

방선균 분리주 No. 2007-18이 생산하는 Protein Kinase C 저해물질, MT-2007

안종석* · 박문수 · 안순철 · 박찬선¹
오원근 · 윤병대 · 이현선 · 민태익
한국과학기술연구원 유전공학연구소 미생물공학연구실

MT-2007, Protein Kinase C Inhibitor from Actinomycetes Isolate No. 2007-18

Ahn, Jong-Seog*, Moon-Su Park, Soon-Cheol Ahn, Chan-Sun Park,
Won-Ken Oh, Byung-Dae Yun, Hyun-Sun Lee and Tae-Ick Mheen

Laboratory of Microbial Technology, Genetic Engineering Research
Institute, KIST P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea

Abstract — During the screening of inhibitors against protein kinase C(PKC) and the bleb formation of K562 cell induced by phorbol ester from microbial secondary metabolites, MT-2007 was purified by solvent extraction, and chromatographic techniques from Actinomycetes isolate No. 2007-18. It showed completely suppression of bleb formation of K562 cell surface induced by phorbol 12,13-dibutylate at the concentration of 503.9 μ M and IC_{50} on PKC was 31.4 μ M. Its structure was postulated as lasalocid A sodium salt by physico-chemical properties and UV, IR, MS, ¹H-NMR.

Protein kinase C(PKC, Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase)는 세포내 신호전달 뿐만 아니라 세포반응조절, 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 하고 있다(1-3). 이 효소는 phospholipase C에 의한 phosphoinositide의 가수분해에 의해 생성된 diacylglycerol과 Ca^{2+} 에 의해 활성화되며(4, 5), 또한 tumor promoter인 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA)와 phorbol-12,13-dibutylate(PDBu)같은 phorbol ester들에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다(6, 7).

이제까지 알려진 PKC의 세포반응조절의 다양한 역할로 인하여 선택적인 PKC 저해제가 항암제를 비롯하여 신경계, 순환계질환, 면역계질환의 치료제로의 개발가능성을 보여주고 있어 이들에 대한 탐색이 이루어지고 있다(8-11). 현재 임상적으로 사용되는 약물로서 PKC 저해활성이 있는 약물로는 tamoxifen,

adriamycin, trifluoroperazine, chlorpromazine, polymixin B, aminoacridine 등을 들 수 있으며, 합성품인 Et-18-OMe, HAG, HMG, H-7 등과 lipoidal amine 계열의 sphinganine, palmitoylcarnitine 등은 강력한 PKC 저해제로 알려져 있다(8, 12). 천연물 유래의 PKC 저해제는 거의 대부분이 미생물유래 대사산물로서 staurosporine 유도체, calphostin, sangivamycin 등이 알려져 있다. 저자 등은 PKC 저해제를 탐색할 목적으로 K562 세포주를 이용한 blebforming assay와 PKC 효소활성검정을 병용하여 토양미생물로부터 PKC 저해활성 균주를 선별하여 방선균 분리주 No. 2007-18로부터 PKC 저해물질을 분리하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

활성균주의 배양

본 연구실에서 분리한 방선균 분리주 No. 2007-18의 배양조건은 다음과 같다. 종배지로는 1당 glucose

Key words: Actinomycetes, protein kinase C inhibitor, lasalocid A

*Corresponding author

20 g, soluble starch 10 g, K_2HPO_4 0.5 g, yeast extract 4 g, soytone 10 g이 함유된 배지를 사용하였고 본 배양은 L당 glucose 10 g, soluble starch 20 g, K_2HPO_4 0.05 g, NaCl 2 g, yeast extract 4 g, soybean meal 25 g, $CaCO_3$ 2 g이 함유된 항생물질 생산용 배지 10 L에 30°C, 3일간 배양한 종배양액 2%를 접종하여 발효조에서 통기량 0.5 vvm, 교반속도 200 rpm, 온도 30°C에서 7일간 배양하였다.

시약 및 사용기기

Protein kinase C 효소활성측정에 사용된 staurosporine, PDBu(phorbol 12, 13-dibutylate), histone III-S와 phosphatidylserine은 Sigma Co.에서, diolein은 Serdary Research Lab.에서 [γ - ^{32}P] ATP는 Amersham Co.에서 구입하여 사용하였으며, K562 cell의 배양을 위한 RPMI1640 배지는 GIBCO, fetal calf serum은 Hyclone Co.에서 구입하여 사용하였다. 분리주 No. 2007-18의 배양은 14 L jar fermentor(New Brunswick Scientific Co.)를 사용하였다. TLC는 silica gel 60F254 glass plate(Merk Co.)와 RP-18 F254 S(Merk Co.)를 사용하였으며 column chromatography에는 silica gel(70~230 mesh, Merk Co.)와 ODS RP-18 (40~63 μ m, Merk Co.)을 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-6A를 사용하였고, UV absorption spectrum은 Shimadzu UV 260 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 1H -NMR spectrum은 Bruker AMX-500 NMR spectrometer로 측정하였으며 내부 표준물질로는 TMS를 사용하였다. 그리고 mass spectrum은 Concept-IS mass spectrometer를 사용하여 측정하였다.

Bleb forming assay

Bleb forming assay는 Osada 등(13)의 방법을 수정하여 실험하였다. 세포주로는 K562 cell(human chronic myelocytic leukemia cell)을 사용하였다. 배지로는 10% fetal calf serum을 함유한 RPMI1640 배지를 사용했으며, 5% CO_2 농도, 37°C의 조건으로 CO_2 incubator에서 배양하였다. 1×10^5 cell/ml의 농도로 하여 96-multiwell plate의 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 시료용액 10 μ l를 첨가하고, 37°C의 CO_2 incubator에서 1시간 배양하여 세포의 이상유무를 역상현미경상에서 관찰하였다. 그후 PDBu를 1 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가하고 10분 후 K562 세포의 표면에 나타난 소포(bleb)의 형성정도를 역상현미경에서 관

찰하였다. 소포형성저해의 판정기준은 K562에 검정시료대신 staurosporine을 첨가한 것을 positive control로 하고, 검정시료를 첨가하지 않고 PDBu만을 첨가한 것을 negative control로 하여 시료용액을 첨가한 검정구와의 bleb형성 저해정도를 비교하여 20~40% : +, 40~60% : + \pm , 60~80% : ++, 80~95% : ++ \pm , 95% > : +++로 나타냈다.

Protein kinase C 효소활성 측정

PKC는 Huang 등(14)의 방법에 따라 소뇌로부터 부분정제하여 사용하였다. PKC 효소활성측정은 Ca^{2+} , phospholipid와 diolein의 존재하에 기질인 histone III-S에 [γ - ^{32}P]ATP의 ^{32}P 가 phosphorylation되는 정도를 측정하였다. 반응액 25 μ l에는 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM magnesium acetate, 0.12 mM [γ - ^{32}P]ATP(4×10^4 cpm/ μ l), 0.25 mM EGTA, 0.4 mM $CaCl_2$, phosphatidylserine 2.5 g, diolein 0.5 g, histone III-S 25 g과 PKC 효소액 5 μ l를 포함한다. 여기에 검정시료 5 μ l를 첨가하고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid(TCA) 용액 20 μ l로 미리 적신 cellulose-Pi paper 반응액 10 μ l를 점적하고 말린 후 0.2 M KCl이 함유된 5%-TCA 용액으로 전개시킨 paper 하단부 2 cm 정도를 절단하여 scintillation counter를 사용하여 histone III의 인산화 정도를 측정하였다. 이때 background로 phosphatidylserine과 diolein을 뺀 반응액을 사용하여 검정시료의 protein kinase 활성저해 정도를 조사하였다.

항균활성 측정

항균활성을 측정하기 위하여 피점균을 접종한 검정 plate를 제작하여 시료용액 50 μ l를 paper disk에 흡수시킨 뒤 검정 plate에 올려놓고 30~37°C 항온기에서 배양하여 나타나는 생육저지환을 관찰하였다.

결 과

방선균 분리주 No. 2007-18의 분리

전국 각지에서 채취한 토양으로부터 분리한 방선균들은 항생물질 생산용 배지에서 7일간 배양한 배양액의 acetone 추출물에 대하여 소포저해활성과 PKC 효소저해 활성효과를 조사하여 강한 활성을 나타내는 분리주 No. 2007-18을 선별하였다.

활성물질의 분리, 정제

배양액을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양상등액과 균체로 나눠 활성물질을 분리하였다. 균체는 70% acetone으로 세포내의 활성물질을 추출하여 배양상등액의 활성물질 부분과 합쳐 감압농축한 후 이를 소량의 증류수에 현탁시켜 EtOAc로 용매추출하였다. EtOAc 추출물을 CHCl_3 : MeOH(30 : 1~10 : 1)의 전개용매로 silica gel column chromatography하여 활성물질을 분획하였다. 이 활성분획물을 Lobar low pressure LC(RP-18)을 실시하고, 용출된 활성분획물을 다시 Prep. TLC(silica gel, CHCl_3 : MeOH=10 : 1)하여 단일 spot를 나타내는 분획만을 모아 감압농축한 후 MeOH로 재결정화하여 무색침상 결정물을 얻어 이를 MT-2007로 명명하였다.

Table 1. Physico-chemical properties of MT 2007

Appearance	Colorless needles
Solubility	
soluble	EtOAc, CHCl_3 , MeOH, DMSO
insoluble	Hexane, H_2O
Color reaction	
positive	20% H_2SO_4 , 2% FeCl_3 , I_2 , anisaldehyde- H_2SO_4 Dragendorff's, molybdophosphoric acid
negative	Ninhydrin, Ehrlich, aniline phthalate
TLC (Rf) ^a	0.51
(Rf) ^b	0.46

^aprecoated silica gel 60F₂₅₄ plate(Merck).
solvent system: CHCl_3 /MeOH(10/1)

^bprecoated Rp-18 plate(Merck).
solvent system:MeOH/ H_2O (9/1)

MT-2007의 물리·화학적 성질

MT-2007의 물리·화학적 성질은 Table 1에 나타내었다. MT-2007은 무색침상 결정으로서 용해성은 CHCl_3 , EtOAc, MeOH, DMSO에는 용해되었으며, n-Hexane, H_2O 에는 불용이었다. MT-2007의 정색반응은 20% H_2SO_4 , I_2 , anisaldehyde- H_2SO_4 , Dragendorff's, 2% FeCl_3 , molybdophosphoric acid 등에는 양성이었고, ninhydrin, Ehrlich, aniline phthalate에는 음성이었다.

MT-2007의 구조동정

UV spectrum의 흡수극대파장(245 nm와 308 nm)과 IR spectrum의 1596 cm^{-1} 의 carboxylate, 1704 cm^{-1} 의 ketone, $3300\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 의 hydroxyl group의 존재로부터 이물질은 polyether 계열의 lasalocid 유도체의 salt 형태의 물질로 추정하였으며, FAB-MS의 m/e 613과 m/e 635로부터 MT-2007은 분자량 612의 lasalocid A의 sodium salt로 추정할 수 있었다(15). $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 1)은 6.85 ppm(1H, d. J=7.5 Hz)와 6.29 ppm(1H, d. J=7.5Hz)에서 aromatic ring의 ortho-coupled proton과 0.71 ppm(3H, t. J=7.3 Hz), 0.76 ppm(3H, t. J=7 Hz), 0.81 ppm(3H, d. J=5.5 Hz), 1.01 ppm(3H, d. J=6.5 Hz), 1.11 ppm(3H, d. J=7 Hz)과 0.94 ppm에서 1개의 douplet(3H)와 1개의 triplet(3H)가 중복되어 triplet(J=7.5 Hz)으로 나타나는 것으로부터 3개의 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 와 4개의 $=\text{CH}-\text{CH}_3$ 가 존재함을 보여주고 있으며, 2.2 ppm의 singlet은 aromatic methyl을 보여주고 있다. 이제까지 알려진 lasalocid 유도체는 lasalocid A, B, C, D, E로서 lasalocid A 이

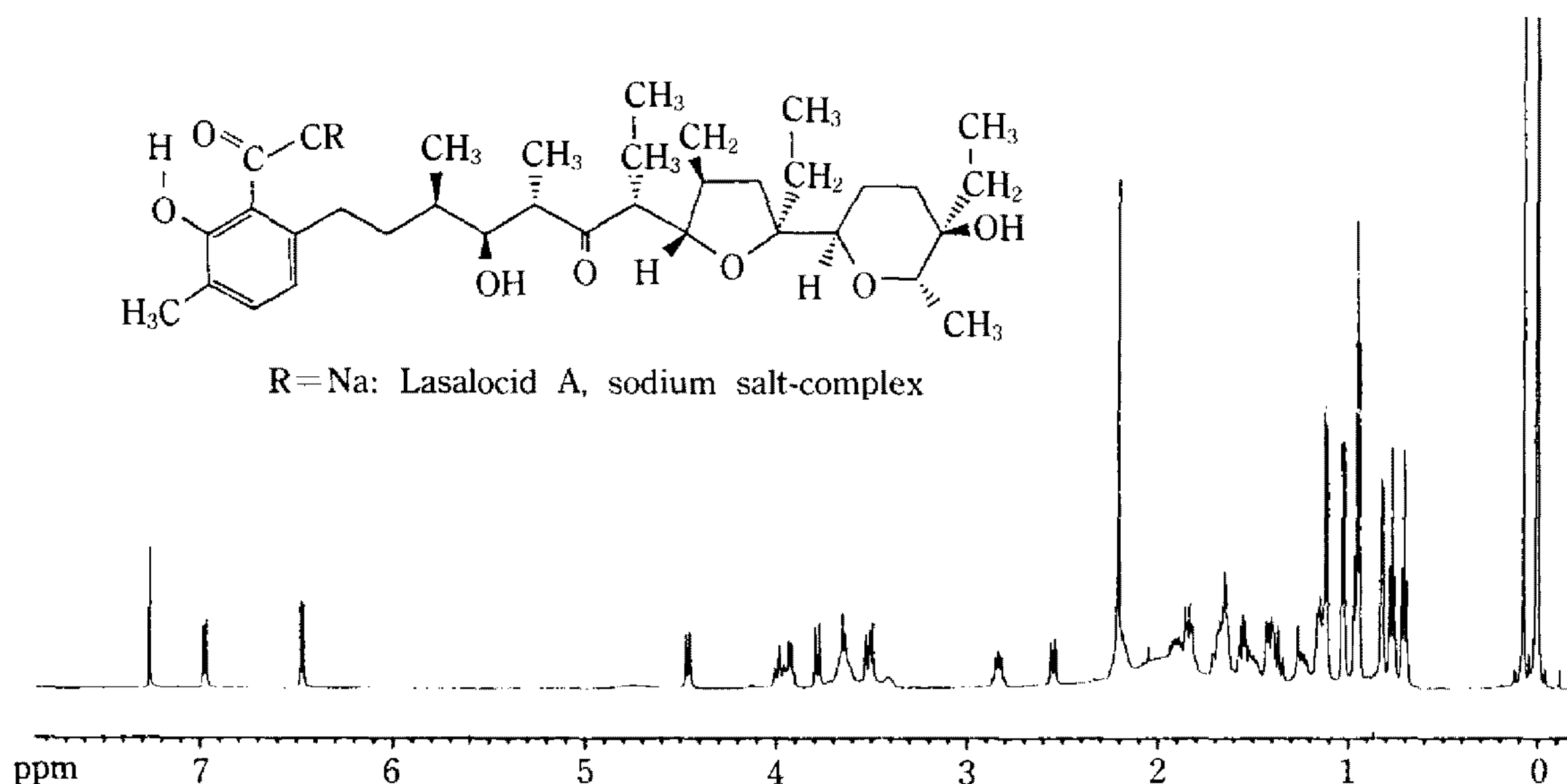


Fig.1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of MT-2007 (CDCl_3 , 500 MHz).

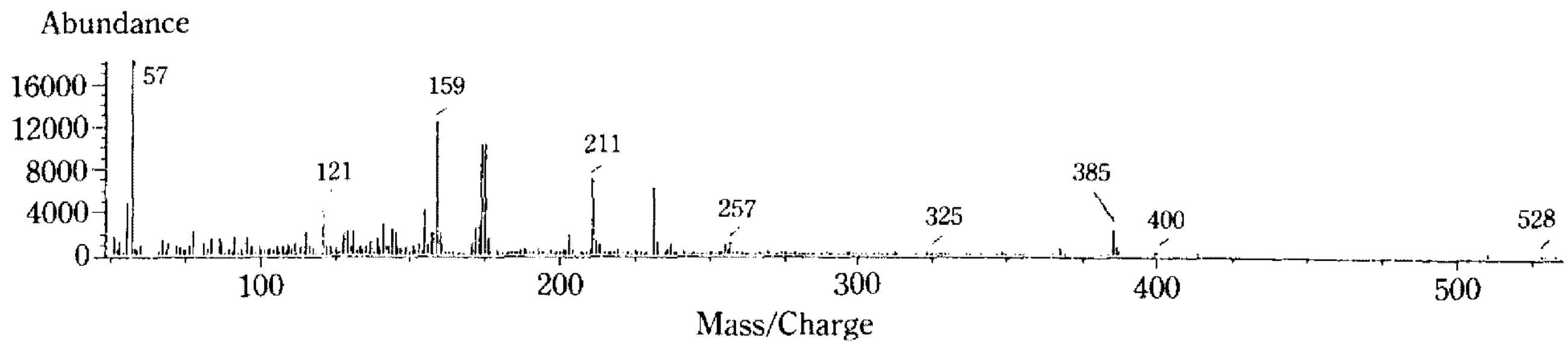


Fig.2. EI-MS spectrum of MT-2007.

Table 2. Antimicrobial activity of MT-2007

Test organisms	Inhibition zone(mm)*
Gram(+) bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	15
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	19
Gram(-) bacteria	
<i>Escherichia coli</i> BE 1186	—
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	—
Yeast	
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	10
Fungi	
<i>Alternaria mali</i> IFO 8984	—

*Dosage: 50 µg/disc, paper disc method

외의 유도체는 분자내에 4개의 ethyl group을 가지고 있어 lasalocid A의 분자량과는 14 mass unit 차이가 나며 이들의 MS fragmentation pattern의 차이로부터 이들을 구별할 수 있다(16). MT-2007의 EI-MS(Fig. 2)의 경우 분자이온은 볼 수 없었으며 M^+ 로부터 H_2O , CO_2 , sodium의 탈락에 기인한 m/e 528의 peak와 계속해서 tetrahydropyranyl ring의 탈락에 기인한 m/e 385, 231, 175, 121과 McLafferty rearrangement에 의한 m/e 211, 155, 57의 fragment ion을 볼 수 있었으며 이같은 pattern은 lasalocid A의 그것과 거의 일치함을 볼 수 있었다. 이상의 결과로부터 MT-2007은 분자량 612를 갖는 lasalocid A의 sodium salt로 동정하였다.

MT-2007의 생물학적 활성

MT-2007은 31.4 µM의 농도에서 phorbol ester에 의해 유도되는 K562 세포표면의 bleb 형성을 저해하기 시작하여 503.9 µM의 농도에서 bleb 형성을 완전히 억제하였고 31.4 µM의 농도에서 50%의 protein kinase C 효소저해 활성을 나타냈다. 또한 MT-2007은 Gram(+) bacteria 중 *Staphylococcus aureus* 209,

다제 내성 변이주인 *Staphylococcus aureus* R-209와 *Candida albicans*에 항균활성을 나타내지만 Gram(-) bacteria에 대해서는 전혀 항균활성을 나타내지 않았다(Table 2).

고 찰

Protein kinase C는 세포내에 극히 미량으로 존재하고 각각의 조직이나 세포의 종류에 따라 수종의 isozyme으로 존재하며, 세포내에는 PKC와는 다른 여러 종류의 protein kinase가 존재하기 때문에 이들과 PKC를 분리하여 활성을 측정하기가 간단하지 않다. 또한 PKC 효소활성은 [$r\text{-}^{32}\text{P}$]ATP를 사용하여 기질인 histone III의 ^{32}P -인산화 정도를 측정해야 하므로 radioisotope를 사용하는 불편함이 따른다. 따라서 미생물 배양액을 비롯한 많은 수의 천연물 시료에 대한 PKC 저해활성을 검정하는데 더욱 어려움이 야기된다. 따라서 본 실험에서는 강력한 tumor promoter인 phorbol ester 화합물이 PKC의 activator이고 phorbol ester의 세포내 수용체가 PKC라는 사실을 이용하여 phorbol ester 투여시 세포형태 변화를 일으키는 K562 세포를 이용하여 PKC의 활성화 정도를 1차적으로 판단하고자 하였으며, 이 세포는 다루기 쉽고 현미경관찰이 용이한 장점을 가지고 있다. 또한 phorbol ester에 의해 PKC가 활성화되면 세포표면에 작은 소포(bleb)들이 형성되며 이 현상은 강력한 PKC 저해제인 staurosporine, H-7 등에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다. 저자 등은 이와 같은 현상을 이용하여 Osada 등(13)이 개발한 방법을 약간 변형한 bleb-forming assay를 PKC 활성저해물질 탐색의 1차검색법으로 이용했으며, 1차검색 결과 bleb 형성억제활성을 나타내는 시료에 대하여 소뇌로부터 부분정제한 PKC 효소활성저해 효과를 검토하였다. 현재까지 알려진 미생물 유래 PKC 저해제는 indolocarbazole alkaloid인 staurosporine류의 물질들과 pe-

rylenequinone인 calphostin류의 물질들 및 nucleoside인 sangivamycin 등의 PKC 저해물질들이 보고되어 있으나 polyether 계열의 lasalocid 유도체의 K562 세포표면의 소포형성저해 및 PKC 효소를 억제한다는 것은 본 논문에서 처음으로 보고하는 것이다.

요 약

미생물 대사산물로부터 phorbol ester에 의해 유도되는 K562 세포 표면의 소포형성 및 Protein kinase C(PKC)에 대한 저해제를 탐색하여 방선균 분리주 No. 2007-18로부터 용매추출 및 크로마토그래피의 기법을 이용하여 MT-2007을 분리하였다.

MT-2007는 503.9 μ M의 농도에서 phorbol 12,13-dibutylate에 의해 유도된 K562 세포표면의 bleb 형성을 완전히 저해하였고, PKC 효소의 IC₅₀값은 31.4 μ M이었다. MT-2007의 구조는 물리·화학적 성질과 UV, IR, MS, ¹H-NMR에 의해서 lasalocid A sodium salt로 동정하였다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 첨단요소연구 개발사업비와 선도기술개발사업비의 일부에 의해 수행되었음을 밝히는 바입니다.

참고문헌

1. Takai, Y., A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori and Y. Nishizuka. 1979. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipid. *J. Biol. Chem.* **254**: 3692-3695.
2. Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**: 693-698.
3. Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. 1986. *Science* **233**: 305-312.
4. Takai, Y., A. Kishimoto, U. Kikkawa and Y. Nishizuka. 1979. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **91**: 1218-1224.
5. Kishimoto, A., Y. Takai, T. Morri, U. Kikkawa and Y. Nishizuka. 1980. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol and its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **255**: 2273-2276.
6. Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol ester. *J. Biol. Chem.* **257**: 7847-7851.
7. Niedal, J.E., L.J. Kuhn and G.R. Bandenberg. 1983. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 36-40.
8. Powis, G. 1991. Signalling targets for anticancer drug development. *Tips*, **12**: 188-194.
9. Sugiura, M., T. Inagami, M.T. Gregory and A. Johns. 1989. Endothelin action inhibition by a protein kinase C inhibitor and involvement of phosphoinositols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**: 170-176.
10. Whatley, P.E., G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre and S.M. Prescott. 1990. Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells. *Prog. Lipid. Res.* **29**: 45-63.
11. Powis, G. and A. Kozikowski. 1991. Growth factor and oncogene signalling pathways as targets for traditional drug development. *Clin. Biochem.* **24**: 385-397.
12. Gescher, A. and I.L. Dale. 1988. Protein kinase C a novel target for traditional anticancer drug design. *Anti-Cancer Drug Design* **4**: 93-105.
13. Osada, H., J. Magae, C. Watanabe and K. Isono. 1988. Rapid screening method for inhibitors of protein kinase C. *J. Antibiot.* **41**: 925-931.
14. Huang, K.P., F.L. Huang, H. Nakabayashi and Y. Yoshida. 1988. Biochemical Characterization of rat brain protein kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* **263**: 14839-14845.
15. Westley, J.W., R.H. Evans, Jr., T. Williams and A. Stempel. 1970. Structure of Antibiotic X-537A. *Chem. Commun.* **1970**: 71-72.
16. Westley, J.W., W. Benz, J. Donahue, R.H. Evans, Jr., C.G. Scott, A. Stempel and J. Berger. 1974. Isolation and structure determination of Lasalocid A. *J. Antibiot.* **27**: 744-753.

(Received December 5, 1992)