

## 한국 *Streptomyces* sp.로부터 분리한 방향족 화합물과 지질 화합물의 세포독성 연구

신석우 · 염 곤\*  
단국대학교 미생물학과

### Cytotoxic Effect of Aromatic and Aliphatic Compounds Produced by *Streptomyces* sp. Isolated in Korea

Shin, Suck Woo and Ryeom, KON\*

Department of Microbiology, Dankook University

(Received April 15, 1997; accepted June 4, 1997)

**Abstract** -- In an effort to screen new selective antitumor agents from the broth of soil microorganism, cytotoxicity oriented screening was performed against tumor cells and 3 compounds (Compound 1, 2 and 3) were isolated from *Streptomyces parvullus* ISP 5048 and their chemical structures were determined. Among these compounds, Compound 2 showed the highest cytotoxicity against P388D1 and L1210. While the IC<sub>50</sub> values of compound 2 against P388D1 and L1210 were 0.073 µg/ml and 0.07 µg/ml, respectively, and the IC<sub>50</sub> value of Compound 3 was 0.17 µg/ml against human lung cancer cells, A549, the cytotoxicity of Compound 2 and 3 against normal cell line, Vero E6 cell was about 4- and 8-fold lower than that of adriamycin. Based on the chemical analysis data, Compound 3 was octacosamicine A, a known antibiotic, which was reported by Dobasih *et al.* (1988). Taken together the results demonstrated that Compound 2 and Compound 3 has the possibility to be developed as antitumor agent because of its potent cytotoxicity as well as high selectivity against various cancer cell lines.

**Keywords** □ *Streptomyces* sp., Cytotoxicity

미생물이 생산하는 이차 대사 산물에는 항생제, 색소, 면역 조절 인자, 효소 억제제, 항종양인자 등이 있으며 특히 토양의 미생물들 중 방선균은 그 이차대사 산물로부터 많은 종류의 종양 세포 억제 인자가 분리되어 꾸준한 연구 대상이 되어 왔다(이, 1989; 이, 1992). 1953년 일본에서 sarkomycin(Umezawa, 1953)이 토양에서 분리된 방선균의 배양액에서 분리 정제된 이후 mitomycin C, bleomycin, actinomycin D, daunorubicin 등이 분리된 방선균의 배양액으로부터 분리되어 독성 및 임상 실험을 거친 후 각종 종양 치료에 중요한 일익을 담당하고 있다(이, 1992). Sarkomycin은 *Streptomyces erythrochromogenes*에서 분리된 물질로서 위, 유방, 자궁, 난소, 폐의 암을 억제하며 축적성 만성 독성이 적은 것으로 보고되었다. *Streptomyces antibioticum*으로부터 분리된 actinomycin D는 임파육아종증에 좋은 결과를 나타내고 있으나 너무 독성이 강하며 널리 사용되지 못하고 있다. Bleomycin는 *Streptomyces grieseus*에서

분리, 정제되었으며, 여러 가지 암 중에서도 피부와 두경부의 암과 편평상피암에 우수한 치료 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 이 항암제는 다른 항암제와 달리 신장에 대한 독성이 낮고 백혈구나 혈소판 감소증을 거의 일으키지 않지만 피부와 폐에 독성이 있다. 또한 광범위하게 사용되는 adriamycin의 경우 심근계 및 순환계 등에 심각한 부작용을 나타내는 문제가 있어 사용에 주의를 요하는 연구 보고가 있다(정, 1982). 이와 같이 대부분의 항암제들은 원하지 않는 부작용을 갖고 있기 때문에 사용이 제한적이다. 이러한 부작용은 분열 속도가 빠른 암세포를 저해하는 물질이 인체의 정상 세포 중 분열 속도가 비교적 빠른 백혈구 모근 세포 조절기 및 생식기 등의 분열 세포에도 작용하여 암세포에만 성장 저해를 일으키는 선택 독성이 높지 않은 것에 기인한다(이, 1989; 정, 1982). 따라서 이상과 같이 여러 가지 현안문제를 해결하려는 노력이 요구되어 새로운 항암제의 개발이 필요하다고 생각된다.

최근, 국내에서도 토양으로부터 분리된 방선균의 배양액으로부터 항종양 물질의 탐색을 시도하는 연구가 활발히

\* To whom correspondence should be addressed.

진행중이나 순수 정제 분리되어 그 생물학적, 화학적 특성이 규명된 항종양 물질의 보고는 극히 제한적이다.

따라서 인체에 부작용이 적으면서 우수한 항암효과를 나타내는 새로운 천연 화합물을 찾기 위한 시도로서 국내 토양에서 항종양물질을 생산하는 방선균을 선별, 분리하고 그 배양액에서 항종양 활성을 보이는 화합물을 순수 분리, 정제한 뒤 정제된 화합물의 *in vitro* 세포 독성능 측정과 아울러 그 구조적 특성을 규명하였다.

## 실험방법

### 야생균주의 분리 배양 및 선별

1994년 4월부터 7월까지 전국 각지에서 채취된 386건의 토양시료 중 전북 대둔산에서 채취한 토양시료를 80℃에서 90분간 방치한 다음 멸균된 증류수에 현탁한 후 방선균 분리용 배지에 상등액을 접종하였다. 방선균 분리용 배지는 Starch-casein agar(Khan and Williams, 1975)를 사용하였으며 fungi의 증식을 억제하기 위해 배지에 Nystatin(50 µg/ml), Cycloheximide(50 µg/ml)를 첨가하였다(이, 1992). 방선균 분리용 배지에서 28℃, 7일에서 14일 동안 배양하여 순수 colony를 분리하였다. 분리된 균주들은 Modified-Bennett's 사면 배지에 접종, 배양시킨 후 4℃ 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다. 염(염, 1994)의 연구 결과 보고서를 토대로 선별된 *Streptomyces parvullus* 117균주(이하 방선균주117로 표기한다)를 대량 배양하여 그 배양액으로부터 항종양 물질의 분리를 시도하였다.

### 방선균 분리균주의 동정

분리균주의 동정을 위한 일반적인 특성은 Manual of the Methods for General and Molecular Bacteriology(Gerhardt 등, 1994)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Sneath 등, 1986)에 따라서 검색되었으며, fatty acid는 gas liquid chromatography로 분석하였다. 또한 영국 Newcastle upon Tyne 대학 미생물학과의 S. A. Ward 박사에게 의해 개발된 program으로서 단위형질의 특성을 양성(+) 혹은 음성(-)으로 간단하게 입력하고, 입력된 자료를 CLUSTAN으로 분석하여 수리분류를 할 수 있는 TAXON program을 이용하여 분리주의 동정 스코어를 결정하였다.

### 항종양 물질의 분리 정제

분리균주 117의 배양액을 ethylacetate로 추출하여 ethylacetate 조엑기스(crude extract) 2.0g을 얻었다. CHCl<sub>3</sub> 용매 하에서 조엑기스를 column chromatography(silica gel)하여 Part A(1.98 g)와 Part B (20 mg)로 분획하였다. Part A를 ethylacetate:n-hexane:methanol=9:1:1 의 혼합용매로 column chromatography하여 compound 1(1.58 g) 및 Part C로 나누고, Part C는 다시 column chromatography(ethylacetate:methanol:NH<sub>4</sub>OH=9:1:1)법으로 재차 정제하여 compound

2(70 mg)와 compound 3(10 mg)을 얻었다.

### 세포 배양 및 세포 독성능 측정

본 실험에 사용된 세포주중 정상 세포인 Vero는 한국 세포주은행에서 분양 받아 사용하였고, 암세포주인 P388D<sub>1</sub>, L1210, A549는 화학 연구소에서 미국 국립 암연구소(NCI)로부터 분양 받아 계대중인 것을 분양 받아서 사용하였다. 세포 배양은 RPMI 1640(Gibco)배지에 10% FBS(Fetal bovine serum, Gibco)와 항생물질(Antibiotic-Antimycotic solution, 100×: 10 ml/L, Sigma)을 1%농도로 첨가하였으며 L-glutamine(Gibco)이 포함된 배지를 사용하였다. 각 세포주는 37℃ 온도에서 5% CO<sub>2</sub>를 유지시키고, 완전 습윤 상태가 유지되는 항온 항습기(Yamato CO<sub>2</sub> model IP-31)에서 배양하였다. Attached cell line인 경우에는 항온 항습기에서 monolayer를 이루도록 배양시키다가 PBS(phosphate buffered saline, Gibco)로 두번 세척한 후 0.05% trypsin 이 포함된 trypsin-EDTA solution(0.25%, Gibco)과 D-PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco)를 사용하여 부유시킨 후 계대 배양하였으며, suspension cell line 경우는 최대 성장된 상태의 T<sub>25</sub> flask(Nunc)에서 0.2 ml 을 다른 T<sub>25</sub> flask에 계대 배양하여 cell line을 유지하였다. colorimetric assay인 [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide](MTT)를 이용한 MTT assay 방법으로 각 세포주의 생존률을 구하였다(Alley et al., 1989; Carmichael et al., 1987).

### 항종양 물질에 대한 기기분석

항종양능이 확인된 화합물들의 구조분석을 위하여 HPLC, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR 및 UV, IR 등의 분광 분석법을 이용하여 조사하였다.

## 실험결과

### 방선균 분리균주의 동정

새로운 종양 세포 억제 인자의 Screening을 위해 일차적으로 분리된 방선균주들의 배양액에 대한 *in vitro* 세포 독성능 측정을 실시하였으며, 그 결과 분리균주 117이 암세포주들에 대해 낮은 희석배수에서 높은 세포 독성능(L1210에 대해 10<sup>-2</sup>~10<sup>-3</sup>사이, P388D<sub>1</sub>에 10<sup>-1</sup>~10<sup>-2</sup>)을 보였다(염 등, 1993). 이 결과를 토대로 117번의 방선균을 선택하여 분리동정을 실시하였다. 분리균주 117의 형태학적 특성은 배지에서 전형적인 *Streptomyces* sp.의 mycelia와 spore를 형성하였다. 원형의 colony를 형성하며 기균사(substrate mycelium)의 색깔은 노란색이었으며 그 위로 ivory 색의 기중균사(aerial mycelium)를 형성하였고, 기질균사는 직선형을 나타냈으며 기중균사는 약간의 굴곡을 나타내는 직선형이었다. 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscope) 관찰결과 포자의 형태가 타원형에 가까운 원통형으로 표면

은 특이적인 돌출물을 갖고 있지 않는 매끈한 형태이고 포자사슬은 분절된 상태였으며 포자사슬의 형태는 나선형이었다. 분리균주 117를 여러 배지에서 배양하여 보았을 때 peptone-yeast extract iron agar(ISP medium 6) 및 Czapeck Dox agar를 제외한 대부분의 배지에서 잘 자랐으며 성장할 때 어떠한 특징적인 변화는 관찰할 수 없었고 light ivory의 기중균사와 노란색의 기질균사를 형성하며 가용성 색소는 노란색이었다(data not shown). 화학분류학적 특성은 Table I에서 보여준 것처럼 분리균주 117의 세포벽의 DAP 이성질체는 LL-DAP(diaminopimelic acid)를 갖고 있었으며, 전균체 가수분해액에 대한 특이적 9종의 당에 대한 실험 결과 세포내의 특징적인 당은 관찰되지 않았다. 분리균주 117의 인지질 구성성분은 *Streptomyces* sp. 분류에 이용되는 PE(phosphatidylethanolamine)를 포함하였으며 PI(phos-

phatidylinositol), DPG(diphosphatidylglycerol) 등을 포함하였다. 이러한 형태는 인지질의 구성성분에 따른 Lechevalier의 분류에서 phospholipid type PII의 형태이다(Table I). 또한 분리균주 117는 *Streptomyces* sp.의 전형적인 주요 지방산 구성성분인 anteiso-15:0, iso-16:0 등을 함유하였다(Table I). 위와 같이 형태학적 특성과 화학분류학적 특성을

**Table I.** Chemotaxonomic characteristics of the strain 117.

Characteristics	strain 117
Cell wall type	I
DAP	LL-DAP
Sugar	None
Phospholipid type	PII
Major fatty acid	ante-15:0 iso-16:0

**Table II.** Taxonomic characteristics of the strain 117.

1. Morphology and pigmentation	
spore chain morphology :	rectiflexible(-), spiral(+)
color of spore mass :	red(-), gray(-)
mycelial pigment :	red/orange (+)
diffusible pigment :	production(+), yellow/brown(+)
melanin production :	PYI medium(-), tyrosin medium(-)
2. Antimicrobial activity	
<i>Bacillus subtilis</i> (SUB) :	<i>Micrococcustluteus</i> (LUT) : +
<i>Candida albicans</i> (ALB) :	<i>Saccharomycescerevisiae</i> (CER) : -
<i>Streptomyces murinus</i> (MUR) :	<i>Aspergillus niger</i> (NIG) : -
3. Biochemical tests	
lecithinase (LEC) :	lipolysis(LIP) : -
pectin hydrolysis (PEC) :	nitrate reduction (NO <sub>3</sub> ) : +
H <sub>2</sub> S production(H <sub>2</sub> S) :	hippulate hydrolysis (HIP) : +
4. Degradative tests	
elastin (ELA) :	xanthine(XAN) : +
albutin (ARB) :	
5. Antibiotic resistance	
neomycin (NEO) :	rifampicin(RIF) : +
oleandomycin (OLE) :	penicilline G (PEN) : +
6. Growth tests	
45 °C(45 °C) :	NaCl (7NA) : +
sodium azide (OLZ) :	phenol (PHN) : -
potassium tellurite (OIT) :	thallous acetate (TOI) : +
7. Compounds as sole source of nitrogen (0.1%, w/v)	
DL-α-amino-n-butyric acid (BUT) :	L-cystein (CTS) : +
L-valine (VAL) :	L-phenylalanine (PHE) : +
L-histidine (HIS) :	L-hydroxyproline (HYD) : +
8. Organic compounds as sole source of carbon (1%, w/v)	
sucrose (SUC) :	myo-inositol (INO) : -
mannitol (MAN) :	L-rhamnose (RHA) : +
raffinose (RAF) :	D-melezitose (MEZ) : -
adonitol (ADO) :	dexran (DEX) : -
D-melibiose (MEB) :	xylitol(XYT) : -



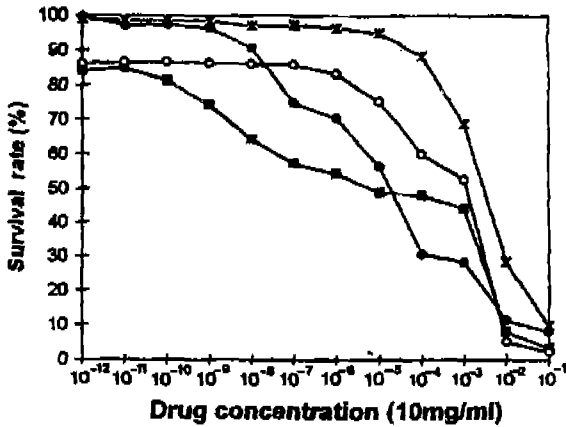


Fig. 1. Cytotoxic effect of compound 1 on the various cell lines. Various cells were seeded and further cultured for 72 hr in RPMI 1640 medium in the presence of compound 1. Cell growth was determined by the MTT assay. P388D<sub>1</sub> (■), L1210 (○), A549 (●), Vero (\*).

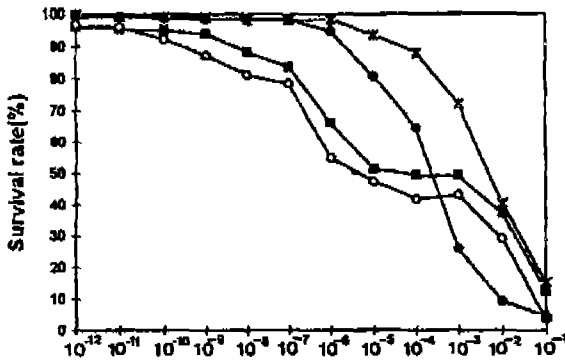


Fig. 2. Cytotoxic effect of compound 2 on the various cell lines. Various cells were seeded and further cultured for 72 hr in RPMI 1640 medium in the presence of compound 2. Cell growth was determined by the MTT assay. P388D<sub>1</sub> (■), L1210 (○), A549 (●), Vero (\*).

분리균주 117번의 배양여액을 ethylacetate로 추출 후 감압 농축하여 얻은 crude extract를 silica gel column chromatography를 이용하여 chloroform으로 전개시켜 일차적으로 두 가지 분획, 즉 Part A와 Part B를 얻었고 이 분획물들에 대한 세포 독성능 측정을 위해 각각 10 mg/ml의 농도로 맞춘 다음 10<sup>-1</sup>에서 10<sup>-12</sup>의 농도까지 단계별로 희석하여 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, 암세포주에 대해서 Part A가 높은 세포독성능을 나타냈다(data not shown).

Part A로부터 높은 순도의 항종양 물질을 분리하기 위해 다른 용매체계에 의한 silica gel column chromatography를 이용하여 compound 1, compound 2 및 compound 3를 각각 분리하였다. 이 화합물들에 대한 시험관내 세포독성능을 같은 방법으로 측정한 결과, compound 1의 IC<sub>50</sub> 값은 양성 대조 세포주 Vero에 대해 51.7 µg/ml, 암세포주인 P

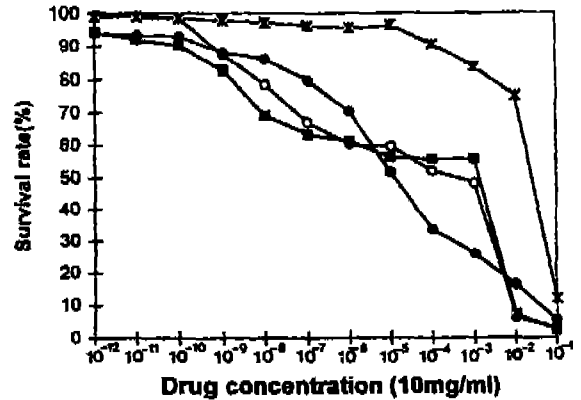


Fig. 3. Cytotoxic effect of compound 3 on the various cell lines. Various cells were seeded and further cultured for 72 hr in RPMI 1640 medium in the presence of compound 3. Cell growth was determined by the MTT assay. P388D<sub>1</sub> (■), L1210 (○), A549 (●), Vero (\*).

Table V. IC<sub>50</sub> (µg/ml) of compounds and adriamycin on cell lines.

Cell lines	IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	Compound 1	Compound 2	Compound 3	ADM*
P388D <sub>1</sub>	0.08	0.073	5.64	0.88
L1210	15.0	0.07	20.46	0.54
A549	0.32	4.34	0.17	0.09
Vero	51.7	244.48	455.47	57.69

ADM\*: Adriamycin.

388D<sub>1</sub>, L1210, A549에는 각각 0.08 µg/ml, 15.0 µg/ml, 0.32 µg/ml로 나타났다(Fig. 1).

Compound 2의 경우, P388D<sub>1</sub>에 대한 IC<sub>50</sub>값이 0.073 µg/ml이었으며, L1210, A549에 대해서 각각 0.07 µg/ml, 4.34 µg/ml로 나타났다. 또한 정상 세포주인 Vero에 대해서는 IC<sub>50</sub>값이 244.48 µg/ml이었다(Fig. 2).

마지막으로 compound 3에 대한 세포독성능 측정결과, 암세포주인 P388D<sub>1</sub>, L1210, A549에 대해 각각 5.64 µg/ml, 20.46 µg/ml, 0.17 µg/ml이었으며, 대조 세포주인 Vero에 대한 IC<sub>50</sub>값은 455.47 µg/ml이었다(Fig. 3).

또한 분리 정제된 각 compound들과 대조 약물인 adriamycin의 세포독성능을 비교해본 결과, compound 1과 compound 2가 암세포주 P388D<sub>1</sub>에 대해 adriamycin보다 10배 높은 것으로 측정되었으며, L1210에 대해서는 compound 2가 대조 약물에 비해 약 8배 높은 시험관내 세포 독성능을 나타내었다(Table V).

그러나, Compound 1의 경우 정상 세포인 Vero cell에 대한 세포 독성능이 Compound 2의 약 5배, 그리고 Compound 3의 약 9배 정도까지 높게 측정되었으며, 항암제인 adriamycin보다도 약간 높은 결과를 나타냈다(Table V).

#### 항종양물질의 구조분석

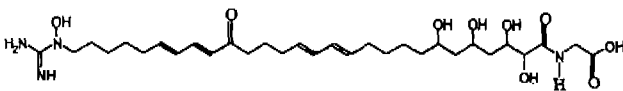
MTT assay 결과를 토대로, 세포 독성이 높으나 정상 세

포주인 Vero cell에 대해서는 세포독성이 낮은 compound 2와 compound 3의 구조 규명을 시도하였다.

Compound 2는 원소 분석 및 FAB mass로부터  $C_{29}H_{31}O_{12}N_3$ (M.W. 613)의 분자식을 확인하였다. UV spectrum에서 250 nm 및 380 nm에서 흡수 극대가 나타났으며, IR spectrum에서  $3400\text{ cm}^{-1}$ 에 NH group,  $1600\text{ cm}^{-1}$ 에서 C=O,  $1300\text{ cm}^{-1}$ 에서 C-O band를 확인 할 수 있었다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서는  $\delta 11.7\text{ ppm}$ 에서 COOH,  $\delta 9.96\text{ ppm}$ 에서 NH proton이 관찰되었다. 또한  $7.46(d)$ 과  $6.90(d)\text{ ppm}$ 에서 aromatic proton을 확인 할 수 있었다.

이상의 자료로부터 compound 2는 indole alkaloid 계통의 물질로 추정하였으나 정확한 구조를 위하여서는 더욱 연구가 수행되어야 하겠다. Compound 3은 원소 분석 및 FAB mass로부터 분자식이  $C_{31}H_{52}N_4O_9$ (M.W. 624)로 확인 할 수 있었다. UV spectrum에서 흡수 극대치는  $238(\epsilon=22,000)$ 로 나타났다.  $^{13}\text{C-NMR}$ 로부터 31개의 탄소를 확인 할 수 있었으며,  $65\sim 75\text{ ppm}$  부근에 4개의 peak로부터 산소에 연결된 탄소가 4개임을 알 수 있었다. 또한  $174.8$  및  $176.0\text{ ppm}$ 에서 acid 및 amide성 carbonyl기,  $204.6\text{ ppm}$ 에서 ketone,  $159.2\text{ ppm}$ 에서 C=N carbon을 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 및  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ -correlation spectroscopy(COSY)로부터  $4.09$ 와  $4.15\text{ ppm}$ 에서의 peak들은 methylene 수소들의 AB splitting pattern을 가지며, 이는 글라이신 moiety의 methylene으로 assign할 수 있고, 이 methylene들은  $174.7\text{ ppm}$ 과  $176.0\text{ ppm}$ 의 carbonyl 탄소와 연결되어 있다. 또한  $176.0\text{ ppm}$ (C-1)의 carbonyl탄소는  $4.28\text{ ppm}$ 의 oxymethine의 수소에 연결되어 있다. 그 외  $1.61\text{-}1.85\text{ ppm}$ ,  $3.97\text{-}4.22\text{ ppm}$ 에서 methylene peak들이 보여진다. 이때  $4.28\text{ ppm}$ 에서의 oxymethine의 수소가  $70.6\text{ ppm}$ 과  $40.9\text{ ppm}$ 의 탄소에 연결되어 있음을 알 수 있다.  $3.97\text{ ppm}$ 에서의 수소는  $14.7$ ,  $33.6$ ,  $41.9\text{ ppm}$ 의 탄소에 연결되어 있고,  $0.75\text{ ppm}$ 에서의 수소는  $72.8$ 과  $39.7\text{ ppm}$ 의 탄소에 연결되어 있다.

이상의 자료를 종합하여 compound 3은 Fig. 4의 구조로 추정하였다. 문헌조사 결과 compound 3은 actinomycetes 균주의 배양액에서 Dobasih 등(Dobasih et al., 1988)이 분리 보고한 octacosamicine A와 동일한 구조였으며 기기 분석 자료 등이 일치하여 compound 3은 octacosamicine A로 동정되었다.



Compound 3.  
 $C_{31}H_{52}N_4O_9$   
MW : 624

Fig. 4. Structure of compound 3.

## 고 찰

새로운 세포 성장 억제 인자의 탐색을 위해, 일차적으로 토양으로부터 이들을 생산하는 미생물의 분리를 시도하였는데, 토양내에는 박테리아, 방선균, 및 진균등과 같은 다양한 미생물들을 함유하고 있으며, 이중 항암 화학 요법제로 개발 가능성이 있는 종양 세포 성장 억제 인자의 생산능이 확인된 많은 연구 보고가 있었다(Umezawa, 1953; Hirosh, 1977; Maiese et al., 1989; Ryn and Choi, 1992). 특히 방선균과(Actinomycetes)에 속하는 방선균(Streptomyces)속은 아주 다양한 생물 활성을 갖는 이차 대사 산물을 생산하는 균주로 알려져 있어(Waksman, 1961), 이 토양 미생물의 배양액으로부터 새로운 천연 화합물을 찾기 위한 많은 시도가 진행되고 있다.

본 실험에서는 채취된 토양 시료로부터 분리된 방선균주들의 종양 세포 성장 억제능을 확인하기 위해 먼저 각 균주들의 배양 여액에 대한 시험관내 세포 독성능을 측정하였다. 그 결과 분리 균주117이 유의성 있는 결과를 나타냈으며(염, 1994), 그 배양액내에 항종양능을 보이는 인자를 함유할 것으로 판단하여 이 균주를 항종양 물질 탐색을 위한 대상균주로 실험에 사용하였다. 새로운 항종양 물질을 개발하는데 있어서 가장 중요한 것은 정상세포와 암세포를 구별해서 작용하는 물질을 효과적으로 감지해 나갈 탐색방법의 적용과 개발이라고 볼 수 있다. 지금까지 개발되어온 항암제 중에서 adriamycin을 비롯한 5FU, bleomycin, cyclophosphamide, daunomycin 등의 세포에 대한 저해작용은 주로 세포분열을 저해하는 것으로 세포분열이 왕성한 암세포에 강하게 작용하여 암세포에 대한 성장 저해작용을 보이는 것인데, 정상세포 중에서도 성장속도가 빠른 조혈기, 생식기, 모근 등의 세포에도 영향을 주어서 각종 부작용을 보이게 된다(정, 1982; 이, 1989). 따라서 암세포에 강한 세포독성을 보이면서 정상세포주에 대한 최대한 세포독성이 낮은 물질을 찾기 위한 방법을 선정하거나 새로운 방법을 개발하는 등의 탐색방법의 개발에 대한 연구도 항종양물질 개발에 중요한 연구 과제가 되고 있다. 먼저 항암 활성을 보이는 화합물의 분리를 위해 TLC와 silica gel column chromatography를 행하여 부분 정제물인 Part A와 Part B를 얻었다. 다시 Part A로부터 재차 chromatography를 실시하여 최종적으로 정제된 세 가지 화합물을 획득하여 각 화합물에 대한 세포 독성능을 MTT assay를 이용하여 측정하였다.

Compound 1은 대조 약물로 사용된 adriamycin과  $IC_{50}$  값을 비교해 볼때 P388D<sub>1</sub>에 대해 약 10배정도 세포 독성능이 높은 것으로 나타났으나, 정상 세포주인 Vero cell에 대한 독성이 매우 높아, 본 실험의 목적상 벗어나는 물질로 판단되었다.

Compound 2의 경우 P388D<sub>1</sub>과 L1210에 대해서 정상 세

포주인 Vero cell보다 약 3000배 이상의 상대적 독성능이 나타났고 대조약물과 비교시 암세포주(P388D<sub>1</sub>, L1210)에 대해서 약 10배정도 높은 세포 독성효과를 보였다. 또한 정상 세포주에 대한 세포 독성능은 adriamycin에 비해 더 낮은(약 1/4배)것으로 나타나 중앙에 선택적 세포독성 효과를 보였다.

Compound 3은 정상 세포주에 대한 IC<sub>50</sub> 값이 다른 화합물과 adriamycin에 비해 상당히 높게 나타나 비교적 안전한 화합물로 여겨졌으며, 암세포주에 대해서는 A549에 대한 결과를 제외하고 비교적 낮은 것으로 나타나 항종양능이 약한 물질로 사료되었다.

항종양능이 확인된 화합물들의 구조를 규명하기 위한 기기 분석 결과, compound 2는 indole alkaloid 계통의 물질로 추정하였으나 정확한 구조를 위하여서는 더욱 연구가 수행되어야 하며, Compound 3는 분자식이 C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub> (M.W. 624)로 확인되었으며 문헌조사 결과 a문헌조사 결과 actinomycetes 균주의 배양액에서 Dobasih 등(Dobasih *et al.*, 1988)이 분리보고한 octacosamicine A와 동일한 구조였으며 기기 분석 자료등이 일치하여 compound 3은 octacosamicine A로 동정되었다. 위 결과들로부터, compound 2가 인간 폐암세포주에 대한 세포독성능이 다른 화합물들과 대조약물에 비해 우수헌데 반해 Vero cell에 대한 IC<sub>50</sub>값이 높은 것으로 측정되어 신규 항암 물질로서의 기능성을 조심스럽게 타진해 볼 수 있을 것으로 생각된다. 최근 미국 NCI에서는 항암제를 검색 할 때 한가지 인간 암세포주만을 검색하지 않고 여러 가지 암세포주들(예를 들면, melanoma, colon, ovary, myeloma cancer cell 등)에 대해서도 검색하고 있으며, 검색결과 어떤 특정한 인간 암세포주에 대한 효과가 있으면 다제약제내성(multidrug resistance)을 나타내는 인간 암세포주에 대해서도 효과가 있는지 검색하고 있다. 따라서 본 연구에서 확인된 compound 2의 인간 폐암세포주에 대한 항암작용이 다른 암세포에도 효과를 나타내는지, 또한 다제약제내성을 나타내는 인간암세포주에 대한 세포독성을 나타내는지 앞으로 더욱 연구되어야 할 과제이다. 만약 다제약제내성을 억제하는 효과가 있으면, 급성 독성시험 및 물질의 부작용 등을 포함하는 상용 안전성 시험을 실시하여 생체 내에서의 생물학적 활성 및 효능을 확인하고 또한 기존 항암제와의 면밀한 비교 분석이 차후 시급한 과제라 하겠다.

생산균주의 동정은 수리동정(Numerical classification) 및 Chemosystematics를 이용하여 평가하였으며 그 결과 이미 알려진 *Streptomyces* sp. 중 *S. parvullus* ISP 5048과 유사도가 높은 것으로 나타났다. 그러나 이 결과만으로는 확실한 동정이 미흡하며 이를 위해 16S rRNA sequencing, DNA base composition, nucleic acid hybridization 및 nucleic acid

sequencing을 통한 분자수준에서의 동정(Molecular systematics)이 요구되며, 추후 현재까지 알려지지 않은 새로운 방선균주로 확인될 경우 대상물질의 생산과 그것과 관련된 조절 기전 연구를 통해 신규 항암제 개발 뿐만 아니라 대량 생산을 위한 방선균의 균주 개발에도 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- 염 곤, 1994. 한국산 생물자원을 이용한 항종양제 개발에 관한 연구. 신약 개발 연구보고서, pp. 1-178.
- 이계준, 1992. 산업에서 중요한 방선균의 분리, 미생물과 산업. 한국 미생물학회, 18(3), 41-49.
- 이정준, 1989. 항암, 항바이러스 물질의 탐색. Microorganism. Ferment., 13(1), 30-47.
- 정동효, 1982. 항생물질 개론. pp. 20-25, 112-139.
- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J. and Berdy, J. (1989). In bioactive metabolites from microorganisms. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F. and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, assesment of chemisensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942.
- Dobasih, K., Matsuda, N., Hamada, M., Naganawa, H., Takita, T. and Takeuchi, T. (1988). Novel antifungal antibiotics octacosamicins A and B. I. taxonomy, fermentation and isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. antibiotics* XLI(11), 1525-1532.
- Gehardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R. (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology. Amer. Soc. Microbiol., Washington, DC, U.S.A.
- Hiroshi, K. (1977). Tallysomylin, a new antitumor antibiotic complex related to bleomycin. *J. antibiotics* 30(10), 769-788.
- Khan, M. R. and Williams, S. T. (1975). Studies on the ecology of Actinomycetes in soil (Distribution and characteristics of acidophilic Actinomycetes). *Soil biology and Biochemistry* 8(7), 345-348.
- Maiese, W. M., Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. A. and Greenstein, M. (1989). Calicheamicins, a novel family of antitumor antibiotics. *J. antibiotics* 23(4), 558-563.
- Ryn, S. Y. and Choi, S. U. (1992). An antitumor activity of *Psoralea corylifolia*. *Arch. pharm. Res.* 15(4), 356-359.
- Sneath, P. A. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, Md, U.S.A.
- Umezawa, H., (1953). Sarkomycin, an antitumor factors produced by *Streptomyces*. *J. Antibiotics* A-6, 101-105.
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A. and Sackin, M. (1983). Numerical classification of streptomycetes and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1743-1813.