

Agelas속의 미동정 해면으로부터 항말라리아 활성을 갖는 Dibromosceptrin의 분리

임치원* · 박영범¹ · 이종수²

국립수산과학원 서해수산연구소, ¹강원도립대학 식품생명과학과, ²경상대학교 해양과학대학 해양산업연구소

Isolation of Dibromosceptrin with Antimalarial Activity from the Unidentified Sponge, Agelas sp.

Chi Won Lim*, Yeung Beom Park¹, and Jong Soo Lee²

West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Incheon 400-201, Korea

¹Department of Food and Life Science, Gangwon Provincial University, Kangnung 210-804, Korea

²Div. of Marine Bioscience, Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Kyeongnam 650-160, Korea

Abstract – In order to find some lead compounds for the treatment of opportunistic infections of malaria and pathogenic microbes, an undescribed Indonesian sponge *Agelas* sp. collected at Manado, Indonesian Waters, was suggested containing active compounds. Crude ethanolic extract of the sponge exhibited significant *in vitro* antimalarial and antimicrobial activity against *Plasmodium falciparum* (D6 colne) with IC₅₀ values of 8 µg/ml and against pathogenic microbes such as *Candida albicans* (150 µg/ml), *Cryptococcus neoformans* (<20 µg/ml), *Staphylococcus aureus* (25 µg/ml), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (<20 µg/ml), and *Pseudomonas aeruginosa* (<20 µg/ml). Active compound (5.0 mg) was isolated from the ethanolic extracts of the sponge and purified by using silica gel and ODS column, successively. Active compound was elucidated as dibromosceptrin ($C_{22}H_{24}Br_2N_{10}O_2$) by detailed analysis of FTESI-MS and comparison of ¹H, ¹³C, DEPT and HMQC NMR spectral data with those reported.

Key words – Antimalaria, Antimicrobes, *Agelas* sp., Dibromosceptrin

해면은 후생동물 중에서 가장 하등한 다세포성 생물로서 얼음에 둘러싸인 극해에서부터 열대 산호초의 바다에 이르기까지, 또한 조간대에서부터 수심 9,000 m의 심해에 이르기까지 폭넓게 분포하며, 바위, 페각, 해조 또는 다른 동물에 고착하거나 모래, 진흙 속에 기부를 고착하여 군체를 이루며 서식한다. 현존하는 종만 하더라도 우리나라에서 200 종 이상이 알려져 있으며, 세계적으로는 1만 종 이상이 알려져 있어 종의 다양성이나 생물자원으로서도 막대한 양에 이른다.¹⁾ 이들 중 조간대에서도 손쉽게 발견되는 종들 중에서도 항균성, 세포 독성 등 여러 가지 활성을 나타내는 종류가 많아 의약품 소재 탐색 재료로서 오래 전부터 활용되어 왔으며, 수많은 활성 물질들이 발견되었다.²⁻⁵⁾ 그 중에는 활성이 강하면서도 구조적으로도 특이한 물질들이 적지 않아 관심이 집중되고 있으며, 최근에는 잠수 기술의 발달로

십해성 희귀종들에 대하여도 연구가 이루어지고 있다.

말라리아는 열대지방의 *Plasmodium*속에 속하는 모기원충이 적혈구와 간세포 내에 존재함으로써 발열, 빈혈, 비대증 등을 일으키는 질병으로 세계보건기구(WHO)의 추정에 따르면 전 세계적으로 매년 3억~5억건의 말라리아 환자가 발생하며 백만명 정도가 이 질병으로 사망하는 것으로 추정하고 있다. 또한, 이러한 질병 발생지역은 아프리카, 인도, 중남미 등과 같은 열대 또는 아열대역이거나 저개발국이 대부분이다.⁶⁾ 우리나라에서는 중국 열류 날개 모기(*Anopheles sinensis*)의 흡혈에 의하여 전파되는 것으로 알려져 있으며, 1933년 처음 환자가 발생한 이래 지속적인 구제활동과 환경위생의 발달로 인하여 현격하게 감소하였고, 1984년 이후에는 완전히 소멸된 것으로 여겨져 왔으나, 1993년 파주군에서 근무하던 군인에게서 처음으로 발병사례가 다시 보고된 이래 경기도 서북부 및 강원도 철원군 일대의 휴전선 지역에서 근무하는 군인들을 중

*교신저자(E-mail) : cwlim@nfrda.re.kr
(FAX) : 032-745-0558

심으로 매년 증가 추세에 있으며, 최근에는 민간인에게까지 발생하고 있어 다시 토착화될 가능성이 매우 높으며, 우리나라로 결코 안전하다고 할 수 없다.⁷⁻⁹⁾ 최근에 발생하는 말라리아는 약제내성이 있어 기존의 치료제로서는 완치하기가 점차 어려운 실정이며, 또한 국내에서는 말라리아 치료제를 찾고자 하는 노력이나 연구가 전무한 실정이다.

본 연구에서는 해면으로부터 항균물질을 검색하는 과정에서 외국산 *Agelas*속의 미동정 해면으로부터, 특히 말라리아균에 강한 항균 활성을 갖는 물질을 처음으로 분리, 동정 하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료 – 실험에 사용된 해면은 *Agelas*(Order Agelasida, Family Agelasidae)종으로, 2001년 3월 인도네시아 Manado 근처 수심 20 m의 해저에서 2.1 kg을 채취하여 -20°C로 냉동하여 두었다가 실험에 사용하였다. *Agelas*속의 *A. ceylonica*(적색 및 흑색 분지형) 및 *A. mauritiana*(오렌지색의 코끼리 귀형)종은 태평양에 소수 서식하는 것으로 알려져 있지만 본 시료는 이 종과는 형태가 다르다. 이 종은 움푹 파진 항아리 모양으로 거대하게 휘어져 있으면서 솟아 올라있는 넓은 관모양으로 이루어져 있고, 특히, 옆면은 수직으로 완만하며 위로 솟은 표면에 다공질과 미세 원뿔모양으로 되어있으며, 조직은 단단하면서도 가죽과 같이 유연하고 살아 있을 때는 약간 검은색을 띠고 있다. 표본 시료는 영국 런던 역사박물관에 보관중에 있으며(BMNH 2001. 7.20.8), Kelly M. 박사(National Institute of Water and Atmospheric Research Ltd., Auckland, New Zealand)에 의하여 확인 결과 아직 미분류된 종으로 확인되었다.

측정기기 – IR과 UV 스펙트럼은 AATI Mattson Geneses Series FTIR과 Hewlett-Packard 845A Diode Array Spectrometer을 사용하였으며, 각종 NMR 스펙트럼은 중 CD_3OD 를 용매로 하여 Bruker Advance DRX-400 spectrometer(Bruker, Germany)에서 용매 peak를 기준으로 측정하였으며, 질량분석은 FTESI-MS를 Bruker-Magnex BioAPEX 30es ion cyclotron HR-HPLC-FT spectrometer을 사용하여 electrospray 표면에 직접 주사하여 측정하였다.

항말라리아성 및 항균성물질의 분리 및 정제 – 해면(2.1 kg)에 3배량(v/w)의 EtOH를 가하여 마쇄 추출한 후 여과하였다. 여과 후 잔사는 3배량의 EtOH를 가하여 다시 동일한 방법으로 2회 반복 추출, 여과하였다. 여과하여 얻은 여액을 합쳐 40°C에서 김압 농축하여 암갈색의 EtOH 추출물(145.7 g)을 얻었다. 이 EtOH 추출물을 시료 5배량(w/w)의 silica gel (Kieselgel 60, 230~400 mesh, Merck) 칼럼에 충

Table I. Solvent compositions for extraction from the sponge (%)

Solvent	Fraction									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hexane	100	75	50	25	0					
EtOAc		25	50	75	100	90	75	50	25	0
MeOH						10	25	50	75	100

진한 다음 Hexane-EtOAc-MeOH 혼합용매를 조성비(Table I)를 변화시켜 각각 4 L씩 용매를 흘려 10개의 분획으로 분리하였다. 이중 비교적 활성이 강한 분획 7~10을 모아 농축한 다음 MeOH-CHCl₃만을 사용하여 극성도를 높여 silica gel 칼럼에서 다시 분리하였다. Silica column에서 얻어진 24개의 획분 중 활성을 나타낸 8~13분획(0.83 g)을 20% MeCN을 용매로 한 ODS 칼럼(Phenomenex Ultracarb 5 μm, ODS-30, 250×21.5 mm)에서 UV 254 nm 파장으로 monitoring하면서 분리, 정제하여 최종적으로 활성 성분 (1) 5.0 mg을 정제하였다. 한편, 분획 16~24는 gel filtration (Sephadex LH20, mobile phase : MeOH)을 반복하며 분리 정제하였고, 최종적으로 C-8 칼럼 (Phenomenex Ultracarb Luna C8, 5 μm, 250×21.5 mm)에서 물과 MeCN 혼합 용매로 gradient (Detection : UV 280 nm)하여 별도의 활성 성분 (2) 20.1 mg을 순수 분리하였다(미수록).

활성성분 1 – Dark yellow powder, UV λ_{\max} : 271 nm (in MeOH), IR (in MeOH) : 3275, 3126, 2802, 1511 cm⁻¹, MS [M+H]⁺ positive FTESI-MS, *m/z* 619.3, 621.3, 623.3, HRFABMS C₂₂H₂₄⁷⁹Br₂N₁₀O₂ obsd. *m/z* 618.0451, calcd. 618.0021, ¹H NMR (400 MHz in CD₃OD) δ : 6.97 (2H, s, H-2,2'), 6.96 (2H, s, H-4,4'), 3.38 (4H, dd 6.2, 4.0, 2H-8,8'), 2.25 (2H, m, H-9,9'), 3.06 (2H, d 5.8, H-10,10'), 6.63 (2H, s, H-15,15'), ¹³C-NMR (100 MHz in CD₃OD) : See Table II.

결과 및 고찰

활성성분의 구조 – 분리 정제된 물질은 진한 황색을 띠었으며, dragendorff 시약에서 양성을 나타내어 3급 또는 4급 질소를 함유한 alkaloid 계통의 물질로 추정되었다. 한편, FTESI-MS spectrum 상에서는 *m/z* 619.3, 621.3, 623.3에 [M+H]⁺ 동위체 이온들의 peak들이 관찰되어 전형적인 brom화합물의 형태를 나타내었으며 fragment 이온들은 거의 관측되지 않았다(Fig. 1). Spectrum 상에서 2 mass unit씩 차이가 나는 것과 peak의 강도가 1:2:1인 것으로부터 분자내에는 2개의 brom이 존재하는 것으로 판단되어 분자식은

Table II. Comparison of ^{13}C NMR spectral data between compound **1** and debromosceptrin (100 MHz, CD_3OD)

Position	Compound 1	Debromosceptrin ¹⁰⁾
N-1,1'		
2,2'	122.1(d)	122.9(d)
3,3'	95.9(s)	97.5(s)
4,4'	112.9(d)	113.5(d)
5,5'	127.6(s)	127.4(s)
6,6'	160.9(s)	163.0(s)
N-7,7'		
8,8'	41.5(t)	42.4(t)
9,9'	37.5(d)	39.4(d)
10,10'	43.3(d)	44.3(d)
11,11'	128.0(s)	129.4(s)
N-12,12'		
13,13'	147.7(s)	149.4(s)
15,15'	110.5(d)	110.1(d)
N-16,16'		

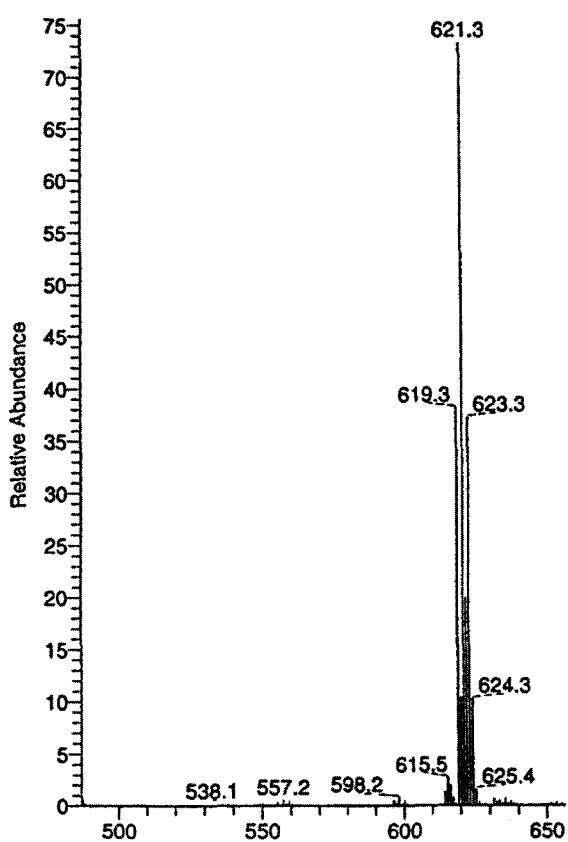


Fig. 1. FTESI-MS spectrum of compound **1**.

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{Br}_2\text{N}_{10}\text{O}_2$ (m/z 618.0451, calcd. 618.0021)로 추정되었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 질소에 결합된 활성 proton^o 용

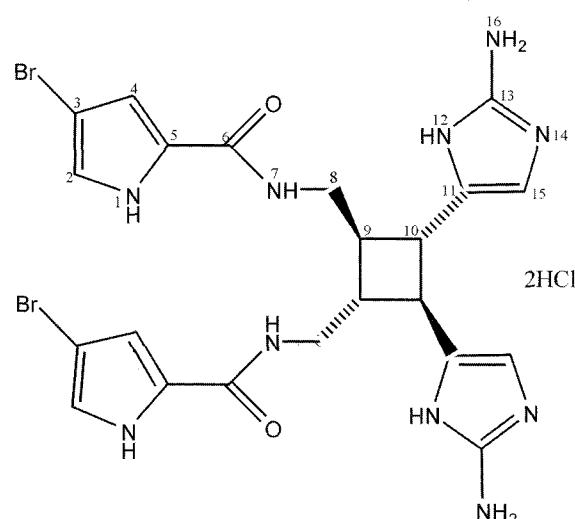


Fig. 2. Structure of compound **1**.

매의 영향으로 나타나지 않았으며, 6개의 signal만 관측되었다. ^{13}C NMR 및 DEPT (90° and 135°) spectrum을 조사해 본 결과(Table II) 10개의 methine, 2개의 methylene 및 10개의 quaternary carbon이 존재하며, methyl기는 존재하지 않는 것으로 확인되었으며, MS로서 추정된 분자식과도 잘 일치하였다. Debromosceptrin의 NMR spectrum¹⁰⁾과 비교해 본 결과 109.6 ppm(d)에서의 공명 대신에 95.9 ppm(s)에서의 공명이 debromosceptrin의 pyrrole ring 탄소가 C-3와 C-3'에 결합되었다는 것을 제외하고는 거의 일치하였으며, 또한 이 화합물의 HMQC와 HMBC spectrum에서도 H-2, H-2'가 C-3 (95.9 ppm), C-3' (97.5 ppm), C-4, C-4', C-2, C-2' 및 quaternary carbon인 C-5, C-5'와 각각 결합하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 MS 및 NMR spectrum을 dibromosceptrin의 spectrum과 완전히 일치하여(Table I) 활성 물질 **1**을 3,3'-dibromosceptrin으로 동정하였으며(Fig. 2), 활성 물질 **2**는 MS 및 NMR spectrum으로부터 이미 알려진 물질인 3,7-dimethylisoguanine($\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_3$)으로 동정되었다.

각 분획의 항균 활성 – EtOH 추출물을 말라리아 및 각종 병원성 세균에 대한 항균 활성을 검색한 결과를 Table III에 나타내었다. 말라리아 원인균인 *Plasmodium falciparum* (D6 clone, control (IC_{50}) : chloroquine (16 ng/ml), artemisinine (8 ng/ml)에는 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도의 IC_{50} 을 나타내어 가장 활성이 강하였으나, 말라리아의 약제로 쓰이는 chloroquine에 대해서 저항성을 나타내는 동일한 *P. falciparum*(W2 Colne, control (IC_{50}) : chloroquine (110 ng/ml), artemisinine (1.8 ng/ml)에 대해서는 억제능이 없었으며, Vero cell에 대한 세포독성도 나타나지 않았다. *Candida*증을 유발하는 효모인 *C. albicans*에 대한 IC_{50} 이 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며, *Aspergillus* 곰팡이에

Table III. Antimicrobial activity of the ethanol extract from unidentified *Agelas* sp. to malaria and other microbes

Strain	Malaria		Microbes						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IC ₅₀ * (μg/ml)	8	NT**	150	<20	25	<20	<20	>500	500

1 : *plasmodium falciparum* (D6 clone), 2 : *plasmodium falciparum* (chloroquin-resistant W2 clone), 3 : *Candida albicans*, 4 : *Cryptococcus neoformans*, 5 : *Staphylococcus aureus*, 6 : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 7 : *Pseudomonas aeruginosa*, 8 : *Aspergillus fumigatis*, 9 : *Mycobacterium intracellulare*

* : control as Amphotericin B (0.10 ~ 0.40), Ciprofloxacin (0.07 ~ 0.15)

** : no activity(over 1 mg/ml)

Table IV. Antimicrobial activity of each fractions from Silicic acid column

Fractions	Activity (IC ₅₀ , μg/ml)						
	3*	4	5	6	7	8	9
2	-	-	-	-	-	NT	-
3	-	-	-	-	-	NT	-
4	-	300	250	200	-	NT	-
5	-	-	100	200	-	NT	500
6	100	<20	35	25	40	NT	>20
7	200	45	30	40	40	NT	100
8	100	<20	<20	<20	<20	NT	100
9	250	<20	40	40	40	NT	500
10	400	40	45	55	45	NT	500

*Abbreviations of microbes refer to Table III.

대하여는 500 μg/ml 이상으로 저해활성이 매우 약하였다. 일반적인 병원성 세균에 대하여는 20~25 μg/ml로 강한 항균활성을 나타내었다.

한편, silica 칼럼에서 분리된 각 분획에서의 항균성 분포를 조사한 결과는 Table IV와 같다. 항균성 물질은 칼럼에 다소 강하게 흡착되어 후반부에 용출되었으며, 활성은 EtOH 추출물과 유사하여 곰팡이(*A. fumigatis*)에 대하여는 항균 활성이 없었고, 일반 세균에 대하여는 모두 항균성을 나타내었다. 특히 8번 분획에서 가장 항균성이 강하여 methicillin에 대한 내성을 가진 황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)이나 내성이 없는 균주 모두에서 C₅₀이 20 μg/ml 이하를 나타내었으며, 연쇄상 구균의 *Cryptococcus neoformans* 등에 대하여도 항균활성이 강하였다.

*Agelas*속의 해면으로부터는 브롬의 수와 결합 위치, pyrrole 환의 결합 상태에 따라 다양한 종류의 알칼로이드 화합물들이 발견되었다.¹¹⁻¹²⁾ 특히, bromopyrrole 유도체인 dibromosceptrin은 *A. oroides*로부터 분리된 oroidin¹³⁾의 이랑체에서 브롬이 2개 분리된 구조이다. 이러한 oroidin group에 속하는 화합물들은 서식 장소에 따라 약간씩 구조에 차이는 있으나, *Agelas*속 해면류에 공통적으로 함유된 물질로 추정되며, 이런 종류의 화합물들은 말라리아 병원균에 항균제로서

의 이용이 기대된다.

결 론

해면에서 열대성 질병인 말라리아 및 병원성 세균에 대한 치료제를 개발할 목적의 일환으로 해면을 검색한 결과, 미동정 인도네시아산 해면, *Agelas* sp.에서 항말라리아 및 항균활성을 나타내는 물질인 dibromosceptrin을 처음으로 분리 정제하였다. 해면(2.1 kg, 습중량)을 EtOH 추출하여 용매분획 및 silica 칼럼, ODS 칼럼(UV : 254 nm)로 순차 정제하여 각종 병원성 세균에 대하여 항균성을 나타내는 dibromosceptrin 5.0 mg을 얻었으며, 특히 말라리아 병원균에 대하여 활성이 강하였다. 또한 다른 분획에서는 3,7-dimethylisoguanine 20.1 mg을 순수 분리하였다. 이러한 물질을 이용하거나 수식함으로서 보다 더 우수한 치료제의 개발에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

- Fusetani, N. (1992) Sponges as the treasure from the sea, In Yasumoto T.(ed.), Mystery of marine organisms approach by chemical methods, 157-164. Kagaku Dojin. Tokyo, Japan.
- Kobayashi, M. (2000) Search for biologically active substances from marine sponge, In Fusetani N.(ed.), Drugs from the sea. 46-58. Karger, Basel, Switzerland.
- D'Auria, M. V., Gomez, P. L., Minale, L., Zampella A., and Debitus, C. (1994) A novel cytotoxic macrolide, superstolide B, related superstolide A, from the New Caledonian sponge *Neosiphonia supestes*. *J. Nat. Prod.*, **57**: 1595-1902.
- Faulkner, D. J. (2002) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **19**: 1-48.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H., Northcote, P. T., and Princep, M. R. (2003) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **20**: 1-48.
- Sianne, S. and van Heeden, F.R. (2002) Antimalarial activity of plant metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, **19**: 672-692.
- Shim, J. C., Shin, E. H., Yang, D. S. and Lee, W. K. (1997) Seasonal prevalence and feeding time of mosquitoes(Diptera:

- Culicidae*) at outbreak regions of domestic malaria(*P. vivax*) in Korea. *Kor. J. Ent.*, **27**: 265-277.
8. Lee, J. S., Lee, W. G., Lee, H. W., Min. S. and Lee, W. J. (1988) Current status of vivax malaria among citizens in Korea. *Kor. J. parasit.*, **36**: 241-248.
9. Lee, T. S., Huh, B. N., Suk, W. S., Lee, T. W., Kim, Y. S., Lim, E. J., Lee, S. W. and Kim, B. S. (1997) Studies on mosquito population dynamics in hunchoen city area Kangwon province(1992-1996) -Seasonal and annual fluctuations in population size-. *Bull. of Health and Environment Research*, **8**: 5-17.
10. Shen, X., Perry, T. L., Dunbar, C. D., Kelly-Borges, M., and Hamann M. T. (1998) Debromosceptrin, an Alkaloid from the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *J. Nat. Prod.*, **61**: 1302-1303.
11. Walker, R. Faulkner, D., Van Engen, and Clardy D. J. (1981) Sceptrin, and antimicrobial agent from the sponge *Agelas sceptrum*. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**: 6775-6773.
12. Albizati, K. F., and Faulkner, D. J. (1985) Stevensine, a Novel Alkaloid of an Unidentified Marine Sponge, *J. Org. Chem.*, **50**: 4163-4164.
13. Keifer, P., Schwarts, R., Koker, M., Hughes, R., Jr., Rittschof, D., and Rinehart K. L. (1991) Bioactive bromopyrrole metabolites from the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *J. Org. Chem.*, **56**: 2965-2975.

(2004년 5월 14일 접수)