

교잡된 *Cordyceps militaris* 균주의 RAPD 분석 및 생리활성물질인 cordycepin 함량 측정

정진우¹ · 김성윤² · 김문옥¹ · 이재윤¹ · 최영현² · 이재동^{1*}

¹부산대학교 자연과학대학 미생물학과
²동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 동의대학교 대학원 바이오물질제어학과(BK21)

RAPD Analysis and Cordycepin Concentration of Hybridized *Cordyceps militaris* Strains by Mating.

Jin-Woo Jeong¹, Cheng-Yun Jin², Mun-Ock Kim¹, Jae-Yun Lee¹, Yung-Hyun Choi² and Jae-Dong Lee^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Department of Biochemistry, Donggeui University College of Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control (BK21 program), Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, Korea

(Received June 16, 2008. Accepted February 10, 2009)

ABSTRACT: The *C. militaris* belongs to entomopathogenic fungi, which have their specific sequences in internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) depending on species. In this study, to identify the phylogenetic relationship of the strain hybridized by mating of *C. militaris*, we compared DNA sequences of ITS regions and 5.8S ribosomal DNA (rDNA) repeat unit of hybrid strain and its parental strains. The result revealed that hybrid strains are *C. militaris* species. In addition, cordycepins produced by hybrid strains and other strains of *C. militaris* were analyzed by HPLC with 20 mM KH₂PO₄ of mobile phase and C-18 columns. The result indicated that the strain hybridized by mating produce higher concentration of phytochemical cordycepin than other *C. militaris* strains.

KEYWORDS: Cordycepin, *Cordyceps militaris*, HPLC analysis, RAPD

동충하초(冬蟲夏草)는 겨울에는 곤충의 몸에서 있다가 여름에는 풀처럼 나타나는 것에서 유래하였다. 즉, 동충하초균은 곤충의 몸에 침입하여 죽게 한 다음 그 기주의 영양분을 이용하여 여름에 자실체를 형성하면서 자라나며, 숙주 특이성을 가지고 있어 이것에 따라 이름을 명명하기도 한다. 감염된 곤충으로부터 대형의 신장된 형태의 직립된 병을 가진 유색의 자낭자과를 형성하는 것에 의해 최초로 곤충에 감염하는 균류로서 인식되었다(Lee, 1998).

동충하초는 분류학상 자낭균아문(Ascomycotina)에 속하며 핵균강(Pyrenomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae)에 위치하며, 대부분 *Cordyceps*속에 속한다. 동충하초균은 세계적으로 약 800여종이 알려져 있고 자실체를 형성하는 것으로는 대부분 자낭균류의 동충하초속(*Cordyceps*)에 속하는 균들로 약 300여종이 보고되었으며, 한국에서 채집, 분류된 것은 약 70여종에 이른다(Sung *et al.*, 1997).

동충하초는 옛 부터 중국에서 암질환, 간질환, 폐질환, 뇌질환, 순환기질환, 심장병, 당뇨병 등에 탁월한 효과를 나타낼 뿐만 아니라 현대실용중약전에는 폐결핵, 노인쇠약성, 만성결핵, 빈혈, 허약체질 등을 치료한다고 나타나 있으며, 최근에는 종양억제율이 83%로 높은 항암 효과 및 마약중독의 해독제로서도 효과가 있는 것으로 보고되고

있다(Bok *et al.*, 1999; Kinjo *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1998).

특히 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)에서 생성되는 주된 생리활성 물질은 cordycepin (3'-deoxyadenosine)이며(Cunningham, 1951), 이는 각종 생리활성에 있어서 뛰어난 항세균성과 항바이러스성 효능을 가진다고 보고되어 있고, 인체에 대한 생리적 기능에 대해서 항암성을 보고한 이래 수종의 종양에 억제효과가 있다고 밝혀졌다(Smuckler *et al.*, 1972; Blakesley *et al.*, 1975; Gumpert *et al.*, 1976; Lovinger *et al.*, 1973; Cory *et al.*, 1965).

이에 본 연구에서는 *C. militaris*에서 생리활성물질인 cordycepin의 함량을 조사하여 그 함량이 높은 균주들을 선발하여 각각 교배하여 만든 새로운 품종을 RAPD분석을 통하여 확인하였고, 또한 이렇게 개량된 *C. militaris* 품종이 높은 cordycepin 함량을 가지는지 HPLC를 통하여 확인하였다. 그 결과 cordycepin (3'-deoxyadenosine)의 함량이 높은 균주를 얻을 수 있었다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

균주분양센터 Korea Agricultural Culture Collection (KACC)에서 4균주(KACC40226, KACC40655, KACC40659,

*Corresponding author <E-mail: leejd@pusan.ac.kr>

Table 1. List of *Cordyceps* species used in this study

No.	Strains*	Fungal species	Origin/ Locality	Accession No.
1	MPNU10306	<i>Cordyceps militaris</i>	Junnam (Mt.), Jiri	-
2	MPNU10364	<i>Cordyceps militaris</i>	Kangwon (Mt.), Sorak	-
3	MPNU10365	<i>Cordyceps militaris</i>	Kangwon (Mt.), Sorak	-
4	MPNU10366	<i>Cordyceps militaris</i>	Kangwon (Mt.), Sorak	-
5	MPNU10963	<i>Cordyceps militaris</i>	Junnam (Mt.), Baegam	-
6	MPNU 8001	<i>Cordyceps militaris</i>	Junnam (Mt.), Jiri	AF153266
7	KACC40226	<i>Cordyceps militaris</i>	KACC	KA003036
8	KACC40655	<i>Cordyceps militaris</i>	KACC	-
9	KACC40659	<i>Cordyceps militaris</i>	KACC	-
10	KACC50001	<i>Cordyceps militaris</i>	KACC	KA006517
11	Hybrid mat1	<i>Cordyceps militaris</i>	MPNU10306*MPNU10366	-
12	Hybrid mat2	<i>Cordyceps militaris</i>	MPNU10306*KACC50001	-
13	Hybrid mat3	<i>Cordyceps militaris</i>	MPNU10366*KACC40659	-

*KACC: Korean Agricultural Culture Collection.

MPNU: Micro. lab. of Pusan National Univ.

KACC50001)를 분양 받았으며, 버섯채집회를 통해 우수한 수집균주 6균주(MPNU10306, MPNU10364, MPNU10365, MPNU10366, MPNU10963, MPNU8001)를 확보하여 표준균주로 사용하였으며, 표준균주로부터 교잡된 4균주(Hybrid mat1, Hybrid mat2, Hybrid mat3, Hybrid mat4)를 사용하였다. 일부균주는 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank database에서 Internal transcribed spacer(ITS) sequences가 등재되어 있는 것을 사용하였다(Table 1). 이러한 균주들은 Potato Dextrose Agar(PDA) 배지에 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후 실험에 사용하였으며, Potato Dextrose Broth(PDB) 배지에 접종하여 25°C에서 7일간 Shaking incubator 후 접종원으로 사용하였다. 아울러 PDB 배지에 각각의 균사체에서 일부 균사를 덜어 넣고 Shaking incubator에서 25°C, 7일간 배양하며 hybrid하였으며, 그 배양액 20~25 ml을 현미배지에 접종 후 1,500~1,700 lux, 17°C incubator에서 습도 95%를 항상 유지하며 48일간 배양하였다.

DNA추출 및 PCR amplification

DNA 추출은 균사체 0.2 g을 액체질소를 넣어 마쇄한 후 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 추출하였으며, 추출한 DNA는 0.8% agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인하였다. ITS1, ITS2 및 5.8S rRNA gene을 포함하고 있는 rDNA영역 즉, ITS region을 증폭하기 위한 primer는 White 등(1990)이 보고한 ITS5F (5'-GGA AGT AAA AGT GGT AAC AA-3')와 ITS4R (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 각각 사용하였으며, 각 primer의 sequence 및 부착부위는 Fig. 1에 나타내었다. 분리한 DNA로부터 ITS1과 5.8S 및 ITS2부분을 증폭하기 위하여 20 µl용

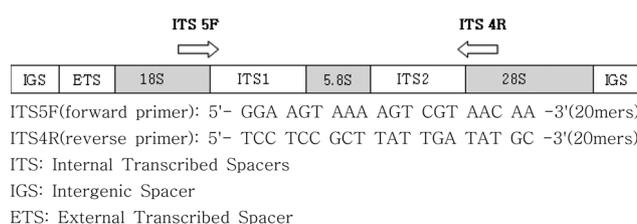


Fig. 1. A structure of rDNA cluster of higher fungi and primer design for PCR amplification and sequencing of ITS regions used in this study.

PCR premix(Bioneer Co, Korea)에 template DNA 1 µl, primers(ITS5F, ITS4R)를 각 1 µl (20 pM)넣고 3차증류수 17 µl를 넣어 total Volume 20 µl로 만들어 PCR를 시행하였다.

PCR 반응조건은 pre-denaturation 96°C/5분, denaturation 96°C/40초, annealing 48°C/40초, extension 72°C/40초, 30 cycle, 72°C/10분 추가연장 반응으로 시행하였다. PCR 반응물은 1% agarose gel에서 확인하고, gel 밴드를 잘라 QIAGEN gel extraction kit(Qiagen, Germany)로 정제하여 염기서열 분석에 사용하였다. 염기서열은 Bigdye Terminator Cycle DNA sequencing v2.0 Kit (PE and Roche, USA)와 ABI 310 auto DNA sequencer (PE and Roche)를 이용하여 분석하고, 결정된 염기서열을 ClustalW mutiple alignment를 이용하여 NCBI Gene bank에 등록된 *C. militaris*종 및 유사 종들과 Neighbor joining method로 유연관계를 비교분석하였다.

RAPD analysis

새로운 품종의 *C. militaris*에서 종내변이도를 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)를 이용하여 관찰하기 위해 random primer (10/mer)를 설계하여 사용하였으며,

Table 2. List of random primers used for RAPD analysis

Code	Source	Sequence	G+C content
A	MPNU-12	5'-TGC TCT GCC C-3'	70%
B	MPNU-18	5'-AAA GCT GCG G-3'	60%
C	MPNU-20	5'-TGA GTG GGT G-3'	60%
D	MPNU-24	5'-GTG AGG CGT C-3'	70%

*MPNU: Micro. lab. of Pusan National Univ.

그 중 관찰된 4개의 primer (MPNU-12, MPNU-18, MPNU-20, MPNU-24)를 사용하였다(Table 2).

PCR 증폭반응은 pre-denaturation (94°C/2분 30초), denaturation (94°C/30초), annealing (36°C/1분), extension (72°C/2분), 45 cycle, 72°C/5분 추가연장 반응을 시켰다.

증폭된 PCR product들은 1% agarose gel에 전기영동을 통하여 균주에 따른 DNA pattern을 분석하였다.

HPLC analysis

자실체 100 g과 증류수 1 l를 넣어 110°C에서 1시간 추출하였으며, 균사체 또한 자실체와 동일한 방법으로 열수 추출을 하였다. 추출액은 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 덜어 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. HPLC 기기의 구성은 SHISEIDO사 (Japan) 제품이었으며, column은 Waters HPLC columns C-18을 사용하여 25°C로 유지하면서 20 mM- KH2PO4 유출용매를 1.0 μl/min로 흘려보냈으며, UV 검출기로 254 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Sequence alignment

추출한 DNA로부터 ITS1과 5.8S 및 ITS2 부분을 PCR로 증폭한 반응물은 Fig. 2에 나타났다.

표준균주 10종과 교배균주 4종의 ITS1, 5.8S, ITS2부위의

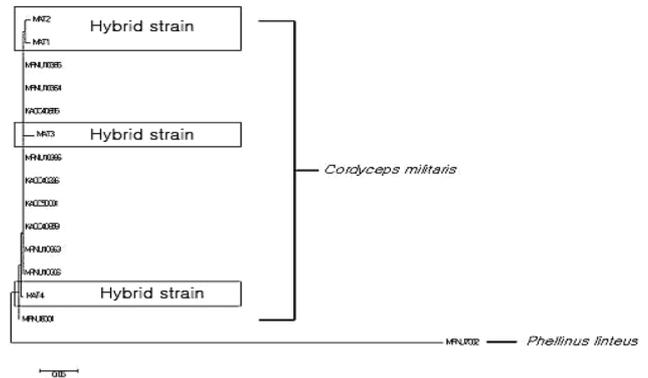


Fig. 3. Phylogenetic obtained by neighbour joining analysis of ITS1, 2 and 5.8S rDNA sequences.

염기서열을 분석한 후 alignment를 수행한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 각 sequence들의 앞부분에 존재하는 ITS1 부위에서는 모든 대상에서 거의 같은 상동성을 나타내어 중간 변이율이 높게 나타났으며, 5.8S rDNA 부위에서는 모든 대상에서 거의 같은 상동성을 나타내어 중간 변이율이 매우 낮게 나타내었다. 또한 ITS2 부위에서도 많은 염기서열상의 차이를 보이고 있으나 ITS1 부위보다는 변이율이 높지 않았다. 특히 표준균주 10균주와 교잡균주 4균주에서 조사된 전 부위(ITS1, 5.8S, ITS2)에서 많은 염기서열 차이를 보이고 있으나 같은 종으로 확인된 표준균주들에서는 1~10 bp 정도의 차이만을 보여 같은 균으로 분류될 수 있었다.

교잡종의 종내 유전적 변이도

RAPD 분석을 위해 사용한 24개의 primer중 관찰된 4개의 primer (MPNU-12, MPNU-18, MPNU-20, MPNU-24)가 명확한 band차이를 보여주었다(Fig. 4). 나머지 20개의 random primer에서는 증폭이 되지 않았거나 모든 유전자형의 증폭에 있어서 명확하지 않았다.

Fig. 4는 각각의 교배균주 중 cordycepin 함량이 높은

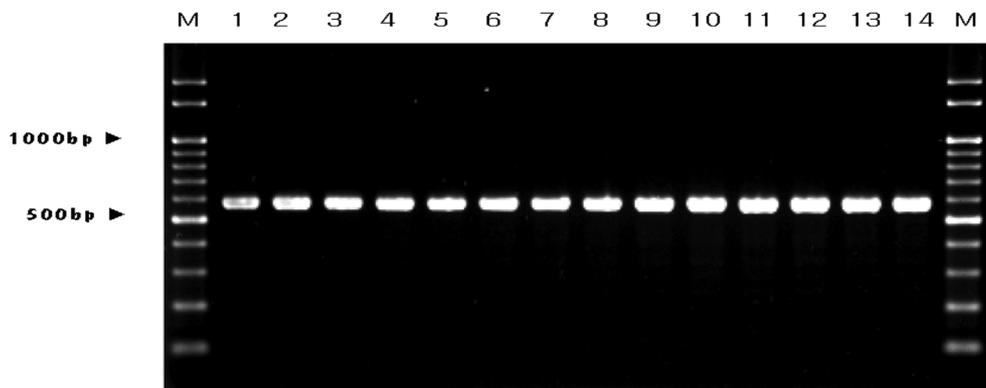


Fig. 2. PCR products using the species-specific of ITS regions, M ; size marker. 1. MPNU10306 2. MPNU10364 3. MPNU10365 4. MPNU10366 5. MPNU10963 6. KACC40226 7. KACC40655 8. KACC40659 9. KACC50001 10. MPNU8001 11. Mat1 12. Mat2 13. Mat3 14. Mat4.

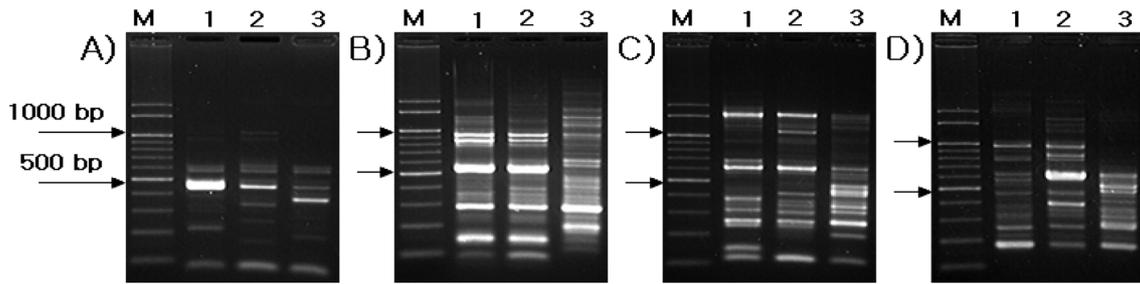


Fig. 4. Amplified products of from DNA of *C. militaris* using random primer, Random primer; A) MPNU-12, B) MPNU-18, C) MPNU-20, D) MPNU-24, LaneM: 100 bp Ladder DNA Marker, lanes1 MPNU10306, lanes2 MPNU10366, lanes3 Mat1.

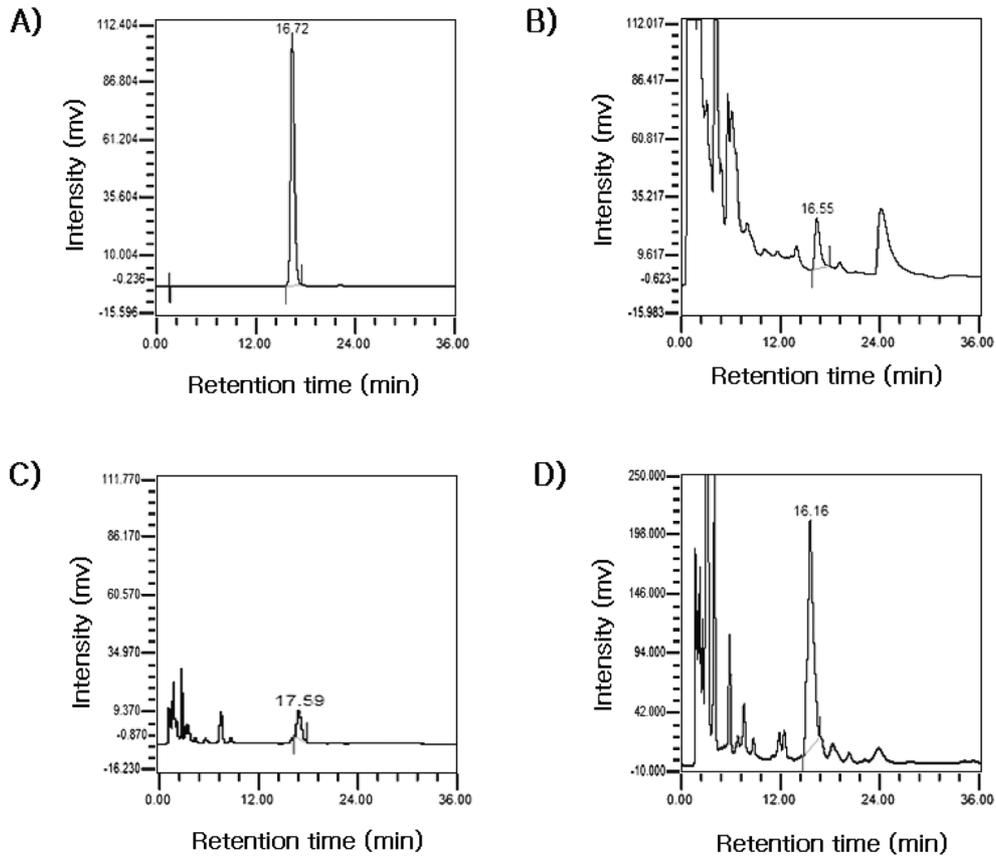


Fig. 5. HPLC chromatogram of cordycepin analysis, Standard (A), MPNU10306 (B), MPNU10366 (C), Hybrid mat1 (D) compounds (*Flow rate 1.0 ml/min).

균주를 선택하여 random primer (MPNU-12, MPNU-18, MPNU-20, MPNU-24)를 사용한 결과를 나타낸 것이다. 각 균주의 band에서 보여지듯이 각각 서로 다른 향상의 band 위치를 나타내며 다양한 유전적 변이가 발견되었으며, 각각의 표준균주에서 교잡한 새로운 종이라 판단할 수 있다.

Cordycepin 함량

Cordycepin 표준곡선은 SIGMA에서 구입한 Standard를 사용하였다. Fig. 5에 standard와 각각의 MPNU10306, MPNU10366, 교잡종 mat1(MPNU10306*MPNU10366) 자실체의 추출물을 이용하여 HPLC chromatogram을 나

타내었다. 동충하초의 cordycepin 함량은 각 sample에 따라 커다란 차이를 보였는데 MPNU10306의 cordycepin 함량 (1.820 mg/ml)과 MPNU10366의 함량(1.225 mg/ml)은 다소 낮은 편이라고 생각되며, 반면에 교잡균주인 교잡종 Mat1의 함량(2.634 mg/ml)은 다른 균주보다 2배정도 높았다(Table 3) 및 (Fig. 6).

즉, 교잡종의 자실체 추출물이 표준균주의 자실체 추출물보다 cordycepin 함량이 높다고 판단할 수 있다. Cordycepin 분석은 아직 국제적인 공인분석법이 없기 때문에 본 연구 결과를 공인할 수는 없지만 SIGMA에서 구매한 표준품을 시료에 첨가하고 실험방법에 서술한 대로 추출과정을 거쳐

Table 3. Cordycepin contents of various strains

Strains No.	RT	Area	Cordycepin contents (β ² /ml)
Standard	16.716	69584491	100.000
MPNU10306	16.549	12746218	1.820
MPNU10366	17.587	8785628	1.225
Hybrid Mat1	16.155	18719089	2.634

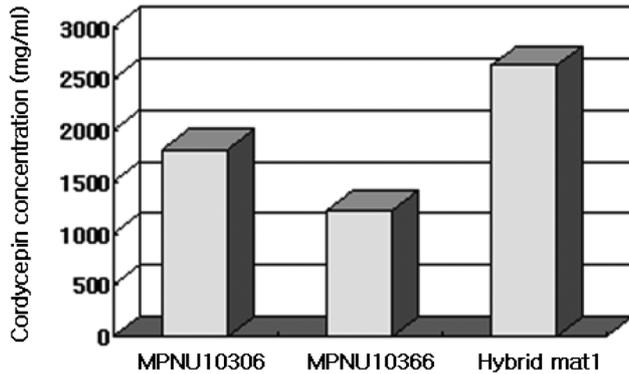


Fig. 6. The cordycepin concentration analysis from *C. militaris* extracted.

표준품을 분석하면 인위적으로 첨가한 표준품이 거의 모두 용출되었기에 본 연구의 분석방법은 적절하다고 판단된다.

적요

KACC에서 분양받은 *C. militaris* 4균주와 야생에서 채집된 6균주 그리고 교배 육성한 4균주를 대상으로 DNA 분석에 의한 분류동정을 시행하였다. 표준균주 10균주와 교잡균주 4균주에서 조사된 전 부위(ITS1, 5.8S rDNA, ITS2)에서 많은 염기서열 차이를 보이고 있으나 같은 종으로 확인된 표준균주들과 수집균주들과 비교한 바 같은 균으로 분류된 것을 확인할 수 있었다. 교잡에 쓰여 졌던 표준균주에서 교잡된 교잡균주 중 가장 우수한 교잡균주 mat1과 교잡에 사용되었던 표준균주(MPNU10306, MPNU10366)를 선택하여 RAPD 분석을 하였으며, RAPD에서 나타난 각 균주간의 다양한 유전적 변이가 관찰되었다. 이는 새로운 *C. militaris*종 균주로 판단되어지며, HPLC 분석에서도 교잡에 쓰여 졌던 표준균주보다 교잡한 *C. militaris* 균주가 cordycepin 생산량이 우수하게 나타났으며, 이는 교잡균주가 cordycepin 함량을 보다 더 높일 수 있음을 의미하고 상업적 가치가 있을 것이라 판단되어지며, 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 이루어진 결과의 일부분이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Blakkesley, R. W. and Boezi, J. A. 1975. A kinetic and structural characterization of adenosine-5'-triphosphate: ribonucleic acid adenylyl-transferase from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta.* **414**. 133-145.

Bok, J. W., Ller, J. C., Klin, H. G., and Neil, G. H. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps militaris*. *Phytochemistry* **51**. 891-898.

Cory, J. G., Suhadolnik, R. J., Resnick, B., and Rich, M. A. 1965. Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid of human tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **103**. 646-653.

Cunningham, K. G., Hutchinson, S. A., Manson, W., and Spring, F. S. 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris*. Part I. Isolation and characterization. *J. Chem. Soc.* **51**. 2299-2300.

Gumport, R. I. and Edelheit, E. B. 1976. The synthesis of 3'-dATP and its use as an inhibitor of ATP-dependent DNA synthesis in toluene-treated *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**. 2804-2809.

Kinjo, N., Kaizu, Y., Taketomo, N., and Tsunoo, A. 1996. Physiological activities of the extracts from cultured mycelia of *Cordyceps militaris* (Vnill.) *Fr. Gen. Educ. Tokyo Med. Dent. Univ.* **26**. 7-14.

Lee, J. D. 1998. Mycology, 3rd edition. Gu-duck Publishing Company.

Lovinger, G. G., Klein, R. A., Gilden, R. V., and Hatanaka, M. 1973. The effect of cordycepin on cell transformation by RNA tumor viruses. *Virology* **55**. 524-526.

Smuckler, E. A. and Hadjiolov, A. A. 1972. Inhibition of hepatic deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in comparison with the effects of amanitin and cordycepin. *Biochem. J.* **129**. 153-166.

Song, C. H., Jeon, Y. J., Yang, B. K., Ra, K. S., and Sung, J. M. 1998. The anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**. 536-539.

Sung, J. M., Lee, H. K., Choi, Y. S., Kim, Y. Y., Lee, S. H., and Sung, G. H. 1997. Distribution and toxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor. J. Mycol.* **25**. 239-252

White, T., Burns, J., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 428. *In*: Innis, M. A. Gelfand, D. H. Sinsky, J. J. and White, T. J. Eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. California.