

115090  
-2

가  
지  
과  
작  
물

바  
이  
러  
스  
병  
에

대  
한

천  
연  
물

유  
래

친  
환  
경

향  
바  
이  
러  
스

소  
재

탐  
색

2018

농  
림  
축  
산  
식  
품  
부  
고  
려  
대  
학  
교

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )

농생명산업기술산업사업 최종보고서

11-1543000-002239-01

# 가지과작물 바이러스병에 대한 천연물 유래 친환경 항바이러스 소재 탐색

최종보고서

2018. 01. 30.

주관연구기관 / 고려대학교 산학협력단

농림축산식품부

## 2. 제출문

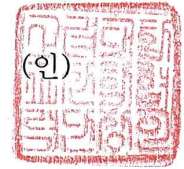
# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가지과작물 바이러스병에 대한 천연물 유래 친환경 항바이러스 소재 탐색”(개발기간 : 2015. 12. 18. ~ 2017. 12. 17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 01 . 30 .

주관연구기관명 : 고려대학교 산학협력단 (대표자) 고제상 (인)  
협동연구기관명 : (대표자) (인)  
참여기관명 : (대표자) (인)



주관연구책임자 : 이동호  
협동연구책임자 :  
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	115090-2	해당 단계 연구 기간	2016-12-18 ~ 2017-12-17	단계구분	2차년도/ 총 2차년도
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	가지과작물 바이러스병에 대한 천연물 유래 친환경 항바이러스 소재 탐색			
연구책임자	이동호	해당단계 참여 연구원 수	총:9명 내부:6명 외부:3명	해당단계 연구개발비	정부:100,000천원 민간: 천원 계:100,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총:10명 내부:7명 외부:3명	총 연구개발비	정부:200,000천원 민간: 천원 계:200,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	고려대학교 산학협력단			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수 29쪽

## 〈 요약 문 〉

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>연구의 목적: 다양한 천연물자원을 이용하여 식물바이러스에 대한 항바이러스 활성 물질을 탐색함에 있음.</p> <p>연구의 내용: PepMoV-GFP 기반 항바이러스 활성검정법을 통하여 천연물 유래 항바이러스 활성 물질을 규명함.</p>					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PepMoV-GFP 기반 leaf-disc method를 이용한 천연물 추출물 스크리닝</li> <li>• UPLC-ELSD-ITMS를 이용하여 <i>Trichoderma albolutescens</i> 추출물 내 대사체 분석</li> <li>• 활성추적을 통한 물질 분리</li> <li>• NMR, MS, IR, VCD를 이용한 물질 구조 규명</li> <li>• PepMoV-GFP 기반 systemic host method를 이용한 trichodermin(1), trichoderminol(2)의 PepMoV에 대한 항바이러스 활성 규명</li> <li>• Half-leaf method를 이용한 trichodermin(1) TMV에 대한 항바이러스 활성 규명</li> <li>• 기전연구 접근 및 field test</li> </ul>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 연구 결과에 따른 국제 농업회사와의 기술이전 모색</li> </ul>					
국문핵심어 (5개 이내)	식물바이러스	고추모틀바이러스	항바이러스제	트라이코더마 알볼루테스센스	트라이코더민	
영문핵심어 (5개 이내)	Plant virus	Pepper mottle virus	Antiviral agent	Trichoderma albolutescens	Trichodermin	

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	5
2. 국내외 기술개발 현황 .....	8
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	8
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	23
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	24
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	24
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	25
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	25
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	25
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	25
11. 기타사항 .....	26
12. 참고문헌 .....	26

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1.1. 연구개발 목적

본 연구의 목표는 가지과 농작물에 심각한 피해를 입히는 식물바이러스 (PepMoV, TMV 등)에 대하여 다양한 천연물 자원 유래 항바이러스활성 물질을 탐색하고, 이의 활성 작용기전을 과학적으로 규명하며, 최종적으로 친환경 항바이러스 농약 개발을 위한 소재를 탐색하여 식물바이러스병에 대한 대책을 강구하는데 있음

- 가지과 농작물에 심각한 피해를 입히는 식물바이러스에 대한 천연물 자원유래 친환경 항바이러스 농약 개발 소재 탐색
- 천연물 자원유래 항바이러스활성 후보물질 확보
- 후보물질의 항바이러스활성 규명 및 작용기전 파악
- 식물바이러스병에 대한 대책 강구

## 1.2. 연구개발의 필요성

- 농작물의 생산량에 영향을 미치는 다양한 식물병의 병원체로는 곰팡이, 박테리아, 바이러스 등이 있으며, 그중에서도 식물바이러스는 다양한 농작물에 심각한 피해를 줌.
- 2014년 기준 식물바이러스는 세계적으로 약 1,200여 종이 보고되었고 주요 농작물의 생산량 및 품질저하 등 세계적으로 약 60조원 이상의 경제적 손실을 끼치고 있으며, 국내에서도 150여 종의 식물바이러스에 의한 연간 8,000억원 이상의 피해를 받고 있음. 또한, 1988년 이후 117종의 신규 바이러스들이 보고되면서 그 종류가 점차 증가하고 있는 추세임 (표 1).

### 국내 신규 발생 바이러스 현황

연도	신규발생 바이러스	발생작물
2008	토마토황화잎말림바이러스 (TYLCV)	토마토
	사탕무황화바이러스 (BWYV)	피망, 파프리카
2011	살못황화줄무늬바이러스 (SYSV)	쪽파
	블루베리붉은원형반점바이러스 (BRRV)	블루베리
2012	순무황화모자이크바이러스 (TYMV)	배추
	양양두과사반점바이러스 (CNRMV)	양양두
2013	질경이모자이크포텍스바이러스 (PIAMV)	나리
	토마토퇴록바이러스 (ToCV)	토마토
2015	박과진딧물매개황화바이러스 (CABYV)	멜론
	수국원형반점바이러스 (HdRSV)	수국
	수국퇴록열록바이러스 (HdCMV)	

출처: 농촌진흥청

표 1. 국내 신규 발생 바이러스 현황

○ 자유무역협정 (FTA) 으로 인한 국가간의 농/식물 무역량의 증가 및 기후온난화 현상으로 열대, 아열대 작물의 도입 및 재배가 늘어나면서 새로운 바이러스의 유입가능성이 높아지며, 이로 인해 기존에 문제가 되지 않았던 피해가 더욱 증가할 가능성이 있음.

○ 국내 농작물에 피해를 주는 다양한 식물바이러스 종류 중 대표적인 종으로 가지과 작물에 심각한 피해를 주는 오이모자이크바이러스 (CMV), 고추모틀바이러스 (PepMoV), 담배모자이크바이러스 (TMV), 고추마일드모틀바이러스 (PMMoV), 토마토반점시듦바이러스 (TSWV)등이 보고되고 있으며, 특히 CMV, PepMoV는 고추작물에 평균 20-35%의 높은 발생률을 보임. 또한, 이 두 바이러스는 다른 바이러스들과 복합감염의 빈도가 높아 추가적 피해를 주기 때문에 그에 대한 대응책이 요구됨. 최근에는 TSWV에 의한 가지과 식물의 피해가 심각한 상태이며, 방제수단 미비로 인한 지속적인 피해를 입고 있는 상황임.

○ 식물바이러스에 감염된 농작물은 주로 모자이크, 반점, 퇴록, 괴사, 왜화, 생육장애등의 병징을 보이며 상품으로서의 가치를 저하시켜 경제적 피해를 줌 (그림 1).



그림 1. 식물바이러스에 의한 가지과 작물의 병징

○ 식물바이러스는 기주식물의 세포내에서 대사과정을 공유하며 존재하기 때문에 바이러스만의 선택적 저해가 어렵고, 복제 및 확산속도가 다른 병원체들과 비교하여 매우 빠르기 때문에 병 방제를 위한 관리적 측면에서 많은 어려움이 따름. 또한, 주요 전염원인 매개충 이외에도 물, 농업도구 등 다양한 환경조건에서 극미량의 바이러스 노출만으로도 높은 전염 가능성이 있기 때문에 특별한 관리 및 방제 수단이 요구됨.

○ 국내 식물 바이러스 연구는 분류동정, 진단기법, 바이러스 유전자 특성 규명 등이 주로 연구되고 있고, 바이러스병 방제적인 측면에서는 주로 저항성 품종개발에 집중되어 있음. 때문에 농가에서 바이러스병에 대한 방제법으로 매개충을 억제하기위한 살충제처리, 병징을 보이는 품종을 포장에서 격리시키는 등의 간접적 방제법만이 이용되고 있음.

○ 천연물은 식물, 동물 및 미생물 자원으로부터 유래한 화합물을 통칭하며, 오래 전부터 다양한 질병 등을 예방 및 치료하기 위하여 사용됨. 특히, 합성물질에 비하여 친환경적이고, 자원의 다양성에 의한 높은 잠재력을 보유하고 있음. 이러한 이유로, 미래선도 5대 산업에 선정되었던 전례가 있듯이 그에 대한 관심과 연구 및 투자가 활발히 이루어지고 있음.

○ 우리나라에는 전통의학, 민간요법 등에 따른 우수한 소재를 많이 보유하고 있으나 이에 대하여 과학적 연구를 통한 약품 소재 개발이 상대적으로 부족함. 국내 천연물신약 개발 현황을 살펴보면 6개 품목 (스티렌, 조인스정, 푸로스판, 살사라진, 아피톡신, 편자환)이 개발 완료되어 시판 중이지만, 사람 질병에 대한 약으로 국한되어 있음.

○ 천연물자원을 이용하여 식물바이러스에 대한 항바이러스제 개발은 세계적으로도 미개척 분야에 속하며, 최근 들어 농산물의 품질향상 등을 위한 식물바이러스병에 대한 관심이 향상되면서 중국연구진들 선두 하에 담배모자이크바이러스 (TMV), 오이모자이크바이러스 (CMV)에 대한 천연물 유래 항바이러스 활성물질들이 보고가 되고 있음.

○ 전세계적인 작물보호제 산업 규모는 360억불 (제초제 46%, 살충제 26%, 살균제 23%, 기타 5%)로 추정됨. 국내 작물보호제 시장은 1조 4000억원 규모이며, 사용량은 2.4억톤 수준에 이르지만 농약원제의 수입의존도가 높아 국제가격 경쟁력이 매우 취약한 현실임.

○ 본 연구팀은 수년간 천연물을 이용한 항바이러스 활성검정 및 활성물질 규명에 대한 연구를 수행하고 있으며, 구축된 시스템을 통한 천연물 유래 항바이러스 활성물질을 확보 및 개발하고, 최종적으로 식물바이러스병에 대한 천연물 유래 친환경적 방제관리의 수단을 제시함에 있음.



## 2. 국내외 기술개발 현황

	코드번호	D-04
<p><b>2.1. 국내외 기술개발 현황</b></p> <p>농작물에 피해를 입히는 식물바이러스에 수에 비하여 이를 대처하기 위한 항바이러스제 연구는 전세계적으로도 부족한 실정임. 근래 10년간 중국의 소수 그룹에서 식물바이러스 (TMV, CMV)에 대한 천연물 유래 항바이러스 활성 물질들이 보고되고 있음 (참고문헌 1 ~ 참고문헌 5).</p>		

## 3. 연구수행 내용 및 결과

	코드번호	D-05
<p><b>3.1. 연구내용 및 결과</b></p> <p><b>가. PepMoV-GFP 기반 leaf-disc method를 통한 천연물 추출물 대량 활성 검정</b></p> <p>고추모틀바이러스(Pepper mottle virus, PepMoV)에 초록형광단백질(Green fluorescent protein, GFP)을 태그한 형질전환 바이러스(PepMoV-GFP)(참고문헌 6) 기반으로 leaf-disc method를 이용하여 다양한 천연물 추출물에 대한 항바이러스 활성 대량 스크리닝 수행함.</p> <p>(1). 실험재료</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PepMoV-GFP(pSP6PepMoV-Vb1/GFP)는 서울여자대학교 식물바이러스은행(Plant virus genbank, PVGB)에서 분양받음.</li> <li>• 다양한 천연물 자원 중 국내 자생 균류 및 버섯 균주 추출물 라이브러리는 고려대학교 생명과학대학에서 제작 및 보관함.</li> </ul> <p>(2). PepMoV-GFP 기반 leaf-disc method</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 유묘시기의 건전 고추 식물에 PepMoV-GFP 접종원을 접종시킨 후, 온실 배양.</li> <li>② UV상 GFP가 고르게 퍼진 잎 수확.</li> <li>③ 증류수로 잎 표면 세척, EtOH과 sodium hypochloride를 이용하여 옆면 소독.</li> <li>④ Paper punch를 이용하여 지름 0.5cm의 leaf disc 채취.</li> <li>⑤ 24-wall plate에 MS 배지를 채운 후, PepMoV-GFP에 감염된 leaf disc를 한 슬롯에 3장씩 띄우고, 각 wall에 동일 농도의 추출물을 혼합하여 7일간 배양</li> <li>⑥ UV상 leaf disc 내 GFP의 유무를 통한 항바이러스 활성 검정.</li> </ol> <p>(3). 항바이러스 대량 활성 검정</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 약 100종의 국내 자생 균류 및 버섯 균주 추출물 라이브러리를 이용하여 PepMoV에 대한 항바이러스 활성 검정 수행.</li> <li>• UV 상 GFP의 유무를 control (PepMoV-GFP infected leaf discs with DMSO) 및</li> </ul>		

negative control (healthy leaf discs)과 비교.

- 실험 결과 약 8종의 균주 추출물에서 항바이러스 활성을 확인함 (그림 4).

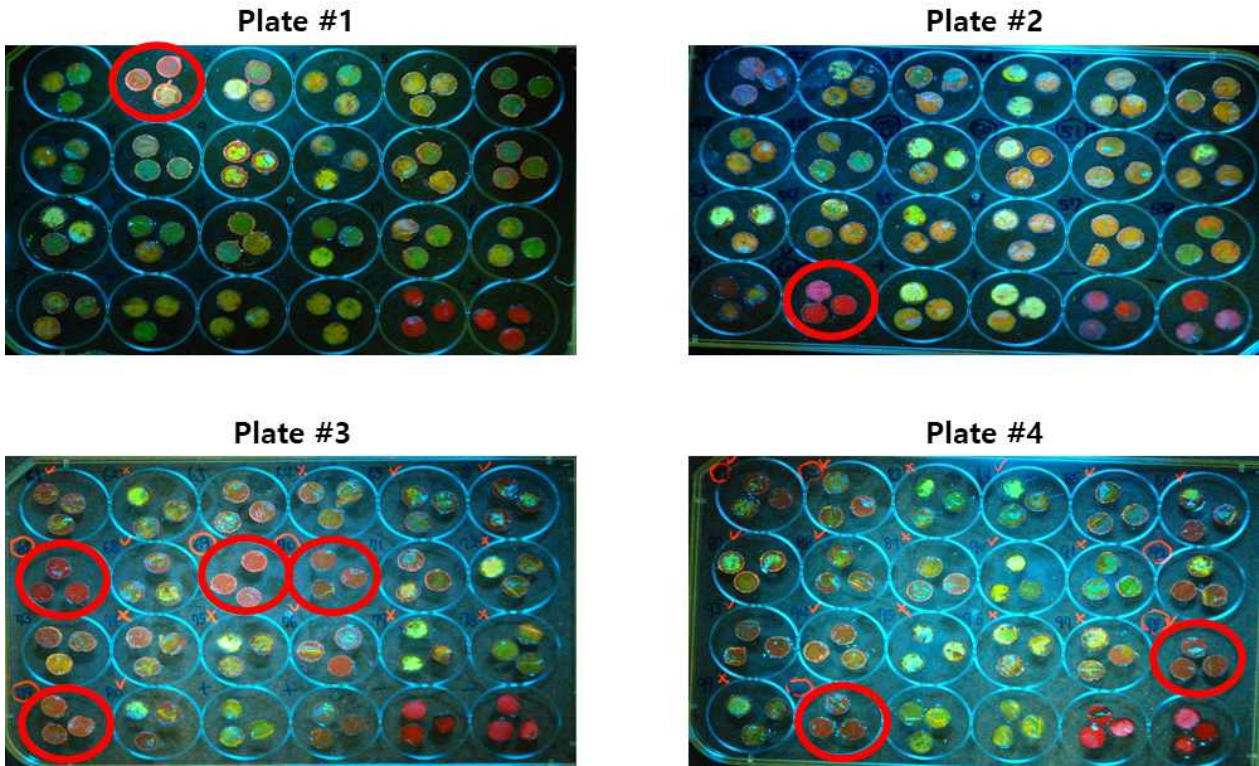


그림 4. PepMoV-GFP 기반 leaf-disc method를 이용함 국내 자생 버섯 균주 추출물 항바이러스 활성 대량 검정

- 활성을 보인 8종의 균주 중 *Trichoderma albolutezens* 균주로부터 우수한 항바이러스 효과를 확인함.
- Leaf-disc method를 이용한 실험 결과 MIC(minimum inhibitory concentration) 10 mg/mL에서 항바이러스 활성을 보임 (그림 5).
- 

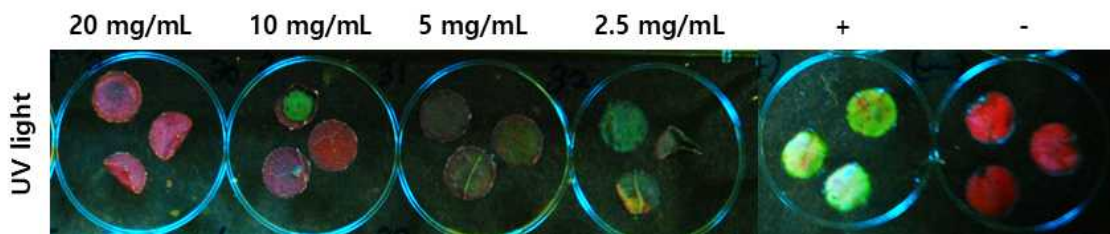


그림 5. *T. albolutezens* 추출물의 PepMoV에 대한 항바이러스 활성 검정

**나. 항바이러스 활성검정에서 선별된 추출물의 LC/MS를 이용한 대사체 분석**

활성을 보이는 추출물 중, 우수한 활성을 보인 *T. albolutescens* 균주 추출물에 대하여 물질 분리 전 LC/MS-ELSD 분석을 통하여 추출물 내 대사성분 파악함.

(1). 실험장비

- LC-ELSD: Waters ACQUITY UPLC™
- MS: Thermo LCQ Fleet Ion Trap MS

(2). UPLC-ELSD/UPLC-ITMS를 이용한 *T. albolutescens* 대사체 분석

- *T. albolutescens* 균주 내 대사 물질을 분석하기 위하여 UPLC, ELSD, MS 분석조건을 이용한 대사체 분석.

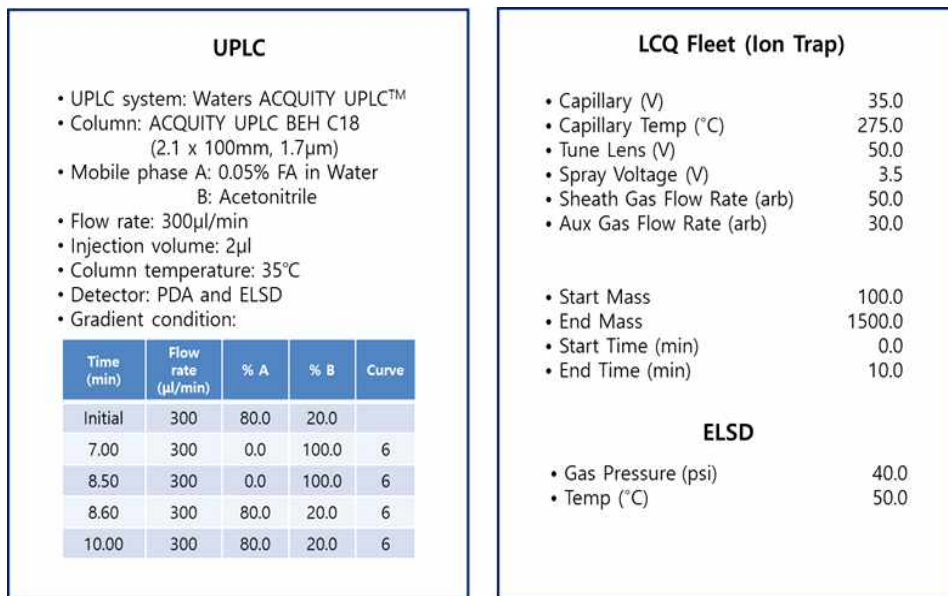


그림 6. UPLC-ELSD, UPLC-MS 분석 조건

- *T. albolutescens* 균주 대사체 분석 결과 ELSD상에서 높은 함량의 물질이 6.2분대에 확인되었으며, 분자량 292로 추정되는 물질을 확인 함 (그림 6 및 그림 7).

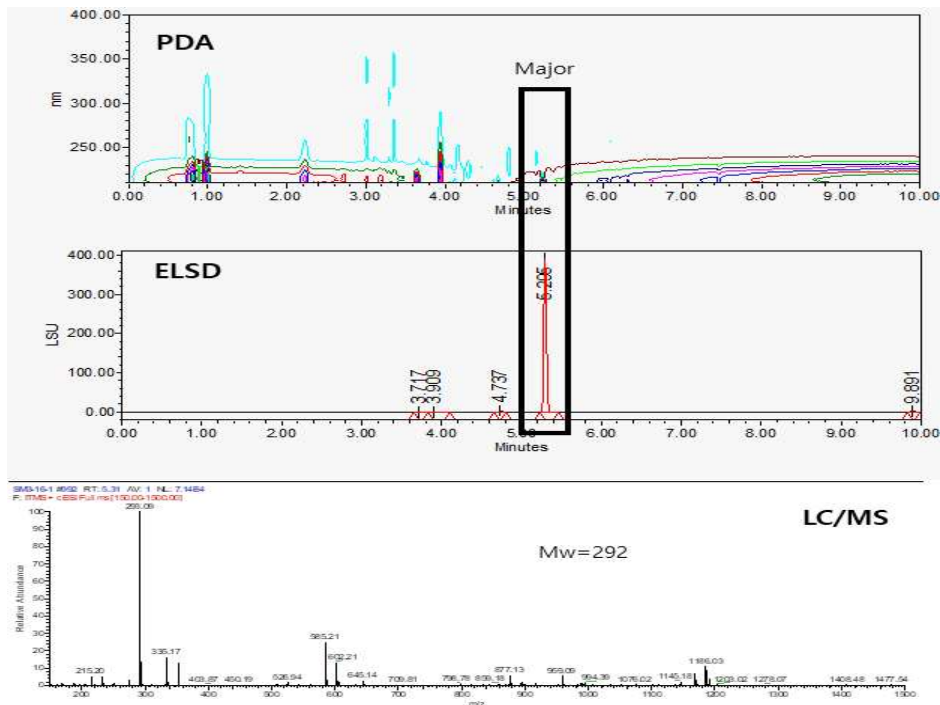


그림 7. *T. albolutescens* 균주내 UPLC-ELSD/MS 이용한 대사체 분석 결과

- *T. albolutescens* 균주 대사체 분석 결과로 분자량 292의 주요 대사성분 및 그 외 신규 화합물을 분리하기 위한 targeted isolation 수행함.

#### 다. 순수 화합물 분리, 화학 구조 결정

우수한 활성을 보인 *T. albolutescens* 균주 추출물에 대하여 column chromatography 기법을 이용한 순수 화합물 분리하고, 분리된 물질의 화학 구조를 규명하기 위하여 다양한 spectroscopy 분석장비를 이용하여 구조 규명함.

##### (1). 실험재료

- *Trichoderma albolutescens* 균주는 오대산 국립공원에서 고려대학교 생명과학대학 김재진 교수에 의하여 채집 및 동정 됨.

##### (2). 실험장비

- NMR: 500 MHz NMR spectrometer (Varian)
- HRMS: Q-TOF micromass spectrometer (Waters)
- IR: 640 FT-IR spectrometer (Varian)
- VCD: ChiralIR-2X TM FT-VCD spectrometer (BioTools)

##### (3) *T. albolutescens* 균주 대량배양 및 추출

- PDA가 담긴 petri dish(45장)에 28°C 10일간 배양.
- 2L의 MeOH에 3회 PDA와 함께 침지하여 MeOH 추출물 만든 후, 증류수 1L와

EtOAc 2L에 녹여 총 3 회 분획 후, EtOAc 추출물 0.8g 확보.

(4). Column chromatography 기법을 이용한 순수 화합물 분리

- EtOAc 추출물을 C<sub>18</sub> RP silica gel이 충전된 유리 컬럼에 MeOH:H<sub>2</sub>O(5:5-10:0) 조성으로 흘려 6개의 fraction으로 나눔. 그 중 3번 fraction(F3, 312.0 mg)을 silica gel이 충전된 유리 컬럼에 *n*-hexane:EtOAc(8:2-5:5) 조성으로 흘려 화합물 1(243.9 mg)을 단리함. 또한 2번 fraction(F2, 102.0 mg)을 silica gel이 충전된 유리 컬럼에 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(9.8:-7:3) 조성으로 흘려 3개의 sub-fraction으로 나눔 후, 그중 1번 fraction(F2.1, 30.6 mg)을 silica gel이 충전된 유리 컬럼에 *n*-hexane:EtOAc(8:2-5:5) 조성으로 흘려 화합물 2(15.5 mg)을 단리함 (그림 8).

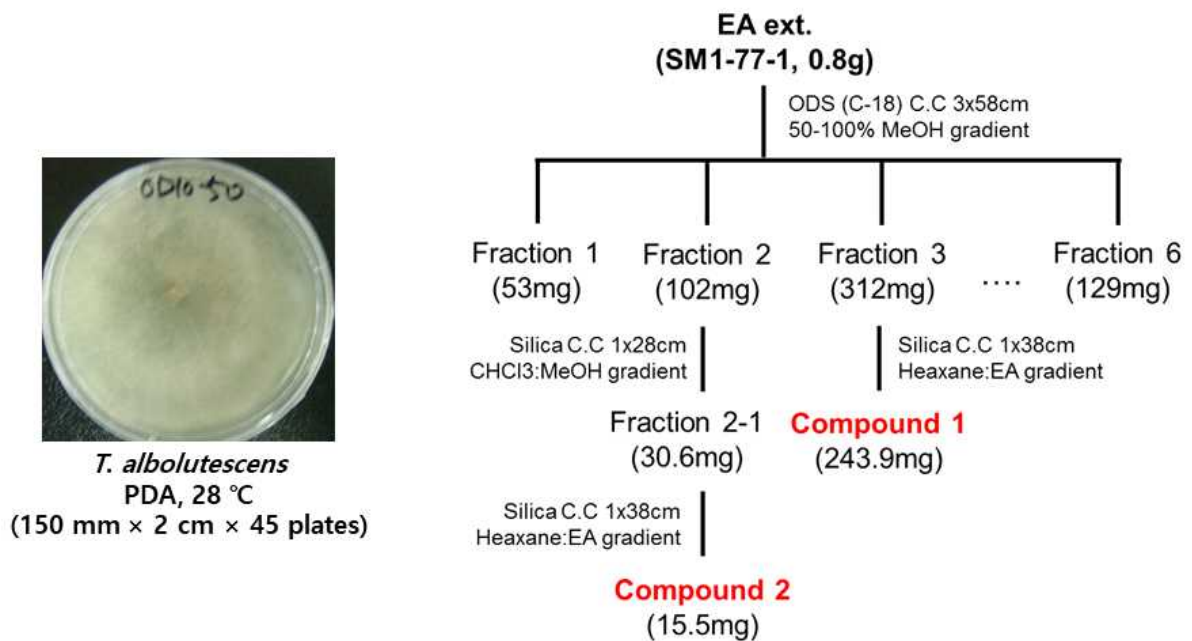


그림 8. 다양한 column chromatography 기법을 이용한 *T. albolutescens* 균주내 화합물 분리

(5). 다양한 spectroscopy 분석기법을 이용한 순수 화합물 구조 규명

- NMR, MS, IR을 이용한 화합물 1 (그림 9), 화합물 2 (그림 10)의 구조 규명함.

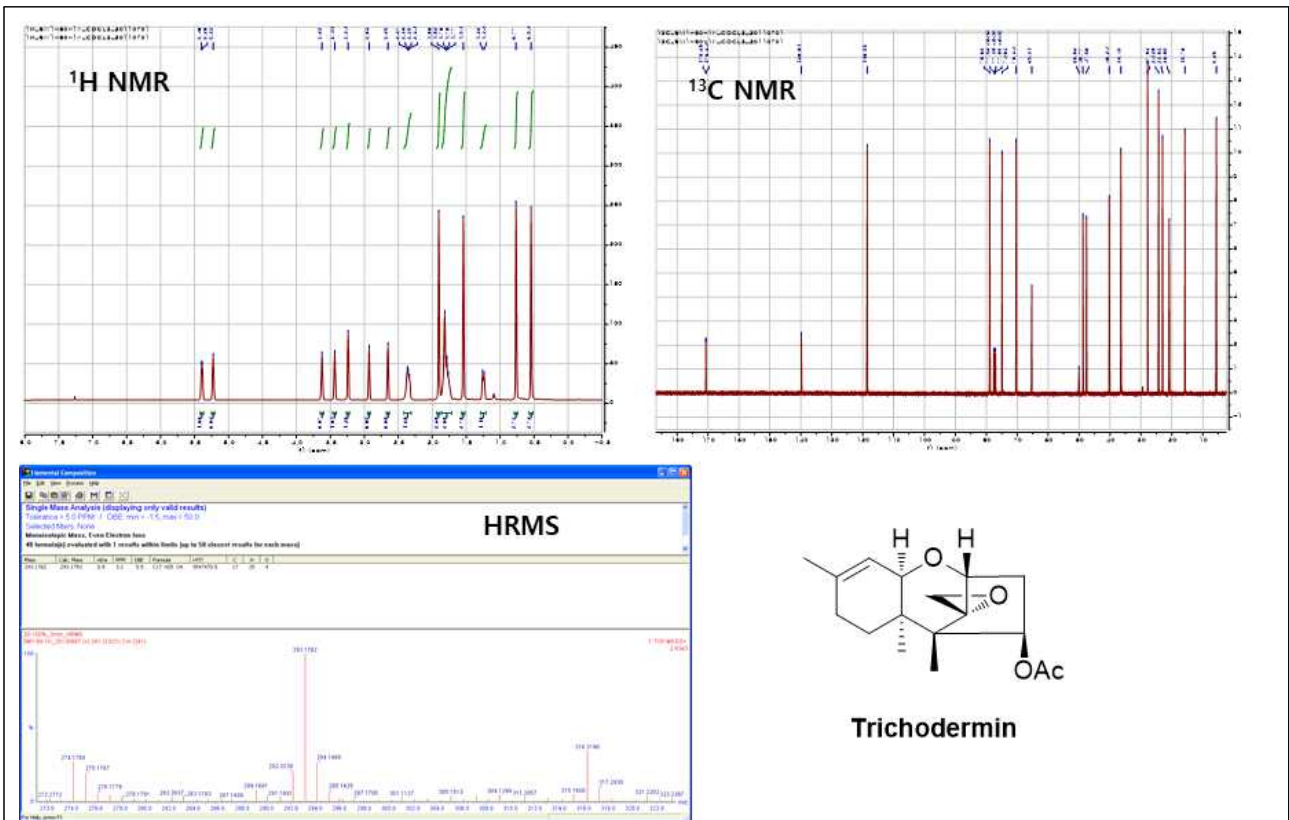


그림 9. 화합물 1 (trichodermin)의 다양한 spectroscopy 분석결과

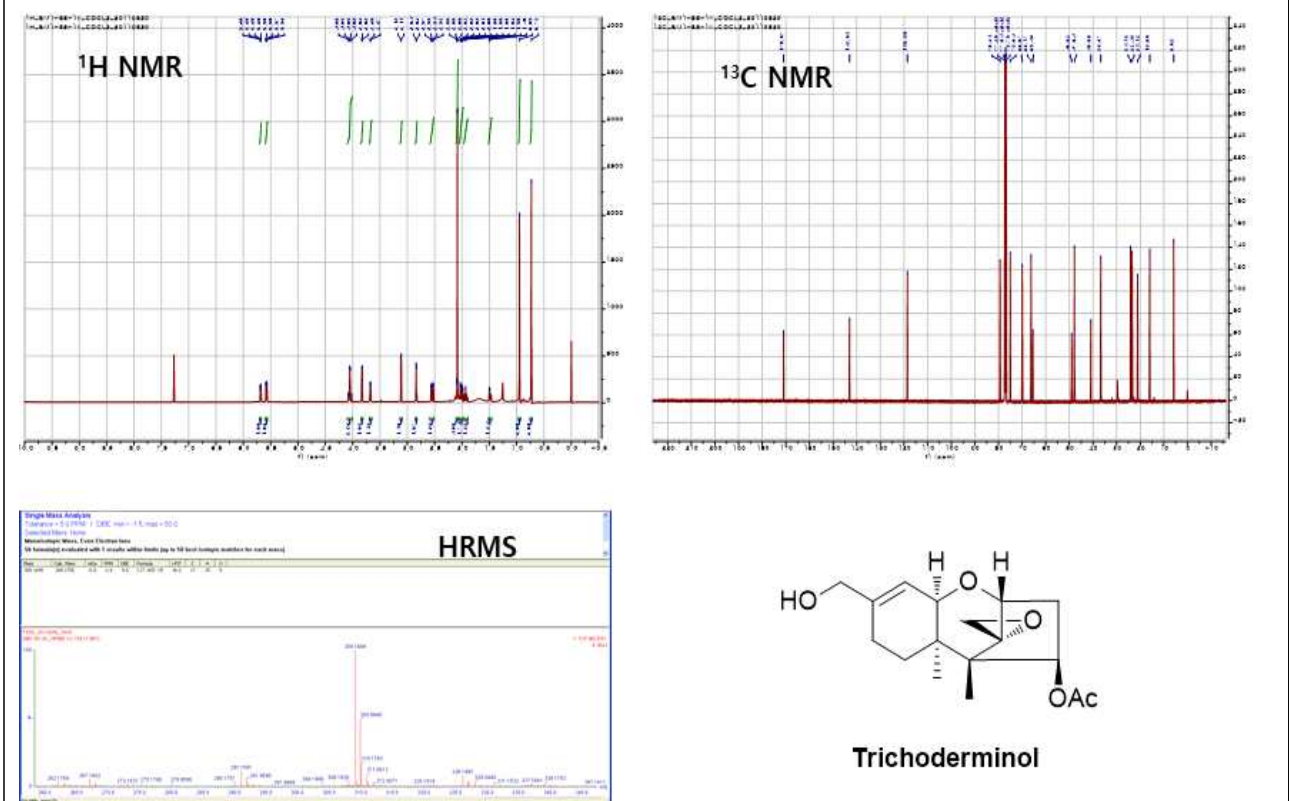


그림 10. 화합물 2 (trichoderminol)의 다양한 spectroscopy 분석결과

- Trichodermin(1):  $^1\text{H}$  NMR(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.56(1H, dd,  $J = 3.5, 8.0$  Hz, H-4), 5.40 (1H, m, H-10), 3.81 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz, H-2), 3.60 (1H, br d,  $J = 5.5$  Hz, H-11), 3.11 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-13a), 2.82 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-13b), 2.53 (1H, dd,  $J = 8.0, 15.5$  Hz, H-3a), 2.07 (3H, s, H-OAc), 1.91-2.01 (4H, m, overlap, H-3b, H-7a, H-8), 1.71 (3H, s, H-16), 1.41 (1H, m, H-7b), 0.93 (3H, s, H-15), 0.71 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz)  $\delta$  170.7 (C-OAc), 139.8 (C-9), 118.6 (C-10), 78.9 (C-2), 74.9 (C-4), 70.4 (C-11), 65.3 (C-12), 48.8 (C-5), 47.6 (C-13), 40.2 (C-6), 36.5 (C-3), 27.8 (C-8), 24.3 (C-7), 23.0 (C-16), 20.9 (C-OAc), 15.8 (C-15), 5.6 (C-14); IR  $\nu_{\text{max}}$ (ATR) 2963, 1730, 1436, 1373, 1240, 1078, 1029, 990  $\text{cm}^{-1}$ ; ESIMS(positive) $m/z$  293.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  293.1758  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_4$ , 303.1753).

- Trichoderminol(2):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.69 (1H, m, H-10), 5.58 (1H, dd,  $J = 3.5, 8.0$  Hz, H-4), 4.05 (2H, br d,  $J = 3.5$  Hz, H-16), 3.82 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz, H-2), 3.67 (1H, br d,  $J = 5.5$  Hz, H-11), 3.12 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-13a), 2.84 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-13b), 2.54 (1H, dd,  $J = 8.0, 15.5$  Hz, H-3a), 2.09 (2H, m, overlap, H-8), 2.09 (3H, s, overlap, H-OAc), 1.99 (1H, m, H-3b), 1.93 (1H, m, H-7a), 1.48 (1H, m, H-7b), 0.95 (3H, s, H-15), 0.73 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$ NMR(125MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$  171.0 (C-OAc), 143.0 (C-9), 118.6 (C-10), 79.3 (C-2), 75.0 (C-4), 70.0 (C-11), 66.2 (C-16), 65.5 (C-12), 49.0 (C-5), 47.8 (C-13), 40.9 (C-6), 36.7 (C-3), 24.1 (C-7), 23.4 (C-8), 21.1 (C-OAc), 16.0 (C-15), 5.8 (C-14); IR  $\nu_{\text{max}}$ (ATR): 3444, 2928, 1725, 1433, 1375, 1245, 1074, 1030, 963 $\text{cm}^{-1}$ ; ESIMS(negative) $m/z$  353.1  $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$ ; ESIMS(positive) $m/z$  309.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 617.3 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 925.5 $[3\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  309.1694  $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{O}_5$ , 309.1702).

- 구조 분석 결과 화합물 **2**(trichoderminol)은 신규 구조 화합물로 확인.

(6). VCD 분석기법을 이용한 순수 화합물 입체 구조 규명

- 두 화합물의 입체구조를 규명하기 위하여 VCD 분석 기법을 수행. 측정 VCD값과 계산된 VCD값의 비교를 통하여 두 고조의 입체구조를 규명함 (그림 11).

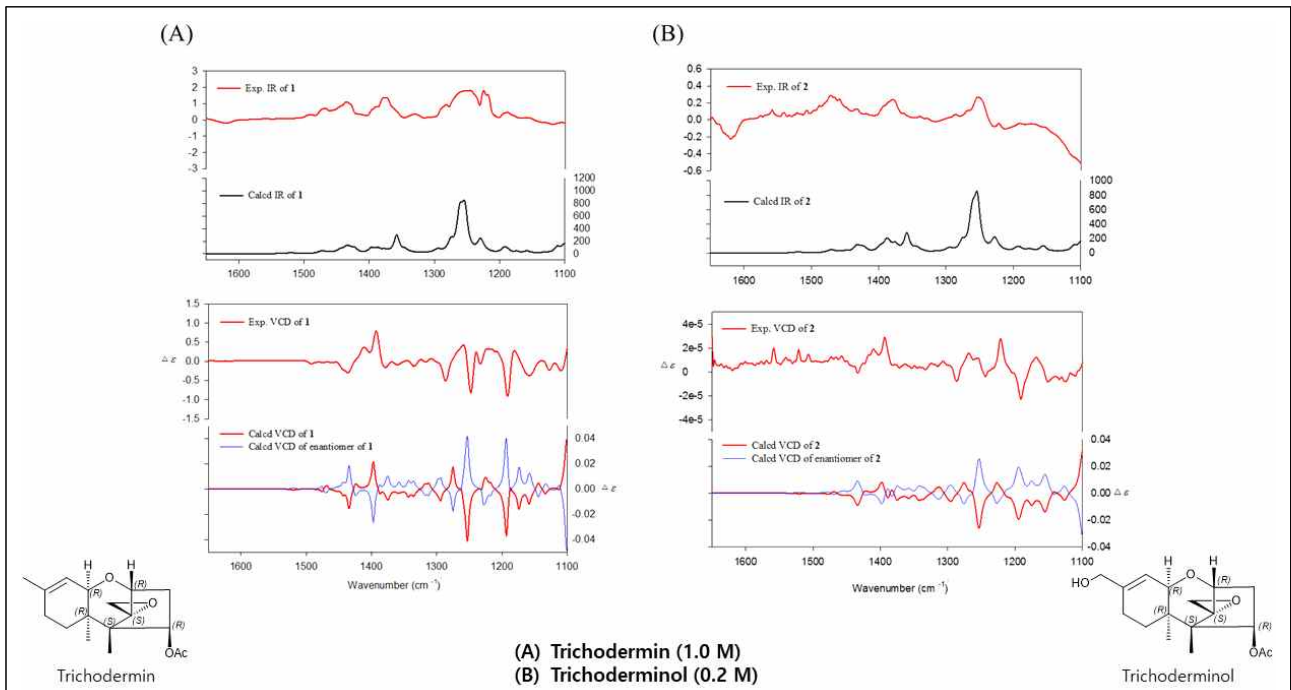


그림 11. Trichodermin(1)과 trichoderminol(2)의 VCD 분석 결과

#### 라. 후보 물질 및 추출물의 식물바이러스에 대한 활성 검정

*T. albolutescens* 균주 추출물로부터 분리된 두 화합물(1: trichodermin, 2: trichoderminol)에 대하여 PepMoV-GFP 기반 systemic host method를 이용한 항바이러스 활성 검정을 수행. 또한 담배모자이크바이러스(Tobacco mosaic virus, TMV)에 대하여 half-leaf method를 이용한 항바이러스 활성 검정을 수행함으로써 활성물질의 효능에 대하여 식물바이러스에 대한 스펙트럼 확장.

##### (1). 실험재료

- 기주식물: 담배(*Nicotiana benthamiana* L., *Nicotiana glutinosa* L.)
- 기주식물: 고추(*Capsicum annum* L., 마니파품종)

##### (2). PepMoV-GFP 기반 systemic host method를 이용한 항바이러스 활성 검정 (PepMoV)

- **Inactivation effect(담배):** Trichodermin(1)과 trichoderminol(2)를 농도별로 0.1% DMSO로 녹이고, PepMoV-GFP 접종원과 혼합하여 30분간 상온에서 반응 시킨 후, 혼합액을 PepMoV의 전신감염기주식물인 담배(*N. benthamiana*) 1개체의 떡잎포함 4개의 하엽에 50  $\mu$ L씩 접종함 (반복군 3개체).
- 실험결과, trichodermin(1)은 MIC 10  $\mu$ M에서 항바이러스 활성 효과를 보였으며, trichoderminol(2)은 MIC 1 mM에서 항바이러스 활성 효과를 보임. 따라서 trichodermin(1)은 trichoderminol(2)에 비하여 더 우수한 활성을 보였으며, 두 물질간 활성은 약 100배정도 차이가 남을 확인함. 또한, UV상 GFP를 관찰하였을 때 PepMoV-GFP의 확산이 control과 대비하여 지연됨을 확인하였으며, 이를 molecular analysis(RT-PCR, western blot)을 통하여 검증함 (그림 12 그림 13).



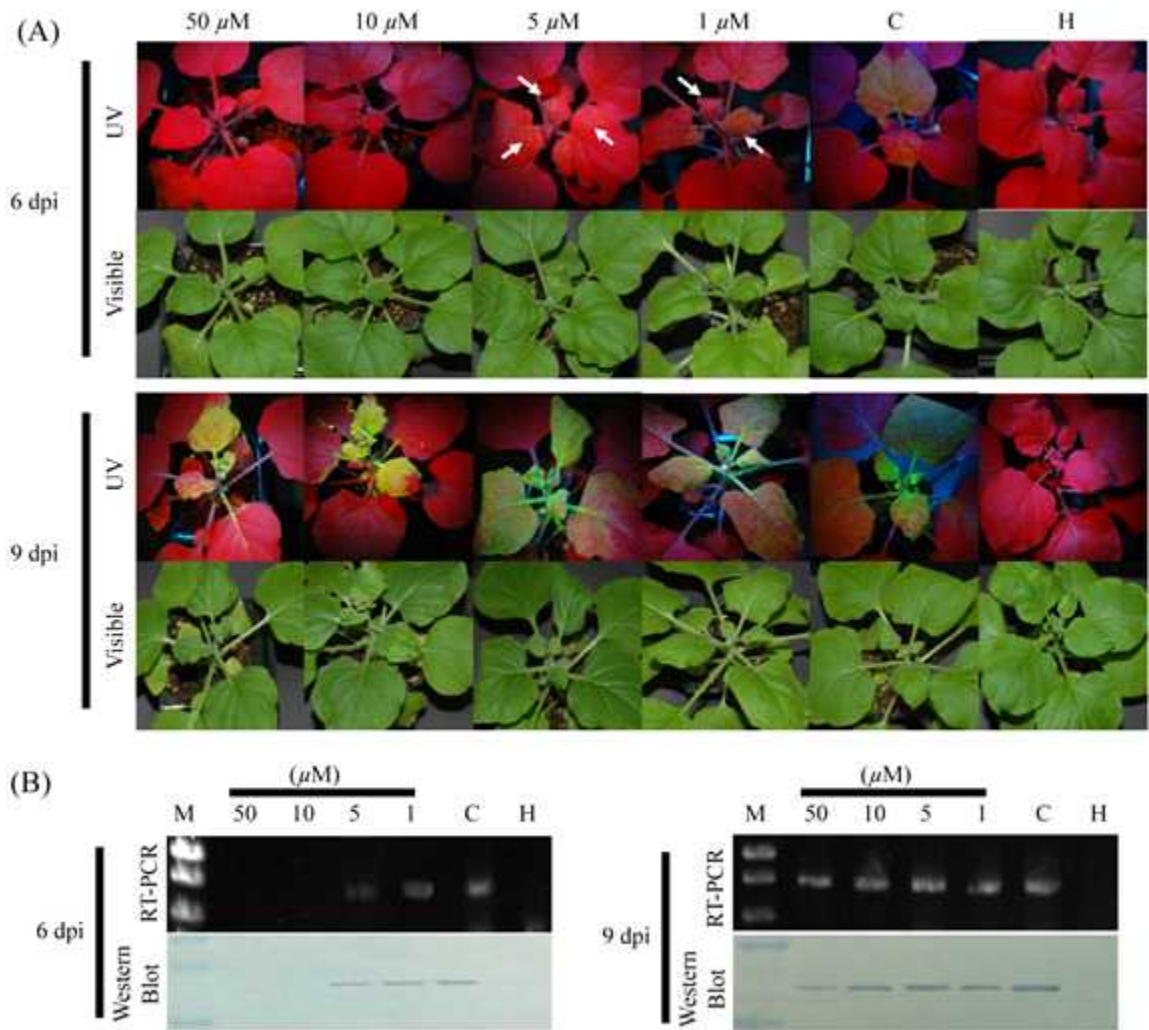


그림 12. Trichodermin(1)의 담배에서 향바이러스 활성(inactivation effect).

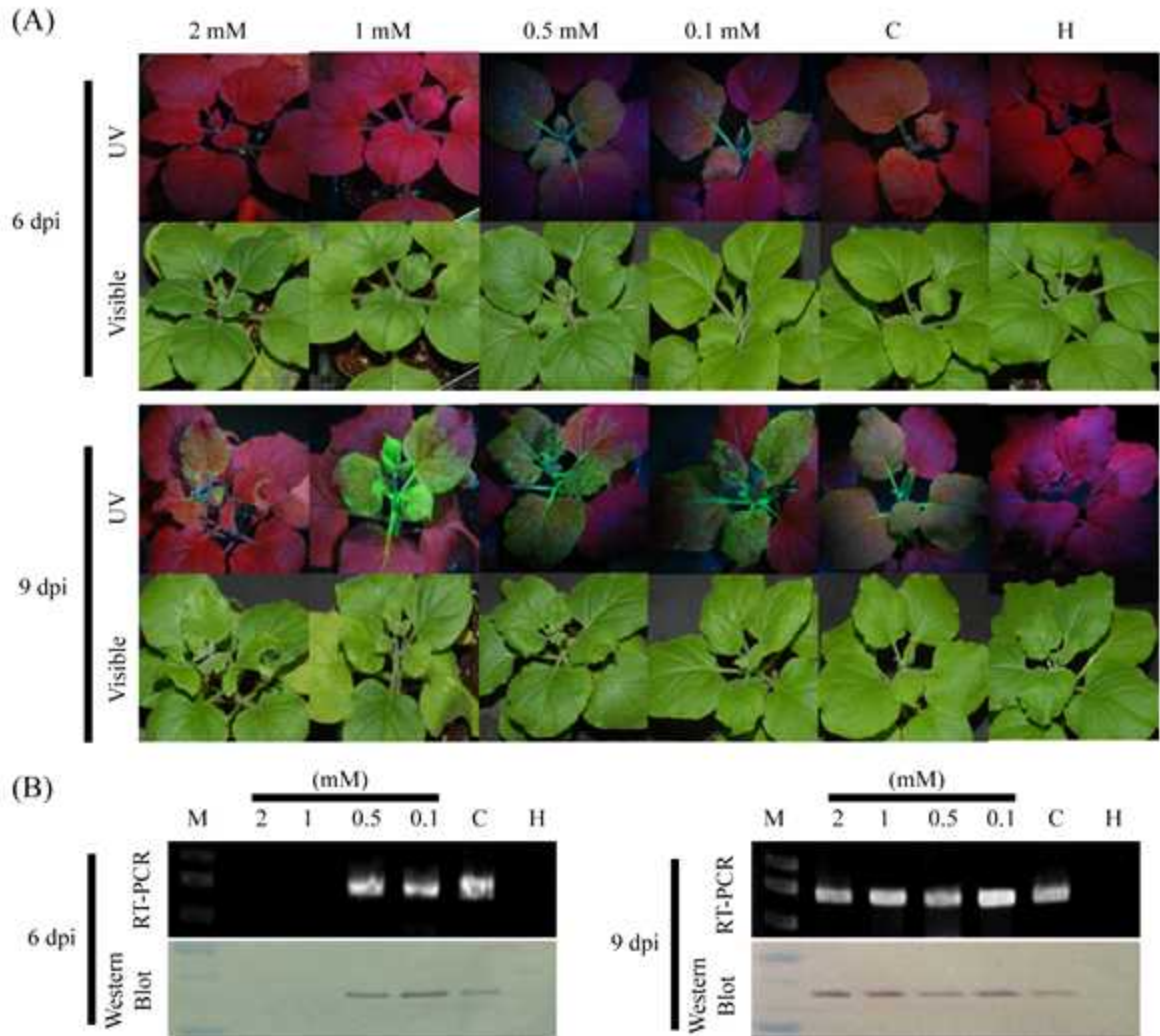


그림 13. Trichoderminol(2)의 담배에서 항바이러스 활성(inactivation effect).

- **Inactivation effect(고추):** 담배에서 우수한 활성을 보인 trichodermin(1)에 대하여 실제 농가에서 사용되는 고추 재배 품종(*C. annuum*, 마니파)에서 항바이러스 활성 검정을 수행함. 혼합액을 PepMoV의 전신감염기주식물인 고추 1개체의 떡잎포함 4개의 하엽에 50 $\mu$ L씩 접종함 (반복군 3개체).
- 실험결과, 담배에서 보다 높은 MIC 1 mM에서 항바이러스 활성 효과를 확인함. 또한, 담배에서 보이는 활성양상과 유사하게 control 대비하여 PepMoV-GFP의 확산이 지연됨을 UV상 GFP와 molecular analysis를 통하여 확인함 (그림 14).

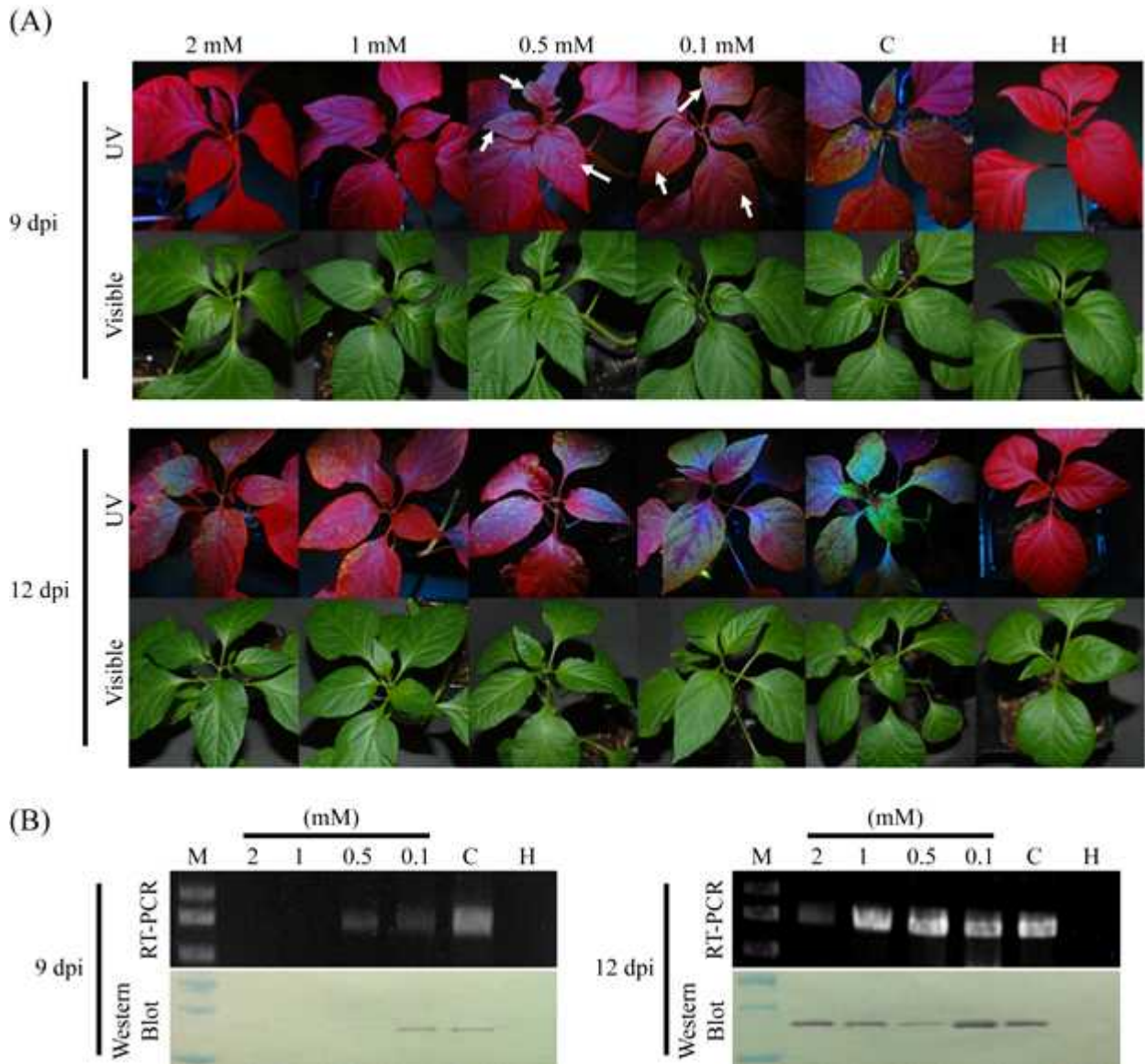


그림 14. Trichodermin(1)의 고추에서 향바이러스 활성(inactivation effect).

- **Protective effect(고추):** Trichodermin(1)에 대하여 고추에서 보호효과를 검증함. 1 mM의 0.1% DMSO에 녹인 trichodermin(1)을 건전한 고추의 떡잎 포함 하엽 4개에 50  $\mu$ L씩 고르게 바르고, 1시간 후 PepMoV-GFP 접종원을 이용하여 trichodermin(1)이 처리된 잎에 접종함 (3개체 반복)..
- 실험결과, buffer(0.1% DMSO with PBS)만 처리 후 PepMoV-GFP를 접종한 control 식물개체에서는 4일차부터 UV상 GFP가 관찰되어 점차 확산됨을 확인하였지만, trichodermin(1) 2 mM을 처리한 식물개체에서는 약 7일차부터 GFP가 관찰됨. 따라서, trichodermin(1)이 PepMoV-GFP의 확산을 지연됨을 확인하였으며, 이를 molecular analysis를 통하여 추가로 확인함 (그림 15).

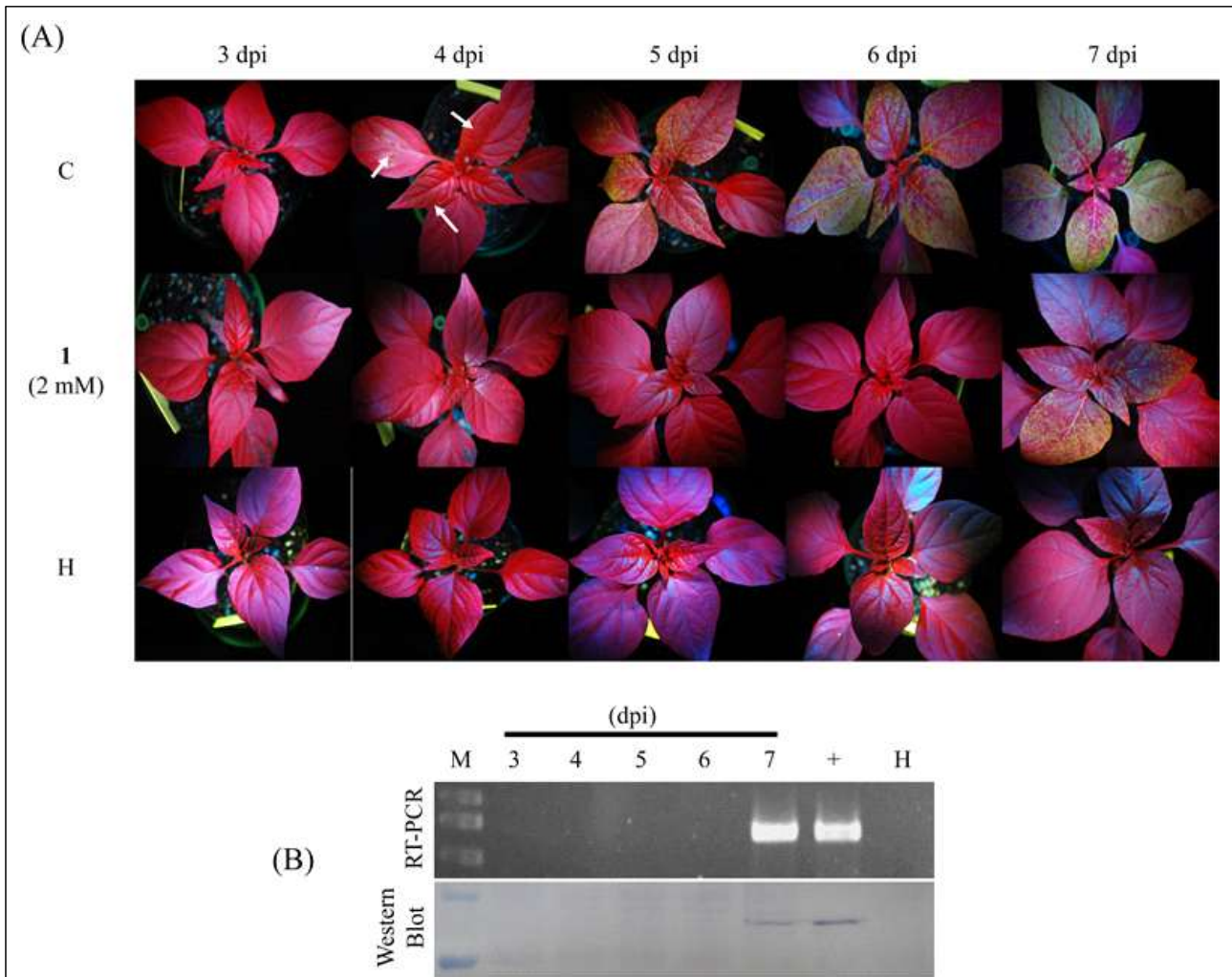


그림 15. Trichodermin(1)의 고추에서 향바이러스 활성화(protective effect).

- 본 실험을 통하여, *T. albolutelescens* 균주로부터 분리된 두 trichothecene 계열 화합물 (trichodermin, trichoderminol)은 전신감염기주 식물내에서 PepMoV의 확산을 지연시키는 것을 확인하였으며, 이를 토대로 식물바이러스에 대한 향바이러스 활성화 효과를 검증함.

(3). Half-leaf method를 이용한 향바이러스 활성화 검정 (TMV)

- Trichodermin(1)을 다양한 농작물에 피해를 입히는 TMV에 대하여 half-leaf method를 이용한 향바이러스 활성화 검정 수행.
- **Inactivation effect(담배):** 0.1% DMSO에 농도별로 녹인 trichodermin(1)과 TMV 접종원을 혼합한 후, TMV의 국부병반기주 식물인 담배(*N. glutinosa* L.) 잎에 접종시켜 생기는 국부병반(local lesion)의 수 계수를 통한 향바이러스 활성화 검정 수행. 담배의 잎에서 임의로 반으로 나눈 후, 좌측면은 trichodermin(1)과 TMV 접종원의 혼합물을 50  $\mu$ L 씩 접종하고, 우측면은 buffer(0.1% DMSO with PBS)와 TMV 접종원의 혼합액을 접종함 (3반복). 3일간 온실배양 후, 잎면의 국부병반의 수를 계수하여 inhibition rate 산출 및 IC<sub>50</sub> 값 산출함.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(C - T)/C] \times 100\%$$

(C: Average number of local lesions of the control,

T: Average number of local lesions of the treatment)

- 실험결과, TMV에 대하여 positive control인 ribavirin의 경우 1 mM에서 약 26.4%의 inhibition rate 나타내는 반면, trichodermin은 1 mM에서 약 93.0%의 우수한 항바이러스 활성을 나타냈으며, 농도별 실험결과 IC<sub>50</sub> 수치가 약 0.27 mM로 나타남 (표 2).

Inactivation effect	Inhibition rate	
	Trichodermin (1)	Ribavirin (Positive control)
1 mM	93.0%	26.4%
0.5 mM	86.5%	
0.25 mM	34.7%	
IC <sub>50</sub>	0.27 mM	

(n = 5)

표 2. TMV에 대한 trichodermin의 항바이러스 활성

- 본 실험을 통하여, *T. albolutezens* 균주로부터 분리된 trichodermin(1)은 PepMoV 뿐만 아니라 농작물에 심각한 피해를 주는 주요 식물바이러스 중 하나인 TMV에 대하여 항바이러스 활성을 보임을 확인함. 이를 통하여, trichodermin(1)이 다양한 식물바이러스 스펙트럼에 대하여 항바이러스 활성을 나타냄을 확인함. 특히 positive control인 ribavirin과 대조하여 우수한 항바이러스 효과를 나타냄으로서 항바이러스제로서의 개발가치가 높다고 판단됨.

#### 마. 활성 물질의 작용기전 연구 접근

Trichodermin(1)에 의한 PepMoV의 외형적 변화를 관찰하기 위하여 TEM(transmission electron microscope) 분석 수행.

##### (1). TEM 분석

- PepMoV-GFP에 감염된 leaf-disc를 MS배지가 담긴 24-wall plate에 띄운 후, 2 mM 농도의 trichodermin(1)을 혼합. 7일간 배양한 leaf disc를 갈아 grid를 만든 후 TEM 분석 수행.
- 실험결과, PepMoV 접종원과 buffer만 혼합된 leaf disc에서는 약 737 nm의 선형구조의 PepMoV가 다수 관찰되지만, trichodermin(1)을 처리한 leaf disc에서는 PepMoV의 particle이 다수 관찰되었으며, 온전한 형태의 PepMoV가 발견되지 않음 (그림 16).

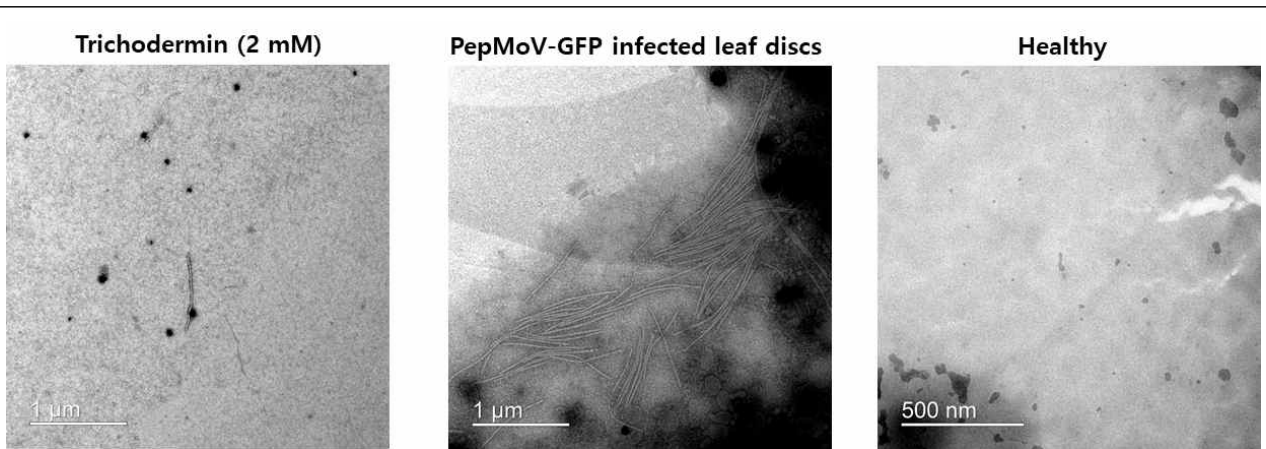


그림 16 TEM을 이용한 trichodermin(1) 처리 leaf disc 내 PepMoV

- 본 실험을 통하여, 항바이러스 활성 물질인 trichodermin(1)은 PepMoV의 외피단백질 (CP)에 영향에 대한 가능성을 확인할 수 있으며, 이를 기반으로 다양한 molecular analysis를 통한 기전 연구의 접근성을 제시함.

#### 마. Field test

PepMoV, TMV 등에 활성을 보이는 trichodermin(1)을 생성하는 *T. albolutescens* 추출물을 대량 확보하여 개방된 노지상태에서 식물에 처리하였을 때 약해 및 활성 등을 파악하며 대량 field test를 수행하기 위한 pre-test 수행.

##### (1). 약해실험

- *T. albolutescens* 추출물을 침지 혹은 분사 방법으로 농도별 기주식물(고추품종)에 처리하였을 때 식물의 약해 여부를 판단. 이를 통한 적정 투여 양 조정 (그림 17).

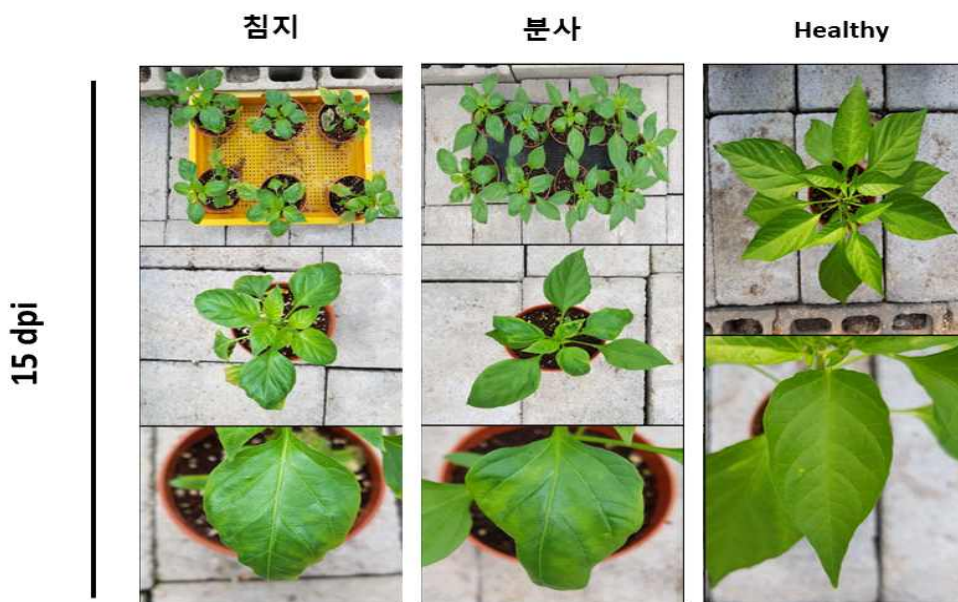


그림 17. *T. albolutescens* 추출물 처리에 따른 약해 실험

- 실험결과 침지법(개체당 1회 투여량: 2.9 mg)과 분사법(개체당 1회 투여량: 0.2 mg)에서 활성 농도인 1 mM에서 약해를 입지 않는 투여량을 확인하였으며, 이를 통하여 활성 농도 및 투여량 설정 (반복군 10개체).

## (2). Field test (pre-test)

- 개방된 노지에서 식물들에게 침지 혹은 분사 형태로 *T. albolutescens* 추출물을 투여한 후, 식물바이러스에 대한 항바이러스 효과 여부 파악하기 위한 pre-test 수행. 후속 연구에 따른 field test 수행 예정.

## 바. 향후 계획

- 본 실험의 결과에 따르면, *T. albolutescens* 균주 추출물 내 활성 물질인 trichodermin의 함량은 ELSD 분석 상 약 95% 이상으로 높은 함량을 보임(그림 7). 따라서, 다양한 배양 조건을 통한 trichodermin의 최대 산출 조건을 파악하고, 제형화를 통한 사업화 방안 모색.
- 활성물질인 trichodermin의 식물바이러스에 관한 작용기전 연구를 위하여 향후, real-time PCR을 통하여 정량적 항바이러스 효과를 확인하고, 식물바이러스의 각 단백질의 발현량을 확인하여 심화 있는 작용기전 연구수행. 이를 통한 항바이러스 효과의 과학적 규명 모색.
- 활성 농도에서 식물에 약해를 입지 않는 제시한 투여량을 기반으로 대량으로 field test 수행.

## 3.2. 연구개발성과

### 가. 논문

- Seung Mok Ryu, Jaeyoung Kwon, Young Hye Seo, Eun Gyeong Song, Seong Su Hong, Beom Seok Kim, Jin Sung Hong, Ki Hyun Ryu, Dongho Lee. Quassinoids isolated from *Brucea javanica* inhibit pepper mottle virus in pepper. *Virus Research* **2017**, *227*, 49-56.
- Seung Mok Ryu, Hae Min Lee, Eun Gyeong Song, Young Hye Seo, Jun Lee, Yuanqiang Guo, Beom Seok Kim, Jae-Jin Kim, Jin Sung Hong, Ki Hyun Ryu, and Dongho Lee. Antiviral Activities of Trichothecenes Isolated from *Trichoderma albolutescens* against Pepper Mottle Virus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*(21), 4273-4279.

### 나. 특허

- 이동호, 김재진, 류기현, 김범석, 류승목. 신규한 항바이러스용 조성물 및 이를 이용한 식물바이러스의 방제 방법. 대한민국 특허 등록 10-1680183 (2016/11/22)
- 이동호, 김재진, 류기현, 김범석, 류승목. 신규한 항바이러스용 조성물 및 이를 이용한

식물바이러스의 방제 방법. USA 특허 출원 15/032611 (2016/04/27)

- 이동호, 김재진, 류기현, 김범석, 류승목. 신규한 항바이러스용 조성물 및 이를 이용한 식물바이러스의 방제 방법. JAPAN 특허 출원 2016-525004 (2016/04/18)

### 3.3. 결론

본 결과를 통하여, *T. albolutescens* 추출물 및 주요 성분인 trichothecene 계열 물질들에 대한 항바이러스 활성 효과를 최초로 규명하였으며, 이를 기반으로 천연물 유래 항바이러스제 개발의 소스에 대한 우선권 확보 및 기반 기술 확보함.

## 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

### 4.1. 목표달성도

기존 과제 계획서에서 제시한 추진일정을 기반으로 2차년도에 걸친 연구의 목표를 달성함.

	세부연구내용	추진일정 (월)												달성도	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1차 년도 2016	활성 대량검정	■													100%
	대사체분석			■			■							100%	
	물질분리, 구조				■									100%	
공정률 (%)	월별	5	5	10	15	20	10	10	10	5	5	5			
	누계	5	10	20	35	55	65	75	85	90	95	100			
2차 년도 2017	활성 검정	■												100%	
	작용기전 연구			■									100%		
공정률 (%)	월별	5	5	10	15	15	15	15	10	5	5				
	누계	5	10	20	35	50	65	80	90	95	100				

### 4.2. 관련분야 기여도

식물바이러스에 대한 천연물 유래 항바이러스제 개발 연구는 국내 외 포함하여 그 수가 적기 때문에 본 연구결과는 신규성적인 측면이 매우 뛰어나며, 분야에서 선도적 위치를 선점할 가능성이 있다고 판단됨. 또한, 원천 기술 우선권 선점을 통하여 향후 제품 개발로 인한 시장 선점의 가능성이 크다고 판단됨.



### 5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>○ 심화적인 작용기전 연구 및 대량의 field test 실험이 필요로 함.</p> <p>○ 본 연구 결과를 기반으로, 논문 게재, 특허 출원을 하였으며 이를 통해 학술적 검증 및 기반 기술 우선권을 확보함. 따라서 향후 기업과의 기술이전 등을 통하여 상업화를 위한 추진이 필요함.</p>	

### 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p>○ 해당사항 없음</p>	

### 7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<p>○ 해당사항 없음</p>	

### 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

### 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p>본 연구수행기관인 고려대학교, 서울여자대학교, 강원대학교의 각 대학 안전관리 규정에 의거하여 이를 성실히 이행함.</p>	

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허 등록	신규한 항바이러스 용 조성물 및 이를 이용한 식물바이러 스의 방제 방법.	고려대		대한민국		2016.01.22		
2	특허 출원	신규한 항바이러스 용 조성물 및 이를 이용한 식물바이러 스의 방제 방법.	고려대		미국		2016.04.27		
3	특허 출원	신규한 항바이러스 용 조성물 및 이를 이용한 식물바이러 스의 방제 방법.	고려대		일본		2016.04.18		
4	논문	Quassinoids isolated from <i>Brucea javanica</i> inhibit pepper mottle virus in pepper.	고려대	교신	Virus Research	2.628	2017	중복사사	SCI/2
5	논문	Antiviral Activities of Trichothecenes Isolated from <i>Trichoderma</i> <i>albolutelescens</i> against Pepper Mottle Virus.	고려대	교신	Agricultur al and Food Chemistry	3.154	2017	중복사사	SCI/1

## 11. 기타사항

코드번호		D-13
○ 해당사항 없음		

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
<p>참고문헌 1. Li, Y.; Wang, L.; Li, S.; Chen, X.; Shen, Y.; Zhang, Z.; He, H.; Xu, W.; Shu, Y.; Liang, G., Seco-pregnane steroids target the subgenomic RNA of alphavirus-like RNA viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007, 104, 8083-8088.</p>	
<p>참고문헌 2. Ge, Y.-h.; Liu, K.-x.; Zhang, J.-x.; Mu, S.-z.; Hao, X.-j., The limonoids and their antitobacco mosaic virus (TMV) activities from <i>Munronia unifoliolata</i> Oliv. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 4289-4295.</p>	
<p>참고문헌 3. Ouyang, M.-A.; Wein, Y.-S.; Zhang, Z.-K.; Kuo, Y.-H., Inhibitory activity against tobacco mosaic virus (TMV) replication of pinoresinol and syringaresinol lignans and their glycosides from the root of <i>Rhus javanica</i> var. <i>roxburghiana</i>. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 6460-6465.</p>	
<p>참고문헌 4. Luo, Y.; Zhang, D.-D.; Dong, X.-W.; Zhao, P.-B.; Chen, L.-L.; Song, X.-Y.; Wang, X.-J.; Chen, X.-L.; Shi, M.; Zhang, Y.-Z., Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. FEMS Microbiol. Lett. 2010, 313, 120-126.</p>	
<p>참고문헌 5. Zhou, W.-W.; Zhang, L.-X.; Zhang, B.; Wang, F.; Liang, Z.-H.; Niu, T.-G., Isolation and characterization of ZH14 with antiviral activity against Tobacco mosaic virus. Can. J. Microbiol. 2008, 54, 441-449.</p>	
<p>참고문헌 6. Lee, M. Y.; Song, Y. S.; Ryu, K. H., Development of infectious transcripts from full-length and GFP-tagged cDNA clones of Pepper mottle virus and stable systemic expression of GFP in tobacco and pepper. Virus Res. 2011, 155, 487-494.</p>	

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.