소했음을 보여주고 있다 (표

5). 피크 3에 포함된 GalA 잔류물은 검출할 수 없었다. 피크 4는 다당류가 포함된 부분으로 이 피크는 GalA만으로 이루어져 있기 때문에 이것은 펙티나아제 소화에서 나온 것이다. 천연 다당류에 비해 천연 면역 자극 작용은 펙티나아제 소화에 따른 분자량 감소에 따라 약화되었으며, 피크 3과 피크 4의 성분은 검출할 수 없었다. 이러한 결과는 AF 내의 α -1,4-폴리갈락투론산 구조가 천연 면역 자극 작용에 필요하다는 것을 시사하고 있다.

4. 논의

본 연구에서 저자들은 누에 근육 수축 분석 시험을 사용하여 17종의 채소류에서 얻은 온수 추출물로부터 천연 면역 자극제를 분리해냈으며, 브로콜리 추출물이 이 중에서 가장 높은 수준의 면역 자극제 작용을 한다는 것을 발견했다. 브로콜리는 인체 건강에 유익한 채소이며, 항발암성 작용이 있는 설포라판과 같은 다른 생리 활성 화합물도 추출되었다 (18). 최근에는 브로콜리 줄기에서 항암 세포의 번식을 촉진시키는 성질이 있는 다당류 또한 정제된 바 있다 (19). 그러나 브로콜리에서 추출한 천연 면역 자극 화합물을 보고된 바 없다. 브로콜리의 관련 아종인 화이트 캐비지 (브라시카 올레라세아 var. 카피타타, 품종 바톨로), 케일 (B. 올레라세아 var. 사벨리카, 품종 녹색 모스크러셋), 및 적색 케일 (B. 올레라세아 var. 사벨리카 품종 레드브) 등은 천연 면역성에서 중요한 역할을 하는 보완 시스템을 활성화시키는 펙틴 다당류를 함유하고 있다 (20). 본 연구에서는 브로콜리의 또다른 관련 아종 일본에서 재배한 양배추 (B. 올레라세아 var. 카피타타)에서 얻은 온수 추출물이 누에 근육 수축 분석 시험에서 천연 면역 자극 작용을 보이지 않았다. 이 작용은 브로콜리의 아종에 따라 차이를 보인다.

저자들은 브로콜리의 온수 추출물에서 천연 면역 자극제를 정제했으며, RG-I 구조 (그림 3에 실린 구조 모델)를 가진 호모갈락투로난으로 구성된 펙틴과 유사한 다당류로 그 화학적 구조의 특징을 해석했다. 펙틴은 식물 세포벽에 들어 있는 구조적으로 복잡한 다당류로 주로 호모갈락투로난, RG-I 및 람노갈락투로난 II (RG-II)으로 구성되어 있고, 각 유형의 다당류 분포는 식물 종에 따라 차이가 난다 (14). RG-II는 C-2 및 C-3 위치에서 α -1,4-폴리갈락투론산을 다양한 올리고당 체인으로 대체한 것이다 (14). 메틸화 분석을 통해 GalA 잔류물이 브로콜리에서 정제된 천연 면역 자극제에서 4가지가 대체된 형이라는 것이 밝혀졌다. 이러한 발

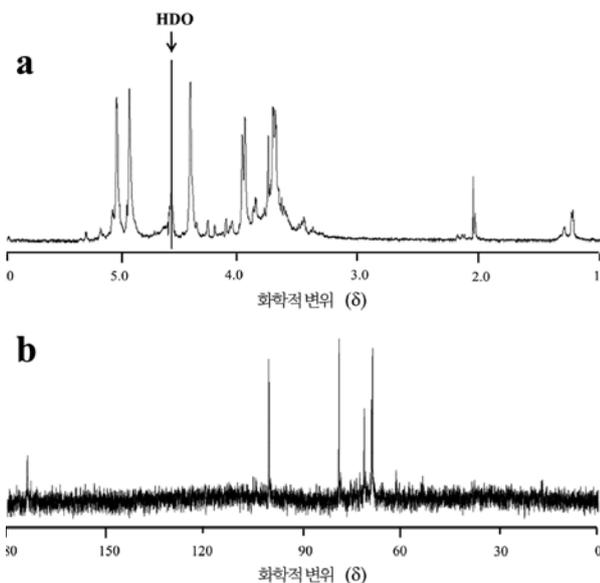


Figure 4. 옥살산으로 처리한 산성 부분의 NMR 스펙트럼 (a) 500 MHz ^1H NMR, (b) 40°C 에서 D_2O 에 기록된 125 MHz ^{13}C NMR 스펙트럼.

견은 이 다당류에 RG-II 구조가 포함되어 있지 않다는 것을 시사한다. 펙틴은 면역 제어 작용 등과 같은 다양한 유형의 대생물 작용을 보여주고 있으며, 몇 가지 유형에서는 이러한 작용을 하는데 필요한 활성 성분이 알려져 있다 (21,22). 면역 자극 작용을 지닌 식물성 펙틴의 거의 모든 활성 성분이 갈락탄이나 아라비난 구조를 가지고 있다 (21,22). α -1,4-폴리갈락투론산 및 아라비난은 본 연구에서 정제한 다당류의 주요 구조들이기 때문에 저자들은 화학적 처리 및 효소에 의한 처리를 통해 각각의 성분을 제거했으며, 이러한 작용은 α -1,4-폴리갈락투론산 구조가 약화됨에 따라 저하되는 것으로 밝혀졌다. 알고 있는 바로는 이 논문이 천연 면역 자극 작용을 위해서는 펙틴과 유사한 다당류 구조 내에 α -1,4-폴리갈락투론산 모티프가 필요하다는 것을 보고한 최초의 보고서이다. 브로콜리에서 얻은 펙틴과 유사한 다당류는 천연 면역성을 자극하는 우수한 작용 모드를 갖고 있을 수 있다. 호모갈락투로난은 식물성 펙틴의 공통 구조 중 하나 이기는 하지만, 브로콜리 다당류 내의 α -1,4-폴리갈락투론산이 어떻게 천연 면역성을 자극하는지는 명확하지 않다. 이전에 저자들은 녹차 추출물에서 누에 근육 수축 분석 시험을 통해 천연 면역 자극 작용을 지닌 다당류를 정제한 바 있다 (7). 이 다당류는 펙틴과 유사한 구조로 GalA, Gal, Glc, 및 Rha로 구성되며, 그 몰 비율은 22:4:5:1이었다. 이 다당류의 주 구조는 브로콜리에서 얻은 천연 면역 자극제와 마찬가지로 α -1,4-폴리갈락투론산이었다. 누에 근육 수축 분석 시험에서 α -1,4-폴리갈락투론산의 구조 및 작용 관계를 구하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다. 또한 포유류의 시스템에서도 누에 근육 수축 작용을 유도하는 α -1,4-폴리갈락투론산이 천연 면역 자극 작용을 나타내는지의 여부를 밝히기 위해서도 추가 연구가 필요하다.

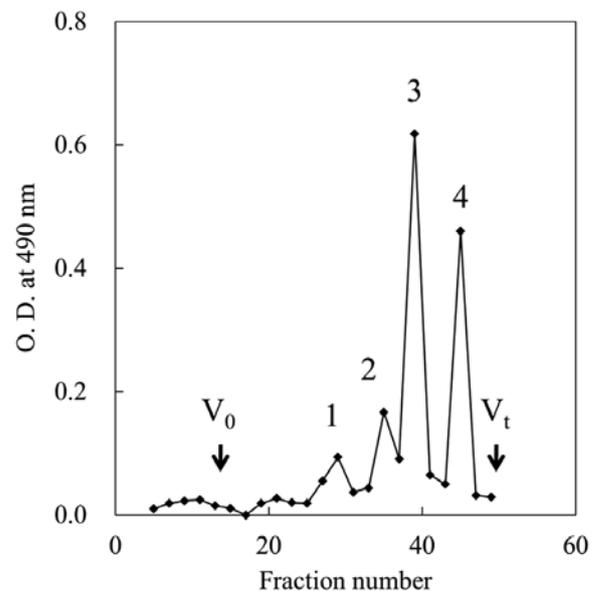


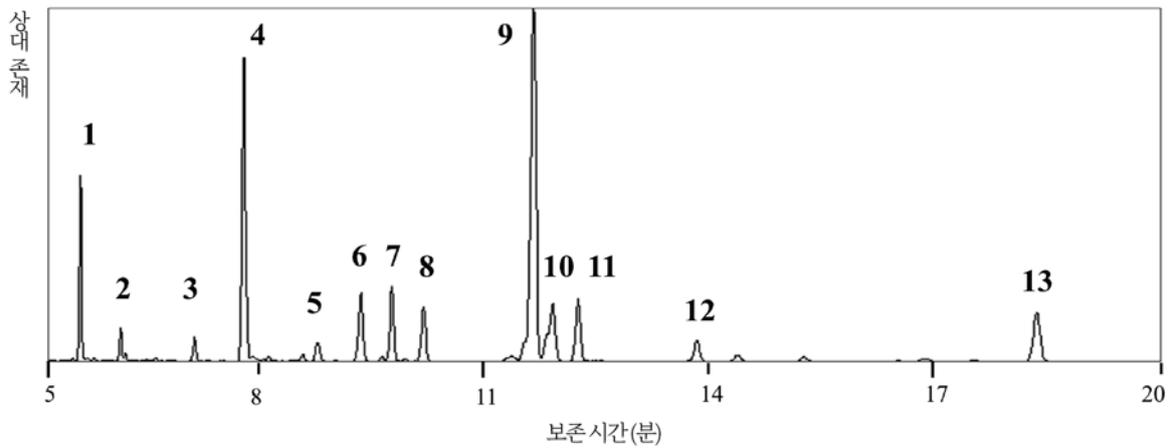
Figure 5. 펙티나아제로 소화된 산성 부분의 겔 여과 컬럼 크로마토그래피. 이 샘플은 0.2 M 아세트산을 용출액으로 사용하여 바이오젤 P-4 겔 여과 컬럼 (1150 mm \times 15 mm ϕ)에 적용시켰다. 허공 용적 (V_0)을 추정하기 위하여 사이즈 마커로 블루 덱스트란 2000을 사용했으며, V_t 는 겔의 총 부피를 나타낸다. 당류를 함유한 부분은 페놀- H_2SO_4 법을 이용해 모니터링했다.

샘플	당 조성(몰Mol %)						작용(개체수)
	GalA	Gal	Glc	Ara	Xyl	Rha	
산성부분	46	18	3.7	27	ND	4.5	630
옥살산처리	30	45	5.5	3.2	3.6	12	670 <
펙티나아제							
Peak 1	23	22	5.0	28	5.0	18	370
Peak 2	24	24	6.0	17	5.5	24	240
Peak 3	ND	36	5.7	47	ND	12	< 160
Peak 4	100	ND	ND	ND	ND	ND	< 160

Ara, arabinose; Gal, galactose; GalA, galacturonic acid; Glc, glucose; Rha, rhamnose; Xyl, xylose. ND, not detected.

Table 5. 산성 부분의 근육 수축 작용에 대한 구조적 변경의 효과

Supplemental Data



Supplementary Figure S1. 산성 부분에서 부분적으로 메틸화된 알디톨 아세테이트 유도체의 GLC 패턴. 1) 1,4-디-O-아세틸-2,3,5-트리-O-메틸 아라비톨, 2) 1,5-디-O-아세틸-2,3,4-트리-O-메틸 람니톨, 3) 1,3,4-트리-O-아세틸-2,5-디-O-메틸 아라비톨, 4) 1,4,5-트리-O-아세틸-2,3-디-O-메틸 아라비톨, 5) 1,5-디-O-아세틸-2,3,4,6-테트라-O-메틸 글루시톨, 6) 1,5-디-O-아세틸-2,3,4,6-테트라-O-메틸 갈락티톨, 7) 1,3,4,5-테트라-O-아세틸-2-모노-O-메틸 아라비톨, 8) 1,2,4,5-테트라-O-아세틸-3-모노-O-메틸 람니톨, 9) 1,4,5-트리-O-아세틸-2,3,6-트리-O-메틸 (6,6-디데루토)갈락티톨, 10) 1,4,5-트리-O-아세틸-2,3,6-트리-O-메틸 갈락티톨, 11) 1,3,5-트리-O-아세틸-2,4,6-트리-O-메틸 갈락티톨, 12) 1,5,6-트리-O-아세틸-2,3,4-트리-O-메틸 갈락티톨, 및 13) 1,3,5,6-테트라-O-아세틸-2,4-디-O-메틸 갈락티톨.