

Streptomyces sp.no. 460이 생산하는 살충성 물질의 구조 동정

오세량* · 이형규 · 구본탁 · 최수근 · 박상구 · 신병식 · 박승환 · 김정일

KIST 유전공학연구소 응용미생물 연구그룹

초록 : 토양에서 분리된 방선균에서 생산되는 살충성 물질을 스크리닝하는 연구과정중 선발된 no. 460균주가 생산하는 살충성 물질을 분리하였다. 분리된 물질 4가지는 UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, C-H COSY 방법으로 구조 분석한 결과, Piericidin C₁, C₂, C₃ 그리고 D₁으로 각각 동정되었다(1994년 1월 31일 접수, 1994년 3월 18일 수리).

서 론

유기합성 살충제는 농업 생산성 향상에 절대적으로 공헌해 왔지만 그 작용기작이 비선택적인 몇 가지의 lead molecules로부터 출발하여 개발된 것이므로 인축에 대한 독성과 non-target organisms에 대한 독성문제를 극복하지 못하고 있으며, 공통적인 구조 및 작용기작은 방제 대상 생물에 저항성을 유발하여 계속 사용하면 사용량을 증가 해야만 하였다. 이로 말미암아 유기합성 살충제는 인축에 대한 직접적인 독성문제 뿐만 아니라, 환경중에 잔류, 축적되어 먹이사슬 균형을 포함한 생태계 전반의 안정을 위협하는 주된 원인으로 인식되고 있다. 따라서 최근에는 기존 살충제들의 비선택적인 독성으로 야기되는 단점들을 극복하고 대체될 수 있는 새로운 작용기작, 새로운 구조의 lead molecules를 다양한 생물자원으로부터 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며,¹⁻¹⁵⁾ 성공적인 연구결과로 tetranactin,¹⁶⁾ avermectins,¹⁷⁾ milbemycins¹⁸⁾ 등의 살충성 물질들이 산업화 되었거나 산업화 과정 중에 있다.

본 연구실에서는 새로운 구조의 살충성 물질 선발을 목적으로 우리나라 각 지역의 토양으로부터 방선균 6,000여 균주를 분리하였으며, 이들을 대상으로 살충활성이 있는 균주를 선발하고 살충성 물질을 분리하는 연구를 수행하여 왔다. 그중 먼저 no. 460균주의 살충성 물질이 분리, 동정 되었기에 이를 보고하고자 한다.

살충성 물질의 분리

토양에서 분리된 균주들은 Fabre *et al.*¹⁹⁾의 방법을

사용하여 집파리(*Musca domestica*)에 대한 살충효과 검정으로 살충성 물질 생산 균주를 1차 선발한 후, 본 실험실에서 고안한 방법²⁰⁾으로 집누에나방 유충(*Bombyx mori* 3rd larvae)에 대한 살충효과를 고체 및 액체 배양액에서 확인하여 대상곤충과 배양방식을 달리하여도 안정된 살충효과를 나타내는 균주를 선발하였다. 균주 배양에 사용한 GAPY배지의 조성은 Table 1과 같다.

균주의 대량배양은 먼저 GAPY 액체배지 300 ml에 균주를 접종하여 flask 배양(27°C, 200 rpm, 3days)한 후, 이를 다시 GAPY 액체배지 14L에 2차 접종하여 배양(27°C, 200 rpm, 7days)하였다. 배양액의 살충성 물질 확인은, 배양액 추출물의 일부를 순상 TLC(Silica gel 60F₂₅₄, hexane/acetone 2/1, v/v)와 역상 TLC(RP-18 F₂₅₄, methanol/H₂O 9/1, v/v)상에서 분리한 후 *Bombyx mori* 유충에 대한 살충활성으로 물질의 위치를 확인하였으며 이를 기준으로 살충성 물질을 분리하였다(Fig. 1). 살충성 물질들은 균체 및 배양액에 모두 존재하여 각각을 추출한 후 함께 모았으며, 총 추출액은 순상 column chromatography(silica gel, hexane-acetone mixture, acetone 0~100% gradient)와 역상 column chromatography(RP-18, methanol-H₂O mixture, 85/15, v/v)방법으로 살충성분들을 분리한 후, 최종적으로 HPLC(RP-18, methanol-H₂O mixture 4/1~9/1, v/v)상에서 정제하였다.

결과 및 고찰

살충 활성

분리된 물질들을 본 연구에서 사용한 bioassay 방법으로 *Bombyx mori* 유충에 대한 살충효과를 검정한 결과

Key words : Streptomyces, piericidins

*Corresponding author : S.-R. Oh

Table 1. Composition of GAPY medium.

Glucose	10.0 g
Soluble starch	20.0 g
Bacto soytone	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
CaCO ₃	1.0 g
Agar	15.0 g
Distilled H ₂ O	1,000 ml
pH adjusted to 7.2	

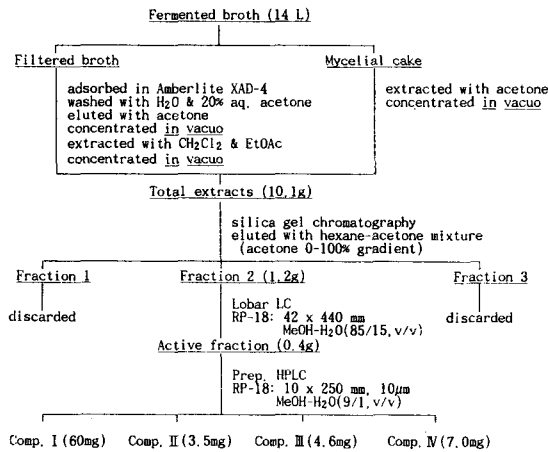


Fig. 1. Isolation procedure of insecticidal compounds from *streptomyces* no. 46 strain.

는 Table 2와 같다. Compound I-IV 모두 1 µg~10 µg 에서 0%~100%의 치사율을 나타내어 기존의 살충제인 DDT와 parathion과 동일한 수준에서 살충효과를 나타 내었다.

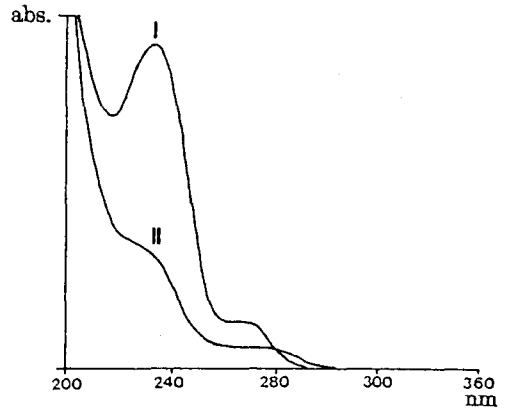


Fig. 2. UV spectra of isolated compounds in methanol. type I: compound I, II and IV, type II: compound III.

UV spectrum 비교

분리된 살충성 물질들의 UV spectrum은 Fig. 2와 같다. Compound I, II 및 IV는 최대 흡수 파장이 235 nm으로 spectrum pattern이 동일하였다. 이에 비교하여 compound III은 235 nm와 272 nm의 2 max. peak pattern으로 나타나지만 235 nm에서 분자흡광계수값(ϵ_{max})이 현저하게 차이가 나고 spectrum pattern도 shoulder 형태 이었다. 분리된 물질들의 UV spectrum pattern이 2가지로 나뉘는 특징은 Piericidins 계열물질의 UV spectra와 유사하였다.²¹⁾ 즉, Piericidins의 계열물질(PA, PB, PC and PD)들은 pyridine ring의 side chain에서 계열 물질 상호간이나 동일 계열내의 말단기의 구조적 유사 성과는 관계없이 5번 탄소 위치의 methyl group 존재

Table 2. Comparision of insecticidal activity of isolated compounds with other compounds.

compound	300 µg ¹⁾	10 µg	5 µg	2.5 µg	1.0 µg	0.1 µg
acetone (control)	0/10 ²⁾					
cycloheximide	0/10					
kanamycin	0/10					
compound I		10/10	10/10	8/10	1/10	—
compound II		10/10	7/10	2/10	0/10	—
compound III		10/10	10/10	4/10	0/10	—
compound IV		10/10	10/10	4/10	1/10	—
DDT		10/10	4/10	1/10	0/10	—
parathion		10/10	10/10	9/10	3/10	0/10
carbofuran		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

1) loading dosage on artificial diet 1.5 g.

2) no.of dead larvae/applied larvae (3rd larvae of *Bombyx mori*) after 24hrs.

Table 3. $^1\text{H-NMR}$ data of insecticidal compounds from no. 46 strain¹⁾

proton	Comp. I	Comp. II	Comp. III	Comp. IV	PD ₁ ²⁾
1-H ₂	3.46 (d, 7.0 Hz)	3.29 (d, 6.8 Hz)	3.35 (d, 6.8 Hz)	3.34 (d, 7.0 Hz)	3.30 (d)
2-H	5.50 (t)	5.37 (t, 9.2 Hz)	5.37 (t, 6.8 Hz)	5.38 (t, 7.0 Hz)	5.31 (t)
4-H ₂	2.86 (s)	2.75 (d, 6.9 Hz)	2.67 (s)	2.76 (d, 6.8 Hz)	2.47 (d)
5-H	5.64 (dt)	5.55 (dt)	—	5.50	5.45 (m)
6-H	6.16 (d, 15.6 Hz)	6.04 (d, 15.5 Hz)	5.66 (s)	5.60 (dt, 15.5 Hz)	5.98 (d)
8-H	5.37 (d, 8.9 Hz)	5.20 (d, 9.2 Hz)	5.05 (d, 9.5 Hz)	5.18 (d, 9.8 Hz)	5.16 (d)
9-H	2.69 (m)	2.65 (m)	2.56 (m)	2.65 (m)	2.50 (m)
10-H	2.62 (d)	2.87 (d, 8.9 Hz)	2.86 (d, 9.2 Hz)	2.87 (d, 9.0 Hz)	2.72 (d)
12-H	2.86		2.92	2.92	2.40 (q)
13-H ₃	1.39 (d, 5.5 Hz)		1.30 (d, 5.5 Hz)	1.30 (d, 5.6 Hz)	1.24 (d)
13-H		1.56 (m)			
14-H ₃	1.33 (s)	1.30 (s)	1.28 (s)	1.27 (s)	1.14 (s)
15-H ₃	1.00 (d, 6.8 Hz)	0.93 (d, 6.6 Hz)	0.90 (d, 6.8 Hz)	0.89 (d, 6.8 Hz)	0.87 (d)
16-H ₃	1.83 (s)	1.71 (s)	1.65 (s)	1.72 (s)	1.68 (s)
17-H ₃	1.83 (s)	1.76 (s)	1.76 (s)	1.77 (s)	1.73 (s)
18-H ₃		0.95 (d, 6.5 Hz)			
19-H ₃		1.06 (d, 6.5 Hz)			
10-OCH ₃	3.53 (s)				3.45 (s)
6'-H ₃	2.18 (s)	2.06 (s)	2.06 (s)	2.07 (s)	2.04 (s)
7'-H ₃	3.94 (s)	3.82 (s)	3.83 (s)	3.88 (s)	3.80 (s)
8'-H ₃	4.04 (s)	3.92 (s)	3.92 (s)	3.92 (s)	3.89 (s)

1) measured in CDCl₃ solution at 300 MHz; chemical shifts are given in ppm relative to internal Me₄Si.

2) Data of piericidin D₁ from S. Yoshida's paper²²⁾.

Table 4. $^{13}\text{C-NMR}$ data of compound I and Piericidin D₁¹⁾

carbon	compound I	PD ₁ ²⁾	carbon	compound I	PD ₁
1	34.4 (CH ₂)	34.5 (t)	15	17.8 (CH ₃)	18.0 (q)
2	122.0 (CH)	122.3 (t)	16	16.5 (CH ₃)	16.6 (q)
3	134.9 (C)	134.7 (s)	17	12.8 (CH ₃)	12.9 (q)
4	43.1 (CH ₂)	43.1 (t)			
5	125.8 (CH)	125.8 (d)	10-OCH ₃	58.6 (CH ₃)	58.6 (q)
6	136.0 (CH)	136.1 (d)	1'	150.8 (C)	150.7 (s)
7	134.9 (C)	134.7 (s)	2'	111.9 (C)	112.1 (s)
8	133.5 (CH)	133.5 (d)	3'	153.9 (C)	154.3 (d)
9	36.0 (CH)	36.2 (d)	4'	127.7 (C)	128.0 (s)
10	91.1 (CH)	91.2 (d)			
11	61.9 (C)	61.9 (d)	5'	153.5 (C)	153.7 (s)
12	55.0 (CH)	55.0 (d)	6'	10.4 (CH ₃)	10.5 (q)
13	13.1 (CH ₃)	13.2 (q)	7'	60.5 (CH ₃)	60.4 (q)
14	11.3 (CH ₃)	11.4 (q)	8'	53.0 (CH ₃)	52.9 (q)

1) measured in CDCl₃ solution at 75 MHz; chemical shifts are given in ppm relative to internal Me₄Si.

2) data of piericidin D₁ from S. Yoshida's paper²²⁾.

여부에 따라 UV spectrum이 2가지 pattern으로 나뉘는데, 이로서 compound I-IV는 모두 Piericidins 계열물질로 추정되었다.

NMR 구조분석

Compound I-IV의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 spectra를 Piericidin D₁와 비교한 결과는 Table 3, 4와 같다.

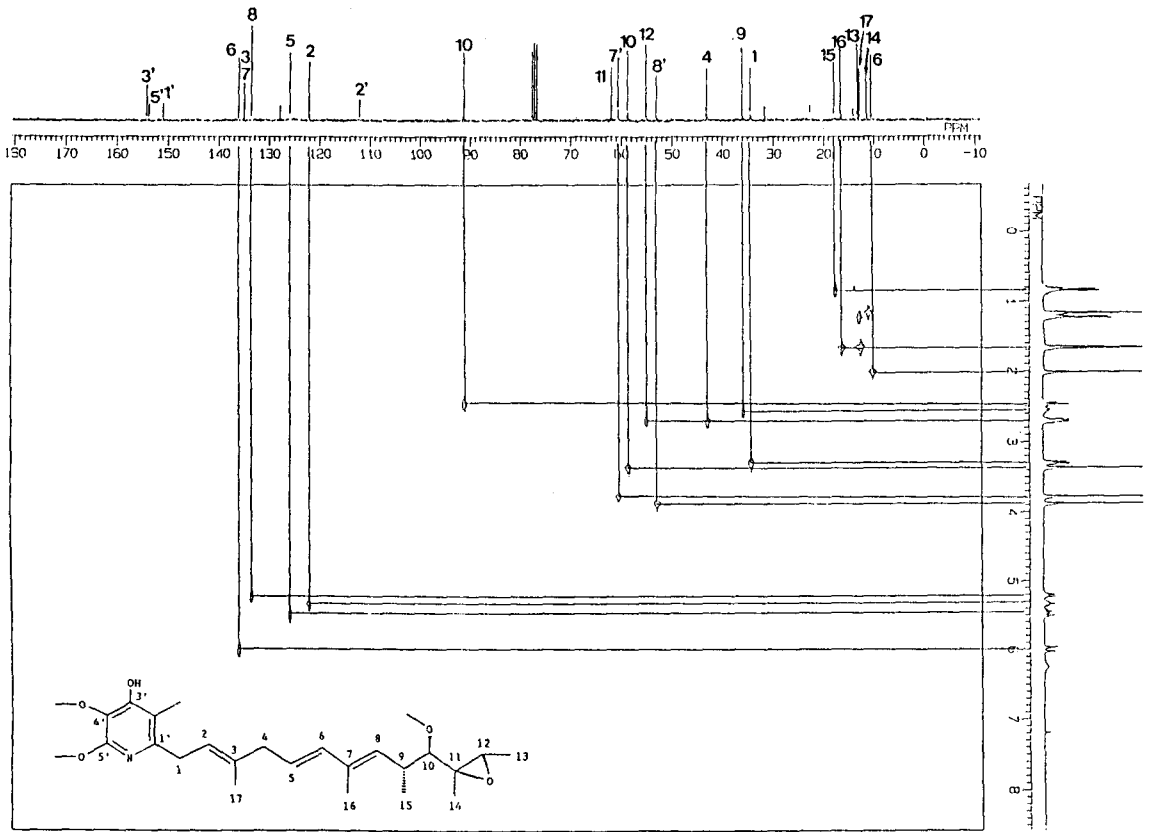
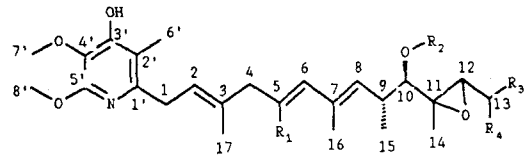


Fig. 3. Carbon-proton 2D NMR spectra of comp. I (Piericidin D₁) from *streptomyces* no. 46 strain.

Compound I은 UV 흡수 pattern이 235 nm에서 강한 흡수를 보이고 있어서 5번탄소의 CH₃가 없는 계열의 물질로 생각되며, ¹H-NMR data에서 0.9~1.1 ppm에서의 isopropyl group이 보이지 않는 것으로 볼 때 A₁, B₁, C₁ 또는 D₁ type의 골격을 갖고 있는 것으로 보인다. 그중, OCH₃의 존재(¹H-NMR: 3.53 ppm, ¹³C-NMR: 58.6 ppm)가 인정되므로 A₁이나 C₁은 아니며, C₁₁-C₁₂ 사이의 epoxy group이 있는 것(¹H-NMR: 2.86 ppm, ¹³C-NMR: 55.0 및 61.9 ppm)으로 보아 본 화합물을 Piericidin D₁으로 동정하였다. 그러나, Yoshida 등이 발표한 문헌²²⁾에 따르면, ¹H-NMR data 해석에서 12-H(q, 2.40 ppm), 4-H₂(d, 2.47 ppm), 9-H(m, 2.50 ppm) 및 10-H(d, 2.72 ppm)으로 정하였는데, 본 연구자의 ¹³C-¹H COSY 분석결과를 보면, C₄(43.1 ppm)와 C₁₂(55.0 ppm)의 proton signal이 2.86 ppm에서 겹쳐서 나타나고, C₉(36.0 ppm)의 proton은 2.69 ppm에서 multiplet으로, C₁₀(91.1 ppm)의 proton은 2.62 ppm에서 상관관계를 보여주고 있다(Fig. 3). 따라서 본 화합물 Piericidin D₁의 ¹H-NMR data해석은 10-H(d, 2.62



- PIERICIDIN C1 : R1- R2- R3- R4- H
- C2 : R1- CH3, R2- R3- R4- H
- C3 : R1- R2- H, R3- R4- CH3
- D1 : R1- R3- R4- H, R2- CH3

Fig. 4. Structures of insecticidal compounds from *Streptomyces* no. 46 strain.

ppm), 9-H(dd, 2.69 ppm), 4-H₂+12H(d+q, 2.86 ppm)으로 수정되어야 할 것이다.

Compound II의 경우, compound I과 UV pattern이 유사하고 isopropyl group(0.95, 1.06 및 1.56 ppm)이 있으므로 Piericidin C₃으로 동정하였다. Compound III은, UV pattern이 5번탄소 위치에 methyl group이 존재하는

것과, $^1\text{H-NMR}$ 에서 5-H가 없어지고 4-H₂가 2.67 ppm에서 singlet으로 나타나며 isopropyl group이 없으므로 Piericidin C₂로 동정하였다. Compound IV는, UV pattern이 compound I과 유사하고 5.50 ppm의 5-H, 2.76 ppm의 4-H₂ 및 1.30 ppm의 13-H 등의 signal로서 Piericidin C₁으로 동정하였다(Fig. 4).

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구 개발사업으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. S. Tamur, N. Takahashi, S. Miyamoto, S. Suzuki and J. Nakatsu: *Agric. Biol. Chem.*, 27 : 576(1993)
2. H. Oishi, T. Hosokawa, T. Okatomi, K. Suzuki and K. Ando: *Agric. Biol. Chem.*, 33 : 1790(1969)
3. U. Dahn, H. Hagenmaier, H. Hohne, W. A. Konig, G. Wolf and A. Zahner: *Arch. Mikrobiol.*, 107 : 143 (1976)
4. R. Baute, D. G. Deffieax, M. A. Merlet and A. Neveu: *J. Antibiot.*, 34 : 1261(1981)
5. L. Huang, G. Albers-Schönberg, R. L. Monaghan, K. Jakbas, S. S. Pong, O. D. Hengens, R. W. Berg, D. A. Ostilind, J. Conroy and E. O. Stapley: *J. Antibiot.* 37 : 970(1984)
6. S. Matsumoto, S. Sakuda, A. Isogai and A. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, 48 : 827(1984)
7. A. Isigal, S. Sakuda, S. Matsumoto, M. Ogura, K. Furihara, H. Seto and A. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, 48 : 1979(1984)
8. M. A. Goetz, P. A. McCormick, R. L. Monaghan and D. A. Ostilind: *J. Antibiot.*, 38 : 161(1985)
9. S. Sakuda, A. Isogai, S. Matsumoto and A. Suzuki: *J. Antibiot.*, 40 : 296(1987)
10. Y. Kato, N. Fusetani, S. Matsunaga, K. Hashimoto, S. Fujita and T. Furuya: *J. Am. Chem. Soc.*, 108 : 2780(1986)
11. S. Murao, H. Hayashi, K. Takiuchi and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, 52 : 885(1988)
12. E. Taniguchi, K. Emamura, F. Ishibashi, T. Matsui and A. Nishio: *Agric. Biol. Chem.*, 53 : 631(1989)
13. K. Watanabe, K. Umeda and M. Miyakado: *Agric. Biol. Chem.*, 53 : 2513(1989)
14. K. Kawazu, J. P. Alcantara and A. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, 53 : 2719(1989)
15. Y. Sanemitsu, Y. Nakayama, T. Yano and Y. Tanabe: *Agric. Biol. Chem.*, 53 : 2843(1989)
16. K. Ando, H. Oishi, S. Hirano, T. Okutomi, K. Suzuki, H. Okazaki, M. Sawada and T. Sagawa: *J. Antibiot.*, 14 : 347(1971)
17. R. W. Burg, B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birubaum, S. A. Currie, R. Hartman, U. L. Kong, R. L. Managhan, G. Olson, I. Putter, J. B. Tunac, H. Wallick, E. O. Stapley, R. Oiwa and S. Omura: *Antimicrob. Agents Chemother.* 15 : 361(1979)
18. Y. Takiguchi, H. Mishima, M. Okuda and M. Terao: *J. Antibiot.*, 33 : 1120(1980)
19. B. Fabre, E. Armau, G. Etienne, F. Legendre and G. Tiraby: *J. Antibiot.*, 41 : 212(1988)
20. 김정일 등: 과학기술처보고서 BSG 70590-536-4 (1993)
21. S. Yoshida, K. Yoneyama, S. Shiraishi, A. Watanabe and N. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, 41 : 849 (1977)
22. S. Yoshida, K. Yoneyama, S. Shiraishi, A. Watanabe and N. Takahashi: *Agric. Biol. Chem.*, 41 : 855 (1977)

Identification of insecticidal compounds from *Streptomyces* sp. no. 46

Sei-Ryang Oh*, Hyeong-Kyu Lee, Bon-Tak Koo, Soo-Keun Choi, Sang-Gu Park, Byung-Sik Shin, Seung-Hwan Park, Jeong-Il Kim (Applied Microbiology Research Group, Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, Taejeon, Korea)

Abstract : In searching for new insecticidal compounds from soil microorganisms, strains of *streptomyces* species showed insecticidal activities on *Musca domestica* and *Bombyx mori* were selected. Compounds I-IV, which were isolated from the metabolites of no. 46 strain, were identified as piericidin C₁, C₂, C₃ and D₁, respectively by UV and NMR data analyses.