

방선균주 7489가 생산하는 DNA Topoisomerase I 저해제에 관한 연구

이동선 · 하상철¹ · 이상용 · 김종국 · 홍순덕*
경북대학교 미생물학과, ¹한국과학기술연구원 생명공학연구소

DNA Topoisomerase I Inhibitor by *Streptomyces* sp. 7489. Dong-Sun Lee, Sang-Chul Ha¹, Sang-Yong Lee, Jong-Guk Kim and Soon-Duck Hong*. Department of Microbiology, College of Natural Science, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea, ¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusung 305-600, Korea - During the screening of inhibitor of DNA topoisomerase I from microbial secondary metabolites, *Streptomyces melanosporofaciens* 7489 which was capable of producing high level of inhibitor was selected from soil. The active compound (7489-1) was purified from the culture broth by solvent extraction, silica gel column chromatography and HPLC. The inhibitor was identified as dibutyl phthalate by spectroscopic methods of UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT and EI-MS. 7489-1 showed a strong inhibitory activity against topoisomerase I with 10 μ M of IC₅₀ value.

DNA topoisomerase I는 DNA 가닥의 절단과 재결합을 촉매하여 DNA topology를 조절함으로써 DNA 복제, 전사, recombination, chromosome separation 등과 같은 세포내 DNA 대사에서 필수적인 과정에 요구되는 핵산 관련효소로서, 암화학요법에서 세포내 중요한 표적이 되고 있다(1-3). 지금까지 개발된 항암제의 대부분(VP-16, teniposide, m-AMSA, adriamycin 등)은 topoisomerase II를 표적으로 하였으나, topoisomerase I를 표적으로 하는 항암제(camptothecin 및 그 유도체 등)(7, 8)는 소수에 불과하다. 이 논문에서는 DNA topoisomerase I의 활성을 저해하는 항암제를 탐색하였으며, 그 과정에서 *Streptomyces melanosporofaciens* 7489에서 생성되는 저해제를 분리정제하여 그 구조의 규명과 *in vitro*에서 topoisomerase I의 저해활성을 조사하였다.

재료 및 방법

활성균주의 배양

방선균 분리주 7489의 배양배지로는 soluble starch 10 g, soybean meal 15 g, yeast extract 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 1 g, CaCO₃ 2 g을 1l의 증류수에 녹인 후 pH를 7.0으로 조정하여 사용하였다. 본 배양을 위해서는 500 ml의 baffled flask 2개에 100 ml씩 3일 동안 배양한 종배양액을 8l의 배지에 접종한 후 28°C에서 1.2 vvm의 air와 350 rpm에서 배양하였다.

DNA topoisomerase I 저해제의 분리

3일 동안 배양한 배양액을 원심분리하여 균체와 상등

액을 분리한 후 균체에 acetone를 첨가하여 추출 및 농축하였다. 농축된 여액을 pH 7.0으로 조정 후 ethyl acetate를 사용하여 3회 추출한 뒤 재농축하였다. 이를 silica gel column chromatography(chloroform : methanol = 20 : 1), preparative TLC(chloroform : methanol = 10 : 1)를 사용하여 활성물질을 분리한 후 HPLC(70% MeOH)하여 7489-1(11.5 mg)을 얻었다.

사용기기

구조분석을 위한 NMR 분석은 Varian 300 Spectrometer, MS는 HP5989A Spectrometer, UV absorption은 Milton Roy Spectronic 3000 array Spectrophotometer, 그리고 화합물의 분리를 위한 HPLC는 Hitachi 사(L-6200)의 기기를 이용하여 225 nm에서 reverse phase ¹⁸C(μ Bondapak, 3.9×300 mm) column를 사용하였다.

DNA topoisomerase I 활성측정 방법

DNA topoisomerase I(Amersham Co.) 활성은 plasmid pBR322 DNA의 supercoiled form이 relaxed form 및 nicked form으로 전환되는 것을 관찰함으로써 결정하였다. 반응혼합액은 40 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM EDTA, bovine serum albumin(50 μ g/ml), 0.3 μ g의 pBR322 DNA, sample액 1 μ l, 1 unit의 topoisomerase I를 포함한다. 반응혼합액을 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 4 μ l의 loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40% glycerol and 2.5% SDS)를 첨가한 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 DNA topology를 관찰하였다.

*Corresponding author.

Key words: DNA topoisomerase I inhibitor, *Streptomyces melanosporofaciens* 7489, dibutyl phthalate

Whole broth (8 l)
 ↓ centrifuged
 Mycelium
 ↓ extracted with acetone
 ↓ evaporated
 ↓ extracted with EtOAc (three times)
 Silica gel column chromatography
 ↓ eluted with CHCl₃-MeOH (10:1)
 Preparative TLC
 ↓
 HPLC (70% MeOH)
 ↓
 7489-1 (11.5mg)

Fig. 1. Purification procedure of topoisomerase I inhibitor 7489-1 from the culture broth of *S. melanosporofaciens* 7489.

Table 1. Physico-chemical properties of antibiotic 7489-1.

Appearance	White powder
Molecular formular	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
EI-MS (m/z)	278 (M ⁺)
UV λ ^{MeOH} _{max} (nm)	206, 273
IR (KBr) ν cm ⁻¹ (=O)	1,710
TLC, SiO ₂ ^a (R _f)	0.34

^aChloroform : methanol (20 : 1)

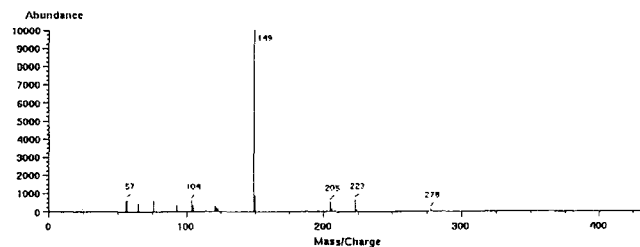


Fig. 2. EI-MS spectrum of 7489-1. The molecular weight of 7489-1 was determined to be 278.

결과 및 고찰

DNA topoisomerase I 저해제의 분리 정제

Streptomyces melanosporofaciens 7489 균주를 8l 배양하여 원심분리후 균체를 acetone으로 추출, 농축한 다음 다시 ethyl acetate로 추출한 뒤 농축하여 4.9g를 얻었다. 이를 silica gel(70~230 mesh, Merck Co.) column chromatography 하여 CHCl₃ : MeOH(20 : 1)의 전개용매로 용출하였다. 활성분획을 농축한 뒤 preparative TLC plate(Merck Co., silica gel, 0.5 mm)에 점적 후 chloroform : methanol(10 : 1)의 전개용매로 전개시켜 활성물질을 분리하였다. 그리고 70% MeOH로 HPLC

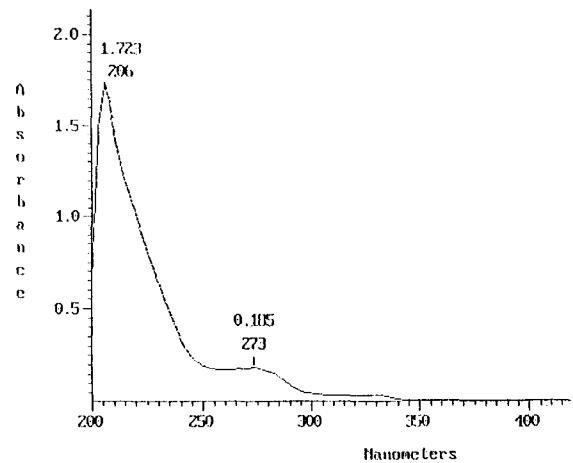


Fig. 3. UV absorption spectrum of 7489-1. The UV spectra of 7489-1 compound showed absorption maxima at 206 and 273 nm.

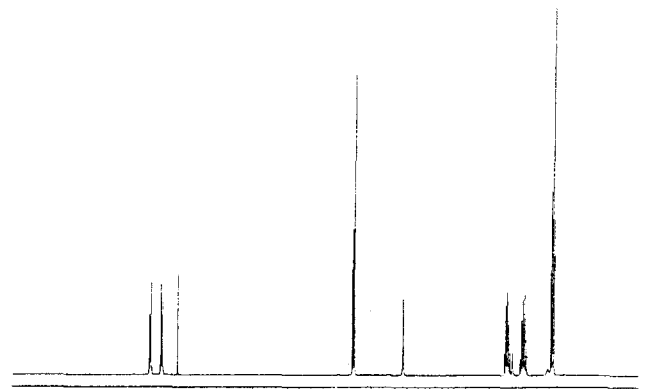


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of 7489-1 from *S. melanosporofaciens* 7489 (300 MHz, CDCl₃).

하여 순수한 7489-1(11.5 mg)을 얻었다(Fig. 1).

이화학적 성질

활성물질 7489-1의 이화학적 성질은 Table 1과 같다. 7489-1은 흰색의 결정이며 methanol, acetone, ethyl acetate에는 쉽게 녹고 물에는 녹지 않은 지용성 물질이다. EI-MS로 측정된 결과(Fig. 2) 278에서 (M⁺) peak가 관찰되어 이 7489-1의 분자량은 278로 확인되었으며 NMR에 의한 구조분석결과 분자식은 C₁₆H₂₂O₄로 결정되었다. 7489-1의 UV 흡수 spectrum은 Fig. 3과 같으며 methanol에서의 최대흡수파장은 206, 273 nm이었다.

구조결정

DNA topoisomerase I 저해제 7489-1의 ¹H-NMR은 Fig. 4와 같다. AB 7.52 ppm(dd, 1H)와 7.71 ppm (dd, 1H) 계를 가진 2개의 방향족 proton과 4.3 ppm(t, 2H)에 산소가 결합된 methylene의 signal이 관찰되었다. 1.72 ppm

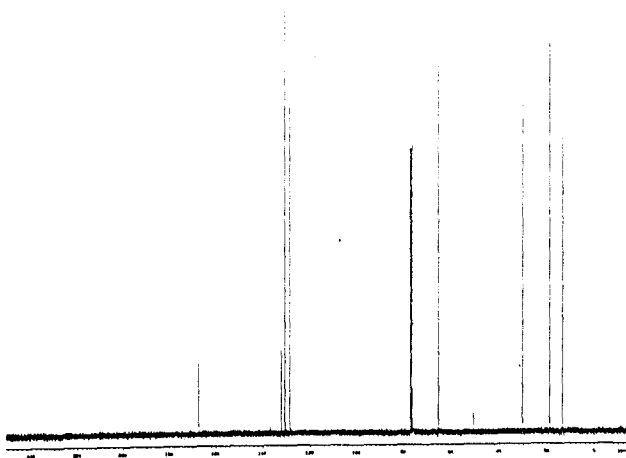


Fig. 5. ¹³C-NMR spectrum of 7489-1 from *S. melanosporofaciens* 7489 (75 MHz, CDCl₃).

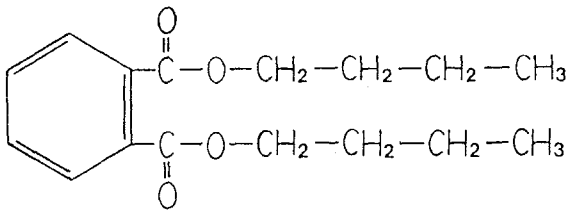


Fig. 6. Structure of dibutyl phthalate.

(m, 2H), 1.44 ppm(m, 2H) 부근에 methylene의 signal이 관찰되었으며 0.95 ppm(t, 3H)에 methyl기의 signal이 관찰되었다. Fig. 5에는 ¹³C-NMR spectrum을 나타내었다. 167.6 ppm에 carboxyl기의 signal이, 132.2 ppm에 방향족유래 4급탄소의 signal이, 130.8, 128.8 ppm에 방향족유래의 methine 탄소가, 65.5 ppm에 산소가 결합된 methylene의 signal이 각각 관찰되었다. 또한 30.5, 19.1 ppm에 methylene의 signal이 관찰되며 13.7 ppm에 methyl기의 signal이 관찰되었다. Distortionless Enhancement by Polarization Transfer(DEPT)-NMR의 경우 protonated 탄소의 수는 6개로 관찰되며, 이들은 각각 1개의 methyl기(13.7 ppm), 3개의 methylene기(65.5, 30.5 and 19.1 ppm), 2개의 methine기(130.8, 128.8 ppm)로 구성되어 있다(data not shown). 8개의 signal에서 관찰되는 탄소수와 mass spectrum에서 보이는 분자량은 서로 일치하지 않으므로 두개로 연결된 것으로 결론지었다. 이상 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS의 결과로 7489-1의 구조는 dibutyl phthalate로 결정되었다(Fig. 6).

*Streptomyces melanosporofaciens*에 의해 생산되는 dibutyl phthalate가 topoisomerase I 저해제로 알려진 것이 이 논문이 처음이다. 이 균주에서 생산되는 2차대사산물로서 chilaphylin(4, 10), elaiophylin(11), melanosporin(6, 12)와 dioctyl phthalate(13)등이 있었으며 이러한 물질들은 항균활성과 항암활성을 가지는 것으로 알려져

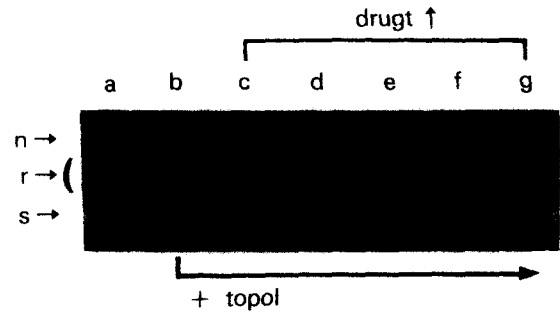


Fig. 7. Effect of dibutyl phthalate on relaxation assay of DNA topoisomerase I.

Plasmid DNA (pBR322, 0.3 μg) was treated with 1 unit of topoisomerase I in the presence of drug (lanes c~g) and then analyzed on an agarose gel; lane a, pBR322 DNA control; lane b, no drug; lanes c~g, dibutyl phthalate. Drug concentrations were as follows: lane c, 1 μM; lane d, 2.5 μM; lane e, 5 μM; lane f, 10 μM; lane g, 25 μM. "n", "r" and "s" denote nicked, relaxed and supercoiled DNA, respectively. Assay conditions are described under Materials and Methods.

있다. 그리고 dibutyl phthalate는 곰팡이의 한 균주인 *Penicillium bilaii* strain PB-50에서 생성(14)되는 것으로 알려져 있으며 특히 암세포에서는 DNA 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다(15).

7489-1의 Topoisomerase 활성저해

DNA topoisomerase I은 DNA의 supercoiled form에 nick를 야기시켜 relaxed form으로 전환(Fig. 7, lane b) 시키는 효소로서 Fig. 7에서와 같이 1 μM에서 10 μM (Fig. 7, lanes c~f)까지의 약제처리에서는 DNA의 relaxed form이 점진적으로 감소하였으며, 이에 상당하는 supercoiled form이 증가하였다. 그러나 25 μM(Fig. 7, lane g)에서는 topoisomerase I의 활성이 거의 완전히 저해됨을 알았다.

요 약

미생물로 부터 topoisomerase I 저해물질을 탐색하던 중 *Streptomyces melanosporofaciens* 7489 균주가 topoisomerase 활성을 저해하는 것을 발견하였다. 이에 균주가 생산하는 활성물질을 분리정제한 후 구조를 결정하였고 정제된 물질에 대한 활성을 조사하였다. 균체로 부터 acetone 추출, ethyl acetate 추출, silica gel column chromatography, preparative TLC 및 HPLC등을 통하여 topoisomerase 저해물질 7489-1을 정제한 후 UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, EI-MS등의 기기분석을 한 결과 저해물질은 dibutyl phthalate로 결정되었다. 7489-1의 topoisomerase I 저해활성은 1 μM에서 10 μM까지 점진적으로 감소하였으며 25 μM에서 완전히 저해되었다.

참고문헌

1. Wang, J.C. 1985. DNA Topoisomerase. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 665-695.
2. D'Arpa, P. and L.F. Liu. 1989. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochem. Biophys. Acta.* **989**: 163-177.
3. Liu, L.F. 1989. DNA Topoisomerase poisons as antitumor drug. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 351-375.
4. Yoshinori Yamashita, Sho-zou Kawada, N. Fujii, and H. Nakano. 1991. Induction of mammalian DNA Topoisomerase I and II mediated DNA cleavage by sain-topin, a new antitumor agent from Fungus. *Biochemistry* **30**: 5838-5845.
5. Schneider, E., Y.H. Hsling and L.F. Liu. 1990. DNA Topoisomerase as anticancer drug targets. *Adv. Pharmacol.* **21**: 149-183.
6. Dalica, K. and R.J. Franco. 1988. Inhibitors of DNA Topoisomerase. *Biochemistry* **27**: 2253-2258.
7. Giovanella, B.C., J.S. Stehlin, M.E. Wall, M.C. Wani, A.W. Nicholas, L.F. Liu, R. Silber and M. Potmesil. 1989. DNA Topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science* **246**: 1046-1048.
8. Hertzberg, R.P., M.J. Caranfa, K.G. Holden, D.R. Jakas, G. Gallagher, M.R. Mattern, S.M. Mong, J.O. Bartus, R.K. Johnson and W.D. Kingsbury. 1989. Modification of the hydroxyl lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J. Med. Chem.* **32**: 715-720.
9. Lee D.S., S.C. Ha, W.C. Shin, T.H. Park, J.G. Kim and S.D. Hong. 1995. Numerical identification of an actinomycetes strain producing an antitumor antibiotic with inhibitory activity against DNA topoisomerase I. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 123-130.
10. Astrio Rex and Luis Arrieta. 1973. Chilaphylin: A new Antibiotic produced by *Streptomyces melanosporofaciens* strain chilea. *The Journal of Antibiotics* **26**(3): 126-130.
11. Hammann, P. and G. Kretzschmar. 1990. Secondary metabolites by chemical screening, 6. Cleavage of elaiophylin and transformation into a spiroketal building block. *Tetrahedron* **46**: 5609-5616.
12. Arcamone, F.M., C. Bertazzoli, M. Ghilone and T. Scotti. 1959. Melanosporin and elaiophylin, new antibiotics from *Streptomyces melanosporus*. *Gion Microbiol.* **7**: 207-216.
13. Kim, S.K., S.S. Kim, K.S. Kim, Y.R. Chung and C.H. Kim. 1991. New antibiotics produced by *Streptomyces melanosporofaciens* II. Antimicrobial activities and isolation, purification and structure determination of the active compound. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 235-241.
14. Savard M.E., J.D. Miller, L.A. blois, K.A. Seifert, and R.A. Samson. 1994. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain pB-50. *Mycopathologia* **127**(1): 19-27.
15. Kageyama K., Y. Onoyama, T. Nokajima, S. Otani, I. Yano, H.Hotta, Y.I. Matsui, H. Kogawa and N. Miwa. 1994. DNA synthesis inhibitor and transmembrane permeation into tumor cells by various dialkyl phthalate upon hyperthermia. *Anticancer Res.* **14**(6B): 2769-2772.

(Received 26 September 1995)