

반추동물 급성기관지폐렴균 *Pasteurella haemolytica*에 항균활성을 갖는 물질의 특성규명

강희철 · 유인자 · 윤봉식 · 전용수¹ · 유익동*

생명공학연구소 세포기능제어 연구실,
¹국립수의과학검역원 세균과

An Antibacterial Compound against *Pasteurella haemolytica* Produced by *Streptomyces* sp. 51086. Kang, Hee-Chol, In-Ja Ryoo, Bong-Sik Yun, Yong Soo Jeon¹, and Ick-Dong Yoo* Korea Research Institute of Bio-science and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea, ¹National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang 430-016, Korea - *Pasteurella haemolytica* is well known to cause severe pneumonia, consolidation and oedema of the lung, and fibrinous pleurisy under the stress and infection of virus in the cattle. In the course of our screening for antimicrobial agents against *P. haemolytica*, compound 51086 has been isolated from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. 51086. The compound 51086 was purified by SiO₂, Sephadex LH-20 and ODS column chromatographies and HPLC, subsequently. The structure of compound 51086 was determined as hygromycin A by combination of ¹H NMR, ¹³C NMR, HMBC, and ESI-MS. This compound showed significant antibacterial activity against *P. haemolytica* and *P. multocida*.

Key words : hygromycin A, *Pasteurella haemolytica*, structure determination, antimicrobial activity

반추동물의 급성기관지 폐렴 또는 수송열(shipping fever)은 *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida*, *Haemophilus somnus*에 의하여 유발되며, 그 중 *P. haemolytica*가 주 원인으로 알려져 있다[5]. 주로 수송, 고온, 저온, 피로, 흥분과 같은 스트레스 및 virus, *Mycoplasma* spp. 등의 2차 감염과 복합적으로 작용하여 발병되는 것으로 알려져 있다[17]. *P. haemolytica*는 Gram 음성의 단간균이며 A와 T의 두가지 biotype과 12~15종의 serotype이 있고[3] 급성 섬유소성 폐렴을 일으키는 병원균으로 접종 후 5시간 안에 폐포와 소엽간질의 심한 수종, 섬유소 석출, 염증세포의 침윤과 출혈 및 혈관 내피세포의 변성을 유발한다[1]. 또한 호흡기로 전염된 *P. haemolytica*는 폐포벽의 식세포를 파괴하여 균체 내독소의 작용으로 폐렴 및 흉막염을 유발하며[4], 폐렴의 감염 초기에 폐조직의 상해를 일으키는 중요한 인자라고 보고되었다[8, 9]. 이와 같은 *P. haemolytica*에 의한 급성 기관지 폐렴등의 발병을 억제하기 위하여는 설파메타진, 테라마이신 등의 항균제, 호르몬제, IBR백신 및 PI-3백신 등이 치료제 또는 발병억제제로 이용되고 있다. 최근의 연구에서는 enrofloxacin, danofloxacin, erythromycin, tilmicosin, penicillin G, cetiofur 등이 이들 Gram 음성균에 대해 강한 항균활성을 나타내는 것으로 보고되었다[13]. 한편으로 *P. haemolytica*가 분비하는 glycoprotease, bacterial exotoxin에 대한 유전자 분석에 대한 연구[11, 16]도 다각도

로 수행되고 있다. 본 연구에서는 가축질병의 원인균에 대한 항균활성 물질을 탐색하던 중 토양방선균인 *Streptomyces* sp. 51086의 배양액으로부터 *P. haemolytica*에 대하여 강한 항균활성을 나타내는 물질을 분리, 정제하였으며, ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HMBC, ESI-Mass 등의 기기분석을 통해 그 구조를 규명하였다.

재료 및 방법

실험재료

약 3,000여주의 미생물 배양액을 대상으로 *P. haemolytica*에 대하여 선택적으로 강한 항균활성을 나타내는 물질을 탐색한 결과 충북 청원군 대청호주변에서 채취한 *Streptomyces* sp. 51086 균주의 배양액이 강력한 항균활성을 나타내는 것을 발견하였다. 따라서 51086 균주의 배양액 및 균체 메탄올 추출물을 분리정제용 시료로 사용하였다. 본 실험에 사용한 공시균주는 국립수의과학검역원으로부터 *P. haemolytica* 균주를 분양받아 사용하였다.

균주의 배양

Streptomyces sp. 51086 균주를 GSS배지(soluble starch 10 g, glucose 20 g, soybean meal 25 g, beef extract 1 g, yeast extract 4 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ 0.25 g, CaCO₃ 2 g, pH 7.2) 100 ml을 넣은 500 ml 삼각 플라스크에 소량 접종하여 7일 동안 전배양 하였다. 본 배양은 상기의 배지 100 ml를 넣은 500 ml 삼각플라스크 30개에 전배양액 10 ml을 각각 접종한 후 28°C에서 7일간 진탕배양하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4330, Fax. 82-42-860-4595
E-mail: idyoo@mail.kribb.re.kr

활성물질의 추출 및 정제

Streptomyces sp. 51086 균주 배양액을 ethyl acetate 및 butanol(BuOH) 등의 유기용매로 추출 후 silica gel, Sephadex LH-20, ODS open column chromatography를 거친 후 HPLC에 의하여 정제하였다. Column chromatography에 이용된 silica gel(70~230 mesh)은 Merck사의 제품을 사용하였으며, 용매는 chloroform : methanol = 10 : 1~5 : 1로 용출하였다. Sephadex LH-20 column chromatography는 50 % methanol(MeOH)을 사용하여 2회에 걸쳐 행하였고 ODS (YMC사) open column chromatography는 20, 40, 60, 80, 100% methanol을 이용, 단계적으로 용출하였다. 활성물질의 최종정제에는 HPLC를 이용하였으며 이때 사용한 column은 phenomenex사의 C₁₈(250×Φ10 mm) column으로, 전개용매는 20%~80% methanol, 유속 2.5 ml/min에서 수행하여 순수하게 정제된 화합물 51086 20 mg을 분리, 정제하였다.

생물활성

Brain Heart Infusion(BHI)(calf brains 200 g, beef heart 250 g, Bacto proteose peptone 10 g, Bacto dextrose 2 g, sodium chloride 5 g, disodium phosphate 2.5 g Difco) 배지 18.5 g을 H₂O 500 ml에 녹인 후, 배양용 시험관에 5 ml씩 분주한 후 가압, 멸균하고 *P. haemolytica* KCTC 2892 균주를 접종하여 37°C에서 12시간 배양하였다. 항균활성 측정은 1.8% 한천이 첨가된 BHI 배지에 상기 배양액을 1% 접종하여 petri dish에 분주하고 대상시료(51086 화합물)를 paper disc(8 mm)에 처리하여 건조시킨 후, 상기 petri-dish상에서 12시간 배양, 투명환의 직경을 측정하였다.

기기 분석

NMR 측정은 Varian Unity 300(300 MHz) 및 Varian Unity 500(500 MHz) NMR spectrometer를 사용하였으며 내부표준물질은 tetramethylsilane을, 용매로는 CD₃OD를 사용하였다. Electrospray mass spectrum(ESI-MS)은 Finnigan사의 Navigator mass spectrometer를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

추출 및 분리정제

Streptomyces sp. 51086 균주의 배양액 3 l를 여지로 여과하여 배양여액과 균체로 분리하고 균체는 아세톤으로 재차 추출하여 감압농축하고 배양여액과 혼합하였다. 배양여액을 1N HCl을 이용하여 pH 3으로 조절한 후 ethyl acetate 및 BuOH을 이용하여 유기용매 추출을 행하였다. 이중 활성분획인 BuOH층을 감압농축한 후 CHCl₃ : MeOH(10 : 15 : 1)을 전개용매로 silica gel column chromatography를 실시하였다. 활성분획은 농축하여 MeOH 및 50% MeOH을

이용, 2회에 걸쳐 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하였다. 이중 활성분획을 대상으로 20% MeOH부터 MeOH 농도를 점차적으로 높여가며 ODS open column chromatography를 실시하였으며 최종적으로는 HPLC를 이용하여 화합물 51086 20 mg을 분리하였다(Fig. 1).

화합물 51086의 화학구조

화합물 51086의 화학구조를 밝히기 위하여 CD₃OD를 용매로하여 ¹H 및 ¹³C NMR, DQF-COSY, HMQC, HMBC를 측정하였으며 그 결과는 다음과 같다. ¹H NMR spectrum (Fig. 2)을 해석한 결과 aromatic 영역에서 한 AMX spin system에 기인하는 peak들(7.21, 6.94, 6.88 ppm)이 관찰되었으며 5.62 ppm에서 당의 anomeric proton이, 3.8~4.5 ppm사이에 다수의 산소와 결합한 수소가 관찰되었다. 산소와 결합한 다수의 수소들은 그들의 결합상수로부터 대부분 당구조에서 유래한 proton들로 추정되었다. 그 외에 2.12 ppm에서 singlet methyl proton이 관찰되었다. ¹³C NMR

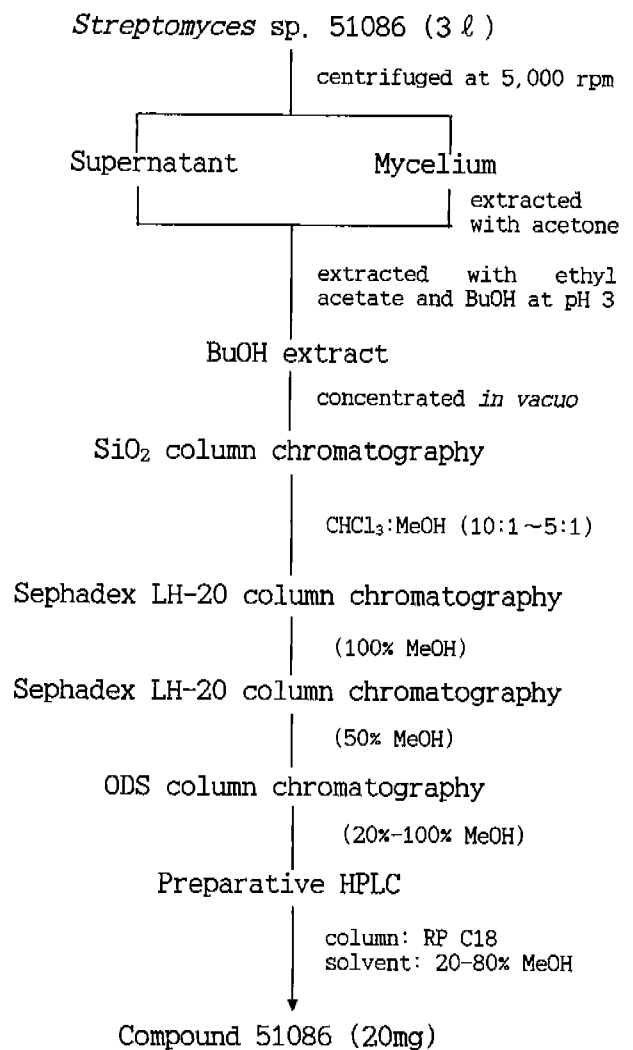


Fig. 1. Purification procedure of compound 51086.

spectrum(Fig. 2)에서는 210.2 ppm에서 carbonyl carbon, 172.6 ppm에서 ester 혹은 amide carbonyl 탄소, 115~150 ppm 사이에 aromatic 혹은 olefinic 탄소가 관찰되었다. 그 외에 104 ppm 부근에서 anomeric 탄소 및 70~80 ppm 사이에 다수의 산소와 결합한 탄소들이 관찰되었다. HMQC spectrum으로부터는 이들 각각의 탄소에 직접 결합한 수소 ($^1J_{CH}$) 및 사급탄소들을 확인하였다.

본 화합물의 부분구조를 밝히기 위하여 상호 이웃한 proton간의 연결성을 알 수 있는 DQF-COSY spectrum을 측정하였으며 그 결과 a) $-CH(-O)-CH(-O)-CH(-O)-CH(-O)-O-$, b) 1,2,4-trisubstituted benzene, c) $-CH=C(-CH_3)-$, d) $-CH(-O)-CH(-O)-CH(-N)-CH(-O)-CH(-O)-$ 의 4개의 부분구조를 밝힐 수 있었다. 또한 이들 각각의 부분구조는 HMBC spectrum에 의하여 연결할 수 있었다. 즉 당의 anomeric proton(부분구조 a)으로부터 당의 4번탄소 및 1,2,4-trisubstituted benzene의 1번 탄소인 148 ppm의 탄소에 long-range correlation이 관찰되어 본 화합물에 5탄당의 존재가 확인되었으며 또한 이는 benzene 환에 결합하고 있음이 확인되었다. 그 외에 7.26 ppm의 olefinic methine proton(부분구조 c)으로부터 benzene환의 3번, 5번 탄소 및 172.6 ppm의 carbonyl 탄소에 long-range coupling이 관찰되고 4.51 ppm의 질소와 결합한 methine proton(부분구조 d)으로부터 172.6 ppm의 탄소에 HMBC correlation이 관찰되어 상기 COSY에 의하여 밝혀진 4개의 부분구조를 연결하였다. 그 외에 HMBC data로부터 본 화합물의 화학구조를 Fig. 3에 나타낸 바와같이 aminoglycoside 계열의 화합물로 밝혔다. 또한 database 검색에 의하여 본 화합물이 *S. hygroscopicus*로부터 분리 보고된 물질

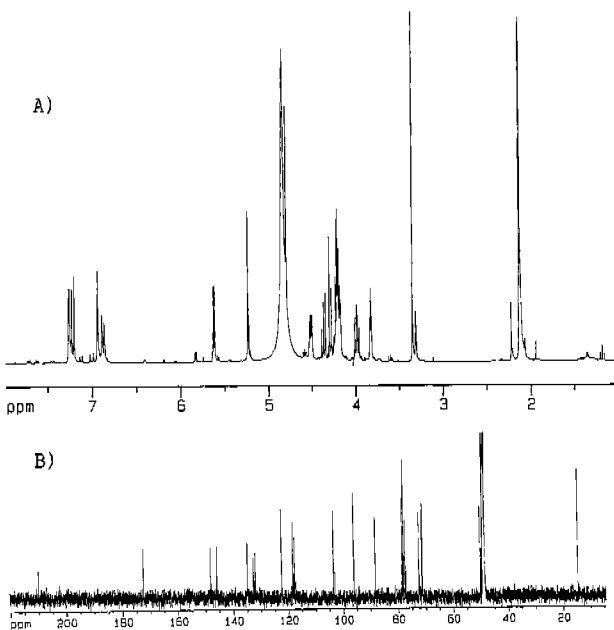


Fig. 2. 1H (A) and ^{13}C (B) NMR spectra of compound 51086.

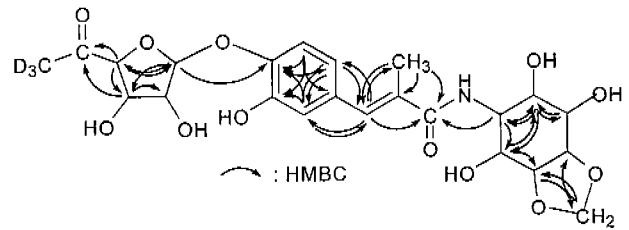


Fig. 3. Structure of compound 51086 elucidated by HMBC data.

로 부정형의 흰색 입자이며, 녹는점이 105~190°C이고, UV 272 nm에서 최대 흡수치를 나타내는 화합물 hygromycin A와 동일한 구조[2, 7, 10]를 지녔음을 알 수 있었다. 그러나 본 화합물에서는 5탄당의 4번 탄소에 결합한 acetyl group의 methyl proton 및 탄소 peak가 관찰되지 않았는데 이는 NMR 측정 용매인 CD_3OD 용매상에서 keto-enol 반응에 의하여 methyl proton이 deuterium으로 치환되어 관찰되지 않은 것으로 추정되며 또한 ESI-mass spectrum(Fig. 4)에서도 본 화합물의 분자량이 hygromycin A보다 3이 큰 m/z 515($M+3+H$)에서 mass peak가 관찰되어 이를 뒷받침하였다.

항균활성

화합물 51086의 항균스펙트럼을 조사하였으며 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 본 화합물을 paper disc 당 40 μg 씩 적용하여 몇종류의 그람양성 및 음성 세균에 대하여 항균활성을 조사한 결과 그람양성 세균에서는 *Staphylococcus* 속에만 약한 항균 활성을 보인 반면 그람음성 세균에 대하여는 *Escherichia coli*, *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* 등에 강력한 항균활성을 나타내었다. 이들 결과로부터 본 화합물은 가축병원균인 *P. haemolytica* 및 *P. multocida* 에 보다 선택적으로 강한 항균 활성을 나타냄을 확인하였다.

Hygromycin 항생물질은 *S. hygroscopicus* 균주가 생산하는 aminoglycoside계 항생물질로 Pittenger[15] 등에 의해

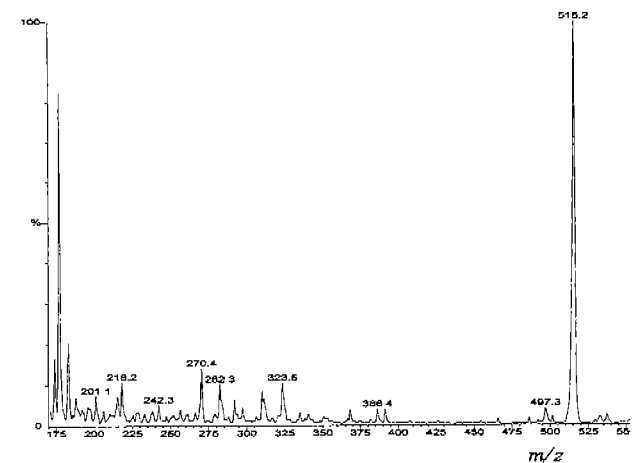


Fig. 4. Positive ESI-mass spectrum of compound 51086.

Table 1. Antimicrobial activity of compound 51086

Organism	diameter (mm)*
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1916	11
<i>Staphylococcus aureus</i> R209 KCTC1928	13
<i>Corynebacterium lilium</i> KCT1448	-
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC1914	-
<i>Escherichia coli</i> KCTC1924	15
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC1926	-
<i>Pasteurella haemolytica</i> KCTC2892	17
<i>Pasteurella multocida</i> KCTC2893	17
<i>Candida albicans</i> KCTC1940	-

*40 µg/disc (8 mm)

서 처음으로 발견된 화합물로 hygromycin A 및 B가 보고되었으며 항기생충 작용이 있음이 알려졌다[12, 14]. 이후 hygromycin B는 각종 그람양성균 및 음성균과 일부 방선균에 항균활성이 있음이 보고된 후 돼지 및 닭의 회충약 등으로 활용되고 있으며 hygromycin A는 peptidyltransferase를 억제하는 활성이 있는 것으로 보고되었다[6]. 본 연구에서는 반추동물의 급성기관지 폐렴 또는 수송열(shipping fever)의 원인균인 *P. haemolytica* 및 *P. multocida* 등에 선택적으로 강한 항균 활성을 나타내는 물질을 탐색하던 중, 항균활성이 강한 방선균의 일종인 *Streptomyces*속 균주가 탐색되어 활성물질을 대상으로 추출정제 및 화학구조, 생물활성 등을 확인한 결과, hygromycin A 화합물로 확인된 것이다. 이는 가축 호흡기 질환 병원균인 *P. haemolytica* 및 *P. multocida* 균에 hygromycin A 화합물이 보다 선택적으로 강한 항균활성을 나타냄을 알 수 있었으며 또한 구조해석을 위한 NMR 및 mass 실험 과정에서 본 화합물의 acetyl기를 형성하는 methyl group이 쉽게 keto-enol 반응에 의하여 deuterium으로 치환되는 것을 알 수 있었으며 이는 본 화합물의 동정에 많은 혼란을 초래하며 구조동정 과정에 주의해야 할 점으로 생각된다.

요 약

방선균 약 2,500주의 배양액으로부터 *Pasteurella haemolytica*에 대한 항균활성을 조사한 결과, 높은활성을 나타내는 *Streptomyces* sp. 51086 균주를 선발하였다. *Streptomyces* sp. 51086 배양액으로부터 유기용매분획, silica gel column, Sephadex LH-20 column chromatography 및 HPLC 등을 이용하여 *P. haemolytica*에 강한 항균활성을 나타내는 화합물 51086을 분리 정제하였다. ¹H NMR, ¹³C NMR, HMQC, COSY, HMBC, ESI-MS 등의 실험에 의하여 분리 정제된 화합물 51086의 화학구조를 해석한 결과, aminoglycoside 계열의 hygromycin A와 동일 화합물임을 확인하였다. 본 화합물 51086의 항균 spectrum을 조사한 결과, 반추동물의 급성기관지 폐렴 또는 수송열(shipping

fever)의 원인균인 *P. haemolytica* 및 *P. multocida*에 선택적으로 강한 항균 활성을 나타내었다.

REFERENCES

- Breider, M. A., S. Kumar, and R. E. Corstvet. 1990. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. *Infect. Immunol.* **58**: 1671-1677.
- Chida, N., M. Ohtsuka, K. Nakazawa, and S. Ogawa. 1991. Total synthesis of antibiotic hygromycin A. *J. Org. Chem.*, **56**: 2976-2983.
- Confer, A. W., R. J. Panciera, K. D. Clinkenbeard, and D. A. Mosicr. 1990. Molecular aspects of virulence of *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Vet. Res.* **54**: 48-52.
- Confer, A. W. and K. R. Simons. 1986. Effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide on selected functions of bovine leukocytes. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 154-157.
- Gibbs, H. A., E. M. Allan., A. Wiseman, and I. E. Selman. 1984. Experimental production of bovine pneumonic pasteurellosis. *Res. Vet. Sci.*, **37**: 154-166.
- Hayashi, S. F., L. J. L. Norcia., S. B. Seibel, and A. M. Silvia. 1996. Structure-activity relationships of hygromycin A and its analogs: protein synthesis inhibition activity in a cell free system. *J. Antibiotics* **50**: 514-521.
- Jaynes, B. H., N. C. Elliott, and D. L. Schicho. 1992. Semi-synthetic hygromycin A analogs: synthesis and antibacterial activity of derivatives lacking the furanose moiety. *J. Antibiotics* **45**: 1705-1707.
- Jean, Y. H. and U. B. Bak. 1994. Pathological studies on the calf pneumonia experimentally induced by endotoxin and leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1. *J. Agr. Sci. Vet.* **35**: 643-658.
- Jean, Y. H. and U. B. Bak. 1994. Pathological studies on the calf pneumonia experimentally induced by *Pasteurella haemolytica* A1. *J. Agr. Sci. Vet.* **35**: 629-642.
- Kakinuma, K. and Y. Sakagami. 1978. Nuclear magnetic resonance and structure of hygromycin. *Agric. Biol. Chem.*, **42**: 279-286.
- McWhinney, D. R., Y. F. Chang, R. Young, and D. K. Struck. 1992. Separable domains define target cell specificities of an RTX hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.* **174**: 291-297.
- Nakagawa, A., T. Fujimoto, and S. Omura. 1987. Hygromycin A, an antitreponemal substance. *J. Antibiotics* **40**: 1627-1635.
- Norcia, L. J. L., A. M. Silvia, and S. F. Hayashi. 1999. Studies on time-kill kinetics of different classes of antibiotics against veterinary pathogenic bacteria including *Pasterella*, *Actinobacillus* and *Escherichia coli*. *J. Antibiotics* **52**: 52-60.
- Omura, S., A. Nakagawa, T. Fujimoto, K. Saito, K. Otofuro, and J. C. Walsh. 1987. Hygromycin A, an antitreponemal substance. *J. Antibiotics* **40**: 1619-1626.
- Pittenger, R. C., R. N. Wolfe, M. M. Hoehn, P. N. Marks, W.

- A. Daliy, and J. M. McGuire. 1953. Hygromycin I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Anti. Chem.* **3**: 1268–1278.
16. Styr, R, R. D. Dahl, and L. D. Potter. 1990. Time and temperature dependence of granulocyte damage by leucotoxic supernatant from *Pasteurella haemolytica* A1. *J. Gen. Microbiol. Ave., Soc. Gen. Microbiol.* **136**: 2173–2178.
17. Suárez-Güàmes, F., M. T. Collins, and C. E. Whiteman. 1985. Experimental reproduction of septicemic pasteurellosis in feedlot lambs : Bacteriologic and pathologic examinations. *Am. J. Vet. Res.* **46**: 193–201.

(Received May 31, 1999)