

항암활성물질을 생산하는 토양방선균의 동정 및 항암물질의 생물학적 활성

박정민 · 문순옥* · 오두환¹

수원대학교 유전공학과, ¹연세대학교 식품생물공학과

Identification of Soil Actinomycetes Producing Anticancer Agent and Its Biological Activities

Park, Jung-Min, Soon-Ok Moon* and Doo-Hwan Oh¹

Department of Genetic Engineering, Suwon University of Suwon 445-743, Korea

¹Department of Food and Biotechnology, Yonsei University Seoul 120-749, Korea

Abstract — Cytotoxic test was performed by SRB assay on human epidermoid carcinoma HEp-2 cell line for screening the soil microorganism, secreting anticancer agent. One microorganism was selected among two thousand microorganisms for its highest cytotoxicity. And this microorganism was identified with *Streptomyces* species after performing of diaminopimeric acid and reducing sugar analysis of cell wall and analysing the cultural characteristics and named *Streptomyces* sp. SM 1119. The effect of anticancer agent in SM 1119 culture extract on the cell cycle was studied by using G₀ synchronized NIH 3T3 cells. The extract inhibited the serum stimulation of G₀ NIH 3T3 cell only within 1 hour after serum stimulation but not after 6 hours. The extract also reduced the amount of *c-myc* mRNA in Colo 320 cell. These results suggest that the anticancer agent in the extract inhibits the progression of cell cycle very early stages, probably from G₀ to G₁.

1950년대부터 시작된 항암활성물질의 체계적인 탐색으로 인하여 세계적으로 600여종 이상의 항암활성물질이 발견되었으며 이를 이용한 암의 화학요법은 암의 치료 뿐 아니라 암세포의 생물학적 연구에도 많은 기여를 하였다. 특히 방선균은 항암활성물질을 생성하는 중요한 미생물자원으로 주목받고 있다. 예를 들어 actinomycin D(11), daunorubicin(16) doxorubicin(1) 및 bleomycin(19) 등의 항암물질이 토양으로부터 분리된 방선균이 생산하는 물질로 알려지고 있다. 따라서 미생물자원이 풍부한 국내토양으로부터 분리한 방선균을 대상으로 체계적으로 항암활성물질을 탐색하는 것은 새로운 항암물질의 개발을 위하여 필요한 과정이라 할 수 있다. 특히 현재 이용되고 있는 항암물질의 가장 큰 단점인 side effect가 적은 항암활성물질의 탐색은 효과적인 항암제의 개발을 위하여 중요하다고 하겠다. 항암활성의 측정에는 다양한 cytotoxicity 및 viability test가 이용되어왔다. 세포의 viability를 간단하게 관찰할 수 있는 방법으로 개발된

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay는 항암활성물질 탐색에 널리 이용된 방법이다(7). 그러나 product인 formazan의 불용성과 세포 외에도 이온 및 pH 등의 다른 요인에 의하여 영향을 받을 수 있다는 단점이 있다. 최근에는 MTT assay 대신 세포내의 단백질 함량을 측정함으로써 항암물질의 활성을 측정하는 방법인 sulforhodamin B(SRB) assay가 개발되었다(18). 단백질의 양은 전체세포 내의 물질을 추정하는데 널리 이용되고 있으며 특히 SRB assay는 Lowry와 Bradford assay보다 민감하며 세포수와 비례관계에 있다는 장점이 있고 수용성의 성질 및 환경에 의한 영향을 덜 받는다는 장점으로 MTT assay보다 광범위하게 항암물질의 탐색에 이용되고 있다. 본 연구에서는 토양으로부터 분리한 방선균 배양 추출액의 인체 암세포주인 epidermoid carcinoma, Hep-2 세포에 대한 cytotoxic 활성을 SRB assay를 통하여 검색하여 항암물질 생산 균주를 분리, 동정하였으며, 이 항암활성물질의 작용 기작을 알아보기 위하여 mouse fibroblast인 NIH 3T3 세포주기에 미치는 영향과 지속적인 세포의 증식에 요구된다고 알려진 *c-myc* 유전자의 발현에 미치는

Key words: Anticancer agent, SRB assay, *Streptomyces* sp., *c-myc* expression

*Corresponding author

영향을 검토하였다(8, 14). 본 연구에서 탐색된 항암 활성물질은 세포주기의 초기에 작용하며 *c-myc* 유전자의 mRNA 양을 감소시킴으로써 성장인자의 신호 전달체계의 저해제로 작용할 가능성을 암시하고 있다. 최근 성장인자의 신호전달체계에 대한 이해가 증가함에 따라 이체계를 표적으로 하는 저해제는 암세포에 특이적으로 작용하는 새로운 항암제로 개발될 수 있다고 제안되고 있다(15).

재료 및 방법

방선균 추출액 준비

토양으로부터 분리한 방선균을 항암물질 생산 추출용 배지(2.0% Sucrose, 0.5% Yeast extract, 0.5% Polypeptone, 0.5% KH_2PO_4 , 0.5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.0% GVs)에 접종한 후 30°C 배양기에서 7일간 배양하였다. 배양액에 동량의 acetone을 처리하고 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리에 의해 방선균체를 제거하고 상등액에서 acetone을 완전히 제거함으로써 방선균 추출액을 준비하였다.

세포 배양

항암물질 탐색에는 HEp-2(Epidermoid carcinoma, Larynx, Human), PC14(Prostate adenocarcinoma, Human), A549(Lung carcinoma, Human), NIH3T3(NIH Swiss, Mouse) 등의 세포주를 이용하였다. 방선균 배양액 추출액이 *c-myc* oncogene의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에는 *c-myc* gene이 증폭된 Colo 320 DM(Colon, adenocarcinoma, Human) 세포를 사용하였다. 인체 세포주의 경우 RPMI 1640에 10% Fetal Calf Serum(FCS, Hyclone)을, mouse cell line인 NIH3T3 세포는 Dulbecco's modification of eagles medium(DMEM)에 5% Bovine Calf Serum(BCS, Hyclone)를 각각 첨가한 배지에 100 units의 penicillin-streptomycin(Gibco)을 첨가하여 37°C의 CO_2 배양기(5% CO_2 , 95% air)에서 배양하였다.

SRB assay

96 well plate에 1×10^5 cell/ml을 seeding 하여 24시간 동안 배양한 후 미생물 배양 추출액을 처리하고 일정한 시간 경과 후, 10% TCA를 처리하여 4°C에서 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 물로 5회 세척한 후 건조시키고 0.4% SRB 용액으로 염색한 후 1% acetic acid로 5회 세척하고 건조시켰다. 10 mM Tris로 녹인 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다(13).

Growth inhibition의 정도는 미생물배양 추출액을 처리하지 않은 well의 흡광도를 기준으로 하여 미생물배양 추출액을 처리한 well의 흡광도를 백분율로 환산하였다.

항암물질 생산균주의 동정

선별균주의 동정을 위하여 균의 형태학적 특성 및 배양학적, 화학적 특성을 조사하였다. 형태학적 특성은 Scanning electronmicroscopy(SEM)으로 spore의 형태를 관찰하였다. 배양학적 성질은 International *Streptomyces* Project(ISP)에 명시된 배지를 사용하여 30°C에서 7, 14, 30일 간격으로 균의 생육도, 기균사의 형성유무 및 색조, 이면색의 형태를 관찰함으로써, 탄소원의 이용은 Pridham과 Gottlieb의 방법(17)에 따라 수행함으로써 확인하였다. 선별균주의 화학적 특성으로는 diaminopimelic acid(DAP)의 구조분석과 당분석을 통하여 관찰하였다(5). 선별균주의 동정은 Bergy's Manual of Systematic Bacteriology(6, 17)의 색인에 의거하여 검색하였다.

Northern blot analysis

Colo 320 DM cell을 1×10^5 /ml로 seeding 한 후에 test 하고자 하는 미생물 추출액을 처리하고 일정 시간 배양한 후 total RNA를 single step guanidium isothiocyanate 방법(12)에 의하여 준비하였다. RNA를 1% formaldehyde gel electrophoresis로 분리하고 nylon membrane에 transfer 한 후 UV cross link로 고정하였다. Hybridization 용액(7% SDS, 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.8, 50 μM /ml total yeast RNA, 5XSSC, 0.1% lauroylsarcosine)을 이용하여 37°C에서 6시간 prehybridization한 후 Digoxigenin(DIG) label된 DNA probe를 첨가하여 37°C에서 24시간 hybridization 하였다. Probe로는 human genomic *c-myc* DNA를 포함하는 plasmid(ATCC 41010)(10)에서 1.4 kb 크기의 exon3가 포함된 EcoR I, Cla I fragment를 분리하여 DIG label된 dUTP를 이용한 random primed DNA labeling 방법(Boehringer Mannheim)으로 label 하여 사용하였다. Hybridization 후 membrane을 상온에서 washing 용액(1XSSC, 0.1% SDS)으로 5분간 2회, 68°C에서 washing 용액(0.2XSSC, 0.2% SDS)으로 15분간 2회 세척한 후 alkaline phosphatase label 된 anti-DIG antibody로 detection 하였다. Alkaline phosphatase의 기질로는 chemiluminescent reagent인 AMPPD를 사용하였으며 hybridization은 membrane을 x-ray film에 노출시킨 후 현상하여 확인하였다.

결과 및 고찰

SRB assay에 의한 균주 탐색

토양으로부터 분리한 방선균주 약 2000 균주로부터 SRB assay에 의하여 강한 항암활성을 나타내는 124 균주를 선별하였다. 선별된 124 균주를 1:10, 1:25의 비율로 희석하여 암세포에 처리한 후 cytotoxicity를 측정된 결과 3 균주를 선별할 수 있었다. 선별한 균주를 각각 HEP-2, PC14, A549, Colo 320 DM 세포에 처리하여 항암활성을 알아보고 mouse cell line인 NIH 3T3에 미치는 영향과 비교하였다. 그 결과 암세포에는 영향을 미치나 mouse fibroblast인 NIH 3T3에는 영향을 거의 미치지 않는 균주를 찾을 수 있었다(Table 1). 이 결과는 미생물 배양 추출액의 항암활성이 암세포에 특이적으로 작용함을 암시하고 있으나 species와 세포의 종류에 따라 다르게 작용했을 가능성도 배제할 수 없다. 미생물 배양 추출액의 지속적인 효과를 알아보기 위하여 추출액을 초기에 일정기간 처리한 후 추출액을 제거하고 새로운 배지

에서 암세포들이 받는 영향을 알아 본 결과 SM 1119 균주의 배양추출액은 지속적인 효과가 있었다(Fig. 1). 그러나 다른 두 균주의 배양 추출액을 처리시에는 추출액의 제거 후 정상적인 성장으로 회복함을 알게 되었다(data not shown). 또한 SM 1119 균주의 배양추출액은 100°C, 30분 처리 후에도 100%의 활성을 유지하였으나 다른 두 균주의 배양추출액은 같은 조건에서 약 20%의 항암활성을 나타내었다(data not shown). 이상의 결과에 의하여 암세포에 대하여 강한 cytotoxic 영향을 주며, long term effect가 있으며 높은 열 안정성 가지는 물질을 분비하는 균주 SM 1119를 선택하였다.

선별된 미생물의 동정

방선균은 균사상으로 생육하는 그람 양성 세균의 일종으로 다양한 항생물질을 생산하며 생리적, 형태적 특성이 매우 다양하다. 방선균의 속을 분리 미생물의 형태학적 특성과 방선균의 세포벽 성분인 diaminopimelic acid(DAP) 구조분석을 이용한 화학 분석방법과 International Streptomyces Project(ISP) 분류법을 사용하여 동정하였다. 분리 미생물의 전자현미경 사

Table 1. Effect of microbial extract on the human cancer cell lines and mouse cell line

	1119	124	1682
Hep2	+++	+++	+++
pc14	+++	+++	+++
A549	+++	+	+++
colo320	+++	+	++
NIH 3T3	-	+	-

+++ : strongly growth inhibited, ++ : moderately inhibited, + : weakly inhibited, - : no effect

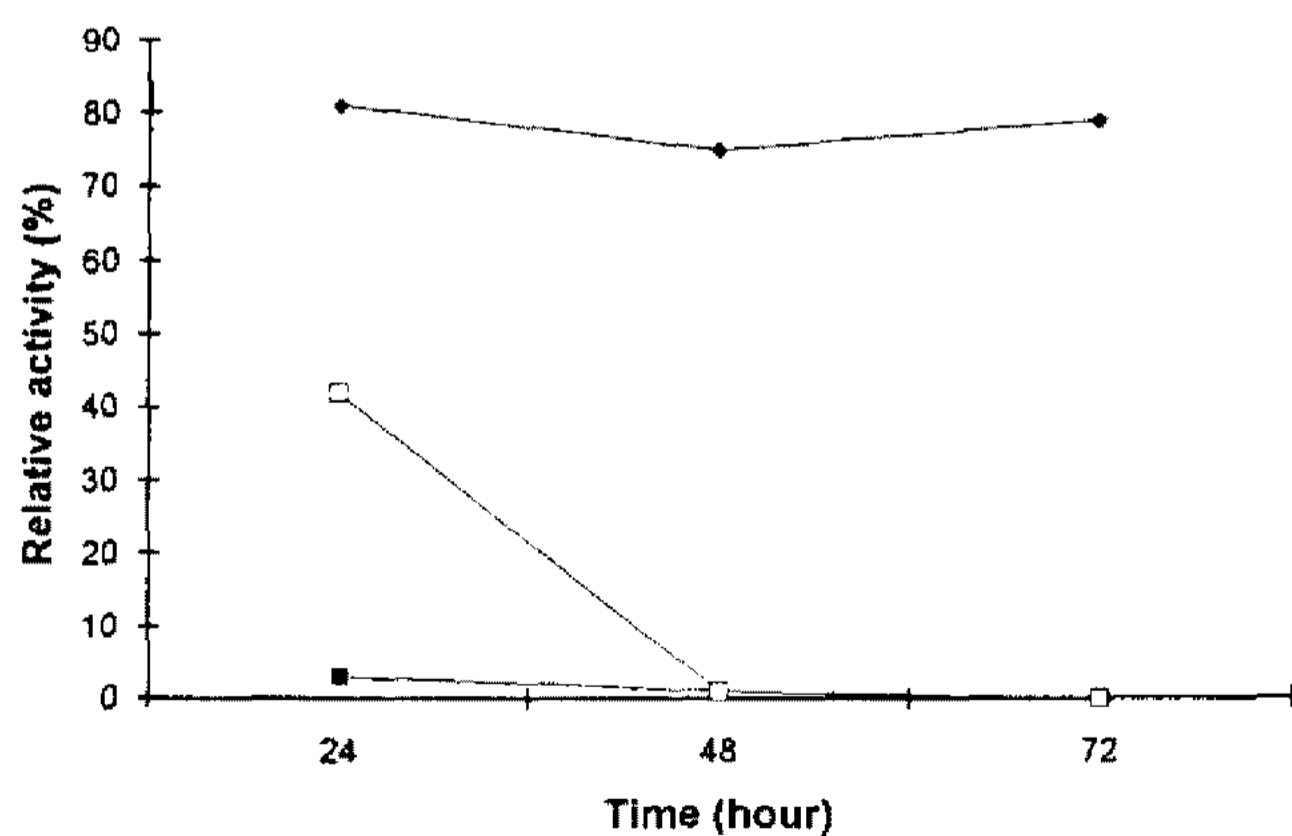


Fig. 1. Long term effect of anticancer material produced by microorganism SM 1119 on the growth inhibition of HEp-2 cells.

After HEp-2 cells were incubated with 10 μl (■), 50 μl (□), and 100 μl (◆) of microbial extract for 2 hrs, cells were incubated with fresh media for 1-3 day.

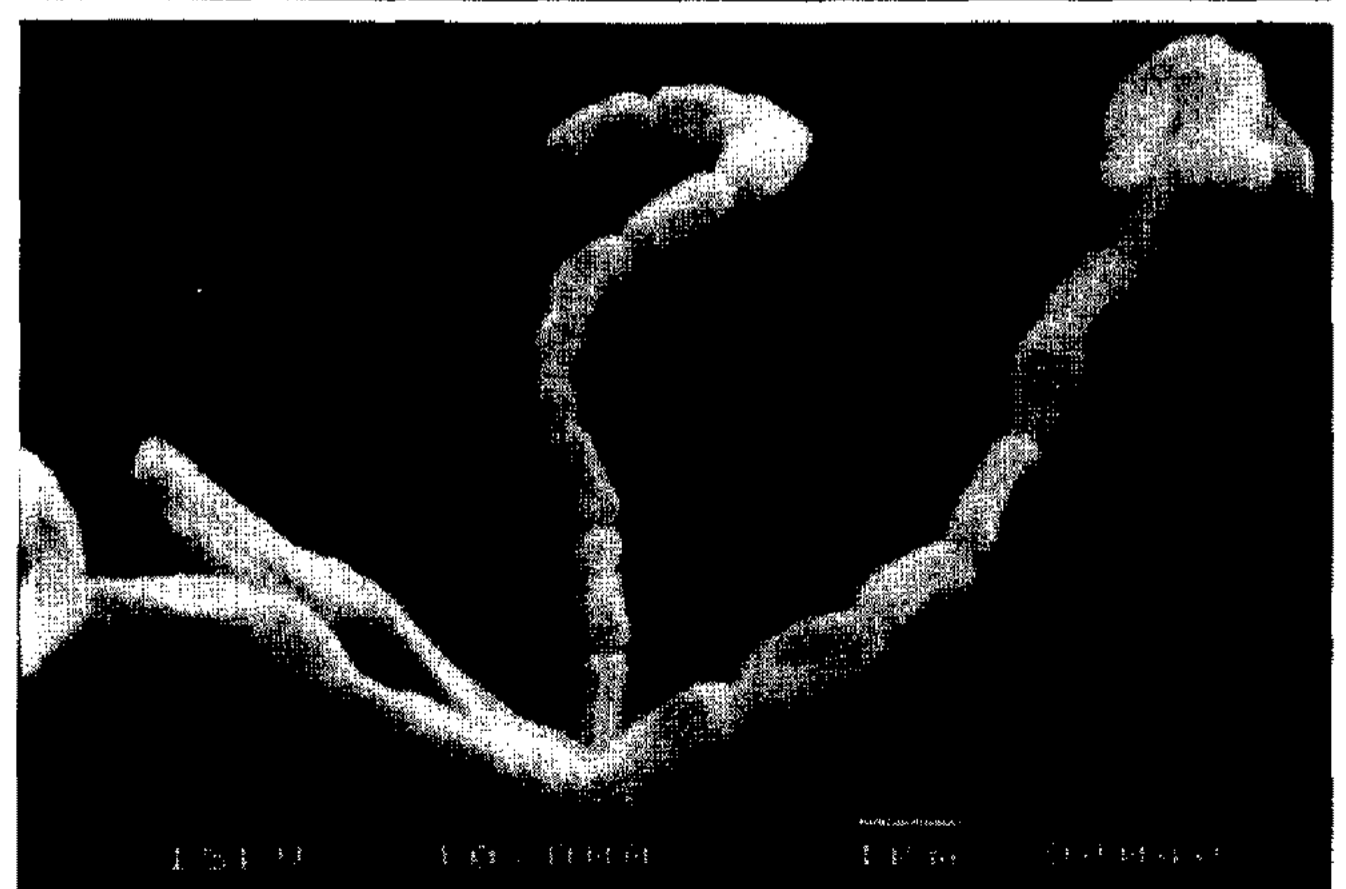
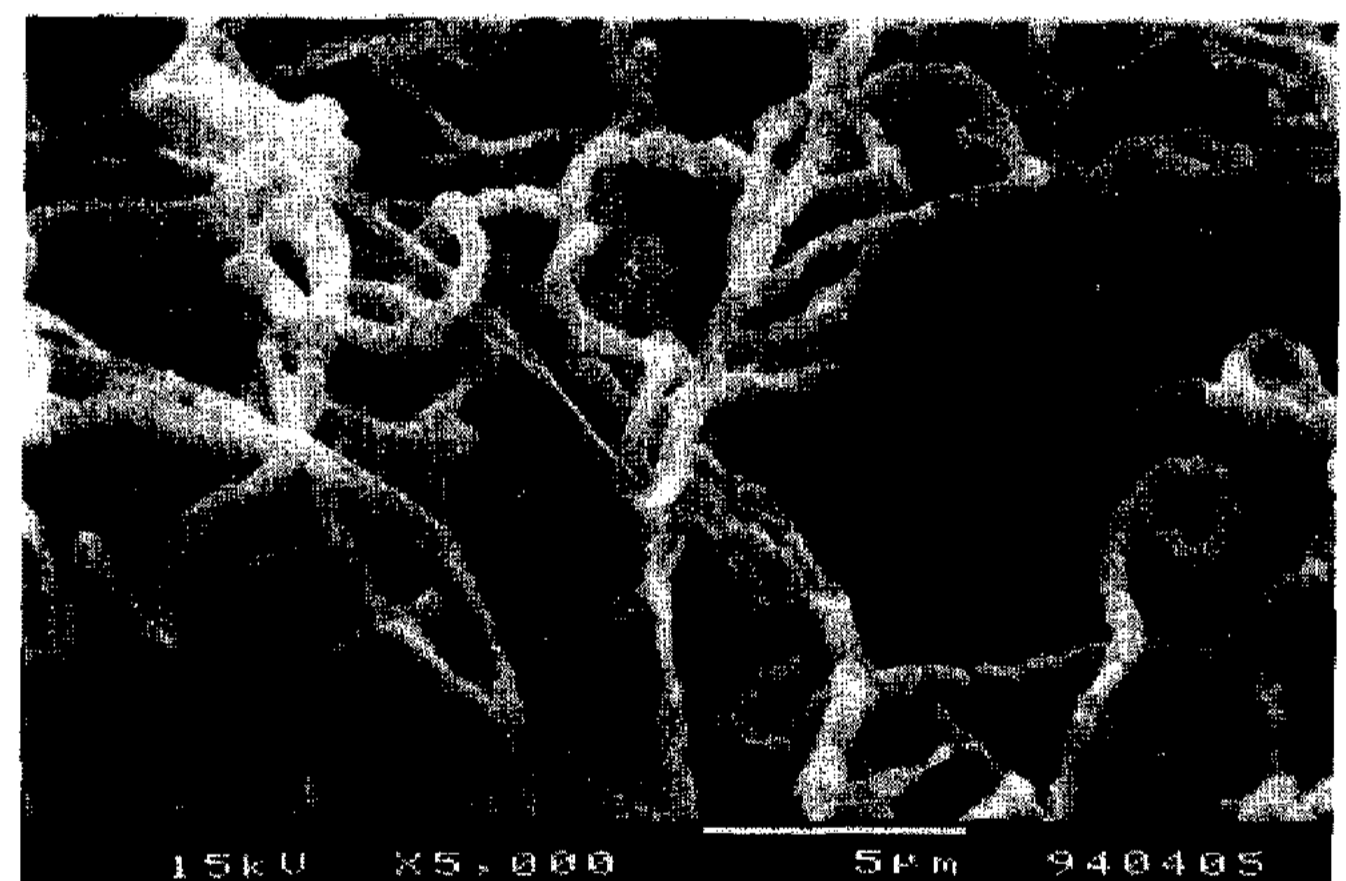


Fig. 2. Scanning Electron microphotography of SM 1119 grown on Benett's agar medium.

진을 관찰한 결과 포자 쉼의 형태는 *rectiflexibiles*이며 포자 표면은 smooth로 나타났다(Fig. 2). 세포벽 구성성분의 하나인 diaminopimelic acid(DAP)의 L, L-type과 meso-type은 방선균의 속 분리에 중요한 기준이 된다(5). 방선균의 세포벽 구성 성분으로 L, L-type의 DAP가 존재하면 *Streptomyces*속, meso-type의 DAP가 존재하면 *Actinomadura*속, 그리고 meso-와 L, L-type의 DAP가 모두 존재하면 *Kitasatospora*속으로 분류하게 된다(2). 모양으로부터 선별한 No.1119-22 균주의 세포벽의 DAP 구조 분석 결과 L, L-DAP만 존재함을 알 수 있었으며 alanine과 glutamine, glycine이 존재함을 알 수 있었으므로 *Streptomyces*속으로 확인할 수 있었다(Fig. 3). 세포벽 구성성분의 하나인 당은 DAP 구조분석과 더불어 방선균의 속 분리에 기준이 된다(5). No.1119-22의 세포벽을 가수분해한 후 얻은 가수분해물을 barium hydroxide를 이용하여 중화하고 cellulose TLC plate 상에서 n-butanol : water : pyridine : toluene(5 : 3 : 3 : 4)으로 전개하여 세포벽 당성분을 확인하였다(data not shown). 방선균은 세포벽 당성분에 따라 A, B, C, D 등의 4 group으로 분리되고 있다. 세포벽 환원당 분석결과 특징적인 당이 없음을 나타내므로 group C에

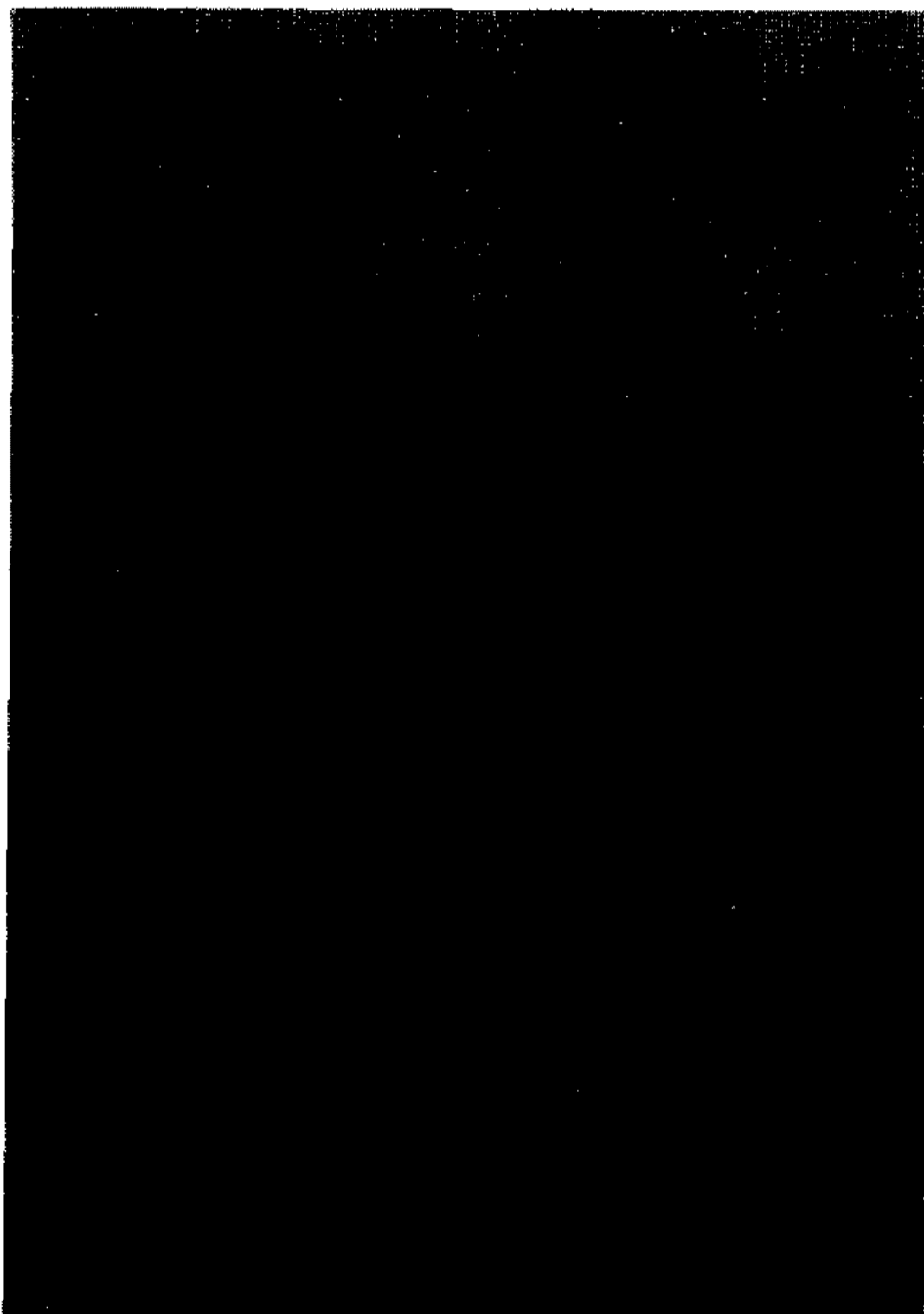


Fig. 3. Cellulose thin layer chromatography of SM 1119 cell wall.

1; standard diaminopimelic acid (DAP) isomers (a; LL-DAP, b; meso-DAP), 2; SM No.1119-22 cell wall hydrolysate, 3; Glycine, 4; Glutamine, 5; Alanine

해당하며 *Streptomyces*, *Norcardiopsis*, *Thermoacetinomyces* 등이 여기에 속한다. 균주의 동정을 위하여 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology volume 4"(6, 17)와 방선균 분리와 동정법의 방법에 의거하여 검토한 결과 분리균주 SM 1119는 cell wall type I, 세포벽 당 성분 pattern C에 속하는 *Streptomyces* 속임을 알 수 있었다(17).

SM 1119 균주를 ISP 배지상에서 7, 14, 21일 동안 배양한 후 생육 정도와 기균사의 색, 상면과 이면의 색, 가용성 색소의 생성 여부를 관찰하였다. 그 결과 전반적인 배지의 생육 정도는 양호하였으며 기균사의 색은 전체적으로 회색(gray)을 나타내었고 glycerol-asparagine agar 배지에서는 옅은 파란색(light blue)을 나타내었다. 집락의 이면색(reverse color)은 Yeast extract-malt extract agar와 Tyrosine agar에서는 red를 띠며 oatmeal agar와 Inorganic salt-starch agar에서는 orange를 띠며 glycerol-asparagine agar와 peptone-yeast extract iron agar에서는 dark blue를 나타내었다. SM 1119를 ISP에 수록된 각종 배지 상에서의 *Streptomyces*속과 기균사의 색과 이면색, 당 이용성을 검토한 결과 *Streptomyces*속과 비슷한 특징을 가짐을 알 수 있었다(17). 이상의 결과에 의하여 선별균주 SM 1119를 *Streptomyces* sp. SM 1119로 명명하였다.

선별균주 배양추출액의 생물학적 특성

선별균주의 배양추출액이 세포의 형태변화에 미치는 영향을 위상차 현미경으로 관찰한 결과 세포의 형태변화가 관찰되었다(Fig. 4). 이 결과는 선별균주의 배양 추출액의 항암효과는 세포의 성장을 저해하는 작용에 의한 것임을 암시하고 있다. *Streptomyces* sp.

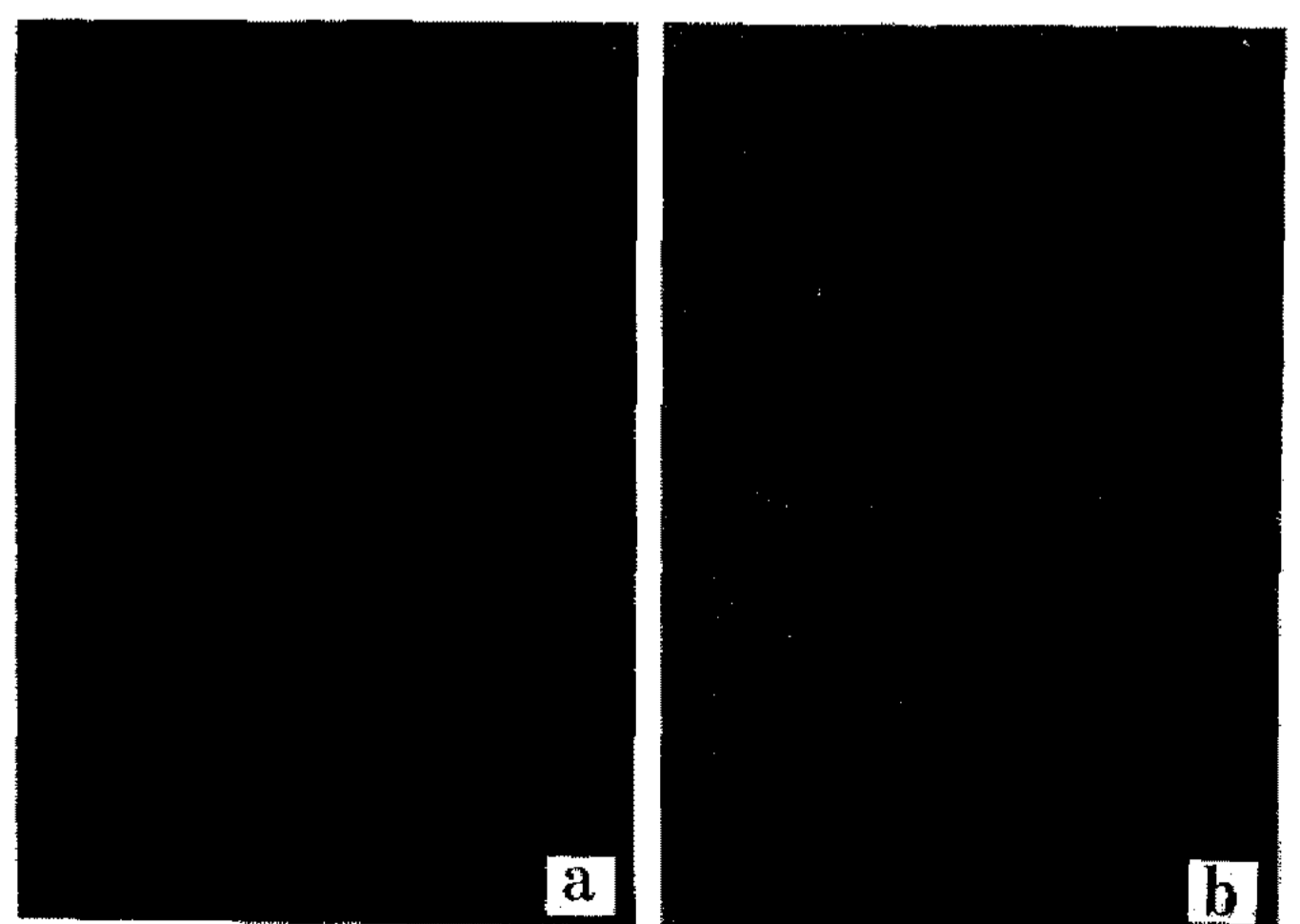


Fig. 4. Morphological change of HEp-2 cell.

a; control, b; SM No.1119-22 culture extract treated

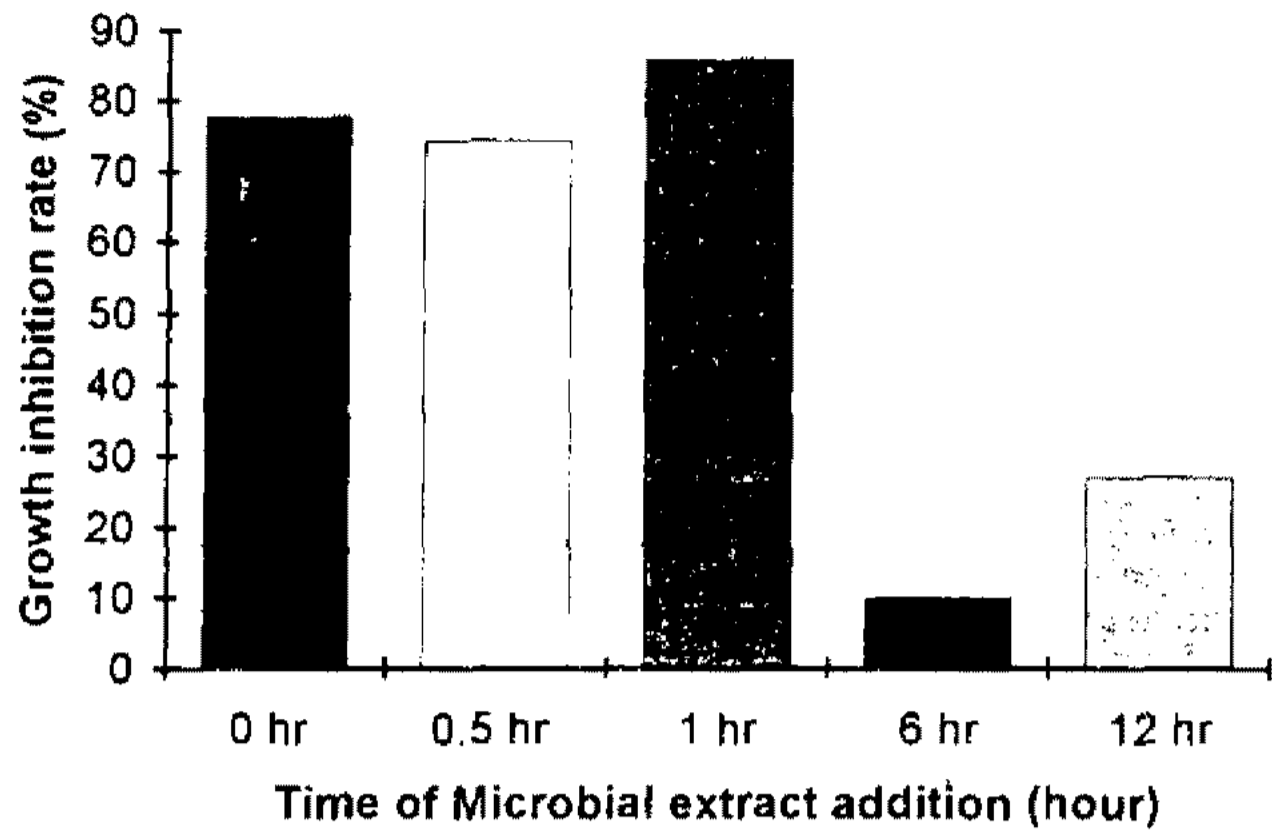


Fig. 5. The effect of *Streptomyces* sp. SM 1119 extract on the cell cycle.

NIH 3T3 cells were synchronized by serum starvation, then fresh media containing 10% BCS was added and streptomyces sp. SM 1119 extract was added at different time point after 10% BCS addition.

SM 1119 배양추출액이 세포주기에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 NIH 3T3 세포를 0.5% serum을 첨가한 배지에서 배양함으로써 quiescent 하게 만든 후 10% serum을 첨가하여 모든 세포가 G₀에서 G₁ phase로 세포주기를 시작하도록 하였다. *Streptomyces* sp. SM 1119 추출물을 serum 처리시 동시 또는 일정 시간 후 세포주기가 어느 정도 진행된 후 처리하여 줌으로써 *Streptomyces* sp. SM 1119 배양추출액이 세포주기의 어느 단계에서 작용을 하는 지를 관찰하였다(Fig. 5). 배양추출액은 serum의 효과를 1시간 후에 가장 많이 억제하였으나 6시간 이후에는 억제 효과가 현저히 감소하였다. 이 결과는 배양추출액이 세포주기의 초기과정을 저해하는 작용이 있음을 시사하고 있다.

위의 가정을 확인하기 위하여 serum에 의하여 촉진되는 중요한 초기반응으로 알려지고 있는 *c-myc* 유전자의 발현에 미치는 영향을 검토하였다(4). *c-myc* 유전자의 발현은 세포주기의 G₀-G₁ transition에 요구되며, 지속적인 세포의 증식에 요구된다고 알려지고 있다(14). *c-myc* gene이 amplification 된 Colo 320 DM 세포를 이용하여 total RNA를 분리한 후 Northern blot 분석에 의하여 *c-myc* mRNA 양을 확인하였다(Fig. 6). *c-myc* mRNA의 양은 처리된 배양액의 농도가 증가함에 따라 감소하였음을 알 수 있었다. 이 결과는 추출액의 항암활성물질이 *c-myc* oncogene의 발현을 억제함으로써 세포의 증식을 억제하였을 가능성을 지지하고 있다. 본 실험에서 확인된 항암활성물질의 성질은 최근의 항암활성물질의 탐색의 target이 되고 있는 성장인자의 신호전달 체계의

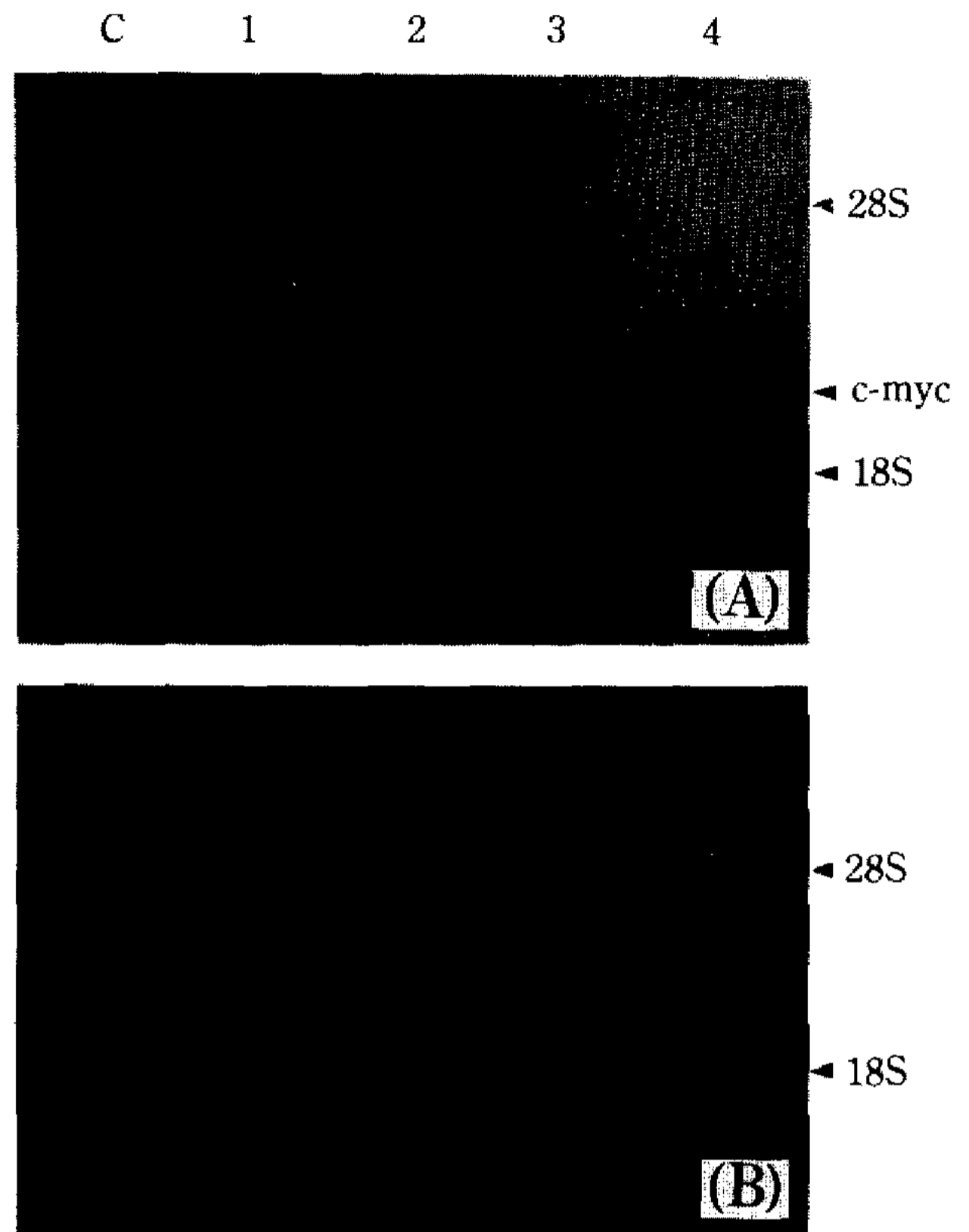


Fig. 6. Northern blot analysis.

Colo 320 DM cells were incubated with SM 1119 extract for 3 hrs and total RNA was prepared. 30 µg of RNA was loaded per lane, electrophoresed on 1.0% agarose gel and hybridized with DIG labeled *c-myc* probe (A): c, control; 1, 200 µl; 2, 150µl; 3, 100µl; 4, 50 µl of SM 1119 extract was treated. (B) Before transfer the gel into Nylon membrane the gel was stained with ethidium bromide

저해제일 가능성이 높다고 하겠으나(3) 이를 확인하기 위하여는 추출액으로부터의 항암활성물질의 정제 및 정제된 물질의 작용기작등이 밝혀져야 할 것이다.

요 약

토양으로부터 방선균을 분리하여 항암활성을 나타내는 물질을 생산하는 균주 No.1119-22를 선별하였다. 선별분리주는 세포벽의 diaminopimeric acid 구조, 아미노산 및 구성당의 분석과 형태학적 분석 결과 *Streptomyces* sp.로 확인되어 이를 *Streptomyces* sp. SM 1119라 명명하였다. 선별균주의 배양추출액은 NIH 3T3 세포주보다 인체 암세포에 강한 항암활성을 나타내었으며 세포주기 초기에 작용하여 세포의 증식을 억제할 것으로 추정되었다. 이 가정은 선별균주의 배양추출액이 세포주기의 G₀와 G₁의 진행에 요구되는 *c-myc* 유전자의 발현을 저해하는 작용이 있다는 발

견에 의하여 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 선도기술개발사업에 의하여 수행되었으며 연구비지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Arcamone, Y., G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, and C. Spalla. 1969. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**: 1101-1110.
2. 방선균 동정 실험. 1985. 일본방선균 연구회편: 48-55.
3. Garth, P. and K. Alan. 1991. Growth factor and oncogene signalling pathway as targets for rational anticancer drug development. *Clinical Biochemistry* **24**: 385-397.
4. Greenberg, M.E. and E.B. Ziff. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos protooncogene. *Nature* **311**: 433-438.
5. Hoare, D.S. and E. Work. 1957. The Stereoisomers of α,β -Diaminopimelic Acid. *Biochemistry* **65**: 441-447.
6. Hubert, A. and Lechevalier. 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Pp. 441-447. The Williams & Wilkins.
7. James, C., G.D. William, F.D. Adi, D.M. John, and B.M. James. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
8. Jennifer, A.P. and W.S. Roland. 1990. Transforming growth factor β 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3758-3762.
9. Joseph, I.S. and G.D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiology* **28**: 226-231.
10. Kari, A., S. Manfred, C.C. Lin, E.V. Harold, and J.M. Bishop. 1983. Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene(c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 1707-1711.
11. Manaker, R., F. Gregory, L.C. Vining, and S.A. Waksman. 1955. Actinomycin. III the production and properties of new actinomycin. *Antibiot. Ann* 1954-1955: 853-857.
12. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 1, 7.3-7.29.
13. Philip, S., S. Ritsa, S. Dominic, and M. Anne. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
14. Pietenpol, J.A., R.W. Stein, E. Moran, P. Yaciuk, K. Schlegel, P. Howley, and H.L. Moses. 1990. Transforming growth factor β 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3758-3762.
15. Powis, P. 1991. Signalling targets for anticancer drug development. *TIPS* **12**: 188-194.
16. Remers, W.A. 1979. Anthracyclines, Pp. 63-132. *Chemistry of Antitumor Antibiotics*, Vol. 1, Wiley-Interscience, New York.
17. Romano, L. 1984. *Streptomyces* and related genera, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol. 4, Pp. 2451-2508. The Williams & Wilkins.
18. Rubinstein, L.V., R.H. Shoemaker, K.D. Paull, and R.M. Simon. 1990. Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1113-1118.
19. Umezawa, H., K. Maeda, Y. Takeuchi, and Y. Okami. 1966. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* **26**: 117-119.

(Received June 24, 1994)