

Micromonospora sp. SA-246 균주가 생산하는 Isochromanequinone계 항생물질

여운형 · 윤봉식 · 황경숙¹ · 이정옥² · 유승헌*

충남대학교 농생물학과, ¹목원대학교 미생물학과, ²한국화학연구소 의약활성실

An Isochromanequinone Compound Produced by *Micromonospora* sp. SA-246. Woon-Hyung Yeo, Bong-Sik Yun, Kyung-Sook Whang¹, Chong-Ock Lee² and Seung-Hun Yu*. Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea, ¹Department of Microbiology, Mokwon University, Taejon 301-729, Korea, ²KRICT, P.O. Box 9, Yusong, Taejon 305-606, Korea - In the course of screening for new bioactive compounds from oligotrophs in soil, a microorganism, designated as SA-246 and now identified as *Micromonospora* sp., has been shown to produce a strong antibacterial compound. The active compound was purified from broth filtrate by ethylacetate extraction, silica gel column chromatography, preparative TLC and HPLC, and was identified as crisamicin A based on mass and NMR spectral data. The compound SA-246 exhibited not only strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria but also cytotoxicity against cancer cell lines such as A549 (lung), SK-OV-3 (ovarian), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (central nervous system) and HCT15 (colon).

토양미생물 상호간에 길항적 관계가 Waksman에 의해 보고된(1) 이후 수많은 생리활성물질이 미생물로부터 분리되었다. 특히 방선균에서 분리된 생리활성물질이 지금까지 발견된 물질 중 약 45%를 차지하고 있으며, 이중 대부분은 *Streptomyces* 속에서 분리되었다(2). 그러나 이같은 다수의 항생물질의 발견에도 불구하고 낮은 활성, 독성, 저항성등으로 인하여 실용적으로 이용할 수 있는 물질은 소수에 불과하다. 최근들어 이같은 문제를 해결하기 위한 여러방안이 모색되어 지고 있다. 특히 특정부위에 선택적으로 작용하는 화합물을 탐색하기 위한 target-directed screening 방법의 개발(3,4), 기존에 발견된 활성물질의 새로운 활성탐색 그리고 새로운 골격의 생리활성물질 탐색을 위한 희귀미생물의 분리, 배양법등이 검토되고 있다(5,6).

가장 중요한 생리활성물질 탐색원인 토양 미생물은 토양의 영양조건에 따라 크게 두 그룹으로 나뉜다. 즉 유기물 농도가 풍부한 환경하에서 급속히 증식하는 고영양성 미생물(copiotroph)과 빈약한 영양조건에서 더디게 증식하는 저영양성 미생물(oligotroph)로 분류된다(7). 지금까지의 미생물연구가 대부분 고농도 영양조건에서 급속히 증식하는 고영양성 미생물에 국한되어 왔으며 저영양성 미생물에 대하여는 등한시 되어 왔다. 저영양성 미생물은 통상농도의 고영양 배지에서는 잘 분리되지 않기 때문에 생리활성물질 탐색에도 거의 이용되지 않았다(8-10). 따라서 저영양성 미생물을 이용한

생리활성물질 탐색은 기존에 밝혀진 물질과는 구조적으로 다른 독특한 신규 화합물 혹은 합성을 위한 선도물질의 개발 가능성이 높을 것으로 사료되어 저영양성 세균 및 방선균을 선택적으로 분리하였다. 분리된 저영양성 미생물에 대하여 항균활성 및 암세포주에 대한 세포독성을 조사하던 중 SA-246 균주가 강력한 항균활성 및 세포독성을 나타내는 것을 발견하였다. 본 연구에서는 SA-246 균주가 생산하는 활성물질을 분리, 정제하고 물리화학적 특성, NMR 분석에 의한 구조결정, 생물학적 특성등을 조사하였다.

재료 및 방법

방선균의 분리 및 활성균주의 선발

토양으로부터의 저영양성 방선균의 분리에는 통상의 육즙배지를 100배로 희석한 희석 육즙 배지(beef extract 0.03 g, peptone 0.05 g, agar 15 g/l, pH 7.0)를 이용하였으며 멸균한 증류수에 토양시료를 10⁻⁵으로 희석한 후 분리용 배지상에 0.5 ml/씩 도말하여 30°C에서 10~20일간 배양하였다. 배양후 균총의 색과 현미경하에서 균사의 형태적 특성을 관찰한 후 서로 상이한 방선균을 분리, 배양하였다. 활성균주의 선발을 위해 1차적으로 항균활성(paper disk법)을 조사하였으며, 2차적으로 암세포주에 대한 세포독성(cytotoxicity)을 조사하였다. 그 결과, 그람 양성세균에 강한 항균활성을 나타내며 A549(lung), SK-OV-3(ovarian)등의 암세포주에 세포독성을 나타내는 SA-246 균주를 선발하였다.

균주의 동정

*Corresponding author.

Key words: *Micromonospora* sp., crisamicin A, antibacterial activity, cytotoxicity, cancer cell lines

SA-246 균주의 분류, 동정은 International *Streptomyces* Project(ISP)의 분류기준 및 동정방법에 준하여 행하였다(11-16).

SA-246 균주의 배양

항생물질 생산용 배지로는 GS배지(soluble starch 5 g, glucose 5 g, aspartic acid 0.5 g, $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/l, pH 7.3)를 이용하였으며 이 배지에 SA-246 균주를 접종한 후 5일간 정치배양하여 전배양 하였다. 본배양은 1l 삼각 플라스크에 생산용배지 250 ml를 분주하여 전배양액 10 ml를 접종한 후 160 rpm, 27°C에서 7일간 배양하였다.

구조분석 및 이화학적 특성조사

구조분석을 위한 NMR 측정은 Bruker NMR spectrometer(400 MHz)를 사용하였으며 내부표준물질은 TMS를, 용매는 $CDCl_3$ 를 사용하였다. UV spectrum은 CH_3CN 을 용매로 하여 Shimazu UV-260 spectrophotometer로 측정하였으며 분자량 측정은 JEOL HX 100 mass spectrometer를 사용하여 FAB 모드로 측정하였다. TLC 분석은 Merck사 제품의 silica gel 60 F₂₅₄를 이용하였다.

생물활성

SA-246 화합물의 항균활성 측정을 위한 검정균으로는 세균으로서 *Staphylococcus aureus* R-209, *Sarcina lutea*등을 비롯한 8종을 사용하였고 효모로서 *Candida albicans*를, 곰팡이로서 *Pyricularia grisea*, *Colletotrichum lagenarium*등의 5종을 사용하였으며 paper disc 당 5 µg의 시료를 처리하여 항균활성의 유무를 측정하였다. 본 SA-246 화합물은 배지상에서 확산이 잘 이루어지지 않으므로 정확한 생육저지환의 크기는 측정할 수 없었으며 다만 활성유무만을 기술하였다. 암세포주에 대한 세포독성 실험에는 폐암세포주(A549), 난소암세포주(SK-OV-3), 피부암세포주(SK-MEL-2), 신경암세포주(XF498), 대장암세포주(HCT15)를 대상으로, 시료를 처리한 후 생존세포의 단백질을 정량하여 이를 세포독성의 지표로 삼는 sulforhodamine B 방법에 의하여

측정하였다(17).

결과 및 고찰

선발균주의 동정

SA-246 균주의 배양적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Yeast-malt extract agar 및 oatmeal agar 배지에서는 기균사의 생육이 양호하였으나 그 외의 배지에서는 생육이 매우 미약하거나 혹은 전혀 생육하지 못하였다. 기저균사는 연갈색 혹은 연노란색을 띠었으며 yeast-malt extract agar 배지에서는 연갈색의 수용성 색소를 생성하였다.

포자는 짧은 sporophore 위에 단포자를 형성하였으며(Fig. 1) 세포벽 구성 성분은 meso-diaminopimelic acid를 함유하고 있었다. 전분 및 skim milk를 가수분해하고 gelatin 액화능을 지녔으며 13종의 탄소원을 대상으로 당이용성을 조사한 결과 D-mannitol, L-rhamnose, sucrose 등은 잘 이용하였으나 그 외의 탄소원은 이용하지 못하였다(Table 2).

이상의 분류학적 특성을 토대로 ISP 분류 key 및 기타 방선균 분류기준과 비교 검토한 결과 본 균주는

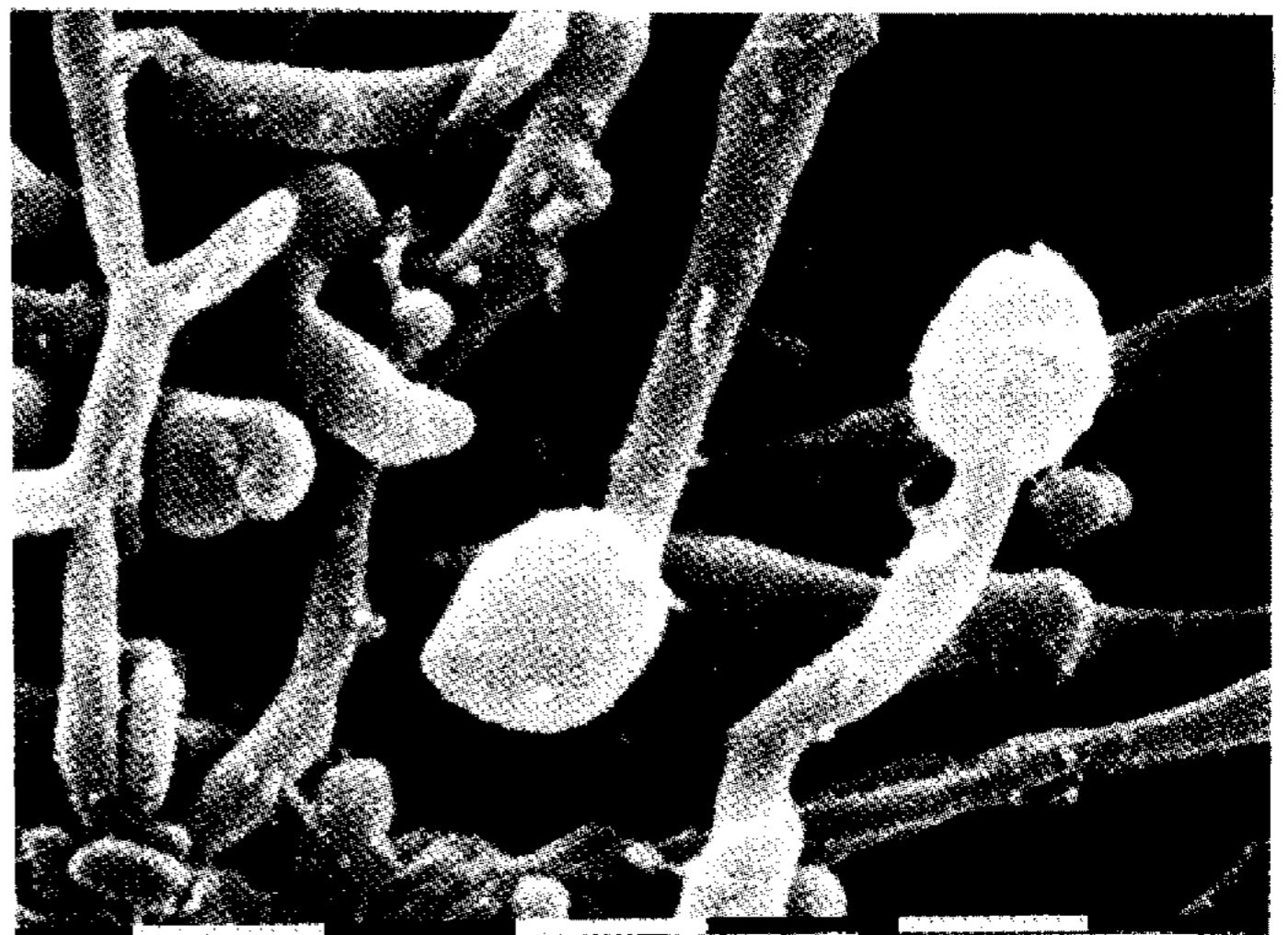


Fig. 1. Electronmicrograph of sporophores and spores of strain SA-246 (bar: 1 µm).

Table 1. Cultural characteristics of strain SA-246.

Media	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment
Yeast-malt extract agar	Good, None	Pale brown	Pale brown
Oatmeal agar	Moderate, None	Pale brown	
Inorganic salts-starch agar	None		
Glycerol-asparagine agar	Poor, None	Pale yellow	
Peptone-yeast extract-iron agar	None		
Tyrosine agar	Poor, None	Pale yellow	
Bennet's agar	Poor, None	Pale yellow	

Table 2. Morphological and physiological characteristics of strain SA-246.

Spore	Single spores on short sporophores
Cell wall constituent	<i>meso</i> -DAP
Liquefaction of gelatin	+
Hydrolysis of skim milk	+
Hydrolysis of starch	+
Utilization of L-Arabinose	-
D-Fructose	-
D-Galactose	-
myo-Inositol	-
D-Mannitol	+
Raffinose	-
L-Rhamnose	+
Sucrose	+
Cellulose	-
D-Xylose	-
Cellobiose	-
Inulin	-
Melibiose	-

Whole culture broth

| centrifugation

Supernatant

| extracted with ethylacetate

Ethylacetate layer

| concentrated *in vacuo*

Silica gel column chromatography

| CHCl₃:MeOH=90: 1

Preparative TLC

| CHCl₃:MeOH:AcOH=90:3:0.1

HPLC

(Capcell pak C₁₈, CH₃CN-H₂O(40:60), UV 230nm)

|

Compound SA-246

Fig. 2. Isolation procedure of compound SA-246.

Micromonospora 屬에 속하는 것으로 동정하였으며 따라서 *Micromonospora* sp. SA-246으로 명명하였다.

활성물질의 분리 및 정제

Micromonospora sp. SA-246 균주가 생산하는 항생물질의 분리정제 과정은 다음과 같다(Fig. 2). 7일간 배양한 균배양액(3 l)을 원심분리한 후 배양상등액을 취하여 ethylacetate로 3회 반복 추출하였다. 용매층은 농축하여 silica gel column chromatography(CHCl₃: MeOH=90: 1)를 수행하였다. 용출된 활성물질은 농축

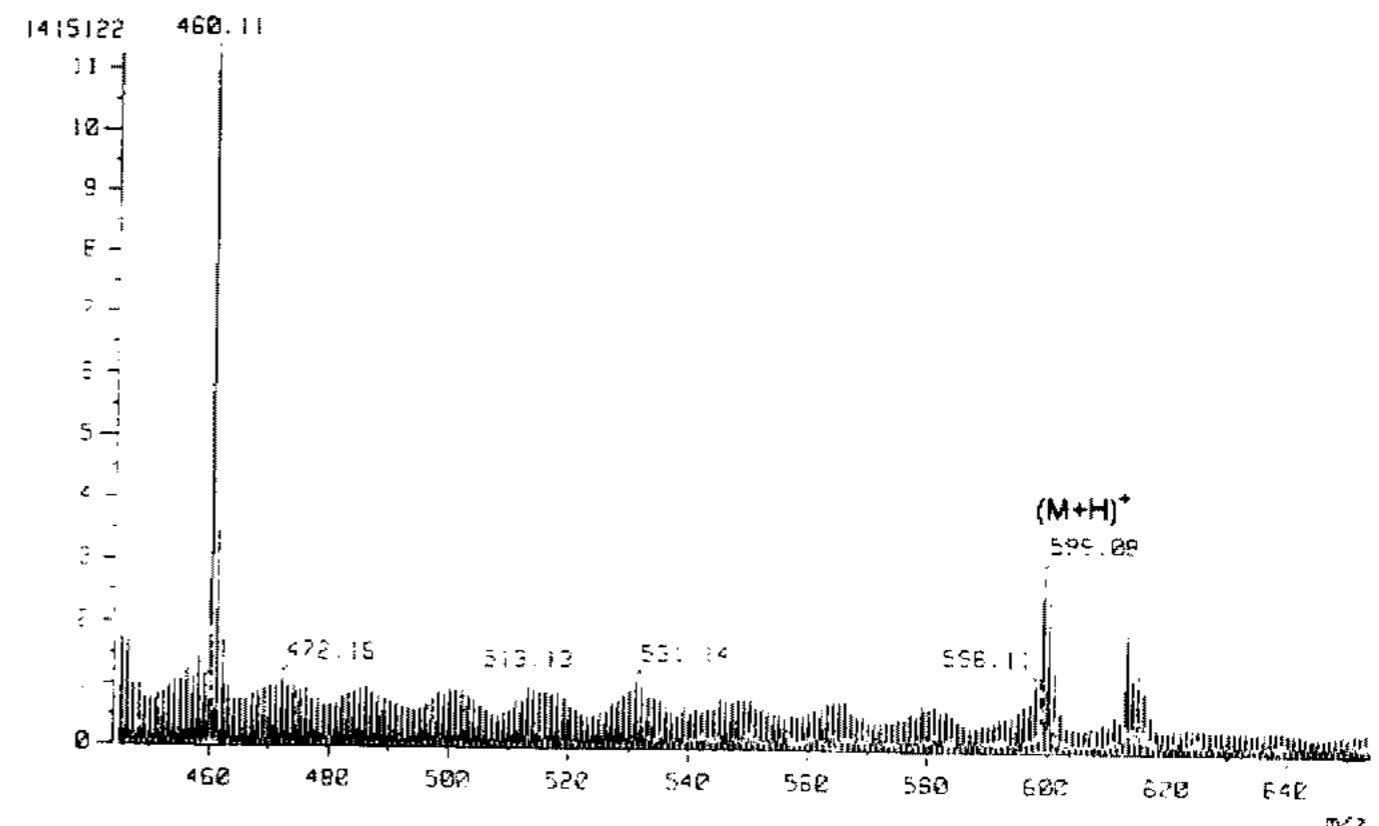
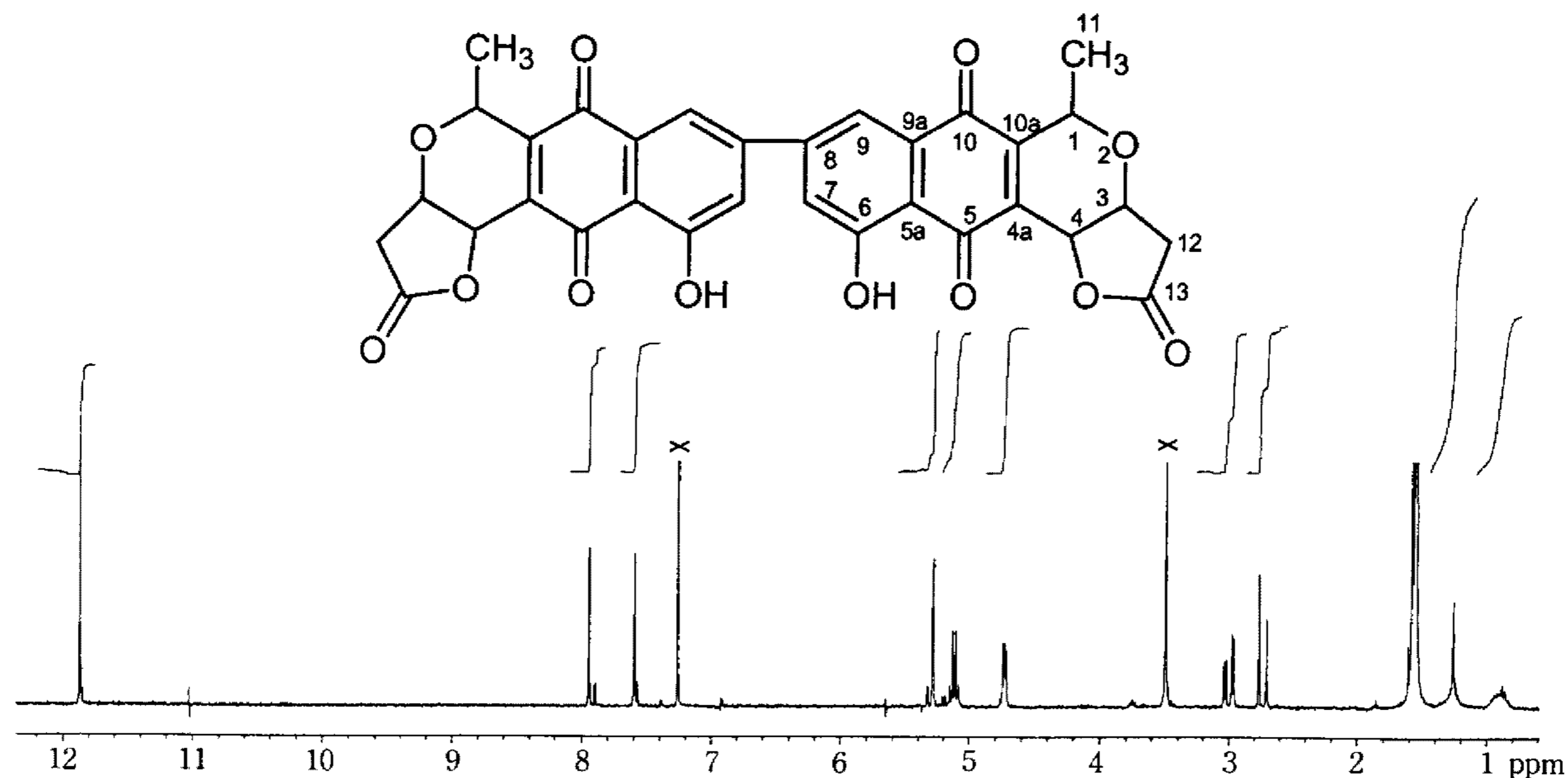


Fig. 3. FAB-mass spectrum of compound SA-246.

후 소량의 chloroform에 녹여 CHCl₃: MeOH: AcOH (90: 3: 0.1)를 전개용매로 preparative TLC를 하였다. 활성물질은 CHCl₃: MeOH(20: 1)로 용출하고 농축한 후 60% 함수 acetonitrile을 용매로 HPLC(Capcell pak C₁₈, 10 mm×250 mm)를 수행하여 정제된 SA-246 화합물 7 mg을 획득하였다.

활성물질의 물리화학적 특성 및 구조분석

SA-246 균주가 생산하는 활성물질의 성상은 오렌지 색 침상 결정으로 DMSO, CHCl₃, CH₃CN, EtOAc등에는 가용성이었으나 hexane, MeOH, H₂O등에는 난용성이었다. 화합물 SA-246은 231, 267 및 437 nm에서 UV-VIS 최대 흡수 피크를 나타내었으며 상기 성상과 종합하여 볼 때 본 활성물질은 quinone 계열의 화합물로 추정되었다. FAB-MS(Fig. 3) 측정 결과 (M+H)⁺가 m/z 599에서 확인되어 본 활성물질의 분자량은 598로 추정되었다. 자세한 구조해석은 NMR spectrum의 분석에 의하여 수행되었다. 우선, ¹H NMR spectrum (Fig. 4)의 분석결과 11.87 ppm에 수소결합한 hydroxyl group에 유래하는 signal, 7.94 및 7.59 ppm에 상호 *meta* coupling(*J*=2 Hz)한 방향족 methine proton, 5.28, 5.15, 4.73, 3.00 및 2.73 ppm에 각각 ¹H의 proton에 해당하는 signal들이 관측되었다. 3.00 ppm과 2.73 ppm의 proton은 그들의 결합상수(*J*=17.7 Hz)가 큰 것으로 부터 geminal coupling을 하고 있는 methylene proton으로 판명되었으며 1.57 ppm에 irradiation 하여 proton을 측정된 결과 5.12 ppm에 있는 quartet proton이 singlet으로 나타나 1.57 ppm에 5.12 ppm의 methine proton과 결합한 methyl proton이 존재함을 알 수 있었다. ¹³C NMR 분석 결과, 186.9 및 181.8 ppm에 quinone환의 carbonyl기에 유래하는 signal, 173.9 ppm에 ester기의 carbonyl signal, 162.3, 151.0, 146.5, 134.8, 132.3 및 114.4 ppm에 sp² 4급탄소, 123.0 및 118.4 ppm에 sp² methine 탄소, 66~69 ppm 사이에 3개의 oxymethine 탄소, 36.7 ppm에 methylene 탄소, 18.5

Fig. 4. ^1H -NMR spectrum of compound SA-246 (CDCl_3).Table 3. ^1H and ^{13}C NMR assignments for compound SA-246 in CDCl_3 .

Positions	^{13}C chemical shifts, ppm	^1H chemical shifts, ppm
1	66.8	5.12 (q, 7.2) ^a
3	66.5	4.73 (dd, 5.1, 3.0)
4	68.4	5.28 (d, 3.0)
4a	151.0	
5	181.8	
5a	114.4	
6	162.3	
7	123.0	7.94* (d, 2.1)
8	134.8	
9	118.4	7.59* (d, 2.1)
9a	132.3	
10	186.9	
10a	146.5	
11	18.5	1.57 (d, 7.2)
12	36.7	3.00 (dd, 17.7, 5.1)
		2.73 (d, 17.7)
13	173.9	

*Assignments interchangeable.

^aProton resonance multiplicity and coupling constant (J = Hz) in parentheses.

Each chemical shift value was assigned by comparison with that of crismamicin A.

ppm에 methyl 탄소등 총 16개의 탄소 signal이 관측되었다. 본 화합물의 분자량이 598인 것에 비하여 NMR상에서 관측된 ^1H , ^{13}C signal의 수가 극히 적어 구조적으로 symmetrical dimer를 이루고 있을 것으로 추정되었다.

Table 4. Antimicrobial spectra of compound SA-246.

Test microorganisms	activity*
Bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	+
<i>Sarcina lutea</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+
<i>Streptococcus</i> sp.	+
<i>Escherichia coli</i>	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	-
<i>Erwinia carotovora</i>	-
Fungi	
<i>Pyricularia grisea</i>	-
<i>Mucor rambannius</i>	-
<i>Colletrichum lagenarium</i>	-
<i>Aspergillus niger</i>	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	-

*At 5 $\mu\text{g/ml}$ (+: active, -: inactive).

이상의 mass spectrum 분석에 의한 분자량 및 ^1H NMR spectrum에 의한 부분구조에 근거하여 data base로 검색한 결과 본 화합물은 Nelson등에 의하여 항균활성물질로 분리 보고된 crismamicin A(Fig. 4)와 동일화합물임이 입증되었다(18). *Micromonospora* sp. SA-246에 의하여 생산된 항생물질 SA-246 화합물의 ^1H , ^{13}C NMR 스펙트럼의 분석결과를 Table 3에 나타내었다. Crismamicin A는 isochromanequinone계 항생물질로 구조상 대칭을 이루고 있으며 생산균은 *Micromonospora purpureochromogenes* subsp. *halotolerans*로 동정, 보고

Table 5. Cytotoxicity of compound SA-246 against various cancer cell lines.

Cell lines	ED ₅₀ (µg/ml)*
A549 (human lung)	1.1
SK-OV-3 (human ovarian)	0.4
SK-MEL-2 (human melanoma)	0.4
XF498 (central nervous system)	0.7
HCT15 (human colon)	0.3

*Activity was estimated by SRB method.

되었다(19). 최근 Russell등에 의하여 crisamicin C가 분리 보고되었으며 이는 구조적으로 crisamicin A의 4a위와 10a위가 epoxy 구조를 하고 있다(20). 본 생산 균주는 crisamicin A 및 C 이외에 몇몇 crisamicin 관련 화합물을 생성하며 현재 이들 유도체에 대한 구조분석이 진행 중에 있다.

활성물질의 생물활성

그람 양성·음성 세균, 곰팡이, 효모등을 대상으로 항균활성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 화합물 SA-246은 *Staphylococcus aureus* R-209, *Sarcina lutea*, *Streptococcus* sp.등의 그람 양성 세균에 항균활성을 나타내었으나 곰팡이, 효모등에는 활성을 나타내지 않았다. 한편 각종 암세포주에 대한 세포독성을 조사한 결과 난소암세포주, 피부암세포주, 신경암세포주, 대장암세포주에 대한 ED₅₀ 값이 0.3~0.7 µg/ml로 강한 세포독성을 나타내었다(Table 5).

Crisamicin A의 항균활성은 Nelson등에 의하여 보고되었으나 난소암세포주(SK-OV-3), 피부암세포주(SK-MEL-2), 신경암세포주(XF498) 및 대장암세포주(HCT 15)에 대하여 강한 세포독성을 나타내는 것은 본 연구에 의하여 처음 밝혀졌다.

요 약

저영양성 미생물을 선택적으로 분리, 배양하여 새로운 생리활성물질을 탐색하던 중 SA-246 균주가 강한 항균활성 및 암세포주에 대한 세포독성을 나타내는 것을 발견하였다. SA-246 균주의 동정을 위하여 배양적, 형태적, 생리적 특성을 ISP 방법에 따라 조사한 결과 *Micromonospora*屬에 속하는 것으로 동정하였으며 따라서 *Micromonospora* sp. SA-246으로 명명하였다. 배양액으로 부터 용매추출, silica gel column chromatography, preparative TLC, HPLC등에 의하여 활성물질을 분리, 정제하였으며 UV 흡수, mass, NMR spectrum의 분석 결과 본 활성물질을 crisamicin A로 동정하였다. 화합물 SA-246은 그람 양성 세균에 항균활성을, 폐암

세포주(A549), 난소암세포주(SK-OV-3), 피부암세포주(SK-MEL-2), 신경암세포주(XF498), 대장암세포주(HCT 15)에 세포독성을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 1994년도 핵심전문연구비(과제번호 941-0600-008-2)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Waksman, S.A. 1940. Antagonistic interrelationships among microorganisms. *Chronica Botanica on Microorganisms* 6: 145-148.
2. Cross, T. 1982. Actinomycetes: A continuing source of new metabolites. *Developments in Industrial Microbiology* 23: 1-18.
3. Gunji, S., K. Arima, and T. Beppu. 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agri. Biol. Chem.* 47: 2061-2069.
4. Selitrennikoff, C.P. 1983. Use of temperature-sensitive protoplast-forming *Neurospora crassa* strain for the detection of antifungal antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 757-765.
5. Wellington, E.M.H. and T. Cross. 1983. Taxonomy of antibiotic-producing actinomycetes and new approaches for their selective isolation. *Progress in Industrial Microbiol.* 17: 7-35.
6. Goodfellow, M. and E. Williams. 1986. New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria. *Biotechnol. & Genetic Eng. Reviews.* 4: 143-162.
7. Hattori, T. 1976. Plate count of bacteria in soil on a diluted nutrient broth as a culture medium. *Rep. Inst. Agric. Res. Tohoku Univ.* 27: 23-30.
8. Otha, H. and T. Hattori. 1983. Oligotrophic bacteria on organic debris and plant roots in a paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.* 15: 1-8.
9. Poindexter, J.S. 1981. Oligotrophy. *Advance in Microbiol Ecology.* 5: 63-89.
10. Whang, K. and T. Hattori. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina a forest soil. *Antonie van Leewenhoek J. Microbiol.* 54: 19-37.
11. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.
12. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* II. Species description from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18: 69-189.
13. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18: 279-399.

14. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1969. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 391-512.
15. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1972. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* V. Additional description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 265-394.
16. Nomura, H. 1974. Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP. *J. Ferment. Technol.* **52**: 78-92.
17. Monks, A., D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hoes, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolf, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, and M. Boyd. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* **83**: 757-766.
18. Ling, D., L. Shield, and Jr. K.L. Rinehart. 1986. Isolation and structure determination of crisamicin A, a new antibiotic from *Micromonospora purpureochromogenes* subsp. *halotolerans*. *J. Antibiotics* **39**: 345-353.
19. Nelson, R.A., Jr. J.A. Pope, G.M. Luedemann, L.E. McDaniel, and C.P. Schaffner. 1986. Crisamicin A, a new antibiotic from *Micromonospora*, I. Taxonomy of the producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical characterization and antimicrobial properties. *J. Antibiotics* **39**: 335-344.
20. Russell, W.L., R.C. Pandey, and C.P. Schaffner. 1988. Crisamicin C, a new isochromanequinone antibiotic. *J. Antibiotics* **41**: 149-156.

(Received 10 December 1995)