

## *Streptomyces* sp. ZF-100이 생산하는 세포주기 저해제

하상철\* · 홍순덕<sup>1</sup> · Hiroyuki Osada<sup>2</sup>

한국과학기술연구원 유전공학연구소 <sup>1</sup>경북대학교 자연과학대학 미생물학과

<sup>2</sup>일본 이화학연구소 항생물질연구소

## A Gap Phase-Specific Inhibitor of the Mammalian Cell Cycle from *Streptomyces* sp. ZF10

Ha, Sang-Chul\*, Soon-Duck Hong<sup>1</sup> and Hiroyuki Osada<sup>2</sup>

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

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

<sup>2</sup>Laboratory of Antibiotics, The Institute of Physical and Chemical Research(RIKEN) Wako-shi,  
Saitama 351-01, Japan

**Abstract** — Genistein, a inhibitor of the progression of G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> phases of the mammalian cell cycle, was discovered through a unique screening system, in which effects of microbial metabolites on the cycle progression of the cultured mouse mammalian carcinoma cell were monitored by flow cytometry. The inhibitor was extracted from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. ZF10 with ethyl acetate, and purified by silica gel column chromatography and HPLC.

진핵세포주기는 두개의 중요한 사건 즉 S기에 있어서 DNA복제와 두개의 중간(gap)기인 G<sub>1</sub>과 G<sub>2</sub>에 의해 분리되는 M기에서 유사분열로 나누어진다. 대부분의 항암제는 DNA대사와 분열장치의 저해제들이다. 매우 극소수의 물질이 G<sub>1</sub>과 G<sub>2</sub>기에 특이한 저해제로 알려져 있다. 더우기 최근 광범위한 연구에 의해 많은 proto-oncogene 기능을 포함하는 복잡한 신호전달체계가 이 gap phase에 연관이 되어 있다는 것이 나타났다. 그런 신호전달체계의 많은 step은 oncogene에 의해 활성화되거나 방해된다. 그래서 암세포에서 성장은 조절되지 않는다(1). 그러므로 gap phase에 의해 일어나는 조절능은 선택적인 항암제로서 더욱 더 적절한 target가 될 수 있다고 보여진다. 이와같은 탐색에 의해, protein kinase의 저해제의 일종인 staurosporine도 G<sub>1</sub>과 G<sub>2</sub> phase를 저해한다는 것이 최근 발견되었다(3).

본 연구는 항암제 개발에 관한 연구의 일환으로 세포주기 저해제를 개발하는데 있다. 방선균으로부터 세포주기 저해제를 탐색하는 과정에서 isoflavonoid

계열의 물질을 분리 정제하여 구조를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

Zaire 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. ZF10 균주를 사용하였다.

#### 발효조건

*Streptomyces* sp. ZF10 균주로부터 cell cycle 저해제를 생산하기 위하여 glucose 2%, soluble starch 1%, meat extract 0.1%, dry yeast 0.4%, soybean flour 2.5%, NaCl 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.005%로 구성된 배지를 살균 전에 pH 7.0으로 조정하여 사용하였으며, 이 배지 3l에 3일간 배양한 종균을 2%(v/v)로 접종하여 5l의 발효조에서 통기량 3.3 vvm, 교반속도 200 rpm, 27°C에서 3일간 배양하였다.

#### 사용기기

HPLC는 Waters 991 photodiode array detector와 Delta prep 4000 pump, UV/Vis spectrophotometer는 Hitachi 220A spectrophotometer, <sup>1</sup>H-NMR는 Jeol

**Key words:** Cell cycle inhibitor, genistein, *Streptomyces* sp.

\*Corresponding author

GX-400를 사용하였다.

**Flow cytometry**

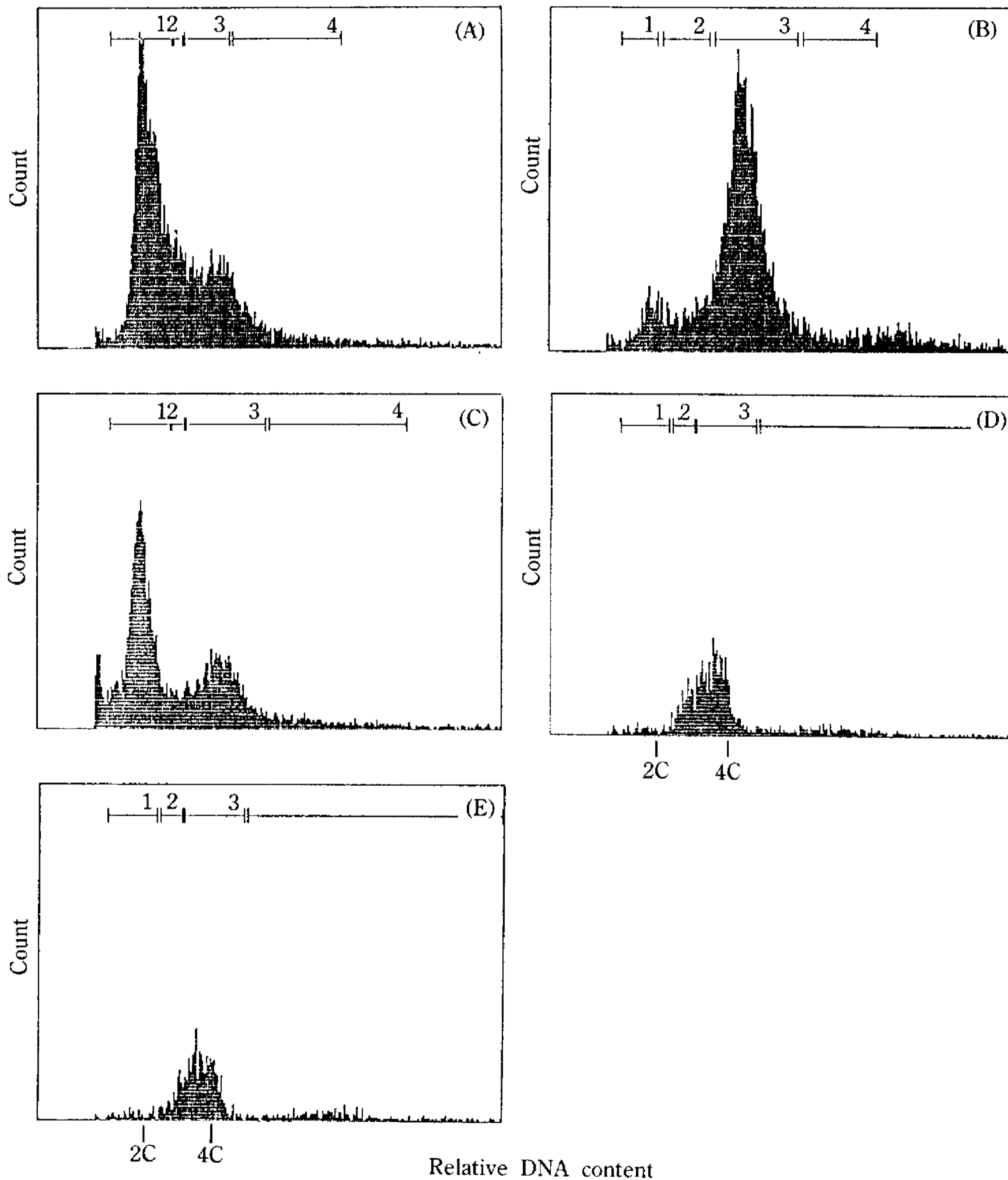
온도 감수성 mouse 유방암세포(ts-FT210)(2, 3)를 5% RPMI 배지에서 32°C 72시간 배양시킨 후 세포( $2.0 \times 10^5$  cells/ml)를 39°C 에서 17시간 배양하면 G<sub>2</sub> arrest가 일어난다. 그 상태에서 방선균 배양액을 처리한 다음 32°C 로 옮겨 4시간 배양 후 cell을 원심분리해서 상등액을 버리고 PBS로 두번 세척 후 50 µg/ml의

propidium iodine 1 ml로 염색 후 4°C 에서 30분간 incubation 후 flow cytometer(Epics C, Coulter)로 DNA 함량을 측정하였다.

**결 과**

**균주선발**

우리는 G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>기에 cell cycle progression의 저해제의 활성을 검색하는 즉 동조배양한 온도감수성



**Fig. 1. Analytical patterns on mammalian cell cycle.** DNA distribution pattern of cells cultured at 32°C (A), cultured at 39°C (B), temperature-shifted from 39°C to 32°C (C), cultured in staurosporine (D), and cells in the extract of strain ZF10 cultured broth (E).

Culture broth(3.5 l)  
 ↓ centrifuge at 10,000 rpm at 15 min  
 Mycelium  
 ↓ extracted with acetone  
 Evaporate  
 ↓ extracted with EtOAc  
 EtOAc extract(2.75 g)  
 ↓  
 Silica gel column chromatography  
 ↓ eluted with chloroform : methanol(20 : 1)  
 Prep. TLC  
 ↓ developed with chloroform : methanol(40 : 1)  
 HPLC(HS-3, 10 mg)

Fig. 2. Purification procedures of the active compound HS-3 from *Streptomyces* sp. ZF-10.

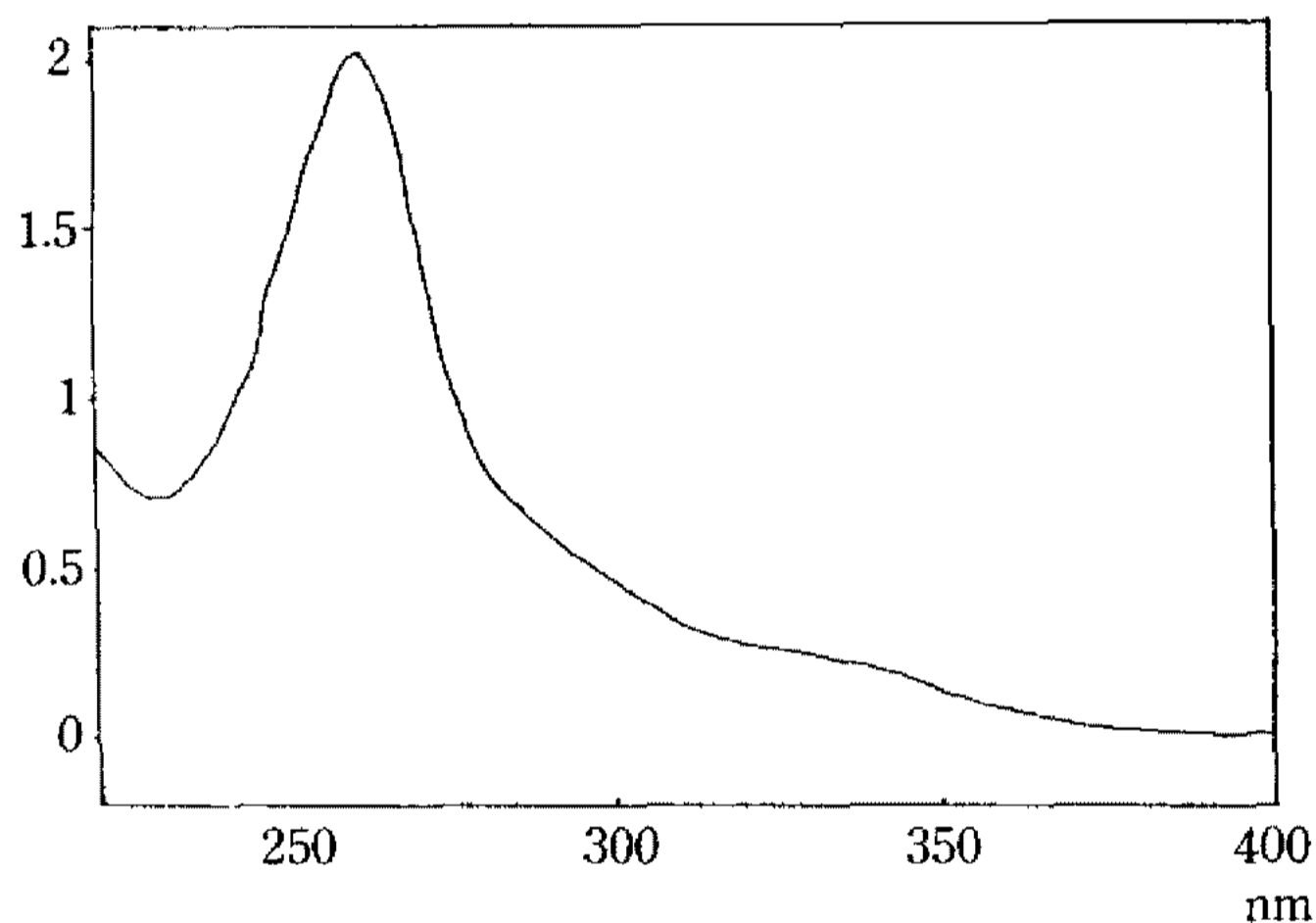


Fig. 3. UV spectrum of the active compound HS-3 in MeOH.

mouse 유방암세포(ts-FT210)로 미생물 대사산물의 효과가 flow cytometry에 의해 감지되는 탐색계를 고안하였다. Fig. 1에 전형적인 flow cytometry의 분석 양상을 나타내었다. A는 32°C 에서 17시간 배양한 세포의 양상이고 B는 39°C 에서 17시간 배양한 세포의 양상이고 C는 39°C 에서 17시간 배양 후 32°C 로 온도변환시킨 후 4시간 배양한 세포의 양상이며 D는 Staurosporin 처리 후의 양상이다. 이와같은 screening 방법으로 Zaire 토양에서 분리한 방선균 *Streptomyces* sp. ZF-10(E)를 선별하였다.

**활성물질의 분리정제**

*Streptomyces* sp. ZF10을 6 l 배양하여 원심분리 후 균체를 acetone으로 추출농축한 다음 다시 ethyl acetate로 용매추출하여 2.75 g의 조시료를 얻었다. Silica

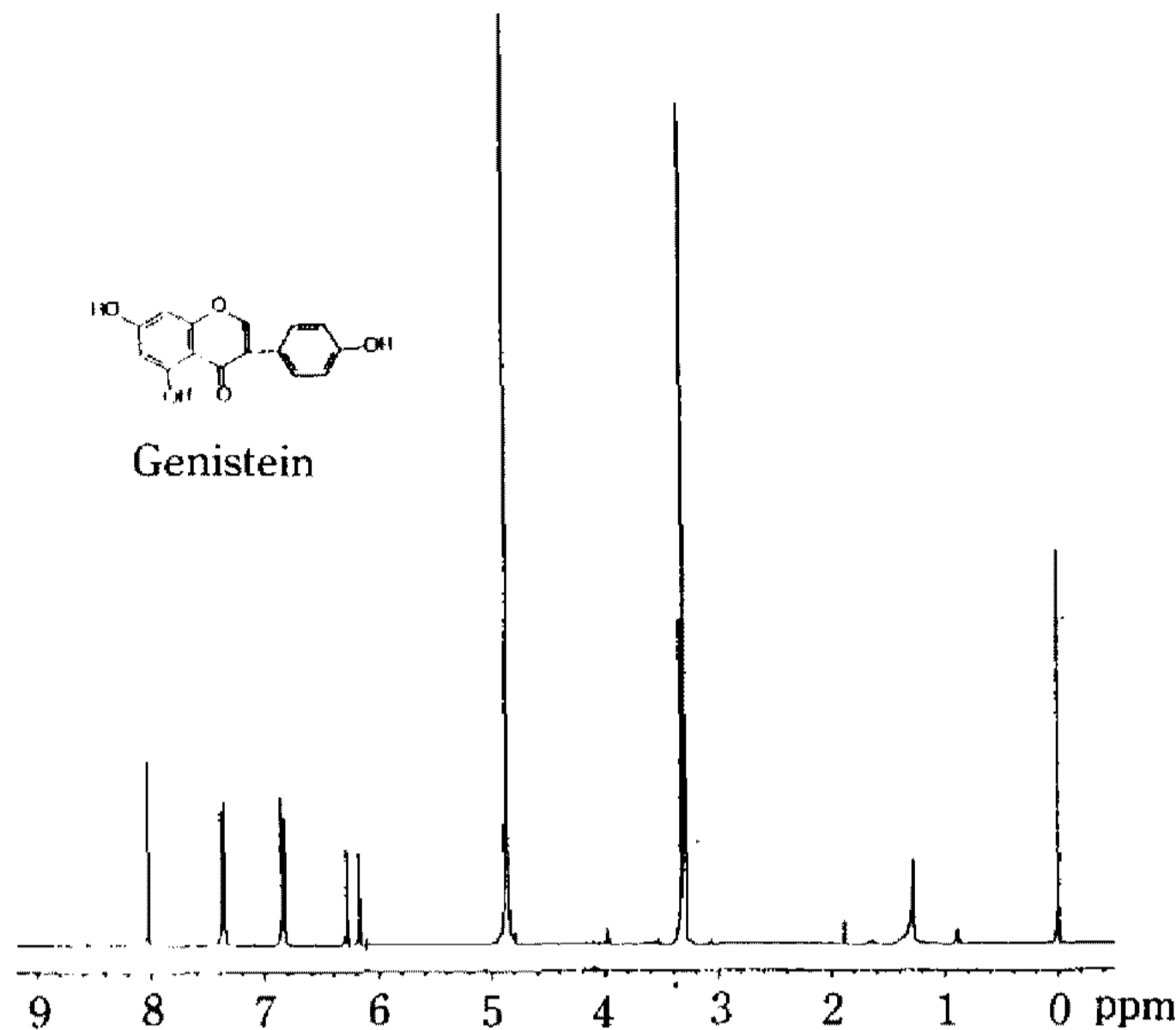
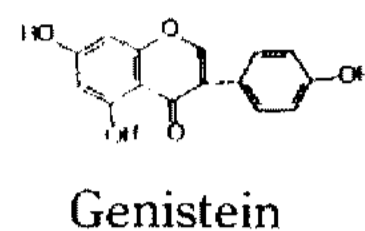


Fig. 4. <sup>1</sup>H NMR spectrum and structure of HS-3.

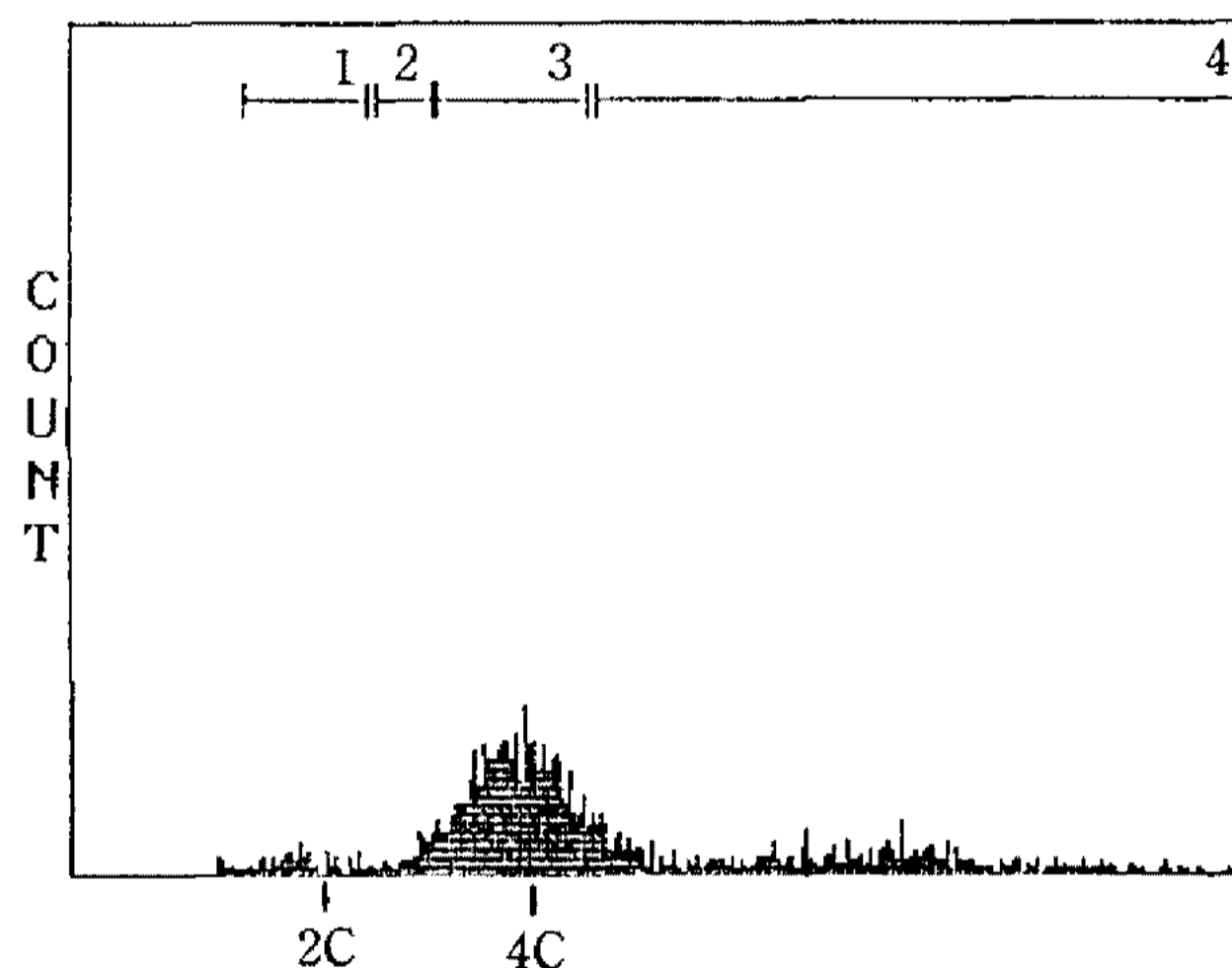


Fig. 5. Effect of the active compound HS-3 on mammalian cell cycle.

gel column chromatography를 통해 0.32 g을 얻었으며 preparative TLC를 행한 뒤 최종적으로는 HPLC에 의해서 HS-3를 순수분리하였다(Fig. 2).

**UV 흡수 spectrum**

분리정제된 물질의 UV 흡수 spectrum은 Fig. 3과 같다. MeOH에서 최대파장이 261 nm이었다. 이 결과는 전형적인 isoflavonoid계의(4) UV 흡수 peak와 일치하였다.

**<sup>1</sup>H-NMR spectrum**

활성물질 HS-3의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 Fig. 4와 같다. 86.17(d, 1H, J=2 Hz)와 6.28(d, 1H, J=2 Hz),

6.84(d, 2H, J=10 Hz), 7.36(d, 2H, J=10 Hz), 8.01(S, 1H)의 peak는 genistein의  $^1\text{H-NMR}$  peak와 같았다. Isoflavone 계열의 genistein으로 결정되었다. UV spectrum과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum의 해석 결과 HS-3는 genistein으로 판명되었으며 그 구조는 Fig. 4와 같다.

### 생물활성

활성물질 HS-3이 세포주기에 미치는 영향을 Fig. 5에 나타내었는데 이 물질은 mouse 유방암 세포의  $G_2$ 기를 arrest 하는 것으로 보인다.

## 고찰

Genistein은 우리의 독특한 탐색계를 통한  $G_1$ 과  $G_2$ 기에서 세포주기 저해제로서 발견되었다. 이 system은 mouse 유방암 세포 주기의 progression에서 미생물 대사 산물이 flow cytometry에 의해 모니터되는 system이다. 현재, 세포 주기 저해제로 알려져 있는 것은 leptolstatin(5), trichostatin A(6), leptomycin B(7), staurosporine(8) 등이 있다. 그들 모두 3Y1 fibroblast 세포에 있어서  $G_1$ ,  $G_2$ 기를 차단하는 것으로 알려져 있다. Genistein이 cell cycle 저해제로 알려진 것은 이 논문이 처음이다. 최근 trichostatin A의 target 분자는 핵내 histone deacetylase로 결정되었으며 staurosporine은 이미 proteine kinase 저해제로 알려졌다. 반면 leptomycin의 작용기작은 아직 알려지지 않았다. 최근 연구에 의하면 정상 fibroblast 세포에서 leptomycin B의 효과는 정적이지만 DNA virus의 transform 된 세포에서는 매우 독성이 강하였다. 그리고 세포 주기 저해제의 하나인 radicicol이 일본에서 phase 1에 들어갔다. 그러므로 세포주기 저해제는 새로운 항암제 개발의 가능성을 시사한다.

## 요약

Genistein은 우리의 독특한 탐색계를 통한  $G_1$ 과  $G_2$ 기에서 세포주기 저해제로서 발견되었다. 이 system은 mouse 유방암 세포 주기의 progression에서 미생물

대사산물이 flow cytometry에 의해 모니터되는 system이다. Zaire 토양에서 분리한 *Streptomyces* ZF-10으로부터  $G_1$ ,  $G_2$ 기의 특이적인 세포주기 저해제인 항생물질 HS-3를 용매추출, silica gel column chromatography, HPLC를 통하여 분리정제하였다. 그래서 UV,  $^1\text{H-NMR}$  spectrum 분석을 통해 HS-3는 genistein으로 동정되었다.

## 참고문헌

1. Pardee, A.B. 1989.  $G_1$  events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**: 603-608.
2. Hamaguchi, J.R., R.A. Tobey, J. Pines, H.A. Crissman, T. Hunter, and E.M. Bradbury. 1992. Requirement for p34<sup>cdc2</sup> kinase is restricted to mitosis in the mammalian cdc2 mutant FT210. *J. Cell. Biol.* **117**: 1041-1053.
3. Mineo, C., Y. Murakami, Y. Ishimi, F. Hanaoka, and M. Yamada. 1986. Isolation and analysis of mammalian temperature-sensitive mutant defective in  $G_2$  functions. *Exp. Cell. Res.* **167**: 53-62.
4. Makham, K.R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Pp. 15-50. Academic Press, New York.
5. Abe, K., M. Yoshida, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1993. Leptolstatin from *Streptomyces* sp. SAM 1595, a new gap phase-specific inhibition of the mammalian cell cycle. I. screening, taxonomy, purification and biological activity. *J. Antibiotics* **46**: 728-734.
6. Yoshida, M. and T. Beppu. 1988. Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both  $G_1$  and  $G_2$  phases by trichostatin A. *Exp. Cell. Res.* **177**: 122-131.
7. Yoshida, M., M. Nishikawa, K. Nishi, K. Abe, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1990. Effects of leptomycin B on cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells. *Exp. Cell. Res.* **187**: 150-156.
8. Abe, K., M. Yoshida, T. Usui, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1991. High synchronous culture of fibroblasts from  $G_2$  block caused by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinase. *Exp. Cell. Res.* **192**: 122-127.

(Received April 15, 1994)