

## 방선균이 생산하는 Manumycin계 항암활성물질 MCHS-4

하상철\* · 김영호 · 이정준  
KIST 생명공학연구소

### Cytotoxic Manumycin Class Antibiotic from *Streptomyces* sp., MCHS-4

Sang-Chul Ha\*, Young-Ho Kim and Jung-Joon Lee

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,  
KIST P.O. BOX-115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

**Abstract** — A cytotoxic compound, MCHS-4, was isolated from the mycelium of *Streptomyces* T-70 and identified as manumycin A. The compound showed significant cytotoxicity against human gastric carcinoma cell line, SNU-1 and human hepatocellular cell line, SNU-354.

미생물 대사 산물로부터 항종양 항생물질을 개발하기 위한 연구의 일환으로 국내에서 다발하는 암들로부터 수립한 암세포주들중 위암 세포주 SNU-1, 간암세포주 SNU-354에 대한 세포 독성 물질을 탐색하는 과정에서 *Streptomyces* sp. T-70 균주가 생성하는 항암활성물질 MCHS-4를 분리정제하여 구조를 분석한 결과 manumycin으로 동정되었기에 간략하게 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 균주의 배양

방선균 분리주 *Streptomyces* sp. T-70의 배양에는 oatmeal 20 g, malt extract 20 g, yeast extract 2 g, glucose 10 g, soybean meal 10 g, soluble starch 12 g을 1l의 증류수에 녹이고, pH를 7.0으로 조절한 MCLM-1 배지를 사용하였다. 활성물질의 분리정제를 위해 Jar fermenter에서 5l의 MCLM-1 배지에 200 ml의 T-70균주 1차 배양액을 접종하고 28°C, 350 rpm, 1.2 vvm air의 조건으로 5일동안 배양하였다.

##### 세포주와 세포배양

세포주의 배양을 위해 사용한 RPMI 1640는 GIBCO(MD, USA)사의 제품을 사용하였고, fetal calf serum은 Hyclone(Utah, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 세포주들은 성장속도가 빠르고 항암제에

대한 감수성이 예민한 SNU-1(위암세포주)과 기존 항암제에 내성을 나타내는 SNU-354(간암세포주)로써 세포주들은 10% fetal calf serum이 함유된 RPMI 1640 배지에 접종하여 5% CO<sub>2</sub> 존재하에서 37°C incubator에서 배양하였다.

##### 사용기기

방선균의 배양에는 한국발효기의 7.5l jar fermenter를 사용하였고, 화합물의 분리를 위한 HPLC는 Waters사의 HPLC System(501 pump, 745B Data Module, Automated Gradient Controller)을 사용하였다. UV spectra는 Milton Roy Spectronic 3000 array Spectrophotometer를, <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectra는 Varian Unity 300 NMR Spectrometer를, FAB-MS는 JMS-HS 110A Spectrometer를 사용하였다.

##### 항암활성의 측정

Microtiter plate에 SNU-1 세포주는 RPMI 1640 배지 180 μl에 8×10<sup>3</sup>개 세포수가 되도록 희석하고 SNU-354 세포주는 180 μl 배지에 4×10<sup>4</sup>개 세포수가 되도록 희석하여 각 well에 분주하고 24시간 후에 시료를 가해 주었다. 시료는 DMSO 용액에 화합물을 농도별로 용해한 후 RPMI 배지에 희석하여 20 μl를 가했을 때 well당 DMSO의 농도가 0.1%가 되도록 조제하였다. 조제한 시료 20 μl를 각 well에 첨가하고 3일동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하면서 수시로 현미경상에서 형태 변화를 관찰하였다. 세포증식 저해 정도는 SRB(sulforhodamine B) 방법을 이용하여 측

**Key words:** Antitumor antibiotic, MCHS-4, manumycin, *Streptomyces* sp.

\*Corresponding author

**Table 1. Physico-chemical properties of antibiotic MCHS-4**

Appearance	pale yellow amorphous powder
Mp(°C)	139~141°C(dec)
Solubility	soluble: CHCl <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> OH, acetone insoluble: H <sub>2</sub> O, hexane
FAB-MS negative (m/z)	549 (M-H) <sup>+</sup>
UV λ <sub>max</sub> MeOH nm	314, 278
TLC, SiO <sub>2</sub> <sup>b</sup> (Rf)	0.51

<sup>b</sup>CHCl<sub>3</sub>-MeOH(9:1).

정하였다(1).

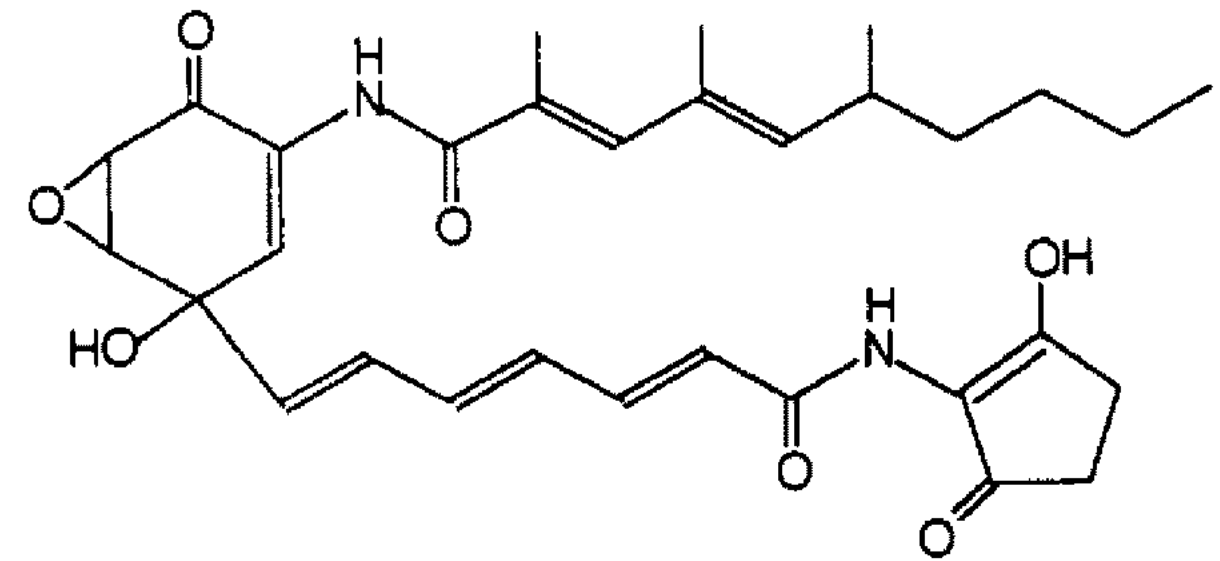
## 결과 및 고찰

### 항생물질의 분리정제

토양에서 분리한 방선균 배양액을 용매추출하여 제조한 시료들을 위암세포주, SNU-1에 대한 세포독성 검색과정에서 *Streptomyces* sp. T-70으로부터 제조한 시료가 현저한 세포증식저해 작용을 나타내었다. 활성물질을 정제하기 위해 T-70 균주를 5l의 MCLM-1에서 5일동안 배양한 후 원심분리하여 균사체만을 취하였다. 균사체를 acetone으로 3회 추출하고 추출액을 감압농축한 후 다시 ethyl acetate로 추출하였다. Ethyl acetate 추출액을 농축한 후 silicagel column을 이용하여 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(10:1) 용매로 분획하였다. 위암세포주에 세포독성을 나타내는 분획은 preparative TLC plate(MERCK, Art 5744)에 loading 한 후 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(10:1)로 전개시킨 후 활성을 나타내는 분획을 모아 농축한 후 70% MeOH 용매로 preparative HPLC를 실시하여 최종적으로 MCHS-4(10 mg)을 얻었다.

### 이화학적 성질 및 구조분석

항생물질 MCHS-4의 이화학적 성질은 Table 1과 같다. MCHS-4는 융점 139~141°C의 미황색 분말로서 MeOH, acetone, chloroform에는 녹고, 물과 hexane에는 녹지 않았다. UV spectrum에서 278 nm와 314 nm의 최대 흡수파장으로 분자내에 conjugated dienone과 trienone의 존재를 추정할 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 0.88(3H, t, J=6.0 Hz)과 δ 0.99(3H, d, J=6.3 Hz)에서 각각 aliphatic chain의 methylene과 methine carbon에 결합하고 있는 methyl기와 δ 1.81(3H, s), δ 2.04(3H, s)에서 olefinic car-



**Fig. 1. Structure of manumycin**

bon에 결합하고 있는 methyl기를 포함하여 총 4개의 methyl기를 관찰할 수 있었다. 그 외의 methylene proton, olefinic proton과 NH, OH등의 chemical shift는 문헌에 보고된 manumycin의 data와 거의 일치하였다. 분자량을 알기 위해서 negative FAB-MS를 측정된 결과 m/z 549에서 molecular ion peak를 관찰할 수 있었다. 이상의 물리화학적 성질과 spectral data를 문헌치와 비교함으로써 MCHS-4는 manumycin A로 동정할 수 있었다(Fig. 1).

### 생물활성

MCHS-4는 인체위암세포주인 SNU-1과 간암세포주인 SNU-354에 대하여 5.0 µg/ml, 12.0 µg/ml의 비교적 낮은 농도에서 IC<sub>50</sub>를 나타내었다. 현재까지 보고된 여러 manumycin의 유도체(2-12)들은 gram 양성 세균 및 fungi에 대한 antimicrobial activity와 L1210에 대한 세포독성외에도 ras 단백질의 farnesyltransferase(13, 14) 저해 활성과 더불어 ras 유전자가 활성화된 종양에 대해서 in vivo에서 활성이 있음이 보고된 후 manumycin계 화합물에 대한 연구가 활발하다. 최근 새로운 표적을 지표로 한 항종양 활성물질의 검색방법이 계속 확립되고 있어 세포 독성을 나타내는 기존의 화합물이라도 새로운 활성화합물로의 개발 가능성이 기대되고 있다.

## 감사의 글

본 연구에 사용된 SNU-1, SNU-354 세포주를 분양하여 주신 박재갑 교수님께 감사를 드립니다. 본 연구는 한국과학재단에서 지원한 이공계 박사학위자 연구지원 사업에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 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.
2. Buzetti, F., E. Gaumann, R. Hutter, W. Keller-Schierlein, L. Neipp, V. Prolog and H. Zahner. 1963. *Manumycin*. *Pharm. Acta Helv.* **38**: 871.
  3. Schroder, K. and A. Zeeck. 1973. *Manumycin*. *Tetrahedron. Lett.* **50**: 4995-4998.
  4. Zeeck, A., K. Schroder, K. Frobel, R. Grote and R. Thiericke. 1987. The structure of manumycin. I. Characterization, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiotics* **40**: 1530-1540.
  5. Kakinuma, K., N. Ikekawa, A. Nakagawa and S. Omura. 1979. The structure of asukamycin, a possible shunt metabolite from 3-dehydroquinic acid in the shikimate pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 3402-3404.
  6. Brodasky, T.F., D.W. Stroman, A. Dietz and S. Mizesak. 1983. U-56,407, new antibiotic related to asukamycin: Isolation and characterization. *J. Antibiotics* **36**: 950-956.
  7. Slechta, L., J.I. Cialdella, S.A. Mizesak and H. Hoeksema. 1982. Isolation and characterization of a new antibiotic U-62162. *J. Antibiotics* **35**: 556-560.
  8. Grote, R., A. Zeeck, H. Drautz and H. Zahner. 1988. Metabolic products of microorganisms. 244. Colabomycins, new antibiotics of the manumycin group from *Streptomyces griseoflavus*. I. Isolation, characterization and biological properties. *J. Antibiotics* **41**: 1178-1185.
  9. Chatterjee, S., E.K.S. Vuayakumar, C.M.M. Franco, J. Blumbach, B.N. Ganguli, H-W. Fehlhaber and H. Kogler. 1993. On the structure of alisamycin, a new member of the manumycin class of antibiotics. *J. Antibiotics* **46**: 1027-1030.
  10. Zeeck, A. and I. Sattler. 1993. Directed biosynthesis as an alternative to synthetic modifications of antibiotics. In antibiotics and antiviral compounds. Chemical synthesis and modification. Ed., K. Krohn, *et al.*, pp. 75-87, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weiheim.
  11. Shu, Y.Z., S. Hwang, R.R. Wang, K.S. Lam, S.E. Klohr, K.J. Volk, D.M. Pirnik, J.S. Wells, P.B. Fernandes and P.S. Patel. 1994. Manumycin E, F and G, new members of manumycin class antibiotics, from *Streptomyces* sp. *J. Antibiotics* **47**: 324-333.
  12. Hayashi, K., M. Nakagawa and M. Nakayama. 1994. Nisamycin, a new manumycin group antibiotic from *Streptomyces* sp. K106. II. Structure determination and structure-activity relationships. *J. Antibiotics* **47**: 1110-1115.
  13. Gibbs, J.A. 1991. Ras c-terminal processing enzymes- New drug target? *Cell* **65**: 1-4.
  14. Hara, M., K. Akasaka, S. Akinaga, H. Nakano, R. Gomez, D. Wood, M. Uh and F. Tamanoi. 1993. Identification of ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2281-2285.

(Received 20 April 1995)