

## *Streptomyces floridiae* SHS-1372가 생산하는 항암항생물질 HS-1의 특성

하상철<sup>1</sup> · 홍순덕\*

<sup>1</sup>KIST, 유전공학 연구소 생물공학 연구실, 경북대학교 자연과학대학 미생물학과

### Characteristics of Antitumor Antibiotics HS-1 from a *Streptomyces floridiae* SHS-1372

Ha, Sang-Chul<sup>1</sup> and Soon-Duck Hong\*

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology, Genetic Engineering Research Institute, KIST,  
P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea  
Department of microbiology, College of Natural Sciences,  
Kyungpook national university, Taegu 702-701, Korea

**Abstract** — Antitumor antibiotic HS-1 was purified from the culture broth of a *streptomyces floridiae* SHS-1372 which had been isolated from soil, by solvent extraction, silica gel column chromatography and gel filtration. It was confirmed that HS-1 was active against gram positive bacteria and cancer cells(K562, P388, MCF-7, HT-29). Through the analysis of UV spectrum, melting point, IR spectrum, FAB-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, 2D-NMR spectra, HS-1 could be identified as the actinomycin X<sub>2</sub> antibiotics containing actinocine chromophore and peptides consisted of threonine, proline, methylvaline, sarcosine, D-valine and 4-ketoproline.

수많은 질병중에서도 암은 한국인의 사망원인의 제 1위를 차지하고 그 사망자수는 매년 증가하고 있어 암은 문자 그대로 인류의 숙적이다. 암을 극복하기 위해 여러가지 치료법이 개발되고 있지만 그 중에서도 항암제에 의한 화학 요법은 가장 기대되는 영역의 하나이다.

Umezawa(1)가 *Streptomyces*속에서 sarkomycin을 발견하고 Hackmann에 의해 actinomycin C가 강한 항종양작용이 있는 것을 발견하였다. 이들의 발견이 인화점이 되어 미생물의 2차 대사 산물에서 항종양 물질을 찾는 연구가 급속히 발전되어 새로운 항종양 항생물질이 많이 발견되었다(2-7).

항종양 항생물질의 작용에는 DNA 합성 저해, RNA 합성 저해, 기질의 analogue로써의 nucleotide 생합성 저해, 효소반응저해에 의한 nucleotide의 생합성 저해, 단백질 생합성 저해등이 있고, 그 전부가 DNA에 직접 작용한다. 저자들은 위암세포를 이용하여 새로운 항암 항생물질의 탐색을 목적으로 전국 각지의 토양을 채취하여 이들로부터 방선균을 분리한 뒤, 항암활성이

강한 *S. floridiae* SHS-1372가 생산하는 항암 항생물질 HS-1을 분리 정제하여 이화학적 성질을 조사하고 기기분석을 통하여 구조를 결정하였다.

### 재료 및 방법

#### 활성균주의 배양

토양으로부터 분리한 방선균 No.1372를 사용하여 하등(8)의 배지 조성 및 배양 조건으로 4L를 3일간 배양하였다.

#### 항암항생물질의 분리 정제

3일간 배양한 배양액을 원심분리하여 균체와 상등액을 분리하였다. 균체를 acetone으로 추출한 후 농축한다. 농축된 여액을 pH 7.0으로 조절한 후 ethyl acetate로 다시 추출한 뒤 농축하였다. 이를 silica gel column chromatography에서 chloroform : methanol (30 : 1)을 용매로 하여 활성분획을 용출시키고 활성분획을 preparative gel TLC plate(0.5 mm)에 loading한 후 chloroform : methanol(20 : 1)의 전개 용매로 전개시킨 후 활성물질을 분리한 후 sephadex LH-20 column과 chloroform:methanol(1 : 1) 용매를

**Key words:** Antitumor antibiotics HS-1, *Streptomyces floridiae* SHS-1372, actinomycin X<sub>2</sub>

\*Corresponding author

사용한 chromatography를 행한 뒤 150 mg의 HS-1을 얻었다.

**암세주에 대한 세포 독성 측정**

HS-1의 항암활성을 조사하기 위해 부유세포로는 사람의 백혈병 세포 K-562, mouse의 P388과 접착세포로 위암세포인 HT-29 colon cell과 유방암 세포인 MCF-7 cell을 사용하였다. 이 세포들은 corning plastic dish에의 RPMI 1640배지에 10%의 fetal calf serum을 첨가시켜서 계대 배양하여 IC<sub>50</sub>치를 측정하였다. 약제처리시에는 부유세포의 경우 2.0×10<sup>4</sup> cell/ml의 농도로 4시간 배양한 뒤 약제를 첨가하였으며 접착세포의 경우는 24시간 배양한 뒤에 약제를 처리하여 각각 72시간 후에 coulter counter로 세포수를 측정하였다.

**사용기기**

HS-1의 분리 정제에서 UV absorption spectrum은 shimadzu UV-265 FW spectrophotometer를 사용하여 얻었으며 FAB-MS는 일본 전자사 HX-110 질량 분석기를 이용하였고 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR은 Jeol JNM GX-500 NMR spectrometer를 사용하여 분석하였다.

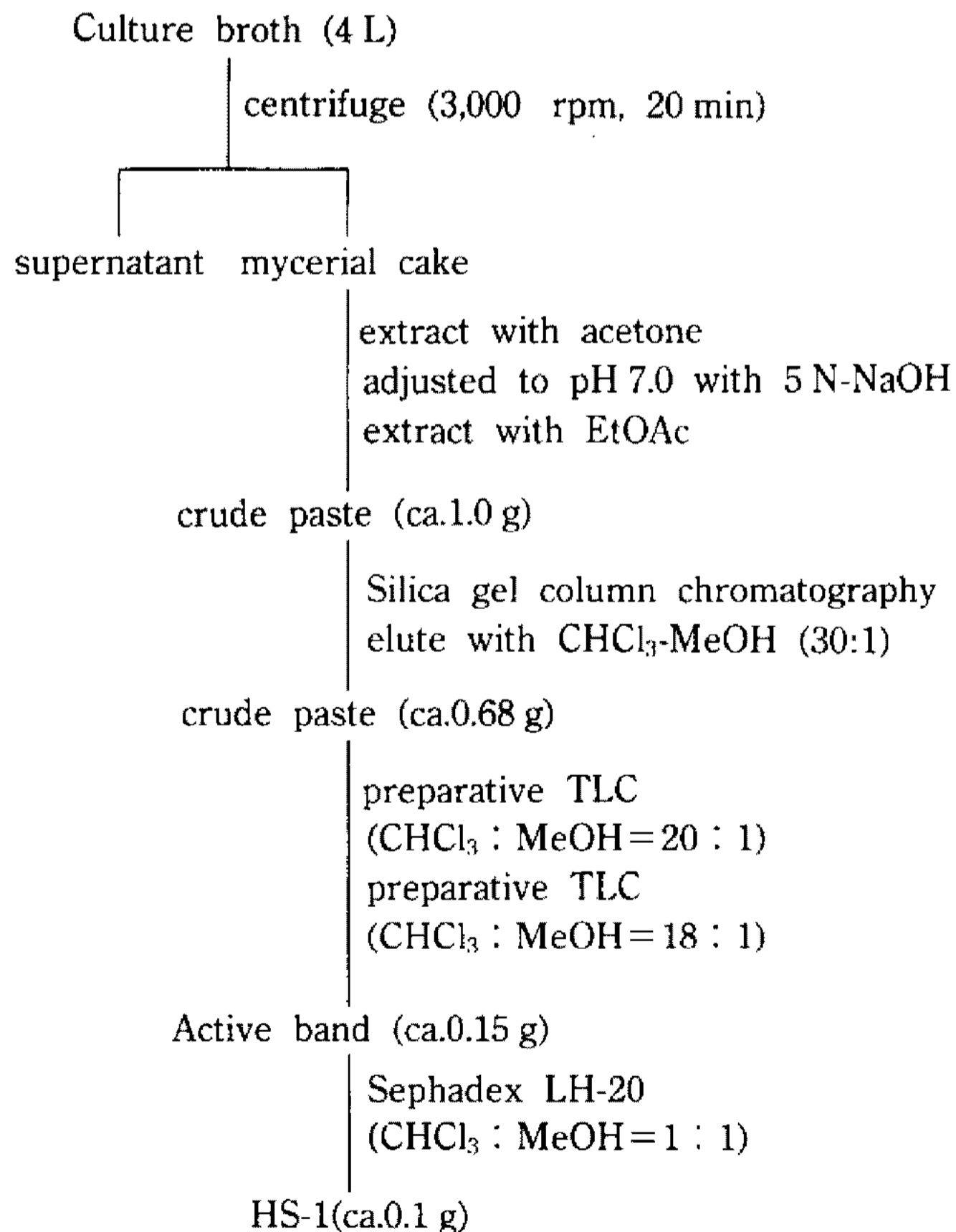


Fig. 1. Purification procedure of antibiotic HS-1 produced by *streptomyces floridae* SHS-1372.

**결과 및 고찰**

**항생물질 HS-1의 분리 정제**

*Streptomyces floridae* SHS-1372를 4 L 배양하여 원심분리 후 균체를 acetone으로 추출 농축 후 다시 ethyl acetate로 추출하여 1g의 조시료를 얻었으며 silica gel column chromatography를 행한 뒤 0.68 g을 얻었으며 prep. TLC를 행한 뒤 0.15 g의 시료를 얻은 후 sephadex LH-20 column chromatography에 의해서 순수한 HS-1을 얻었다(Fig. 1).

**이화학적 성질**

항생물질 HS-1의 이화학적 성질은 Table 1과 같다. HS-1는 붉은색 결정이며 산, 알칼리에 상당히 안정하고 chloroform, methanol, ethyl acetate등의 유기 용매에는 잘 녹으나 hexane에는 거의 녹지 않는다. 융점은 248~250°C 에서 분해되었다.

**UV 흡수 spectrum**

항생물질 HS-1의 UV 흡수 spectrum은 Fig. 2와

Table 1. Physio-chemical properties of HS-1

appearance	red needle
melting point	248~250°C (decomposition)
mass spectrum	m/z, 1269 (M <sup>+</sup> )
UV λ <sup>MeOH</sup> <sub>max</sub> mm	219, 440
IR ν <sup>KBr</sup> <sub>max</sub> cm	
solubility :	
soluble	chloroform, MeOH, EtOAc, acetone
insoluble	n-hexane, water
TLC SiO <sub>2</sub>	
benzene : methanol (9 : 1)	Rf 0.46
CHCl <sub>3</sub> : methanol (20 : 1)	Rf 0.56
ethylacetate : CHCl <sub>3</sub> (6 : 4)	Rf 0.45

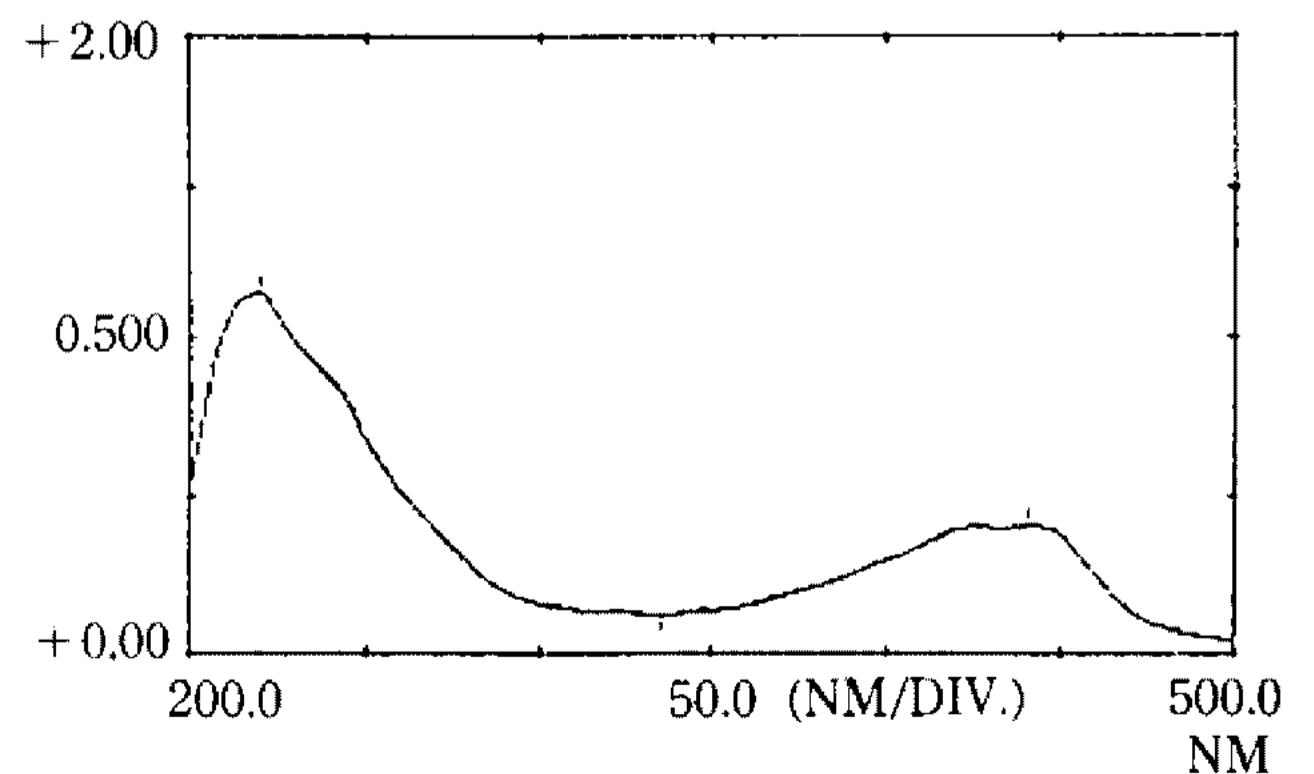
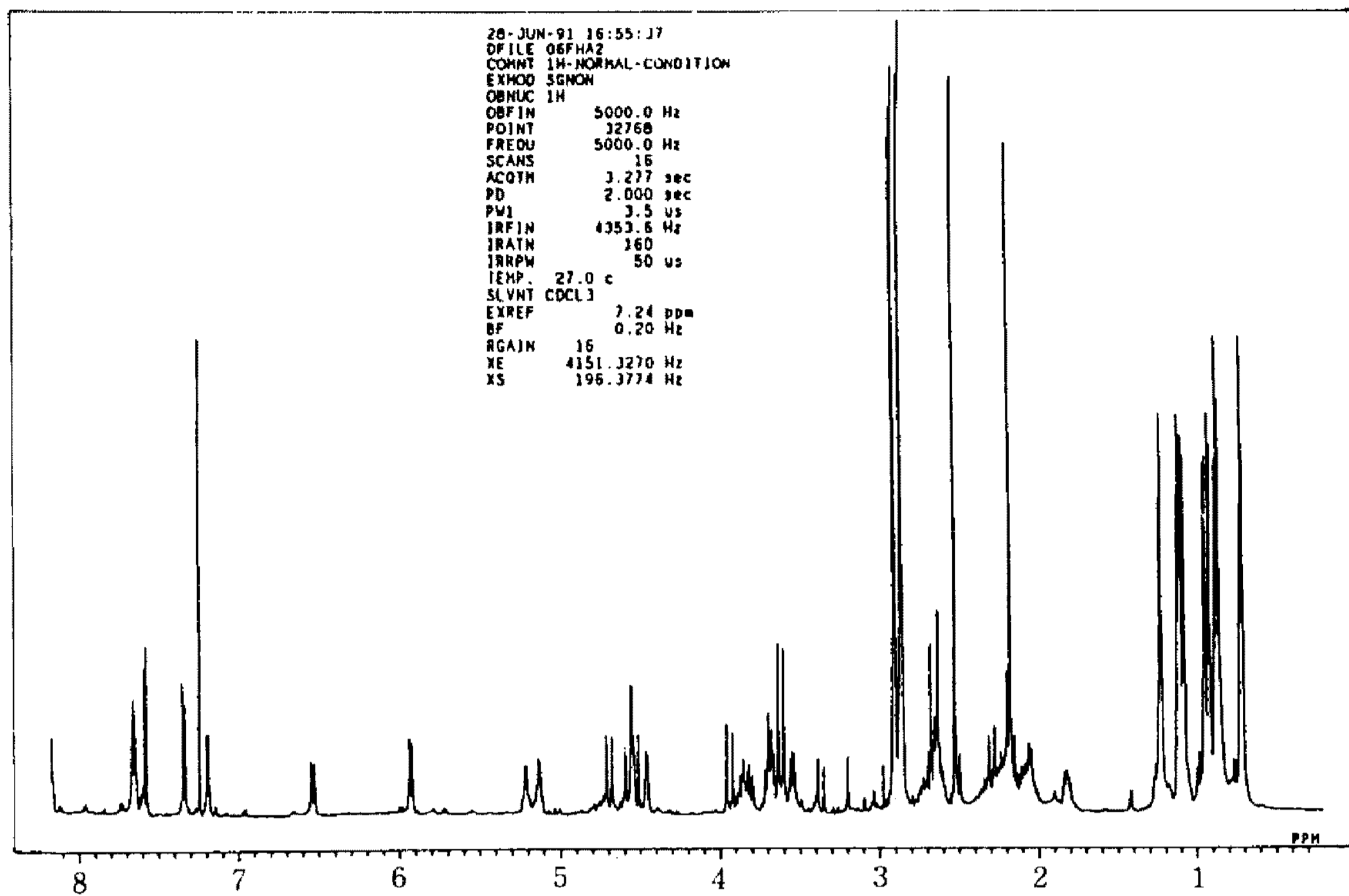
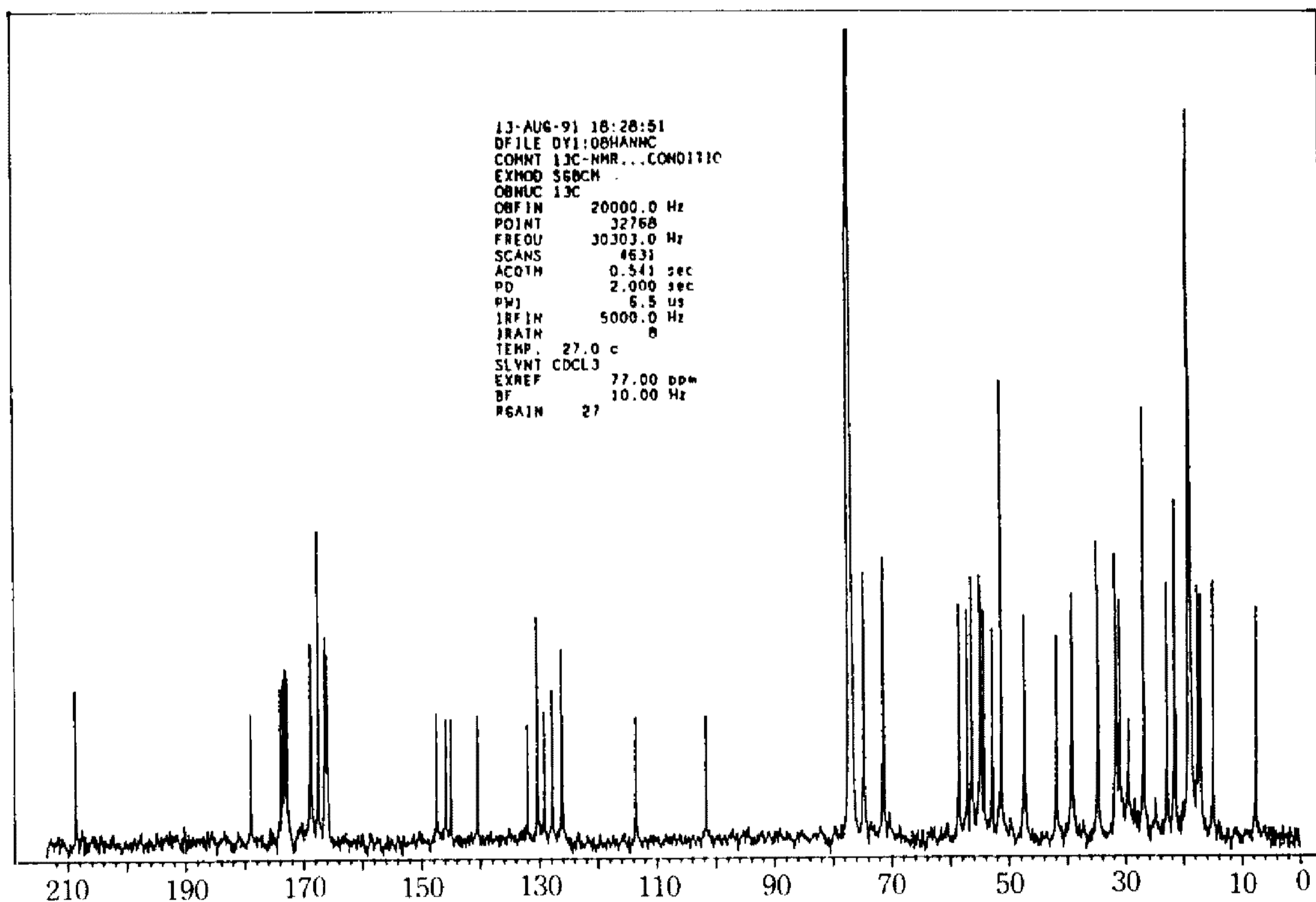


Fig. 2. UV absorption spectrum of HS-1.

Fig. 3.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of HS-1.Fig. 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of HS-1.

같다. HS-1의 methanol에서의 최대 흡수 파장은 219 nm와 440 nm이었다. HS-1의 UV 흡수 spectrum은 actinomycin 계열의 항생물질의 UV 흡수 spectrum과 매우 유사하였다(2).

$^1\text{H}$ -NMR spectrum  
 항생물질 HS-1의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum은 Fig. 3과 같다. 7.34 ppm(d, 1H, J-8Hz)과 7.59 ppm(d, 1H, J-8 Hz)의 peak는 benzene 분자를 가진 chromophore에

의한 것이고 2.18 ppm(S, 3H)과 2.53 ppm(S, 3H)은 chromophore에 결합한 -CH<sub>3</sub>기임을 알 수 있다. 8.2 ppm~7.6 ppm 사이와 7.2 ppm 부근에 나타난 signal도 아미노산 유래의 amide proton으로 분자내에 많은 peptide bond가 있음을 시사한다. 0.7~1.3 ppm 사이에는 분자내의 amino acid에 붙은 -CH<sub>3</sub>기, 4.2~3.4 ppm과 2.4~1.7 ppm에 aliphatic CH<sub>2</sub>, 2.86~2.93 ppm 사이에는 4개의 -N-CH<sub>3</sub>의 signal이 나타났으며 3.5~7.0 ppm 사이에는 amino acid의

CH기의 proton의 signal이 나타났다.

### <sup>13</sup>C-NMR

항생물질 HS-1의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Fig. 4와 같다. 13개의 carbonyl 탄소(210~160 ppm), 9개의 방향족 4급 탄소와 2개의 방향족 methine 탄소(150~100 ppm), 16개의 methine 탄소, 8개의 methylene 탄소, 16개의 methyl 탄소의 signal이 관측되었다. 이상과 같이 UV, IR, NMR spectrum, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-

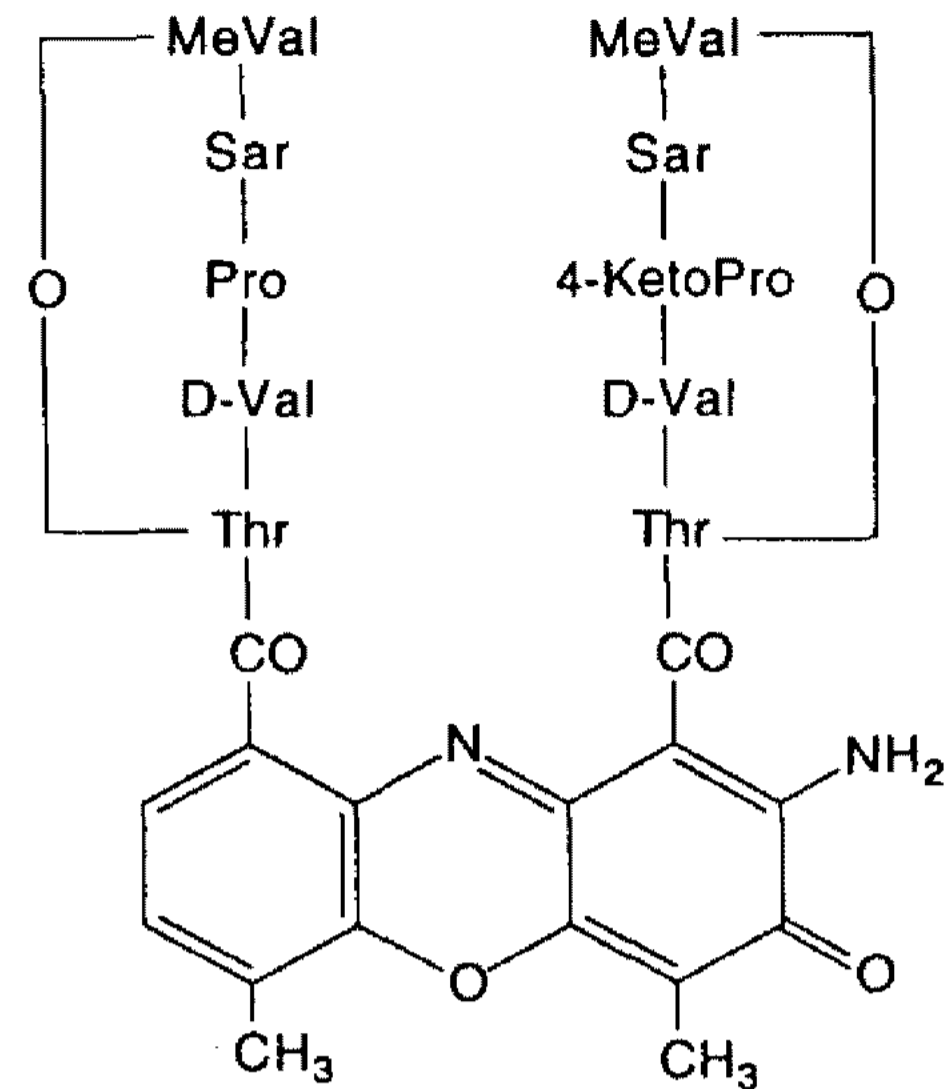
**Table 2. Chemical shift comparison of the antinomycin D, X<sub>2</sub> and antibiotic HS-1**

proton assignment	Actinomycin D (CDCl <sub>3</sub> ) ppm	J*	Actinomycin X <sub>2</sub> (CDCl <sub>3</sub> ) ppm	HS-1 (CDCl <sub>3</sub> ) ppm
NH(Val α)	8.10	(5.6)	(8.19)	8.19
NH(Val β)	7.94	(5.6)	(7.66)	7.66
NH(Thr α)	7.21	(6.8)	(7.21)	7.21
NH(Thr β)	7.84	(6.6)	(7.70)	7.70
8-H(ar.)	7.64	(8.0)	(7.62)	7.62
7-H(ar.)	7.37	(8.0)	(7.37)	7.37
NH <sub>2</sub>	7.0~7.5			
2-H(Pro α)	6.03	(8.0)	(6.56)	6.56*
2-H(Pro β)	5.98	(8.0)	(5.95)	5.95
3-H(Thr α)	5.21	(6.1/2)	(5.23)	5.22
3-H(Thr β)	5.17	(6.1/2)	(5.14)	5.13
2-Ha(Sar α)	4.73	(18)	(4.58)	4.58
2-Ha(Sar β)	4.79	(18)	(4.71)	4.70
2-H(Thr α)	4.50	(6.8/2)	(4.48)	4.45
2-H(Thr β)	4.60	(6.6/2)	(4.56)	4.53
2-Hb(Sar α)	3.61	(18)	3.61	3.61
2-Hb(Sar β)	3.62	(18)	3.63	3.63
2-H(Val α)	3.53	(5.6/9)	3.53	3.53
2-H(Val β)	3.55	(5.6/9)	3.55	3.55
5-H <sub>2</sub> (Pro α, β)	4.2~3.4	3.65~3.9	3.65~3.9	
N-CH <sub>3</sub> (Meval α)	2.88		2.88	2.88
N-CH <sub>3</sub> (Meval β)	2.93		2.92	2.92
N-CH <sub>3</sub> (Sar α, β)	2.87		2.88	2.88
3-Ha(Pro α)	2.70(m)		2.7	2.7
3-Ha(Pro β)	2.90(m)		2.9	2.9
3-H,2-H(Meval α, β)	2.67(m)		2.67	2.67
3-H(Val α, β)	2.17(m)		2.17	2.17
3-Hb,4-H <sub>2</sub> (Pro α, β)	2.4~1.7		2.4~1.7	2.4~1.7
6-CH <sub>3</sub>	2.55		2.55	2.55
4-CH <sub>3</sub>	2.23		2.21	2.21
CH <sub>3</sub> (Thr α, β)	1.26		1.27	1.24
CH <sub>3a</sub> (Val α, β)	1.11		1.13	1.12
CH <sub>3b</sub> (Val α, β)	0.90		0.91	0.89
CH <sub>3a</sub> (Meval α, β)	0.95		0.96	0.96
CH <sub>3b</sub> (Meval α, β)	0.74		0.76	0.73

\*J: Coupling constant

**Table 3. Chemical shift for actinomycin D<sup>a</sup> and antibiotic HS-1**

carbon assignments	Actinomycin D (CDCl <sub>3</sub> ) ppm	X <sub>2</sub>	HS-1 (CDCl <sub>3</sub> ) ppm
4-CH <sub>3</sub>	7.8	7.7	7.8
6-CH <sub>3</sub>	14.9	15.0	14.9
Val Cr(1)	17.4	17.4	17.4
Val Cr(1)	17.8	17.8	17.8
Val Cr(2)	19.1	19.1	19.1
Meval Cr(4)	19.3		19.3
Thr Cr(2)	21.6	21.6	21.6
	21.7		21.7
Pro Cr(2)	22.9	22.9	22.9
	23.1	203.1	208.6*
Meval Cβ(2)	27.0	26.9	27.1
Pro Cβ(2)	31.1	31.0	31.0
	31.4	41.3	41.8*
Val Cβ(2)	31.6	31.5	31.8
	31.9	31.7	31.9
Meval N CH <sub>3</sub> (2)	34.9	34.9	34.9
			35.1
Sar N CH <sub>3</sub> (2)	39.2	39.2	39.2
	39.3		39.3
Pro Cδ(2)	47.4	47.3	47.4
	47.7	47.5	53.0*
Sar Cα(2)	51.5	51.4	51.5
Pro Cα(2)	55.1	54.9	55.1
	55.4	55.3	54.2
Val Cα(2)	56.3	56.3	55.4
	56.5		56.3
Meval Cα(2)	58.8	58.7	58.8
	59.0		56.8
Thr Cα(2)	71.5	71.3	71.5
	71.6	71.4	71.6
Thr Cβ(2)	75.1	75.0	74.7
			74.8
C <sub>1</sub>	101.9	101.6	101.8
C <sub>4</sub>	113.6	113.5	113.6
C <sub>7</sub>	125.9	125.9	126.3
C <sub>6</sub>	127.5	127.5	127.9
C <sub>9</sub>	129.2	129.1	129.2
C <sub>8</sub>	130.3	130.2	130.4
C <sub>9a</sub>	132.8	132.6	132.4
C <sub>5a</sub>	140.5	140.5	140.6
C <sub>4a</sub>	145.2	145.1	145.2
C <sub>10a</sub>	146.0	145.8	146.0
C <sub>2</sub>	147.8	147.7	147.9
C <sub>1</sub> CO	166.1	166.1	166.1, 165.9,
Sar CO(2)	166.4	166.5	166.4
	166.6		166.6
Pro CO(2)	167.5	167.6	167.5
	167.6		
C <sub>9</sub> CO	168.6	168.9	168.6
Thr CO (2)	169.0	169.2	169.0
Meval CO	173.2	172.3	172.6
Val CO	173.4	173.3	173.2
			173.8
Meval CO	173.8	173.7	174.0
C <sub>3</sub> CO	179.2	179.1	179.2

<sup>a</sup>solvent CDCl<sub>3</sub> (at 125.0 MHz); internal standard TMS.**Fig. 5. Structure of actinomycin X<sub>2</sub>.**

MeVal: methyl-valine, Sar: sarcosine, Pro: proline, 4-ketoPro: 4-ketoproline, D-Val: D-valine, Thr: threonine.

**Table 4. Comparison of cytotoxicity of HS-1 in some tumor cell lines**

cell lines	IC <sub>50</sub> (nM)*
K562	17.42 ± 0.26**
P388	1.55 ± 0.55
MCF-7	5.77 ± 0.20
HT-29	1.87 ± 0.01

\*IC<sub>50</sub> means the concentration of a drug that limits the increase in cell population of a culture to one-half that of control, \*\*Mean ± SD of triplicate.

NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H Cosy의 분석 결과 HS-1은 actinomycin X<sub>2</sub> 항생물질로 판명되었다. Actinomycin 계열 항생물질중 HS-1과 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum이 같은 것으로는 actinomycin X<sub>2</sub>임을 알 수 있었다(9, 10). 따라서 actinomycin X<sub>2</sub>와 HS-1의 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 비교하여 Table 2, 3에 정리하였다. Chromophore에서 유래한 proton과 carbon signal은 거의 일치하였고 아미노산들에서 유래한 proton과 carbon의 chemical shift도 거의 같았다. 따라서 HS-1은 actinomycin X<sub>2</sub>로 결정되었다(Fig. 5).

#### 항암활성

암세포에 대한 항생물질 HS-1의 항암 활성은 Table 4에 나타내었다. HS-1에 대한 IC<sub>50</sub>을 측정한 결과 집락세포인 MCF-7(유방암세포)과 HT-29(위암세포)는 각각 5.77, 1.87 nM이었고 부유세포인 K562(사람백혈병세포)와 P388(mouse백혈병세포)의 경우는 17.42, 1.55 nM이었다.

## 요 약

토양에서 분리한 *Streptomyces floridae* SHS-1372로부터 항암 항생물질의 screening 과정중에 강한 항암활성을 나타내는 항암 항생물질 HS-1을 용매 추출, silica gel column chromatography를 통해서 분리 정제하였다. HS-1의 UV, FAB-MS, IR spectrum,  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ , 2D-NMR등의 기기분석에 의해 actinomycin X<sub>2</sub>로 동정되었다. *Streptomyces floridae*로부터 actinomycin X<sub>2</sub>가 분리된 적이 없었다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 일반연구 학술조성비 지원(1992년)에 의하여 이루어진 것이며, 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Umezawa, H. 1978. *Index of antibiotics from Actinomycetes*, Vol 1, 2, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
2. *Index of Actinomycetes Antibiotics*. TDS LTD., Tokyo, Japan.
3. Arcamone, F., G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, and C. Spalla. 1969. Adnamycin, 14-hydroxydounomycin, a new antitumor an-

- tibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**: 1101-1110.
4. Di Marco, A., M. Gotani, P. Orezzi, B.M. Scarpinato, R. Silvestrin, M. Soldati, T. Dosdia, and L. Volentini. 1964. Daumomycin, new antibiotic of rhodomycin group. *Nature* **201**: 706-707.
5. Umezawa, H., K. Maedo, T. Takeuchi, and Y. Okami. 1966. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* **A19**: 200-209.
6. Tomasz, M., C.M. Mercads, J. Olson, and N. Chalferjie. 1974. The mode of interaction of mitomycin C with deoxyribonucleic acid and other polynucleotide in vitro. *Biochemistry* **13**: 4878-4887.
7. Ishida, N., K. Miyazaki, K. Kumagi, and M. Rikimaru. 1965. Neocarzinostatin, an antitumor antibiotic of high molecular weight: isolation, physicochemical properties and biological activity. *J. Antibiotics, Ser. A.* **18**: 68-76.
8. Ha, S.C., S.D. Hong. 1994. Identification of the *Actinomycetes* strain No.1372, a producer of actinomycin X<sub>2</sub>. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 2.
9. Mauger, A.B. and W.A. Thomas. 1981. NMR studies of actinomycins varying at the proline sites. *Org. Magn. Reson.* **17**: 186-190.
10. Mirau, P.A. and R.H. Shafer. 1982. High resolution protein nuclear magnetic resonance analysis of conformational properties of biosynthetic actinomycin analogues. *Biochemistry* **21**: 2622-2626.

(Received October 10, 1993)