

다제내성 *Staphylococcus aureus*에 항균활성을 나타내는 CNU30122 균주가 생산하는 항생물질

윤봉식 · 조수목 · 김창진 · 유익동*

한국과학기술연구원 생명공학연구소

초록 : 다제내성 *Staphylococcus aureus* 균주에 강력한 항균활성을 나타내는 CNU30122 균주를 선발하였다. 선발된 CNU30122 균주의 배양액 추출물로부터 Diaion HP-20 column chromatography, ethylacetate 추출, silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography, HPLC 등에 의해 백색분말의 순수한 화합물을 분리정제하였다. 본 물질의 구조분석을 위하여 ^1H 및 ^{13}C NMR, DEPT, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C COSY 및 HMBC spectrum을 분석한 결과 본 물질은 분자량 516, 분자식 $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_6$ 의 tetracyclic triterpenoic acid 계열인 fusidic acid로 동정되었다. 본 화합물은 streptomycin, penicillin, kanamycin, tetracycline 등의 약제에 내성균주인 *Staphylococcus aureus* R209 균주에 선택적으로 강한 항균활성을 나타내었다(1995년 9월 22일 접수, 1995년 10월 23일 수리).

서 론

Penicillin을 비롯한 β -lactam계 항생물질은, peptidoglycan 생합성 효소이며 세포신장 및 격막형성에 관여하는 penicillin binding proteins (PBPs)와 공유적으로 결합, 결과적으로 PBPs를 불활성화하여 세포벽 합성을 저해하는 항균활성물질이다.¹⁾ 1950년대에는 이같은 β -lactam계 항생물질이 폭넓게 사용되었으나 곧 β -lactamase 생성균이 출현하게 되어 이들 항생물질에 내성을 나타내게 되었다. 그러나, penicillinase resistant β -lactam 항생물질인 methicillin의 개발로 인하여 β -lactamase에 의하여 유발된 내성균주에 대한 치료가 가능하게 되었으나 또 다시 methicillin에 내성을 나타내는 균주가 출현하게 되었고 이들 균주는 β -lactamase에 의한 내성과는 또 다른 내성기작을 지녔음이 밝혀졌다.²⁻⁶⁾ 이 새로운 내성은 β -lactam 항생물질에 낮은 친화력(low affinity)을 지닌 PBP 2a에 의하여 유발된다. PBP 2a는 β -lactam 항생물질과 친화성이 낮아 이들 항생물질에 의하여 불활성화 되지 않으며 불활성화된 PBP 1-3을 대신하여 지속적으로 세포벽을 합성하는 것으로 생각되어지고 있다.⁷⁾ Methicillin 내성 *Staphylococcus aureus*는 penicillin, streptomycin, kanamycin, tetracycline, chloramphenicol, lincomycin 등의 항생제에 대하여 교차저항성을 나타내므로 임상상에 크나큰 문제로 대두되고 있다.¹⁾

다제내성 *S. aureus*에 대한 선택적인 항생제의 개발을 위하여 streptomycin, penicillin, kanamycin, tetracycline을 비롯한 다양한 항생물질에 저항성을 나타내는 *S. aureus* R209 균주를 이용하여 새로운 항생물질을 screening하던 중 CNU30122 균주의 배양액이 강한 선택적 항균활성을 나타내는 것을 발견하였다. 본 연구는 CNU30122 균주가 생산하는 활성물질을 분리정제하고 다양한 NMR실험에

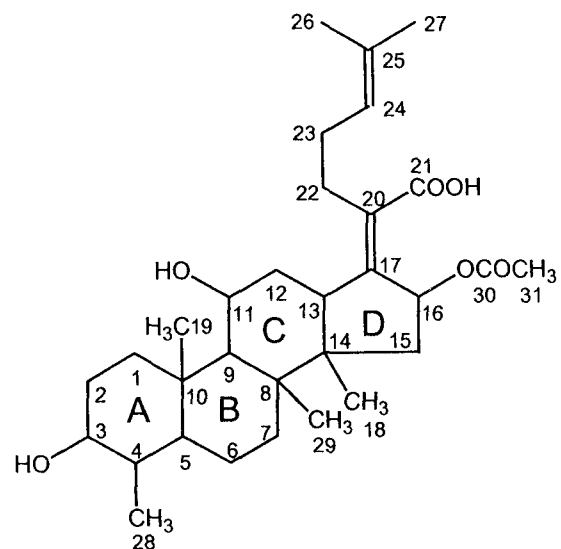


Fig. 1. Structure of compound CNU30122 (fusidic acid).

의하여 그 화학구조(Fig. 1)를 결정하였기에 보고한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양조건

영지버섯 자실체에 부생하는 균을 분리 배양하여 *S. aureus* R209 균주에 대한 항균활성을 조사하던 중 CNU30122 균주의 배양액이 *S. aureus*에만 특이적으로 강한 항균활성을 나타내어 본 실험에 공시하였다 (Table 1). 균주의 보존 및 colony의 형태관찰에는 potato dextrose agar (potato 200 g, dextrose 20 g, agar 20 g, pH 6.0)배지를 사용하였으며, 활성물질의 분리를 위한 배양은 potato dextrose 액체배지 (Difco)를 사용하여 30°C에서 10

찾는말 : multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, strain CNU30122, fusidic acid

*연락처자

Table 1. Antimicrobial spectra of the antibiotic produced by CNU 30122 strain.

Test microorganisms	Inhibition zone diameter (mm)
Gram positive Bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	22
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	16
<i>Mycobacterium phlei</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0
Gram negative Bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
Fungi	
<i>Botrytis cinerea</i>	0
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	0
<i>Fusarium solani</i>	0
<i>Phytophthora parasitica</i>	0

일간 수행하였다.

기기분석

구조분석을 위한 NMR측정은 JEOL GX-400 NMR spectrometer를 사용하였으며 내부표준물질은 tetramethylsilane을, 용매는 $CDCl_3$ 를 사용하였다. SIMS는 Hitachi M-80 mass spectrometer로, UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 UVICON사의 KONTRON UV spectrophotometer로 측정하였다. TLC분석은 Merck사 제품의 silica gel 60 F₂₅₄를 이용하였다.

결과 및 고찰

활성물질의 분리 및 정제

활성물질의 분리정제과정을 Fig. 2에 나타내었다. CNU30122 균주의 배양액 3L를 원심분리한 후, 균사체 부분은 70%아세톤으로 추출하고 아세톤을 감압농축에 의해 제거한 후 상등액과 함께 Diaion HP-20 column chromatography를 실시하였다. 80%아세톤에 용출된 활성분획을 감압농축하여 ethylacetate로 추출하였으며 용매층은 다시 농축하여 silica gel column 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 순차적으로 실시하였다. 최종적으로 HPLC(ODS column 20×250 mm, 75% $CH_3CN + 25\% H_2O$, flow rate 7 ml/min, retention time 23.5 min)에 의하여 백색분말의 활성물질 10 mg을 획득하였다.

활성물질의 물리화학적 특성 및 구조분석

CNU30122 균주가 생산하는 활성물질은 UV 222 nm에서 최대흡수피크를 나타내었으며 *m*-nitrobenzylalcohol을 matrix로 하여 측정된 SIMS의 결과(m/z 539(M+Na)⁺) 및 ¹H, ¹³C NMR spectra의 분석결과에 의하여 분자량은 516, 분자식은 $C_{31}H_{48}O_6$ 으로 추정되었다.

그 이상의 구조해석은 DQF-COSY, ¹H-¹³C COSY 및

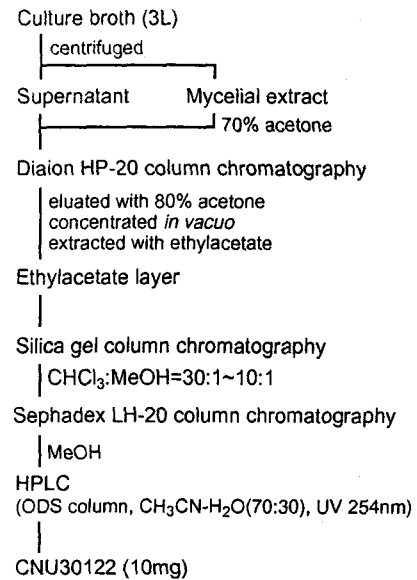


Fig. 2. Isolation procedure of compound CNU30122.

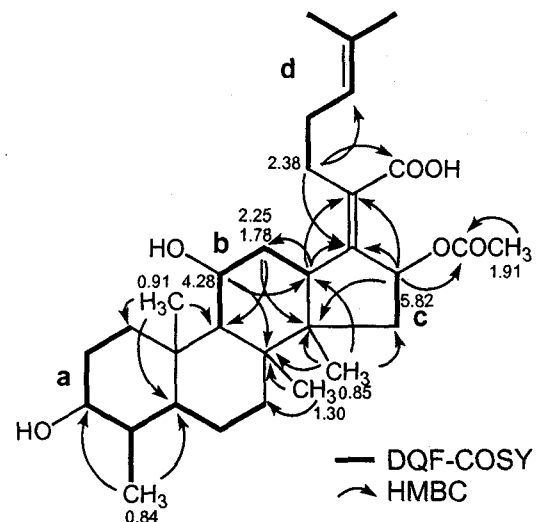


Fig. 3. Structure of compound CNU30122 elucidated by DQF-COSY and HMBC experiments

HMBC를 포함한 2차원 NMR실험에 의하여 수행되었다.⁸⁻¹⁰⁾ DQF-COSY에 의하여 해석된 4개의 부분구조 및 HMBC spectrum분석에 의한 각 부분구조의 연결을 Fig. 3에 나타내었다. 즉 19위의 singlet methyl proton(0.91 ppm)으로부터 1위, 5위 및 9위의 탄소에 원거리 스핀 결합이 관측되어 부분구조 a가 6원환(A ring)을 이루고 있음을 시사하였다. 부분구조 b의 11위의 oxymethine(4.28 ppm)으로부터 8위 및 13위의 탄소에, 12위의 methylene proton(2.25 및 1.78 ppm)으로부터 9위 및 14위의 탄소에 원거리 스핀 결합이 관측되었고, 0.85 ppm의 singlet methyl proton으로부터 8, 14, 15위의 탄소에 원거리 스핀 결합이 관측되어 부분구조 b가 6원환(C ring)을 이루고 있는 것이 입증되었다. 또한, 1.30 ppm의 methyl proton으로부터 부분구조 a의 7위의 methylene 탄소

Table 2. Comparison of ^{13}C NMR chemical shift values(ppm) of CNU30122 and fusidic acid.

Carbon no. CNU30122	Fusidic acid ¹²⁾	Carbon no. CNU30122	Fusidic acid ¹²⁾
1	29.1	17	149.1
2	28.8	18	16.8
3	70.4	19	22.0
4	35.3	20	128.5
5	35.0	21	172.5
6	19.9	22	27.8
7	31.1	23	27.0
8	38.5	24	122.1
9	48.3	25	131.6
10	35.9	26	16.8
11	67.2	27	24.7
12	34.5	28	14.9
13	43.2	29	22.9
14	47.7	30	170.0
15	37.9	31	19.6
16	73.4		74.5

및 8위의 4급탄소에 원거리 스핀 결합이 관측되어 B ring의 존재가 밝혀졌다. 22위의 methylene proton (2.38 ppm)으로부터 17위의 sp^2 4급 탄소 및 21위의 carbonyl 탄소에 각각 원거리 스핀결합이 관측되었고 16위의 methine proton (5.82 ppm)으로부터 17위 및 20위의 sp^2 4급 탄소에 원거리 스핀결합이 관측되어 부분구조 c와 d가 연결되었으며 또한 1.91 ppm의 methyl proton으로부터 170.0 ppm의 carbonyl 탄소에 원거리 스핀결합이 관측되어 16위의 탄소에 acetoxy group이 결합하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 구조를 data base를 이용하여 검색한 결과 CNU30122 균주가 생산하는 항생물질은 tetracyclic triterpenic acid인 fusidic acid와 동일한 화합물임이 입증되었다.¹¹⁻¹³⁾ CNU30122 화합물과 fusidic acid의 ^{13}C chemical shift치의 비교를 Table 2에 나타내었다.

단백질 합성을 억제하는 fusidic acid는 단독으로 혹은 penicillin, tetracycline, rifampicin등과 함께 혼용으로 임상상 이용되고 있으며 특히 폐혈증, 심내막염, 포도상구균 폐염, 급성 및 만성 골수염, 낭포성 섬유증 및 외상등의 치료에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 알려졌다.¹¹⁾

Fusidic acid는 *Fusidium coccineum*, *Cephalosporium lamellaecola*, *Mucor ramannianus*, *Epidermophyton floccosum*, *Calcarisporium antibioticum*, *Keratinomyces longifuscus*, *Isaria kogane* 등 다양한 균주에 의하여 생산되는 것이 보고되어 있다.¹¹⁾ CNU30122 균주는 그 형태적 특징으로부터 불완전균류인 *Fusidium*속과 유사한 것으로 나

타났으나(자료 미제시) 세부적인 분류학적 특성은 조사 중에 있다.

참 고 문 헌

- Lorian, V. (1991) In 'Antibiotics in laboratory medicine', Bryan, L. E. and A. J. Godfrey, 3rd Ed., Chap. 16, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Boyce, J. M. and A. A. Medeiros (1987) Role of β -lactamase in expression of resistance by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **31**, 1426-1428.
- Song, M. D., M. Wachi, M. Doi, F. Ishino and M. Matsuhashi (1987) Evolution of an inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.* **221**, 167-171.
- Ubukata, K., N. Yamashita and M. Konno (1985) Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 851-857.
- Kreiswirth, B., J. Kornblum, R. D. Arbeit, W. Eisner, J. N. Maslow, A. McGeer, D. E. Low and R. P. Novick (1993) Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* **259**, 227-230.
- Matthews, P. and A. Tomasz (1990) Insertional inactivation of the *mec* gene in a transposon mutant of a methicillin-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. agents chemother.* **34**, 1777-1779.
- de Jonge, B. L. M., Y. -S. Chang, D. Gage and A. Tomasz (1992) Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J. Biol. Chem.* **267**, 11248-11254.
- Bax, A., R. Freeman, G. Morris, U. Piantini, O. W. Sorensen and R. R. Ernst (1982) Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6800-6801.
- Bax, A. and S. Subramanian (1986) Sensitivity-enhanced two-dimensional heteronuclear shift correlation NMR spectroscopy. *J. Magn. Resonance* **67**, 565-569.
- Bax, A. and M. F. Summers (1986) ^1H and ^{13}C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093-2094.
- Vandamme, E. J. (1984) In 'Drugs and the pharmaceutical sciences', Daehne, W. V., S. Jahnsen, I. Kirk, R. Larsen and H. Lörck, 1st Ed., Vol. 22, Chap. 14, Pp.427-449. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Riisom, T., H. J. Jakobsen, N. Rastrup-Anderson and H. Lörck (1974) Assignment of the ^{13}C NMR spectra of fusidic acid derivatives. *Tetrahedron Lett.* **26**, 2247-2250.
- Godtfredsen, W. O. and S. Vangedal (1962) The structure of fusidic acid. *Tetrahedron* **18**, 1029-1048.

An Antibiotic against Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* Produced by Strain CNU30122

Bong-Sik Yun, Soo-Muk Cho, Chang-Jin Kim and Ick-Dong Yoo* (*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon 305-600, Korea*)

Abstract : During the screening for the antimicrobial agents against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, we isolated an active compound produced by strain CNU30122. The active compound was purified from culture broth by HP-20 column chromatography, ethylacetate extraction, silica gel column and Sephadex LH-20 column chromatographies and HPLC. Based on various NMR studies including ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C COSY and HMBC experiments, the active compound was identified as fusidic acid.

*Corresponding author