

## 칼슘함량이 강화된 새송이버섯의 프로테오믹 분석

배희선<sup>1</sup> · 김대현 · 최응규\*

울산과학기술대학교 나노생명화학공학부, <sup>1</sup>(재)포항테크노파크 바이오정보지원센터

### Proteomic Characteristics of Calcium Enriched King Oyster Mushroom (*Pleurotus eryngii*)

Hee-Sun Bae<sup>1</sup>, Dae-Hyun Kim, and Ung-Kyu Choi\*

School of Nano-Bioscience & Chemical Engineering, UNIST

<sup>1</sup>Pohang Center for Evaluation of Biomaterials

**Abstract** This study was conducted to identify the differences in proteomic characteristics between Ca-enriched king oyster mushrooms and general king oyster mushrooms. A combined high-throughput proteomic approach was employed to determine the expression profiles and identity of proteins using 2-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The overall distribution patterns of the proteins were quite similar, but many of the protein spot intensities varied. A total of 10 proteins, representing a significant difference in the quantities of protein between the two types of mushrooms, were successfully identified. Among these proteins, eight kinds were increased in the Ca-enriched king oyster mushrooms and two kinds were decreased. This study showed that proteomic analysis can help define specific changes in protein level and composition, which can occur in mushrooms where Ca content may or may not be enriched.

**Keywords:** Ca-enriched king oyster mushroom, proteomic analysis, MALDI-TOF

## 서 론

새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)는 분류학적으로 느타리버섯과(*Pleurotaceae*), 느타리버섯 속(*Pleurotus*)에 속하는 버섯으로서 주로 아열대 지방의 대초원에서 발생하며 분포지역은 유럽남부, 중앙아시아, 아프리카 북부등지에서 자생하는 버섯으로 “King oyster mushroom”이라고 불리어지기도 한다(1).

새송이버섯은 건조물의 약 30%가 단백질로 구성되어 있어 우수한 단백질 공급원일 뿐만 아니라 각종 비타민 성분을 함유하고 있는 우수한 식품원료이다(2). 또한 새송이버섯의 단백질당류는 대장암세포의 증식억제 효과가 우수하며(3), 혈당 및 혈중 콜레스테롤 저하효과(4) 등이 우수한 것으로 보고되어 있다.

버섯의 칼슘함량은 채소 등에 비해 상당히 부족한 것으로 알려져 있음에 따라(5,6), *Pleurotus eryngii*, *Hypsizygus marmoratus*, *Pholiota nameko*, *Flammulina velutipes* 및 *Ganoderma lucidum* 등 다양한 버섯을 대상으로 칼슘을 비롯한 무기질의 흡수에 관한 연구가 상당히 진행되어 왔다(7-12). Tabata와 Ogura(13)는 potato sucrose agar(PSA)와 톱밥배지에서 *H. marmoratus*의 균사체 증식을 확인한 바 있으며, Tabata와 Shinohara(14)는 PSA와 톱밥배지에서 *Pleurotus ostreatus*와 *P. nameko*의 칼슘흡수능을 조사하

여 보고한 바 있다.

본 연구진은 톱밥배지에서 새송이버섯의 칼슘흡수능을 다양한 칼슘원을 활용하여 조사한 바 있으며, 그 결과 Ca-phosphate와 Ca-carbonate를 0.1% 첨가 시 새송이버섯의 칼슘함량을 4배 이상 증가시킴을 확인하고 그 결과를 보고하였다(15). 또한 칼슘원의 원가 절감을 위하여 소성한 불가사리를 칼슘원으로 이용하여 새송이버섯의 칼슘함량을 조사한 결과 4배 이상의 칼슘함량이 증가함을 확인한 바 있다(16).

본 연구에서는 최근에 널리 활용되는 프로테오믹스 기술을 활용하여 칼슘함량이 증가된 새송이버섯과 일반 새송이버섯에서 단백질 발현의 변화를 조사하였다. 또한 현저한 차이를 보이는 단백질들을 분리, 동정함으로써 새송이버섯 칼슘강화의 기작규명에 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 칼슘강화 새송이버섯 배양 및 칼슘함량 측정

본 실험에서는 농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물학과에서 분양받은 *Pleurotus eryngii* NIAST 2302를 potato dextrose agar(PDA)에서 2개월 간격으로 계대배양하여 사용하였다. 액체 배양을 위한 접종원의 준비는 250 mL 삼각플라스크에 50 mL의 potato dextrose broth를 조제하여 평판배양된 새송이버섯 균사체를 접종하고 5일간 배양한 다음, 배양액을 균질기로 균질화하여 접종원으로 사용하였다. 칼슘강화 새송이버섯의 제조를 위해 칼슘원으로 Ca-phosphate( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )를 1.0% 첨가한 후 배지를 100°C에서 4시간 동안 멸균하고 여기에 미리 배양된 균사체를 접종하였다. 접종된 톱밥배지를 23°C(습도 80% 이상)의 암실에서

\*Corresponding author: Ung-Kyu Choi, School of Nano-Bioscience & Chemical Engineering, UNIST, Ulsan 689-798, Korea

Tel: 82-54-223-2252

Fax: 82-54-223-2250

E-mail: cuk8272@unist.ac.kr

Received September 2, 2010; revised December 2, 2010;

accepted December 2, 2010

25일간 균사를 배양한 다음 생육실로 옮겨 발아를 유도하였으며, 자실체의 생육조건을 맞추어 주며 자실체로 생육시켰다. 생산된 자실체는 무작위 추출하여 칼슘함량을 측정하고 2차원 전기영동을 위한 시료로 사용하였다. 새송이버섯 자실체에 함유된 칼슘함량은 원자흡광분광 광도법(17)으로 정량하였다.

### 단백질 분리

새송이버섯과 칼슘이 첨가된 새송이버섯은 세척 후 냉동건조하고 액체 질소를 이용하여 분말화하여 시료로 사용하였다. 시료는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관하였다. 버섯 분말은 buffer [20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 250 mM sucrose, 10 mM ethylene glycol tetraacetic acid(EGTA), 1 mM phenyl methane sulfonyl fluoride(PMSF), 1 mM dithiothreitol(DTT), 1% Triton X-100]을 이용하여 균질화를 수행하였다. 그리고 50% trichloroacetic acid를 이용하여 침전시켰다. 원심분리기를 이용하여 얻은 침전물을 acetone으로 씻어 준 9.5 M urea, 0.8% phamalyte(pH 3.5-10), 1% dichlorodiphenyl-trichloroethane(DDT), 2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 4% protease inhibitor cocktail table로 구성된 시료용액을 넣고 상온에서 1시간 방치 후 침전물로부터 단백질을 분리하였다(18,19).

### 이차원 전기영동

버섯으로부터 분리된 단백질 시료를 IEF(isoelectric focusing)와 2-dimensional electrophoresis를 통하여 분리하였다. 일차 IEF를 위하여 IPG strip은 24 cm pH 3-10을 이용하였다. 이때 단백질 시료는 600  $\mu\text{g}$ 을 사용하였으며 sample buffer 즉, lysis solution을 포함한 전체 부피가 340  $\mu\text{L}$ 가 되도록 하여 IPGphor strip holder에 dry strip과 단백질 시료를 넣고  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 IPGphor IEF system(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 rehydration 단계를 수행하였다. Rehydration 후 염을 제거하였으며, IEF는 500 V로 1시간, 1,000 V로 1시간, 4,000 V로 2시간, 8,000 V로 18시간을 수행하여 총 153,500 Vhr을 수행하였다. IEF 후 SDS-PAGE 수행을 위해 equilibration buffer [1.5 M Tris-HCl(pH 8.8), 75% glycerol, 6 M Urea, 2% SDS]에 1% DDT를 첨가하여 15분간 equilibration시킨 후 2.5% indole-3-acetic acid(IAA)를 첨가하여 다시 15분간 equilibration 시켰다. Equilibration된 strip은 Ettan DALTsix Larger Vertical electrophoresis system(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 12% gel에서 80 V로 1시간 전기영동을 하고 120 V로 12시간 동안 전기영동을 실시하여 단백질을 분자량에 따라 분리하였다. 전기영동 후 3% phosphoric acid, 50% ethanol에서 30분간 fixing 후 물을 이용하여 gel을 깨끗이 씻어주고 다시 34% methanol, 3% phosphoric acid, 17% ammonium sulfate에서 1시간 동안 equilibration시키고 coomassie brilliant blue(0.02% CBB-G250, 3% phosphoric acid, 17% ammonium sulfate, 34% ethanol)을 이용하여 stain한 뒤 이를 물을 이용하여 destain하였다.

### 이미지 분석

UMAX PowerLook 1120 scanner(UMAX Technologies, Inc. Dallas, TX, USA)를 이용하여 destain을 마친 gel의 이미지를 스캐닝해서 TIFF 파일 형태로 저장하였다. 저장된 이미지는 PDQuest software(version 7.0, Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 이미지 분석을 수행하였다. 각 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 평준화(normalization) 하였으며, 칼슘이 첨가된 새송이버섯 단백질 발현 변화를 비교하기 위해 PDQuest를 이용하여 비

교되는 두 gel 상의 spot을 동일하게 match시킨 뒤 각 spot에 대하여 intensity를 비교 분석하였다. 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현 변화를 보여주는 단백질을 spot으로 선정하였다.

### 단백질 절편

CBB로 염색된 gel을 멸균된 물로 2번 씻어주고 이미지 분석으로 확인된 spot 부위를 조심스럽게 1-2 mm 오려 내어 E-tube에 옮겼다. 50%(v/v) acetonitrile을 gel 조각의 2배 부피가 되도록 넣고 15분간 상온에 방치하였다. 15분 후 모든 liquid를 제거하고 gel 조각을 충분히 덮게 100% acetonitrile을 넣었다. Gel 조각이 흰색으로 변하면 acetonitrile를 제거하고 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 에서 약 5분간 rehydration하였다. 같은 부피의 acetonitrile를 1:1이 되게 넣고 15분간 incubation하여 모든 liquid를 제거하고 speed vac.에서 1시간 말렸다.

Gel 조각을 trypsin(50 ng/ $\mu\text{L}$ )이 포함된 digestion buffer(5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )에 넣고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 45분간 반응하였다. Gel 조각 속으로 liquid가 들어가면 trypsin이 없는 digestion buffer를 더 넣어준다. 80  $\mu\text{L}$  정도의 digestion buffer를 넣고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 반응시켰다(20).

$37^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 trypsin으로 반응시킨 뒤 25 nM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 를 20  $\mu\text{L}$  넣고 15분간 반응시켰다. 반응 후 100%의 acetonitrile를 20  $\mu\text{L}$  정도 넣고 다시 15분간 반응시켰다. 상등액을 새 tube에 옮겨 담고 남은 gel 조각에 0.1% TFA, 60% acetonitrile를 20  $\mu\text{L}$  정도 넣은 뒤 15분간 반응시키고 상등액을 새 tube에 옮겨 담았다. 이 과정을 2번 수행하였다. 각 상등액을 모두 합하여 speed vac.을 이용하여 말렸다. 완전히 말린 peptide에 0.5% TFA solution 2  $\mu\text{L}$ 를 넣고 pipeting으로 녹인 후 여기에 50% acetonitrile, 0.5% TFA solution 500  $\mu\text{L}$ 에 Matrix( $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) 5 mg을 넣고 vortexing한 뒤 1분간 spin down 하였다. 녹여진 peptide 1  $\mu\text{L}$ 가 있는 tube에 matrix 1  $\mu\text{L}$ 를 넣어 적당히 섞어준 뒤 plate 위에 적하하였다.

### 단백질 동정

질량분석기는 Voyager DE-STR MALDI-TOF mass spectrometer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였다(21). Plate에 적하되어 있는 단백질 단편은 positive ion mode에서 accelerating voltage 20 KV, delay time은 200 ns에서 측정하여 얻어진 peak로 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다.

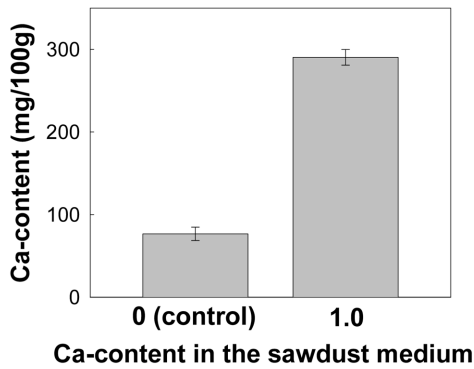
### Database search

Peptide fingerprinting은 검색 engine인 MS-FIT(Protein Prospector v 4.0.4, <http://prospector.ucsf.edu>)을 이용하였다. 이때 database는 PubMed([www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed))와 Swiss-Prot/TrEMBL(<http://au.expasy.org/sport>)의 정보를 바탕으로 존재하고 있는 위치에 따라 분류하였다. MS-FIT에서 database를 이용하여 검색할 때 species는 모든 종을 대상으로 선택하고 mass tolerance는  $\pm 100$  ppm 이하로 선택하여 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 새송이버섯 자실체의 칼슘함량

본 연구에 사용된 새송이버섯의 칼슘함량을 확인하기 위하여 새송이버섯의 칼슘원으로서 Ca-phosphate를 톱삼배지 무게에 대하여 1.0% 농도로 첨가한 후 균주를 접종하고 일반적인 새송이버섯의 배양환경 및 생육환경을 준수하여 자실체를 얻은 후 칼



**Fig. 1. Calcium contents of King oyster mushroom harvested from the sawdust medium supplemented with Ca-source.**

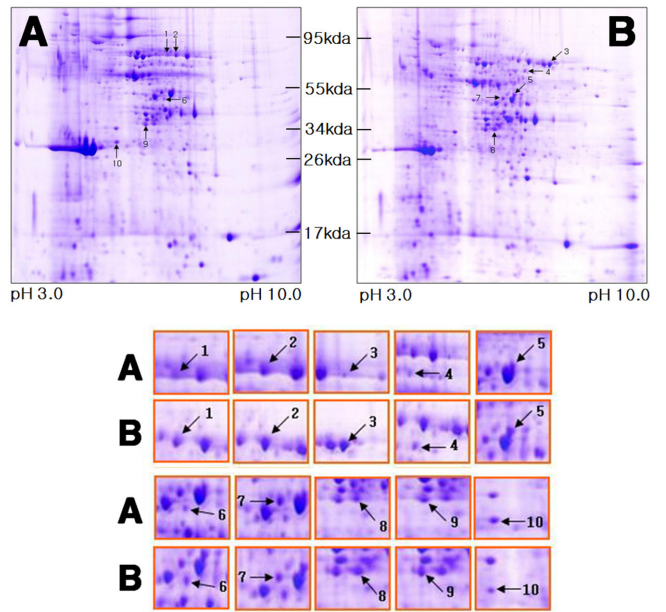
습함량을 Fig. 1에 나타내었다. 배지에 칼슘원을 첨가하지 않은 대조구의 경우 새송이버섯의 칼슘 함량은 76.7±8.1 mg%를 나타내었으며, Ca-phosphate를 1.0% 첨가한 구에서는 290.4±9.4 mg%로 대조구에 비해 칼슘 함량이 3.8배 정도 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 Choi 등(16)이 칼슘원으로 새송이버섯에 불가사리 분말을 1.0% 첨가한 구에서 255.9±16.3 mg%의 칼슘함량을 얻어 대조구에 비해 3.6배 이상 칼슘의 함량이 증가했다는 보고와 유사한 결과이다.

**이차원 전기영동 패턴**

새송이버섯과 칼슘이 첨가된 새송이버섯의 단백질 발현의 차이를 관찰하기 위해 이차원 전기영동을 수행하였다. 이미지 분석은 PDQuest 2-Dimension software(Bio-Rad)을 이용하였다. 이미지 분석 결과 약 800여개의 spot을 확인할 수 있었다. 일반 새송이버섯과 칼슘이 첨가된 새송이버섯의 단백질 발현 양상을 이차원 전기영동으로 분석한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. IEF 과정은 24 cm IPG strip(pH 3-10) 범위에서 수행하였다. 15 Kda에서 100 Kda 사이에 존재하는 60% 정도의 spot은 산성 pI를 가지며 나머지 40% 정도의 spot은 염기성 영역에 나타났다. 100 Kda 이상에서는 polypeptide spot이 거의 나타나지 않았다. 그리고 9.0 이상의 pI에서도 spot은 거의 나타나지 않았다.

**발현 차이의 단백질 확인**

2-D gel의 단백질 spot을 trypsin으로 digestion하고 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight(Maldi-Tof)를 통해 분석한 결과 700여 개의 spot이 발현의 차이를 보였고 그 중 두 배 이상의 발현변화를 보이는 spot은 30여 개가 있었다. 이들 spot 중 20개의 spot에 대한 질량 값을 얻고 database를 이용하여 단백질 동정을 수행한 결과 10개의 spot에 대한 단백질 동정을 할 수 있었다. Table 1은 칼슘이 첨가된 배지의 새송이버섯에서 발현이 증가되거나 감소되어 차이를 보인 단백질을 나타내었다. 대부분의 spot이 10% 미만의 sequence coverage를 가졌다. 확인된 단백질은 2-D gel 상에서 분자량과 pI 값을 이용하여 입증하였다. 10개의 확인된 단백질은 8개의 단백질은 발현이 증가하는 것으로 나타났으며 2개의 단백질은 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 동정된 10개의 단백질들 중 putative transcriptional regulator mtlR, arginyl-tRNA synthetase, glucose inhibited division protein A, calcium-dependent protein kinase 4, APT synthase subunit A, glutamate 5-kinase(Gamma-glutamyl kinase), probable fold bifunctional protein 및 2,3-bisphosphoglycerate-



**Fig. 2. Protein expression maps of calcium-enriched King oyster mushroom (A) and general King oyster mushroom (B).** Proteins from King oyster mushrooms were separated on a pH 3-10 IPG strip in the first dimension and on an SDS-polyacrylamide (12%) gel in the second dimension. Protein spots significantly differentiated by calcium enrichment are marked by arrows. The numbers indicated on the gels correspond to the gel numbers given in Table 2.

dependent phosphoglycerate mutase 2는 칼슘강화 새송이버섯에서 함량이 증가하는 것으로 확인된 반면 α-centractin(Centractin)과 thiazole biosynthesis protein의 함량은 칼슘강화 새송이버섯에서 감소하는 것으로 확인되었다.

**동정된 단백질의 분류**

대부분의 단백질은 세포질에 있는 것으로 나타났으나 APT synthase subunit A는 미토콘드리아에 위치하며 α-centractin은 세포질, 세포골격, 중심체(centrosome)에 위치한다. 또한 동정된 단백질은 PudMed와 Swiss-Prot/TrEMBL의 정보를 바탕으로 생리학적 기능을 확인할 수 있었다. 칼슘함량이 강화된 새송이버섯에서 2.3배 증가하는 경향을 보인 putative transcriptional regulator mtlR은 세포질에 위치하고 있으며 마니톨(mannitol) phosphoenol pyruvate-dependent sugar phosphotransferase system(PTS)의 조절을 관여하는 단백질인 것으로 확인되었다. Arginyl-tRNA synthetase은 칼슘강화 새송이버섯에서 4.5배의 함량증가를 나타내었다. 이 단백질은 세포질에 위치하며 ATP(Adenosine triphosphate)의 탈인산화로 두개의 인산기가 떨어지고 L-argininine와 tRNA(Arg)를 합성하여 L-arginyl-tRNA(Arg)으로 촉매하는 역할을 한다. 칼슘강화 새송이버섯에서 6.4배의 함량증가를 나타낸 glucose inhibited division protein A는 tRNA 유리된 염기의 5-carboxymethylaminomethyl modification에 관여하는 것으로 알려져 있다.

보통 식물에서 세포질의 칼슘 농도 변화는 다양한 생리적 자극 반응에서 신호전달경로와 관련이 있으며, 세포질의 칼슘 증가에 의해 protein kinase 활성화도 역시 증가하는 것으로 알려져 있다. 칼슘강화 새송이버섯에서 2.9배 함량이 증가한 calcium-dependent protein kinase(CDPK)는 식물에서 신호전달경로에서 하부단계와 관련하여 반응에 도움을 주는 것으로 알려져 있으며, calcium-

**Table 1. Differentially expressed proteins in calcium-enriched King oyster mushroom and general King oyster mushroom**

No.	Identified protein	Species	Accession No.	M.W (Kda)	pI	MOWSE <sup>1)</sup> Score	Coverage (%)	Fold
1	Putative transcriptional regulator mtlR	<i>Streptococcus mutans</i>	Q02425	75	6.2	108.0	6	+2.3
2	Arginyl-tRNA synthetase	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	Q971X1	71	6.8	62.9	5	+4.5
3	Glucose inhibited division protein A	<i>Thermotoga maritima</i>	Q9WYA1	71	8.6	48.4	7	+6.4
4	Calcium-dependent protein kinase 4	<i>Plasmodium falciparum</i>	Q8IBS5	60	6.5	47.1	5	+2.9
5	APT synthase	<i>Saccharomyces cerevisia</i>	P00850	54	5.5	128.0	8	+5.2
6	Glutamate 5-kinase (Gamma-glutamyl kinase)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Q8A1E7	39	5.6	104.0	6	+5.2
7	Alpha-centractin (Centractin)	<i>Canis familiaris</i>	P61162	42	6.1	96.4	8	-3.3
8	Probable fold bifunctional protein	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Q05213	30	6.0	93.1	9	+4.4
9	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase 2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Q8A765	28	5.8	60.0	7	+3.9
10	Thiazole biosynthesis protein	<i>Aquifex aeolicus</i>	O67926	29	5.7	79.0	5	-2.3

MOWSE<sup>1)</sup>: molecular weight search

The MS spectra of protein digests were compared with the NCBI database using the MS-FIT database-searching program. Protein names have been assigned according to PubMed and Swiss-Prot/TrEMBL. Differentially expressed proteins (ratio 2) that were up-regulated(+) or down-regulated(-) in response to calcium-enriched King oyster mushroom and general King oyster mushroom are listed. Results are means of three independent experiments performed for each condition. The spot numbers are identical to those given in Fig. 2.

dependent protein kinase의 자극을 통해 칼슘은 2차 messenger 기능을 할 수 있다(22).

ATP는 모든 생물의 세포 내 존재하여 에너지대사에 매우 중요한 역할을 한다. ATP 한 분자가 가수분해를 통해 다량의 에너지를 방출하며 이는 생물활동에 사용된다. 칼슘강화 새송이버섯에서 5.2배 함량이 증가한 것으로 확인된 ATP synthase는 미토콘드리아 막 단백질로 알려져 있으며, ADP (Adenosine diphosphate)로부터 ATP를 생성하는 역할을 수행한다. 대부분의 세포내 ATP는 cytosolic glycolysis와 미토콘드리아의 산화적 인산화로부터 유래되며, 그 다음은 미토콘드리아의 ATP synthase에 의한 ATP 합성을 위해서 환원된 cofactor(NADH, FADH<sub>2</sub>)의 산화와 연결된다. 미토콘드리아에서 칼슘의 증가는 미토콘드리아에서 ATP 합성을 증가시켜 미토콘드리아의 대사과정을 활성화시킨다(23).

Glutamate 5-phosphate를 형성하기 위해 glutamate에 인산기가 이동하도록 촉매하는 역할을 수행하는 glutamate 5-kinase는 칼슘강화 새송이버섯에서 함량이 5.2배 증가하는 것으로 확인되었다. Bifunctional protein fold는 칼슘강화 새송이버섯에서 함량이 4.4배 증가하였으며, 5,10-methenyltetrahydrofolate의 산화를 촉매하여 5,10-methylenetetrahydrofolate를 생성시키며, 10-formyltetrahydrofolate에서 5,10-methenyltetrahydrofolate로 가수분해를 촉매하는 역할을 수행하는 단백질로 알려져 있다.

칼슘강화 새송이버섯에서 함량이 3.9배 증가된 phosphoglycerate mutase는 해당작용의 대사과정에 관여하는 효소로 알려져 있으며, 2-phosphoglycerate(2-PGA)와 3-phosphoglycerate(3-PGA)의 상호 전환을 촉매한다(24). 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase(dPGM)는 보조 요소로 2,3-bisphosphoglycerate(2,3-BPGA)을 필요로 한다. dPGM은 bisphosphoglycerate synthase, fructose 2,6-bisphosphatase, pyrophosphatase 그리고 acid phosphatase와 같이 대사작용에 관련된 단백질과 같은 효소 그룹에 속하는 것으로 알려져 있다(25).

칼슘강화 새송이버섯에서 3.3배 함량이 감소한 것으로 확인된  $\alpha$ -centractin는 세포 운동성에 연관된 미세소관(microtubule)을 포함하는 multi-subunit 복합체의 구성요소이다. 그리고 이 단백질은 세포가 분열할 때 중심적인 역할을 하는 세포의 중심체(centrosome)와 관련되어 있다. 칼슘강화 새송이버섯에서 2.3배 함량이 감소

한 thiazole biosynthesis protein은 척추동물과 일부 미생물의 필수 영양소로 알려진 thiamine의 일부분인 thiazole의 합성에 필요한 단백질이다. Thiazole은 pyrimidine heterocycle로 티아민을 구성하며 원핵생물, 균 그리고 식물에서 합성되어진다. 비타민 B1은 대사작용의 중요한 보조 요소로 활동하기 위해 모든 기관에서 필수적인 구성요소이며(26), 식물에서 DNA 손상과 병원균의 공격 반응과도 관련되어져 있다(27,28).

## 요 약

본 연구에서는 프로테오믹스 기술을 활용하여 칼슘함량이 증가된 새송이버섯과 일반 새송이버섯에서 단백질 발현의 변화를 조사하였다. 또한 현저한 차이를 보이는 단백질들을 분리, 동정함으로써 새송이버섯 칼슘강화의 기작규명에 기초자료를 제공하고자 하였다. 새송이버섯의 단백질 패턴을 확인한 결과 15 Kda에서 100 Kda 사이에 존재하는 60% 정도의 spot은 산성 pI를 가지며 나머지 40% 정도의 spot은 염기성 영역에 나타났다. 100 Kda 이상에서는 polypeptide spot이 거의 나타나지 않았다. 그리고 9.0 이상의 pI에서도 spot은 거의 나타나지 않았다. 두 배 이상의 발현변화를 보이는 30여개의 spot들 중 10개의 spot에 대한 단백질 동정을 할 수 있었다. 10개의 확인된 단백질은 8개의 단백질은 발현이 증가하는 것으로 나타났으며 2개의 단백질은 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 동정된 단백질들의 기능을 고찰한 결과 새송이버섯의 칼슘강화기작을 규명하는데 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 문 헌

- Rajaratnam S, Bano Z. *Pleurotus* mushrooms. Part 1 A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. CRC Crit. Rev. Food Sci. 26: 157-223 (1987)
- Jin SK, Kim IS, Kim Dh, Jeong KJ, Moon SS. Effect of *Pleurotus eryngii* and meat particle size on sausage quality. Korean J. Food Sci. Anim. Resour. 26: 343-348 (2006)
- Hwang YJ, Nam HK, Chang MJ, Noh GW, Kim SH. Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. Korean J. Food

- Sci. Nutr. 32: 217-222 (2003)
4. Kang TS, Kang MS, Sung JM, Kang AS, Shon HR, Lee SY. Effect of *Pleurotus eryngii* on the blood glucose and cholesterol in diabetic rats. Korean J. Mycol. 29: 86-90 (2001)
  5. Kawai, H, Sugahara T, Matsuzawa M, Sumiyashiki K, Aoyagi Y, Hosogai Y. Mineral contents in edible mushrooms. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 33: 250-255 (1986)
  6. Kawai H, Sugahara T, Fujishiro S, Matsuzawa M, Aoyagi Y, Hosogai Y. Mineral contents of edible mushrooms growing on wood. Comparison with mineral contents of mushrooms growing in soil. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 37: 468-473 (1990)
  7. Sasaki H, Aoyagi Y, Dasuga A, Tanaka Y, Masuzawa M, Kawai H. Relationships between fruit body compositions and substrates in *bunashimeji* [*Hypsizygus marmoreus* (peck) bigelow], *nameko* [*Pholiota nameko* (J. Ito)] and *enokitake* [*Flammulina velutipes* (Curt: Fr.) Sing.] mushrooms cultivated on sawdust substrate beds. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 42: 471-477 (1995)
  8. Sugahara T, Matsuzawa M, Fujishiro S, Aoyagi Y, Hosogai Y. Mineral contents in edible mushrooms growing in soil. J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 37: 540-546 (1990)
  10. Tham LX, Matsuhashi S, Kume T. Growth and fruit body formulation of *Ganoderma lucidum* on media supplemented with vanadium, selenium and germanium. Mycoscience 40: 87-92 (1999)
  11. Tham LX, Matsuhashi S, Kume T. Responses of *Ganoderma lucidum* to heavy metals. Mycoscience 40: 209-213 (1999)
  12. Yasui A, Tsutsumi C, Takasaki M, Mori T. Absorption of elements from heavy metals containing culture media by oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel.). J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 35: 160-165 (1998)
  13. Tabata T, Ogura T. Absorption of calcium and magnesium by the fruiting body of the cultivated mushroom *Hypsizygus marmoreus* (peck) bigelow from sawdust culture media. J. Food Sci. 68: 76-79 (2003)
  14. Tabata T, Shinohara H. Absorption of calcium salts added culture media by *hiratake* (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel.) and *Nameko* (*Pholiota nameko* J. Ito). J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. 42: 682-686 (1995)
  15. Lee NH, Im MH, Choi UK. Calcium absorption by the fruit body of *saesongi* mushroom. Food Sci. Biotechnol. 15: 308-311 (2006)
  16. Choi UK, Bajpai VK, Lee NH. Influence of calcinated starfish powder on growth, yield, spawn run and primordial germination of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). Food Chem. Toxicol. 47: 2830-2833 (2009)
  17. Perkin-Elmer Corporation. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT, USA (1968)
  18. Liang Y, Chen H, Tang M, Shen S. Proteome analysis of an ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* under salt shock. Mycol. Res. 111: 939-946 (2007)
  19. Shimizu M, Wariishi H. Development of a sample preparation method for fungal proteomics. FEMS Microbiol. Lett. 247: 17-22 (2005)
  20. Jensen ON, Wilm M, Shevchenko A, Mann M. Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. Methods Mol. Biol. 112: 513-530 (1999)
  21. Pappin DJ. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF mass spectrometry. Methods Mol Biol. 64: 165-173 (1997)
  22. Harper JF, Sussman MR, Schaller GE, Putnam-Evans C, Charbonneau H, Harmon AC. A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. Science 252: 951-954 (1991)
  23. Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 13807-13812 (1999)
  24. Galperin MY, Bairoch A, Koonin EV. A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. Protein Sci. 7: 1829-1835 (1998)
  25. Fothergill-Gilmore LA, Watson HC. The phosphoglycerate mutases. Adv. Enzymol. RAMB 62: 227-313 (1989)
  26. Pohl M, Sprenger GA, Miller M. A new perspective on thiamine catalysis. Curr. Opin. Biotech. 15: 335-342 (2004)
  27. Machado CR, de Oliveira RL, Boiteux S, Praekelt UM, Meacock PA, Menck CF. Thi1, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. Plant Mol. Biol. 31: 585-593 (1996)
  28. Ahn IP, Kim S, Lee YH. Vitamin B<sub>1</sub> functions as an activator of plant disease resistance. Plant Physiol. 138: 1505-1515 (2005)