

신규 항균물질 5-S-GAD(*N*- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine)의 합성 및 생리활성

임재윤[#] · 박호용 · Natori Shunji*

생명공학연구소, 동경대학 약학부*

(Received February 9, 1998)

Synthesis and Biological Activity of 5-S-GAD (*N*- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine), a Novel Antibacterial Substance

Jae Yoon Leem[#], Ho Yong Park and Shunji Natori*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P. O. Box 115,
Yusong-gu, Taejeon 305-600, Korea

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Abstract—We had already reported that we purified *N*- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine (5-S-GAD), a novel antibacterial substance from the immunized adult *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly). We found that the antibacterial activity of synthetic 5-S-GAD is equal to that of authentic 5-S-GAD without a specificity of antibacterial activity against Gram positive and Gram negative. Significant synergism was detected between 5-S-GAD and streptomycin against streptomycin resistant strain *E. coli* K12 594. It has an antitumor activity against several tumor cell lines at a concentration of 100 μ M. However, no cytotoxic activity against murine macrophage was detected at a concentration of 500 μ M. Furthermore, haemolytic activity against sheep erythrocytes was not detected at the same concentration. We suggest that the S-conjugation of glutathion with dihydroxyphenylalanine might be important to increase antibacterial activity of dihydroxyphenylalanine.

Keywords □ Insect defense molecules, antibacterial substance, 5-S-GAD, synthesis, GSH, synergism, antitumor activity.

생물개체가 항상성(homeostasis)을 유지해가며 생존하기 위해서는 자기(self)와 비자기(nonsel)를 명확히 구별하는 것이 필요하며, 이물질의 침입으로부터 생체를 방어하는 기전을 갖추는 것은 대단히 중요하다.

곤충은 지구상에 현존하는 생물종 가운데 가장 번성한 생물집단으로서 군림하고 있다.¹⁾ 그 이유로는 외부 환경에 대한 적응 능력, 즉 다양한 생태학적 지위(ecological niches)를 점유할 수 있는 능력과 외적으로부터 자신을 보호하는 뛰어난 자기 방어능력을 지니고 있기 때문이라고 여겨진다. 한편, 이러한 곤충의 생체방어

기전에 관한 연구는 1920년대부터 곤충병리학적인 관점에서 시작되었으나²⁾ 큰 진전을 보지 못하다가 1970년대 말, Boman,³⁾ Natori⁴⁾ 등에 의해 분자생물학적 수법을 이용한 연구가 시작된 이래 많은 연구 결과를 바탕으로 매우 합리적인 방어기전이 발달되어 있음이 밝혀지고 있다.

곤충의 생체 방어 기전은 혈구세포와 같은 식세포에 의한 세포성 방어 기전과 생체내 방어물질을 이용하는 체액성 방어 기전으로 크게 나눌 수 있다. 세포성 방어 기전은 선충류와 같은 비교적 큰 이물질을 배제하는 encapsulation 반응과 세균류나 진균류등 비교적 작은 침입자를 제거하는 nodule formation 및 식균작용(phagocytosis)에 의해 이루어진다. 또한 체액성 방어

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-860-4654 (팩스) 042-860-4659

기전에는 melanine 형성에 밀접히 관련되어 있는 prophenoloxidase cascade 및 직접 이물질에 치사적으로 작용하는 혈구응집소와 항균단백질 등이 존재한다고 알려져 있다.⁵⁾ 예를 들어, flesh fly(*Sarcophaga peregrina*)의 유충에서는 sarcophaga lectin⁶⁾이라는 혈구 응집소, 그람 음성균에 유효한 sarcotoxin⁷⁾과 그람 양성균에 유효한 sapecin,⁸⁾ 그리고 진균류에 유효한 AFP⁹⁾라는 항균 단백질 등이 분리 보고되었다. 이 가운데 AFP를 제외한 물질들은 체벽 상해의 자극으로 인해 그 유전자 발현을 거쳐 합성이 유도되어 침입한 세균의 세포막에 치사적으로 작용하므로써, 이물질을 협동적으로 배제한다고 알려져 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 특히, 최근에 Rel family 전사인자인 NF- κ B 유사 단백질의 활성화가 이들 방어물질의 유전자 발현에 직접적으로 관련되어 있다는 연구결과가 나와 곤충의 생체방어기전에 관한 연구의 중요성을 말해주고 있다.^{13,14)}

한편, 최근에는 지구환경 보호, 유용생물자원 확보 및 신 기능 생물 소재 개발이라는 환경적, 산업적, 경제적 측면에서의 중요성 때문에 항생제로의 개발을 목표로 곤충의 생체방어 관련물질을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 위에서 언급한 항균 단백질은 항균활성 뿐만 아니라 다른 생리활성도 갖고 있어 주목을 받고 있다.¹⁵⁾ 그러나 대부분의 항균 단백질은 분자량이 3,000 이상이므로 생체내에서의 불안정성 및 면역반응 유도등 의약품 개발까지는 여러 난점이 있다. 따라서 이러한 관점에서 곤충 생체방어 관련 저분자 물질의 탐색은 매우 중요하다고 할 수 있겠다.

최근에 본 연구자가 보고한 *N*- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine(이하 5-S-GAD로 약함)는 flesh fly 성충으로부터 분리 정제한

신규의 항균물질로 곤충 유래의 다른 항균 단백질과는 달리 그 분자량이 573인 저분자 물질로서 그 항균활성 기전 역시 H₂O₂를 매개하고 있어 전혀 새로운 활성기전을 나타내는 것으로 밝혀졌다¹⁶⁾(Fig. 1). 계속해서 본 연구자는 유기 화학적 방법 및 효소 반응을 이용하여 5-S-GAD를 대량 합성할 수 있었으며 합성품 5-S-GAD의 항균활성을 비롯한 생리활성을 검토한 바, 몇 가지 새로운 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기 - *t*-Boc- β -Ala-Osu는 Kokusan(Tokyo, Japan)제를 사용하였고, 그 외 시약은 Sigma사 제품을 주로 사용하였다. TLC는 pre-coated silica gel 60 F254(Merk Art. 5715)를 사용하였다. 선광도는 Jasco DIP-371를 사용하여 측정하였고, UV 스펙트럼은 HITACHI U-3210 분광광도계를, IR 스펙트럼은 Jasco DIP-140을 사용하여 측정하였다. 고분해능 FAB 질량 분석은 *m*-nitrobenzyl alcohol과 glycerol의 혼합물을 매트릭스로 해서 polyethylene glycol을 내부 표준물질로 이용하여 JEOL JMS-SX102A 분석기로 측정하였으며, NMR 스펙트럼은 VARIAN UNITY PLUS 500을 사용하여 측정하였다. 분석용 칼럼은 YMC-Pack R&D R-ODS-5, S-5, 120A(250×4.6 mm; YMC, Kyoto) 및 TSK gel Carbon-500(150×4.6 mm; Tosoh, Tokyo)을 사용하였고, 분리용 칼럼은 YMC-Pack R&D R-ODS-5-A(250×20 mm; YMC, Kyoto)를 사용하여 Gilson HPLC system으로 분리 정제했다. Antibiotic medium 3등 배지류는 Difco(USA)사 제품을 사용하였다.

5-S-GAD의 합성

***N*- β -Ala-Dopa의 합성** - 반응용기에 L-Dopa 2.8 g (14.2 mmol)과 *t*-Boc- β -Ala-OSu 3.4 g(11.9 mmol)을 넣고 argon 가스로 치환한 후, DMF/CH₃CN(1:1) 30 ml를 넣고 DIEA(Diisopropylethylamine) 2.5 ml (14.2 mmol)과 함께 실온에서 24시간 반응시켰다(Fig. 2A). 반응의 진행은 CH₃CN/H₂O(4:1)을 이동상으로 TLC 분석으로 검정하였는데, UV 254 nm에서의 형광과 페놀 시약에 의한 정색 반응에 의하여 *t*-Boc- β -Ala-Dopa의 새로운 밴드(Rf. 0.52)를 확인했다. 1 N HCl 수용액을 가해 pH가 4가 되도록 하여 반응을 종료시킨

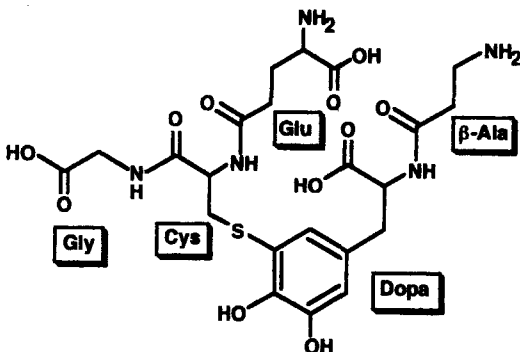


Fig. 1 — Structure of 5-S-GAD.

후, EtOAc 50 ml을 가해 잘 혼합하여 수층과 분리하고 유기용매층을 취했다. 유기층의 수분을 제거하기 위해 무수 MgSO₄로 탈수한 후 감압증류하여 유기용액을 제거하고 3.3 g의 고체를 얻었다. 더 이상의 정제과정 없이 생성물 *t*-Boc- β -Ala-Dopa로부터 보호기인 *t*-Boc를 제거하기 위해 90% TFA/5% *m*-cresol/5% formic acid (v/v) 20 ml를 가해 실온에서 10시간 반응시킨 후, TLC 분석에 의해 *t*-Boc가 제거된 것(Rf. 0.46)을 확인했다. 그 후, 반응혼합액으로부터 *t*-Boc를 제거하고 *N*- β -Ala-Dopa(β -AD로 약함)를 얻기 위해 냉 diethyl ether 50 ml을 가해 얻어지는 백색 침전물을 5,000×g, 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 진공 건조기로 건조시켰다. 다음으로 순품 β -AD를 얻기 위해 C₁₈ HPLC* 및 Carbon-500 HPLC*에 의해 분리 정제하여 백색의 무정형 분말 2.2 g(65%)을 얻었으며, UV 및 ¹H-NMR 분석을 통해 β -AD의 합성을 확인하였다.

*C₁₈ HPLC conditions : column, YMC-Pack R&D R-ODS-5, S-5, 120A(250×4.6 mm; YMC, Kyoto) [YMC-Pack R&D R-ODS-5-A(250×20 mm; YMC, Kyoto)]; solution A, 0.1% TFA in Nanopure water; solution B, 0.1% TFA in CH₃CN; linear gradient of 0→20% solution B in solution A for 40 min.; detector, 225, 280 nm; flow rate, 1 ml/min [10 ml/min]; retention time, 27 min [29 min].

[]안은 분리용 칼럼을 사용할 때의 조건임.

*Carbon-500 HPLC conditions : column, TSK gel Carbon-500(150×4.6 mm; Tosoh, Tokyo); solution A, 0.1% TFA in Nanopure water; solution B, 0.1% TFA in CH₃CN; linear gradient of 0→30% solution B in solution A for 40 min.; detector, 225, 280 nm; flow rate, 1 ml/min; retention time, 34 min.

합성품 *N*- β -Ala-Dopa - UV $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ nm(ϵ) 280 (1,319) 250(3,463) 205(14,235); ¹H-NMR(D₂O) δ : 3.14(2H, t, β -Ala-CH₂), 2.60(2H, m, β -Ala-CH₂), 4.63(1H, q, Dopa-CH), 2.86(1H, q, Dopa- β CH₂), 3.1(1H, q, Dopa- β CH₂), 6.78(1H, d, Dopa-Aro.2-CH), 6.84(1H, d, Dopa-Aro.5-CH), 6.69(1H, dd, Dopa-Aro.6-CH)

***N*- β -Ala-Dopa와 GSH의 conjugation** - 유기 화학적 방법에 의해 합성한 β -AD에 glutathion(GSH로 약함)을 conjugation 시키기 위해 Ito등¹⁷⁾의 방법을 이용하였다. 즉, argon 가스로 치환한 반응 조건에서 환원형 GSH 121 mg(0.39 mmol)과 β -AD 99 mg(0.35 mmol)을 50 mM 인산염 완충액(pH6.5) 15 ml에 녹인 후, mushroom tyrosinase(18 mg)을 가해 실온에서 3시간 반응시켰다(Fig. 2B). 반응의 진행은 연속적인 UV-spectrum curve를 작성하여 확인하였는데, 반

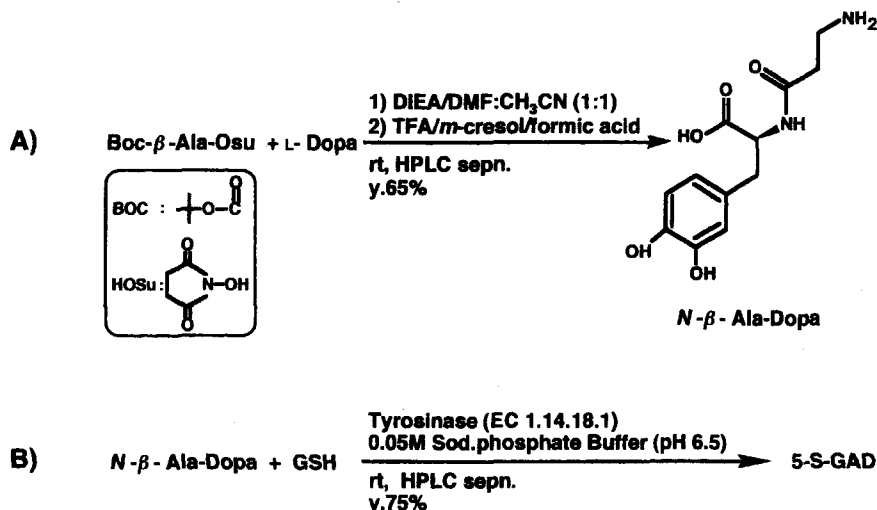


Fig. 2 — Scheme of synthesis of 5-S-GAD.

용액을 10분 간격으로 취하여 0.1 N HCl 수용액으로 50배 희석하여 UV spectrum 분석을 행하였다. 최적 반응 시간은 280 nm의 흡수 극대 peak가 293 nm로 이동하는 시간으로 정하였다. 반응액의 pH가 1이 되도록 6 N HCl 수용액을 가하여 반응을 종결시켰다. 반응 생성물의 항균 활성을 지표로 C₁₈ HPLC*에 의해 분리 정제하여, 백색의 무정형 분말 135.4 mg(75%)을 얻었으며, 최종 정제물에 대한 구조 분석은 IR, UV, NMR, FAB-MS 및 선광도 분석 등의 분광학적 방법에 의해 행하였다.

*C₁₈ HPLC conditions : column, YMC-Pack R&D R-ODS-5, S-5, 120A(250×4.6 mm; YMC, Kyoto), [YMC-Pack R&D R-ODS-5-A(250×20 mm; YMC, Kyoto)]; solution A, 0.1% TFA in Nanopure water; solution B, 0.1% TFA in CH₃CN; linear gradient of 0→20% solution B in solution A for 40 min.; detector, 254, 293 nm; flow rate, 1 ml/min(10 ml/min); retention time, 29 min(31 min). []안은 분리 용 칼럼을 사용할 때의 조건임.

합성품 5-S-GAD - 백색의 무정형 분말. C₂₂H₃₁N₅-O₁₁S : FABHR-MS m/z Found : 574.1804(M+H)⁺, Calcd. : 574.1819(M+H)⁺; [a]_D¹⁹ -21.9°(c 0.0386, H₂O); UVλ_{max}^{H₂O} nm(ε) 293(1,319) 254(1,824) 207(13,996); IR(KBr) cm⁻¹ 3400(OH), 3100, 3000, 1730, 1670(C=O), 1540, 1430(C=C), 1200, 1140, 990, 945, 840, 800; ¹H-NMR(D₂O) : 3.00(2H, t, β-Ala-αCH₂), 2.44(2H, m, β-Ala-αCH₂), 3.70(2H, Gly-CH₂), 4.24(2H, Cys-αCH₂), 3.05(1H, Cys-βCH₂), 3.18(1H, Cys-βCH₂), 3.73(1H, Glu-αCH), 1.98(2H, Glu-βCH₂), 2.32(2H, rCH₂), 4.47(1H, q, Dopa-αCH), 2.70(1H, q, Dopa-βCH₂), 2.92(1H, q, Dopa-βCH₂), 6.62(1H, d, Dopa-Aro.2-CH), 6.72(1H, dd, Dopa-Aro.6-CH); ¹³C-NMR(D₂O) : 36.6(β-Ala-αCH₂), 32.6(β-Ala-βCH₂), 172.6(β-Ala-CO), 42.1(Gly-CH₂), 174.1(Gly-CO), 53.9(Cys-αCH₂), 35.6(Cys-βCH₂), 173.2(Cys-CO), 54.4(Glu-αCH), 26.7(Glu-βCH₂), 31.8(rCH₂), 174.0(Glu-mCO), 175.3(Glu-sCO), 55.2(Dopa-αCH),

36.8(Dopa-βCH₂), 130.1(Dopa-Aro.1-C), 117.9(Dopa-Aro.2-CH), 145.1(Dopa-Aro.3-CH), 144.6(Dopa-Aro.4-CH), 119.7(Dopa-Aro.5-CH), 126.7(Dopa-Aro.6-CH), 176.2(Dopa-CO)

미생물 균주 및 항균활성 시험 - *in vitro* 항균활성 시험에는 *Escherichia coli* K12 594(str^r) 균주를 사용하였으며, 항균 스펙트럼 분석의 대상 균주로서는 *Staphylococcus aureus* IFO 12732, *Micrococcus luteus* FDA, *Bacillus subtilis* NRRL B-558 16, *Corynebacterium bovis* 1810, *Klebsiella pneumoniae* PCI 602, *Escherichia coli* NIHJ, *Shigella dysenteriae* JS 1191, *Salmonella typhi* T-63 그리고 *Candida albicans* ATCC 36232를 사용하였고, 항균활성의 검정 방법으로는 liquid growth inhibition assay를 사용하였다. 즉, 대수기의 *E. coli* K12 594(str^r)균주를 2.5×10⁸ cells/ml(OD₆₅₀=0.3)로 130 mM NaCl, 0.2%(w/v) BSA를 포함하는 10mM phosphate buffer(pH 6.0)에 현탁한 후, Antibiotic medium 3으로 300배 희석해 10 μl의 단계 희석한 시료를 넣은 96 well microtiter plate에 100 μl씩 첨가하였다. 37°C에서 5시간 배양후 Abs 650 nm를 측정해 균의 증식 저해활성을 검정하였다. 이때 positive control로서는 cecropin B를 사용하였으며 항균활성은 시료 대신 0.05% BSA를 포함하는 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)만 첨가한 경우의 균의 증식을 100%로 해 그 증식 저해활성으로 계산했다. 또한, *Candida albicans* ATCC 36232 균주에 대한 항생활성을 검정하기 위하여, 10 μl의 단계 희석한 시료를 넣은 96 well microtiter plate에 Sabouraud medium으로 배양된 2×10⁵ cells/ml(OD₆₅₀=0.0336)의 균주를 100 μl씩 첨가하였다. 37°C에서 5시간 배양후 Abs 650 nm를 측정해 균의 증식 저해활성을 검정하였다. 이때 positive control로서는 nystatin을 사용하였다.

종양 세포주 및 항종양활성 시험 - *in vitro* 항종양활성 시험에 사용한 종양 세포주는 mouse ascitic carcinoma Ehrlich, mouse sarcoma S180, mouse lympholytic leukemia L1210, mouse ascitic neoplasm P388, mouse fibrosarcoma Meth A, mouse lymphoma EL4, mouse melanoma B16-BL10, invasive mucinous carcinoma IMC ca 그리고 mesothelioma FS-3이었으며, 항종양활성 검정 방법으로는 MTT assay를 사용하였다. 즉, 종양세포주를 0.05%

trypsin 및 0.02% EDTA로 처리하여 원심분리후 배지에 현탁하여 그 세포수를 Model Z coulter counter로 측정하였다. 세포 현탁액 200 μ l(1×10^5 cells/ml)를 96 well microtiter plate에 넣고, 10% FCS RPMI로 단계 희석한 시료를 더한 후 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 48~72시간 배양한 후 20 μ l의 0.5% MTT 용액을 가한 후, 다시 4시간동안 배양을 계속하였다. 그후 150 μ l의 0.04 N HCl-isopropanol을 가해 각 well로부터 100 μ l 상등액을 취하여 Abs 570 nm를 측정하였다. 항종양활성은 대조군에 비교해서 세포 성장을 50% 저해하는 농도 IC₅₀로 나타냈다.

세포 독성 시험 - 2마리의 Balb/c mouse의 복강에 5 ml의 PBS(phosphate buffered saline)를 주사하여 peritoneal cell을 주사기로 채취하였다. 이 조작을 2회 반복한 후 얻어진 peritoneal cell 현탁액을 1,200 \times g, 4°C, 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 다시 PBS에 현탁한 후 원심조작을 반복하여 상등액을 제거하여 macrophage 분획을 얻었다. 1.2×10^6 cells/ml로 PBS에 현탁시킨 후, 24 well plate에 120 μ l를 취하고 1% BSA-PBS에 녹인 시료용액 20 μ l을 더하여 37°C, 30분간 배양하였다. trypan blue로 염색한 후 세포수를 카운팅했다. 대조군으로는 mellitin을 사용하였다.

용혈 시험 - sheep erythrocytes에 대한 용혈시험을 행하였다. SRBC(sheep red blood cell) 3 ml을 PBS 11 ml에 현탁하여 2,000 \times g, 4°C, 5분 동안 원심분리한 후, 그 상등액을 제거하였다. 원심분리 및 상등액 제거 조작을 3회 반복한 후, 다시 pellet에 10 ml의 PBS를 가해 현탁하였다. 단계희석한 1% BSA-PBS에 녹인 시료 용액 50 μ l를 96 well microtiter plate에 넣은 후 erythrocyte 현탁액 50 μ l를 가해 잘 혼합하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 2,000 \times g, 5분간 원심분리한 후 상등액 5 μ l를 취하여 1% BSA-PBS로 100배 희석하여 Abs 576 nm를 측정했다. 대조군으로는 DDW 및 mellitin을 사용하였다.

결과 및 고찰

5-S-GAD의 합성

N- β -Ala-Dopa의 합성 - 반응 도중에 연속적으로 반응액의 EtOAc층 및 수층을 각각 반응 출발물질과 함께 CH₃CN/H₂O(4:1)을 이동상으로 TLC 분석한 결과,

EtOAc층에서 반응물 L-Dopa와 *t*-Boc- β -Ala-OSu 이외의 새로운 밴드(Rf. 0.52)가 검출되었으며 이는 UV 280 nm에서의 형광과 페놀 시약에 의한 정상 반응에 양성인 점으로 미루어 L-Dopa와 *t*-Boc- β -Ala-OSu가 펩타이드 결합한 *t*-Boc- β -Ala-Dopa에 의한 것으로 추정하였다. 반응은 약 24시간동안 계속하였는데, 이는 새로 생성된 밴드의 크기가 더 이상 커지지 않는 시점으로 하였다. 계속해서 90% TFA/5% *m*-cresol/5% formic acid(v/v)를 가해 *t*-Boc를 제거하였으며 TLC 분석 결과, 제거된 *t*-Boc에 기인하는 Rf. 0.46의 새로운 밴드가 수층으로부터 검출되었다. 다음으로 순품 N- β -Ala-Dopa를 얻기 위해 C₁₈ HPLC 및 Carbon-500 HPLC를 이용하여 분리 정제하였으며 최종 수득율은 65%이었다. 구조 분석 및 확인을 위해 정제물을 가지고 UV 및 ¹H-NMR 분석을 한 결과, N- β -Ala-Dopa의 합성을 확인할 수 있었다. 즉, UV 스펙트럼에서 최대 흡수 peak는 L-Dopa에 기인하는 280 nm에서 관찰할 수 있었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서는 3.14, 2.60 ppm에 각각 β -Ala의 α CH₂와 β CH₂의 signal을 관찰하였으며, 4.63, 2.86 ppm에서 각각 L-Dopa의 α CH와 β CH₂의 signal을 6.78, 6.84, 6.69 ppm에서 각각 aromatic ring의 2-CH, 5-CH, 6-CH의 signal을 확인할 수 있었다(Table I).

N- β -Ala-Dopa와 GSH의 conjugation - 위에서 합성한 β -AD에 mushroom tyrosinase를 이용한 효소 반응으로 GSH를 conjugation 시켰다. 최적 반응 시간은 3시간이었으며 280 nm의 흡수 극대 peak가 293 nm로 이동하는 시점으로 하였다. 반응 종결후, 생성물에 대하여 항균 활성을 지표로 C₁₈ HPLC로 분리 정제하였으며, 최종 수득율은 75%이었다. 구조 분석을 위해 정제물에 대하여 IR, UV, NMR, FAB-MS 및 선광도 등 여러 분광

Table I - Summary of ¹H-NMR spectral data of synthetic N- β -Ala-Dopa in D₂O

Position	δ^1 H
β -Alanine	
α CH ₂	3.14(t, 2H, J=6.6Hz)
β CH ₂	2.60(m, 2H)
Dihydroxyphenylalanine	
α CH	4.63(q, 1H, J=3.67, 5.49Hz)
β CH ₂	2.86(q), 3.10(q)
Aro.2-CH	6.78(d, 1H, J=1.83Hz)
Aro.5-CH	6.84(d, 1H, J=8.06Hz)
Aro.6-CH	6.69(dd, 1H, J=1.83, 8.

Table II— Summary of ¹³C, ¹H-NMR spectral data from FG-HMBC for synthetic 5-S-GAD in D₂O

Position	δ ¹³ C	δ ¹ H	Position	δ ¹³ C	δ ¹ H
Glycine			β-Alanine		
CH ₂	42.1	3.70	αCH ₂	36.6	3.00
CO	174.1		βCH ₂	32.6	2.44
			CO	172.6	
Cystein			Dihydroxyphenylalanine		
αCH ₂	53.9	4.24	αCH	55.2	4.47
βCH ₂	35.6	3.05, 3.18	βCH ₂	36.8	2.70, 2.92
CO	173.2		Aro.1-C	130.1	
Glutamic acid			Aro.2-CH	117.9	6.62(d, J=2Hz)
αCH	54.4	3.73	Aro.3-C	145.1	
βCH ₂	26.7	1.98	Aro.4-C	144.6	
rCH ₂	31.8	2.32	Aro.5-C	119.7	
mCO	174.0		Aro.6-CH	126.7	6.72(d, J=2Hz)
sCO	175.3		CO	176.2	

학적 분석을 한 결과, 파리로부터 분리된 5-s-GAD의 분석치와 일치하였다. Table II에 합성품 5-S-GAD의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼 결과를 나타냈다.

항균활성 및 스펙트럼 - *E. coli* K12 594(str^r)균주를 사용하여 *in vitro* 항균활성을 검정한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 합성품 5-S-GAD의 활성은 파리로부터의 정제품 5-S-GAD의 활성과 일치하였다. 즉, 농도의존적으로 그 항균활성이 증가하였으며, ED₅₀가 8.7

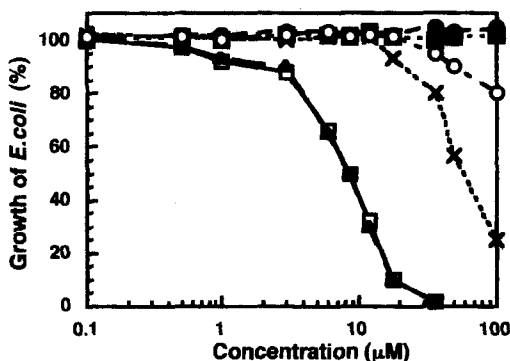


Fig. 3— Comparison of antibacterial activities of β-Ala, Dopa, β-AD, GSH, authentic 5-S-GAD and synthetic 5-S-GAD.

The antibacterial activities of substructures of 5-S-GAD and synthetic 5-S-GAD were compared with authentic 5-S-GAD using *Escherichia coli* K12 594 (str^r) as a target bacterium. Increasing amounts of test samples were added to the M3 medium and the relative bacterial growth was determined after incubation for 5hr at 37°C. The samples used were : ●, β-Ala; ○, Dopa; ×, β-AD; ■, GSH; ▲, authentic 5-S-GAD; □, synthetic 5-S-GAD.

μM로 일치하였다. 또한 그 부분구조인 β-Ala, Dopa, β-AD 및 GSH의 항균활성도 함께 비교해 본 결과, β-Ala 및 GSH는 전혀 활성이 없었으며 Dopa 및 β-AD는 각각 5-S-GAD의 1/20, 1/7의 활성을 나타냈다. 다시 말해서, Dopa에 β-Ala이 펩타이드 결합함으로써 Dopa의 항균활성이 약 3배 증가하였으며, 또한 β-AD에 GSH이 결합함으로써 β-AD의 활성이 7배 증가하였음을 알았다. 한편, 5-S-GAD의 항균활성 메커니즘은 이 분자와 *E. coli*와의 상호작용으로부터 생성되는 H₂O₂에 기인하는 살균작용이라는 것을 보고한 바 있다. 이와 같이 β-Ala 및 GSH가 Dopa에 결합함으로써 항균활성이 증가하는 것은 결국 *E. coli*에 대한 친화성이 증가함으로써 H₂O₂의 발생량이 증가하는 것으로 추측된다. 이에 관해서는 H₂O₂의 발생량의 측정을 비롯한 추가실험이 필요하다.

5-S-GAD의 항균활성은 Table III에 나타낸 바와 같

Table III— Antibacterial specificity of 5-S-GAD

Bacterial strain	ED ₅₀ (μM) [#]
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	31
<i>Micrococcus luteus</i> FDA 16	17
<i>Corynebacterium bovis</i> 1810	87
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-558	>200
<i>Escherichia coli</i> K12 594 (str ^r)	26(8.7)*
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI 602	78
<i>Shigella dysenteriae</i> JS 1191	174
<i>Salmonella typhi</i> T-63	170
<i>Candida albicans</i> ATCC 36232	>200

[#] ED₅₀ means the concentrations of 5-S-GAD causing 50% inhibition of bacterial growth relative to control.

* streptomycin was added to antibacterial assay.

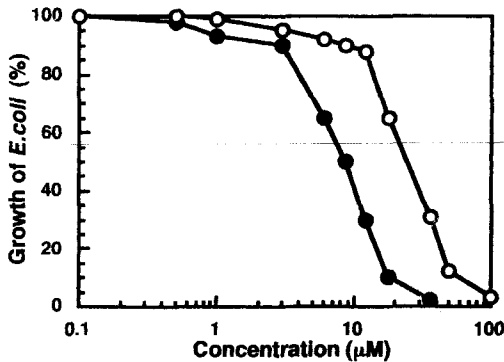


Fig. 4— Synergism between streptomycin and 5-S-GAD. *Escherichia coli* K-12 594 (str^r) was incubated with or not 100 μg/ml streptomycin and increasing amounts of 5-S-GAD in M3 medium for 5 hr at 37°C. ●, presence of streptomycin; ○, absence of streptomycin.

이, 수종의 그람 양성균 및 그람 음성균에 항균 스펙트럼을 보였다. 즉, 그 ED₅₀는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* IFO 12732에 대해 31 μM, *Micrococcus luteus* FDA 16에 대해 17 μM, *Corynebacterium bovis* 1810에 대해 87 μM, *Escherichia coli* K12 594(Str^r)에 대해 26 μM, *Klebsiella pneumoniae* PCI 602에 대해 78 μM, *Shigella dysenteriae* JS 1191에 대해 174 μM 그리고 *Salmonella typhi* T-63에 대해 170 μM이었다. 그러나 *Bacillus subtilis* NRRL B-558 및 곰팡이 균주인 *Candida albicans* ATCC 36232에 대해서는 200 μM 이상의 농도에서도 유의성 있는 활성은 보이지 않았다. 한편, Fig. 4에서 볼 수 있듯이 *E. coli* K12 594(str^r)에 대해 streptomycin 존재 하에서 그 항균활성이 약 3배 증가하였다(Table III). 이는 5-S-GAD가 streptomycin 내성 균주의 내성 메커니즘에 길항적으로 작용함으로써 streptomycin과

Table IV— Antitumor activity of 5-S-GAD

Cell line	IC ₅₀ (μM) ^a
Ehrlich	60
IMC ca	72
FS-3	80
S180	83
L1210	85
P388	97
Meth A	100
EL-4	151
B16-BL10	172

^a IC₅₀ means the concentrations of 5-S-GAD causing 50% growth inhibition of cell line relative to control.

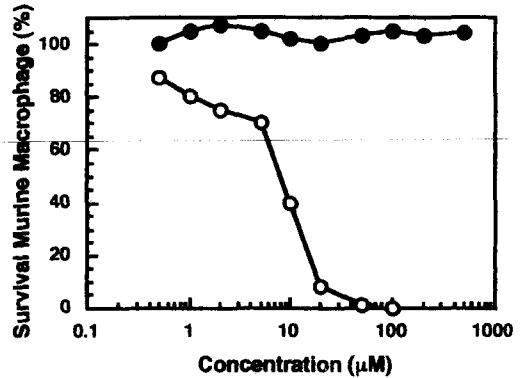


Fig. 5— Cytotoxic activity of 5-S-GAD. The fraction of murine macrophage was incubated with increasing amounts of synthetic 5-S-GAD and melittin of positive control for 30 min at 37°C. The cytotoxic activity was measured by counting the survival macrophage. ●, 5-S-GAD; ○, melittin.

synergic effect를 나타내는 것으로 추정할 수 있었다.

항종양활성 - *in vitro* 항종양활성 시험결과 Table IV에 나타낸 바와 같이, 수종의 종양 세포주에 대해 항종양활성을 나타냈다. 즉, IC₅₀값이 Ehrlich 세포주에 대해 60 μM, IMC ca 세포주에 대해 72 M, FS-3 세포주에 대해 80 μM, S180 세포주에 대해 83 μM, L1210 세포주에 대해 85 μM, P388 세포주에 대해 97 μM, Meth A 세포주에 대해 100 μM, EL4 세포주에 대해 151 μM 그리고 B16-BL10 세포주에 대해 172 μM이

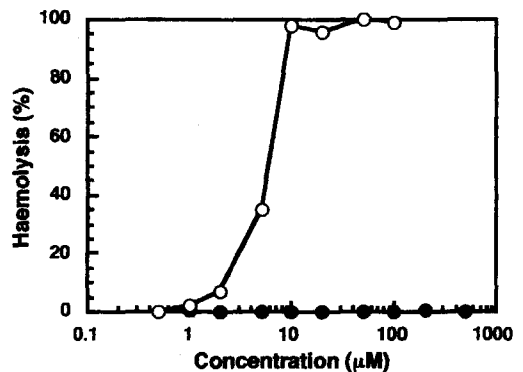


Fig. 6— Haemolytic activity of 5-S-GAD. Sheep erythrocytes were incubated with increasing amounts of synthetic 5-S-GAD and melittin of positive control for 2 hr at 37°C. After centrifugation, the A₅₇₆ values of the resulting supernatants were measured. Complete lysis was achieved by incubating the cells in distilled water. ●, 5-S-GAD; ○, melittin.

었다.

세포 독성 - *in vitro* 세포독성 시험 결과, murine macrophage에 대해서 전혀 세포 독성을 나타내지 않았다. 즉, Fig. 5에서 볼 수 있듯이 대조군으로 사용한 mellitin이 7 μ M 농도에서 ED₅₀를 나타내는 반면, 5-S-GAD는 500 μ M 농도에서도 전혀 세포독성을 나타내지 않았다. 또한, 생쥐에 대한 급성독성 시험 결과, 복강주사로 2,000 mg/kg 농도까지 전혀 영향이 없었다.

용혈 활성 - 용혈활성 시험 결과, sheep erythrocytes에 대해서 아무런 용혈 활성을 나타내지 않았다. 즉, Fig. 6에서 볼 수 있듯이 대조군으로 사용한 mellitin이 6 μ M 농도에서 ED₅₀를 나타내는 반면, 5-S-GAD는 500 μ M 농도에서도 전혀 용혈활성을 나타내지 않았다.

결 론

5-S-GAD는 flesh fly 성충으로부터 분리 정제한 신규의 저분자성 항균물질이다. 본 연구자는 5-S-GAD의 대량 합성을 목적으로 유기 화학적 방법 및 효소 반응을 이용하여 합성을 시도하였으며 합성품 5-S-GAD의 항균활성을 비롯한 생리활성을 검토한 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 5-S-GAD를 합성하기 위해 먼저 유기 화학적 방법에 의해 β -AD를 합성하였다. 다음으로 mushroom tyrosinase를 이용한 효소 반응으로 GSH과 β -AD를 conjugation하여 5-S-GAD를 합성하였다.

2. 합성품 5-S-GAD의 항균활성은 정제품의 항균활성과 일치하였으며, 그 부분구조인 Dopa 및 β -AD의 항균활성은 각각 5-S-GAD의 1/20, 1/7의 활성을 나타냈다.

3. streptomycin 내성균주에 대한 5-S-GAD의 항균활성은 streptomycin 존재 하에서 약 3배 증가하였다.

4. 5-S-GAD는 그람 음성균뿐만 아니라 그람 양성균에도 강한 항균활성을 나타냈다.

5. 5-S-GAD는 Ehrlich 및 IMC ca 세포주 등 몇 가지 종양세포주의 증식을 유의성 있게 저해하였다.

6. 5-S-GAD는 500 μ M 이상의 농도에서 mouse 복강 macrophage에 대한 세포독성을 나타내지 않았다.

7. 5-S-GAD는 500 μ M 이상의 농도에서 sheep erythrocytes에 대한 용혈 활성을 나타내지 않았다.

문 헌

- 1) Wilson, C. and Peter, F. M. : Biodiversity. *Natl. Acad. Press* (1988).
- 2) Glaser, R. W. : On the existence of immunity principles in insects. *Psyche*, **25**, 38 (1918).
- 3) Boman, H. G., Nilsson, I. and Rasmuson, B. : Inducible antibacterial defense system in *Drosophila*. *Nature* **237**, 232 (1972).
- 4) Natori, S. : Bactericidal substance induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *J. Insect. Physiol.* **23**, 1169 (1977).
- 5) Hoffmann, J. A., Janeway, C. A. Jr. and Natori, S. : Phylogenetic perspectives in immunity-The insect host defense. *Molecular Biology Intelligence Unit.*, R.G. Landes Co. (1994).
- 6) Komano, H., Mizuno, D. and Natori, S. : Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. *J. Biol. Chem.* **255**, 2919 (1980).
- 7) Okada, M. and Natori, S. : Purification and characterization of an antibacterial protein from hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly) larvae. *Biochem. J.* **211**, 727 (1983).
- 8) Matsuyama, K. and Natori, S. : Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *J. Biol. Chem.* **263**(32), 17112 (1988).
- 9) Iijima, R., Kurata, S. and Natori, S. : Purification, characterization and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.* **268**(16), 12055 (1993).
- 10) Nakajima, Y., Qu, XM. and Natori, S. : Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly). *J. Biol. Chem.* **262**, 1165 (1987).
- 11) Okada, M. and Natori, S. : Ionophore activity of sarcotoxin I, a bactericidal protein of *Sarcophaga peregrina*. *Biochem. J.* **229**, 453 (1985).
- 12) Matsuyama, K. and Natori, S. : Mode of action of sapecin, a novel antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly). *J. Biochem.* **108**, 128 (1990).

- 13) Kobayashi, A., Matsui, M., Kubo, T. and Natori, S. : Purification and characterization of a 59 kilodalton protein that specifically binds to $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ binding motifs of the defense protein genes of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly). *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4049 (1993).
- 14) Sun, S. C. and Faye, I. : Affinity purification and characterization of CIF, an insect immune responsive factor with $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ -like properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**, 225 (1992).
- 15) Natori, S. : Dual functions of insect immunity proteins in defense and development. *Research Immunol.* **141**, 938 (1990).
- 16) Leem, J. Y., Nishimura, C., Kurata, S., Shimura, I., Kobayashi, A. and Natori, S. : Purification and characterization of *N*- β -Alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxy-phenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (Flesh Fly). *J. Biol. Chem.* **271**(23), 13573 (1996).
- 17) Ito, S., Inoue, S., Yamamoto, Y. and Fujita, K. : Synthesis and antitumor activity of cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine and related compounds. *J. Med. Chem.* **24**, 673 (1981).