

낙엽진흙버섯 자실체 유래 열수 추출물과 에탄올 침전물의 항바이러스활성

이새미 · 김성민 · 이윤희 · 김우중 · 나예슬 · 김현걸 · 남재환 · 신현동¹ · 권두한² · 박용일*
가톨릭대학교 생명공학과 & 생물소재공학연구센터, ¹고려대학교 환경생태공학과, ²한국생명공학연구원

Antiviral Activity of Hot-Water Extract and Its Ethanol Precipitate of *Phellinus pini* Fruiting Body. Lee, Sae Mi, Sung-Min Kim, Yoon-Hee Lee, Woo Jung Kim, Ye-Seul Na, Hyun Guell Kim, Jae-Hwan Nam, Hyun Dong Shin¹, Doo Han Kwon², and Yong Il Park*. Department of Biotechnology and The Biomaterial Engineering Research Center, The Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, Korea, ¹Dept. of Environmental Science and Ecological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ²Korea Research Institute for Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea – The crushed fruiting body of Alaskan *Porodaedalea pini* (Brot.) Murrill (syn. *Phellinus pini*) was extracted in boiling water for 4 h with the yield of 20.5% in dry mass. This hot-water extract showed significant antiviral activity by inhibiting the plaque formation in HeLa cells by coxsackievirus B3 (CVB3) and also showed highest inhibitory effect against neuraminidase activity among water extracts of various mushrooms. From the water extract, the ethanol precipitate (EP) and supernatant fraction (ES) were obtained through 75% ethanol precipitation with the yield of 43.3% and 28.3 % in dry mass, respectively. Whereas ES did not show any detectable level of antiviral activity, EP showed significant dose-dependent inhibition of plaque formation by CVB3 in HeLa cells with an EC₅₀ (50% effective concentration) of 0.45 mg/mL. The cytotoxicity on HeLa cells by EP was relatively low with the CC₅₀ (50% cytotoxic concentration) of 2.25 mg/mL. EP also effectively inhibited neuraminidase activity in a dose-dependent manner showing up to 75% inhibition at 1.7 mg/mL. These results suggest that the hot-water extract and its EP of *P. pini* fruiting body can be a candidate for the development of a potent broad-range antiviral agent against influenza virus(Flu) as well as CVB3. The major active component of EP was shown to be a heteropolysaccharide-protein complex containing glucose as the main sugar residue with mole percentage of 79.8% and other sugars like galactose (19.2%), xylose (17%), mannose (5.8%), and fucose (4.6%) and a small portion (12.7%, in mass) of protein.

Key words: *Phellinus pini*, neuraminidase, hot water extract, ethanol precipitation, antiviral activity, CVB3.

서 론

최근 SARS, AI 등 신종바이러스의 출현은 인간과 가축의 생명을 심각하게 위협하고 있어 각종 바이러스로 질환의 예방 및 새로운 치료제에 대한 사회적 관심이 고조되고 있다. 현재 사용 중인 iododeoxyuridine(IDU), acyclovir(ACV), azidothymidine (AZT), interferon (IFN) 등의 항바이러스제 대부분이 세포독성, 신경정신학적 증상 등 여러 가지 부작용을 나타내며[27, 32], 인간 인플루엔자 바이러스 A와 B 및 조류인플루엔자 바이러스에 대한 치료제로 개발된 oseltamivir의 경우도 노약자에게 투여 시 구토, 기관지염, 기침, 현기증 등의 부작용이 보고되고 있다[26]. 또한 기존 약물에 대한 내성균주의 출현도 증가하는 것으로 보고되고 있어[2, 6, 13, 27, 32], 보다 부작용이 적고 안전한 신규 항바이러스제

개발의 필요성이 지속적으로 요구되고 있으며[8, 19], 특히, 최근에는 천연물로부터의 항바이러스 활성 물질의 탐색에 많은 관심이 집중되고 있다.

천연물 중에서도 버섯류는 오랫동안 인간에 의해 식용 또는 민간요법으로 섭취하여 왔기에 비교적 안전성이 높아, 천연물 유래 신규 의약품 개발 가능성이 높은 장점이 있다. 많은 버섯류로부터 분리된 다당류가 면역 증강 및 항암활성이 있는 것으로 보고되었으며[3, 22, 37], 일부는 이미 항암 치료제로서 개발되어 있다. *Lentinus edodes* 유래 lentinan[33]과 *Coriolus versicolor* 유래 PSK[14, 34]의 HIV 증식 억제 효과, *Elfvigina applanata* 열수 추출물의 VSV에 대한 항바이러스 활성[11], *Ganoderma* spp. 유래 당단백의 HSV에 대한 항바이러스 활성[25], *Microphorus affinis* 유래 지질성 물질들의 neuraminidase 활성 저해[21], *Cordyceps militaris* 유래 nucleoside 유도체인 codycepin의 HIV-1의 역전사 효소의 활성 억제[23] 등 버섯류의 항바이러스 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

낙엽진 흙버섯(*Phellinus pini*)은 민주름버섯목(*Aphyll-*

*Corresponding author

Tel: 82-2-2164-4512, Fax: 82-2-2164-4865

E-mail: yongil382@catholic.ac.kr

phorales) 소나무버늘버섯과(*Hymenochaetae*) 진흙버섯속(*Phellinus* sp.)에 속하는 버섯으로, 자실체 유래 추출물의 항암작용[16], 면역증강작용[18], 혈중지질감소효과[36] 등에 대한 연구가 보고되어 있으나, 타 버섯에 비해 광범위한 생리활성 평가는 이루어지지 않고 있으며, 특히, 항바이러스 활성에 대한 보고는 거의 없는 실정이다[1]. 본 연구에서는, 이 버섯에 대한 다양한 약리작용을 평가하고 활성성분을 규명하는 연구의 일환으로 자실체 열수추출물로부터 얻어진 에탄올 침전물 고분자물이 인간의 심장, 췌장, 간 등에 감염하여 심근염, 간염 등을 유발하고 최근에는 당뇨병(IDDM)의 발병에도 관련이 있는 것으로 보고되고 있는 coxsackievirus B3(CVB3)[35]에 대해 항바이러스 활성을 확인하였고, 한편, influenza virus(Flu) 등에 대한 항바이러스제 탐색을 위해 이용되고 있는 neuraminidase(NA) 활성 저해[7, 10, 13, 17]로 항바이러스 활성을 확인하여, 본 낙엽진흙버섯의 수용성 고분자물이 광범위 항바이러스 활성이 있음을 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

낙엽진흙 버섯(*Porodaedalea pini* (Brot.) Murrill] (syn. *Phellinus pini*)의 자실체는 알래스카에서 채취되어 (주)화주커뮤니케이션스(Seoul, Korea)로부터 제공 받았으며, 고려대학교 진균분류생태연구실로부터 동정 받아 실험에 사용하였다. Roswell Park Memorial Institute medium(RPMI) 1640, trypsin-EDTA, penicillin, streptomycin은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), neuraminidase(from *Clostridium perfringens*)와 표준 기질인 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA)[28], 표준 단당류(fucose, mannose, glucose, galactose, xylose) 등은 모두 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포주 및 바이러스

숙주세포인 HeLa 세포는 10%(v/v) heat inactivated(56°C, 30 min) fetal bovine serum(FBS), penicillin과 streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 바이러스는 coxsackievirus B3 (CVB3) H3 strain(AAB02228)을 가톨릭대학교 생명공학과 분자바이러스 연구실로부터 제공받아 HeLa 배양을 통해 얻은 stock을 -70°C에서 보관하며 사용하였다. CVB3 바이러스 titer는 plaque reduction assay로 결정하였다[31].

버섯 열수추출 및 에탄올 침전물의 제조

버섯 자실체를 작은 절편으로 절단한 후 분쇄기로 파쇄

한 조분쇄물 200 g에 3 L의 증류수를 가하여 100°C에서 4 시간 교반하면서 추출하고 Filter paper(Whatman #2)로 여과한 여액을 -80°C에서 동결 건조하여 얻어진 건조 분말 상태의 열수추출물을 얻었다. 건조 열수추출물 0.6 g을 50 mL의 증류수에 녹인 후 3배 용량의 95% 에탄올을 가하여 4°C에서 24시간 정치시킨 후, 원심분리(8,000 rpm, 30 min, 4°C) 하였다. 침전물은 증류수에 녹여 투석(MWCO 14,000) 후 동결 건조하여 건조분말형태(EP)로 보관하여 실험에 사용하였으며 상등액은 감압 농축(Rotary evaporator, Eyela, USA)하여 에탄올을 제거한 뒤 증류수에 녹여 동결 건조하여 건조분말형태(ES)로 실험에 사용하였다.

세포독성시험

열수추출물과 에탄올 침전물(EP)의 세포독성을 조사하기 위해, HeLa 세포를 96-well plate에 1.0×10^5 cells/well의 농도로 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하여 세포단층을 얻은 후, 배지를 제거하고 2% FBS를 함유한 유지용 배지(maintenance medium, MM)를 이용해 다양한 농도의 시료 용액을 제조하여 well당 100 μ L씩 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 MTT assay[30]로 세포독성을 측정하였다. 세포독성은 세포의 성장을 50%까지 저해하는데 필요한 시료의 농도인 50% cytotoxic concentration(CC₅₀)로 나타내었다.

CVB3에 대한 항바이러스 시험

항바이러스 활성은 plaque reduction assay로 측정 하였다[31]. 6-Well culture plates에 숙주세포인 HeLa cell의 세포단층(1×10^5 cells/well)이 형성된 후 농도별(0.1, 0.5, 1 mg/mL)로 열수추출물, 에탄올 침전 후 얻어진 상등액 시료(ES)와 침전물 시료(EP)를 각각 첨가하고, 150 PFU/well의 CVB3를 동시에 접종시켰다. 5% CO₂, 37°C incubator에서 90분 간 바이러스를 세포에 흡착시킨 뒤 agar overlay medium(2% FBS, 0.5% agarose 함유된 RPMI 1640)을 세포 단층에 3 mL/well로 가한 후 37°C, 5% CO₂에서 48시간 배양 후 agar overlay medium을 떼어내고 5% formalin-PBS로 세포를 고정시킨 후 crystal violet으로 염색하여 plaque의 수를 세었다. 항바이러스 활성은 viral plaque의 수를 50% 감소시키는 데 필요한 시료의 농도를 50% effective concentration(EC₅₀)으로 나타냈다.

열수추출물의 항바이러스 작용 양식을 조사하기 위한 전배양 시험의 경우는 Katz 등[20]의 방법에 따라, HeLa cell을 6-well plate에 먼저 분주하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양하여 세포단층을 얻은 후 배지를 제거하고 농도별(0.1, 0.5, 1.0 mg/mL) 열수추출물과 2% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지를 well에 넣고 24시간 동안 전배양 하였다. 대조군으로는 배지만을 첨가하였다. 전배양이 끝난 후 시료를 함유한 배지를 제거한 후 잔여 배지를 PBS로 세척하여

완전히 제거한 다음, 150 PFU/well의 CVB3 용액을 접종하고 90분 간 세포에 흡착시킨 후 상기와 같이 배양하고 viral plaque의 수를 비교하였다.

Neuraminidase 활성 저해 시험

Influenza virus(Flu) 등과 같이, 바이러스의 침입과 증식에 바이러스 표면의 haemagglutinin(HA)과 neuraminidase(NA) 단백질 system을 이용하는 바이러스들에 대한 항바이러스 활성 여부를 neuraminidase(NA) inhibition assay[24]로 조사하였다. NA 효소 활성 저해 실험에는 낙엽진흙 버섯 자실체 외에, 노루궁뎅이버섯(*H. erinacium*), 운지버섯(*C. vesicolor*), 상황버섯(*P. linteus*), 잔나비불로초(*G. applanatum*), 차가버섯(*I. obliquus*)의 자실체 열수추출물을 낙엽진흙 버섯의 경우와 동일한 방법으로 제조하여 각 버섯 열수추출물의 NA 효소 활성 저해를 통한 항바이러스 활성을 비교하고, 가장 우수한 것으로 나타난 낙엽진흙 버섯의 열수추출 에탄올 침전물(EP)에 대해 농도별로 효소 저해 활성을 조사하였다. NA 효소액 10 μ L(2.5×10^{-3} U), 0.2 mM의 기질(MUNANA) 40 μ L, 농도별 시료액(열수 추출물 또는 에탄올 침전물) 10 μ L를 40 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 첨가하고 37°C에서 15분 반응시킨 후 0.1 M glycine-NaOH buffer(pH 10.4) 2.94 mL을 첨가하여 반응을 종료시키고 spectrofluorophotometer(Bio-Rad, USA)로 Ex. 360 nm/Em. 440 nm에서 fluorescence를 측정하여 효소활성 저해여부를 조사하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군으로 측정된 fluorescence 값을 100%로 하였으며, NA에 대한 표준 저해제로는 sialyllactose(Sigma)를 사용하였다.

에탄올 침전물 고분자의 성분 분석

항바이러스 활성 물질의 성분당 분석을 위해 1%(w/v)의 시료용액을 4 M trifluoroacetic acid(TFA)와 1:1(v/v)로 혼합하여 100°C에서 4시간 동안 가수분해 한 후 Speed Vac에서 건조시킨 후 증류수 200 μ L에 녹여 산가수분해물을 만들고, Honda 등[15]의 방법에 따라 PMP(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)로 표식하고, 10 μ 씩 injection하고 Shim-pack CLC-ODS column(6.0 mm \times 15 cm, Shimadzu, Japan) 상에서 HPLC(Dionex, USA)로 분석하였다. 0.1 M sodium phosphate buffer/10% acetonitrile(pH 7.0)로 1.0 mL/min 속도로 용출하면서 UV detector(Dionex, USA)로 245 nm에서 검출하였다. 표준시료는 각 20 mM의 fucose, mannose, glucose, galactose, xylose를 PMP로 표식하여 사용하였다. 총당은 phenol-sulfuric acid method[9]로 분석하고, 단백질은 BSA를 표준물질로하여 Bradford assay[4]로 분석, 정량하였다.

결과 및 고찰

버섯 열수추출 및 에탄올 침전물의 제조

버섯 자실체 조분체물 200 g을 증류수에서 100°C에서 4시간 교반하면서 추출하고 여과한 여액을 -80°C에서 동결 건조하여 41 g(수율 20.5%)의 건조 분말 상태의 열수추출물을 얻었다. 건조 열수추출물 0.6 g으로부터 75% 에탄올 침전 후 원심분리하고 동결건조하여 0.17 g(수율 28.3%)의 저분자 상등액 건조물(ES)을 얻었고, 침전물은 투석(MWCO 14,000) 후 동결건조하여 0.26 g(수율 43.3%)의 수용성 고분자 침전물 건조물(EP)을 얻었다(Fig. 1). 투석 과정에서 분자량 14,000 이하이면서 에탄올 75%에 침전되는 물질들의 상당 부분(0.17 g)이 제거되고 고분자 침전물만 얻어진 것으로 사료되었다.

CBV30에 대한 항바이러스 활성

바이러스와 농도별(0.1, 0.5, 1 mg/mL) 열수추출물을 각각 혼합하여 infection 시킨 후 plaque assay를 시행한 결과, 처리해준 시료의 농도가 증가함에 따라 대조군에 비해 형성되는 plaque의 수가 11.8%, 22.5%, 42.5% 감소하여, 농도의존적인 plaque 형성 억제능을 보였다(Fig. 2A). 그러나, 시료를 농도별로 먼저 HeLa cell에 처리하고 24시간 전배양시킨 후 시료를 완전히 제거하고 CVB3를 접종하여 plaque assay를 시행한 전배양 시험에서는, 0.1 mg과 0.5 mg에서는 오히려 다소 plaque 수의 증가를 보이다가 1 mg/mL의 농도에서 14% 정도의 낮은 억제 결과를 보여(Fig. 2B), 처리한

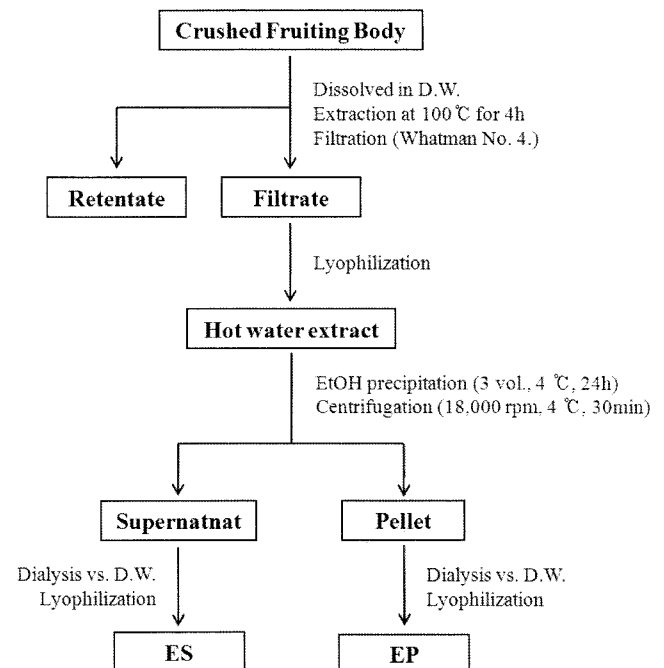


Fig. 1. Preparation of the hot-water extract and ethanol precipitate (EP) from the crushed *Phellinus pini* fruiting body.

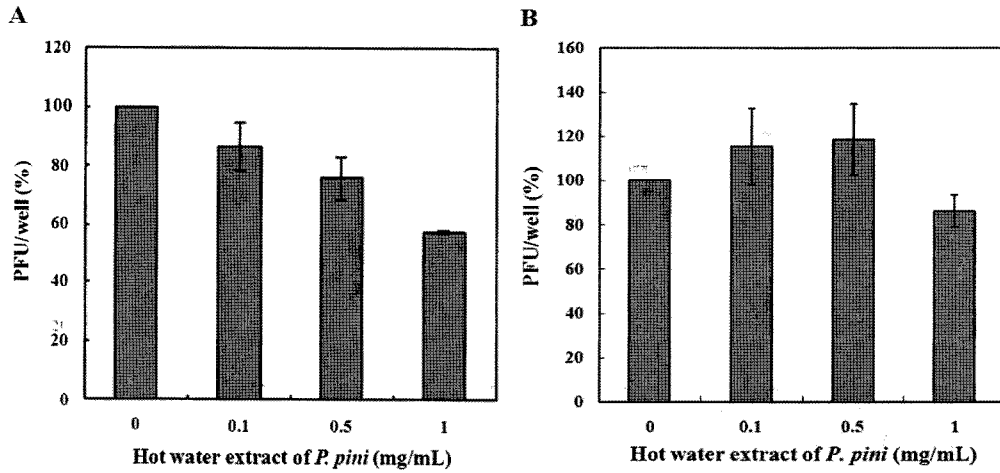


Fig. 2. Antiviral activity of hot-water extract of *P. pini* against CVB3 in HeLa cells. Antiviral activity was assessed by the inhibitory effect of the hot-water extract on plaque formation by CVB3 in two different ways, (A) when the hot-water extract and virus were treated simultaneously to the cells or (B) when the hot-water extract and cells were pre-cultured before the addition of the virus.

시료의 농도 범위에서는 plaque 형성 억제능을 보이지 않거나 미약하였으며, 바이러스와 열수추출물을 동시에 혼합하여 처리했을 경우가 전배양의 경우보다 plaque 형성 억제능이 현저히 높은 것으로 나타났다. 시료와 숙주세포를 전배양하였을 때 plaque 형성 억제능이 상대적으로 미약하였던 결과는, *Lentinus edodes* 자실체 추출물이나 그 배양추출물이 전배양 동안에 숙주세포에 영향을 주어 세포가 바이러스에 대한 저항성을 갖도록 하였다는 결과[5, 12]와는 달리, 본 실험에 사용된 낙엽진흙버섯 열수추출물의 활성 물질은 숙주 세포 자체의 바이러스 저항성에는 영향을 주지 않는 것으로 생각되었다[29].

한편, HeLa 세포에 있어서 열수추출물 및 에탄올 침전물(EP)의 세포독성을 MTT reduction assay 방법으로 조사한 결과 열수추출물의 경우 세포의 성장이 50% 저해되는 처리 시료의 농도(CC₅₀)는 1.25 mg/mL이었으며(Data not shown), 에탄올 침전물인 고분자 EP의 경우, HeLa 세포에 대한 세포 증식 저해 정도는 0.1 mg에서 13.5%, 1 mg에서 15.6%, 2.5 mg/mL에서 57.6% 정도의 세포증식 저해를 보였으며, CC₅₀이 2.25 mg/mL으로 세포독성은 더 낮았다(Fig. 3). 이는 에탄올 침전을 통한 분획 과정에 열수추출물에 포함되어 있던 세포 증식을 저해하는 불순물이 좀 더 제거되었기 때문으로 생각되었다. 한편, 종양세포인 HeLa에 비해, Vero 세포에 대한 EP의 세포 독성은 5 mg/mL까지의 농도에서도 전혀 없는 것으로 나타나(Data not shown), 낙엽진흙버섯 열수추출물로 얻어진 에탄올 침전물 고분자는 세포독성은 매우 미미한 것으로 나타났다.

열수추출물로부터 에탄올 침전으로 얻어진 상등액(ES)과 침전물(EP)시료의 HeLa 세포에서 CVB3에 대한 항바이러스 활성을 plaque reduction assay로 조사한 결과, 저분자 열수추출물인 ES의 경우, HeLa 세포에서 CVB3에 의한 plaque 형성에 대한 억제능은 없는 것으로 나타났다(Fig.

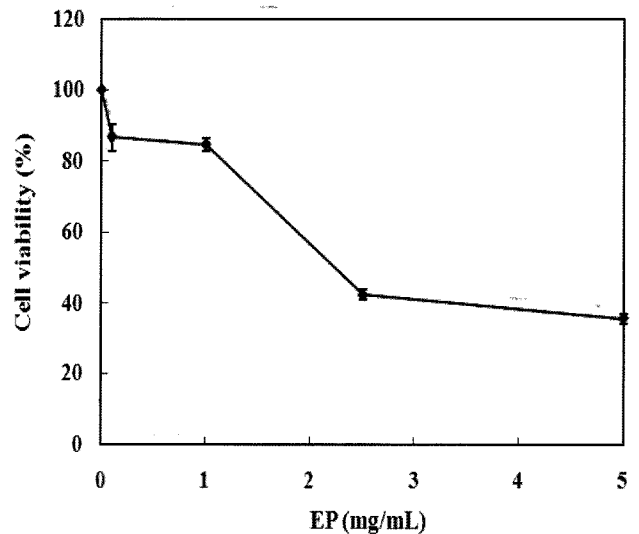


Fig. 3. Growth inhibition of HeLa cells by the ethanol-precipitate (EP) from the hot-water extract of *P. pini* fruiting body.

4A). 그러나, 에탄올 침전물인 고분자 EP의 경우, CVB3에 의한 plaque 형성에 대해 농도 의존적으로 현저한 억제능이 있음을 보였다(Fig. 4B). EP를 0.1, 0.5, 1.0 mg/mL 농도로 처리했을 때 처리하지 않은 대조군에 비해 각각 7.0, 56.0, 66.4%까지 plaque 형성을 저해하였다. Fig. 4C에서 시료를 처리해주지 않은 대조군(Fig. 4C-a)부터 0.1 mg(4C-b), 0.5 mg(4C-c), 1 mg/mL(4C-d) 순으로 EP의 농도가 높아질수록 plaque의 형성이 감소되는 것을 확인하였다. Plaque 수를 대조군과 비교하였을 때, 바이러스의 증식을 50%까지 억제시키는 EP의 농도인 EC₅₀(50% effective concentration)은 0.45 mg/mL이었다.

Neuraminidase 활성 저해능

Neuraminidase(NA) 효소 활성 저해 실험에는 낙엽진흙 버

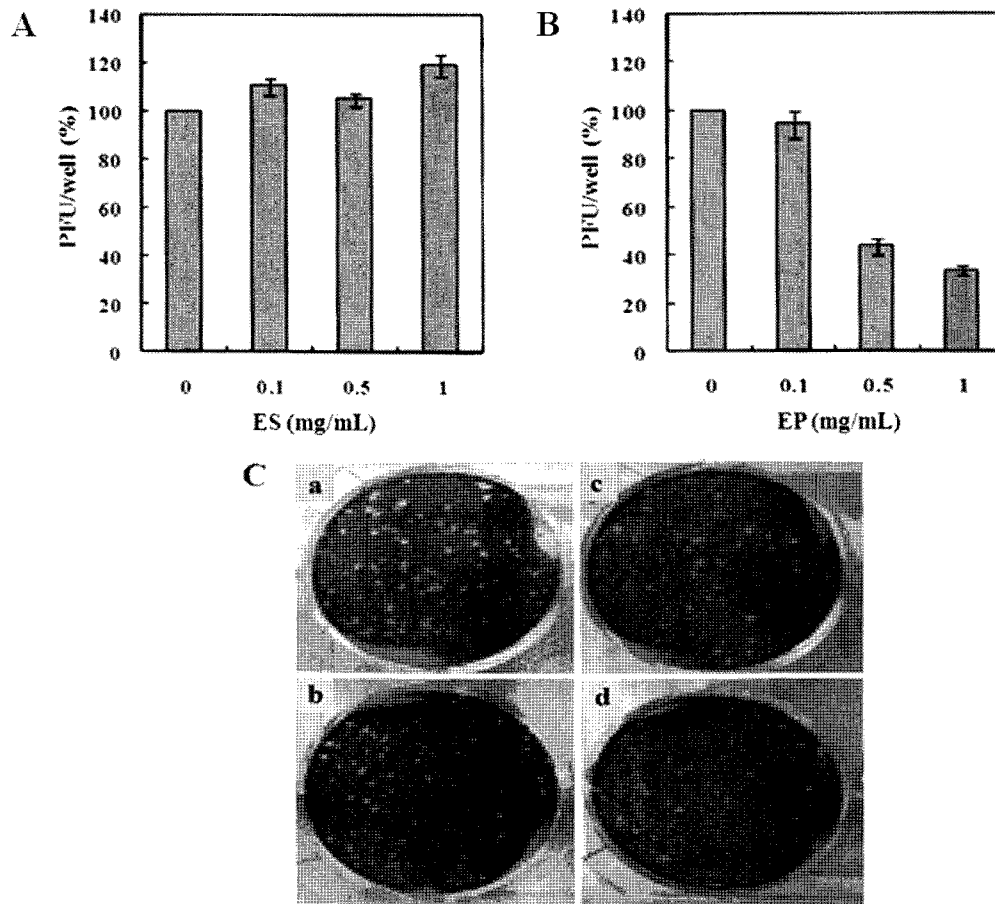


Fig. 4. Antiviral activity of the ethanol precipitate (EP) from the *P. pini* hot-water extracts against CVB3 in HeLa cells. Results were expressed as relative percentage with respect to the control that was set at 100%. (A) supernatant (ES) after ethanol precipitation, (B) precipitate (EP), (C) precipitate (EP), where a, b, c, and d represent the different concentrations (0, 0.1, 0.5, and 1.0 mg/mL) of EP, respectively. Values were the mean \pm SD. In pannel C, representative of independent experiments is shown.

섯 자실체외에, 노루궁뎅이버섯(*H. erinacium*), 운지버섯(*C. vesicolor*), 상황버섯(*P. linteus*), 잔나비불로초(*G. applanatum*), 차가버섯(*I. obliquus*)의 자실체 열수추출물을 낙엽진 흙 버섯의 경우와 동일한 방법으로 제조하여 각 버섯 열수추출물의 NA 효소 활성 저해를 비교한 결과(Fig. 5), 시료를 넣어주지 않은 대조군(Control)으로 측정된 fluorescence 값을 100%로 하였을 때 노루궁뎅이버섯(*H. erinacium*), 운지버섯(*C. vesicolor*), 상황버섯(*P. linteus*)의 추출물은 NA 효소 활성 저해능이 없었으나, 잔나비불로초(*G. applanatum*) 12%, 차가버섯(*I. obliquus*) 18.28%, 낙엽진흙버섯(*P. pini*) 58.8%로 낙엽진흙버섯의 열수추출물이 NA 효소 활성을 가장 강하게 저해하는 것으로 나타나, 낙엽진흙버섯의 열수추출물에 Influenza virus(Flu)에 대한 항바이러스 활성 물질이 있음을 보였다. 따라서, 가장 높은 저해 활성을 보인 낙엽진흙 버섯의 열수 추출물로부터 에탄올 침전으로 얻어진 저분자의 상등액(ES)과 고분자 침전물인 EP에 대해 NA에 대한 저해 활성을 조사한 결과(Fig. 6A), ES는 1.7 mg/mL에서도 저해 활성은 나타나지 않았으나, EP는 약 75%의 효소활성

억제효과를 보였다. 열수추출물과 EP의 농도를 각각 0.4, 0.8, 1.7, 3.4 mg/mL 농도별로 처리하여 효소 활성 저해를 측정된 결과(Fig. 6B), 열수추출물의 경우 33.3, 42.1, 56.4, 68.8%까지 저해활성을 보였으나, EP의 경우, 각각 48.3, 60.2, 74.9, 86.7%까지 저해하여, 열수추출물과 EP 모두 농도 의존적으로 NA 효소 활성을 현저히 저해하였으며, 에탄올 침전으로 얻어진 고분자 침전물이 보다 높은 저해 활성을 보였다. 이는 열수추출 후에 75% 에탄올 침전 및 투석(MWCO 14,000) 처리가 *P. pini* 자실체로부터 항바이러스 활성물질의 정제에 유효하였다는 것을 보여 주었다. EP의 neuraminidase에 대한 현저한 저해 활성은 *P. pini* 자실체의 수용성 고분자 성분인 EP가 현재 인간 인플루엔자 바이러스 A와 B 및 조류인플루엔자 바이러스(AI)에 대한 치료제로 사용되고 있는 oseltamivir(TamifluTM)나 zanamivir(RelenzaTM)와 같이 influenza 바이러스에 대해 매우 선택적이고 강력한 항바이러스 활성을 갖는 물질일 가능성을 시사하였다[7, 10, 13, 21]. 또한, EP가 외피가 없는 RNA 바이러스(non enveloped RNA virus)인 CVB3 뿐만 아니라, 외피

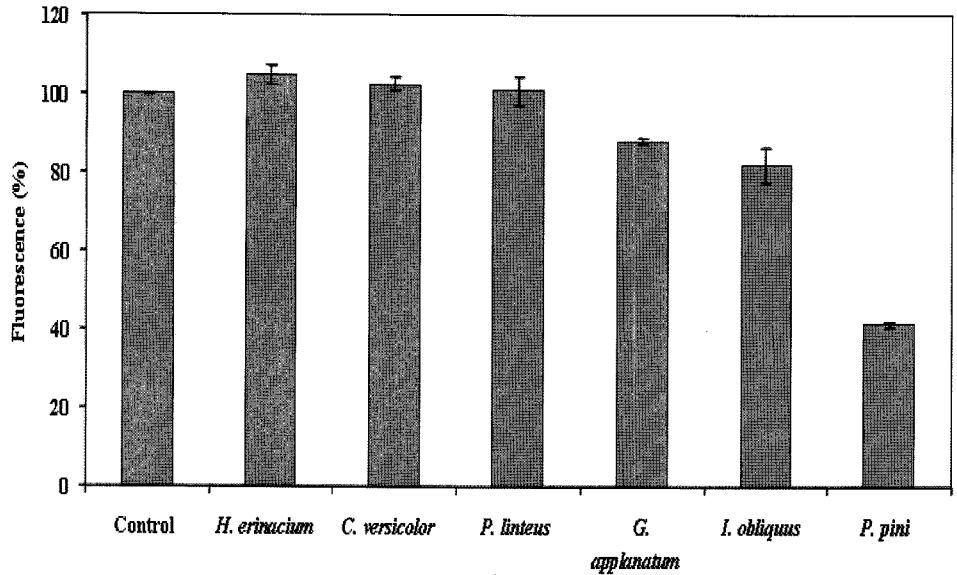


Fig. 5. Inhibition of neuraminidase activity by the hot-water extracts of various mushrooms and *P. pini* fruiting bodies. Each sample of 1.7 mg/mL in ddH₂O was used. For control, equal volume of ddH₂O instead of sample was used. Fluorometric quantification was determined at Ex. 360 nm and Em. 440 nm.

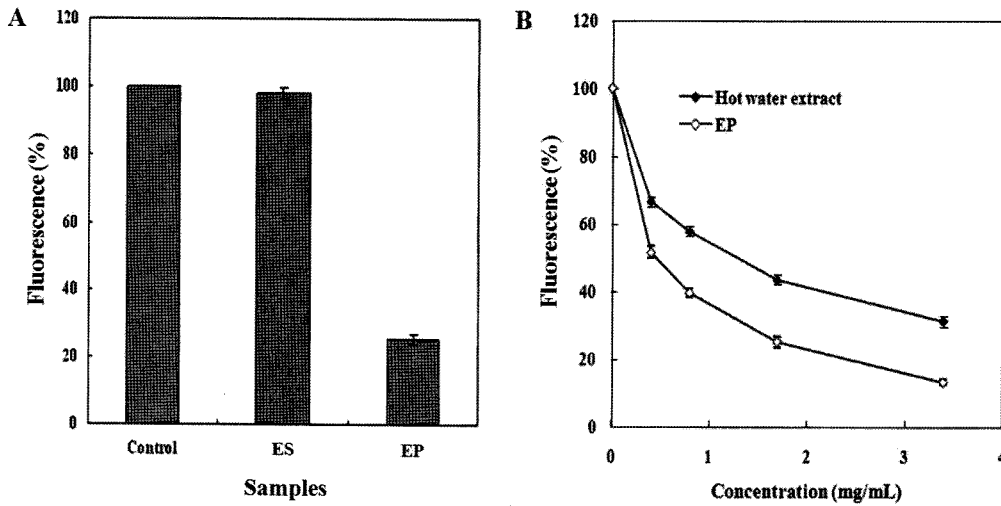


Fig. 6. Inhibition of neuraminidase activity by the supernatant (ES) and ethanol precipitate (EP) of the hot-water extracts of *P. pini* fruiting body. (A) The concentration of each sample was 1.7 mg/mL. As a control, ddH₂O without EP or ES was used. (B) Concentration-dependent inhibition of neuraminidase by the hot-water extract and ethanol precipitate (EP).

를 갖는 DNA 바이러스인 influenza virus 등에도 광범위하게 항바이러스 활성을 나타낼 수 있음을 보였다.

EP의 성분 분석

항바이러스 활성이 확인된 고분자 에탄올 침전물(EP)의 성분당 조성 및 단백질 함량을 조사하였다. EP 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 산 가수분해 후 PMP로 표식하고, C₁₈ ODS column 상에서 HPLC로 분석한 결과(Fig. 7, Table 1), EP는 주로 탄수화물로 이루어져 있으며, 특히 glucose의 함량이 79.8%로 가장 높았고 galactose 9.1%, xylose 8.3%, mannose와 fucose도 소량 포함되어 있었다.

이는, EP가 버섯 자실체의 열수 추출물로부터 에탄올 침전으로 얻어진 고분자물이라는 점에서 EP가 다당류의 일종으로, 특히, glucose가 80%이상을 차지하는 heteroglycan의 일종이며, EP 건조물이 상온에서 증류수나 항바이러스 실험을 위한 HeLa 세포 배양배지에 녹일 경우에도 침전물 형성 없이 잘 녹아 EP가 수용성의 glucan임을 알 수 있었다. 한편, EP에는 적은 량(12.7% in mass)이지만 단백질이 존재하는 것으로 나타났다(Table 1). 이는 EP가 소량의 단백질 또는 작은 펩타이드를 함유한 당단백의 일종일 가능성이 있는 것으로 사료된다. 그러나, 단백질 부분이 탄수화물에 화학적 결합으로 존재하는지는 확실치 않으며, 현재 본 연구실에서

Table 1. Chemical composition of EP from *P. pini* fruiting body.

	Protein ^a (mass %)	Proportion of monosaccharide (mole %) ^b				
		Fuc	Gal	Xyl	Glc	Man
EP	12.7	1.4	9.1	8.3	79.8	1.4

^aProtein was quantified by Bradford assay using BSA as a standard. ^bThe mole percentage of each monosaccharide in Fig. 7 was calculated from the area of each peak on the HPLC chromatogram of acid hydrolysates of EP; the total area of all the significant peaks were set at 100%. Fuc, fucose; Gal, galactose; Xyl, xylose; Glc, glucose; Man, mannose. The values were the mean of two separate experiments.

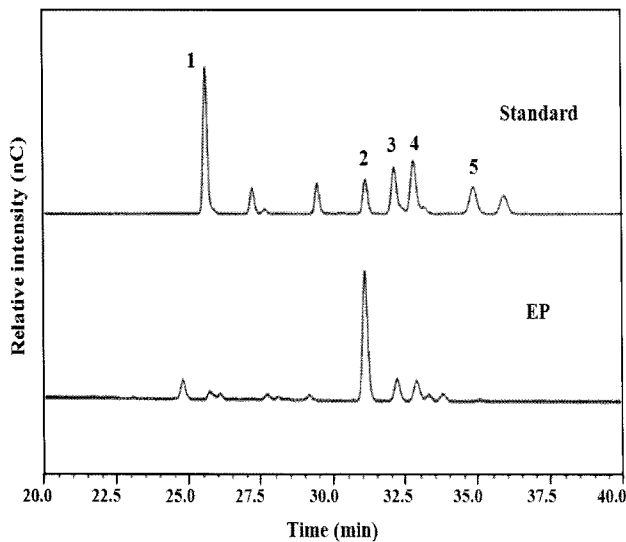


Fig. 7. Monosaccharide composition analysis of EP from *P. pini* fruiting body. Numbers represent the PMP-labeled standard monosaccharides of 200 nmol each: 1, mannose; 2, glucose; 3, galactose; 4, xylose; 5, fucose. EP sample (1%, w/v) was acid hydrolyzed by 2 M TFA and the resulting monosaccharides released were labeled with PMP as described in the Text and then analyzed on a Shim-pack CLC-ODS column using HPLC with UV detector at 245 nm.

는 EP의 완전 정제 및 glucose 분자의 빈도, 분자 사슬의 glucose 함량, 다른 성분당들과의 결합 구조, 탄수화물과 단백질 부분의 화학적 결합 여부 등의 보다 상세한 구조분석 연구와 EP의 항바이러스 활성에 관한 상세한 작용 기작 등에 대한 연구를 진행 중에 있다.

요 약

알래스카산 낙엽진흙버섯 [*Porodaedalea pini* (Brot.) Murrill] (syn. *Phellinus pini*)의 자실체 조분체물로부터 100°C에서 4시간 추출하여 건량 수율 20.5%의 건조 분말 열수추출물을 제조하여, HeLa 세포에서 CVB3에 대한 항바이러스 활성을 조사한 결과 plaque 형성을 현저히 억제하였다. 또한, 다른 여러 가지 버섯 추출물에 비해 neuraminidase 활성 저해능이 가장 높았다. 열수 추출물로부터 75% 에탄올 침전으로 건량 수율 28.3%의 저분자 상등액 건조물(ES)과 수율 43.3%의 고분자 침전물 건조물(EP)을 얻었다. 상등

액인 ES에서는 항바이러스 활성이 없었지만, 침전물인 EP는 HeLa 세포에서 CVB3 바이러스에 대해 농도 의존적으로 plaque 형성을 현저히 억제하였고, EC₅₀은 0.45 mg/mL 이었으며, HeLa 세포에 대한 세포독성 CC₅₀은 2.25 mg/mL 이었다. 또한, EP는 neuraminidase 활성을 농도 의존적으로 저해하였으며, 1.7 mg/mL에서 약 75%의 효소활성 억제효과를 보였다. 이러한 결과는 낙엽진흙버섯 자실체의 열수추출물로부터 얻어진 에탄올 침전물 EP가 CVB3 뿐만 아니라, influenza virus(Flu) 등에 대해서도 광범위하게 항바이러스 활성을 나타낼 가능성을 보여 주었다. EP는 다당류로서 glucose의 함량이 79.8%로 가장 높았고 galactose, xylose, mannose와 fucose를 소량 포함한 수용성 heteroglycan의 일종으로, 소량(12.7%, w/w)의 단백질 또는 작은 펩타이드를 함유한 당단백의 일종일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2007년 가톨릭대학교 교비연구비와 가톨릭대학교 경기도지역협력센터(GRRC)의 지원에 의해 연구수행된 결과이며 이에 감사드리는 바입니다.

REFERENCES

1. Ayer, W. A., D. J. Muir, and P. Chakravarty. 1996. Phenolic and other metabolites of *Phellinus pini*, a fungus pathogenic to pine. *Phytochem.* **42**: 1321-1324.
2. Bartholomeusz, A. and S. Locarnini. 2006. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *J. Med. Virol.* **78**: S52-S55.
3. Bohn, J. A., and J. N. BeMiller. 1995. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Pol.* **28**: 3-14.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
5. Chihara, G., Y. Maeda, T. Hamura, T. Sasaki, and F. Fukuoka. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Nature* **222**: 687-688.
6. Coen, E. M. 1986. General aspects of virus resistance with special reference to herpes simplex virus. *J. Antimicrob.*

- Chemother.* **18(Suppl. B)**: 1-10.
7. Colamn, P. M. 1995. Design and antiviral properties of influenza virus neuraminidase inhibitors. *Pure and Appl. Chem.* **67**: 1683-1688.
 8. De Clercq, E. 1997. In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clinic. Microbiol. Rev.* **10**: 674-693.
 9. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
 10. Eichelberger, M. C., A. Hassantoufighi, M. Wu, and M. Li. 2008. Neuraminidase activity provides a practical read-out for a high throughput influenza antiviral screening assay. *Virology* **5**: 109-116.
 11. Eo, S. K., Y. S. Kim, K. W. Oh, C. K. Lee, Y. N. Lee, and S. S. Han. 2001. Mode of antiviral activity of water soluble components isolated from *Elfvigina applanata* on vesicular stomatitis virus. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 74-78.
 12. Fujii, T., H. Maeda, F. Suzuki, and N. Isida. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics* **32**: 1079-1090.
 13. Gubareva, L. V. 2004. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res.* **103**: 199-203.
 14. Hirose, K., M. Hakozi, J. Kakuchi, K. Matsunaga, C. Yoshikumi, M. Takahashi, T. S. Tochikura, and N. Yamamoto. 1987. A biological response modifier, PSK, inhibits reverse transcriptase in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**: 562-567.
 15. Honda, S., E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, and J. Nakamura. 1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal. Biochem.* **180**: 351-357.
 16. Ikegawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara, and F. Fukuoka. 1968. Antitumor action of some *Basidiomycetes*, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155-157.
 17. Itzstein, M., W. Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. van Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron, and C. R. Penn. 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**: 418-423.
 18. Jeong, S. C., S. P. Cho, B. K. Yang, Y. T. Jeong, K. S. Ra, and C. H. Song. 2004. Immunomodulating activity of the exopolymer from submerged mycelial culture of *Phellinus pini*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 15-21.
 19. Jones, P. S. 1998. Strategies for antiviral drug discovery. *Antivir. Chem. Chemother.* **9**: 283-302.
 20. Katz, D. H., J. F. Marcelletti, M. H. Khalil, and L. E. Pope. 1991. Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including herpes simplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10825-10829.
 21. Kim, K. B., S. I. Kim, and K. S. Song. 2003. Neuraminidase inhibitors from mushroom *Microphorus affinis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 778-782.
 22. Kim, J. Y., S. E. Byeon, Y. G. Lee, J. Y. Lee, J. S. Park, E. K. Hong, and J. Y. Cho. 2008. Immunostimulatory activities of polysaccharides from liquid culture of pine-mushroom *Tricholoma matsutake*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 95-103.
 23. Muller, W. E. G., B. E. Weiler, R. Charubala, W. Piferiderer, L. Lserman, R. W. Sobol, J. Suhadolnik, and H. C. Schroder. 1990. Cordycepin analogues of 2'5'-oligoadenylate inhibitor human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase. *Biochem.* **30**: 2027-2033.
 24. Myers, R. W., R. T. Lee, Y. C. Lee, and G. H. Thomas. 1980. The synthesis of 4-methylumbelliferyl α -ketoside of *N*-acetylneuraminic acid and its use in a fluorometric assay for neuraminidase. *Anal. Biochem.* **101**: 166-174.
 25. Oh, K. W., C. K. Lee, Y. S. Kim, S. K. Eo, and S. S. Han. 2000. Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with acyclovir and vidarabine. *J. Ethnopharmacol.* **72**: 221-227.
 26. Okumura, A., T. Kubota, T. Kato, and T. Morishima. 2006. Oseltamivir and delirious behavior in children with influenza. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**: 572.
 27. Ong, A. K. and F. G. Hayden. 2007. John F. Enders Lecture 2006: Antivirals for influenza. *J. Infect. Dis.* **196**: 181-190.
 28. Potier, M., L. Mameli, M. Belisle, L. Dallaire, and S. B. Melancon. 1979. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-*N*-acetylneuramin-ate) substrate. *Anal. Biochem.* **94**: 287-296.
 29. Rym, K. H., S. K. Eo, Y. S. Kim, C. K. Lee, and S. S. Han. 1999. Antiviral activity of water soluble substance from *Elfvigina applanata*. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 25-33.
 30. Scubiero, D. A., R. H. Shoemaker, and K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, and M. R. Boyd. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**: 4827-4833.
 31. Shigeta, S., S. Mori, M. Baba, M. Ito, K. Honzumi, K. Nakamura, H. Oshitani, Y. Numazaki, A. Matsuda, T. Obara, S. Shuto, and E. De Clercq. 1992. Antiviral activities of ribavirin, 5-ethynyl-1-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide, and 6'-(R)-6'-C-methyl-neplanocin A against several ortho- and paramyxoviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 435-439.
 32. Tisdale, M. 2000. Monitoring of viral susceptibility: new challenges with the development of influenza NA inhibitors. *Rev. Med. Virol.* **10**: 45-55.
 33. Tochikura, T. S., H. Nakashima, Y. Kaneko, N. Kobayashi, and N. Yamamoto. 1987a. Suppression of human immunodeficiency virus replication by 3'-azido-3'-deoxythymidine in various human haematopoietic cell lines; Augmentation of the effect by lentinan. *JPN. J. Cancer Res. (Gann)* **8**: 583-589.

34. Tochikura, T. S., H. Nakashima, K. Hirose, and N. Yamamoto. 1987b. A biological response modifier, PSK, inhibits human immunodeficiency virus infection *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**: 726-733.
35. Tracy S., K. Hofling, S. Pirruccello, P. H. Lane, S. M. Reyna, and C. J. Gauntt. 2000. Group B coxsackievirus myocarditis and pancreatitis: connection between viral virulence phenotypes in mice. *J. Med. Virol.* **62**: 70-81.
36. Yang, B. K., J. B. Park, and C. H. Song. 2002. Hypolipidemic effect of exo-polymer produced in submerged mycelial culture of five different mushrooms. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 957-961.
37. Zhang, M., S. W. Cui, P. C. K. Cheung, and Q. Wang. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation processes, structural characteristics and anti-tumor activity. *Trends Food Sci. Technol.* **18**: 4-19.

(Received Feb. 18, 2009/Accepted March 4, 2009)