

토양으로부터 ACAT 저해활성을 나타내는 미생물의 탐색과 방선균이 생산하는 ACAT 저해물질, AI-3의 특성

정태숙 · 김성욱 · 이항우 · 손광희 · 권용국 · 최명언¹ · 복성해*

한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물소재연구 Group

¹서울대학교 자연과학대학 화학과

Screening of Microorganisms Having ACAT Inhibitor Activity from Soil and Characterization of AI-3, ACAT Inhibitor Produced by *Streptomyces* sp. A-3

Jeong, Tae-Sook, Sung-Uk Kim, Hang-Woo Lee, Kwang-Hee Son,
Yong-Kook Kwon, Myung-Un Choi¹ and Song-Hae Bok*

Bioproducts Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST,
P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea

¹Department of Chemistry, College of Natural Sciences,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — About 1,300 strains isolated from soil were evaluated for acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibition activity. About 4.0% of actinomycetes and 3.6% of fungi showed greater than 50% inhibition activity, respectively. However, none of the isolated bacteria exhibited inhibition activity more than 50%. Among them, one *Streptomyces* sp. A-3 showed a higher ACAT inhibition activity in culture broth. Isolation of the ACAT inhibitor (AI-3) was achieved by Amberlite XAD-7 column, silica-gel column, Sephadex LH-20 gel-filtration and reverse phase HPLC. From the UV, IR, FAB-MS spectroscopy and NMR studies, the molecular weight of this compound AI-3 was determined as 465. AI-3 seemed to have a similar structure to that of skin tumor promoter, Olivoretin A. The compound AI-3 inhibited ACAT activity *in vitro* assay system using rat liver microsomes with IC₅₀ value of 3.1 μM.

Acyl-CoA : Cholesterol acyltransferase(ACAT, EC 2.3.1.26)는 동맥에서 cholesterol ester 축적(1)과 장으로부터 cholesterol 흡수 및 간에서 lipoprotein 형성(2)에 중요한 역할을 하는 효소이다. 최근 급속한 산업화와 경제발전으로 생활수준이 향상되면서 지방질의 과다섭취로 인한 심장병과 혈관질환의 발병 및 사망률은 의학기술의 발달에도 불구하고 다른 질병에 비해 매우 높은 비율을 차지하고 있어(3), 심장질환에 관계된 위험인자들 즉 고혈압, Cholesterol 과다증, 포화지방의 과다섭취 및 흡연 등이 미치는 영향에

대한 연구가 활발해지고 있다. 오래전부터 선진국에서는 새로운 심장질환 치료제를 탐색하기 위하여 ACE(angiotensin converting enzyme) Inhibitor와 HMG-CoA reductase Inhibitor에 대한 연구가 활발히 진행되어 이들 효소에 대한 저해제로 Captopril, Enalapril, Lovastatin 등이 개발되어 현재까지 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 ACE Inhibitor와 HMG-CoA reductase Inhibitor들은 Ca channel blocker와 복합 처방해야하거나, cholesterol 관련대사에 영향을 주는 부작용이 예상되고 있다. 따라서 최근에는 약리기전상 동맥경화증과 고지혈증 치료제로 약효의 우수성과 안전성이 기대되고 있는 ACAT Inhibitor에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 추세에 따라 전

Key words: AI-3, Acyl-CoA; cholesterol acyltransferase inhibitor, *Streptomyces*, Olivoretin A

*Corresponding author

국각지로부터 수집한 토양으로부터 ACAT 저해활성을 나타내는 생산균주를 탐색하여, 이중 비교적 저해활성이 높은 물질인 AI-3의 분리·정제 및 기기분석을 통한 구조결정에 관하여 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

균주의 분리 및 시료조제

토양으로부터 균주를 분리하기 위한 분리용 배지로는 starch-nitrate agar, humic acid agar, potato-dextrose agar, Czapek's agar와 malt extract agar를 기본배지로 이용하여 방선균, 세균 및 곰팡이를 분리하였다. 선별된 미생물의 발효배지로는 soluble starch 20 g, soybean meal 25 g, glucose 0.5 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, polypeptone 1 g, CaCl₂ 1 g, NaCl 3 g, D.W. 1 l(pH 7.2)를 이용하였으며, 배양액을 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액을 활성검색에 이용하였다.

균주의 동정

ACAT 저해제 생산균의 동정을 위하여 세포벽의 조성과 isoprenoid quinone 및 지방산 형태의 분석은 방선균의 동정 실험법(4)에 따라 행하였다.

효소의 부분 정제

ACAT 효소원으로는 흰 쥐(male Sprague-Dawley 150~200 g)의 간조직을 분리하여 생리식염수로 세척하고 4배 용량의 완충액 A(0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.01 M Tris, pH 7.4)를 가한 다음 ice bath에서 teflon homogenizer로 균질화하였다. 균질액을 14,000×g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 100,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하였다.

이 침전물을 완충액 B(0.25 M sucrose, 0.01 M Tris, pH 7.4)로 수세하고 분쇄시킨 후 1시간 동안 100,000×g에서 다시 초원심분리를 행하였다. 2차로 얻은 침전물을 4 ml의 완충액 B에 현탁시킨 후 bovine serum albumin 을 표준 단백질로 사용하여 Lowry 등(5)의 방법에 따라 단백질을 정량하고 단백질 농도가 8~10 mg/ml가 되도록 희석하여 200 μl씩 분취한 후 -80℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

효소활성의 측정

ACAT 활성의 측정은 [1-¹⁴C] oleoyl-CoA를 기질로 하여 Tabas 등(6)의 방법을 일부 수정하여 사용하였

다. 10 μl 발효 상등액, 4.0 μl microsomal enzyme, 20.0 μl assay buffer(0.5 M KH₂PO₄, 10 mM DTT, pH 7.4), 40 mg/ml BSA(지방산이 제거된 것, Sigma A6003) 15.0 μl, 20 mg/ml cholesterol 2.0 μl, H₂O 41.0 μl를 가하여 37℃에서 15분간 예비반응시켰다. 이 반응액에 [1-¹⁴C] oleoyl-CoA(0.02 μCi, 최종농도 10 μM) 8 μl를 첨가하여 다시 37℃에서 15분간 반응시킨 후 isopropanol-heptane(4 : 1 ; v/v) 1 ml를 가하여 반응을 정지시키고, heptane 0.6 ml와 5배로 희석한 assay buffer 0.4 ml를 첨가한 후 원심분리를 행하였다. 효소활성의 측정은 원심분리하여 얻은 상등액 100 μl에 cocktail(Lipoluma, Lumac사) 4 ml를 첨가한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

ACAT 활성저해제의 탐색

방선균, 세균, 곰팡이 발효액 0.5 ml에 동량의 Ethyl acetate(EtOAc)를 첨가하여 추출한 후 각각의 층을 효소활성 측정에 이용하였으며, 대조구로는 발효배지 상등액과 용매(5% MeOH, 2% DMSO)를 사용했고, blank는 0℃에서 반응시킨 것을 사용하였다. 활성 측정 후 50% 이상 활성억제를 나타내는 것을 선별하였으며, 저해율은 다음 식으로부터 구하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{CPM}(\text{Sample}) - \text{CPM}(\text{Blank})}{\text{CPM}(\text{Control}) - \text{CPM}(\text{Blank})} \right]$$

선발 균주 A-3의 배양

토양방선균 A-3를 생육배지(yeast extract 0.5%, Bacto-peptone 0.5%, malt extract 0.3%, glucose 1%)에 접종하여 28℃에서 4일간 종균배양하였다. 배양 후 발효배지(Table 1)를 함유한 발효조에 접종하여 28℃, 용존산소 80%, 통기량 0.5 l/min, 교반속도 250~500 rpm, 초기 pH 7.0에서 96~120시간 동안 발효를 행하고 발효액을 7,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 균체를 분리하였다.

효소저해물질의 분리 및 정제

효소저해물질의 정제는 A-3 균주의 발효액을 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하고, 상등액은 XAD-7 adsorption chromatography에 흡착시킨 후 MeOH로 용출하여 농축하였으며, 균체는 MeOH로 추출한 후 진공 농축하였다. 상등액과 균체의 농축액을 H₂O에 용해해서 reverse phase silica-gel column chromato-

Table 1. Fermentation medium for *Streptomyces* A-3 strain

Composition	Concentration (% w/w)
Soluble starch	2.0
SE 50M	0.4
CN 50BT	0.3
CaCO ₃	0.3
Polypeptone	0.2
Yeast extract	0.1
Glucose	1.0
NaCl	0.2
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Antifoam(Neorine)	0.05
Trace elements	
Fe ²⁺	20 mg/l
Mn ²⁺	10 mg/l
Zn ²⁺	10 mg/l
Co ²⁺	5 mg/l

graphy를 이용하여 9개의 분획으로 분리한 후, 저해 활성을 나타내는 분획을 다시 Sephadex LH-20 size exclusion chromatography와 preparative reverse phase HPLC를 행하여 정제하였다.

AI-3의 구조분석

UV 흡광도 분석은 효소저해물질을 100% MeOH에 용해한 후 Shimadzu UV-265 spectrophotometer로 측정하였고, 효소저해물질의 분자량은 VG 70-SEQ mass spectrometry를 이용하여 FAB ion화 방법으로 측정하였으며 matrix로는 glycerol(positive)과 triethylamine(negative)을 이용하였다. 또한 효소저해물질을 CDCl₃에 녹여 Bruker 300 MHz 핵자기공명기를 이용하여 ¹H, ¹³C NMR spectra를 얻었으며 내부표준물질로는 TMS를 사용하였다. FT-IR spectrum은 효소저해물질을 KBr과 혼합하여 disc로 만든 후 Bio-Rad Digilab Division FTS-80 FT-IR spectrophotometer를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

ACAT 활성저해제의 선별

전국 각지로부터 수집한 토양으로부터 분리한 미생물 중 1277균주의 발효액을 불층과 EtOAc층으로

Table 2. Incidence frequency of ACAT inhibitor from various microorganisms

Microorganisms	Sample No. treated	Inhibition (%)	
		50>	80>
Bacteria	172	0.0	0.0
Actinomycetes	605	4.0	0.7
Fungi	500	3.6	0.0

Table 3. Composition of fermentation media for isolated *Streptomyces*

Medium 1		Medium 2	
Soluble starch	2.0%	Soluble starch	2.0%
SE 50 M	0.4	SE 50 M	2.0
CN 50 BT	0.3	Glucose	0.2
Polypeptone	0.2	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
CaCO ₃	0.3	K ₂ HPO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.1	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Yeast extract	0.1	CaCl ₂	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	NaCl	0.3
NaCl	0.2		
Trace Fe ²⁺	20 mg/l	Trace Fe ²⁺	20 mg/l
Mn ²⁺	10 mg/l	Mn ²⁺	10 mg/l
Zn ²⁺	10 mg/l	Zn ²⁺	10 mg/l
Co ²⁺	5 mg/l	Co ²⁺	5 mg/l

분리한 후 ACAT 활성을 조사하였다(Table 2). Table 2에 나타낸 바와 같이 50% 이상 저해활성을 나타낸 균주는 방선균 605균주로부터 4.0%, 곰팡이 500균주로부터 3.6%이며, 세균 172균주로부터는 50% 이상의 저해활성을 나타내는 것이 전혀 없어 좋은 대조를 이루었고, 방선균 605균주 중 고온방선균 402균주에서도 50% 이상 저해활성을 나타내는 것이 없었다.

1차 선별한 56균주의 방선균을 대상으로 2가지 종류의 배지를 사용하여 28°C 에서 4일간 진탕배양한 후 상등액의 ACAT 활성을 조사하였다. 그 결과 배지 1에서는 56균주 중 25균주 배양액에서 50% 이상의 억제활성을 나타내었고, 배지 2(Table 3)에서는 56균주 중 14균주액에서 50% 이상의 억제활성을 나타내었다.

따라서 전체적으로 배지 1이 ACAT 저해물질의 생산에 적합한 것으로 생각되어지며, 균주 No. 2131의 경우에는 배지 2에서 생산한 배양액은 80% 이상의 저해활성을 나타내는 반면에, 배지 1에서 생산한 배양액은 저해활성이 거의 없어 발효배지 조성(유기

질소원의 유무)에 따라 차이를 나타내는 것으로 생각되었다.

이렇게 1차 선별한 방선균 중에서 70% 이상의 ACAT 활성을 나타내는 한 균주를 선별하여 앞으로의 실험에 이용하였으며, 이 균주는 세포벽 조성이 LL-DAP type이고, isoprenoid quinone이 MK-9(H₂H₄H₆H₈)이었으며 cellular fatty acid 조성이 FA-type 2C로 전형적인 *Streptomyces*속의 특징을 나타내어 이 균주를 *Streptomyces* sp.로 동정하였다.

효소활성저해제의 분리 및 정제

ACAT 저해활성을 나타내는 물질을 분리하기 위하여 상등액 4l를 Amberlite XAD-7(Rohm & Hass

사) column(105×200 mm)에 분당 40 ml의 유속으로 흡착시킨 후 증류수로 흡착되지 않은 물질을 제거하고 MeOH을 이용하여 용출하였다. 용출액 중 저해 활성을 나타내는 물질이 포함된 분획을 진공 농축(2.28 g)하여 reverse phase silica-gel column chromatography(95 id×50 mm, C-18, 40~63 μm, Merck)를 행하였으며, 용출액으로는 H₂O, 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7, 1 : 9 H₂O/MeOH, MeOH, MeCN, EtOAc를 각각 400 ml씩 이용하였다. 효소활성저해물질이 함유된 분획(Fr. 7)을 모아서 진공 농축한 후 다시 MeOH에 용해하고 size exclusion chromatography(Sephadex LH-20, 35 id×850 mm)를 통과하여 효소활성 억제분획(Fr. 28~38)을 모아 농축하였다. 또한 Sephadex LH-20를 통과한 물질을 preparative HPLC(Bondapak C-18, 19×150 mm, Waters, eluent 75% MeOH, 225 nm)로 최종 정제하였다(Fig. 1). 균체로부터 활성물질을 분리하기 위하여 균체에 4l의 MeOH을 첨가하여 상온에서 24시간동안 교반한 후 균체를 여과하고 진공 농축한 후(4.28 g) reverse phase silica-gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel-filtration, HPLC를 이용하여 상등액과 같은 방법으로 분리·정제를 행하였으며, 발효액 4l로부터 최종적으로 흰색분말 8 mg(상등액의 XAD-7 MeOH 용출액과 균체의 MeOH 추출액을 기초로하여 수율은 0.12%이었다.)을 얻었으며, 이 순수 정제된 물질을 AI-3로 명명하였다.

AI-3의 이화학적 성질

ACAT 저해제 AI-3의 이화학적 성질은 Table 4에

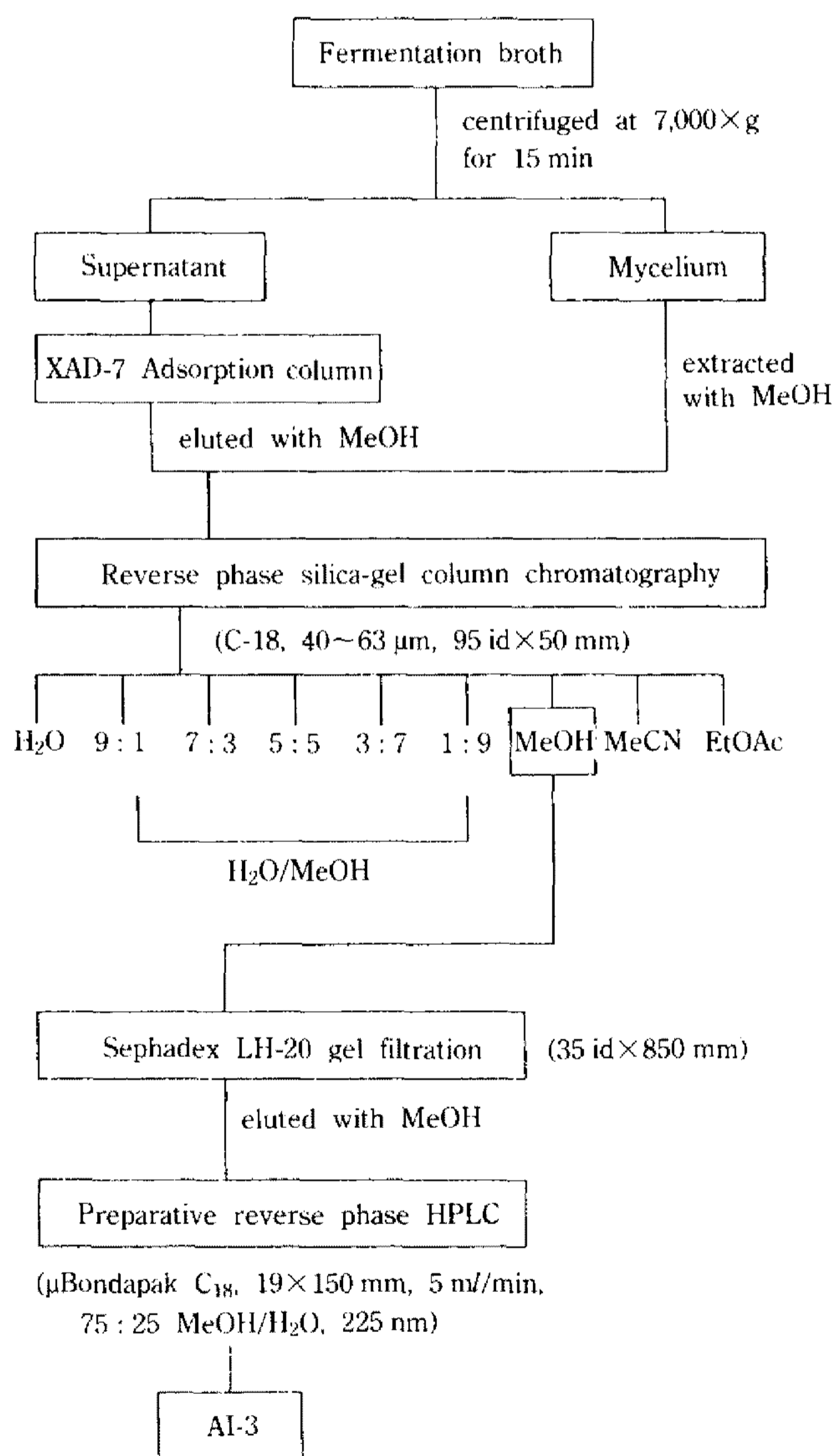


Fig. 1. Purification steps of compound AI-3 showing ACAT inhibition activity produced from *Streptomyces* sp. A-3 strain.

Table 4. Physico-chemical properties of AI-3

Appearance	colorless powder
Stability	stable in acid and weakly base
Molecular formula	C ₂₉ H ₄₃ N ₃ O ₂
HRFAB-MS(m/z)	
Calcd:	465.3355
Found:	465.3362
UV _{max} ^{MeOH} (nm)	232,286
Melting point	251~253°C
Solubility	
soluble:	MeOH, CHCl ₃
insoluble:	H ₂ O, n-Hexane
Rf value	0.67~0.68
(n-Hexane/EtOAc=1 : 2)	

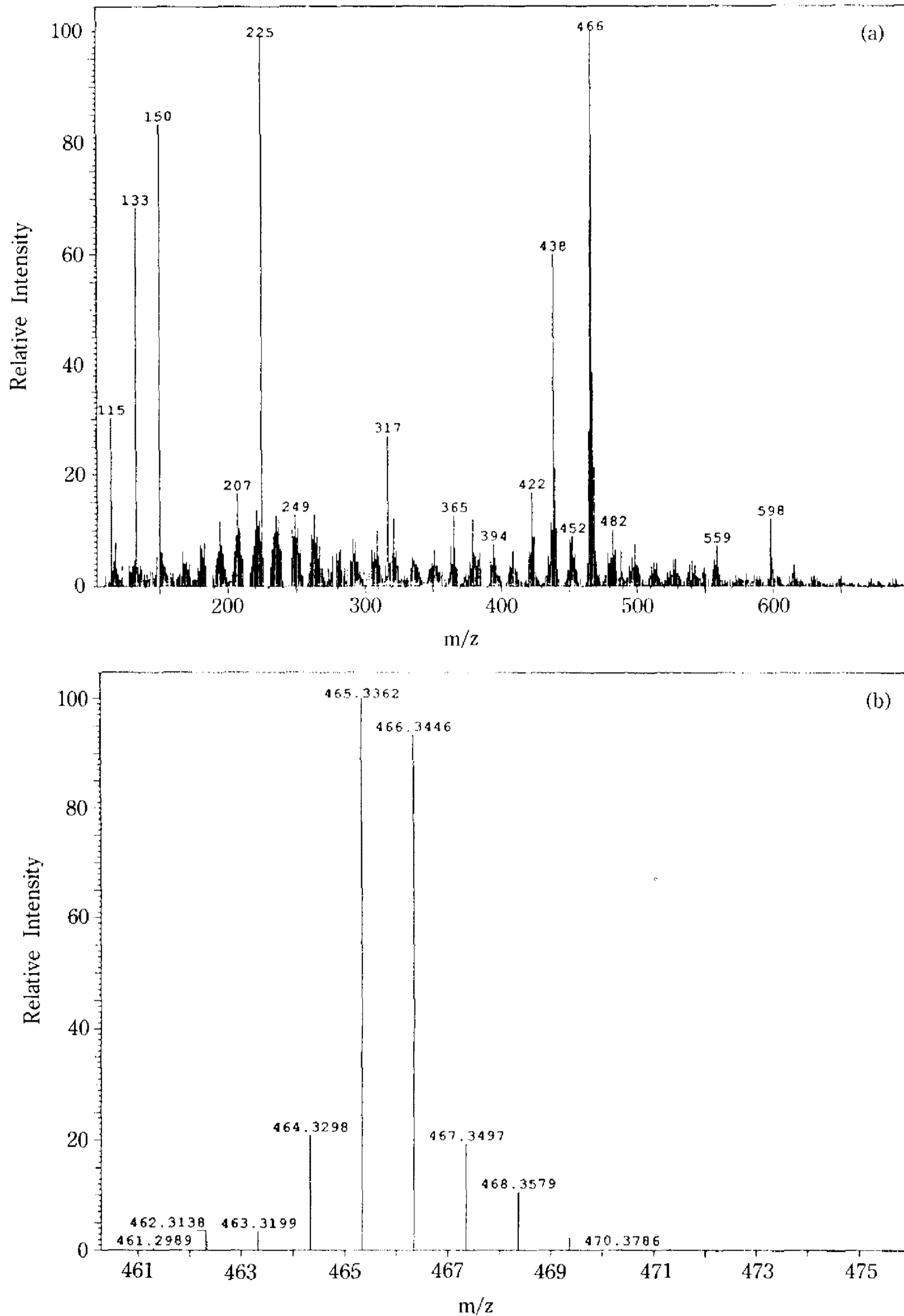


Fig. 2. FAB-MS spectrum (a) and HRFAB-MS spectrum (b) of compound AI-3.

나타내었다. AI-3는 백색분말로서 산성과 약염기성에서는 안정하나, 강염기성에서는 불안정하다. AI-3는 MeOH와 CHCl_3 에는 잘 녹고, 물과 n-Hexane에는 용해되지 않았다.

AI-3의 구조결정

AI-3 물질의 UV-VIS spectrum은 100% MeOH 용액에서 232 nm와 286 nm에서 최대 흡수 파장을 나타내었으며, 분자량을 FAB-MS로 측정된 결과(Fig. 2a) 466에서 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 의 강한 ion peak가 나타났으

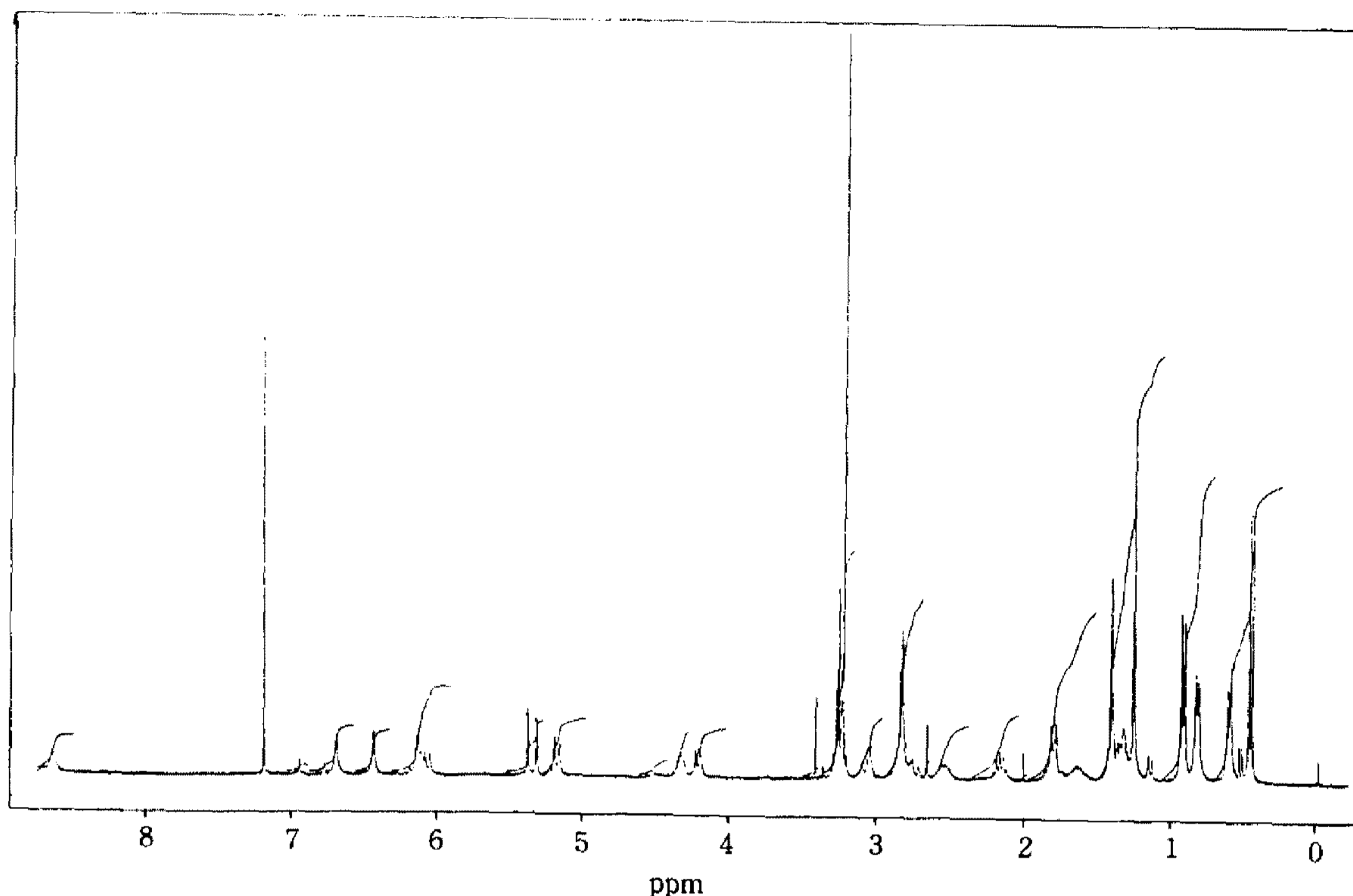


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound AI-3 (CDCl_3 , 300 MHz).

며, high resolution FAB-MS(Fig. 2b)에서는 m/z : 465.3362로 나타나 예상되는 분자식은 $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_2$ 라고 생각되었다.

AI-3의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 Fig. 3에 나타내었다. 0.68 ppm(3H, d, $J=6.6$ Hz)과 0.91 ppm(3H, d, $J=6.6$ Hz)의 signal은 2.61 ppm(1H, septet, $J=6.6$ Hz) signal과 coupling하며, 0.53 ppm(3H, d, $J=6.7$ Hz)과 1.01 ppm(3H, d, $J=6.7$ Hz)의 signal은 2.25 ppm(1H, septet, $J=6.7$ Hz) signal과 coupling하는 2개의 isopropyl group의 존재를 알 수 있고, 1.35 ppm(3H, s)과 1.51 ppm(3H, s)의 peak는 tert-C에 연결된 $-\text{CH}_3$ 임을 알 수 있었다. 또한 2.91 ppm(3H, s)은 N- CH_3 에 의한 peak이며, 3.31 ppm(3H, s)은 O- CH_3 에 의한 peak를 나타내었다. 5.42 ppm(1H, dd, $J_{\text{trans}}=17.8$, $J_{\text{gem}}=1.2$ Hz)과 5.25 ppm(1H, dd, $J_{\text{cis}}=10.7$, $J_{\text{gem}}=1.2$ Hz) signal은 double bond에 연결된 proton을 나타내었으며 8.70 ppm(1H, br s)은 NH의 peak를 나타내었다. 이러한 ^1NMR Spectrum으로부터 얻은 signal assignment data를 Table 5에 종합하였다.

AI-3 화합물의 FT-IR spectrum을 Fig. 4에 나타내었다. $3,400\text{ cm}^{-1}$ 에서 $-\text{NH}$, $2,870\sim 2,960\text{ cm}^{-1}$ 에서 aliphatic C-H group의 존재와 $1,650\text{ cm}^{-1}$ 에서는 amide carbonyl group의 존재를 알 수 있었다.

이상의 여러가지 spectra를 종합해 볼 때 AI-3

Table 5. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) chemical shifts and assignments for ACAT inhibitor AI-3

No.	Chemical shift (δ)
1	8.70 (1H, br s)
2	6.77 (1H, m)
6	6.52 (1H, s)
10a	3.15 (1H, br d, $J_{\text{gem}}=17.8$)
10b	2.88 (1H, dd, $J_{\text{gem}}=17.8$, $J_{10b,11}=3.6$)
11	4.40 (1H, m)
12	6.22 (1H, br s)
14	4.29 (1H, d, $J_{14,21}=10.2$)
20	3.34-3.37(2H, m)
21	2.61 (1H, d septet, $J_{21,14}=10.2$, $J_{21,22\text{ and }23}=6.6$)
22	*0.91 (3H, d, $J_{22,21}=6.6$)
23	*0.68 (3H, d, $J_{23,21}=6.6$)
24	2.91 (3H, s)
25	1.35 (3H, s)
26	2.25 (1H, septet, $J_{26,27\text{ and }28}=6.7$)
27	+0.53 (3H, d, $J_{27,26}=6.7$)
28	+1.01 (3H, d, $J_{28,26}=6.7$)
29	1.51 (3H, s)
30	6.17 (1H, dd, $J_{\text{trans}}=17.8$, $J_{\text{cis}}=10.7$)
31a	5.42 (1H, dd, $J_{\text{trans}}=17.8$, $J_{\text{gem}}=1.2$)
31b	5.25 (1H, dd, $J_{\text{cis}}=10.7$, $J_{\text{gem}}=1.2$)
32	3.31 (3H, s)

a) 17_{ab}, 18_{ab}: not assigned.

b) Assignments bearing the same superscript on vertical column may be interchanged.

ACAT 활성저해물질(Fig. 5)은 *Streptoverticillium olivoreticuli*로부터 분리된(7, 8) 바 있는 강한 발포성 skin tumor promoter인 Olivoretin A와 거의 동일한 구조라고 생각된다. 그러나 지금까지 Olivoretin 계열 화합물이 ACAT 활성저해제라는 사실은 보고된 바 없으며, Olivoretin A와 미세한 부분에서 차이를 보이는 입체구조 이성질체일 가능성이 있다. 따라서 앞으로 500 MHz NMR의 특수기법과 X-ray 분석을 통해 보다 명확한 구조연구를 계속할 예정이다.

In vitro 효소계에서의 ACAT 활성저해 효과

일차 ACAT 활성저해물질 탐색과정에서는 유기용매를 이용하여 cholesteryl oleate가 포함된 상층을 분리하여 radioactivity를 측정하였다. 또한 2차 탐색

과정에서는 lipid 추출물이 포함된 상층에는 반응생성물인 cholesteryl oleate 이외의 물질이 미량 포함되어 있을 가능성이 있으므로 TLC plate(Silica 60F₂₅₄, Merck사)를 이용하여 상층액을 petroleum ether-diethyl ether-acetic acid(90 : 10 : 1)의 용매에서 전개시킨 후, iodine에 의해 발색되는 cholesteryl oleate 부분(Rf=0.75)을 긁어서 radioactivity를 측정하였다. AI-3 화합물의 100% 순수한 물질을 순차적으로 희석하여 *in vitro* microsomal 효소계에서 ACAT 활성을 조사한 결과 IC₅₀ value는 3.1 μM임을 알 수 있었다 (Table 5). 최근에 Tomoda 등(11)에 의해 보고된 purpactin A, B, C를 기점으로해서 천연미생물로부터 많은 ACAT 저해제에 대한 보고가 급증하고 있으나,

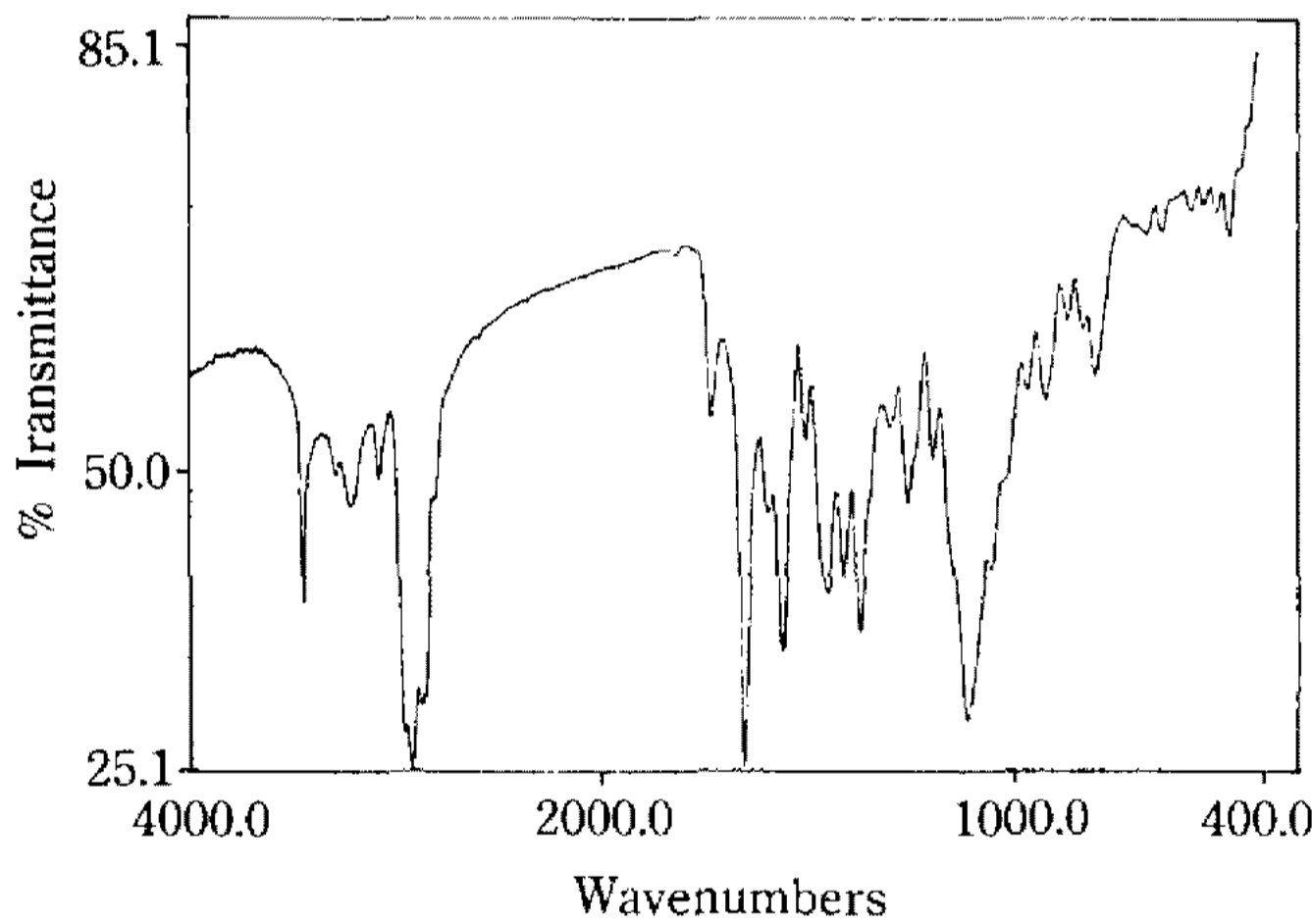


Fig. 4. FT-IR spectrum of compound AI-3.

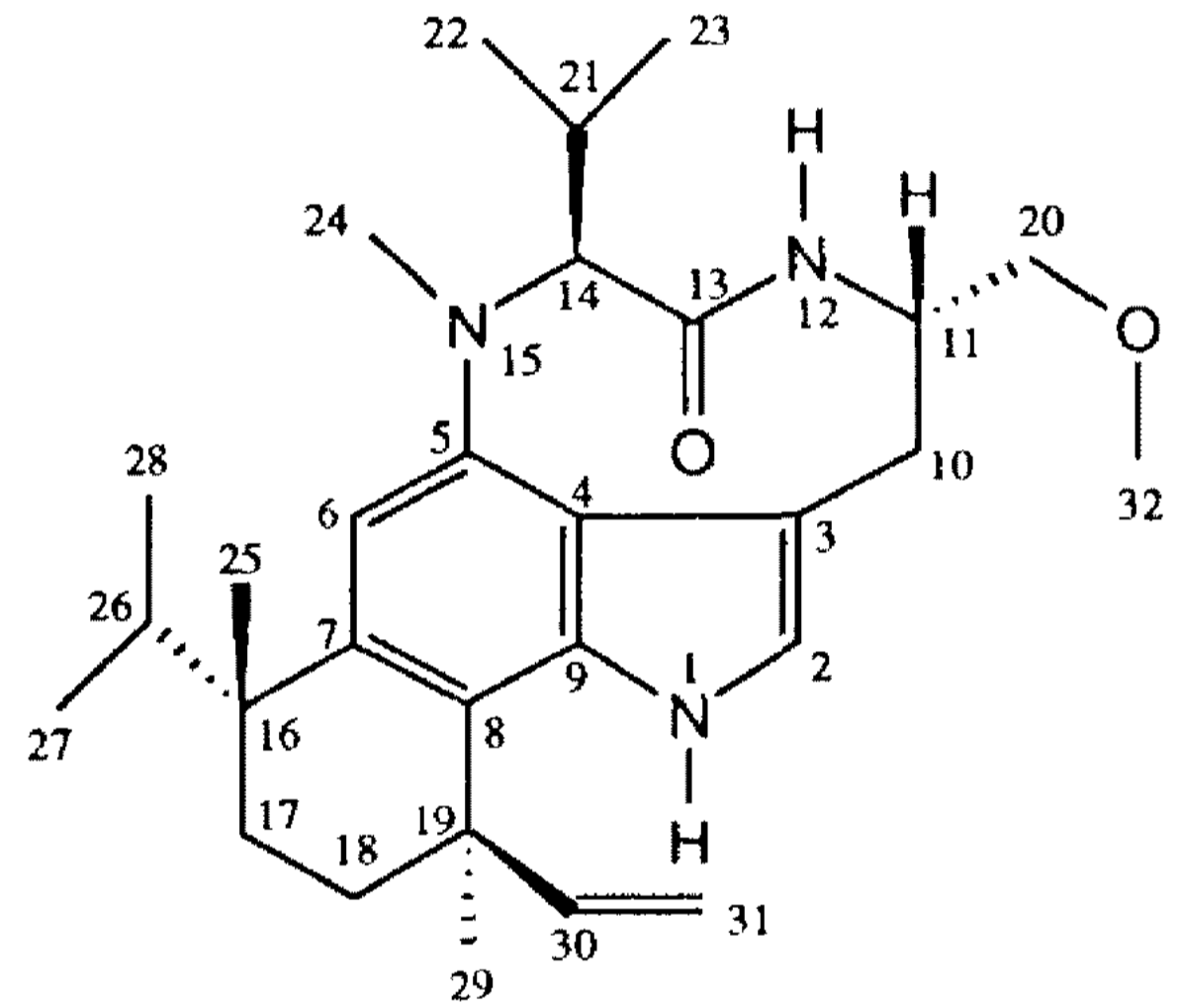


Fig. 5. Structure of AI-3.

Table 5. Summary of inhibitory activity and cytotoxicity of various ACAT inhibitors

Compound	IC ₅₀ (μM)			Ref.
	Microsomal assay	J774	macrophage assay	
		CE	Cytotoxicity	
AI-3	3.1	NT	NT	
CL-283,546	1.3	0.074		(9)
CL-277,082	6.6	0.30	7.8	(10)
Purpactin A	121	1.2	9.7	(11)
Glisoprenin A	46	1.2	14.0	(12)
Enniatins	22-110	0.44-1.1	2.6~>10	(13)
Acaterin	120	45		(14)
Beauvericin	3.0	0.17	11	(15)
Pyripyropenes	0.053~0.268			(16)
AS-183	0.94			(17)
Helminthosporol	500	90		(18)

CE: Cholesterol ester formation, NT: Not tested.

일반적으로 J774 macrophage assay system에서의 IC₅₀ value는 *in vitro* microsomal enzyme assay system보다 10~100배 낮게 나타나고 있다.

또한 enzyme assay시 *Fusarium* sp.로부터 분리된 enniatins(15)에 의한 ACAT 억제와 hydrophobicity 사이의 상관관계에 관한 결과로부터 ACAT이 membrane-bound 효소이기 때문에 소수성 화합물이 membrane과 친화성이 높고, 비특정적인 방법으로 효소 활성을 저해할 수 있다고 보고하고 있다. 그러나 enniatins의 branched alkyl amino acid 대신에 L-phenylalanine을 포함하는 beauvericin이 강한 ACAT 저해 활성을 나타낸다는 점으로부터 구조상 aromatic group이 ACAT 저해에 기여할 것으로 지적하고 있다. 따라서 AI-3와 그 유도체를 이용하여 *in vitro* microsomal assay system과 J774 cell assay system을 이용한 cholesterol ester 형성 및 cytotoxicity에 관한 연구와 tumor promoter들이 어떤 기작에 의해 ACAT 활성을 저해하는가에 관한 연구를 진행하고자 한다.

요 약

토양으로부터 분리한 1,300여 균주 중 50% 이상 ACAT 저해 활성을 나타내는 경우는 방선균 605균주로부터 4.0%, 곰팡이 500여 균주로부터 3.6%였으며, 세균 172균주로부터는 50% 이상 저해활성을 나타내는 것이 없어 좋은 대조를 이루었다. 이중 강한 ACAT 저해활성을 나타내는 생산균주 *Streptomyces* sp. A-3 배양액으로부터 XAD-7 column, silica-gel column, sephadex LH-20 column chromatography 및 역상 HPLC를 이용하여 활성저해물질(AI-3)을 분리·정제하였다. AI-3를 UV, IR, FAB-MS, NMR을 통해 분석한 결과 분자량이 465이며, skin tumor promoter로 알려진 Olivoretin A와 거의 동일한 구조임을 알 수 있었다. 또한 rat liver microsome을 이용한 효소활성 성분분석에서 AI-3의 IC₅₀ value는 3.1 μM이었다.

감사의 말씀

본 연구의 수행중 균주의 동정에 많은 도움을 주신 유전공학연구소 박용하 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Bell, F.P. 1986. Arterial cholesterol esterification

by acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, its possible significance in atherogenesis and its inhibition by drugs. Pp. 409-422. In J.R. Prous(ed.), *Pharmacological Control of Hyperlipidemia*, Science Publishers.

- Heider, J.G. 1986. Agent which inhibit cholesterol esterification in the intestine and their potential value in the treatment of hypercholesterolemia. Pp. 423-438. In J.R. Prous(ed.), *Pharmacological Control of Hyperlipidemia*, Science Publishers.
- Stinson, S.C. 1988. Drug Industry steps up fight against heart disease. C & E N. October 3: 35-70.
- 일본방선균연구회편. 1985. 放線菌의 同定實驗法 Pp. 58-150. 1th ed., 日本放線菌研究會事務局, 東京.
- Lowry, O.H. and N.T. Rosebrough. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Tabas, I., D.A. Weiland, and A.R. Tall. 1986. Inhibition of ACAT in J774 macrophages enhances down-regulation of the low density lipoprotein receptor and HMG-CoA reductase and prevents low density lipoprotein-induced cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* **261**: 3147-3155.
- Sakai, S.-I., N. Aimi, K. Yamaguchi, Y. Hitotsuyanagi, C. Watanabe, K. Yokose, Y. Koyama, K. Shudo, and A. Itai. 1984. Elucidation of the structure of olivoretin A and D (Teleocidin B). *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 354-357.
- Hitotsuyanagi, Y., K. Yamaguchi, K. Ogata, N. Aimi, S.-I. Sakai, Y. Koyama, Y. Endo, K. shudo, A. Itai, and Y. Iitaka. 1984. Eluidation of the structure of olivoretin B and C. *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 3774-3778.
- Katocs, Jr., A.S., C.-H. Wang, and E.E. Largis. 1988. The hypercholesterolemic activity of the ACAT inhibitor CL 283, 546 in rat, rabbit and monkey. *FASEB J.* **2**: A1219.
- Kelly, J.L., C.A. Suenram, M.M. Rozek, S.A. Schaffer, and C.J. Schwartz. 1988. Influence of the acyl-CoA: cholesterol *O*-acyltransferase inhibitor, CL 277082, on cholesterol ester accumulation in rabbit macrophage-rich granulomas and hepatic tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **960**: 83-90.
- Tomoda, H., H. Nishida, R. Musuma, J. Cao, S. Okuda, J. Cao, S. Okuda, and S. Ōmura. 1991. Purpactins, new inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium purpurogenum*. *J. Antibiot.* **44**: 136-143.
- Tomoda, H., H. Nishida, X.-H. Huang, R. Masuma, Y.K. Kim, and S. Ōmura. 1992. Glisoprenins, new inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acy-

- ltransferase produced by *Gliocladium* sp. FO-1513. *J. Antibiot.* **45**: 1202-1206.
13. Tomoda, H., H. Nishida, X.-H. Huang, R. Muzuma, Y.K. Kim, and S. Ōmura. 1992. New cyclodepsipeptides, enniatins D,E and F produced by *Fusarium* sp. FO-1305. *J. Antibiot.* **45**: 1207-1215.
14. Naganuma S., K. Sakai, K. Hasumi, and A. Endo. 1992. Acaterin, a novel inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Pseudomonas* sp. A92. *J. Antibiot.* **45**: 1216-1221.
15. Tomoda, H., X.-H. Huang, J. Cao, H. Nishida, R. Nagao, S. Okuda, H. Tanaka, and S. Ōmura. 1992. Inhibition of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase by cyclodepsipeptide antibiotics. *J. Antibiot.* **45**: 1626-1632.
16. Ōmura, S., H. Tomoda, Y.K. Kim, and H. Nishida. 1993. Pyripyropenes, highly potent inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* **46**: 1168-1169.
17. Kuroda, K., M. Yoshida, Y. Uosaki, K. Ando, I. Kawamoto, E. Oishi, H. Onuma, K. Yamada, and Y. Matsuda. 1993. AS-183, a novel inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase produced by *Scedosporium* sp. SPC-15549. *J. Antibiot.* **46**: 1196-1202.
18. Park J.K., K. Hasumi, and A. Endo. 1993. Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase by helminthosporol and its related compounds. *J. Antibiot.* **46**: 1303-1305.

(Received November 17, 1993)