

방선균에서 분리한 Macrolide 계 항암활성물질

김항섭 · 김세은 · 이성우 · 방희재 · 김영호 · 이정준*
KIST 유전공학연구소

Antitumoral Macrolide Antibiotics from *Streptomyces* sp. Ba16

Kim, Hang-Sub, Se-Eun Kim, Sung-Woo Lee, Hee-Jae Bang,
Young-Ho Kim and Jung-Joon Lee*

Genetic Engineering Research Institute, KIST P.O.Box 115, Yusung,
Taejon, 305-600, Korea

Abstract — Three more unusual macrolides in addition to concanamycin B were isolated from the mycelium of *Streptomyces* sp. strain Ba16. These four compounds showed a potent cytotoxicity to human cancer cell lines, SNU-1 (stomach cancer cell line), SNU-354 (liver cancer cell line), MCF-7 (breast cancer cell line) and KB-3-1 (oral epidermoid carcinoma cell line). Interestingly, these compounds conferred slight differential cytotoxicity on RHEK-1, a human epidermal keratinocyte cell line immortalized by AD12-SV40 hybrid virus and RHEK-1/pSV₂ ras which was resulted from *H-ras* transformation of RHEK-1. These compounds were determined to be concanamycin A, concanamycin E and O-methyl concanamycin B by NMR and other spectral analysis.

천연물 특히 미생물 대사산물로부터 항종양활성물질을 개발하기 위한 연구 중 국내 토양에서 분리한 균주 *Streptomyces* Ba16으로부터 유방암 세포주 MCF-7에 대하여 강한 세포독성을 나타내며, 낮은 농도에서 세포의 형태변화를 유도하는 물질 MCH-201을 concanamycin B로 동정하여 보고한 바 있다(1). 이 균주에 대한 계속적인 연구로 3개의 관련 화합물을 추가로 분리하여 구조를 동정하였다. 본 보에서는 국내에서 다발하는 위암 및 간암 환자에서 수렴된 위암세포주 SNU-1, 간암세포주 SNU-354를 포함하는 축소된 인체 암세포주 panel 및 인체에서 발생하는 암 특히 colon cancer 및 pancreatic cancer에서 50% 이상의 관련성이 있는 발암유전자 *H-ras*로 형질 전환된 세포주 RHEK-1/pSV₂ ras 및 이와 비교할 수 있는 세포주 RHEK-1을 대상으로(2) 방선균 분리주 Ba16으로부터 분리한 macrolide 항생물질의 세포독성 및 구조와 활성관계를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Key words: Macrolide, antitumor, concanamycin A, concanamycin E, O-methyl concanamycin B, *Streptomyces* sp.

*Corresponding author

균주의 배양

방선균 분리주 Ba16의 배양을 위하여 사용한 배지는 oatmeal 20 g, malt extract 20 g, yeast extract 2 g, glucose 10 g, soybean meal 10 g, soluble starch 12 g, CoSO₄·7H₂O 0.006 g, ZnSO₄·7H₂O 0.003 g, MnSO₄·7H₂O 0.003 g, FeSO₄·7H₂O 0.003 g을 1l의 증류수에 녹이고 pH를 7.0으로 조절한 MCLM-1 medium을 사용하였다. 본 배양을 위해서는 500 ml의 baffled flask 3개에 100 ml 씩의 배지를 3일 동안 배양한 종배양액 240 ml를 8l의 본 배양 배지에 접종한 후 28°C, 350 rpm, 1.2 vvm air의 조건으로 3일 동안 배양하였다.

세포주와 세포배양

세포주의 배양을 위해 사용한 RPMI 1640과 DMEM 배지는 GIBCO(MD, USA) 사의 제품을 사용하였고, fetal calf serum은 Hyclone(Utah, USA)에서 구입하였다. SNU-1과 SNU-354 세포주 배양에는 10% fetal calf serum이 함유된 RPMI 1640 배지를, KB-3-1과 MCF-7 세포주는 10% fetal calf serum이 함유된 DMEM 배지를, 그리고 RHEK-1 및 RHEK-1/pSV₂ ras 세포주는 1 µg/ml hydrocortisone이 함유된 10% fetal calf serum이 함유된 DMEM 배지를 각각 사용하였다. 모든 배양은 5% CO₂ 존재하에 37°C

incubator에서 이루어졌다.

사용기기

방선균의 배양을 위해서 B. Braun의 15 l jar fermentor인 Biomate를 사용하였고, mycelium의 harvest를 위해서는 Beckman Model J2-21 High speed centrifuge를, 화합물의 분리를 위한 HPLC는 Waters system(501 pump, 745B Data Module, Automated Gradient Controller)를 사용하였다. 기기분석을 위해서 UV absorption는 Milton Roy Spectronic 3000 array Spectrophotometer를, IR은 Laser Precision Analytical RFX-65 FT-IR Spectrophotometer를, NMR은 Varian 300과 500 NMR Spectrometer를, MS는 HP 5989A Spectrometer를 사용하였다.

항암활성의 측정

배양액 100 µl(5% FCS 함유)에 96 well plate의 한 well 당 log phase에 있는 세포수가 2000~5000 cells/well이 되도록 plating하여 24시간 배양한 후, 각각의 화합물을 MeOH에 녹여 단계별로 희석한 시료를 넣어 최종 volume이 200 µl가 되도록 하였다. 각 화합물의 IC₅₀은 24시간 배양한 세포에 시료를 처리하고 48~72시간 후에 SRB 방법을 이용하여 측정하였으며, 570 nm에서 흡광도를 측정하여 3개 well의 평균값을 대조군과 비교하여 결정하였다(3).

결과 및 고찰

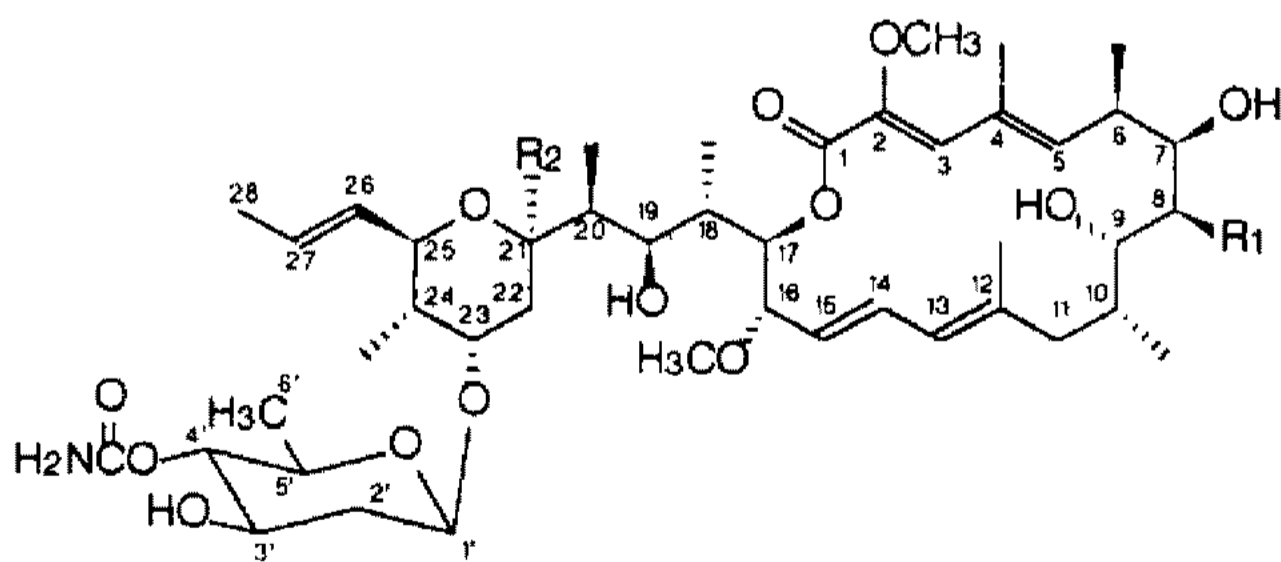
활성물질의 분리 정제

토양에서 분리한 방선균 균주 Ba16은 전보에서 보고한 대로(1) 분리하였으며, 항암활성의 분리정제를

위해서 방선균의 배양은 OMYM medium에서 배양하였다. 배양액 8 l를 8000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 supernatant와 mycelium을 분리하고, mycelium 만을 MeOH 4 l로 2회 추출하고 여과한 후, MeOH 추출액을 합하여 감압농축하였다. 이 MeOH extract를 다시 dichloromethane으로 녹여서 soluble한 분획만을 얻고 이를 농축한 후, MeOH을 용매로 하여 Sephadex LH20(460×26 mm) column chromatography를 실시하였다. 각 분획에 대하여 세포독성을 나타내는 분획만을 모아서 농축한 후 80% MeOH을 용매로 하여 preparative HPLC(Delta Pak 19×300 mm)를 실시하여 4종류의 macrolide 계 항암물질 MCH-201(17.1 mg), MCH-202(0.9 mg), MCH-203(3.9 mg), MCH-204(3.5 mg)를 분리하였다.

물리 화학적 성질과 구조동정

각각의 화합물은 무정형의 백색분말로 얻어졌으며 물리화학적 성질을 Table 1에 나타내었다. 네 화합물 모두 UV 244 nm와 285 nm의 흡수극대와, ¹H-NMR의 저자장 영역에서 H-3, H-5, H-13, H-14, H-15의 peak로부터 conjugated diene의 존재와 unsaturated ester의 구조를 가지고 있는 동일한 계통의 화합물임을 알 수 있었다(4). 이 화합물들 역시 실온에서 NMR spectrum을 측정할 경우 macrolide ring의 conformational flexibility 때문에 일부 peak 들은 broad 하게 나타나거나 또는 관찰되지 않았으므로 NMR 측정온도를 -20°C 또는 50°C 로 하여 측정하였다(5). MCH-202의 경우는 전보에서 보고한 MCH-201의 ¹H NMR spectrum과 비교해 볼 때 거의 동일한 spectrum을 나타내었으므로 concanamycin의 유도체임을 알 수 있었고, FAB MS spectrum에서 m/z 388 (M + Na⁺)의 peak로부터 분자량 865의 concanamycin A로 추정할 수 있었으며, 표준품과 HPLC의 retention time을 비교한 결과 동일하였으므로 concanamycin A로 동정하였다(6). MCH-203의 경우도 유사한 ¹H NMR spectrum을 보였고 FAB MS spectrum의 m/z 860 (M + Na⁺)의 peak에서 분자량 837의 concanamycin E로 동정하였다(7). MCH-204의 경우는 FAB MS spectrum에서 m/z 888 (M + Na⁺)의 peak를 나타내어 분자량이 865인 화합물로 추정할 수 있었고, ¹H NMR spectrum의 δ 2.96에서 특이하게 upfield shift된 methoxyl group이 관찰되는 것으로 보아 이 화합물은 concanamycin B의 C-21번 위치의 hydroxyl group이 methoxyl group으로 치환된 O-methyl concanamycin B로 동정하였다(4). MCH-201을 약산성의 methanol 용액에서 방치하면 MCH-204의 화합물로



compound	R1	R2	Identified as
MCH 201	CH ₃	OH	concanamycin B
MCH 202	CH ₂ CH ₃	OH	concanamycin A
MCH 203	H	OH	concanamycin E
MCH 204	CH ₃	OCH ₃	O-methyl-concanamycin B

Fig. 1. Chemical structure of the compounds isolated from mycelium of *Streptomyces* sp. Ba16.

변형되는 것으로 보아 이 화합물은 MCH-201의 분리과정에서 생성된 artefact일 가능성이 시사되었다. Concanamycins은 *Streptomyces diastatochromogenes* S-45에서 처음으로 분리된 18-membered macrocyclic lactone 구조로, long side chain에 2-deoxy- β -D-rhamnosyl group을 가진 six-membered hemiketal ring이 결합하고 있는 화합물로서, 최근 이러한 unu-

sual macrolides의 생물활성에 대한 관심이 증대되어 많은 연구가 진행되고 있다(8, 9).

생물학적 활성

이 화합물 들은 Table 3에서와 같이 위암세포주인 SNU-1, 간암세포주인 SNU 354, epidermal carcinoma 세포주인 KB-3-1 세포주에 대해서는 10^{-2} ~

Table 1. Physicochemical properties of MCH-201 and its congeners

	MCH-201	MCH-202	MCH-203	MCH-204
Nature	white power	white powder	white powder	white powder
HPLC ¹⁾ (rt)	8.28 min	9.86 min	7.08 min	12.53 min
MP	172°C	nd	nd	nd
UV λ max(MeOH)	244, 285 nm	244, 285 nm	244, 285 nm	244, 285 nm
MS(m/z)	874(FAB M+Na ⁺)	888(FAB, M+Na ⁺)	860(FAB, M+Na ⁺)	888(FAB, M+Na ⁺)

¹⁾column: μ -Bondapak C-18 (ϕ 3.9 \times 300 mm), solvent: 80% methanol, UV: 254 nm, flow rate: 1 ml/min, nd: not determined.

Table 2. ¹H-NMR assignments of MCH-201 and its congeners

	MCH-201 ¹⁾	MCH-202 ¹⁾	MCH-203 ²⁾	MCH-204 ¹⁾
C2-OCH ₃	3.48 s	3.56 s	3.57 s	3.61 s
H3	6.35 s	6.41 s	6.29 s	6.34 s
C4-CH ₃	1.96 s	1.97 s	2.01 s	1.99 s
H5	5.58 d (9.5)	5.68 d(10.2)	5.28 d(9.9)	5.79 m
C12-CH ₃	1.81 s	1.88 s	1.82 s	1.82 s
H13	5.80 d (11.0)	5.78 d(9.6)	5.85 d(10.5)	5.81 m
H14	6.50 m	6.58 m	6.54 m	6.48 m
H15	5.16 m	5.17 m	5.23 m	5.11 m
16-OCH ₃	3.20 s	3.26 s	3.24 s	3.18 s
C21-OCH ₃	—	—	—	2.96 s
H26	5.19 m	5.30 m	5.31 m	5.35 m
H27	5.48 m	5.53 m	5.54 m	5.64 m
H1'	4.48 d (9.5)	4.56 d(9.3)	4.54 d(9.7)	4.53 d
H4'	4.23 t(9.0)	4.28 t(9.1)	4.26 t(9.1)	4.30 t(9.1)
OCONH ₂	4.96 s	4.75 s	4.67 s	4.92 s

¹⁾¹H-NMR spectra were measured at -20°C in CDCl₃ (300 MHz).

²⁾¹H-NMR spectrum was measured at 50°C in CDCl₃ (500 MHz).

Table 3. Cytotoxic activities of the MCH-201 and its congeners

compound	Cell line tested (IC ₅₀ $\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	SNU-1	SNU-354	KB-3-1	MCF-7	RHEK-1	RHEK-1/pSV ₂ ras
MCH-201	5×10^{-3}	1×10^{-2}	5×10^{-4}	5×10^{-1}	5×10^{-3}	5×10^{-4}
MCH-202	1×10^{-4}	1×10^{-3}	5×10^{-3}	5×10^{-1}	5×10^{-4}	5×10^{-5}
MCH-203	5×10^{-2}	1×10^{-1}	5×10^{-2}	5×10^0	5×10^{-2}	5×10^{-3}
MCH-204	1×10^{-3}	5×10^{-3}	5×10^{-1}	5×10^0	5×10^{-2}	5×10^{-3}

SNU1: human stomach cancer, SNU354: human liver cancer, KB-3-1: human oral epidermoid carcinoma, MCF7: human breast cancer, RHEK-1: human epidermal keratinocyte cell line, RHEK-1/pSV₂ ras: RHEK-1 cell line transformed with pSV₂ ras.

10^{-4} $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서 IC_{50} 을 나타내었다. 인체 유방세포주 MCF-7 세포주에 대해서는 낮은 농도에서 세포의 형태 변화를 유도하였으나 다른 세포주에 비해서 대체로 저항성을 나타내었다. 구조활성 상관에서 볼 때 C-8 위치에 proton이 존재하는 MCH-203의 경우보다는 methyl group이 치환된 MCH-201이 높은 활성을 나타내었으며, ethyl group이 존재하는 화합물 MCH-202가 가장 높은 세포독성을 나타내었다. MCH-201의 탄소 21번 위치의 hydroxyl group이 methoxyl group으로 치환된 MCH-204 화합물의 경우는 대체로 낮은 활성을 나타내어 탄소 21번 위치의 hydroxyl group이 활성을 나타내는 functional group임을 시사해 주었다. 이 화합물들은 Ad12-SV40 virus에 의해서 감염되어 immortalized 된 human epidermal keratinocyte cell line인 RHEK-1 세포주에 대해서 대체로 높은 세포독성을 나타내었으며, 이 세포주에 *ras* oncogene을 transformation시킨 세포주 RHEK-1/pSV₂ *ras* 세포주에 대해서는 RHEK-1 세포주에 대해서보다 대체로 10배 정도 높은 세포독성을 나타내었다. Oncogene 중에서 가장 많이 연구된 *ras* 유전자는 GTP 결합 단백을 code 하며 point mutation에 의해 세포의 악성전환을 일으키는 잠재력을 갖고 있다. 실제로 colon cancer나 pancreatic carcinoma에서는 50% 이상의 *ras* mutation이 보고되어 *ras* protein과 사람의 암과의 상관성을 제시해 주고 있으며, *ras*에 의한 세포전환을 억제하는 항암제 개발의 가능성을 제시해 주고 있다(10). 지금까지 보고된 화합물로서 azatyrosine은 H-*ras*로 형질전환된 NIH3T3 세포의 형태를 NIH3T3의 원형대로 전환시키는 작용으로 검색되었고(11), H-*ras* 및 v-*ras*로 형질전환된 NIH3T3를 이용한 검색에서 depudesin이 보고되었다(12). 최근 매우 활발하게 진행되고 있는 farnesyl protein transferase 저해제 연구도 *ras* protein의 활성을 저해함으로써 특이적인 항암제를 개발하려는 노력의 일환이다(13). 최근 farnesyl protein transferase 저해제로 합성한 pseudo peptide L-731, 734는 soft agar에서 *ras*-transformed 세포의 성장 저해와 정상세포로 형태변화를 유도하였고(14), benzodiazepine 구조를 갖는 peptide 유사체는 *ras*-transformed 세포를 정상세포 형태로 변환시켰다(15). 이러한 일련의 보고들은 매우 고무적인 결과로, concanamycin의 경우도 *ras* protein의 기능을 저해하는지, 그 저해작용이 farnesyl protein transferase의 저해에 의한 것인지와, 또 *ras*-transformed 세포의 형태변화에 대한 영향을 규명하기 위한 연구가 계속되고 있다. Concanamycin은 이러한 세포독성 외에 항균활성과

면역활성(5), cholesteryl ester의 합성저해(7) 등의 다양한 생물활성을 나타낸다고 알려져 있어 앞으로 이러한 unususal macrolide에 대한 계속적인 연구가 기대된다.

요 약

미생물 대사산물로부터 인체암 세포주의 세포독성을 나타내는 화합물을 탐색하는 중에 *Streptomyces* sp. Ba16 균주를 선별하였으며, 이 균주를 배양하여 활성물질로서 MCH-202, MCH-203, MCH-204의 화합물들을 추가로 분리하였다. 물리화학적 성질과 각종 spectroscopic data에 의한 구조분석의 결과 이 화합물들은 각각 concanamycin A, concanamycin E, O-methyl concanamycin-B로 동정하였으며, SNU-1, SNU-354와 carcinoma 등의 세포주에 10^{-2} ~ 10^{-4} $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포독성을 나타내었다. 특히 이 화합물들은 Ad12-SV40 virus에 의해서 infection 된 human epidermal keratinocyte cell line인 RHEK-1 세포주에 대해서는 10^{-2} ~ 10^{-4} $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 대체로 높은 세포독성을 나타내었고, 이 세포주에 *ras* oncogene을 transformation시킨 RHEK-1/pSV₂ *ras* 세포주에 대해서는 RHEK-1 세포주에 비해 10배 정도 더 높은 세포독성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구에 사용된 SNU-1, SNU-354를 분양하여 주신 박재갑 교수님과 RHEK-1 및 RHEK-1/pSV₂ *ras* 세포주를 분양하여 주신 림종식 박사님께 감사드립니다. 본 연구는 과기처에서 지원한 특정연구개발 사업에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 김향섭, 김세은, 김영호, 이성우, 오구택, 김환목, 이정준. 1993. 인체유방암세포주 MCF-7의 형태변화와 증식에 영향을 주는 항암활성물질, MCH-201. 한국산업미생물학회지 21: 316-321.
2. Rhim, J.S., J.B. Park, and G. Jay. 1989. Neoplastic transformation of human keratinocytes by polybrene-induced DNA-mediated transfer of an activated oncogene. *Oncogene* 4: 1403-1409.
3. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenny, and M.R. Boyd. 1990. New calorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. NCI* 82: 1107-1112.

4. Kinashi, M., K. Someno, K. Sakaguchi, T. Higashijima, and T. Miyazawa. 1981. Structure of concanamycin A. *Tetrahedron* **22**: 3861-3864.
5. Kinash, H., K. Someno, and K. Sakaguchi. 1984. Isolation and characterization of concanamycin A, B and C. *J. Antibiotics*. **37**: 1333-1343.
6. Westley, J.W., C.M. Liu, L.H. Sello, R.H. Evans, N. Troupe, J.F. Blount, A.M. Chiu, L.J. Todaro, and P.A. Miller. 1984. The structure and absolute configuration of the 18-membered macrolide lactone antibiotic X-4357B (concanamycin A). *J. Antibiotics* **37**: 1738-1740.
7. Woo, J.T., C. Shinohara, K. Sakai, K. Hasumi, and A. Endo. 1992. Isolation, characterization and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification. *J. Antibiotics*. **45**: 1108-1116.
8. Kataoka, T., J. Magae, K. Kasamo, H. Yamanishi, A. Endo, M. Yamasaki, and K. Nagai. 1992. Effects of prodigiosin 25-C on cultured cell lines: its similarity to monovalent polyether ionophores and vacuolar H⁺-ATPase inhibitors. *J. Antibiotics* **45**: 1618-1625.
9. Ogasawara, M., N. Naruse, A. Yoshimura, Y. Hamagishi, and T. Oki. 1993. Elevation of low density lipoprotein-receptor mRNA concentration in human hepatoma HepG2 cells by macrolide antibiotics. *J. Antibiotics* **46**: 866-868.
10. Gibbs, J.A. 1991. *Ras* C-terminal processing enzymes-New drug target ? *Cell* **65**: 1-4.
11. Shindo-Okada, N., O. Makabe, H. Nagahara, and S. Nishimura. 1989. Permanent conversion of mouse and human cells transformed by activated *ras* or *raf* genes to apparently normal cells by treatment with the antibiotic azatyrosine. *Molecular Carcinogenesis* **2**: 159-167.
12. Sugita, K., H. Yoshida, M. Matsumoto, and S. Matsutani. 1992. A noble compound, depudecin, induces production of transformation to the flat phenotype of NIH3T3 cells transformed by *ras*-oncogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 379-387.
13. Tamanoi, F. 1993. Inhibitors of *Ras* farnesyltransferase. *TIBS* **18**: 349-353.
14. Kohl, N.E., S.D. Mosser, S.J. Desolms, E.A. Giuliani, D.L. Pompliano, S.L. Graham, R.L. Smith, E.M. Scolnick, A. Oliff, and J.B. Gibbs. 1993. Selective inhibition of *ras*-dependent transformation by farnesyltransferase inhibitor. *Science* **260**: 1934-1937.
15. James, G.L., J.L. Goldstein, M.S. Brown, T.E. Rawson, T.C. Sommers, R.S. McDowell, C.W. Crowley, B.K. Lukas, A.D. Levinson, and J.C. Marsters. 1993. Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of *Ras* farnesylation in animal cells. *Science* **260**: 1937-1942.

(Received June 24, 1994)