

KB암세포에 효과있는 *Streptomyces plicatosporus*가 생산하는 항암증강물질 Rubiginone B₂에 관한 연구

하상철* · 홍순덕¹ · Seto Haruo²

한국과학기술연구원 유전공학연구소, ¹경북대학교 자연과학대학 미생물학과,

²동경대학 분자세포생물연구소 생리활성물질연구부

Rubiginone B₂, Isotetracenone Antibiotics which Reverses Multidrug-Resistance in KB Tumor Cells

Ha, Sang-Chul*, Soon-Duck Hong¹ and Haruo Seto²

Genetic Engineering Research Institute, KIST P.O. Box 115, Taedok Science Town,
Taejon, 305-606, Korea

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

²Institute of Molecular and Cellular Biosciences The University of Tokyo,
Yayoi, Bunkyo-Ku, Tokyo 113, Japan

Abstract — Antibiotic HS-2 was purified from the culture broth of *Streptomyces plicatosporus* which was isolated from soil, by solvent extraction, silica gel column chromatography and gel filtration. Through the analysis of UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectrum, HS-2 was identified as rubiginone B₂. It was confirmed that HS-2 enhanced the cytotoxicity of colchicine against multidrug-resistant tumor cells.

암치료의 화학요법은, 30여년 동안, 새로운 항암제를 찾아내는 것에서 발전해 왔다. 항암제의 병용요법이 확립된과 같이, Williams 종양과 백혈병 등의 소아암, 부인의 섬모암 등에 대한 유효한 치료법이 발견되었고, 치유되는 암이 되었다. 급성림파성 백혈병, Hodgkin's 병, Burkitt's lymphoma 종 등의 경우 상당한 빈도로 환자는 사회생활에 복귀할 수 있다.

화학요법에 기대가 모아지는 한편, 현실적으로는 화학요법제에 거의 반응하지 않는 폐암, 대장암 등의 고형암이 있다는 것도 사실이다. 그리고 반응하는 암에 있어서도 멀지 않아 항암제가 듣지 않는 내성화도 현실적인 문제가 되고 있다. 이와 같은 화학요법의 현실에 대해서 새로운 항암제, 특히 고형암에 유효한 약제를 개발하는 노력이 필요하다. 동시에 최근의 암 연구와 더불어 새로운 치료법의 탐색도 시작되고 있다. 예를 들어 C-kinase와 Phosphatidylinositol 경로에 화학요법의 target를 추구하는 방법, 암 유전자, receptor를 target로 하는 법, topoisome-

rase, DNA 수복계에 새로운 target를 구하는 연구 등이 있다. 이와 같은 이론적인 화학요법의 접근법 중에 특히 최근 주목을 받고 있는 것은 항암제 내성에 관한 것이다(1). 그 배경은 일부의 항암제 내성 기구가 분자 level에서 해명되고 그 기구를 target로 한 화학요법은 성립가능성이 있다.

본 연구는 colchicine 내성 KB 세포주(KB-C2)(2)를 이용한 다제내성(3)을 극복할 수 있는 물질을 생산하는 새로운 방선균을 분리하고, 분리된 균주가 생산하는 다제내성 극복물질을 분리, 정제하여 구조를 밝혔으며 colchicine 내성 KB 세포주에 대한 항암증강활성을 조사하였다.

재료 및 방법

생산균주

일본국 오키나와현 하도마섬에서 분리한 방선균 2238-SVT4 균주(4)의 미생물학적 특성을 조사하기 위하여 형태학적 특성, 배양학적 특성 및 탄소 이용성 등을 조사하였다. 조사방법은 International Streptomyces Project(ISP) 방법에 준하였다.

Key words: KB-C2, multidrug-resistance, rubiginone B₂, *Streptomyces plicatosporus*

*Corresponding author

항생물질의 발효생산

전배양배지(soluble starch 1%, polypeptone 1%, molasses 1%, meat extract 1%, pH 7.2) 15 ml를 50 ml 대형 시험관에 분주, 살균 후 방선균 2238-SVT4 균주를 접종하여 27°C 에서 72시간 진탕배양하고 이를 생산용 배지(soluble starch 2.5%, soybean meal 1.5%, dry yeast 0.2%, CaCO₃ 0.4%, pH 6.2) 100 ml가 든 500 ml 삼각플라스크에 전배양한 배지를 2% 접종 후 27°C 에서 3일간 배양하였다. 더욱이 대량배양을 위하여 생산용 배지 30 l를 50 l jar fermentor에 살균 후 전배양액 600 ml를 첨가하였다. 배양은 27°C, 통기량 30 l/분, 교반회전수 400 rpm으로 3일간 배양하였다.

항생물질의 분리정제

배양액을 sharpless 연속원심분리기로 원심분리한 뒤, 균체를 모아서 10 l의 acetone으로 추출한 다음 농축하여 acetone을 제거한 뒤 농축액을 2 l ethyl acetate로 두번 추출하였다. 유기층을 농축건조 후 silica gel column chromatography에서 chloroform : methanol(100 : 1)로 용매전개하여 활성분획을 용출시키고 활성분획을 prep. TLC(0.5 mm)로 chloroform : methanol(200 : 1)로 전개시킨 후 Rf 치가 높은 부분을 다시 prep. TLC를 이용해서 hexane : chloroform : triethylamine(6 : 3 : 1)로 전개시켜서 HS-2를 (120 mg) 얻었다.

사용기기

구조분석을 위한 NMR 분석은 Jeol GX-500을 이용하여 측정하였으며 이때 표준물질로는 TMS(tetra-methylsilane)를 사용하였으며 용매로는 CDCl₃를 이용하여 측정하였다. UV spectrum은 Milton Roy 3000 array spectrophotometer로 측정하였으며 EI-MS는 HP 5989A spectrometer를 사용하였다.

항암증강활성과 세포독성측정법

HS2를 배지(Eagle's MEM 배지) 중에 공존시, KB, KB-C2 세포를 이용하여 각종 항암제의 IC₅₀치가 HS-2에 의해 어떻게 변하는 가를 조사하였다. 그래서 증강도(비공존하의 IC₅₀치/공존하의 IC₅₀치)에 의해 각 항암제의 효과가 어떻게 증강되는 가를 검정하였다. 그리고 세포독성은 KB 세포와 KB-C2 세포를 corning plastic dish에의 MEM 배지에 10% fetal calf serum을 첨가시켜서 계대배양하여 IC₅₀치를 측정하였다. 1×10⁵ cells/ml 24시간 배양한 뒤에 약제를 처리하여 각각 72시간 후에 coulter counter로 세포수를

측정하였다.

결과 및 고찰

항생물질의 분리 정제

Streptomyces plicatosporus 균주를 60 l 배양하여 원심분리 후 균체를 acetone으로 추출 농축한 다음 다시 ethyl acetate로 용매추출한 뒤 silicagel column chromatography를 행하고 활성분획을 prep. TLC로 chloroform : methanol=200 : 1의 조건으로 전개시킨 후 Rf 치가 높은 부분을 다시 prep. TLC를 이용해서 hexane : chloroform : triethylamine(6 : 3 : 1)로 전개시킨 후 최종적으로 HS-2(120 mg)를 얻었다 (Fig. 1).

이화학적 성질

항생물질 HS-2의 이화학적 성질은 Table 1과 같다. HS-2는 노란색 계통의 결정이며 MeOH, acetone, ethyl acetate에서는 쉽게 녹고 물에는 녹지 않는 지용성 물질이다. EI-MS로 측정된 결과(Fig. 2) 320에서 (M⁺)peak가 관찰되어 본 물질의 분자량은 320으로 확인되었으며 NMR에 의한 구조 분석결과 분자식은 C₂₀H₁₀O₄로 결정되었다. HS-2의 UV 흡수 spectrum은 Fig. 3과 같다. HS-2의 ethanol에서의 최대 흡수파장은 264 nm와 375 nm이었다. HS-2의 흡수 spectrum은

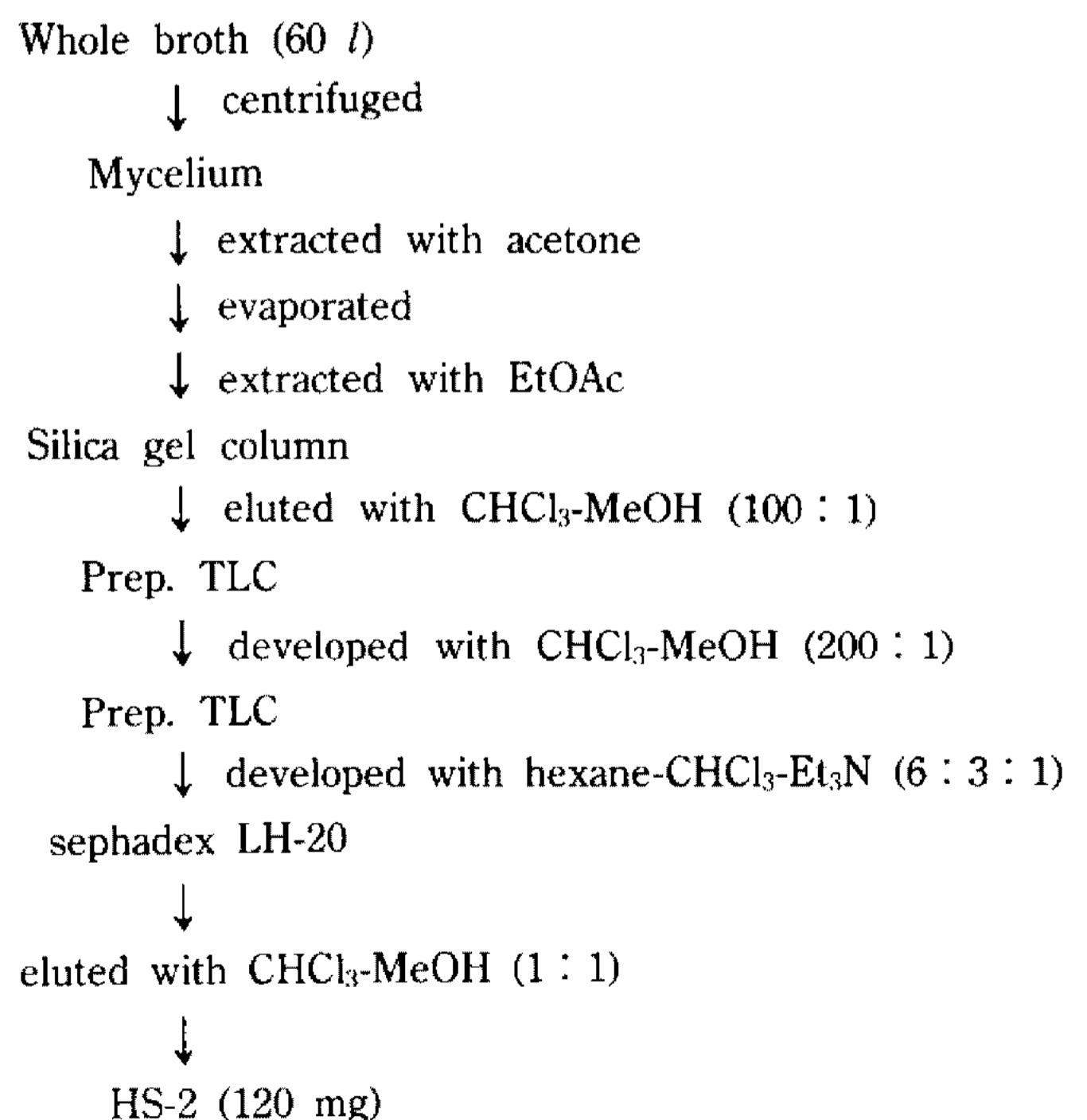


Fig. 1. Purification procedure of antibiotic HS-2 from *Streptomyces plicatosporus*.

isotetracenone계 항생물질의 UV 흡수 spectrum과 매우 유사하였다(6-8).

구조동정

본 항생물질 HS-2의 ¹H-NMR spectrum은 Fig. 4와 같다. ¹H-NMR 관측은 ABX[7.5 ppm(dd), 7.7 ppm(dd), 7.8 ppm(dd)]와 AB[7.5 ppm(dd)와 8.0 ppm(dd)]계를 가진 5개의 방향족 proton과 한개의 OCH₃ 기(3.95 ppm)에서 8-methoxy isotetracenone 핵을 가지고 있다는 것을 시사한다. 그리고 1개의 methine [2.36 ppm(m)]과 두조의 non-equivalent methylene 기[2.51 ppm(dd), 2.85 ppm(dd), 2.72 ppm(dd)와 3.04 ppm(dd)]가 관측된다. 그리고 Table 2에 HS-2의 ¹³C-NMR의 귀속을 나타내었다. 이상과 같이 이화학적 특성 및 UV, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 들의 기기분석에 의한 구조해석 결과들을 종합하여 볼 때 본 항생물질은 rubiginone B₂로 결정되었다(5). Rubiginone B₂는 benz[a] anthraquinone을 골격으로 하는 기지 isotetracenone계 항생물질로서 *Streptomyces griseo-rubiginous*에 의해 생산되며 사람 대장암 세포주 Moser 세포에 대해서 vincristine에 의한 항암 활성을 증강시켰지만 doxorubicine에 의해서는 항암 활성을

증강시키지 못하였다.

항암증강활성

HS-2는 Table 3에 나타낸 바와 같이 1.5 µg/ml의 colchicine 내성 KB 세포의 성장을 저해하였다. 그리고 50 µg/ml 이하 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다. HS-2는 사람 상피암 KB 세포의 다제내성을

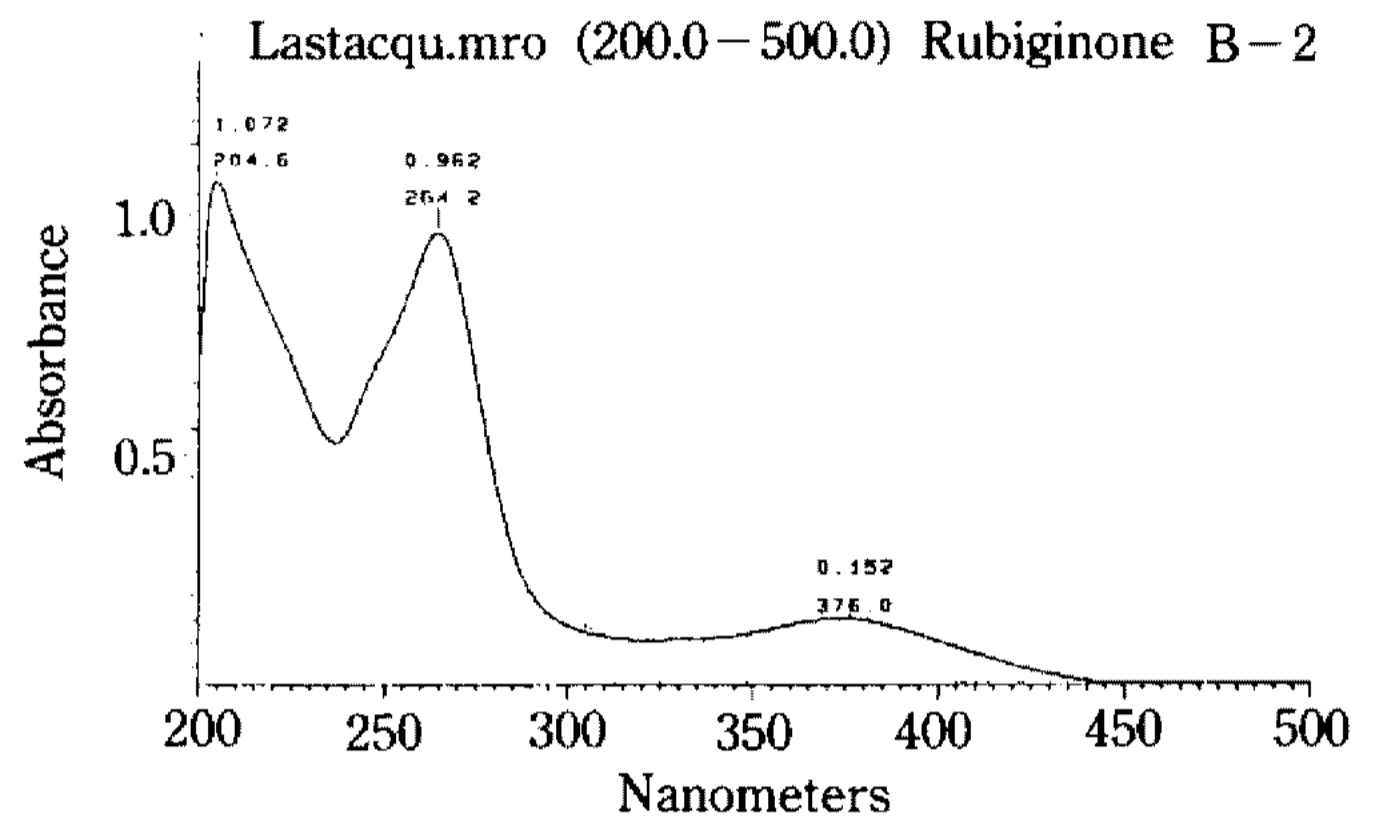


Fig. 3. UV absorption spectrum of HS-2.

Table 1. Physico-chemical properties of antibiotic HS-2

Nature	Yellow needles
MP(°C)	>236(dec)
[α] _D ²⁵ (c 0.5, CHCl ₃)	+78°
Molecular formula	C ₂₀ H ₁₆ O ₄
EI-MS(m/z)	320(M ⁺)
UV λ ^{EtOH} _{max} nm(ε)	264(27,000), 375(5,600)
IR(KBr) ν cm ⁻¹ (OH)	
(=O)	1705, 1697, 1673
TLC, SiO ₂ ^b (Rf)	0.47

^bCHCl₃-MeOH (100 : 1)

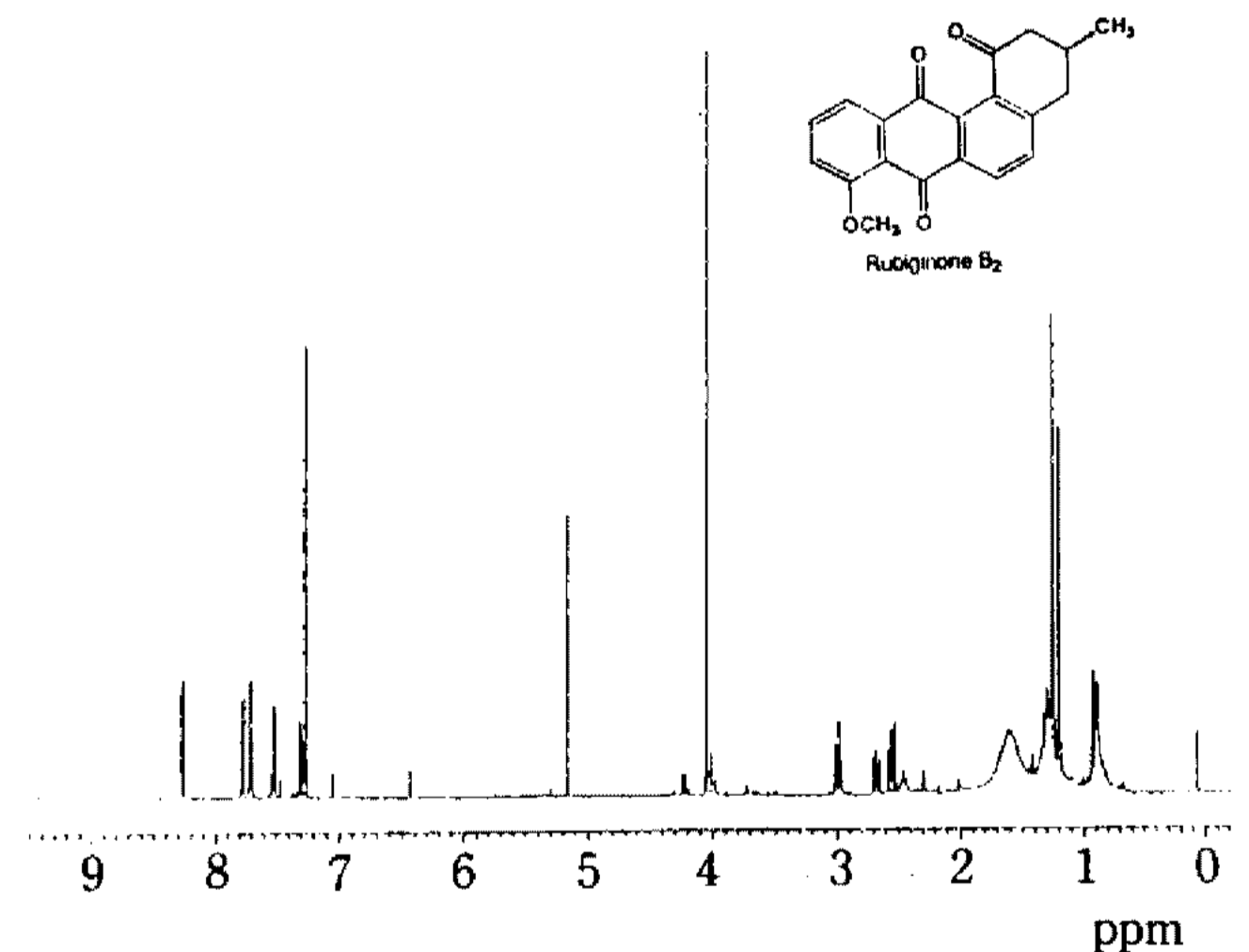


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of HS-2 from *Streptomyces plicatosporus* (500 MHz, CDCl₃).

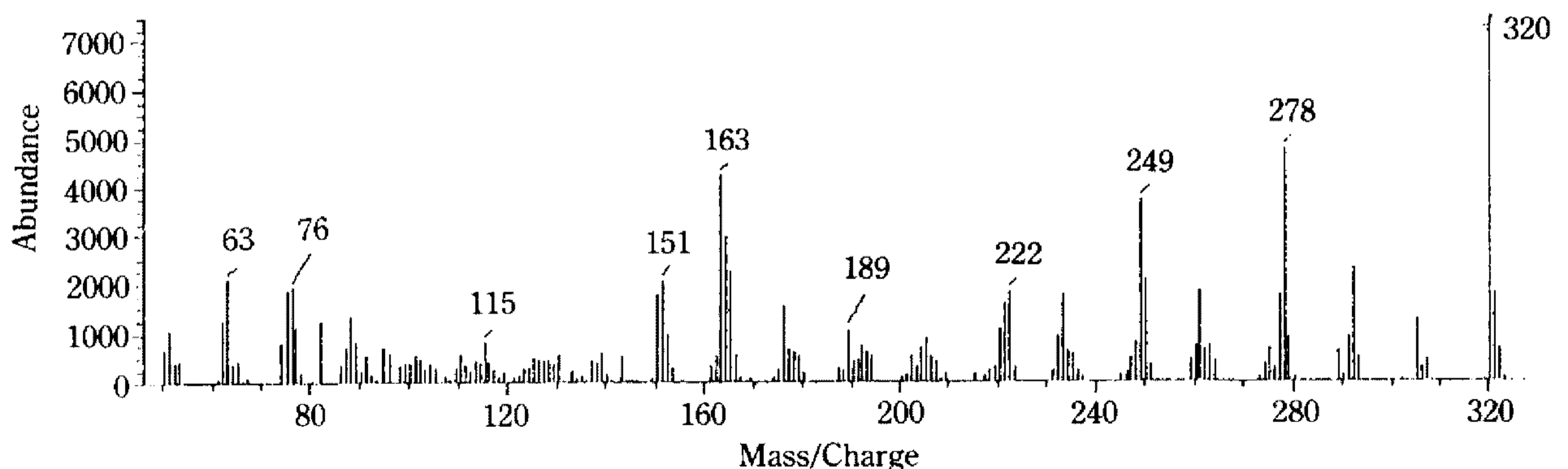


Fig. 2. EI-MS spectrum of HS-2.

Table 2. ^{13}C -NMR spectral data for HS-2

No	ppm
	HS-2
C1	198.0
C2	46.9
C3	30.3
3-CH ₃	21.0
C4	46.9
C4a	149.5
C5	133.6
C6	128.9

Chemical shifts in ppm from internal TMS.

Table 3. Effect of HS-2 on multidrug-resistant tumor cells

	IC ₅₀ (μg/ml)	
	Colchicine (1.5 μg/ml)	Colchicine (-)
HS-2	12	>50
control	4.5	

Cell line: KB(CH)^R, Colchicine-resistant KB cells; Eagle's MEM+0.1% Bacto-peptone+10% FCS; 1×10⁵ cells/ml, 37°C, 24 hours

극복하는 것으로 나타났다. 그리고 rubiginone B₂는 사람 대장암 세포주 Moser 세포에 있어서 vincristine의 항암활성을 증강시켰으나 doxorubicine에 의해서는 항암활성을 증강시키지 못하였다. 이후, 다른 항암제를 사용하여 rubiginone B₂의 다양한 작용기작에 대한 지속적인 연구가 기대된다.

요 약

최근 문제가 되고 있는 항암내성에 대해 내성을 극복하는 물질을 탐색하던 중 사람 상피암 세포주인 KB-C2에 내성을 극복하는 균주를 분리하고 그 균주가 생산하는 항생물질을 분리, 정제한 후 구조를 결정하였고 정제된 물질에 대한 항암증강활성을 조사하였다. 분리된 균주 2238-SVT4 균주는 *Streptomyces*

*plicatosporus*라는 새로운 균주로 판명되었다. 또한 균체에서 ethyl acetate extraction, silicagel column chromatography, gel filtration 등을 통하여 항암증강물질을 정제한 후 UV, EI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 기기분석을 한 결과 본 물질은 rubiginone B₂로 결정되었다. Rubiginone B₂는 KB-C2 세포주에서 처음으로 다제내성을 극복하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Tsuruo, T. 1988. Mechanism of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn. J. Cancer Res.* **79**: 285-296.
2. Shen, D., C. Cardareul, J. Hwang, M. Cornwell, N. Richert, S. Ishii, I. Pastan, and M.M. Gottesman. 1986. Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high level resistant to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins. *J. Biol. Chem.* **261**: 7762-7770.
3. Bradley, G., P.F. Jurnaka, and V. Ling. 1988. Mechanism of multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Acta.* **948**: 87-128.
4. 하상철. 1992. 신규 isotetracenone계 항생물질 hatomarubigin에 관한 연구. 동경대학교 박사논문.
5. Oka, M., H. Kamel, Y. Hamagishi, K. Tomita, T. Miyaki, M. Konishi, and T. Oki. 1990. Chemical and biological properties of rubiginone, a complex of new antibiotics with vincristine-cytotoxicity potentiating activity. *J. Antibiot.* **43**: 967-976.
6. Hayakawa, Y., T. Iwakiri, K. Imamura, H. Seto, and N. Otake. 1985. Studies on the isotetracenone antibiotics I. capoamycin, a new antitumor antibiotic. *J. Antibiot.* **38**: 957-959.
7. Hayakawa, Y., T. Iwakiri, K. Imamura, H. Seto, and N. Otake. 1985. Studies on the isotetracenone antibiotics II. kerriamycins A, B and C, new antitumor antibiotics. *J. Antibiot.* **38**: 960-963.
8. Hayakawa, Y., T. Iwakiri, K. Imamura, H. Seto, and N. Otake. 1987. Studies on the isotetracenone antibiotics III. a new isotetracenone antibiotic, grincamycin. *J. Antibiot.* **40**: 1785-1787.

(Received April 15, 1994)