

백강잠 101A의 세포독성 사이클로덱시펩타이드 성분

권학철 · 방은정* · 최상운** · 이완주*** · 조세연*** · 정이연*** · 김선여**** · 이강노#

성균관대학 약학대학, *기초과학지원연구소, **한국화학연구소, ***농촌진흥청
농업과학원 잠사곤충연구부, ****경희대학교 동서의학대학원

(Received March 10, 2000)

Cytotoxic Cyclodepsipeptides of *Bombycis corpus* 101A

Hak Cheol Kwon, Eun Jung Bang*, Sang Un Choi**, Won Chu Lee***, Sea Yun Cho***,
I-Yeon Jung***, Sun Yeou Kim**** and Kang Ro Lee#

College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon 440-746, Korea

*Korea Basic Science Institute, Seoul, 136-701, Korea

**Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 136-702, Korea

***Department of Sericulture & Entomology, National Institute Agricultural Science
and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea, and

****Graduate School of East West Medical College, Kyunghee University, 130-701, Korea

Abstract — From the MeOH extract of *Bombycis corpus* inoculated by *Beauveria bassiana* 101A, two cyclodepsipeptides, bassianolide (1) and beauberin (2), were isolated and their structures were determined by one and two dimensional NMR studies. Compounds 1 and 2 exhibited cytotoxicity against cultured human tumor cell lines.

Keywords □ *Bombycis corpus*, *Beauveria bassiana* 101A, bassianolide, beauberin, cytotoxicity.

누에 (*Bombix mori*, 누에과 Bombycidae) 유충의 피부에 백강균 (*Beauveria bassiana*)을 접종한 후 적당한 온도와 습도조건하에서 일정기간 사육하면 누에충체에 균사체가 형성되며 강직현상을 나타내고 결국에는 죽게 되는데 이 죽은 충체를 백강잠 (*Bombycis corpus*)이라고 한다.¹⁾ 본 연구의 시료인 백강잠 101A는 농촌진흥청 잠사곤충부에서 백강균의 아종인 *Beauveria bassiana* 101A를 새로이 개발하여 유충의 피부에 접종하여 일정 조건하에서 사육하여 얻은 것으로서, 농업과학기술원 및 생명공학연구소에서 기존의 백강균인 *Beauveria bassiana*와 새로운 균주인 *Beauveria bassiana* 101A의 DNA sequence 연구결과 염기서열이 동일하다고 입증하였다. 저자들은 이 균주에 의하여 형성된 백강잠

101A의 메탄올 엑기스에서 2종의 세포독성 steroid물질을 보고한 바 있으며,²⁾ 계속적인 활성성분에 대한 연구의 일환으로 alkaloid 성분연구를 수행하여 핵산분획으로부터 2종의 cyclodepsipeptide 물질인 bassianolide (1)과 beauberin (2)을 분리하여 구조를 동정하였다. 화합물 1과 2는 5종의 암세포주에 대하여 1.39~1.75 µg/ml의 ED₅₀의 세포독성을 나타내었다.

실험방법

실험재료

백강잠 101A(*Bombycis corpus*, 1.5 kg)은 농촌진흥청 잠사곤충부에서 공급받아 사용하였다.

기기 및 시약

¹H- 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker AMX500

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-290-7710 (팩스) 0331-290-7750

spectrometer로, MS spectrum은 VG70-VSEQ(VG Analytical, UK)으로 측정하였다. 추출 및 column chromatography용 용매는 1급시약을, 기타 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70~230 and 230~400 mesh, ASTM Art. 7734 and 9385, Merck)을 사용하였고, reverse phase column chromatography용 충전제는 LiChroprep RP-18(40~63 μm , Art. 13900, Merck)를 사용하였다. LPLC는 LiChroprep Si60 Lobar[®]-B column(Art. 10401, Merck)을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ precoated plate(Art. 5554, Merck)를 사용하였다.

추출 및 분리

백강잠 101A 건조분말 1.5 kg을 methanol(MeOH)로 상온에서 5회 반복추출하고 60°C에서 3회 추출하여 얻어진 추출액을 감압농축하여 120g의 MeOH 추출물을 얻었다. 이를 증류수에 현탁시킨후 hexane(800 ml \times 3), chloroform(800 ml \times 2) 및 butanol(800 ml \times 2)로 분획하여 각각 55g, 6g 및 30g의 용매분획물을 얻었다. 이중 hexane분획은 dragendorff시약에 대하여 양성반응을 보였으며, 발색강도로 보아 alkaloid 함량이 많을 것으로 추측되었다. Hexane 분획 55g을 hexane-ethylacetate(EtOAc)(5:1~0:1) 혼합용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 3개의 소분획 H1-H3을 얻었다. 소분획 H2에 대하여 hexane-EtOAc(3:1)용매로 silica gel column chromatography와 90% acetonitril을 용매로 RP-18 column chromatography를 수행하여 화합물 1(0.8 g)을 얻었다. 또한 소분획 H3에 대하여 hexane-EtOAc(1:1)용매로 silica Lobar[®]-B column chromatography를 반복수행하여 화합물 2(1.2 g)를 얻었다.

화합물 1 - Colorless oil, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 1663 (amide C=O), 1746 (ester C=O). EI-MS m/z (rel. int.) : 908 (M^+ , 15), 852 (12), 682 (10), 600 (49), 296 (13), 228 (13), 209 (100), 194 (56), 183 (50), 168 (29), 100 (52). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.52 (3H, d, $J=7.0$ Hz), 0.63 (3H, d, $J=7.0$ Hz), 0.83~1.00 (42H, m), 1.28 (1H, m, γ -H of Leu), 1.39 (3H, m, γ -H of Leu), 1.51 (1H, m, β -H of Hiv), 1.58 (1H, m, γ -H of Leu), 1.68~1.85 (8H, m, β -H of Leu), 2.07 (1H, m,

β -H of Hiv), 2.15~2.22 (3H, m, β -H of Hiv), 2.82 (s, N-CH₃), 2.85 (3H, s, N-CH₃), 2.98 (3H, s, N-CH₃), 3.01 (3H, s, N-CH₃), 3.22 (3H, s, N-CH₃), 4.39 (1H, dd, $J=11.6, 4.0$ Hz), 4.96 (1H, d, $J=2.3$ Hz, α -H of Hiv), 5.15(1H, d, $J=7.7$ Hz, α -H of Hiv), 5.25 (1H, d, $J=6.9$ Hz, α -H of Hiv), 5.41 (1H, d, $J=7.9$ Hz, α -H of Hiv), 5.41 (1H, dd, $J=12.1, 4.2$ Hz, α -H of Leu), 5.48 (1H, d, $J=2.2$ Hz, α -H of Hiv), 5.59 (1H, dd, $J=12.2, 4.6$ Hz, α -H of Leu), 5.62 (1H, dd, $J=12.2$ Hz, 4.3 Hz, α -H of Leu). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 15.38, 16.35, 18.57, 18.76, 18.85, 19.14, 19.15, 19.25, 19.38, 20.85, 21.26, 21.42, 21.51, 21.69, 21.93, 24.08, 24.13, 24.23, 24.29, 24.41, 25.38, 25.55, 25.59, 25.88, 26.07, 28.89, 30.27, 30.32, 30.88, 31.19, 31.53, 31.63, 32.27, 37.32, 37.43, 38.27, 38.57, 39.15, 53.91, 54.86, 54.91, 58.14, 74.89, 74.98, 75.92, 169.31, 169.73, 170.07, 170.85, 170.96, 171.13, 171.46, 171.65, 172.10, 172.11

화합물 2 - colorless oil, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 1661 (amide C=O), 1746 (ester C=O). EI-MS m/z (rel. int.) : 783 (M^+ , 15), 692 (27), 592 (13), 244 (53), 217 (19), 142 (20), 134 (100), 91(36). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.38 (3H, d, $J=7.0$ Hz, 4'-CH₃), 0.77 (3H, d, $J=7.0$ Hz, 5'-CH₃), 1.99 (1H, m, H-3'), 2.93 (1H, m, H-3), 3.00 (3H, s, N-CH₃), 3.36 (1H, dd, $J=14.5, 5.0$ Hz, H-3), 4.86 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-2'), 5.54 (1H, brdd, $J=11.5, 4.5$ Hz, H-2), 7.14~7.25 (5H, m, H-5~H-9). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 18.06 (C-4'), 19.07 (C-5'), 30.43 (C-3'), 32.90 (N-CH₃), 35.43 (C-3), 57.80 (C-2), 76.26 (C-2'), 127.49 (C-7), 129.24 (C-6, C-8), 129.52 (C-5, C-9), 137.28 (C-4), 170.36 (C-1), 170.62 (C-1')

세포독성실험 - 세포독성 실험은 Sulforhodamin B Bioassay (SRB) 방법³⁾을 응용하여 한국화학연구소에서 수행하였다. 실험에 사용한 암세포주들은 A549 (non small cell lung carcinoma), SK-OV-3 (ademoncarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF-498 (central nerve system tumor) 및 HCT-15 (conlon

ademocarcinoma) 등이다.

결과 및 고찰

화합물 **1**은 0°C에서는 백색 무정형의 물질이고 상온에서는 oil상으로 되는 물질로서 dragendorff 시약에서 적색으로 발색되었다. IR 스펙트럼에서 1663와 1746 cm^{-1} 에서 amide carbonyl group과 ester carbonyl group에 의한 흡수 band를 관찰할 수 있었고, EI-MS 스펙트럼에서 m/z 908의 분자이온 피크 (M^+)가 관찰되었다. 이상의 자료와 NMR 스펙트럼의 양상을 기초로 하여 화합물 **1**은 cyclopeptide 유도체로 추정하였다.^{4,5)} $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼과 HOMO 2D J-resolved $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 80.83과 1.00사이의 methyl doublet peak들, 2.07~2.22 사이의 multiplet peak들과 84.96, 5.15, 5.25, 5.41과 5.48에서 나타나는 doublet peak들은 α -hydroxy-isovaleryl group (Hiv)들의 signal로⁴⁾ 추정하였고, 80.83과 1.00사이의 methyl doublet peak들, 1.28~1.58의 multiplet peak들, 1.68~1.85의 multiplet peak들과 84.39, 5.41, 5.52, 5.59와 5.62에서 나타나는 double-doublet peak들은 leucynyl group (Leu)들의 signal로⁵⁾ 추정하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 10개의 carbonyl carbon signal, 4개의 oxygenated carbon signal, 4개의 C-N signal 및 5개의 N- CH_3 signal을 포함한 총 56개의 signal이 관찰되었다. HMQC 스펙트럼에서는 oxygenated carbon signal들과 isovaleryl group의 α -proton들과의 상관관계가 관찰되었고(84.96/876.30, 85.15/875.92, 85.25/875.92, 85.41/874.98, 및 85.48/874.89), C-N carbon signal들과 leucynyl group의 α -proton들과의 상관관계가 관찰되었다(84.39/858.14, 85.41/854.91, 85.59/854.86, and 85.62/853.91). 이상의 자료를 기초로 하여 화합물 **1**을 N-methylleucynyl- α -hydroxy-isovaleryl amide를 기본 unit로 한 cyclode-

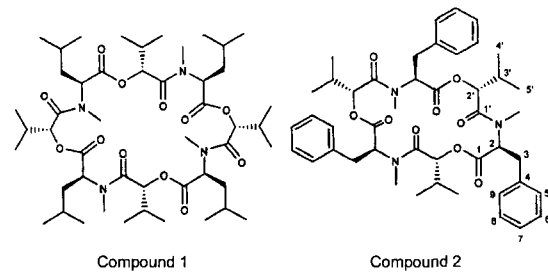


Fig. 1 – Structures of compounds **1** and **2**.

psipeptide로 추정하였다. 분자량을 (M^+ m/z 908) 통해 화합물 **1**이 tetramer이고 48개의 탄소로 구성되어 있다고 추정할 수 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 56개의 signal이 관찰되었는데 이는 화합물 **1**의 conformation이 변화함에 의한 것으로 추정하였다.⁶⁾ 이상의 자료로부터 화합물 **1**은 methylleucynyl- α -hydroxy-isovaleryl amide의 cyclic tetramer ester형태의 bassianolide로 추정하였고, 기존문헌⁶⁾과 비교하여 그 구조를 확인 동정하였다.

화합물 **2**는 0°C에서는 무색 무정형 물질이고 상온에서 oil상으로 존재하는 물질로서 dragendorff 시약에서 적색으로 발색되었다. IR 스펙트럼은 화합물 **1**과 매우 유사하여 화합물 **2** 역시 cyclopeptide임을 추정할 수 있었다. EI-MS 스펙트럼에서 m/z 783의 분자이온 피크 (M^+)가 관찰되었으나 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 15개의 탄소에 의한 signal만이 관찰되어 화합물 **2**는 탄소 15개로 구성된 단위의 trimer임을 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 N- CH_3 에 의한 signal 및 cyclopeptide구조에서 흔히 존재하는 α -hydroxy-isovaleric acid unit와 phenylalanine unit에 의한 전형적인 signal이 관찰되었다. α -Hydroxy-isovaleric acid unit에 의한 signal은 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서는 80.38 (3H, d, $J=7.0$ Hz), 0.77 (3H, d, $J=7.0$ Hz), 1.99 (1H, m) 와 4.86 (1H, d, $J=9.0$ Hz)

Table I – The cytotoxic activities of compounds **1** and **2** on five cancer cell lines

cancer cell line compounds	ED ₅₀ values*				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
1	1.68	1.57	1.60	1.75	1.51
2	1.51	1.43	1.58	1.54	1.39
doxorubicin	0.12	0.13	0.11	0.23	2.40

*ED₅₀ value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration ($\mu\text{g/ml}$) that caused 50% inhibition of cell growth *in vitro*

에서 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 δ 18.06, 19.07, 30.43, 76.26, 170.62에서 관찰되었으며, phenylalanine unit에 의한 signal은 ^1H -NMR 스펙트럼에서는 δ 2.93 (1H, m), 3.36 1H, dd, $J=14.5, 5.0$ Hz), 5.54 (1H, br.dd, $J=11.5, 4.5$ Hz), 7.14~7.25 (5H, m)에서 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 δ 35.43, 57.80, 127.49, 129.24, 129.52, 137.28, 170.36 (C=O)에서 관찰되었다. 이상의 자료를 기초로 화합물 2는 N-methylphenylalanyl- α -hydroxy-isovaleryl amide의 cyclic trimeric ester인 beauvericin으로 추정하였고 기존문헌⁷⁾과 비교하여 그 구조를 확인 동정하였다.

화합물 1과 2의 세포독성을 5종의 암세포주를 이용하여 측정한 결과 ED_{50} 값이 1.39~1.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 비교적 우수한 세포독성을 나타냈다(Table I). 현재 이 물질들에 대한 기타의 생물 활성연구는 진행중에 있다.

문 헌

- 1) 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 : 중약대사전, 완역판, 도서출판 정담, p.2015 (1997).
- 2) Kwon, H. C., Moon, H. I., Choi, S. H., Lee, J. O., Cho, S. Y., Jung, I. Y., Kim, S. Y. and Lee, K. R. : Cytotoxic constituents of *Bombycis corpus*. *Yakhak Hoeji*, **43**, 169 (1999)
- 3) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990)
- 4) Fernandez, R., Rodriguez, J., Quinoa, E., Riguera, R., Munoz, L., Fernandez-Suarez, M. and Debitus, C. : Onchidin B: A New Cyclodepsipeptide from the Mollusc *Onchidium* sp. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11635 (1996).
- 5) Tsunoo, A., Kamuo, M., Taketomo, N., Sato, Y. and Ajisaka, K. : Roseocardin, A Novel cardiotoxic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum* TT103. *The Journal of Antibiotics*, **50**, 1007 (1997).
- 6) Kanaoka, M., Isogai, A., Murakoshi, S., Ichinoe, M., Suzuki, A. and Tamura, S. : Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 629 (1978).
- 7) Gupta, S., Montllor, C. and Hwang, Y. S. : Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. *J. Nat. Prod.*, **58**, 733 (1995).