

점액세균 *Sorangium cellulosum*이 생산하는 약제내성 암세포의 증식억제물질

안종웅* · 이정옥¹

한국해양대학교 해양과학부, ¹한국화학연구원 생명의약부

Isolation of Antibiotics Effective to Multidrug-Resistant Cancer Cells from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Ahn, Jong-Woong* and Chong-Ock Lee¹. Division of Ocean Science, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea, ¹Medicinal Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea - Drug resistance is one of the most significant impediments to successful chemotherapy of cancer. Multidrug-resistance is characterized by decreased cellular sensitivity to anticancer agents due to the overexpression of P-glycoprotein. By using adriamycin-resistance CL02 cancer cells, we undertook the screening for agents which were effective to multidrug-resistant cancer cells from strains of the species *Sorangium cellulosum* isolated in our laboratory. *Sorangium cellulosum*, cellulose-degrading myxobacteria have recently proved to be a rich source of novel anticancer agents. One of the significant examples is the promising anticancer agent epothilone. JW1006 is the first strain of *Sorangium cellulosum* which was selected by us for the isolation of a metabolite by a biological screening because of a high cytotoxic activity against the CL02 cancer cells. Cytotoxicity-guided chromatographic fractionation of the culture broth led to the isolation of two active principles, disorazole A₁ and A₂. They showed potent cytotoxicity against CL02 cancer cells with IC₅₀ values in the picomolar range, and were as active against drug-resistant cancer cells CL02 and CP70 as against the corresponding sensitive cells.

Key words: *Sorangium cellulosum*, disorazoles, *mdr*-cancer cell, cytotoxicity

현재 암환자의 화학요법에 있어서 약물에 대한 암세포의 내성발현이 항암치료의 주요 장애요인이 되고 있으며, 특히 암세포가 특정 항암제에 의해 내성을 획득하면 구조가 상이한 타 항암제에도 교차내성을 나타내는 이른바 암세포의 다약제 내성(multidrug resistance, MDR)이 암 화학요법에 있어서 가장 심각한 문제가 되고 있다. 다약제 내성의 기전에 대해서는 다양한 형태가 보고되어 있는데 그 중에서도 P-glycoprotein(Pgp)에 의한 다약제 내성이 가장 많이 알려져 있다[1, 9, 10]. Pgp는 분자량이 170 KDa 정도이며 transmembrane glycoprotein으로서, vinca alkaloids, anthracyclines, *epi*-podophyllotoxin 등과 같은 다양한 종류의 약물들을 세포 밖으로 배출시킴으로써 약물의 세포독성을 나타내지 못하게 한다[6, 14]. 이러한 다약제 내성으로 인해 지금까지 개발된 많은 항암제가 사용해보기도 전에 무력화될 뿐만 아니라 최근 항암제개발 연구에서 가장 성공적인 성과로 인정 받고있는 taxol의 경우도 이를 이용한 치료과정에서 내성 암세포의 출현이 보고되고 있어서 그 심각성을 더해주고 있다. 이러한 관점에서 미국 국립 암연구소를 비롯해 Sandoz, Pfizer, Vertex, Xenova 등과 같은 선진 제약기

업들은 새로운 기전의 신규물질에 근거한 항암제 개발연구와 함께 다약제 내성을 극복하는 방법의 하나로써 Pgp에 영향을 받지 않는 새로운 항암제의 개발연구에 역점을 두고 있다.

본 연구에서는 최근 Epothilone[3]의 생산균으로 알려지면서 생리활성물질의 새로운 source로 유명해진 cellulose 용해성 점액세균 *Sorangium cellulosum*의 균주를 대상으로 그들의 대사산물에서 다약제 내성 암세포에 대한 증식억제물질을 탐색하기 위해 Choi 등[2]이 확립한 다약제 내성 암세포주인 CL02 세포와 CP70 세포를 이용하여 스크리닝 한 결과, *S. cellulosum* JW1006의 배양물에서 강한 억제활성이 확인되어 그 활성물질의 분리 및 구조결정과 생물활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

충남 논산시 소재의 야산, 과수원, 밭 등지에서 채취한 토양을 시료로 하여 상법[12]에 따라 cellulose 용해성 점액세균인 *Sorangium cellulosum* 균주를 분리하였다. 즉 WCX agar 배지를 담은 petri dish(φ9 cm)에 미리 멸균한 filter paper(φ5 cm, Whatman No.2)를 깔고 그 위에 토양시료를 처리한 다음, 30°C에 2~3주일 배양했을 때 용해된 filter paper의 주변에 나타나는 orange색의 fruiting body를 KAN-

*Corresponding author

Tel: 82-51-410-4754, Fax: 82-51-404-3988

E-mail: jwahn@hhu.ac.kr

4 agar에 3~5회 옮겨 순화하였으며 계대는 VY/2 agar 배지를 이용하였다. 순화된 균주들의 균체증식을 위한 전배양과 물질생산을 위한 본배양에는 모두 동일한 조성의 액체배지 (0.8% potato starch, 0.2% glucose, 0.2% soybean meal, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.0008% EDTA Fe(III)- Na^+ salt, pH 7.2)를 사용하였는데, 다만 본배양의 경우 자가독성을 방지하고 물질생산량을 높이기 위해 2-l 용량의 배양 플라스크에 흡착수지인 XAD-16을 2%(w/v) 첨가하여 400 ml의 액체배지와 함께 넣은 후 멸균한 다음 전배양한 균액을 5%(v/v) 접종하여 30°C, 15일간 진탕배양(160 rpm)하였다.

균주의 동정

분리된 균주들의 분류학적 고찰은 Bergey's Manual[4] 및 문헌[11, 12, 15]의 분류·동정에 관한 기준에 따라 cellulose 용해성의 여부를 비롯해 자실체 및 Swarm의 형태적 특성을 동정의 중요한 지표로 하였다. Cellulose 용해성은 WCX agar 배지 위에 깔아놓은 filter paper(Whatman No.2)의 용해여부로 확인하였으며, Swarm과 자실체의 형태는 VY/2 agar 배지 및 KAN-4 agar 배지에서 30°C, 2주간 배양한 것을 해부현미경(OLYMPUS SZ-11, OLYMPUS)과 광학현미경(ECLIPS E600, NIKON)으로 관찰하였다. 또한 Congo red 염색액은 0.01% 수용액을 사용하였다.

추출 및 분리

배양액을 원심분리하여 균체와 흡착수지를 모은 다음, acetone으로 추출하여 감압 농축하였다. 이 농축물을 silica gel에 흡착시켜 CH_2Cl_2 -MeOH를 용매계로하여 단계적으로 극성용매의 비율을 높이면서(100:0 → 90:10) column chromatography($\phi 3 \times 30$ cm)를 행하여 활성 분획물을 얻은 다음 이것을 다시 methanol을 이용한 Sephadex LH-20 column chromatography($\phi 2.5 \times 80$ cm)를 통해 정제하였다. 최종적으로 85% aq. methanol을 용매계로 reversed phase의 RP-18 column($\phi 2 \times 20$ cm, JAI)을 장착한 Recycling prep. HPLC(LC-908, Japan Analytical Industry Co., Ltd.)를 행하여 활성분체로서 2개의 화합물을 순수하게 정제하고 각각 KM10061, KR10062로 명명하였다.

기기분석

정제한 화합물들의 UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 UV265 분광광도계(Shimadzu, Japan)로 측정하였고 IR spectrum의 측정은 FTIR spectrometer(Mattson, USA)로 하였다. 선광도는 automatic polarimeter(Rudolph Research, USA)로 측정하였으며, mass의 측정은 OPUS data system이 장착된 질량분석기(Micromass, England)로 하였다. COSY, ROESY, DEPT, HMBC 및 HSQC를 포함한 각종 NMR spectrum은 UNITY500 NMR spectrometer(Varian, USA)

를 사용하였으며 내부 표준물질로는 tetramethyl silane (TMS)을, 측정용매로는 CD_3OD 를 사용하였다.

KM10061: colorless oil; $[\alpha]_D -72^\circ$ (c 0.7, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} : 250, 265, 272, 299, 306, 323 nm; IR(film) ν_{max} : 3435, 1725, 1351, 1151, 1109 cm^{-1} ; HRFABMS m/z 781.8933(calcd for $[C_{43}H_{54}N_2O_{10}+Na]$, 781.8967); FABMS m/z 781[M+Na] $^+$, 759[M+H], 741; ^{13}C -NMR (125 MHz): 163.9(s), 162.9(s), 161.9(s), 161.7(s), 146.0(2C, d), 137.0(d), 136.7(d), 135.1(d), 134.7(d), 134.3(s), 133.7(s), 133.4(d), 131.7(2C, d), 131.0(d), 129.7(d), 129.5(2C, d), 129.3(d), 128.3(d), 128.0(d), 126.9(d), 113.8(d), 79.9(d), 78.2(d), 77.8(2C, d), 77.6(d), 59.7(d), 56.6(q), 56.0(d), 42.6(2C, s), 36.1(t), 29.5(t), 29.2(t), 19.4(4C, q), 18.0(2C, q).

KM10062: colorless oil; $[\alpha]_D -30.2^\circ$ (c 0.5, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} : 252, 264, 274, 298, 303, 320 nm; IR(film) ν_{max} : 3450, 1728, 1350, 1155, 1102 cm^{-1} ; FABMS m/z 743 $[C_{42}H_{52}N_2O_{10}-H]^+$; ^{13}C -NMR(125 MHz): 164.1(s), 163.0(s), 162.1(s), 161.7(s), 146.3(2C, d), 137.2(d), 137.0(d), 136.6(d), 135.4(d), 134.7(s), 133.9(s), 133.6(d), 132.1(2C, d), 131.4(d), 129.9(d), 129.5(2C, d), 128.7(d), 128.3(d), 127.0(d), 126.8(d), 113.5(d), 78.5(d), 78.1(2C, d), 77.6(d), 70.8(d), 60.0(d), 56.4(d), 42.8(2C, s), 38.5(t), 29.7(t), 29.2(t), 19.7(4C, q), 18.6(2C, q).

암세포 배양

실험에 사용된 암세포주는 모두 인체기원의 암세포주들로서, 폐암세포주인 A549, 자궁암세포주인 A2780, 피부암세포주인 SK-MEL-2, 중추신경계암세포주인 XF498, 대장암세포주인 HCT15 및 HCT15 세포로부터 adriamycin을 처리하여 다약제내성 세포주로 확립한 CL02 세포와 자궁암세포주인 A2780 세포에 cisplatin을 처리하여 내성 세포주로 확립한 CP70 세포를 이용하였다. 감수성 세포주는 모두 미국의 국립 암 연구소로부터 분양 받았으며, cisplatin내성 세포주인 CP70은 미국의 FOX CHASE Cancer Center에서 분양 받아 사용하였다. 배양액으로는 glutamine, $NaHCO_3$, gentamycin 및 amphotericin을 첨가하여 5% FBS로 보강한 RPMI1640 용액을 사용하였으며, 37°C, 5% CO_2 및 100% 습도의 조건에서 배양하고 3~4일에 한번씩 계대 유지하였다.

세포독성

세포들을 각각 96-well flat bottom microplate에 분주하여 바닥 면에 세포가 부착하도록 24시간 배양하고 세포가 바닥 면에 부착된 후에 배양액을 제거한 다음 시료약물을 well당 100 μl 넣어 배양기에서 72시간 배양하였다. 약물을 첨가하여 배양한 후 세포독성의 측정은 세포표면 단백질 염색 시약인 SRB를 이용하여 측정하였다[13]. 즉 약물을 첨가하여 배양한 후, 배양액을 제거한 다음 각 well에 10% TCA 용

액을 처리하고 4°C에서 1시간동안 방치하여 세포들을 고정시켰다. 그 후 TCA를 제거하고 실온에서 건조시킨 후 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 실온에서 30분 동안 방치하여 세포를 염색하였다. 세포와 결합하지 않은 여분의 SRB를 1% acetic acid 용액으로 세척하여 제거하고, pH 10.3~10.5의 10 mM Tris base (unbuffered) 용액을 염색된 세포들에 가하여 SRB를 용출시켰다. 각 well의 흡광도는 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 520 nm에서 측정하였으며, 약물을 가하지 않은 well(C)과 약물을 가한 각 well(T) 및 약물을 가할 때의 well(Tz)을 비교하여, $Tz \leq T$ 인 경우에는 $[(T - Tz)/(C - Tz)] \times 100$ 의 수식으로, $Tz > T$ 인 경우에는 $[(T - Tz)/Tz] \times 100$ 의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다.

결과 및 고찰

생산균의 동정

점액세균은 타 세균과는 달리 계통발생학적 연관관계에 근거하여 분류하기 보다는 아직까지 fruiting body와 swarm의 형태적 특징에 의한 표현적 특성을 기준으로 하여 분류하고 있다[4, 11, 12]. 그러나, cellulose를 용해하는 점액세균은 예외적으로 모두 *Sorangium* 속(Sorangineae)에 속하며, 오래된 분류에 의하면 3종 이상이 있다고 하나[11], 최근의 분류체계에는 1종으로 줄어들어 *Sorangium cellulosum*만 인정되고 있다[4]. JW1006을 포함한 60종의 분리된 균주들은 모두 cellulose를 용해하는 점액세균인 *S. cellulosum*으로서 WCX agar 배지 상의 filter paper에 접종하였을 때, 10~14일이 경과한 후 여과지가 용해되기 시작하였고(Fig. 1), 여과지 이면에 yellow-orange 또는 red-orange 색의 자실체가 관찰되었다. 이들의 영양세포는 광학현미경($\times 1500$)으로 형태를 관찰한 결과 끝이 무딘 짧은 간상으로 나타났으며, Gram 음성으로 판별되었고 congo red로 처리하였을 때 음성이었다. 또한 KAN-4 agar 배지에서 30°C, 14~20일간 배양했을 때 특유한 형태의 자실체와 swarm(Fig. 2)이 관찰되었고, 액체배양에서 균체는 형태와 크기가 다양한 덩어리(lump)를 이루며 성장하여 *S. cellulosum*의 배양상 특성을 잘

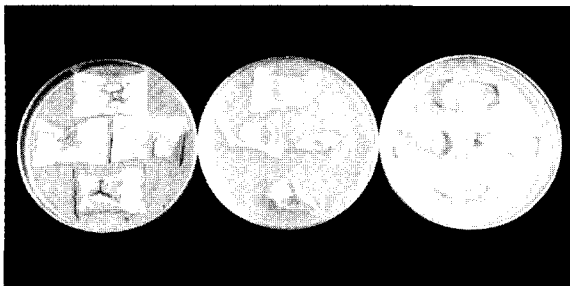


Fig. 1. Photographs of the isolated strain, JW1006 degrading cellulose (filter paper).

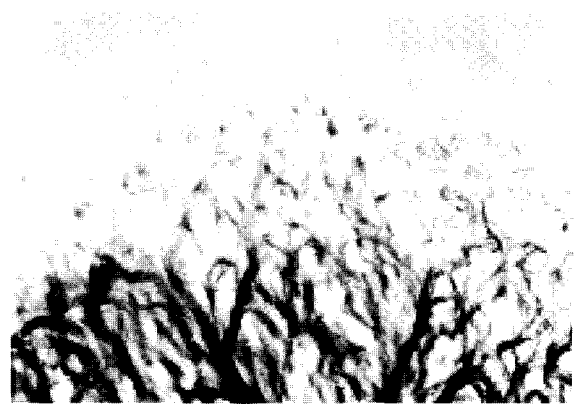


Fig. 2. Swarm colony of the isolated strain JW1006 on KAN-4 agar.

나타내었다.

활성물질의 정제 및 구조결정

S. cellulosum JW1006의 배양액(10 l)을 원심분리하여 균체와 흡착수지를 모은 다음 acetone으로 3일간 실온에서 추출한 후 농축하였다. 강한 활성을 보인 농축물(728 mg)을 silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 거쳐 최종적으로 recycling prep. HPLC로 정제한 결과 활성 본체로서 KM10061(13.8 mg)과 KR10062(7.0 mg)를 순수한 액상으로 얻었다. 이들의 화학구조를 결정하기 위해 2D-NMR을 비롯해 다양한 분광학적 방법을 이용하였는데, 이 과정에서 이들은 NMR, UV, IR의 spectral pattern이 아주 비슷하며 HRFABMS와 ¹³C-NMR의 data로부터 확인된 이들의 분자식으로부터 불포화도(=18)가 동일함을 알 수 있었고, 특히 ¹H-¹H COSY 실험 결과 동일한 부분구조(Fig. 3)

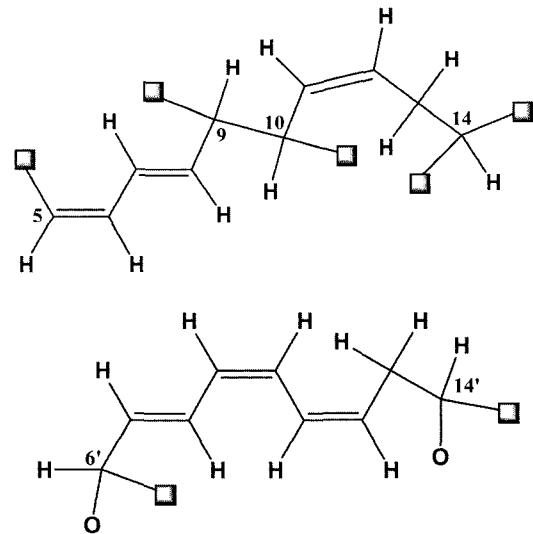


Fig. 3. Two common structural elements of the compounds 1 and 2 derived from ¹H-¹H COSY NMR Spectroscopy.

와 2개의 oxazole ring의 존재가 공통적으로 확인되어 KM10061과 KR10062는 동일한 chromophore를 지닌 구조 이성체임이 강하게 시사되었다.

이러한 사실에 근거하여 우선 지금까지 밝혀진 점액세균의 대사산물에 관해 문헌을 조사한 결과, KM10061과 KM10062는 각각 H. Reichenbach group(GBF)에 의해 동종의 점액세균에서 분리된 Disorazoles A₁ 및 A₂(Fig. 4)의 물리화학적 성상과 spectral data[7]가 일치하였다.

세포독성

분리된 활성물질의 인간 암세포에 대한 독성을 Table 1에 나타내었다. Disorazoles A₁과 A₂는 공시된 모든 암세포주에 대해 강한 증식억제 활성을 나타내었으며, IC₅₀은 0.04 ng/ml 이하로 나타났다. 한편 adriamycin의 세포독성은 감수성 세포주(HCT15)의 IC₅₀이 0.12 µg/ml인데 비해 내성세포주(CL02)에서는 3.27 µg/ml로서 약 27배정도 차이를 보였다. Cisplatin의 내성세포주에 대한 세포독성 실험에서는 cisplatin에 대해 내성세포주(CP70)가 감수성 세포주(A2780)에 비해 약 4배정도 내성이 유도된 것과는 대조적으로 Disorazoles A₁과 A₂는 감수성 세포주와 약제내성 세포주에 대하여 거의 동일한 활성을 보여 다약제 내성을 극복함을 나타내고 있다. 이러한 활성은 최근 용균성 점액세균의 일종인 *Myxococcus stipitatus*에서 분리된 stipiamide[8]에서도 보고되어 있으나, 농도에 있어서 1000배 이상의 차이를 나타내고 있다.

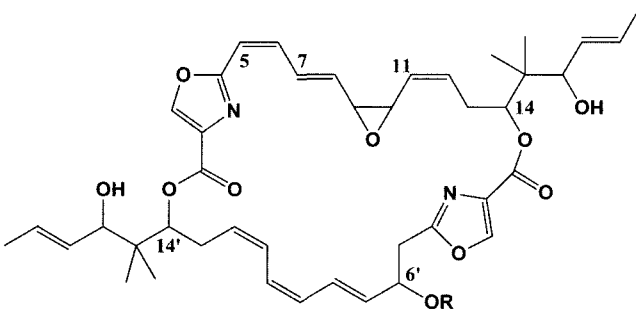


Fig. 4. The structures of disorazoles A₁ and A₂. Disorazole A₁: R=CH₃; Disorazole A₂: R=H.

Disorazole 화합물은 1994년 Reichenbach 등[7]에 의해 최초로 분리되어 각종 식물병원성 곰팡이를 비롯해 L929 (mouse fibroblast)와 HeLa cell과 같은 진핵세포에 대해 강한 성장억제 작용이 있음이 밝혀졌는데[5], 본 연구를 통해서도 Disorazole 화합물의 다양한 인간 암세포에 대한 강한 증식억제 작용이 확인되었으며 이와 함께 다약제 내성의 암세포주에 대해 증식을 효과적으로 억제하는 것이 처음으로 확인되어 향후 항암제의 내성극복에 대한 작용기구의 규명에 선도적인 역할이 기대된다. 특히 adriamycin 내성 암세포주에 대한 Disorazole 화합물의 내성극복이 현저하므로 향후의 연구에서는 Pgp와 관련하여 항암제의 active efflux를 저해하는지에 대한 검토가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

요약

암세포가 특정 항암제에 의해 내성을 획득하면 구조가 상이한 타 항암제에도 교차내성을 나타내는 이른바 암세포의 다약제 내성이 암 화학요법에 있어서 가장 심각한 문제가 되고 있다. 본 연구에서는 다약제 내성 암세포주인 CL02 세포를 이용하여 cellulose 용해성 점액세균인 *Sorangium cellulosum*의 60여종의 균주를 대상으로 다약제 내성 암세포에 유효한 항암물질을 탐색하는 과정에서, 균주 JW1006의 대사산물에서 강한 증식억제 활성을 발견하고 그 활성 본체로서 macrolide계 화합물인 Disorazoles A₁과 A₂를 분리하였다. Disorazoles A₁과 A₂는 인체기원의 암세포에 대해 모두 강한 세포독성(IC₅₀ < 0.04 ng/ml)을 나타낼 뿐만 아니라 다약제내성 세포주인 CL02와 cisplatin내성 세포주인 CP70에 대해서 감수성 세포주와 동일한 활성을 나타내어 다약제 내성을 극복하는 우수한 활성 물질임을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 신약개발지원사업(00-PJ2-PG1-CD02-0007)의 지원으로 진행되었으며 이에 감사드립니다.

Table 1. Cytotoxicities of disorazoles A₁ (1), A₂ (2) and reference compounds

Compound	IC ₅₀ [ng/ml]						
	A549	SK-MEL-2	XF498	HCT15	CL02	A2780	CP70
1	0.02	0.04	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
2	0.04	0.04	0.03	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Adriamycin	40	60	130	120	3,270	20	80
Cisplatin	450	1,260	580	500	1,020	3,240	13,750

IC₅₀: Drug concentration inhibiting 50% of cell growth; A549: Human lung cancer cell line; SK-MEL-2: Human skin cancer cell line; XF498: Human CNS cancer cell line; HCT15: Human colon cancer cell line; CL02: Adriamycin-resistant HCT15 subline; A2780: Human ovary cancer cell line; CP70: Cisplatin-resistant A2780 subline

REFERENCES

1. Bradley, G., P. F. Juranka, and V. Ling. 1988. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* **948**: 87-128.
2. Choi, S. U., N. Y. Kim, E. J. Choi, K. H. Kim, and C. O. Lee. 1996. Establishment of doxorubicin-resistant subline derived from HCT15 human colorectal cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* **19**: 342-347.
3. Gerth, K., N. Bedorf, G. Hoefle, H. Irschik, and H. Reichenbach. 1996. Epothilons A and B: Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). *J. Antibiotics* **49**: 560-563.
4. Halt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staleg, and S. T. Williams. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. William and Wilkins. Baltimore, U. S. A
5. Irschik, H., R. Jansen, K. Gerth, G. Hoefle, and H. Reichenbach. 1995. Disorazol A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacterium. *J. Antibiotics* **48**: 21-25.
6. Iwahashi, T., E. Okochi, K. Ono, L. Sugawara, T. Tsuruo, and S. Mori. 1991. Establishment of multidrug resistant human colorectal carcinoma HCT15 cell line and their properties. *Anticancer Res.* **11**: 1309-1312.
7. Jansen, R., H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, and G. Hoefle. 1994. Disorazoles, highly cytotoxic metabolites from *Sorangium cellulosum* strain So ce12. *Liebigs Ann. Chem.* 759-773.
8. Kim, Y. J., K. Furihata, S. Yamanaka, R. Fudo, and H. Seto. 1991. Isolation and structural elucidation of stiptiamide, a new antibiotic effective to multidrug-resistant cancer cells. *J. Antibiotics* **44**: 553-556.
9. Lum, B. L., M. P. Gosland, S. Kaubisch, and B. I. Sikic. 1993. Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy* **13**: 88-109.
10. Perez, R. P., T. C. Hamilton, R. F. Ozoles, and R. C. Young. 1993. Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* **71**: 1571-1580.
11. Reichenbach, H., and G. Hoefle. 1993. Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotech. Adv.* **11**: 219-277.
12. Reichenbach, H. and M. Dworkin. 1992. *The Myxobacteria*, pp. 3416-3487. In Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin (eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed.). Springer Verlag, New York.
13. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. Warren, H. Bokesch, S. Kenny, and M. R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
14. Ueda, K., G. Cardarelli, M. M. Gottesman, and I. Pastan. 1987. Expression of a full length cDNA for the human *MDR-1* gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 3004-3008.
15. Yamanaka, S., A. Kawaguchi, and K. Komagata. 1987. Isolation and identification of myxobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 247-265.

(Received Jan. 5, 2004/Accepted Mar. 10, 2004)