

(1,3)β-Glucansynthase 효소 억제 활성을 가진 천연물의 검색

천현자¹ · 김영순¹ · 이영행¹ · 광규범² · 권석용³ · 권태오³ · 채규윤^{1,3*}

1: 원광대학교 자연과학대학 화학과, 2: 전북대학교 신소재 공학부, 3: 원광대학교 의약자원연구센터

Screening of Antifungal Natural Products with Inhibitory Effects on (1,3)β-glucan Synthase

Hyun Ja Chun¹, Young Sun Kim¹, Young Hang Lee¹, Geu Byum Kwak²,
Suk young kwon³, Tae Oh Kwon³, Geu Yun Chai^{1,3*}

1: Department of Chemistry, Wonkwang University, 2: advanced materials Chonbuk National University,
3: Medicinal Resources Research Center of Wonkwang University

Antifungal activities of the extracts from 26 medicinal plants were investigated utilizing paper-disk diffusion method and (1,3)β-glucan synthase inhibitory assay. (1,3)β-glucan synthase is considered as valuable target in the development of antifungal agents. Among the screened extracts, the ethyl acetate extract of *Equisetum arvense*, the ethyl acetate extract of *Polygonum aviculare*, the butanol extract of *Crataegus pinnatifida* and the n-hexane extract of *Saussurea lappa* showed significant antifungal activities on *Candida albicans* in both disk diffusion and enzyme assays.

Key words : (1,3)β-glucan synthase, *Candida albicans*, Antifungal activity

서론

진균에 의한 감염은 피부 및 머리카락 등에 감염되는 표피감염(superficial infection) 및 생명까지도 위협하는 전신감염(systemic infection) 등이 있으며 특히 *Candida albicans* 와 *Aspergillus fumigatus* 에 의한 감염이 가장 빈번하고 심각한 것으로 보고되고 있다¹⁻⁴. 진균감염에 의한 질병의 발생 빈도가 증가하는데 반하여 사용 가능한 효과적인 치료약물은 극히 제한되어 있고, 사용가능한 치료제가 가지는 부작용이 있는 점에 비추어 새로운 형태의 효과적인 항진균 물질의 개발은 매우 중요하다고 인식된다.^{2,5} 진균세포의 세포벽을 이루는 물질중 키틴과 베타글루칸은 진균에 특이적으로 존재하는 세포구성물질이며 특히 (1,3)β-glucan은 세포벽의 주성분으로서 (1,3)β-glucan synthase에 의하여 UDP-glucose로부터 생성되는 D-glucose의 복합체이다.⁶ 이들의 합성이 저해될 경우 진균의 성장을 선택적으로 방해할 수 있어 신규 항생물질 탐색의 좋은 대상으로 인식되고 있다. 포유류의 세포는 위에서 언급된 (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 부작용이 없는 항진균제의 개발 가능성이 크다고 판단된다.^{6,7} 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.^{8,9} 본 연구에서는 문헌조사를 기초로 하여 항진균 효과가 있을 것으로 예상되는 한약재를 선정하여 (1,3)β-glucan synthase 차단효과를 중심으로 항진균성 천연물질을 탐색함으로써 궁극적으로 새로운 작용기전에 근거한 효과적이며 안전한 항진균제의 개발 가능성을 탐색하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료의 선정 및 분획, 정제

다양한 문헌 조사에 의하여 항진균 효과를 지닐 것으로 예상되는 전통 약용식물 27종을 우선 선정하였다(Table 1). 선정된 식물들은 n-hexane, ethyl acetate, butanol의 연속적인 solvent partitioning 방법에 의하여 3개의 추출물을 얻었다.¹¹⁾

* 교신저자 : 채규윤, 전북 익산시 신동동 344-2, 원광대학교 자연과학대학
· E-mail : geuyoon@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6230
· 접수 : 2003/10/06 · 수정 : 2003/10/31 · 채택 : 2003/11/20

2. 사용균주 및 균주의 배양

Enzyme assay-사용된 균주로는 *Candida albicans*을 사용하였고 균주배양에는 PDB 2.4g에 H₂O 100ml를 넣어 녹인 후 *Candida albicans*을 넣고 Mid-log상태까지 배양하였다. 배양한 균주를 원심분리기를 이용하여 세포분리 한후 Glass beads를 사용하여 세포를 분쇄한 후 3-5분간 냉각하여 다시 원심분리 후 여액을 고속으로 원심 분리하여 얻어진 membrane pellet를 33% glycerol을 함유한 용액에 녹여 보관하였다.

위에서 얻어진 단백질 혼합물 (100 µg)를 50mM Tris/HCl, PH 7.5, 20µM GTP, 4mM EDTA, 0.5% Brij 35, 6.6% glycerol, 2mM UDP-Glc, 1mg/ml 농도의 천연물과 혼합한 후 25°C에서 30분간 방치한 후 10µl의 NaOH로 반응을 정지시킨다. 생성된 glucan을 80°C에서 30분간 용해한 후 0.210ml의 analine blue 혼합액을 첨가한 다음 혼합액을 50°C에서 30분간 그 후 실온에서 30분간 반응시킨 후 fluorescence reader로 생성된 fluorescence complex의 농도를 측정하고 Deoxyojirimycin을 fluorescence assay 대조군으로 사용하여 진균세포벽에 효과적으로 작용할 수 있는 천연물질을 선별하였다.^{12,13)}

항진균 활성 측정 - 실험용으로 사용된 균주로는 *Candida albicans*을 사용하였고 균주배양에 사용될 배지로 PDB(Potato Dextrose Broth)를 사용하였다. 삼각플라스크에 PDB 2.4g과 H₂O 50ml를 넣고 녹여 상온에서 36hr~48hr 동안 200rpm에서 배양한다. sterile Tryptic soy agar는 멸균후 45°C~50°C에서 *Candida albicans*을 2ml 넣어 흔들여 준다.

위의 agar를 petri plates(100×15mm)에 10ml 정도 넣고 4°C 냉장고에 보관한다. filter paper disks(6.25mm)에 sample(200µg/20µl)를 흡수시킨다. solvent를 건조시킨 후 disk 를 plate 표면에 놓고 실온에서 24시간 배양후 disk 주위의 clear zone의 생성여부와 생성된 clear zone의 직경을 측정하여 항진균 작용을 판정하였다.¹⁴⁾

3. 항진균성 활성효과의 측정

본 연구에서는 문헌조사에 의해 선정된 항진균 활성 효과를 보일 것으로 예상되는 한약재의 추출물을 대상으로 *Candida albicans*에 대한 초기단계의 항진균 활성을 측정하였다.

제1차 측정은 Enzyme assay를 통하여 (1,3)β-glucan synthase 저해 효과를 지니는 추출물을 확인 한후 제2차 검정법으로서 여지 디스크 확산법에 의하여 효소억제 활성을 보인 추출물들이 항진균 효과를 지니고 있는지 확인하였다.

실험 결과 및 고찰

1. (1,3)β-glucan synthase 활성 억제 효과

1) 저해제인 Deoxyojirimycin 이 효소활성에 미치는 효과¹⁵⁾

일반적으로 UDP-[¹⁴C]glucose를 기질로 사용하는 Selitrennikoff 등이 제안한 radio activity assay 방법의 경우는 fluorescence reader를 이용하여 측정하는 방법에 비하여 그 비용이 많이 드는 단점을 가지고 있다.^{1,16)}

Table 1. Inhibition effects of Extracts products on (1,3)β-glucan synthase

Sample	학명	Inhibition (%)	Sample	학명	Inhibition (%)
쇠뜨기(문형)	<i>Equisetum arvense</i>		편죽	<i>Polygonum aviculare</i>	
n-Hexane		80.2	n-Hexane		86.1
EA		97.4	EA		95.7
BuOH		72.5	BuOH		96.9
황련	<i>Coptis chinensis</i>		대마(마자인)	<i>Cannabis sativa</i>	
n-Hexane		-41.1	n-Hexane		40.7
EA		-133.5	EA		91.4
BuOH		-467.3	BuOH		74.3
두충	<i>Eucommia ulmoides</i>		산사(살)	<i>Crataegus pinnatifida</i>	
n-Hexane		66.1	n-Hexane		77.2
EA		54.6	EA		93.1
BuOH		55.3	BuOH		84.7
정공피 (당마가목)	<i>Sorbus amurensis</i>		결명자	<i>Cassia tora</i>	
n-Hexane		73.8	n-Hexane		70.2
EA		65.1	EA		51.4
BuOH		58.5	BuOH		-0.5
정목향 (취방울뿌리)	<i>Aristolochia contorta</i>		현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>	
n-Hexane		73.8	n-Hexane		65.7
EA		58.5	EA		36.9
BuOH		13.6	BuOH		33.3
단삼	<i>Salvia miltiorrhiza</i>		조구등	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	
n-Hexane		73.5	n-Hexane		63.4
EA		55.7	EA		63.1
BuOH		64.3	BuOH		67.5
목향	<i>Saussurea lappa</i>		외침 (탈진독찰)	<i>Siegesbeckia orientalis</i>	
n-Hexane		79.8	n-Hexane		65
EA		63.7	EA		63.9
BuOH		42.4	BuOH		47.3
참이 (도꼬마리)	<i>Xanthium strumarium</i>		사삼 (잔대뿌리)	<i>Adenophora triphylla</i>	
n-Hexane		40.9	n-Hexane		20.9
EA		1.6	EA		63.4
BuOH		27.5	BuOH		35.9
대계근			상삼	<i>Morus alba L.</i>	
n-Hexane		53.2	n-Hexane		36.4
EA		55	EA		35.1
BuOH		49.4	BuOH		41.2
상엽	<i>Morus alba L.</i>		신이화	<i>Magnolia denuata Desr.</i>	
n-Hexane		0.8	n-Hexane		26.2
EA		31.6	EA		8.3
BuOH		32.6	BuOH		-64.6
토사자	<i>Cuscuta japonica</i>		백과엽	<i>Ginkgo biloba</i>	
n-Hexane		31.8	n-Hexane		59.7
EA		27.8	EA		83.7
BuOH		52	BuOH		57.1
태자삼	<i>Pseudostellaria heterophylla</i>				
n-Hexane		69.2			
EA		72			
BuOH		85.7			
구맥	<i>Dianthus superbus</i>		옥미수	<i>Zea mays</i>	
n-Hexane		63.9	EA		72.5
백작약	<i>Paeonia japonica</i>		상지	<i>Morus alba L.</i>	
EA		48	EA		47.1
BuOH		47.7	BuOH		68.3

따라서 본 연구에서는 안전하고 경제적인 UDP-glucose를 기질로 사용하는 fluorescence assay 방법 토대로 하여 항진균 작용을 가질 것으로 예상되는 약용식물의 유기용매 추출물의 생리활성을 검색하였다.¹⁷⁾ 먼저, 글루칸 합성 저해제로 알려져 있는 Deoxynojirimycin이 (1,3) β -glucan synthase 의 in vitro 활성에 미치는 효과를 조사한 결과 Table 1에서 보듯이 농도가 증가할 수록 저해율이 증가하였으며, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 62.7%의 저해율을 보였고 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 91.5%의 저해율을 나타내었다.

2) 각종 약재들이 효소활성에 미치는 효과

표준물질인 Deoxynojirimycin 이 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 62.7%를 보였으므로 약재들의 농도를 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 고정하여 효소의 저해율을 측정하여 표준물질의 저해율과 비교하여 항진균 효과를 비교 측정하였다.

그 결과 Table 2에서 보듯이 여러 약재들에서 효소활성이 표준물질인 Deoxynojirimycin 의 62.7%보다 높은 저해율을 보였다. 쇠뜨기(Equisetum arvense), 편축(Polygonum aviculare), 산사(Crataegus pinnatifida), 목향(Saussurea lappa) 등의 경우에는 모든 추출물에 대하여 높은 저해율을 보였고, 태자삼(Pseudostellaria heterophylla)의 경우에는 BuOH 층에서 높은 저해율을 보였다. 좋은 저해 효과를 보이는 이들 약재들중에서 우선 쇠뜨기(Equisetum arvense) EA 추출물, 목향(Saussurea lappa)의 n-hexane 추출물과 태자삼(Pseudostellaria heterophylla) BuOH 추출물을 다시 용매 분획하여 효소 활성 저해율을 다시 측정하였다.

Table 2. Inhibition effect of Deoxynojirimycin on (1,3) β -glucan synthase

Concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inhibition(%) \pm SD
50	34.47 \pm 0.40
100	38.67 \pm 0.20
200	44.58 \pm 0.37
400	57.65 \pm 1.09
500	62.69 \pm 1.08
1000	79.89 \pm 1.02
2000	91.47 \pm 0.35
4000	94.44 \pm 1.17

2. 여지 디스크 확산법에 의한 한약재의 항진균효과

Enzyme assay법에 의해 (1,3) β -glucan synthase inhibition된 천연물을 대상으로 여지 디스크 확산법을 이용하여 약재의 항진균 효과를 본 결과는 Table 3과 같다.

Table 에서 보는바와 같이 황련(Coptis chinensis), 상삼(Morus alba L.), 상엽(Morus alba L.), 신이화(Magnolia denudata Desr.)의 4개 식물에서만 모두 음성으로 나오고 나머지 식물들은 모두 양성반응을 나타내어 항진균 효과가 있음을 알 수 있었다.

Table 3. Antifungal effects of the extracts measured by the disc diffusion method.

Sample	학명	Sample농도	Activity
쇠뜨기(문형)	Equisetum arvense		
n-Hexane		1mg/ml	++
EA		"	++
BuOH		"	-
황련	Coptis chinensis		
n-Hexane		1mg/ml	-
EA		"	-
BuOH		"	-
두충	Eucommia ulmoides		
n-Hexane		1mg/ml	+
EA		"	+
BuOH		"	+
정공피 (당마가목)	Sorbus amurensis		
n-Hexane		1mg/ml	+
EA		"	+
BuOH		"	+
청목향 (쥐방울뿌리)	Aristolochia contorta		
n-Hexane		1mg/ml	+
EA		"	+
BuOH		"	-
단삼	Salvia miltiorrhiza		
n-Hexane		1mg/ml	+
EA		"	++
BuOH		"	+
목향	Saussurea lappa		
n-Hexane		1mg/ml	++
EA		"	++
BuOH		"	++
편축	Polygonum aviculare		
n-Hexane		1mg/ml	++
EA		"	++
BuOH		"	++
대마(마자인)	Cannabis sativa		
n-Hexane		1mg/ml	+
EA		"	+
BuOH		"	+
산사(실)	Crataegus pinnatifida		
n-Hexane		1mg/ml	++
EA		"	++
BuOH		"	++
결명자	Cassia tora		
n-Hexane		1mg/ml	+
EA		"	+
BuOH		"	-
현삼	Scrophularia buergeriana		
n-Hexane		1mg/ml	+
EA		"	-
BuOH		"	-
조구등	Uncaria rhynchophylla		
n-Hexane			+
EA		1mg/ml	+
BuOH		"	+
희침 (털진득침)	Siegesbeckia orientalis		
n-Hexane		1mg/ml	+
EA		"	+
BuOH		"	+

* Positive control(+), Negative control(-): 0~5mm +, 5~10mm ++

Sample	학명	Sample농도	Activity
장어 (도꼬마리)	Xanthium strumarium	1mg/ml	+
n-Hexane		"	-
EA		"	-
BuOH		"	-
대계근		1mg/ml	+
n-Hexane		"	+
EA		"	+
BuOH		"	+
상엽	Morus alba L.	1mg/ml	-
n-Hexane		"	-
EA		"	-
BuOH		"	-
토사자	Cuscuta japonica	1mg/ml	+
n-Hexane		"	+
EA		"	+
BuOH		"	+
태자삼	Pseudostellaria heterophylla	1mg/ml	+
n-Hexane		"	++
EA		"	++
BuOH		"	++
구맥	Dianthus superbus	1mg/ml	+
n-Hexane		"	+
백작약	Paeonia japonica	"	++
EA		"	++
BuOH		"	+
사삼 (잔대뿌리)	Adenophora triphylla	1mg/ml	-
n-Hexane		"	+
EA		"	+
BuOH		"	-
상삼	Morus alba L.	1mg/ml	-
n-Hexane		"	-
EA		"	-
BuOH	Magnolia denuata Desr.	"	-
신이화		1mg/ml	-
n-Hexane		"	-
EA		"	-
BuOH	Ginkgo biloba	"	-
백과엽		1mg/ml	+
n-Hexane		"	+
EA		"	+
BuOH	Zea mays	"	+
옥미수		1mg/ml	+
EA		"	+
상지	Morus alba L.	1mg/ml	+
EA		"	+
BuOH		"	+

* Positive control(+), Negative control(-): 0~5mm +, 5~10mm ++

결론

항진균 효과가 있을 것으로 예상되는 27종의 약용식물을 선정하여 (1,3)-β-glucan synthase 차단 효과와 여지 디스크 확산법을 중심으로 항진균성 천연물질을 탐색한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1,3)-β-glucan synthase 차단효과를 측정하여 쇠뜨기(Equisetum arvense) EA 97.4%, 편축(Polygonum aviculare) EA

95%, BuOH 96.9%, 산사(Crataegus pinnatifida) EA 93.1%, 목향(Saussurea lappa) hexan 79.8% 등의 모든 추출물에서 높은 저해율을 보였고, 태자삼은 BuOH 85.7% 층에서 높은 저해율을 보였고, 쇠뜨기(Equisetum arvense)EA, 목향(Saussurea lappa) n-hexane과 태자삼 BuOH 추출물을 다시 용매 분획하여 쇠뜨기(Equisetum arvense) EA와 목향(Saussurea lappa) hexane에서 높은 저해율을 보였으며, 여지 디스크 확산법에서 24종의 약재중 특히 쇠뜨기(Equisetum arvense), 편축 Polygonum aviculare), 산사(Crataegus pinnatifida), 목향(Saussurea lappa)태자삼은 BuOH, 양성반응을 보였다.

이상을 종합해 보면 쇠뜨기 쇠뜨기(Equisetum arvense) EA의 분획과 목향(Saussurea lappa) hexane에 항진균 효과를 나타내는 활성 물질이 존재하리라 예상되어 진다.

감사의 글

본 연구는 전라북도, 전라북도 중소기업청, 의약자원 연구센터(RRC), 2001년 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 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.
2. Georgopapadakou, N. H.; Tkacz, J. S. The fungal cell wall as a drug target. Trends in Microbiology 3, 98-104, 1995.
3. Rex, J. H.; Rinaldi, M. G.; Pfaller, M. A. Resistance of Candida species to luconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1-8, 1995.
4. Klepser, M. E.; Ernst, E. J.; Pfaller, M. A. Update on antifungal resistance. Trends in Microbiology 5, 372-375, 1997.
5. Onishi, J.; Mainz, 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.; Tsipouras, K.; Wilson, K.; Kurtz, M. B. Discovery of novel antifungal (1,3)-β-glucan synthase inhibitors. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 368-377, 2000.
6. Debono, M.; Gordee, R. S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. Annu. Rev. Microbiol. 48, 471-497, 1994.
7. 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.
8. 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.
 9. 민지영, 김은미, 민태진 버섯중 항균활성물질의 개발-버섯중의 식물병원성 곰팡이에 대한 항균활성 물질 검색-. *The Korean Journal of Mycology* 25, 354-361, 1997.
 10. 민병선, 방규호, 이준성, 배기환 *Candida* 와 *Penicillium* 속 진균에 대한 천연물의 항진균 효과 검색. *약학회지* 40, 582-590, 1996.
 11. 방규호, 이영하, 민병선 계피로부터 항진균물질 AF-001의 분리, 정제 및 특성. *The Korean Journal of Mycology* 25, 348-353, 1997.
 12. David J. Frost, Kim Brandt, John Chpobianco and Robert Goldman. 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.
 13. Esther Shedletzky, Christoph Unger, and Deborah P. Delmer. A Microtiter-Based Fluorescence Assay for (1,3)- β -glucan synthase. *Analytical biochemistry* 249, 88-93, 1997.
 14. Hadacek, F.; Greger, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.* 11, 137-147, 2000.
 15. Paek, Nam-soo, Dae-jung Kang, Yong-jin Choi, Jung-jun Lee, Tae-han Kim, and Kee-won Kim. Production of 1-Deoxynojirimycin by streptomyces sp. SID9135. *Journal of Microbiology and Biotechnology* vol. 7. No. 4, 262-266, 1997.
 16. Shedletzky, E.; Unger, C.; Delmer, D. P. A microtiter-based fluorescence assay for (1,3) β -glucan synthases. *Anal. Biochem.* 249, 88-93, 1997.
 17. 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.