

### 신경세포 보호물질 탐색

김원곤 · 유익동  
KIST 생명공학연구소

뇌졸중으로 대표되는 뇌혈관질환은 우리나라 사람의 사망 원인중 암에이어 2위를 기록하고 있고 이로 인한 사망률이 매년 증가하고 있다. 또한 세계적으로도 사망원인 2~3위를 차지할 정도로 치명적인 질환 가운데 하나이다(1).

흔히 중풍으로 불리는 뇌졸중은 머리카락 부위의 혈관 중에 동맥경화 등이 발생, 찢어짐이 생겨 피의 흐름을 막기 때문에 의식을 잃고 갑자기 쓰러지는 병이다. 이 병의 원인은 허혈상태로 인한 에너지 결핍으로 신경전달 물질의 일종인 glutamate가 세포 내로 흡수되지 못함으로써, 세포 외의 glutamate의 농도가 비정상적으로 높아지게 되어 그 독성으로 인하여 뇌 신경세포가 죽어가고 있기 때문인 것으로 알려져 있다(2). 또한 최근에는 노인성 치매, 파킨슨 병 등의 만성 뇌질환에도 신경세포에 대한 glutamate 독성이 그 원인중의 하나라고 알려져 있다(3).

#### Glutamate neurotoxicity

L-Glutamate는 생리적으로는 중요한 신경전달 물질의 일종이지만 허혈상태에서는 뇌 신경세포를 손상시킨다(4,5). 즉 정상상태에서는 presynaptic neuron과 glia 세포의 세포막에 존재하는  $\text{Na}^+$ -dependent high affinity transporter에 의해서 세포외부에 존재하는 과량의 glutamate를 흡수하여 세포 외의 glutamate의 농도를 약  $0.3 \mu\text{M}$ 의 저 농도로 유지하지만, 대뇌의 동맥이 폐쇄되어 허혈 상태가 되면 glucose 및 산소의 공급이 결핍으로 에너지가 부족하게 되어 과량의 glutamate가 세포 내로 pump in를 할 수 없게 된다. 그 결과 세포외부의 glutamate의 농도는  $3 \text{mM}$ 정도 즉 정상상태의 약 1000배정도까지 높아지게된다(6). 이러한 과량의 glutamate는 presynaptic neuron의 세포막에 존재하는 NMDA, AMPA, kainate type 등의 glutamate receptor들과 지속적으로 결합하게 됨으로써 비정상적으로 많은 양의 칼슘이온이 세포 내로 유입하게 된다(7). 칼슘이외에 나트륨 이온도 NMDA receptor와 AMPA/kainate receptor에 의해서 세포 내로 유입되고 세포내 신호전달물질인 DAG와  $\text{IP}_3$ 의 농도가 metabotropic receptor에 의해서 증가하게 된다.  $\text{IP}_3$ 은 세포내 칼슘 저장고에서 칼슘이온을 방출하고 DAG은 칼슘 이온과 함께 membrane 단백질을

modify하여 신경세포의 excitatory signal에대한 감도를 증가시켜 결국 칼슘이온의 축적이 증폭하게 된다. 그 결과 세포내의 과량축적된 칼슘이온은 세포내의 phospholipase  $\text{A}_2$ , nitric oxide synthase, protease, endonuclease 등과 같은  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzyme들을 활성화시킨다. Phospholipase  $\text{A}_2$ 에 의해서 phospholipid가 분해되어 생성된 arachidonic acid는 대사과정에서 활성산소를 생성시킨다(8). 이러한 arachidonic acid와 활성산소는 다시 presynaptic neuron에서의 glutamate의 분비를 촉진시킬 뿐만 아니라 postsynaptic neuron과 glia세포의 glutamate흡수를 방해함으로써 세포 외의 glutamate의 농도를 더욱 증폭시킨다. 또한  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의해서 활성화된 calpain I이라는 peptidase는 xanthine dehydrogenase를 xanthine oxidase로 활성화시키며, xanthine oxidase에의한 purine 염기의 대사결과 superoxides가 생성하게된다. 그리고 nitric oxide synthase의 작용으로 생성된 nitric oxide는 superoxide와 반응하여 peroxynitrite를 거쳐 반응성이 큰 hydroxyl radical이 생성된다(9). 결국 phospholipase  $\text{A}_2$ , nitric oxide synthase, xanthine oxidase 등의 효소 작용 결과 세포 내에 활성산소가 생성되고, 이러한 활성산소들은 DNA, protein, lipid를 비선택적으로 파괴시켜 necrosis을 일으킴으로써 신경세포가 죽게 한다. 또한 endonuclease의 작용으로 apoptosis가 일어나기도 한다.

한편 Malouf 등은 N18TG-2(mouse neuroblastoma clone)와 rat embryonic neuronal retina의 hybridoma인 신경세포주 N18-RE-105 세포를 이용하여 glutamate 세포독성 기작을 연구하였다(10,11). 그 결과 N18-RE-105 세포는 quisqualate-type glutamate과 binding하고 delayed  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent cytotoxicity특성을 보이는 quis-type glutamate toxicity를 나타낸다고 보고하였다(12,13). 그 기작은 다음과 같이 밝혀졌다. Glutamate는 receptor에 결합할 뿐만 아니라 cystine-glutamate antiport site에도 강하게 결합하여 신경세포의 cystine uptake를 경쟁적으로 저해한다. 따라서 세포 내에서 산화환원균형을 적절히 유지하는 glutathione(GSH/GSSH level)의 농도가 감소하게 되어서 세포 내에 peroxide와 같은 활성산소가 축적하게 되어 지질과산화물을 통해서 세포가 죽게 된다. 또한 Murphy 등은 embryonic cortical neuron의 초대세포에서도 위의 사실을 확인하여 quis-type glutamate의 기작은 oxidative stress인 것으로 밝히고 활성

산소 소거물질에 의한 glutamate 독성의 억제는 뇌졸중 등의 뇌 질환 등의 치료법으로 가능하다고 보고하였다(14).

### 연구동향

Glutamate neurotoxicity의 작용기작을 근거로한 뇌졸중 치료제 개발 target으로는 glutamate release의 block, glutamate antagonist에 의한 glutamate receptor활성화의 block, 칼슘이온 채널의 block, 활성산소소거 등이 있다(1). 특히 NMDA receptor antagonist와 항산화제 개발을 중심으로 연구되어 왔다. 여러 glutamate receptor들 중에서 NMDA type receptor가 Ca<sup>2+</sup>이온에 대한 투과성이 가장 크기 때문에 NMDA receptor의 modulator에 대한 개발이 집중되어 왔다. 이중 대표적인 것으로는 amantadine과 같은 NMDA channel blocker, dizocilpine(MK-801)과 같은 NMDA antagonist, 7-chlorothiokynurenin acid와 같은 glycineB antagonist등이 있다(15). 특히 미생물 대사산물로는 토양 곰팡이인 *Verticillium sp.*으로부터 분리된 ES-242s화합물이 NMDA channel blocker 및 competitive NMDA antagonist로 보고되었다(16). 또한 NMDA receptor modulator이외에 NBQX, GYKI-52466 등과 같은 AMPA receptor antagonist등이 보고되었다(15). 그러나 대부분의 glutamate receptor modulator들은 비선택적 저해작용으로 정상적인 신경전달까지 방해함으로써 neuronal vacuolization 및 behavioral disturbance등의 심각한 부작용이 제기되고 있다(17). 이러한 부작용을 해결하기 위한 하나의 방법으로 subtype-specific antagonist의 개발이 대두되고 있는데 이는 Receptor의 subtype에 따라 central distribution, function 및 pharmacological specificity가 다르기 때문이다. 그러나 이를 위해 glutamate receptor의 subtype에 대한 분자생물학적, 약리학적 연구가 더욱 요청되고 있다.

한편, glutamate toxicity의 최종 원인 물질이 활성산소음이 밝혀짐에 따라 강력한 free radical scavengers이 개발 되어왔다. Upjohn사가 개발한 지질과산화 저해물질 U78517F는 21-aminosteroid의 amine unit와 vitamin E의 tetramethylchroman ring으로 구성된 화합물로 *in vivo* 실험에서 강한 뇌졸중 치료효과를 나타낸다고 보고되었다(18). 항산화물질 IRFI-016은 benzofuran를 기본골격으로 하며 뇌허혈후 재환류시 뇌세포의 손상을 크게 감소시키는 효과를 나타낸다고 보고되었다(19). 또한 N18-RE-105의 glutamate세포독성을 저해활성을 가지면서 free radical scavenger물질로 알려진 quinone계의 idebenone화합물은 뇌동맥경화증 및 뇌혈관장애성 치매에 대한 치료효과가 보고되었으며(20), 현재 일본에서 심장수술후, 장기이식후의 뇌대사 부활제로써 임상시험중이다. 한편 미생물 대사산물류의 항산화물질로는 carbazole계의 carquinostatin, carbazoquinocin, antiostatin, carazostatin, neocarazostatin, carbazomycin물

질, phenazine계의 benthocyanin, benthophocin, phenazoviridin 물질, 그리고 naphterpin, pyridoxin, thiozostatin, stealthin, pyrrolostatin화합물이 보고되었다(21). Kato 등(22)은 pyrrolostatin에 대하여 마우스 저산소성 치사모델을 이용하여 약효를 평가한 경우 200 mg/kg의 복강내 투여시 100%의 생존률을 보이는 항저산소 작용이 관찰되어 허혈성 뇌질환의 치료제로서 가능성을 시사하였다.

### 연구결과

#### 국 내

김 등(23,24)은 *in vitro* 허혈성 모델로서 N18-RE-105세포를 이용하여 각종 토양 미생물로부터 glutamate독성 억제물질 생산균주를 탐색하였으며, 이중 방선균 균주 *Streptomyces nitrosporeus* 30643으로부터 새로운 신경세포 보호물질을 분리하였다. 이 새로운 신경세포 보호물질은 *Streptomyces nitrosporeus* 30643의 배양액으로부터 ethylacetate 용매 추출, SiO<sub>2</sub> column chromatography와 HPLC를 이용하여 분리 정제 하였으며, 흰색 분말 상태의 순수한 benzastatins A, B, C, D, E, F, 그리고 G를 얻었다. Benzastatin의 구조는 IR, EIMS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H COSY, NOE 그리고 long-range <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H COSY의 실험 결과로부터 결정되었다 (Fig. 1). Benzastatins A와 B는 0 미생물 대사산물로는 매우 드물게 보고된 aminobenzamide 구조를 가지며, benzastatins C와 D는 tetrahydroquinoline 구조의 특이한 alkaloid계 화합물이었다. Benzastatins E, F 및 G는 미생물 대사물질로는 처음 분리된 indoline 골격을 가졌다. Benzastatins A, B, C, D, E, F 및 G는 N18-RE-105 세포에 대하여 농도 의존적으로 glutamate 독성을 저해하였으며 유효 농도치 (EC<sub>50</sub>)는 각각 47.6, 18.4, 2.0, 5.4, 1.7, 3.6 그리고 12.2 μM이었다 (Table 1). Benzastatins C와 E 물질의 활성은 Idebenone과 비교할 때 각각 3배, 2.4배 정도 낮은 반면, 독성은 각각 8배, 40배 이상 낮았다. 쥐 간의 microsome을 이용한 지질 과산화 저해활성을 조사한 결과

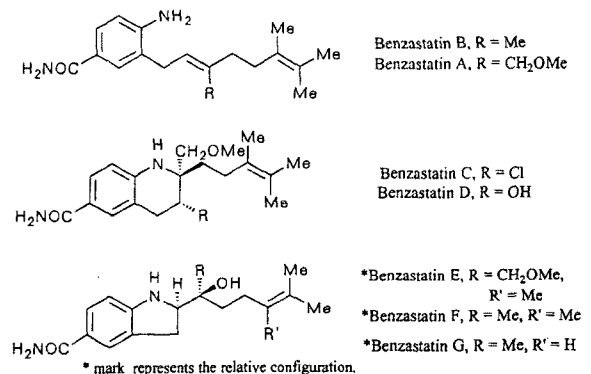
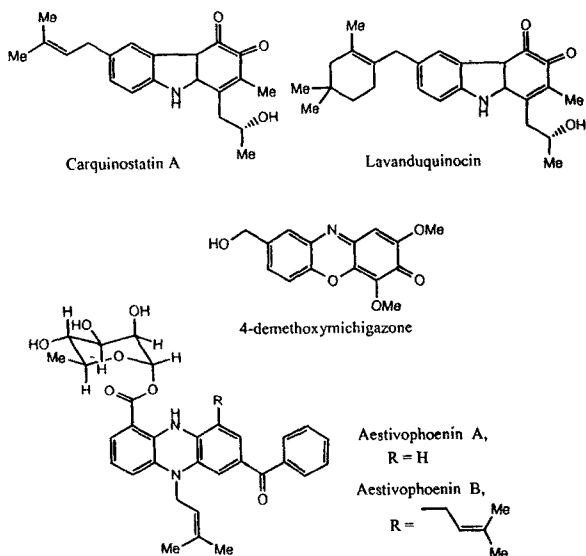


Fig. 1. The stereochemical structures of benzastatins.

**Table 1.** Free radical scavenging activity ( $EC_{50}$ ) and cytotoxicity ( $IC_{50}$ ) of benzastatins and related compounds

Compound	Rat liver microsomes		N18-RE-105	
	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$EC_{50}$	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	$IC_{50}/EC_{50}$
Benzastatin A	37.9	47.6	>100	>2.1
Benzastatin B	16.9	18.4	84.3	4.6
Benzastatin C	3.3	2.0	38.1	19.1
Benzastatin D	4.2	5.4	>200	>37.0
Benzastatin E	4.7	1.7	>200	>117.6
Benzastatin F	5.3	3.6	>200	>55.6
Benzastatin G	15.7	12.2	>200	>16.4
Vitamin E	3.9	3.5	>200	>57.1
Idebenone	4.1	0.7	4.9	7
4-aminobenzamide	>50	>100	>100	-
Indole acetic acid	>50	>100	>100	-

**Fig. 2.** The reported microbial substances protecting neuronal cells from glutamate toxicity.

benzastatins A, B, C, D, E, F 및 G는 각각 37.9, 16.9, 3.3, 4.2, 4.7, 5.3 그리고 15.7  $\mu$ M의 유효 농도를 나타내었다. Benzastatins C, D, E, F의 지질 과산화 저해활성은 vitamin E 및 idebenone과 비슷하였다.

## 국 외

Seto 등(25-28)은 N18-RE-105 세포를 이용하여 방선균의 배양액으로부터 carquinostatin A, lavanduquinocin, aestivophoenins A와 B, 4-demethoxymichigazone 등의 신경세포 보호물질을 분리하였다(Fig. 2). Carquinostatin A는 *Streptomyces exfoliatus* 배양액에서 분리된 carbazole계 화합물로 N18-RE-105와 초대 배양 hippocampus 세포에 대한

생물산업

glutamate 독성을 저해하였다. 그러나 rat의 뇌허혈 모델계에서는 활성이 나타나지 않았다고 보고되었다. Lavanduquinocin은 cyclolavandulyl unit을 갖는 carquinostatin A의 유도체이며, aestivophoenins는  $\alpha$ -rhamnose을 함유한 phenazine계 화합물이었다. Aestivophoenins 화합물은 40 nM에서 초대 배양 hippocampus 세포에 대한 glutamate 독성을 완전히 저해하는 활성을 나타낸다고 보고되었다.

## 참고문헌

- Justin A. Z. and D.W. Choi. 1991. Stroke therapy. *Sci. Am. July*, 36-43.
- Lynch, D. R. and T. M. Dawson. 1994. Secondary mechanisms in neuronal trauma. *Curr. Opin. Neurol.* 7, 510-506.
- Beal, M. F. 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness? *Ann Neurol.* 31, 119-130.
- Coyle, J. T. and P. Puttfarcken. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689-695.
- Lees, G. J. 1993. Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. *Neurosci.* 54, 287-322.
- Eimerl, S. and M. Schramm. 1994. The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J. Neurochem.* 62, 1223-1226.
- Choi, D. W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity and cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7, 369-379.
- Dumuis, A., M. Sebben, L. Haynes, J.-P. Pin and J. Bockaert. 1988. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 336, 68-70.
- Lipton, S. A., Y. B. Choi, Z. H. Pan, S. Z. Lei, H. S. V. Chen, N. J. Sucher, J. Loscalzo, D. J. Singel and J. S. Stamler. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.
- Malouf, A. T., J. T. Coyle, and R. L. Schnaar. 1984. Agonists and cations regulate the glutamic acid receptors on intact neuroblastoma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* 259, 12763-12768.
- Malouf, A. T., R. L. Schnaar, and J. T. Coyle. 1984. Characterization of a glutamic acid neurotransmitter binding site on neuroblastoma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* 259, 12756-12762.
- Murphy, T. H., A. T. Malouf, A. Sastre, A., R. L. Schnaar, R. L. and J. T. Coyle. 1988. Calcium dependent glutamate cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 444, 325-332.
- Murphy, T. H., A. T. Malouf, A. Sastre, A., R. L. Schnaar, R. L. and J. T. Coyle. 1988. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2, 1547-1558.
- Murphy, T. H., R. L. Schnaar, & J. T. Coyle. 1990. Im-

- munc cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB. J.* **4**, 1624-1633.
15. Danysz, W., C. G. Parsons, I. Bresink and G. Quack. 1995. Glutamate in CNS disorders. *Drugs News & Perspectives* **8**, 261-277.
  16. Toki, S., K. Ando, M. Yoshida, I. Kawamoto, H. Sano and Y. Matsuda. 1992. ES-242-1, A novel compound from *Verticillium* sp. binds to a site on N-methyl-D-aspartate receptor that is coupled to the channel domain. *J. Antibiotics* **45**, 88-92.
  17. Koek W., J. H. Woods, and G. D. Winger. 1988. MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* **245**, 969-974.
  18. Hall, D. E., J. M. Braughler, P. A. Yonkers, S. L. Smith, K. L. Linseman, E. D. Means, H. M. Scherch, P. F. Voigtlander, R. A. Lahti, and E. J. Jacobsen. 1991. U-78517F: A Potent inhibitor of lipid peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* **258**, 688-694.
  19. Calapai, G., F. Squadrito, A. Rizzo, C. Crisafulli, G. M. Campo, M. C. Marciano, G. Mazzaglia, and R. Scuri. 1993. A New antioxidant drug limits brain damage induced by transient cerebral ischaemia. *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **4**, 159-164.
  20. Nagaoka, A., M. Suno, M. Shibota, and M. Kakigana. 1984. Effects of idebenone(CV-2619) on neurological deficits, local cerebral flow, and metabolism in rats with experimental cerebral ischemia. *Folia Pharmacol. Jpn.* **84**, 303-309.
  21. 別府輝彦, 大村 智, 瀬戸治男, 山崎眞狩. 1993. 蛋白質核酸酵素 **38**, 144-156.
  22. Kato, S., K. Shino, H. Kawai, A. Odagawa, M. Matsuoka and J. Mochizuki. 1993. pyrrolostatin, a novel lipid peroxidation inhibitor from *Streptomyces chrestomyeticus*. *J. Antibiotics* **46**, 892-899.
  23. Kim, W. G., J. P. Kim, C. J. Kim, K. H. Lee and I. D. Yoo. 1996. Benzastatins A, B, C, and D : new free radical scavengers from *Streptomyces nitrosporeus* 30643. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiotics* **49**, 20-25.
  24. Kim, W. G., J. P. Kim and I. D. Yoo. 1996. Benzastatins A, B, C, and D : new free radical scavengers from *Streptomyces nitrosporeus* 30643. II. Structure determination. *J. Antibiotics* **49**, 26-30.
  25. Shin-ya, K., M. Tanaka, K. Furihata, Y. Hayakawa and H. Seto. 1993. Structure of carquinostatin A, a new neuronal cell protecting substance produced by *Streptomyces exfoliatus*. *Tetrahedron Lett.* **34**, 4943-4944.
  26. Shin-ya K. M., S. Shintaro, K. Toshihiro, F. Keiko, F. Kazuo, and S. Haruo. 1995. A New neuronal cell protecting substance, lavanduquinocin, produced by *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiotics* **48**, 574-5785.
  27. Shin-ya, K., S. Shimizu, T. Kunigami, K. Furihata, Y. Hayakawa and H. Seto. 1995. Novel neuronal cell protecting substances, Aestivophoenins A and B, produced by *Streptomyces purpeofuscus*. *J. Antibiotics* **48**, 1378-1381.
  28. Kunigami, T., K. Shin-ya, K. Furihata, Y. Hayakawa and H. Seto. 1996. A novel neuronal cell protecting substance, 4-demethoxymichigazone, produced by *Streptomyces halstedii*. *J. Antibiotics* **49**, 312-313.