

Chivosazole F: 점액세균 *Sorangium cellulosum*이 생산하는 다제내성 암세포의 생장억제물질

† 안종웅 · ¹최상운 · 서영완 · ²노정래

한국해양대학교 해양환경생명과학부, ¹한국화학연구원 생명약연구부, ²군산대학교 해양학과

(접수 : 2005. 9. 2., 게재승인 : 2005. 10. 22.)

Chivosazole F, An Efficient Inhibitor of Multidrug-Resistant Cancer Cells Isolated from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria)

Jong-Woong Ahn[†], Sang-Un Choi¹, Youngwan Seo, and Jung-Rae Rho²

Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea

¹Medicinal Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-606, Korea

²Department of Marine Information Science, Kunsan National University, Jeonbuk, 573-701, Korea

(Received : 2005. 9. 2., Accepted : 2005. 10. 22.)

In the course of our search for compounds effective to multidrug-resistant cancer cells from myxobacteria with the adriamycin-resistant cancer cell line CL02, we found cytotoxic activity against the CL02 cells in culture extract of *Sorangium cellulosum* JW1045. Activity-guided fractionation of the culture extract led to the isolation of an active principle, chivosazole F. This compound showed high cytotoxic activity against cultured human cancer cells. The IC₅₀ values, measured by a SRB assay with different cell lines, ranged from 0.1 to 10 ng/ml. Furthermore chivosazole F was as active against drug-resistant cancer cells CL02 and CP70 as against the corresponding sensitive cells.

Key Words : Chivosazole F, *Sorangium cellulosum*, cytotoxicity, mdr-cancer cell

서론

점액세균은 특이한 생활사와 독특한 생리적 특성으로 인해 자연계로부터 분리가 어렵고 배양이 까다로워서 아직 산업적으로 이용된 적은 없지만 최근 독일과 일본 등을 중심으로 이들의 새로운 분리법과 배양기술이 개발되어 연구됨에 따라 생리활성물질의 새로운 자원으로 부각되고 있는 활주세균이다(1). 점액세균 유래의 생리활성물질은 지금까지 약 80개의 신규 화합물과 400여개의 동족체 화합물이 보고되어 있으며(2), 이들은 대부분 타 미생물로부터 생산된 적이 없는 점액세균 특유의 물질로서 타 미생물을 비롯해 바이러스와 cancer cell에 대해 우수한 살상 효과를 나타내는 것이 많다(3, 4, 5). 그 중에서 cellulose 용해성 점액세균인 *Sorangium cellulosum*이 생산하는 epothilone(6, 7)은 점액세균의 대사산물 중 가장 관심을 끄는 물질로서 현재 임상실험에 진입되어있는 유망한 차세

대 항암제 후보물질이며 이외에도 peptide의 일종인 Tubulysin(8)과 macrolide계의 Apicularen A(9) 등이 점액세균 기원의 항암물질로서 현재 선진 제약기업을 중심으로 개발단계에 있다.

지금까지 항암제에 의한 암 질환의 치료는 완치 및 상당한 수면연장의 효과를 거두고 있으나 자주 사용약물에 대한 암세포의 내성발현으로 더 이상 치료효과를 거둘 수 없게 되고 더구나 암 세포가 사용하고 있는 약제뿐만 아니라 구조가 상이한 타 항암제에도 내성을 나타내는 다약제내성 (Multidrug Resistance: MDR)으로 인해 심각한 문제가 되고 있다. 이러한 다약제내성에 대해서는 다양한 기전이 보고되어 있는데 그 중에서도 P-glycoprotein (Pgp)에 의한 것이 가장 많이 알려져 있다(10, 11, 12). Pgp는 분자량이 170 KDa 정도인 transmembrane glycoprotein으로서, *mdr-1* 유전자에 의해 coding되어 있으며, vinca alkaloids, anthracyclines, *epi-podophyllotoxin* 등과 같은 많은 종류의 약물들을 세포 밖으로 배출시킴으로써 결과적으로 약물의 효과 (세포독성)를 나타내지 못하게 한다고 알려져 있다(13, 14). 이러한 암세포의 다약제내성으로 인해 개발된 많은 항암제가 사용해보기도 전에 무력화되고, 더욱이 최근 항암제개발 연구에서 가장 성공적인 성과로 인정받고 있

† Corresponding Author : Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea
Tel : +82-51-410-4754, Fax : +82-51-404-3988
E-mail : jwahn@hhu.ac.kr

는 taxol의 경우도 이를 이용한 치료과정에서 내성 암세포의 출현이 보고되고 있어서 그 심각성을 더해주고 있다. 이러한 관점에서 미국 국립 암연구소를 비롯해 Sandoz, Pfizer, Vertex, Xenova 등과 같은 선진 제약기업들은 새로운 기전에 근거한 신규항암제 개발연구와 함께 다약제내성을 극복하는 방법의 하나로서 Pgp에 영향을 받지 않는 새로운 항암제의 개발연구에 역점을 두고 있다.

본 연구는 Choi 등(15)이 확립한 다약제내성 암세포주인 CL02를 이용하여 난배양성인 *Sorangium* 속의 점액세균이 생산하는 대사산물을 대상으로 다약제내성 암세포에 유효한 항암물질을 탐색하는 과정에서 균주 JW1045의 배양물에서 우수한 활성을 발견하고 그것에 함유된 활성본체의 화학적 규명과 생물활성을 조사한 것이다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

충남 논산시 소재의 야산, 과수원, 밭에서 채취한 토양을 시료로 하여 알려진 방법(16)에 따라 균주 JW1045를 비롯해 60점의 균주를 분리하였다. 즉 WCX agar 배지를 담은 petri dish에 미리 멸균한 filter paper (Whatman No.2)를 깔고 그 위에 토양시료를 처리한 다음, 30°C에 2~3주일 배양했을 때 용해된 filter paper의 주변에 나타나는 orange 색의 fruiting body를 KAN-4 agar에 3~5회 옮겨 순화하였으며 계대는 VY/2 agar 배지를 이용하였다. 순화된 균주들의 균체증식을 위한 전배양과 물질생산을 위한 본배양에는 모두 동일한 조성의 액체배지 (0.8% potato starch, 0.2% glucose, 0.2% soybean meal, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.1% CaCl₂·2H₂O, 0.0008% EDTA Fe(III)-Na⁺ salt, pH 7.2)를 사용하였는데, 다만 본배양의 경우 자가독성을 방지하고 물질생산량을 높이기 위해 2-l 용량의 배양 플라스크에 흡착수지인 XAD-16을 1.5% (w/v) 첨가하여 400 ml의 액체배지와 함께 넣은 후 멸균한 다음 전배양한 균액을 5% (v/v) 접종하여 30°C, 10일간 진탕배양 (160 rpm)하였다.

균주의 동정

분리된 균주들은 모두 cellulose 용해성 점액세균인 *S. cellulosum*으로서, 분류학적 고찰은 Bergey's Manual(17) 및 문헌(16, 18)의 분류·동정에 관한 기준에 따라 cellulose 용해성의 여부를 비롯해 자실체 및 swarm의 형태적 특성을 동정의 지표로 이용하였다. Cellulose 용해성은 WCX agar 배지 위에 깔아 놓은 filter paper (Whatman No. 2)의 용해여부로 확인하였으며, swarm과 자실체의 형태는 VY/2 agar 배지 및 KAN-4 agar 배지에서 30°C, 2주간 배양한 것을 해부현미경 (Olympus SZ-11, Olympus)과 광학현미경 (ECLIPS E600, Nikon)으로 관찰하였다. 또한 Congo red 염색액은 0.01% 수용액을 사용하였다.

추출 및 분리

배양액을 원심분리하여 균체와 흡착수지를 모은 다음 methanol로 추출한 후 여기에 n-heptane으로 처리하여 유상의 세포성분을 제거한 다음 감압 농축하였다. 이 농축물을 silica gel에 흡착시켜 n-hexane-ethyl acetate를 용매계로 하여 단계적

으로 극성용매의 비율을 높이면서 (4 : 6 → 2 : 8) column chromatography (4 × 40 cm)를 행하여 활성분획물을 얻은 다음 이것을 다시 methanol을 이용한 Sephadex LH-20 column chromatography (2.5 × 80 cm)를 통해 정제하였다. 최종적으로 silica gel column (SenshuPak, 5 μm, 8 × 250 mm)과 n-hexane-ethyl acetate(64 : 36)의 용매계를 이용한 HPLC (Shimadzu, Japan)를 행하여 활성본체를 순수하게 정제하고 KM1045로 명명하였다.

기기분석

KM1045의 UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 UV265 분광광도계 (Shimadzu, Japan)로 측정하였고 IR spectrum의 측정은 FTIR 분광광도계 (Mattson, USA)로 하였다. 선광도는 Automatic Polarimeter (Rudolph Research, USA)로 측정하였으며, 질량측정은 OPUS data system이 장착된 질량분석기 (Micromass, England)로 하였다. COSY, ROESY, DEPT, HMBC 및 HSQC를 포함한 각종 NMR spectrum은 UNITY500 NMR Spectrometer (Varian, USA)를 사용하였으며, 내부 표준물질로는 tetramethyl silane (TMS)을, 측정용매로는 CD₃OD를 사용하였다.

암세포 배양

실험에 사용된 암세포주는 모두 인체기원의 것들로서 폐암 세포주인 A549, 자궁암세포주인 A2780, 피부암세포주인 SK-MEL-2, 중추신경계 암세포주인 XF498, 대장암세포주인 HCT15 및 HCT15 세포로부터 adriamycin을 처리하여 다제내성 세포주로 확립한 CL02 세포와 자궁암세포주인 A2780 세포에 cisplatin을 처리하여 내성 세포주로 확립한 CP70 세포를 이용하였다. 감수성 세포주는 모두 미국의 국립 암연구소로부터 분양받았으며 cisplatin내성 세포주인 CP70은 미국의 FOX CHASE Cancer Center에서 분양받아 사용하였다. 배양액으로는 glutamine, NaHCO₃, gentamycin 및 amphotericin을 첨가하여 5% FBS로 보강한 RPMI1640 용액을 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 및 100% 습도의 조건에서 배양하고 3~4일에 한번 씩 계대 유지하였다. 약제내성 세포주인 CP70 및 CL02 세포는 각각의 내성 유도 물질인 cisplatin 및 adriamycin 1 μM을 각각 1개월에 1일씩 처리하여 내성을 유지하며 배양하였고 세포독성 실험 전에 내성을 확인하여 사용하였다.

세포독성측정 (SRB assay)

세포들을 각각 96-well flat bottom microplate에 분주하여 바닥 면에 세포가 부착하도록 24시간 배양하고 세포가 바닥 면에 부착된 후에 배양액을 제거한 다음 시료 약물을 well 당 100 μl 넣어 배양기에서 72시간 배양하였다. 약물을 첨가하여 배양한 후 세포독성의 측정은 세포표면 단백질 염색시약인 sulforhodamine B (SRB)를 이용하여 알려진 방법에 따라 측정하였다(19). 각 well의 흡광도는 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 520 nm에서 측정하였으며 약물을 가하지 않은 well (C)과 약물을 가한 well (T) 및 약물을 가할 때의 well (Tz)을 비교하여 Tz ≤ T인 경우에는 [(T-Tz)/(C-Tz)] × 100의 수식으로, Tz ≥ T인 경우에는 [(T-Tz)/Tz] × 100의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다.

결과 및 고찰

생산균의 동정

점액세균은 타 세균과는 달리 계통발생학적 연관관계에 근거하여 분류하기 보다는 아직까지 자실체와 swarm의 형태적 특징에 의한 표형적 특성을 기준으로 하여 분류하고 있다(16, 17, 18). 그러나 cellulose를 용해하는 점액세균은 예외적으로 모두 *Sorangium*속 (*Sorangineae*)에 속하며, 오래된 분류에 의하면 3종 이상이 있다고 하나, 최근의 분류체계에서는 1종으로 줄어들어 *S. cellulosum*만 인정되고 있다(17). 균주 JW1045는 cellulose를 용해하는 점액세균인 *S. cellulosum*으로서 WCX agar 배지 상의 filter paper에 접종하였을 때 10~14일이 경과한 후 여과지가 용해되기 시작하였고(Fig. 1) 여과지 이면에 red-orange색의 자실체가 관찰되었다. 이들의 영양세포는 광학 현미경 (×1500)으로 형태를 관찰한 결과 끝이 무딘 짧은 간상으로 나타났으며 Gram 음성으로 판별되었고 congo red로 처리하였을 때 음성이었다. 또한 KAN-4 agar 배지에서 30℃, 14~20일간 배양했을 때 특유한 형태의 자실체와 swarm이 관찰되었고(Fig. 2) 액체배양에서 균체는 형태와 크기가 다양한 덩어리(lump)를 이루며 성장하여 *S. cellulosum*의 배양상 특성을 잘 나타내었다.

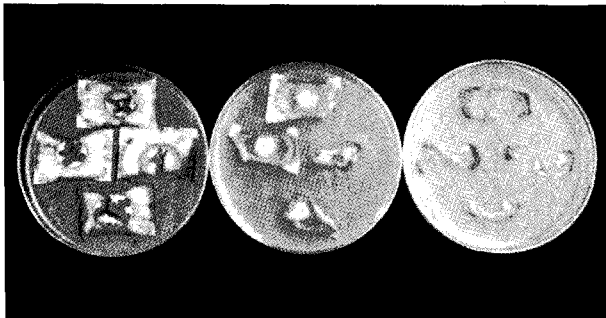


Figure 1. Photographs of the isolated strain JW1045 degrading cellulose (filter paper).



Figure 2. Swarm colony of the isolated strain JW1045 on KAN-4 agar.

활성물질의 정제 및 구조결정

S. cellulosum JW1045의 배양액 (15 L)에서 추출한 강한 활성의 methanol 농축물을 silica gel 및 Sephadex LH-20 column

chromatography를 거쳐 최종적으로 HPLC를 이용해 분리한 결과 활성분체로서 KM1045를 순수한 액상 (11 mg)으로 얻었다. 이 물질의 2D-NMR spectra를 비롯해 다양한 분광학적 data의 해석을 통해 두 개의 spin system(Fig. 3)이 분자 내에 존재함을 확인한 후 지금까지 밝혀진 점액세균의 대사산물 중에서 이 부분구조들을 가진 물질에 대해 문헌을 조사한 결과 KM1045는 이미 동종의 점액세균에서 분리된 chivosazole F(Fig. 4)의 물리화학적 성상 및 spectral data(20)와 일치하였다.

KM1045: colorless oil; $[\alpha]_D -3.9^\circ$ (c 0.5, MeOH); UV(MeOH) λ_{max} : 272, 332 nm; EIMS m/z 691[M]⁺, 673, 658; ¹³C-NMR(125 MHz): 168.9(s), 167.3(s), 145.3(d), 140.1(s), 137.6(d), 130.6(d), 139.9(d), 139.8(d), 138.7(d), 136.3(d), 135.4(d), 134.4(d), 134.3(s), 132.4(d), 131.3(d), 130.2(d), 129.2(d), 129.0(d), 128.5(d), 127.3(d), 122.0(d), 117.9(d), 80.0(d), 78.1(d), 70.5(d), 70.4(d), 68.1(d), 65.2(d), 58.2(q), 44.6(t), 41.8(d), 40.4(d), 39.6(t), 36.3(d), 35.7(d), 24.4(q), 17.8(q), 17.2(q), 14.3(q), 10.3(q), 10.8(q).

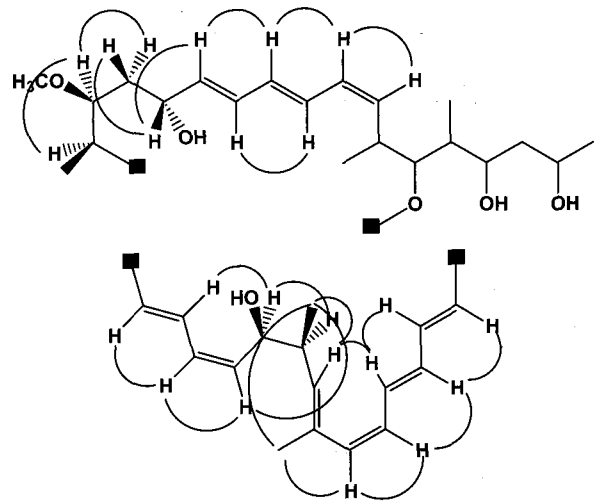


Figure 3. Two structural elements with possible geometric configuration from the homonuclear 2D NMR experiments (∩ NOE correlation).

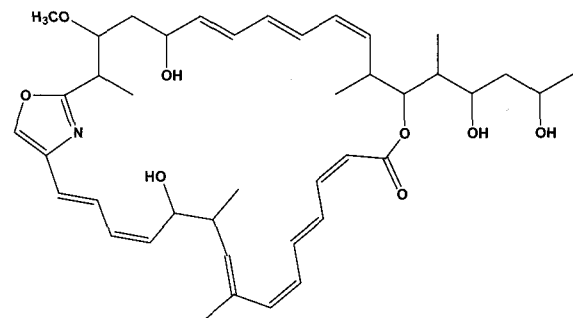


Figure 4. The structure of chivosazole F.

세포독성

인체기원의 암세포주에 대한 KM1045 (Chivosazole F)의 활성을 Table 1에 나타내었다. Chivosazole F는 공시된 모든 암세포주에 대해 강한 성장억제 활성을 나타내었으며 IC₅₀은

Table 1. Cytotoxicity of chivosazole F(1) and reference compounds

Compound	IC ₅₀ [μg/ml]						
	A549	SK-MEL-2	XF498	HCT15	CL02	A2780	CP70
1	0.01	2x10 ⁻⁴	6x10 ⁻⁴	8x10 ⁻⁴	9x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴
Adriamycin	0.04	0.06	0.13	0.12	3.27	0.02	0.08
Cisplatin	0.45	1.26	0.58	0.51	1.02	3.24	13.75

IC₅₀: Drug concentration inhibiting 50% of cell growth; A549: Human lung cancer cell line; SK-MEL-2: Human skin cancer cell line; XF498: Human CNS cancer cell line; HCT15: Human colon cancer cell line; CL02: Adriamycin-resistant HCT15 subline; A2780: Human ovary cancer cell line; CP70: Cisplatin-resistant A2780 subline

0.1~10 ng/ml로 나타났다. 한편 adriamycin의 세포독성은 감수성세포주 (HCT15)의 IC₅₀이 0.12 μg/ml 인데 비해 내성세포주 (CL02)에서는 3.27 μg/ml로서 약 27배 정도 차이를 보였다. Cisplatin내성세포주 (CP70)가 감수성세포주 (A2780)에 비해 약 4배 정도 내성이 유도된 것과는 대조적으로 chivosazole F는 감수성세포주와 내성세포주에 대하여 거의 동일한 활성을 보여 다약제 내성을 극복함을 나타내고 있다.

Chivosazole F는 최초로 Reichenbach 등(21)에 의해 동종의 점액세균으로부터 진균의 생장억제물질로 분리되었으며, 특히 효모의 생장을 강하게 억제하는 것으로 보고되어 있다. 그러나 본 연구의 결과에서 밝혀진 chivosazole F의 인체기원의 각종 암세포에 대한 강한 활성과 특히 다약제내성 암세포주에 대한 강한 생장억제작용은 처음으로 확인된 사실이어서 향후 항암제의 내성극복에 관한 기초연구 및 기전연구에 선도적 역할이 기대된다. 또한 chivosazole F는 점액세균의 대사산물 중 다약제내성 암세포주에 대한 생장억제물질로 이미 보고된 disorazoles(22)과 phenalamides(10)와는 화학구조가 전혀 다른 polyene-macrolide계 화합물이어서 Pgp와 관련된 약물의 active efflux에 대한 억제활성과 함께 이들의 구조-활성 간의 상관에 대해 좀 더 많은 정보를 줄 것으로 기대된다.

요 약

암세포가 특정 항암제에 의해 내성을 획득하면 구조가 상이한 타 항암제에도 교차내성을 나타내는 이른바 암세포의 다약제내성 (MDR)이 암 화학요법에 있어서 가장 심각한 문제가 되고 있다. 본 연구에서는 점액세균의 대사산물로부터 다약제내성 암세포에 대한 생장억제물질을 탐색하는 과정에서 cellulose 용해성 점액세균인 *Sorangium cellulosum* JW1045의 대사산물에서 우수한 활성을 발견하고 그 활성분체로서 polyene-macrolide계 화합물인 chivosazole F를 분리하였다. Chivosazole F는 시험한 인체기원의 암세포에 대해 모두 강한 생장억제작용을 나타내었으며 (IC₅₀ = 0.1~10 ng/ml), 다약제내성 암세포주인 CL02와 CP70에 대해서도 감수성세포주와 동일한 활성을 나타내었다. 이러한 사실은 chivosazole F가 암세포에 대해 다제내성을 유도하지 않는 우수한 활성물질임을 나타냄과 동시에 다제내성을 극복하는 신규 항암제 선도화합물로서의 유용성을 시사하는 것으로 그 의미가 크다.

감 사

이 논문은 한국학술진흥재단의 중점연구소 지원사업 (KRF-2004-005-C00005)에 의해 이루어졌으며 연구비지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Reichenbach, H., K. Gerth, H. Irschik, B. Kunze, and G. Höfle (1988), Myxobacteria: a source of new antibiotics, *TIBTECH.* **6**, 115-121.
- David, W. (2000), Biology and global distribution of myxobacteria in soils, *FEMS Microbiol. Reviews* **20**, 400-420.
- Ahn, J. W., S. H. Woo, C. O. Lee, K. Y. Cho, and B. S. Kim (1999), KR025, a new cytotoxic compound from *Myxococcus fulvus*, *J. Nat. Prod.* **62**(1), 495-496.
- Kundim, B. A., Y. Itou, Y. Sakagami, R. Fudou, S. Yamanaka, and M. Ojima (2004), Novel antifungal polyene amides from *Cystobacter fuscus*, *Tetrahedron* **60**, 10217-10221.
- Miyashiro, S., S. Yamanaka, S. Takayama, and H. Shibai (1998), Novel macrocyclic antibiotics: Megovalicins A-G, *J. Antibiotics* **41**(4), 433-438.
- Cowden, C. J., and I. Paterson (1997), Cancer drugs better than taxol? *Nature* **387**, 238-239.
- Wessjohann, L. (1997), Epithilones: Promising natural products with taxol-like activity, *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**(7), 715-718.
- Sasse, F., H. Steinmetz, J. Heil, G. Höfle, and H. Reichenbach (2000), Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli, *J. Antibiotics* **53**(9), 879-885.
- Kunze, B., R. Jansen, F. Sasse, G. Höfle, and H. Reichenbach (1998), Apicularen A and B, new cytostatic macrolides from *Chondromyces* species (Myxobacteria), *J. Antibiotics* **51**(12), 1075-1080.
- Ahn, J. W. (2002), Cytotoxic polyene antibiotics from *Myxococcus stipitatus* JW111, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**(2), 114-118.
- Lum, B. L., M. P. Gosland, S. Kaubisch, and B. I. Sikic (1993), Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene, *Pharmacotherapy* **13**, 88-109.
- Perez, R. P., T. C. Hamilton, R. F. Ozoles, and R. C. Young (1993), Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer, *Cancer* **71**, 1571-1580.
- Iwahashi, T., E. Okochi, K. Ono, L. Sugawara, T. Tsuruo, and S. Mori (1991), Establishment of multidrug resistant human colorectal carcinoma HCT15 cell line and their properties, *Anticancer Res.* **11**, 1309-1312.
- Ueda, K., G. Cardarelli, M. M. Gottesman, and I. Pastan (1987), Expression of a full length cDNA for the human MDR-1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 3004-3008.
- Choi, S. U., N. Y. Kim, E. J. Choi, K. H. Kim, and C. O. Lee (1996), Establishment of doxorubicin-resistant subline derived from HCT15 human colorectal cancer cells, *Arch. Pharm. Res.* **19**, 342-347.
- Reichenbach, H. and M. Dworkin (1992), The Myxobacteria, p. 3416-3487. In A. Balows, H. G. Truper, and M. Dworkin (eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed.), Springer Verlag, New York.
- Halt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams (1994), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed., William and Wilkins, Baltimore, USA.

18. Reichenbach, H., and G. Höfle (1993), Biologically active secondary metabolites from myxobacteria, *Biotech. Adv.* **11**, 219-277.
19. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. Warren, H. Bokesch, S. Kenny, and M. R. Boyd (1990), New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening, *J. Nat. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.
20. Jansen, R., H. Irschik, H. Reichenbach, and G. Höfle (1997), Chivosazoles A-F: Novel antifungal and cytotoxic macrolides from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria), *Liebigs Ann.* **1997**, 1725-1732.
21. Irschik, H., R. Jansen, K. Gerth, G. Höfle, and H. Reichenbach (1995), Chivosazol A, a new inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria, *J. Antibiotics* **48(9)**, 962-966.
22. Ahn, J. W., and C. O. Lee (2004), Isolation of antibiotics effective to multidrug-resistant cancer cells from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria), *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32(1)**, 47-51.