

정공피 추출물의 (1,3) β -Glucan Synthase에 대한 억제효과

유명자 · 김보미 · 이정호¹ · 이영행 · 채규윤* · 백승화^{2*}

원광대학교 자연과학대학 생명나노화학부, 1: 송호대학 자연건강관리과, 2: 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Inhibitory Effect of *Sorbus cortex* Extract on (1,3)- β -Glucan Synthase

Myung Ja You, Bo Mi Kim, Jeong Ho Lee¹, Young Hang Lee, Kyu Yun Chai*, Seung Hwa Baek^{2*}

Division of Nanobiochemistry, College of Natural Sciences, Wonkwang University,

1: Department of Natural Health Management, Songho College,

2: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

A examination of the kinetic properties of UDP-glucose : (1,3)- β -glucan (callose) synthase from mung bean seedlings (*Sorbus cortex*) shows that these enzymes have a complex interaction with UDP-glucose and various effectors. Deoxyojirimycin increased the inhibitory effect of (1,3)- β -glucan synthase at the concentration-dependent manner by fluorescence assay. The inhibitory effect of Fr. 2-16 (97.15%) showed higher than that of deoxyojirimycin (80.63%). Fr. 2-3 inhibited the growth of the *Candida albicans* at 1 mm inhibition zone by disk diffusion method. These results suggest that *Sorbus cortex* extract can be used as a stable antifungal material.

Key words : Kinetic properties, (1,3)- β -glucan (callose) synthase, *Sorbus cortex*, fluorescence assay, inhibitory effect, *Candida albicans*

서 론

*Candida albicans*는 건강한 사람에게는 주로 효모형태로 존재하지만, 면역력 약화된 사람이 환경이 변화되는 경우에는, 균사를 생성하여 병원성(virulence)이 증가되기도 한다^{1,2)}. 칸디다증(candidiasis)에 대한 화학요법 치료에는 polyene 계열의 amphotericin B, azole 계열의 fluconazole, itraconazole, ketoconazole 등이 있으며, 대부분 독성이 있으나 생체 투과율이 낮아 많은 부작용이 수반되고, 항진균 효과에 대한 내성이 빈번하여 치료효과가 낮다^{1,3,4)}. 현재까지 진균세포벽의 조성과 관련된 1,6- β -glucan synthase, 1,3- β -glucan synthase 등이 밝혀져 있다. 특히 1,3- β -glucan은 진균세포벽의 주성분으로서 1,3- β -glucan synthase에 의하여, UDP-glucose로부터 생성되는 D-glucose의 복합체이다. 즉, 진균류의 세포벽은 다당류 또는 당단백질 형태로 존재하는 탄수화물이 주된 구성성분이며, 세포벽의 약 절반가량은 β -glucan 결합으로 연결되어 있다^{1,2,5,6)}. 포유류의 세포에는 1,3- β -glucan synthase와 1,6- β -glucan synthase 등의

성분이 진균류의 세포벽에는 특이적으로 존재하고 있어, 이들의 합성을 저해하고 차단할 수 있는 물질은 인체에 부작용을 일으키지 않고, 진균에만 선택적으로 작용하는 항진균제의 개발 가능성을 시사한다^{1,5,7,8)}.

정공피(*Sorbus cortex*)는 한반도 전역 고산지대에서 자생하는 마가목(*Sorbus commixta*)의 수피를 채취하여 말린 것으로, 한방에서 진해, 거담, 해소, 기관지염, 폐결핵, 수종, 위염, 신체허약 등을 치료하고, 성분은 beturine, lupeol, β -sitosterol, aucuparin, dihydrocinnamic aldehyde, sorbic acid, parasorboside 등이 함유되어 있다⁹⁾. 본 연구에서는 정공피 추출물에 대한 *Candida albicans*의 항진균 효과를 측정하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 시약 및 기기

실험에 사용된 모든 용매는 사용기전에 감압증류기로 증류하여 사용하였으며, 컬럼 크로마토그래피법은 실리카겔 (35-70 μ m silica gel 60, Alltech)와 Optical rotation은 Perkin-Elmer 241 Polarimeter로 측정하였다. Mass, UV와 IR spectra는 Kratos MS-80, Shimadzu UV 240와 Perkin-Elmer 1600 FT-IR

* 교신저자 : 채규윤, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 자연과학대학

백승화, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : shbaek@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6225

· 접수 : 2008/06/09 · 수정 : 2008/07/22 · 채택 : 2008/09/17

Instruments를 사용하였으며, NMR spectra (300 MHz; ¹H, 75 MHz; ¹³C)은 Varian VXR-300 spectrometer로 측정하였다.

2. 추출

정공피를 익산소재 약재상에서 구입하여, 외부 형태를 비교한 후 실험에 사용하였다. 정공피 (1.2 kg)를 메탄올 (5 L)로 추출하여, 0.4 μm 필터로 여과하여 진공증류기로 감압농축시킨 다음, 물에 현탁시켜 n-hexane, 에틸 아세테이트, 부탄올 순으로 계통 분획하여 각각의 분획물을 얻었다. 한 분획물중 ethyl acetate 층 4 g을 silica gel 150 g 로 충전 된 flash column으로 ethyl acetate, methylene chloride, methanol을 이용하여 19개의 fraction으로 분리하였다.

3. Mung bean (1,3)-β-glucan (callose) synthase의 성장, 수확, 제법

Mung bean (*Vigna radiata*) 종자는 시장에서 구입하여, 증류수에 하루동안 담가둔 후, 상온에서 물 포화된 vermiculite을 암실에서 5일 동안 성장시켰다. 모든 실험은 47°C에서 분리하였으며, Hypocotyl은 10 mM hepes/KOH은 1 mM DTT (pH 7.3)로 차가운 상태에서 수확한 후에 무게를 측정하였다. Hypocotyl은 50 mM hepes/KOH은 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 μM leupeptin과 20 mM pefabloc (pH 7.3)를 polytron homogenizer로 균일화한 후, miracloth로 3회 여과하여, 12,000 rpm으로 5분 동안 회전시킨 후에 제거시켰다. 상등액은 100,000 rpm으로 5분 동안 회전시킨 후에 박막으로 여과하여, 50 mM Hepes/KOH (pH 7.3)로 다시 현탁시켰다. 현탁액을 -80°C에서 저장하여, Bio-Rad protein assay kit로 단백질의 함량을 측정하였다^{10,11}.

4. Mung bean (1,3)-β-glucan synthases의 측정법

Flat-bottomed 96-well microtiter의 50 mL로 표준 검량선법과 효소를 측정하였다. 50 mM Hepes/KOH, pH 7.3, 0.01% digitonin, 1 mM CaCl₂, 10 mM cellobiose, 0.4 mM UDP-Glc과 2.5 mg of membrane protein를 포함한 mung bean enzyme은 상온에서 30분동안 세균을 배양한 후, 6 N NaOH용액 (10 mL)을 첨가하였다. 얻어진 glucan은 0.1% aniline blue 수용액 (40 mL), 1 N HCl (21 mL), 1 M glycine/NaOH buffer (59 mL), aniline blue (pH 9.5)이 혼합물 (210 mL)로 만들어, vortex로 회전시킨 후, 50°C에서 30분간 동안 세포배양한 후, aniline blue과 fluorochrome와 탈색 반응하도록, 30분간 반응시킨다. Fluorescence 정량은 fluorescence plate reader로 흡광과장 (400 nm)와 방출과장 (460 nm)에서 측정한다¹⁰⁻¹².

5. 탁도 측정

*Candida albicans*를 PDB 1.5%가 포함된 액체배지에 접종하고, 37°C의 배양기에 12시간 진탕 배양한 균주를 일정량 접종하고, 시료를 각각 500, 300, 200, 100, 50 mg/mL 농도로 첨가한 후, 48시간 동안 배양하였다. 배양된 균주는 ELISA reader로 파장 620 nm 에서 흡광도를 측정하여, 배지의 탁도를 확인하였고, 순수 배양액의 흡광도 값과 대조하여 MIC를 결정하였으며, MIC

수치가 낮은 것을 항균효과가 높은 것으로 판단하였다¹⁷.

6. Fluorescence 측정

*Candida albicans*를 PDB 1.5%가 포함된 액체배지에 접종하고, 37°C의 배양기에 12시간 진탕 배양한 균주를 일정량 접종하고, 시료를 각각 500, 300, 200, 100, 50 mg/mL 농도로 첨가한 후, 48시간 동안 배양하였다. 배양된 균주에 6N NaOH를 넣고 30분간 배양시킨 다음, aniline blue (0.1% aniline blue 수용액: 1 N HCl : 1 M glycine/NaOH buffer (pH 9.5)-40 : 21 : 59)를 넣고, 30분간 배양한 다음 실온에 30분간 방치한 후 fluorescence로 측정하였다 (Excitation wavelength; 400 nm/slit width 30. emission wavelength; 460 nm/slit width 40)^{10,12}.

7. 고체배지

*Candida albicans*의 고체배지를 이용한 항진균 효과를 측정하기 위하여, 디스크 확산법을 사용하였다. PDB가 포함된 agar를 멸균시킨 후 완전히 굳힌 다음, 37°C에서 12시간 배양기에 배양된 *Candida albicans*가 10⁵ CFU/mL를 접종하였다. 2시간 후 시료가 200 μg 흡수된 filter paper disk를 올려놓고, 37°C에서 48시간 배양 한 후, *Candida albicans*에 대한 발육 저지능으로서 나타나는 clear zone 유무를 확인하여, 항균력을 판정하였다. 발육 저지환은 모두 mm까지 측정하여 판정하였다^{13,14}.

성 적

1. Deoxynojirimycin의 효소활성 억제 효과

UDP-glucose를 기질로 사용하는 fluorescence assay 방법을 기초하여, deoxynojiri -mycin이 1,3-β-glucan synthase에 대한 활성을 측정할 결과, deoxynojirimycin의 농도가 증가함에 따라, 1,3-β-glucan synthase활성의 저해율이 감소하였으며, 1,3-β-glucan synthase에 대한 deoxynojirimycin의 활성은 IC₅₀ 1.47 mg/mL로 관찰할 수가 있었다(Table 1)^{1,10,12,15}.

Table 1. Inhibition effect of deoxynojirimycine on (1,3)-β-glucan synthase.

Concentration (μg/mL)	Inhibition (%)
0	100.00
100	93.41
150	88.63
250	83.76
500	81.23
1,000	68.34
1,500	47.23
2,000	33.54

2. 정공피 추출물의 효소활성에 미치는 효과

표준물질인 deoxynojirimycin과 정공피 추출물을 1 mg/mL 동일한 농도로 처리한 후, 효소의 저해율을 비교하여 항진균 효과를 비교한 결과, 표준물질인 deoxynojirimycin은 80.63 %의 저해율을 보였으며, 정공피 메탄올 추출물에서는 69.70 %의 저해율이 관찰되었다. 에틸 아세테이트 분획물 (Fr. 2)에서는 표준물질

의 저해율보다 낮은 68.23 %의 활성을 관찰할 수가 있었으나, Fr. 1, 3과 4의 저해율은 약 75%의 비슷한 활성이 나타났다. Fr. 2를 컴컴 크로마토그래피법으로 분획한 분획물의 경우에서는 Fr. 2-1 (100% methylene chloride)으로부터 ethyl acetate를 10%씩 증가 시켜서, Fr. 2-7 (methylene chloride : ethyl acetate = 40 : 60)까지는 63.4 - 79.6% 범위의 저해율이 나타났으며, Fr. 2-3 (methylene chloride : ethyl acetate = 80 : 20)의 이동상에서 flavonoid의 특성 피크에 기인된 것으로, 63.4%의 가장 높은 저해율이 관찰되었다. Fr. 2-8 (methylene chloride : ethyl acetate = 30 : 70)으로부터 ethyl acetate를 10%씩 증가 시켜서, Fr. 2-11 (100% ethyl acetate)로 이동상으로 이루어졌으며, Fr. 2-12 (ethyl acetate : methanol = 90 : 10)으로부터 메탄올을 10%씩 증가 시켜서, Fr. 2-19 (ethyl acetate : methanol = 20 : 80)으로 이동상이 구성되어, 저해율이 보다 낮은 85.6 - 97.2% 범위의 저해율이 관찰되었다. 그러나 에틸 아세테이트 분획물 (Fr. 2)에서 가장 낮은 저해율 (97.2%)은 Fr. 2-16 (ethyl acetate : methanol = 50 : 50) 50%의 이동상비율로 혼합하였을 때에, Fr. 2-3의 활성보다 약 1.5배 정도로 낮은 활성이 측정된 것은, 이동상의 극성에 기인하는 것으로 생각된다(Table 2)^{1,10,12}.

Table 2. Inhibition effects of *Sorbus commixta* extracts (1 mg/mL) on (1,3)-β-glucan synthase

Sample	Inhibition (%)	Sample	Inhibition (%)
		Fr. 2-7	79.64
Standard compound	Deoxynojirimycin	Fr. 2-8	85.58
Extract	MeOH	Fr. 2-9	87.64
Solvent fraction	Fr. 1	Fr. 2-10	94.89
	Fr. 2	Fr. 2-11	93.54
	Fr. 3	Fr. 2-12	94.25
	Fr. 4	Fr. 2-13	92.15
Column fraction	Fr. 2-1	Fr. 2-14	94.49
	Fr. 2-2	Fr. 2-15	96.48
	Fr. 2-3	Fr. 2-16	97.15
	Fr. 2-4	Fr. 2-17	89.25
	Fr. 2-5	Fr. 2-18	94.25
	Fr. 2-6	Fr. 2-19	91.25

3. 액체배지에 의한 항진균 측정

타도 측정에 의한 *Candida albicans*의 항진균 효과는 정공피 추출물과 분획물을 농도별로 처리한 후 흡광도를 분석한 결과, 정공피 메탄올 추출물과 분획물의 처리농도가 증가할수록 항진균 효과도 증가하였으며, 에틸아세테이트 분획물 (Fr. 2)과 Fr. 2-3 (methylene chloride : ethyl acetate = 80 : 20)에서 항진균 효과가 높게 나타났지만, 표준물질인 ampicillin의 항진균 효과보다는 낮게 관찰되었다. 정공피 메탄올 추출물에 의한 비교적 극성용매로 분획한 부탄올 분획물 (Fr. 3; 500 mg/mL)에서, *Candida albicans*의 항진균 효과는 낮은 흡광도 (0.625)가 측정되었으나, 에틸 아세테이트 분획물 (Fr. 2)의 Fr. 2-15 (ethyl acetate : methanol = 60 : 40)에서는 가장 낮은 흡광도 (0.067)가 관찰되었다(Table 3). 정공피 메탄올 추출물과 분획에 대한 *Candida albicans*의 fluorescence도 농도증가에 의존적으로 흡광도가 감소되어 관찰되었으며, 부탄올 분획물 (500 mg/mL Fr. 3)에서

*Candida albicans*의 Fluorescence가 낮은 측정값 (128.08)으로 관찰되었으나, 에틸 아세테이트 분획물 (Fr. 2)의 500 mg/mL Fr. 2-13 (ethyl acetate : methanol = 80 : 20)에서는 가장 낮은 Fluorescence의 측정값 (39.52)으로 관찰된 것은, 혼합용매로 사용된 이동상의 상승작용 효과에 기인된 것으로 사료된다(Table 4).

Table 3. Absorbance of *Candida albicans* in various concentrations of *Sorbus commixta* extract.

Sample	Concentration (mg/mL)				Sample	Concentration (mg/mL)			
	100	200	300	500		100	200	300	500
MeOH	0.987	0.895	0.842	0.823	Fr. 2-9	0.985	0.895	0.845	0.863
Fr. 1	1.213	1.158	1.095	0.973	Fr. 2-10	0.856	0.849	0.812	0.804
Fr. 2	0.945	0.917	0.743	0.657	Fr. 2-11	0.957	0.923	0.912	0.905
Fr. 3	0.801	0.730	0.667	0.625	Fr. 2-12	0.845	0.835	0.831	0.829
Fr. 4	0.953	0.923	0.918	0.895	Fr. 2-13	1.058	1.007	0.995	0.966
Fr. 2-1	0.842	0.837	0.824	0.801	Fr. 2-14	1.141	1.098	1.050	0.932
Fr. 2-2	1.012	1.002	0.983	0.912	Fr. 2-15	0.783	0.679	0.391	0.067
Fr. 2-3	0.985	0.926	0.845	0.756	Fr. 2-16	0.954	0.874	0.847	0.834
Fr. 2-4	0.824	0.812	0.789	0.756	Fr. 2-17	1.037	1.005	1.002	0.594
Fr. 2-5	1.023	1.021	0.985	0.879	Fr. 2-18	0.985	0.958	0.945	0.932
Fr. 2-6	1.125	1.089	1.045	1.005	Fr. 2-19	1.136	1.103	1.003	1.080
Fr. 2-7	0.891	0.845	0.824	0.816	Ampicillin	0.603	0.340	0.246	0.130
Fr. 2-8	1.123	1.089	1.075	1.071					

Table 4. Fluorescence of *Candida albicans* in various concentrations of *Sorbus commixta* extract.

Sample	Concentration (mg/mL)				Sample	Concentration (mg/mL)			
	100	200	300	500		100	200	300	500
MeOH	195.68	188.73	182.36	178.89	Fr. 2-9	179.23	155.48	144.26	131.23
Fr. 1	210.31	175.30	172.94	165.25	Fr. 2-10	186.45	182.34	180.42	177.52
Fr. 2	184.26	183.68	172.75	145.29	Fr. 2-11	187.45	164.26	161.23	160.72
Fr. 3	154.88	136.75	130.43	128.08	Fr. 2-12	156.45	152.92	131.26	122.42
Fr. 4	165.23	162.78	161.92	158.45	Fr. 2-13	130.93	113.46	103.17	39.52
Fr. 2-1	145.25	142.26	141.37	139.84	Fr. 2-14	149.40	149.17	105.90	96.95
Fr. 2-2	168.23	154.23	140.26	132.45	Fr. 2-15	128.84	117.53	109.93	106.19
Fr. 2-3	158.45	153.24	152.62	147.21	Fr. 2-16	149.21	133.74	115.60	112.81
Fr. 2-4	169.26	155.56	142.81	131.36	Fr. 2-17	117.89	89.47	61.76	52.98
Fr. 2-5	153.45	151.26	150.26	149.62	Fr. 2-18	125.45	128.46	111.45	102.45
Fr. 2-6	178.45	172.95	168.45	157.26	Fr. 2-19	167.48	158.09	142.52	142.40
Fr. 2-7	189.45	175.65	172.45	170.25	Ampicillin	63.526	55.167	54.121	52.110
Fr. 2-8	167.45	152.45	140.75	136.70					

4. 여지 디스크 확산법에 의한 항진균 효과

여지 디스크 확산법에 의한 항진균 효과를 측정하기 위하여, 항진균제로 쓰이는 ampicillin을 표준물질로 사용하였고, 정공피 추출물을 paper disk plate를 이용하여 항진균 효과를 측정 한 결과, 정공피 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물과 Fr. 2-2, Fr. 2-4, Fr. 2-11에서 0.5 mm 저지환이 나타났으며, Fr. 2-3 (methylene chloride : ethyl acetate = 80 : 20)의 이동상에서 1.0 mm의 저지환이 나타난 것은 flavonoid에 기인한 것으로 생각되나, ampicillin에서 측정된 2.5 mm의 저지환보다 낮은 활성이 관찰되었다(Table 5 & Fig. 1)^{13,14,16}.

Candida albicans 세포벽의 주성분인 1,3-β-glucan synthase에 대한 활성 측정결과, 표준물질인 deoxynojirimycin의 농도가 증가함에 따라 1,3-β-glucan synthase활성에 대한 저해율이 증가하였으며, deoxynojirimycin과 정공피 메탄올 추출물을 1 mg/mL로 처리한 결과 deoxynojirimycin은 80.63 %로 우수한 저해율을

보였다^{2,6,7}. 여지 디스크 확산법에 의한 항진균 활성은 현재 항진균 치료제로 쓰이고 있는 ampicillin에서는 2.5 mm의 저지환이 나타났다^{7,13}.

Table 5. Antifungal activity of *Sorbus commixta* extract against *Candida albicans*.

Sample	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)	Sample	Concentration (mg/mL)	Inhibition (%)
MeOH	1.0	+	Fr 2-10	1.0	-
Fr. 1	1.0	-	Fr. 2-11	1.0	+
Fr. 2	1.0	+	Fr. 2-12	1.0	-
Fr. 3	1.0	+	Fr. 2-13	1.0	-
Fr. 4	1.0	-	Fr. 2-14	1.0	-
Fr. 2-1	1.0	-	Fr. 2-15	1.0	-
Fr. 2-2	1.0	+	Fr. 2-16	1.0	-
Fr. 2-3	1.0	++	Fr. 2-17	1.0	-
Fr. 2-4	1.0	+	Fr. 2-18	1.0	-
Fr. 2-5	1.0	-	Fr. 2-19	1.0	-
Fr. 2-6	1.0	-	Ampicillin	1.0	+++
Fr. 2-7	1.0	-		0.5	++
Fr. 2-8	1.0	+		0.25	++
Fr. 2-9	1.0	-			

Positive control (+) : 0 - 0.5 mm +, 0.5 - 2 mm ++, 2 - 4 mm +++, Negative control (-)

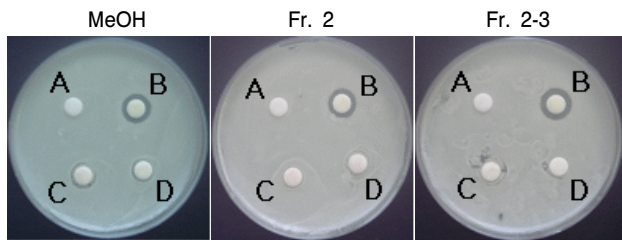


Fig. 1. Inhibition zone of ampicillin and *Sorbus cortex* extract on *Candida albicans*. A: 0 mg/disc (control) B: Ampicillin 200 µg/disc C: Sample 200 µg/disc D: Sample 100 µg/disc.

고찰

진균에 의한 감염은 피부 및 머리카락 등에 감염되는 superficial infection과 생명까지도 위협하는 전신감염 (systemic infection) 등이 있다. 특히 최근 생명을 위협하는 진균감염의 발생빈도는 급격히 증가하고 있다. 20여년전 단지 배양과정에서 오염될 수 있는 종(culture contaminants)으로 간주되던 *Candida* 균의 경우 90년대 이후 중요한 병원균으로 인식되고 있다. 미국의 National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS)에 참여한 병원들을 대상으로 실시된 1991년 조사에 의하면 candidemia 증의 발생빈도가 80년대에 비하여 75-87% 증가한 것으로 보고된바 있으며 이러한 추세는 계속 증가하고 있다^{17,18}. 또한 최근의 한 연구 결과에 의하면, 장기이식 수술후의 빈번한 진균감염 발생이 보고되고 있다(신장이식: 5%, 폐 및 심장: 15 ~ 30 %, 간: 40% 이상)¹⁹. 특히 인체에 치명적인 감염은 주로 기회 감염 진균 (opportunistic fungi)에 의한 것으로서, 정상적인 개체에서는 병을 일으키지 못하지만, 방어기전에 이상이 생기는 경우 발병소인이 있는 숙주에 병을 일으킨다. 이러한 심각한 진균감염에 의한 발병 증가추세는 주로 다음의 여러 가지 원인에 의한 것으로 현

재 추정하고 있다^{20,21}. 첫째 ADIS, 암 치료등을 위한 화학요법, 또는 장기이식술에 사용되는 면역억제제의 사용 등에 기인한 면역기능이 약화된 환자수의 증가, 둘째 의료기술의 발달에 따른 수술 및 보다 공격적인 치료법 (다양한 의료기구의 인체내 사용 등)의 사용 빈도 증가, 셋째 다양한 항생제의 사용, 넷째 인구의 고령화에 따른 면역력이 약화된 인구의 상대적인 증가, 인간의 생명을 위협하는 진균감염은 다양한 진균류 (*Candida spp*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* 및 *Pneumocystis carinii* 등)가 관계되어 있으며, 그 중에서도 특히 *Candida albicans* (칸디다증)와 *Aspergillus fumigatus* (아스페르길루스증)에 의한 감염이 가장 빈번하고 심각한 것으로 보고되고 있다²². *Candida* 종은 혈관 내 감염을 유발하는 주된 원인진균이며, *Aspergillus*종은 급성 백혈병 환자 (acute leukemia), 골수 (bone marrow) 혹은 /조혈간세포 (hematopoietic stem cell) 이식 환자에게서 빈번히 발생하는 폐렴성 사망의 주된 원인균으로 알려져 있다²².

일반적으로 진균 세포벽의 화학성분은 균류의 그것과는 차이가 있다. 예를 들면, 균 세포 벽 형성의 저해제 (inhibitor)로 알려져 있는 β -lactam이나 vancomycin 등은 진균 세포벽에는 아무런 영향도 미치지 못한다. 진균 세포벽은 그 중에 따라서 차이는 있으나, 다당류 (80%), 단백질(3-20%), 지질과 그 외의 미량물질로 이루어져있다. 현재까지 세포벽의 조성파 관련된 효소는 chitin synthase, (1,6) β -glucan synthase 및 (1,3) β -glucan synthase 등이 밝혀져 있다. 특히 (1,3) β -glucan은 세포벽의 주성분으로서 (1,3) β -glucan synthase에 의하여 UDP-glucose로부터 생성되는 D-glucose의 복합체이다. (1,3) β -glucan synthase는 plasma membrane에 위치하고 있으며, 여러 가지의 연구결과에 의하면 (1,3) β -glucan synthase의 활성은 진균 세포벽의 형성 및 성장에 필수적이며 (1,3) β -glucan synthase 농도의 저하는 세포벽이나 세포형상의 이상을 유발시킨다고 알려져 있다^{23,24}. 포유류의 세포는 위에서 언급된 chitin synthase, (1,6) β -glucan synthase 및 (1,3) β -glucan synthase 등 진균류의 세포벽에 존재하는 효소를 가지고 있지 않기 때문에 위의 효소들을 효과적으로 차단할 수 있는 물질은 인체에는 부작용이 없이 진균류에만 선택적으로 작용하는 항진균 약물로의 개발 가능성이 크다고 판단된다. 특히 현재 임상에서 사용되는 항진균 치료제 중 이러한 작용기전에 근거한 약물은 아직 알려져 있지 않다. 따라서 진균세포벽의 형성 및 성장에 필수적인 (1,3) β -glucan synthase의 차단효과를 확인할 수 있는 생리활성 측정 방법에 근거하여 (1,3) β -glucan synthase에 선택적으로 작용하는 항진균 효과를 지닌 천연물의 개발은 중요하다고 사료된다. 본 연구에서는 문헌조사를 기초로 하여 항진균 효과가 있을 것으로 예상되는 한약재를 선정하고, 특히 (1,3) β -glucan synthase 차단효과를 중심으로 항진균성 천연물질을 탐색함으로써 궁극적으로 새로운 작용기전에 근거한 효과적이며 안전한 항진균제의 개발에 기여하고자 한다. 문헌조사에 의하면 국내의 한약재^{25,26}나 자생 버섯류²⁷에 대한 기존의 항진균 활성 검색법을 이용한 항진균 활성에 관한 검색 연구가 이루어진 바 있으나 진균세포벽의 작용과 연관된 활성검

색에 대한 연구는 현재까지 보고된 바 없다. 국외의 연구동향은 진균감염에 대한 빈도수의 증가와 사용 가능한 치료제의 제한에 따라서 미국의 Merck 나 Eli Lilly 제약회사를 비롯한 많은 연구진들이 최근 안전하고 효과적인 항진균제의 개발의 일환으로 진균세포벽에 작용하는 물질의 개발에 투자하고 있다.^{5,28,29)} 현재까지의 문헌 조사에 의하면 (1,3) β -glucan synthase에 작용하는 작용기전을 지닌 물질은 lipopeptides와 papulacandins로 명명되는 수종의 화합물만이 알려져 있으며, 최근 이들과는 다른 terpenoids형의 화합물이 (1,3) β -glucan synthase의 활성을 저해하는 새로운 형태의 화합물로 보고된 바 있다⁹⁾. 특히 이들 중 lipopeptides에 속하는 MK991, FK463 및 LY303366 등이 임상실험단계에 있다. 지금까지 알려진 (1,3) β -glucan synthase에 작용하는 대부분의 항진균 물질은 미생물로부터 유래된 물질이며 그 종류도 다양한 형태의 2차 대사물질이 존재함에 반하여 3가지 형태의 화합물류 만이 보고되고 있다. 또한 radio activity assay를 이용한 미생물 유래의 추출물에 대한 (1,3) β -glucan synthase 활성 검색 연구는 보고된 바^{28,30)} 있으나, 식물 유래의 추출물에 대한 (1,3) β -glucan synthase assay를 이용한 생물학적 활성검색은 아직 보고된 바 없다. 따라서 다양한 2차 대사물질들이 항진균성 물질로 알려져 있으므로 이들 중 (1,3) β -glucan synthase에 작용하는 물질이 규명될 가능성도 클 것으로 예상된다.³¹⁾ (1,3) β -Glucan synthase를 이용한 enzyme assay는 UDP-[27C]glucose를 기질로 사용하는 radio activity assay 방법이 주로 사용되어 왔다. 특히 Selitrennikoff 등은 이러한 방법을 이용하여 HTS (High Throughput Screening)에 적합한 assay법을 보고한 바 있다.^{30,32)} 또한 radio activity한 UDP-[27C]glucose대신 UDP-glucose를 기질로 사용하여 형성된 fluorescent complex의 양을 fluorescence plate reader를 이용하여 측정하는 방법이 알려져 있다³³⁾. 일반적으로 UDP-[27C]glucose를 기질로 사용하는 Selitrennikoff 등이 제안한 radio activity assay 방법의 경우는 fluorescence reader를 이용하여 측정하는 방법에 비하여 그 비용이 많이 드는 단점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 안전하고 경제적인 UDP-glucose를 기질로 사용하는 fluorescence assay 방법 토대로 하여 항진균 작용을 가질 것으로 예상되는 한약재의 유기용매 추출물의 생리활성을 검정하였다.

결 론

정공피 메탄올 추출물을 *Candida albicans*에 대한 항진균 효과의 측정결과는, UDP-glucose를 기질로 사용하는 fluorescence assay법에서는 deoxyojirimycin의 농도가 증가함에 따라, 1,3- β -glucan synthase 활성의 저해율이 증가하였다. Fr. 2-16에서 측정된 97.15 %의 저해율은 deoxyojirimycin의 저해율 80.63%보다 높은 활성이 관찰되었다. 디스크 확산법에 의한 활성은 Fr. 2-3에서 1.0 mm의 저지환이 나타났고, 액체 배지법에 의한 활성 측정에서도 우수한 항진균효과를 보여주었다. 이러한 실험 결과는 정공피를 이용하여 안전한 항진균제 개발에 활용될 수 있으리라 사료되며, 지속적인 항진균물질의 분리 및 분석을 진행하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행되었고 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Chun, H.J., Kim, Y.S., Lee, Y.H., Kwak, G.B., Kwon, S.Y., Kwon, T.O., Chai, G.Y. Screening of antifungal natural products with inhibitory effects on (1,3) β -glucan synthase. *Kor. J. Orien. Physiol. Pathol.* 17(6):1509-1513, 2003.
2. Park, J.H., Kang, M.S., Kim, H.L., Chung, K.H., Moon, W.K. Study on immuno-stimulating activity of β -glucan isolated from the cell wall of yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 35(3):488-492, 2003.
3. Brayman, T.G., Wilks, J.W. Sensitive assay for antifungal activity of glucan synthase inhibitors that uses germ tube formation in *Candida albicans* as an end point. *Am. Soc. Microbiol.* 47(10):3305-3310, 2003.
4. Jang, S.Y., Yu, S.Y., Kim, S.D. Antifungal activity of plant extracts against *Pityrosporum ovale* and *Candida albicans*. *Kor. J. Pharmacogn.* 34(4):303-307, 2003.
5. Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A., Kong, L., Cabello, A., Vicente, F., Pelaez, F., Diez, M. T., Martin, I., Bills, G., Giacobbe, R., Dombrowski, A., Schwartz, R., Morris, S., Harris, G., Tsiouras, A., Wilson, K., Kurtz, M.B. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 368-377, 2000.
6. Urbina, J.M., Cortes, J.C., Palma, A., Lopez, S.N., Zacchino, S.A., Enriz, R.D., Ribas, J.C., Kouznetzov, V.V. Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-aryl-4-N-arylamine-1-butenes and related compounds with inhibitory activities on beta(1-3) glucan and chitin synthases. *Bioorg. Med. Chem.* 8: 691-698, 2000.
7. Lee, G.D., Ha, T.J., Han, H.S., Jang, G.C., Jang, D.S. Jo, D.L., Yang, M.S. Antimicrobial activities of sesquiterpene lactones isolated from the flower of *Chrysanthemum coronarium* L. J. *Kor. Soc. Appl. Chem. Biotechnol.* 46(3):235-239, 2003.
8. Song, H.S., Moon, K.Y. *In vitro* antioxidant activity profiles of β -glucans isolated from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Food Soc. Biotechnol.* 15(3):437-440, 2006.
9. Lee, S.M., Lee, C.G. Isolation and gas chromatographic analysis of lupenone and lupeol from *Sorbus cortex*. *Anal. Sci. Technol.* 12(2):136-140, 1999.

10. Hayashi, T., Read, S.M., Bussell, J., Thslen, M., Lin, F.C., Brown, J., Delmer, D.P. UDP-Glucose: (1,3)-beta-glucan synthases from mung bean and cotton, *Plant Physiol.* 83(4):1054-1062, 1987.
11. Thelen, M.P., Delmer, D.P. Gel-electrophoretic separation, detection, and characterization of plant and bacterial UDP-glucose glucosyltransferases. *Plant Physiol.* 81(3):913-918, 1986.
12. Shedletzky, E., Unger, C., Delmer, D.P. A microtiter-based fluorescence assay for (1,3)-beta-glucan synthases. *Anal. Biochem.* 249(1):88-93, 1997.
13. Kim, Y.H., Lee, H.S. Antibacterial effects of oriental herb extract against *Gardnerella vaginalis*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34(1):70-73, 2006.
14. Chun, S.C. Jee, S.Y., Lee, S.K. The antimicrobial activity of Naesohwangryuntang and its composition oriental medicines. *Kor. J. Herbol.* 19(4):51-60, 2004.
15. Inoue, S.B., Qadota, H., Arisawa, M., Anraku, Y., Watanabe, T., Ohya, Y. Signaling toward yeast 1,3- β -glucan synthesis, *Cell Struct. Func.* 21: 395-402, 1996.
16. Kang, T.S., Jeong, H.S., Park, H.J., Lee, M.Y., Kong, Y.J., Jung, I.S. Biological activities of oat soluble β -glucans. *Kor. J. Food Preserv.* 10: 547-553, 2003.
17. Rex, J.H., Rinaldi, M.G., Pfaller, M.A. Resistance of *Candida species* to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1-8, 1995.
18. Klepser, M.E., Ernst, E.J., Pfaller, M.A. Update on antifungal resistance. *Trends in Microbiology* 5: 372-375, 1997.
19. Alexander, B.D., Perfect, J.R. Antifungal resistance trends towards the year 2000-Implications for therapy and new approaches. *Drugs* 54: 657-678, 1997.
20. Selitrennikoff, C.P. Fungal infections. In *Antifungal drugs: (1,3) β -glucan synthase inhibitors*, Springer-Verlag: Heidelberg, pp 1-12, 1995.
21. Georgopapadakou, N.H., Tkacz, J.S. The fungal cell wall as a drug target. *Trends in Microbiology* 3: 98-104, 1995.
22. Walsh, T.J., Vivian, M.A., Arathoon, E., Chiou, C., Ghannoum, M., Groll, A.H., Odds, F.C. New targets and delivery systems for antifungal therapy. *Medical Mycology* 38, Suppl. 1: 335-347, 2000.
23. Debono, M., Gordee, R.S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 471-497, 1994.
24. Frost, D.J., Brandt, K., Capobianco, J., Goldman, R. Characterization of (1,3)- β -glucan synthase in *Candida albicans*: microsomal assay from the yeast or mycelial morphological forms and a permeabilized whole-cell assay. *Microbiology* 140: 2239-2246, 1994.
25. Krishnaeao, T.V., Galgiani, J.H. Comparison of the *in vitro* activities of the echinocandin LY303366, the pneumocandin MK-0991, and fluconazole against *Candida species* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1957-1960, 1997.
26. Tawara, S., Ikeda, F., Maki, K., Morishita, Y., Otomo, K., Teratani, N., Goto, T., Tomishima, M., Ohki, H., Yamada, A., Kawabata, K., Takasugi, H., Sakane, K., Tanaka, H., Matsumoto, F., Kuwahara, S. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 57-62, 2000.
27. 민병선, 방규호, 이준성, 배기환. *Candida* 와 *Penicillium* 속 진균에 대한 천연물의 항진균 효과 검색. *약학회지* 40: 582-590, 1996.
28. 방규호, 이영하, 민병선. 계피로부터 항진균물질 AF-001의 분리, 정제 및 특성. *대한균주학회지* 25: 348-353, 1997.
29. 민지영, 김은미, 민태진. 버섯중 항균활성물질의 개발-버섯중의 식물병원성 곰팡이에 대한 항균활성 물질 검색. *대한균주학회지* 25: 354-361, 1997.
30. Wood, R.L., Miller, T.K., Wright, A., McCarthy, P., Taft, C. S., Pomponi, S., Selitrennikoff, C.P. Characterization and optimization of In Vitro assay condition for (1,3)- β -glucan synthase activity from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* for enzyme inhibition screening. *J. antibiot.* 51: 665-675, 1998.
31. Ohyama, T., Kurihara, Y., Ono, Y., Ishikawa, T., Miyakoshi, S., Hamano, K., Arai, M., Suzuki, T., Igari, H., Suzuki, Y., Inukai, M. Arborcandins A, B, C, D, E and F, Novel (1,3) β -glucan synthase inhibitors: production and biological activity. *J. Antibiot.* 53: 1108-1116, 2000.
32. Taft, C.S., Enderlin, C.S., Selitrennikoff, C.P. A high throughput *in vitro* assay for fungal (1,3) β -glucan synthase inhibitors. *J. Antibiot.* 47: 1001-1009, 1994.
33. Shedletzky, E., Unger, C., Delmer, D.P. A microtiter-based fluorescence assay for (1,3) β -glucan synthases. *Anal. Biochem.* 249: 88-93, 1997.