

## 방선균 분리주 No. 2511-5로부터 포스포리파제 C 저해물질 스크오파훈진의 분리

오원근 · 이현선<sup>\*</sup> · 안순철 · 김보연 · 박문수 · 민태익 · 안종석

한국과학기술연구원 생명공학연구소

(Received July 24, 1995)

### Isolation of Scopafungin, a Potent Inhibitor of Phospholipase C from Actinomycetes isolate No. 2511-5

Won Keun Oh, Hyun Sun Lee<sup>\*</sup>, Soon Cheol Ahn, Bo Yeon Kim,  
Moon Su Park, Tae Ick Mheen and Jong Seog Ahn

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,  
KIST, Taejeon 305-600, Korea

**Abstract**—MT 2511-5 was purified as a inhibitor of phospholipase C(PLC) from culture broth of a *Streptomyces* sp. NO. 2511-5. It was identified as scopafungin, 36-membered macrolide by physico-chemical and spectroscopic data. Its IC<sub>50</sub> was 30 μM against phospholipase C and it also showed inhibitory activity against some fungi.

**Keywords** □ Phospholipase C inhibitor, *Streptomyces* sp., 36-membered macrolide, scopafungin.

Phosphoinositide specific phospholipase C (PLC)는 세포의 외부로부터 세포반응을 유도시키는 angiotensin, vasopressin 등의 자극인자나 platelet-derived growth factor(PDGF), epidermal growth factor(EGF) 등의 세포 성장인자에 의하여 활성화 되는 것으로 알려져 있다.<sup>1-4)</sup>

PLC의 활성화는 세포막내 소량 존재하는 phospholipid인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP<sub>2</sub>)를 inositol 1,4,5-triphosphate(IP<sub>3</sub>)와 diacylglycerol(DAG)로 분해하며 생성된 IP<sub>3</sub>는 세포질내의 Ca<sup>2+</sup>을 유리시켜 세포내 유리 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가시키고 DAG는 phospholipid-dependent protein serine/threonine kinase인 protein kinase C(PKC)를 활성화시킴으로서 일련의 세포반응을 일으킨다.<sup>5)</sup>

지금까지 알려진 PLC의 세포내 신호전달 반응에서의 다양한 조절역할을 볼때 선택적인 PLC 저해제가 항암제를 비롯하여 순환계 질환, 면역계 질환 치료제로의 개발 가능성을 보여주고 있어 최근에 이들에 대한 탐색이 이루어 지고 있다.<sup>6,7)</sup> 현재까지 알려진 PLC 저해물질로는 유기합성 ether lipid analogue인 ET-18-OCH<sub>3</sub><sup>8)</sup>, phosphoinositol analogue 등<sup>9)</sup>이 알려져 있으며 미생물 유래 PLC 저해물질로는 *Penicillium vinaceum*으로부터 분리된 vinaxanthone<sup>10)</sup>, *Actinomyces* sp.으로부터 분리된 Q12713<sup>11)</sup>, *Chatetosphaeronema hispidulum*으로부터 분리된 hispidospermidin<sup>12)</sup>, *Caloporus dichrous*으로부터 분리된 caloporoside 등<sup>13)</sup>이 최근에 보고되었다.

저자 등은 PLC 저해제를 탐색할 목적으로 PLC 효소활성 검정을 이용하여 토양 미생물로부터 PLC 저해활성 균주를 선별하고 선별된 방선균 분리주 No. 2511-5로부터 PLC 저해활성을 갖는 MT 2511을 분리하여 macrolide계 물질인 scopafungin으로 동정하였

<sup>\*</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-860-4314, 4315 (팩스) 042-860-4595

기에 보고하는 바이다.

### 실험방법

**시약 및 사용기기** - HEPES, EGTA와 L-3-phosphatidyl inositol(PI)는 Sigma사에서 구입하였고 [<sup>3</sup>H]-PI는 Amersham으로부터 구입하여 사용하였다. 방선균 분리주 NO. 2511-5의 배양은 New Brunswick Scientific사의 MF-107 Jar fermentor를 사용하였다. TLC는 silica gel 60F<sub>254</sub>와 RP-18F<sub>254</sub>S(Merck)를 사용하였으며 column chromatography에는 silica gel(70~230 mesh, Merck), ODS RP-18(40-63 μm, Merck), MCI-gel CHP20P(70~150 μm, Mitsubishi Kasei), Diaion HP-20(Nippon Rensui Co.)을 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-6A를 사용하였고 UV 흡수 스펙트럼은 Beckman DU-64 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR, <sup>13</sup>C-DEPT NMR spectrum은 Varian UNITY 300 NMR spectrometer로 측정하였으며 mass spectrum은 Jeol JMS-AX 505 WA mass spectrometer를 사용하여 측정하였다. PLC 효소 활성측정을 위한 radioactivity는 Beckman사의 LS 6000 TA scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

**방선균 분리주 NO. 2511-5의 배양** - 방선균 분리주 NO. 2511-5는 저자 등의 실험실에서 토양으로부터 분리한 균주로 배양조건은 다음과 같다.<sup>14)</sup> 14 l Jar fermentor에 1당 glucose 10 g, soluble starch 20 g, yeast extract 4 g, soybean meal 25 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 g이 함유된 항생물질 생산용배지 10 l를 넣고 4일간 배양한 종균액을 3% 접종하여 배양온도 30°C, 통기량 0.5 vvm, 교반속도 200 rpm에서 6일간 배양하였다. 종균 배지로는 glucose 10 g, soluble starch 10 g, yeast extract 4 g, soybean meal 25 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 g을 사용하였다.

**PLC 효소활성 측정** - PLC 효소는 PLC-γ<sub>1</sub> cDNA가 재조합된 vaccinia virus를 감염시킨 HeLa-3S세포로부터 분리 정제한 것을 사용하였다.<sup>15)</sup> PLC 효소활성 측정은 Rhee등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 실험하였다. 20 μCi의 [<sup>3</sup>H]-PI가 포함된 50 μM PI와 1 mM EGTA, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES(pH=7.0), 0.1% sodium deoxycholate, 효소액 5 μl, 검

정시료 10 μl를 첨가한 200 μl의 반응액을 37°C에서 10분간 반응시킨 후 CHCl<sub>3</sub>/MeOH(2/1)혼합용액 1 ml을 넣어 반응을 중지시켰다. 이어서 5 mM EGTA를 포함한 1N-HCl용액 0.3 ml을 넣고 섞은 후 원심 분리하여 수용액층의 radioactivity를 scintillation counter로 측정하였다. IC<sub>50</sub>값 결정은 Jandel Corporation의 Sigmaplot scientific Graphing System을 이용하였다.

**활성물질의 분리, 정제** - 배양액 20 l를 5000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양액을 상등액과 균체로 분리한 뒤 균체는 아세톤으로 추출 농축하였으며 상등액은 Diaion HP-20 resin에 흡착시켰다. 증류수와 50% MeOH을 사용하여 순차적으로 비활성 부분을 용출 제거한 뒤 resin에 흡착되어 있는 활성부분을 MeOH로 용출하여 감압 농축하였다. 균체의 아세톤 농축액과 Diaion HP-20 resin의 MeOH용출 농축액을 실리카 겔에 흡착시킨 후 column의 상단에 흡착물을 넣고 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O=2/1/0.1을 전개용매로 하여 silica gel column chromatography로 분획하였다. 각 분획물마다 PLC 저해활성을 측정하여 저해 활성 분획을 모아 80% MeOH을 용매로하여 RP-18 column chromatography를 실시하였다. 용출된 활성 분획물을 모아 MCI gel CHP20P column chromatography(용매: 70% MeOH)행하여 활성 분획을 얻고 이를 Prep. HPLC를 실시하여(column: YMC-Pack ODS-AM φ6.0 mm×250 mm, 용매: 80% MeOH, 유속: 1.5 ml/min, UV detector: 254 nm) Retention time 14분의 활성물질 MT 2511 57 mg을 순수 분리하였다.

**물질 MT 2511** - 이 물질은 TLC(SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O=2/1/0.1)상에서 R<sub>f</sub>값이 0.24을 갖는 백색 분말로 ninhydrine, I<sub>2</sub> vapor, 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 양성, Ehrlich, phosphomolybdenic acid시액에 음성으로 나타났다.

UV λ<sub>max</sub>(MeOH): 240, 268 nm, FAB-MS(m/z): 1143(MH<sup>+</sup>), 1125(MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 1057(MH<sup>+</sup>-HOO-CCH<sub>2</sub>CO), 1040(MH<sup>+</sup>-HOOCCH<sub>2</sub>COO), 449, 387, 239, 225, 211, 183, 169, 156. <sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0.86(6 H, CH<sub>3</sub>), 0.92(9H, CH<sub>3</sub>), 1.02(6H, d, J=7 H/z, CH<sub>3</sub>), 1.08(3 H, d, J=7 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.22-2.12(32H, m, CH<sub>2</sub>), 2.32(1 H, m), 2.43(1 H, m), 2.54(1 H, m), 2.83(3 H, s, N-CH<sub>3</sub>),

**Table I**— Comparison of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra data between scopafungin and MT 2511( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)

Carbon no.	scopafungin	MT 2511	Carbon no.	scopafungin	MT 2511
1	10.5	10.5(q) <sup>1)</sup>	31	-	49.3(d)
2	11.0	11.3(q)	32	-	49.6(d)
3	14.6	14.7(q)	33	-	49.8(t)
4	14.8	14.8(q)	34	65.6	65.6(d)
5	15.3	15.1(q)	35	66.0	65.8(d)
6	16.8	16.8(q)	36	69.1	69.4(d)
7	17.8	17.8(q)	37	69.5	69.7(d)
8	20.5	20.4(q)	38	71.3	71.0(d)
9	27.3	27.7(q)	39	72.1	72.2(d)
10	28.4	28.3(q)	40	72.3	72.3(d)
11	29.5	29.8(t)	41	74.5	75.2(d)
12	30.3	30.3(d)	42	75.1	75.7(d)
13	30.5	30.6(t)	43	75.4	75.8(d)
14	32.6	32.6(d)	44	75.6	75.8(d)
15	33.0	32.8(d)	45	77.1	77.4(d)
16	33.6	33.8(t)	46	80.6	79.7(d)
17	37.0	37.5(t)	47	99.8	99.8(s)
18	39.2	39.2(t)	48	129.8	129.8(d)
19	40.2	40.5(m)	49	131.7	131.8(d)
20	40.7	40.6(m)	50	131.8	131.9(d)
21	41.2	42.0(m)	51	131.9	132.3(d)
22	41.9	42.3(t)	52	132.8	132.9(d)
23	42.1	43.2(t)	53	134.8	135.1(d)
24	42.8	43.3(d)	54	136.2	136.4(d)
25	43.9	44.1(d)	55	136.6	136.8(d)
26	44.2	44.5(d)	56	157.9	158.2(d)
27	45.2	45.1(d)	57	171.7	171.4(s)
28	- <sup>2)</sup>	48.0(d)	58	174.1	174.2(s)
29	-	48.7(d)	59	177.0	176.6(s)
30	-	49.1(d)			

<sup>1)</sup> Multiplicities were established by DEPT spectra

<sup>2)</sup> The signals for the six other carbons were unidentified by the solvent peak in the previous report(samain et. al)

3.18(2 H, t,  $J=7$  Hz), 3.76(3 H, m), 3.85(4 H, m), 4.10(4 H, m), 5.20(1 H, m), 5.46(4 H, m), 5.68(2 H, m), 6.15(2 H, m),  $^{13}\text{C}$ -NMR(Table I.)

## 결 과

**MT 2511의 구조동정** - 이 화합물은 240 nm와 268 nm의 UV 최대 흡수파장과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 99.8 ppm의 hemiketal carbon 및  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서 1.22~2.12 ppm의  $\text{CH}_2$  proton으로부터 MT 2511은 marcroliide 계열의 물질로 추정하였다. FAB-Mass spectrum으로부터  $\text{MH}^+$  ion peak가 1143에서 나타났으며 이로부터 이 물질의 분자량을 1142로 추정하였다. 또한 물과 malonyl기가 탈착되어진 1125( $\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ), 1057( $\text{MH}^+ - \text{HOOCCH}_2\text{CO}$ ), 1040( $\text{MH}^+ - \text{HOOCCH}_2\text{COO}$ ), 449, 387 등의 fragmentation pattern을 FAB-Mass spectrum으로부터

터 확인하였다. MT 2511은 아민의 발색에 사용되는 ninhydrine시약에서의 양성반응과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서의 157.9 ppm으로부터 물질내에 guanido group이 존재함을 알 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum으로부터 2.83 ppm의  $\text{N-CH}_3(3\text{H}, \text{s})$ 의 proton, 5.46~6.15 ppm의 8개의  $-\text{CH}=\text{CH}-$  proton, 1.22~2.12 ppm에서의 32개의  $\text{CH}_2$  proton을 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 171.4~176 ppm의 3개의 carboxylic carbon 및 157.9 ppm의 1개의 guanido carbon을 확인할 수 있었다. 또한 129.8~136.8 ppm으로부터 8개의  $-\text{CH}=\text{CH}-$  carbon 및 65.6~79.7 ppm에서 12개의  $-\text{CH}-\text{O}-$  carbon을 각각 확인하였다. 한편 scopafungin은 Samain 등<sup>19)</sup>에 의하여 그 구조가 결정되었으나  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 6개의 carbon이 용매범위에 중복되어 존재하므로 확인하지 못하였다. 그러나 저자들은  $^{13}\text{C}$ -DEPT NMR spectrum을 통하여 48.0~49.6 ppm 사이에서  $\text{CH}_2$ 에

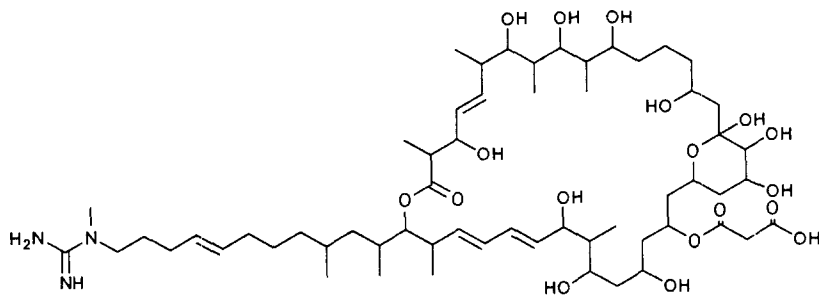


Fig 1 — The structure of scopafungin.

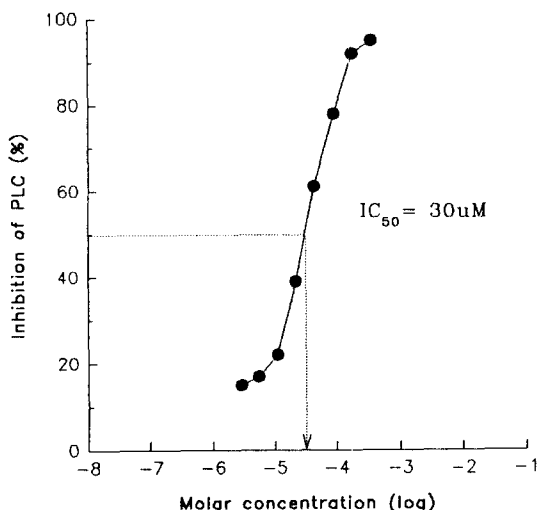


Fig 2 — Inhibition of phospholipase C by MT 2511.

IC<sub>50</sub> value represents the means for three experiments. The assay procedure was described in the experimental methods.

해당하는 6개의 carbon을 확인할 수 있었다. 이상의 물리 화학적 성질 및 기기 분석 결과로부터 문헌에 보고된 marcrolide계 물질들의 data와 비교해 본결과 MT 2511은 36-membered ring을 갖는 scopafungin (Fig.1.)으로 동정되었다.<sup>17, 18, 19)</sup>

**MT 2511-5의 PLC 저해활성** - 기질로 [<sup>3</sup>H]-PI를 사용하여 PLC 저해활성 측정시 MT 2511은 10 μM에서 20% 저해활성을 보이기 시작하여 150 μM에서 100% PLC 효소활성을 저해하였으며 IC<sub>50</sub>은 30 μM이었다(Fig.2.).

## 고찰

PLC는 동물의 각종 조직에서 발견되고 있는 효소로서 세포내 신호전달과정에서 중요한 역할을 수행한다.

현재까지 밝혀진 PLC의 역할은 EGF, PDGF등의 세포 성장인자, lymphokine 및 hormonal peptide등에 의해 활성화되어 PIP<sub>2</sub>를 분해하여 IP<sub>3</sub>와 DAG을 생성하고 이들은 세포내 신호전달의 2차 매개자로 작용하여 여러가지 세포증식 및 반응을 유도한다.<sup>5)</sup>

따라서 PLC 저해제 개발이 항암제 및 면역 질환 치료제로서의 개발 가능성을 증가시키나 이 효소의 세포내 존재량이 극히 적기때문에 미생물 배양액을 비롯한 많은 수의 천연물 시료에 대한 효소 저해활성을 검정하는데 어려움이 있다. 저자들은 이러한 어려움을 극복하기 위하여 PLC-γ1 cDNA를 유전자 재조합에 의하여 Vaccina virus 에 도입하고 HeLa-3S 세포에 감염시켜 PLC를 다량 분리할 수 있었다. 이렇게 분리된 PLC 효소를 이용하여 토양 방선균 배양액에 대한 PLC 저해활성을 검색하여 방선균 분리주 No. 2511-5로 부터 PLC 저해물질 scopafungin을 분리하였다.

Scopafungin은 Samain 등<sup>19)</sup>에 의하여 항 진균 활성을 갖는 물질로 보고되었으며 임상적으로 사용하는 polyene계 물질인 amphotericin B에 버금가는 항 진균 활성을 갖고 있다. 또한 현재까지 PLC 저해작용으로 보고된 물질로는 vinaxanthone<sup>10)</sup>, Q12713<sup>11)</sup>, hispidospermidine<sup>12)</sup>, caloporoside<sup>13)</sup>이 있으나 저자들이 분리한 scopafungin은 marcrolide계열의 물질로 이들과는 다른 골격을 갖는 물질로 marcrolide의 PLC 저해작용은 이 논문에서 처음으로 보고하는 바이다.

Scopafungin은 bovine brain에서 분리한 PLC효소에 대하여 30 μM의 농도에서 IC<sub>50</sub>값을 보여주었으며 vinaxanthone, hispidospermidine은 rat brain에서 분리한 PLC효소에 대하여 각각 5.4 μM, 16 μM의 IC<sub>50</sub>값을, caloporoside는 pig brain에서 분리한 PLC효소에 대하여 18~31 μM의 IC<sub>50</sub>값을 Q12713은 *Bacillus*

*thringensis*에서 분리한 PLC효소에 대하여 약한 저해작용(32% inhibition at 100 µg/ml)을 보여 주었으나 저해효과에 대한 상대적 비교는 효소의 기원이 다르므로 불가능하나 전체적으로 볼 때 scopafungin 은 다른 저해제들에 비하여 약하거나 동등한 저해작용을 보여주는 것으로 생각된다. 한편 scopafungin은 신호 전달 과정의 중요한 효소인 protein kinase C(PKC)에 대하여 Lee등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 효소활성 측정시 200 µM 이상의 농도에서도 저해활성을 보여주지 않았다.

저자들은 현재 scopafungin의 PLC 효소 저해 양식을 밝히고자 하는 실험과 각각의 PLC isozyme에 대한 저해활성의 비교 및 PLC 효소외의 다른 phosphodiesterase인 phospholipase A<sub>2</sub>, phosphatidylcholine specific phospholipase D등의 신호 전달 관련 효소들에 대한 저해활성을 검토중에 있다.

### 감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 선도 기술개발 사업비의 일부에 의해 수행되었음을 밝히는 바입니다.

### 문 헌

- Margolis, B., Ziberstein, A., Franks, C. and Felder, S.: Effect of phospholipase c overexpression on PDGF-induced second messengers and mitogenesis. *Science* **248**, 607 (1990).
- Rhee, S. G. and Choi, K. D.: Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **267**, 12393 (1992).
- Wange, R. L., Smrcka, A. V., Sternweis, P. C. and Exton, J. H.: Photoaffinity labeling of two rat liver plasma membrane proteins with [<sup>32</sup>P]-azidoanilido GTP in response to vasopressin. *J. Biol. Chem.* **266**, 11409 (1991).
- Waldo, G. L., Bayer, J. L., Morris, A. T. and Harden, T. K.: Purification of an AIF4 and G-protein βγ-subunit-regulated phospholipase C-activating protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 14217 (1991).
- Majerus, P. W.: Inositol phosphate biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 225 (1992).
- Bleasdale, J. E.: Inhibitors of phospholipase C-dependent process. *Drugs of the Future* **17**, 475 (1992).
- Powis, G.: Inhibitors of phospholipase C. *Drugs of the Future* **18**, 343 (1993).
- Powis, G., Seewald, M. J., Cratas, D. and Modest, E. J.: Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. *Cancer Res.* **52**, 2835 (1992).
- Potter, B. V. L.: Recent advances in the chemistry and biochemistry of inositol phosphates of biological interest. *Nat. Prod. Rep.* **1** (1990).
- Aoki, M., Itezono, Y., Shirai, H., Nakayama, N., Sakai, A. and Tanaka, Y.: Structure of a novel phospholipase C inhibitor, vinaxanthone (Ro 09-1450), produced by *Penicillium vinaceum*. *Tetrahed. Lett.* **32**, 4737 (1991).
- Ogawara, H., Higashi, K., Manita, S., Hidaka, M., Kato, H. and Takenawa, T.: An inhibitor of inositol-phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem. Biophys. Acta.* **1175**, 289 (1993).
- Yanagisawa, M., Sakai, A., Adachi, K., Sano, T. and Watanabe, K.: Hispidospermidin, a novel phospholipase C inhibitor produced by *Chaetophoronema hispidulum*(Cda) Moesz NR 7127. *J. Antibiotics* **47**, 1 (1994).
- Weber, W., Schu, P., Anke, T., Velten and R., Steglich, W.: Caloporoside, a new inhibitor of phospholipase C from *Caloporus dichrous*(Fr.) Ryv. *J. Antibiotics* **47**, 1188 (1994).
- Ahn, J. S., Ahn, S. C., Lee, H. S., Park, M. S., Oh, W. K., Kim, B. Y. and Mheen, T. I.: Purification and chemical identification of the inhibitor on bleb formation of K562 cell induced by phorbol ester from *Actinomycetes isolate No. 1882-5*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 565 (1992).
- 안종석, 이현선, 안순철, 오원근, 강대욱, 류성호, 서판길: 세포반응의 신호전달 조절 선도 물질의 탐색 기술개발, 과거치 연구보고서 (1993).
- Rhee, S. G., Ryu, S. H., Lee, K. Y. and Cho, K. S.: *Methods in Enzymology* **197**, 502 (1991).
- Fukushima, K. and Arai, T.: Studies on macrocyclic lactone antibiotics. VI<sup>11</sup> skeletal structure of copiamycin. *J. Antibiotics* **35**, 1480 (1982).
- Mamikoshi, M., Sasaki, K., Koiso, Y., Fukushi-

- ma, K. and Iwasaki, S.: Studies on macrocyclic lactone antibiotics. I. Physicochemical properties of azalomycin F<sub>4a</sub>. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 1653 (1982).
- 19) Samain, D., Cook, C. and Rinehart, K. L.: Structure of scopafungin, a potent nonpolyene antifungal antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4129 (1982).
- 20) Lee, H. S., Park, M. S., Oh, W. K., Ahn, S. C., Kim, B. Y., Meen, T. I. and Ahn, J. S.: Isolation and biological activity of verbascoside, a potent inhibitor of protein kinase c from the calyx of *Campsis grandiflora*. *Yakhak Hoeij* **37**, 598 (1993).