

방선균 분리주가 생산하는 Phospholipase C 저해물질인 MT2617-2B의 분리 및 특성

고학룡 · 이현선 · 오원근 · 안순철 · 김보연 · 강대욱 · 민태익 · 안종석*
한국과학기술연구원, 생명공학연구소, 미생물화학연구그룹

Isolation and Characterization of MT2617-2B, a Phospholipase C Inhibitor Produced by an Actinomycetes Isolate. Hack-Ryong Ko, Hyun-Sun Lee, Won-Keun Oh, Soon-Cheol Ahn, Bo-Yeon Kim, Dae-Ook Kang, Tae-Ick Mheen, and Jong-Seog Ahn*. *Microbial Chemistry Research Group, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea* – A phospholipase C (PLC) inhibitor (MT2617-2B) was isolated from the culture broth of actinomycetes isolate MT2617-2 by the extraction with *n*-butanol and column chromatographic techniques. The molecular weight of the inhibitor was 1057, by the spectroscopic analyses of IR, ¹³C- and ¹H-NMR and ESI-MS. The chemical structure of MT2617-2B was found to be a macrolide compound consisted of a hemiketal ring, polyhydroxyl and polymethyl groups, which had a malonate and guanidine group as its side chain. MT2617-2B produced its two isomers having the same molecular weight by standing in methanol solution at room temperature. Therefore, MT2617-2B was identified as copiamycin and niphithricin A, macrolide antibiotics. The values of IC₅₀ against PLC-γ1 and PLC-β1 were 25 and 50 μg/ml, respectively. MT2617-2B had antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, but not against *Escherichia coli*.

Phosphatidylinositol specific phospholipase C (PI-PLC, PLC)는 growth factors, hormones 및 neurotransmitters 등의 자극에 의해 활성화되어 세포막에 소량으로 존재하는 phosphatidylinositol(4, 5) biphosphate(PIP₂)를 수용성의 inositol-(1,4,5)-triphosphate(IP₃)와 지용성의 diacylglycerol(DAG)로 분해하는 효소로서(1), 분해산물인 IP₃와 DAG가 PLC 매개 세포내 신호전달 체계에서 중요한 이차 신호전달물질로 알려져 있어 생체 신호전달 경로의 중심이 되고 있다(1, 2). 이들 분해산물은 각각 세포질내 일시적인 Ca²⁺의 방출(IP₃) 및 protein kinase C(PKC)의 활성화(DAG)를 유도하며(2, 3), 활성화된 PKC에 의해 growth factor receptors 및 nuclear transcription factors 등을 포함한 신호전달 관련 proteins의 활성화(phosphorylation)가 유도되어 궁극적으로 DNA 합성이나 세포분화와 같은 일련의 세포반응을 촉진한다(4, 5). Phosphoinositide에 특이적인 PLC는 각종 동물 조직에서 발견되고 있으며 현재까지 세 종류의 PLC (PLC-β, γ 및 δ)에서 적어도 16가지의 isoform이 알려져 있다(6). 이들 중 PLC-γ는 -β, δ와는 달리 receptor에 있는 phosphotyrosine 잔기와의 결합부위로 알려진 src-homology(SH) domain을 가지며(7, 8), 이 효소를 NIH 3T3 세포에 주입하면 암세포화된다는 보고(3)는 PLC-γ가 암세포의 증식에 중요한 역할을 할 것으로 추정케 한다. 한편, 지금까지 알려진 PLC의 세포내 신호전달 반응

에서의 다양한 조절역할을 볼 때 선택적인 PLC 저해제가 항암제를 비롯하여 순환계 질환 및 면역계 질환 치료제로의 개발 가능성을 보여주고 있어 최근 이들에 대한 탐색이 이루어 지고 있다(9, 10). 현재까지 알려진 PLC 저해물질로는 유기합성 ether lipid analogue인 ET-18-OCH₃(11) 및 phosphoinositol analogue(12) 등이 알려져 있으며 미생물 유래 PLC 저해물질로는 *Penicillium vinaceum*으로 부터 분리된 vinaxanthone(13), *Actinomadura* sp.의 Q12713(14), *Chatetosphaeronema hispidulum*의 hispidospermidin(15) 및 *Caloporus dichrous*의 caloporoside(16) 등이 최근에 보고되었다.

저자 등은 미생물의 이차 대사산물로 부터 PLC 저해물질을 탐색할 목적으로 여러 토양으로 부터 분리한

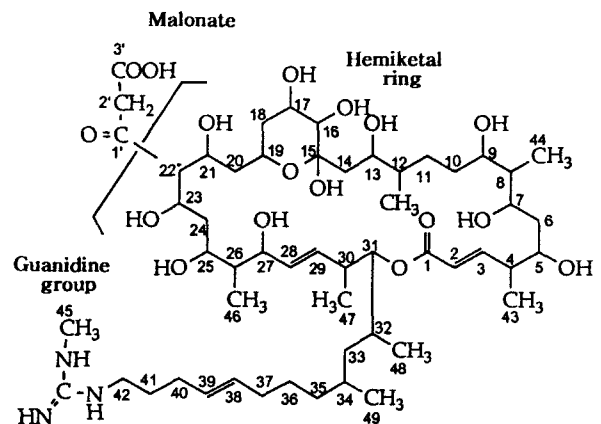


Fig. 1. Structure of copiamycin from Fukushima *et al.* (17).

*Corresponding author.

Key words: MT2617-2B, inhibitor of phospholipase C, macrolide, signal transduction

방선균의 배양액에 대한 PLC 저해활성을 조사하여 이들 중 활성을 보이는 분리주 MT2617-2를 선별하였다. 방선균 분리주 MT2617-2의 배양액으로 부터 PLC 저해활성물질인 MT2617-2B를 분리하였으며 구조분석 결과 기존의 32-membered macrolide 항생물질인 copiamycin (Fig. 1)(17) 및 niphithricin A(18)와 그 특성이 거의 일치하였다. 따라서, 본 논문에서는 MT2617-2B의 분리 및 구조분석 그리고 그 물리, 화학적 및 생물학적 특성을 유사구조의 macrolide 들과 비교하면서 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 미생물 및 세포주

저해제 생산균주로는 본 실험실에서 토양으로 부터 분리한 방선균 MT2617-2를 사용하였으며 항균력 시험에는 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* R209 및 *Candida albicans*를 사용하였다. 세포내 phosphatidyl inositol(PD)-turnover 및 phospholipase D(PLD) 저해활성 측정시 NIH 3T3 γ 1 세포를 사용하였으며 10% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다(19).

PLC 저해활성 측정

PLC 효소의 *in vitro* 저해활성 측정은 Rhee 등(20)의 방법에 따라 행하였으며, 이때 PLC 효소는 PLC- γ 1 cDNA가 재조합된 vaccinia virus를 감염시킨 HeLa-3S 세포로 부터 분리한 것을 사용하였다(21). 즉, 20 μ Ci의 [3 H]-PI가 포함된 50 μ M PI, 1 mM EGTA, 3 mM CaCl₂, 50 mM HEPES(pH 7.0) 및 0.1% sodium deoxycholate로 구성된 반응액 185 μ l에 검정시료 10 μ l와 효소액 5 μ l을 차례로 첨가한 다음 잘 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 CHCl₃/MeOH(2/1) 혼합용액과 5 mM EGTA를 포함한 1N-HCl 용액을 각각 1 ml과 0.3 ml 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 혼합액을 원심분리하여 수용액층의 radioactivity를 scintillation counter로 측정하여 저해정도를 비교하였다.

신호전달 저해활성 측정

PKC 효소 및 bleb forming 저해활성 측정은 이 등(22)의 방법으로 행하였으며, PKC 효소는 rat brain으로 부터 분리한 것을 사용하였다(21). PI-turnover 저해활성은 PLC- γ 1이 과발현되는 NIH 3T3 γ 1 형질전환 세포주를 이용하여 PDGF 처리에 의한 세포내 total inositol phosphate(IPt)의 증가로 부터 검정시료 첨가시 저해되는 정도를 [3 H]-IPt의 양으로 측정하였다(19). PLD 저해활성 측정을 위한 세포내 PEt의 측정은 Lee 등(19)의 방법으로 행하였다.

PLC 저해제의 생산 및 분리

저해제 생산배지인 GSS(glucose 1%, soluble starch 2%, soybean meal 2.5%, K₂HPO₄ 0.05%, pH 6.8) 배지 200 ml을 포함하는 1 l Erlenmeyer flask를 121°C에서 30분간 가압멸균한 후 방선균 분리주 MT2617-2를 접종, 28°C에서 3일간 진탕배양(140 rpm)된 배양액을 접종원으로 사용하여 GSS 배지 10 l을 포함한 15 l jar-fermenter로 28°C에서 7일간 배양(400 rpm)하여 PLC에 저해활성을 갖는 배양액을 얻었다.

방선균 분리주 MT2617-2의 배양액을 원심분리(6,000 rpm, 15분)한 후 침전된 균사체를 60% acetone으로 추출, 농축하여 적당량의 물에 용해시켜 배양액과 혼합한 다음 동량의 *n*-butanol로 3회 용매추출, 감압농축하여 PLC 저해활성을 가진 조추출물을 얻었다. 이 *n*-butanol 추출물을 silica gel에 흡착시켜 chloroform/MeOH (5/1) 용매로 충전된 silica gel column에 loading한 다음 동일 용매로 부터 MeOH까지 단계적으로 극성을 높혀 용출한 결과 chloroform/MeOH/물(2/1/0.05) 부분에서 PLC 저해활성을 확인하였다. 이 활성부분을 감압농축하여 소량의 chloroform/MeOH(1/1)에 용해시킨 후 동일용매로 평형화된 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 보다 정제된 활성부분을 얻은 다음 80% MeOH를 용매로 하여 RP-18 column을 통과시켜 부분 정제된 연노란색의 활성물질을 얻었다. 순수한 단일 활성물질을 얻기 위하여 부분정제된 활성분획을 prep. HPLC(Shimadzu LC-6A, column ; YMC Pack ODS-AM, 250 \times 6.0 mm, solvent ; 82% MeOH, UV 210 nm, flow rate ; 1.5 ml/min)를 행하여 retention time이 20분인 단일 활성 peak를 분취한 후 감압농축하여 흰색분말 상태의 MT2617-2B를 얻었다.

시약 및 기기

[3 H]-PI와 myo-[2- 3 H]inositol은 Amersham 사, L-3-phosphatidyl inositol(PI), HEPES, 및 EGTA는 Sigma 사, PDGF는 Genzyme 사 그리고 phosphatidylethanol (PEt)은 Avanti polar lipids 사로 부터 구입하였다. 물질 분리용 resins으로서 silica gel(70~230 mesh) 및 ODS RP-18(40~63 μ m)은 Merck 사, Sephadex LH-20은 Pharmacia 사 제품을 사용하였으며 PI-turnover 저해활성 측정시 사용된 Biorad AG 1X-8 anion exchange resin은 Biorad 사로 부터 구입하였다. HPLC 용 용매는 Baxter 사, NMR 용 CD₃OD는 Sigma 사로 부터 구입하여 사용하였다.

UV 및 IR spectrum은 각각 Shimadzu UV-260 spectrophotometer와 FT-IR(Laser precision analytical IFX-65S)을, 1 H- 및 13 C-NMR spectrum은 Varian UNITY 300 (300 MHz)을, 그리고 ESI(electrospray ionization)-MS는 VG 사의 Guattro를 이용하였으며, scintillation counter

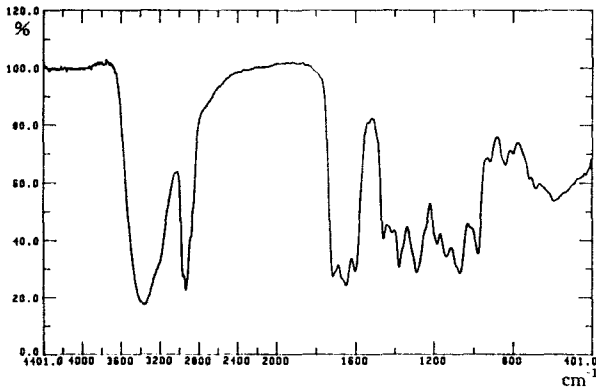


Fig. 2. IR spectrum of MT2617-2B.

는 Beckman 사의 LS 6000 TA를 이용하였다.

결과 및 고찰

MT2617-2B의 구조분석

방선균 분리주 MT2617-2로 부터 생산된 PLC 저해 활성물질인 MT2617-2B는 배양액의 *n*-butanol 추출에 의해 조추출물을 얻을 수 있으며 이를 silica gel, Sephadex LH-20 및 RP-18 column chromatography를 통하여 부분정제한 후 최종적으로 RP-HPLC로 부터 단일 활성 물질로 분리하였다. 감압건조된 MT2617-2B는 흰색분말로 silica gel TLC에서 *n*-butanol-acetic acid-물(63 : 10 : 23)의 용매조건으로 전개한 후 anisaldehyde-H₂SO₄로 발색시키면 진한 청색의 단일 spot으로 존재하였다. MT 2617-2B의 UV 최대 흡수 spectrum(MeOH 용액에서)은 end absorption 외에 220 nm 근처에서 shoulder를 보였으며(Table 3), IR 최대 흡수 spectrum(KBr)을 조사한 결과(Fig. 2), 다수의 hydroxyl group(3363~2933 cm⁻¹)과 carbonyl group(1712~1600 cm⁻¹)이 존재함을 알 수 있었다(17, 23, 24).

MT2617-2B의 ¹³C- 및 ¹H-NMR spectra를 Fig. 3에, 이들 NMR data의 assign 결과를 각각 Table 1과 2에 나타내었다. MT2617-2B의 ¹³C-NMR spectrum에서는 먼저 하나의 hemiketal moiety의 존재를 제시하는 한 탄소인 99.72 ppm의 signal, guanidine moiety의 존재를 추정케하는 한개의 guanidino 탄소 signal(158.22 ppm), 한개의 conjugated lactone carbonyl(168.19 ppm) 및 hemiester group(171.63, 174.19)의 존재를 나타내는 탄소 signals이 특징적인 signals로 인식되었다.

한편, Fiedler 등(18)은 1981년에 macrolide 항생제로서 niphithricins A와 B의 구조분석 실험에서 그들의 ¹³C-NMR spectrum의 signals 중 하나의 hemiketal moiety (99.5 ppm)와 guanidine moiety(158.0 ppm), 그리고 conjugated lactone carbonyl 및 hemiester group(168.0, 171.5, 174.0 ppm)의 탄소 signals의 존재를 제시하였다.

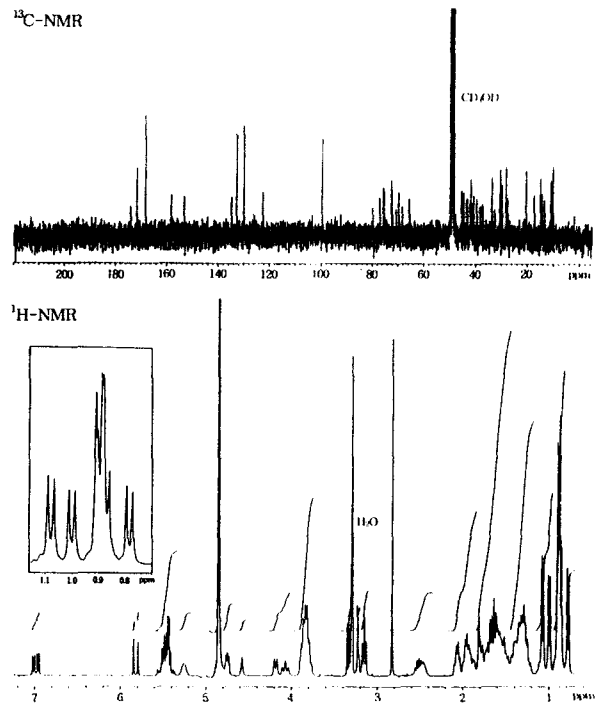


Fig. 3. ¹³C- and ¹H-NMR spectra of MT2617-2B in CD₃OD.

그 후 azalomycin F_{4a}(24, 25), copiamycin(17) 및 niphimycin(23) 등에서도 ¹³C- 및 ¹H-NMR spectra에 의한 이들 부분구조의 분석이 보고되었다. 따라서, MT2617-2B의 UV 최대 흡수 spectrum에서 220 nm의 shoulder와 IR spectrum에서 보인 1712~1600 cm⁻¹의 흡수대는 분자 내에 α, β-unsaturated acid(또는 ester) group의 존재를 예상할 수 있으며 NMR spectra의 부분적인 분석결과로부터 MT2617-2B는 macrocyclic ring을 가진 macrolide 계열의 물질로 추정되었다.

MT2617-2B의 ¹³C-NMR spectrum에서 나타난 7개의 methyl 탄소는 ¹H-NMR spectrum에서도 0.79~1.08 ppm 사이의 methyl protons이 21개(3H×7=21H)로 나타나 처음에는 이 분자가 7개의 methyl groups을 가지는 것으로 예상하였으나 guanidine moiety의 N-methyl 탄소가 28.30 ppm에서, 그리고 이의 proton signals이 2.83 ppm(singlet)에서 발견됨으로서 총 8개의 methyl groups이 존재하는 것으로 확인할 수 있었다. Methylene 및 methine group의 carbon atom으로 여겨지는 21개의 signals(27.66~45.55 ppm)은 이들 각각의 intensity 차이가 보여 1개 또는 2개의 carbon signal이 overlapping(예 : 41.96 ppm)되어 존재할 것으로 추정되었으며, ¹H-NMR spectrum 상에서는 이들(CH₂, CH) proton 들이 1.25~2.53 ppm 사이에서 겹쳐서 나타나 보다 정확한 assign이 어려웠다. Niphithricins(18)이나 copiamycin(17)의 경우에도 이 부분의 몇몇 carbon signals이 중복되므로서 명확한 구조해석이 제시되지 못하였다. Hydroxy 및

Table 1. Comparison of ¹³C-NMR data between MT2617-2B and copiamycin (in parenthesis)^a in CD₃OD

Signal No.	Chemical shift (ppm)	Multiplicity ^b	Assignment
1.	10.23 (10.48)	q (q)	
2.	10.94 (11.26)	q (q)	
3.	13.48 (14.46)	q (q)	
4.	14.42 (15.03)	q (q)	
5.	15.00 (16.53)	q (q)	(43)
6.	17.43 (17.69)	q (q)	(47)
7.	20.57 (20.69)	q (q)	
8.	27.66 (27.73)	t (t)	(40)
9.	28.30 (28.35)	q (q)	N-CH ₃
10.	29.84 (29.89)	t (t)	
11.	30.53 (30.63)	(t+d)	
12.	30.62 (30.75)	t (t)	
13.	32.67 (32.76)	d (d)	
14.	33.72 (33.42)	t (t)	
15.	33.90 (33.75)	t (t)	
16.	37.35 (37.34)	t (t)	
17.	38.37 (39.32)	t (t)	
18.	39.69 (39.80)	d (d)	
19.	40.89 (40.62)	d (d)	(30)
20.	41.22 (41.24)	t (t)	
21.	41.60 (41.58)	t (t)	(42)
22.	41.96 ^c (41.98)	t (t)	
23.	(42.02)	(t)	
24.	42.33 (42.42)	t (t)	
25.	43.31 (43.21)	t (t)	
26.	43.52 (43.45)	d (d)	(4)
27.	44.78 (44.67)	d (d)	
28.	44.80 (44.78)	t (t)	
29.	45.55 ^c (45.46)	m(d)	
30.	(46.10)	(t)	(2')
31.	65.42 (65.64)	d (d)	
32.	65.70 (68.81)	d (d)	
33.	68.38 (68.81)	d (d)	
34.	69.71 (69.71)	d (d)	
35.	70.71 (70.95)	d (d)	(d)
36.	72.22 (72.05)	d (d)	
37.	72.53 (72.52)	d (d)	
38.	75.19 (74.81)	d (d)	
39.	75.58 (75.75)	d (d)	
40.	75.63 (75.75)	d (d)	
41.	77.01 (77.02)	d (d)	(16)
42.	79.90 (80.08)	d (d)	(31)
43.	99.72 (99.73)	s (s)	(15)
44.	122.48 (123.22)	d (d)	(2)
45.	129.96 (129.97)	d (d)	(39)
46.	132.82 (132.79)	d (d)	(38)
47.	134.73 (134.80)	d (d)	(28)
48.	134.87 (134.89)	d (d)	(29)
49.	153.20 (152.52)	d (d)	(3)
50.	158.22 (158.29)	s (s)	N=CN ₂
51.	168.19 (168.22)	s (s)	(1)
52.	171.63 (171.59)	s (s)	(1')
53.	174.11 (174.10)	s (s)	(3')

^a data from Fukushima *et al.* (17).^b multiplicity was elucidated by DEPT-NMR spectrum.^c supposed to be overlapping signals.^d carbon bearing malonyl group.Table 2. Comparison of assigned ¹H-NMR^a signals between MT2617-2B and copiamycin (in parenthesis)^b in CD₃OD

Signal No.	Chemical shift (ppm)	Multiplicity	Assignment
1.	6.99 (6.92)	1H (1H), dd (dd)	(H-3)
2.	5.82 (5.87)	1H (1H), d (d)	(H-2)
3.	5.52 (5.53)	1H (1H), m (dd)	(H-29)
4.	5.47 (5.48)	1H (1H), m (m)	(H-38)
5.	5.44 (5.45)	1H (1H), m (m)	(H-28)
6.	5.41 (5.42)	1H (1H), m (m)	(H-39)
7.	5.26 (5.22)	1H (1H), m (m)	(H-3')
8.	4.75 (4.75)	1H (1H), dd (dd)	(H-31)
9.	4.19	1H, d	
10.	4.07	1H, t	
11.	3.89 (3.88)	(1H), (m)	(H-27)
	} (3.86)	7H (1H), m (m)	(H-17)
12.	3.77 (3.75)	(1H), (m)	(H-5)
14.	3.34 (3.38)	1H (1H), t (d)	(H-16)
15.	3.23 (3.23)	2H (2H), s (s)	(H ₂ -2')
16.	3.18 (3.16)	2H (2H), t (t)	(H ₂ -42)
17.	2.83 (2.83)	3H (3H), s (s)	(N-CH ₃)
18.	2.53 (2.53)	(1H), (m)	(H-30)
	}	2H, m	
	2.47 (2.47)	(1H), (m)	(H-4)
19.	2.06 (2.07)	2H (2H), m (m)	(H ₂ -40)
20.	1.98 (1.97)	(2H), (m)	(H ₂ -37)
	}	4H, m	
	1.87 (1.90)	(1H), (m)	(H-32)
21.	1.82 (1.65)	(2H), (m)	(H ₂ -42)
	}	15H, m	
	1.47		
22.	1.44~1.25	10H, m	
23.	1.08 (1.12)	3H (3H), d (d)	(H ₃ -43)
24.	1.00 (0.99)	3H (3H), d (d)	(H ₃ -47)
25.	0.91 (0.87)	(3H), (d)	(H ₃ -48)
	}	12H(3H×4), m	
	0.86		
26.	0.79 (0.78)	3H (3H), d (d)	

^a TMS was used as an internal standard.^b data from Fukushima *et al.* (17).

acyloxy carbon으로 추정되는 12개의 signals이 65.42~79.90 ppm 사이에서 발견되었으며, 여기에는 malonyl group과 연결된 탄소일 것으로 생각되는 70.71 ppm의 signal이 포함되어 있으며 이 탄소의 methine proton과 malonyl group 내의 methylene proton signals이 각각 5.26 ppm(multiplet, 1H)과 3.23 ppm(singlet, 2H)에서 발견되어 분자내에 한개의 malonyl group(hemiacetal)이 존재함을 알 수 있었다. 또한, hemiketal moiety를 포함한 hydroxyl groups이 3.34 ppm(triplet) 및 3.77~3.89 ppm(multiplet) 사이에서 다수의 proton signals로 나타나 copiamycin(17)의 구조내에 존재하는 polyhydroxyl

groups의 존재와 일치하는 결과를 보였다. MT2617-2B의 ^{13}C -NMR spectrum에는 3개의 carbon-carbon double bonds를 나타내는 6개의 carbon signals(122.48~153.20 ppm)이 존재하였으며 이는 olefinic carbon으로서 이중 하나의 double bond는 lactone group의 α , β -위치의 것으로 추정되었다(18). 이들 olefinic carbon에 해당되는 2개의 proton signals은 6.99 ppm에서 double-doublet과 5.82 ppm에서 doublet으로 나타났으며 나머지 4개의 proton signals(2 carbon-carbon double bonds)은 5.41~5.52 ppm 사이에서 multiplet으로 overlapping 되어 존재하였다. MT2617-2B의 ^1H -NMR spectrum에는 guanidine moiety의 N-methyl 및 N-methylene groups의 proton signals이 각각 2.83 ppm(singlet)과 3.16 ppm(triplet)에서 나타나 copiamycin(17)이나 azalomycin F_{4a}(25)의 유사 부분구조와 거의 일치하는 것으로 분석되었다.

이상의 ^{13}C - 및 ^1H -NMR data의 분석결과, PLC 저해제로 분리된 MT2617-2B는 54개의 탄소를 가진 macrolide 화합물로서 기존의 macrolide 계열의 항생물질 중 copiamycin(17) 및 niphithricins(18)과 매우 유사한 것을 알 수 있었으며, niphithricins의 경우 ^1H -NMR spectrum에서는 구별되지 않으나 ^{13}C -NMR spectrum에서의 각 signals의 intensity의 비교결과, niphithricins A, B 중 A와 거의 일치하는 것으로 판단되었다. 그러나 niphithricins의 경우 NMR spectra의 자세한 assign data가 아직까지 제시되지 않았으며, copiamycin은 Table 1에서 비교한 바와 같이 대부분의 ^{13}C -NMR spectrum 상의 signals이 거의 일치하며, 단지 methyl carbon으로 assign된 signals 중 몇 개(예: 13.48, 14.42, 15.00 ppm)의 chemical shift에서 약간씩 차이를 보였다.

MT2617-2B, copiamycin(17) 및 niphithricins(18)과 같이 한개의 hemiketal 및 guanidine moiety 그리고 olefinic carbonyl group을 가지는 유사구조의 macrolide 화합물로는 niphimycin(23), amycins(26), azalomycin Fs(25, 27), scopafungin(28), neocopiamycin A(29), guanidylfungin A(30), guanidolide A(31) 및 malolactomycins(32) 등이 있으며 이들은 모두 Gram-positive bacteria나 fungi에 대한 항생물질로 보고되었고 다른 생물학적 활성에 관한 보고는 거의 없다.

한편, MT2617-2B의 ESI-MS spectrum을 조사해 본 결과(Fig. 4), m/z 1080($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 1058($\text{M}+\text{H}$)⁺, 1057(M)⁺ 및 972($+\text{H}$)⁺ 등의 주요 ion peaks가 발견되었으며 이 중 1057이 MT2617-2B의 분자 ion인 것이 확실시 되며 m/z 972는 분자 ion으로 부터 malonyl group($\text{CO}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, 87)이 제거된 것으로 판단되었다. Copiamycin의 경우, Fukushima 등(17)은 FD-MS에서 m/z 1057(M^+) 또는 1058(MH^+) 그리고 FAB-MS에서 m/z 1058(MH^+)로, Takesako 등(33)은 SI-MS에서 m/z 1058($\text{M}+\text{H}$) 및 970($\text{M}-\text{COCH}_2\text{COOH}$)의 ion peaks가 발견된 것으로 보고하였다. 또한 copiamycin과 동일 배양액에서

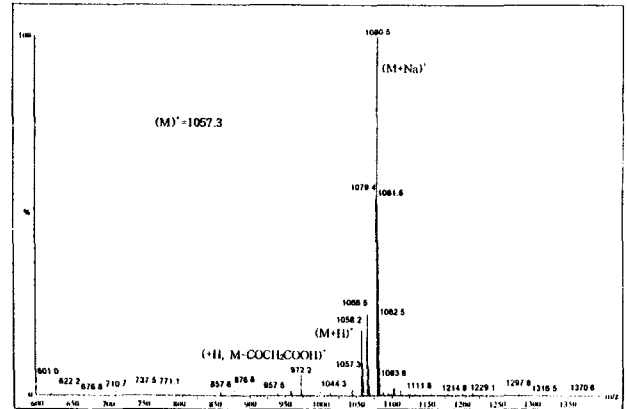


Fig. 4. ESI-MS spectrum of MT2617-2B.

분리되어 N-demethylcopiamycin으로 구조결정된 neocopiamycin A(29)의 FAB-MS spectrum에서도 유사한 fragmentation pattern을 관찰할 수 있었다. Niphithricins의 경우(18), A 및 B가 공히 FD-MS에서 m/z 1058 및 1080(M^++Na)의 ion peak가 나타난 것으로 보고되어 MT2617-2B가 copiamycin이나 niphithricins과 같은 분자량을 가지며 거의 유사한 구조일 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

따라서, 이상의 MT2617-2B에 대한 구조분석 결과, MT2617-2B는 기존 발표된 copiamycin(17, 33) 및 niphithricin A(18)와 거의 동일한 구조일 것으로 판단되며, Fukushima 등(17)도 copiamycin이 niphithricins와 가장 유사한 것으로 보고하였기 때문에 이 세가지 화합물이 같은 구조일 가능성이 높은 것으로 사료되었다.

MT2617-2B는 methanol 용액상태에서 약 1개월 동안 방치한 후 동일조건 하에서 재 HPLC를 행하였을 때, retention time 20분인 MT2617-2B의 본래 peak외에 각각 17분 및 13분의 retention time을 가지는 또 다른 2개의 peak가 나타났으며(Fig. 5), 이들이 MT2617-2B 분자내의 malonyl moiety가 제거된 형태의 유도체일 것으로 추정하였으나 각각을 분취하여 MS spectrum을 조사해 본 결과(data not shown), 분자량 뿐만 아니라 fragmentation pattern도 모두 거의 동일한 양상을 나타내어 이들이 같은 구조의 이성질체일 것으로 추정되었다. 이러한 결과는 niphithricin A가 용액상태에서 B로 전환되며 이들은 서로 hemiketal carbon atom에서 epimerization에 의한 이성질체일 것으로 해석한 보고(18)와 유사한 것이다. Niphithricin A와 함께 MT2617-2B와 거의 일치하는 구조로 생각되는 copiamycin의 경우, 비록 동일 방선균 배양액으로 부터 neocopiamycin A(29)와 guanidolide A(31)가 분리되었지만 이들은 copiamycin과는 분자량이 다른 각각 demethyl- 및 demalonylmethyl-copiamycin 구조의 유도체로서 용액상태에서 copiamycin의 다른 이성질체로의 전환은 아직 제시되지 않았다. MT2617-2B와 유사구조의 macrolides인 azalomy-

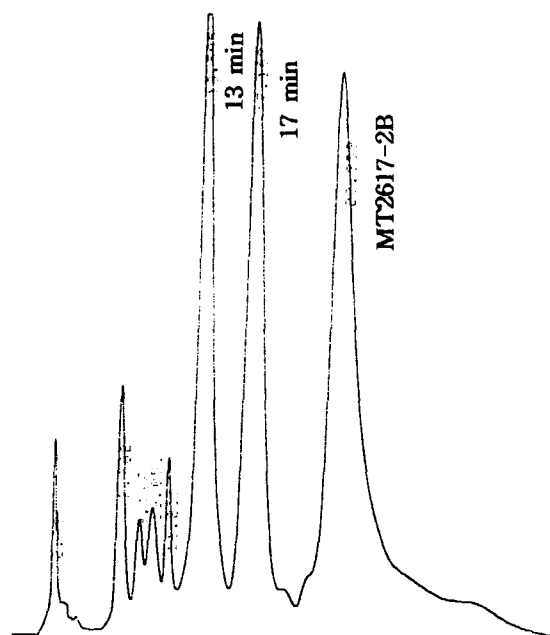


Fig. 5. HPLC profiles of MT2617-2B and its isomers. Column; YMC Pack ODS-AM (RP-18, ϕ 250 \times 4.6 mm, eluant; methanol:water (82:18), detector; UV 210 nm, flow rate; 1.5 ml/min.

cins은 F3, F4 및 F5 등 분자내 methyl group의 갯수와 위치의 차이에 따른 유도체들 뿐만 아니라 이들 각각이 서로 interconversion되는 이성체(F_{3a} , F_{4a} , 및 F_{5a})를 가지는 것으로 보고되었으며(24, 27), 최근의 malolactomy-cins도 methanol 용액에서 서로 interconversion되는 이성체를 가지며 NMR 분석에 의해 이들이 malonyl 잔기의 위치가 서로 바뀐 이성체인 것으로 보고되었다(32). 또한, 다른 유사구조의 macrolide 계열물질인 amycins(26), guanidylfungins(30) 및 niphimycin(23, 26) 등은 malonyl 잔기의 유무 또는 갯수에 따른 유도체들이 동일 미생물 배양액에서 발견된 것으로 보고되었다. MT2617-2B는 NMR data 및 ESI-MS spectrum으로 부터 단일 malonyl 잔기가 존재하는 것으로 확인되었고, methanol 용액에서 세개의 유도체가 생성되었으나 이들이 MT2617-2B와 같은 분자량을 가지며 거의 동일한 것으로 분석되었으므로 단순히 분자내 특정 잔기가 제거된 유도체가 아니라 niphithricins의 경우처럼 hemiketal carbon atom에서의 epimerization에 의한 이성질체이거나, malonyl 잔기의 위치전환에 따른 이성질체일 가능성이 높은 것으로 추정되었다. 또한 MT2617-2B는 copiamycin과 그 구조분석 결과가 거의 일치하나 ^{13}C -NMR spectrum에서 몇몇 methyl carbon signals의 chemical shift가 차이를 보이므로 MT2617-2B의 몇몇 methyl group의 결합탄소 위치가 다른 유도체일 가능성도 있지만 이의 명확한 구조적 해석을 위해서는 MT2617-2B 및 degradation products의 보다 자세한 구조분석이 요구된다.

Table 3. Physico-chemical properties of MT2617-2B

Appearance	Whitish powder
Soluble in	Methanol, dimethyl sulfoxide
Slightly soluble in	Water
Insoluble in	Chloroform, ethylacetate, <i>n</i> -hexane
Color reactions	
Positive	20%- H_2SO_4 , anisaldehyde- H_2SO_4 , ninhydrin, I_2 vapour
Negative	Bromocresolgreen, Dragendorff's, Ehrlich, FeCl_3
UV λ_{max} (in methanol)	End absorption, 220 nm (shoulder)
R_f values in TLC	
Silica gel (60 F-254, Merck)	0.29 (<i>n</i> -butanol-acetic acid-water; 67:23:10) 0.34 (<i>n</i> -butanol-acetic acid-water; 67:10:23)
RP-18 ($F_{254}\text{S}$, Merck)	0.22 (85% methanol)

MT2617-2B의 물리, 화학적 성질 및 생물학적 활성

MT2617-2B는 흰색의 분말로서 methanol이나 DMSO에는 잘 용해되며 물에는 약간 용해되고 chloroform, ethylacetate 및 hexane 등에는 거의 용해되지 않았다 (Table 3). MT2617-2B는 TLC plate 상에서 20%- H_2SO_4 , anisaldehyde-20% H_2SO_4 및 ninhydrin 등에 발색되며 bromocresol green이나 Dragendorff's reagent 등에는 발색되지 않았다. Silica gel(*n*-butanol-acetic acid-물(67 : 23 : 10)) 및 RP-18(85% MeOH) TLC plate에서 각각 전개시켰을 때 각각 0.29와 0.22의 R_f 값을 나타내었으며, niphithricin A가 동일조건인 silica gel TLC plate에서 R_f 0.20으로 보고(18)되어 다소 차이를 보였다.

MT2617-2B는 PLC- γ 1 및 - β 1에 대해 각각 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC_{50} 값을 가지는 저해활성을 보였으나 PLD에 의한 세포내 PEt의 생성은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서도 저해활성을 보여주지 않았다(Table 4). 또한, PI-turnover 저해활성이나, PKC 효소, 그리고 강력한 발암제인 phorbol ester에 의해 유도되는 K562 세포표면의 소포형성(bleb forming)에도 저해활성이 인정되지 않았다. 따라서, macrolide MT2617-2B는 세포내 시험된 신호전달 관련 효소들 중 PLC에 특이적인 저해제임을 알 수 있었다. 한편, MT2617-2B와 유사구조를 가진 기존의 macrolides는 모두가 antimicrobial activity를 가진 항생물질로서만 보고되었으며, 기타 다른 생물학적 활

Table 4. Biological activities of MT2617-2B

Targets	IC ₅₀ or MIC
Phospholipase C-γ1	25 µg/ml
Phospholipase C-β1	50 µg/ml
Phospholipase D	>200 µg/ml
Protein kinase C	>200 µg/ml
PI-turnover	>200 µg/ml
Bleb forming	>200 µg/ml
Antimicrobial activities	
<i>Escherichia coli</i>	>200 µg/disc ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> R209	5 µg/disc ^a
<i>Candida albicans</i>	40 µg/disc ^a

^aMinimum amount appearing inhibition zone.

성에 관한 보고는 거의 없다.

MT2617-2B는 Gram-negative bacteria인 *E. coli*에 대해서는 200 µg/disk 이상의 농도에서도 저해활성을 보이지 않았으나 Gram-positive bacteria인 *S. aureus* 및 fungi에 속하는 *C. albicans*에 대해서는 각각 5 및 40 µg/disk의 농도에서도 저해활성을 보여주었다. 이러한 저해활성 경향은 copiamycin(33, 34), neocopiamycin A (29), guanidylfungin A(33), niphithricins(18), niphimycin (26) 및 guanidolide A(31) 등의 결과와 유사하며, niphithricins의 경우 A의 활성이 B보다 강하고 MT2617-2B와 비슷한 수준의 저해활성을 보여, 앞의 구조분석에서 고찰한 바와 같이 MT2617-2B가 niphithricin A일 것이라는 것을 간접적으로 시사하는 것이다.

요 약

방선균 분리주 MT2617-2의 배양액으로부터 phospholipase C(PLC) 저해물질인 MT2617-2B를 *n*-butanol 추출 및 column chromatography 법을 이용하여 분리하였다. MT2617-2B는 IR, ¹³C- 및 ¹H-NMR 그리고 ESI-MS에 의한 구조분석 결과, 한 개의 hemiketal ring, polyhydroxyl 및 polymethyl groups으로 구성되었으며 side chain으로 한 개씩의 malonate 및 guanidine group을 가지는 분자량 1057의 macrolide 화합물이었다. 따라서, MT2617-2B를 기존의 macrolide 항생제인 copiamycin 및 niphithricin A로 동정하였다. 한편, MT2617-2B는 methanol 용액에서 실온에서 방치하였을 때 동일한 분자량을 가진 두 개의 이성질체를 생성하였다. PLC-γ1과 -β1에 대해 각각 25 및 50 µg/ml의 IC₅₀ 값을 가지며, *Staphylococcus aureus*와 *Candida albicans*에 대해서는 항균활성을 나타내지만 *Escherichia coli*에는 나타내지 않았다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 선도기술개발 사업의 일부에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Berridge, M.J. and R.F. Irvine. 1989. Inositol phosphates and cell signaling. *Nature* **341**: 197-205.
- Majerus, P.W., T.S. Ross, T.W. Cunningham, K.K. Caldwell, A. Bennett Jefferson, and V.S. Bansal. 1990. Recent insights in phosphatidylinositol signaling. *Cell* **63**: 459-465.
- Berridge, M.J. and R.F. Irvine. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-321.
- Whitaker, M. and M. Aitchison. 1985. Calcium-dependent phosphoinositide hydrolysis is associated with exocytosis *in vitro*. *FEBS Lett.* **182**: 119-124.
- Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-613.
- Rhee, S.G. and K.D. Choi. 1992. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **267**: 12393-12396.
- Moran, M.F., C.A. Koch, D. Anderson, C. Ellis, L. England, G.S. Martin, and T. Pawson. 1990. Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 8622-8626.
- Wahl, M.I., N.E. Oleshaw, B. Nishibe, S.G. Rhee, W.J. Pledger, and G. Carpenter. 1989. Platelet-derived growth factor induces rapid and sustained tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma in quiescent Balb/c3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2934-2943.
- Bleasdale, J.E. 1992. Inhibitors of phospholipase C-dependent processes. *Drugs of the Future* **17**: 475-487.
- Powis, G. 1993. Inhibitors of phospholipase C. *Drugs of the Future* **18**: 343-350.
- Powis, G., M.J. Seewald, C. Cratas, D. Melder, J. Riebow, and E.J. Modest. 1992. Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. *Cancer Research* **52**: 2835-2840.
- Potter, B.V.L. 1990. Recent advances in the chemistry and biochemistry of inositol phosphates of biological interest. *Natural Product Reports* **1**: 1-24.
- Aoki, M., Y. Itezono, H. Shirai, N. Nakayama, A. Sakai, Y. Tanaka, A. Yamaguchi, N. Simma, K. Yokose, and H. Seto. 1991. Structure of a novel phospholipase C inhibitor, vinaxanthone (Ro 09-1450), produced by *Penicillium vinaceum*. *Tetrahed. Lett.* **32**: 4737-4740.
- Ogawara, H., K. Higashi, S. Manita, K. Tanaka, Y. Shimizu, and L. Shufang. 1993. An inhibitor of inositol-specific phospholipase C. *J. Antibiotics* **45**: 1365-1366.
- Ohtsuka, T., Y. Itezono, N. Nakayama, A. Sakai, N. Shimma, and K. Yokose. 1994. Hispidospermidin, a novel phospholipase C inhibitor produced by *Chaetosphaeronema hispidulum* (Cda) Moesz NR 7127. II. Isolation, characterization and structural elucidation. *J. An-*

- tibiotics* **47**: 6-15.
16. Weber, W., P. Schu, T. Anke, R. Velten, and W. Steglich. 1994. Caloporoside, a new inhibitor of phospholipase C from *Caloporus dichrous* (Fr.) Ryv. *J. Antibiotics* **47**: 1188-1194.
 17. Fukushima, K., T. Arai, S. Iwasaki, M. Namikoshi, and S. Osada. 1982. Studies on macrocyclic lactone antibiotics. VI. Skeletal structure of copiamycin. *J. Antibiotics* **35**: 1480-1494.
 18. Fiedler, H.-P., W. Wörner, H. Zärner, H.P. Kaiser, W. Keller-Schierlein, and A. Müller. 1981. Metabolic products of microorganisms. Isolation and characterization of niphithricins A, B, and elaiophylin, antibiotics produced by *Streptomyces violaceoniger*. *J. Antibiotics* **34**: 1107-1118.
 19. Lee, Y.H., H.S. Kim, J.K. Pai, S.H. Ryu, and P.G. Suh. 1994. Activation of phospholipase D induced by platelet-derived growth factor is dependent upon the level of phospholipase C- γ 1. *J. Biol. Chem.* **269**: 26842-26847.
 20. Rhee, S.G., S.H. Ryu, K.Y. Lee, and K.S. Cho. 1991. Assays of phosphoinositide-specific phospholipase C and purification of isozymes from bovine brain. *Methods in Enzymol.* **197**: 502-511.
 21. 안종석, 이현선, 안순철, 오원근, 강대욱, 류성호, 서판길. 1993. 세포반응의 신호전달 조절 선도물질의 탐색기술 개발. *과기처 연구보고서*.
 22. 이현선, 박문수, 오원근, 안순철, 김보연, 김환목, 오구택, 민태익, 안종석. 1993. 능소화의 꽃받침으로부터 protein kinase C 저해물질인 Verbascoside의 분리 및 그 생물활성. *약학회지* **37**(6): 598-604.
 23. Bassi, von L., B. Joos, P. Gassmann, H.-P. Kaiser, H. Leuenberger and W. Keller-Schierlein. 1983. On the structure elucidation of niphimycin, Part I. Purification and characterization of the niphimycins Ia and Ib; Degradation by nitric acid. *Helv. Chim. Acta* **66**: 92-117.
 24. Namikoshi, M., K. Sasaki, Y. Koiso, K. Fukushima, S. Iwasaki, S. Nozoe, and S. Osada. 1982. Studies on macrocyclic lactone antibiotics. I. Physicochemical properties of azalomycin F_{4a}. *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 1653-1657.
 25. Namikoshi, M., S. Iwasaki, K. Sasaki, M. Yano, K. Fukushima, S. Nozoe, and S. Okuda. 1982. Studies on macrocyclic lactone antibiotics. II. Partial structures of azalomycin F_{4a}. *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 1658-1668.
 26. Grabley, S., P. Hammann, W. Raether, and J. Wink. 1990. Secondary metabolites by chemical screening. II. Amycins A and B, two novel niphimycin analogs isolated from a high producer strain of elaiophylin and nigericin. *J. Antibiotics* **43**: 639-647.
 27. Iwasaki, S., P. Namikoshi, K. Sasaki, K. Fukushima, and S. Osada. 1982. Studies on macrocyclic lactone antibiotics. V. The structures of azalomycins F_{3a} and F_{5a}. *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 4006-4014.
 28. Samain, D., J.C. Cook Jr. and K.L. Rinehart Jr. 1982. Structure of scopafungin, a potent nonpolyene antifungal antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 4129-4141.
 29. Arai, T., J. Uno, I. Horima, and K. Fukushima. 1984. Isolation of neocopiamycin A from *Streptomyces hygrosopicus* var. *crystallogenes*, the copiamycin source. *J. Antibiotics* **37**: 103-109.
 30. Takesako, K. and T. Beppu. 1984. Studies on new antifungal antibiotics, guanidylfungins A and B. II. Structure elucidation and biosynthesis. *J. Antibiotics* **37**: 1170-1186.
 31. Fukai, T., C. Takahashi, T. Nomura, J. Uno, and T. Arai. 1988. Guanidolide A, a novel antibiotic produced by *Streptomyces hygrosopicus* var. *crystallogenes*, the copiamycin source. *Heterocycles* **27**: 2333-2340.
 32. Koshino, H., K. Kobinata, J. Uzawa, M. Uramoto, K. Isono, and H. Osada. 1993. Structure of malolactomycins A and B, novel 40-membered macrolide antibiotics. *Tetrahedro.* **49**: 8827-8836.
 33. Takesako, K., T. Beppu, T. Nakamura, and A. Obayashi. 1985. Demalonyl derivatives of guanidylfungin A and copiamycin: Their synthesis and antifungal activity. *J. Antibiotics* **38**: 1363-1370.
 34. Kuroda, S., J. Uno, and T. Arai. 1978. Target substances of some antifungal agents in the cell membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**: 454-459.

(Received 6 September 1995)