

Streptomyces sp. AO-05110이 생산하는 Herbimycin A 및 Dihydroherbimycin A의 이화학적 특성 및 생물 활성

장흥배¹ · 김세찬¹ · 김재현*

단국대학교 첨단과학대학 미생물학전공, ¹한국 폴리텍 바이오대학 품질관리과

한국 토양에서 방선균주를 분리하고 화학 분류 및 16S rDNA 염기서열을 통하여 *Streptomyces* 속 균주임을 알아내고 *Streptomyces* sp. AO-05110로 명명하였다. 이 균주가 생산하는 herbimycin A 및 dihydroherbimycin A의 몇 가지 이화학적 성질과 생물 활성을 측정하였다. 두 물질은 모두 산성 조건에서 안정성을 나타냈으며, dihydroherbimycin A는 herbimycin A에 비해 상대적으로 높은 열 안정성을 지니며 극성 또한 높은 물질로서 TLC 상의 Rf 값이 낮았다. Herbimycin A와 dihydroherbimycin A는 모두 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 및 *Micrococcus luteus* ATCC 9341에 대하여 약한 저해 활성을 나타내었고, 다른 미생물에 대해서는 저해 활성을 나타내지 않았다. 항암 활성에 있어서 두 물질은 폐암 세포인 A549 세포와 백혈병 세포인 HL-60 세포에 대해서 강력한 증식 저해 활성을 나타내었다. L5178Y 및 P388 세포를 사용하여 세포 독성을 측정하였다. 그 결과 두 물질은 대조 물질인 camptothecin에 비해서 항암 활성을 가지면서도 비교적 안전한 물질임을 알려 주고 있다.

Key words □ Antibiotic, anticancer activity, cytotoxicity, herbimycin A, dihydroherbimycin A

*Streptomyces*속 균주는 많은 종류의 생리 활성 물질을 생산한다(7). 최근의 연구보고에 의하면 이들 생리 활성 물질의 다양성을 보여주고 있는데, 예를 들면 *S. griseus*가 187종, *S. lavendulae*가 129종, *S. antibioticus*가 95종, *S. hygrosopicus*가 286종의 각종 활성 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(5).

Herbimycin (Fig. 1)은 ansamycin (14)계열의 물질을 주로 생산하는 것으로 알려진 *S. hygrosopicus* AM-3672 균주의 배양액으로부터 제조 활성이 있는 항생 물질로 보고되었는데(15), *Cyperus microiria* 등의 단자엽 식물(mono-cotyledonous plant)과 *Chenopodium ficifolium* 등의 쌍자엽 식물(di-cotyledonous plant)에 대해 강력한 제조활성을 나타내는 것으로 보고되었다. Agar dilution method를 이용한 항균 활성 측정에서는 *Sarcina lutea*, *Candida albicans*, *Saccharomyces sake*, *Piricularia oryzae* 및 *Aspergillus niger* 등에 대하여 약한(IC₅₀, >200 µg/ml) 활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 또한 herbimycin A은 tobacco mosaic virus에 대한 저해 활성을 나타내며 (6), 항암 활성을 보이는 것으로도 알려져 있다. 즉, permissive temperature (33°C)에서 ts/NRK 세포의 전이된 형태를 p60^{src} kinase activity의 저해와 함께 정상 형태로 회복시켰다는 보고가 있다(19). 이때 대조 물질로 사용된 ansamycin (benzenoid ansamycin), streptovaricin 및 rifamycin (naphthalenoid ansamycin) 등은 항암 활성이 없는 것으로 확인되었다. 특히 항암 활성에 관하여는 최근까지도 K562 세포에 대한 화학 요법제들의 세포 사멸 효과(apoptotic effect)와

NPM-ALK (nucleophosmin anaplastic lymphoma kinase) kinase의 저해에 의한 SUDHL-1 세포의 사멸 유도 등 많은 연구가 진행되고 있다 (18). Herbimycin의 유도체에 관해서는 herbimycin B(6)와 herbimycin C (16)의 분리 정제, 생물 활성 및 구조 해석 등이 보고되었고 dihydroherbimycin A(Fig. 1)에 대해서는 proton NMR분석 및 세포 독성에 관한 보고가 있었다(9).

본 실험실에서는 토양 시료에서 분리된 방선균의 배양액으로부터 항산화 활성이 있는 물질을 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl의 탈색 반응을 이용하여 탐색하였다(1). 그 결과 분리균주로부터 herbimycin A와 dihydroherbimycin A가 생산되고 이들이 항산화 활성을 갖는 것을 밝혔다 (논문 준비중). 이 논문에서는 분리균의 특성과 herbimycin A와 dihydroherbimycin A의 이화학적 성질 및 생물 활성에 대하여 기술하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 생산 배지

전국 각지의 다양한 생태계에서 수집된 토양 시료로부터 다단 희석 및 희석법을 이용하여 1,000여 방선균을 순수 분리하였고, 이중 *Bacillus subtilis* 및 *Micrococcus luteus*에 대하여 약한 활성을 나타낸 균주 *Streptomyces* sp. AO-05110를 선발하였다. 선발된 균주는 전배양을 위하여 0.1% yeast extract, 0.1% beef extract, 0.2% N-Z amine A, 1% glucose 및 0.1% CaCO₃ 조성의 살균된 액체배지가 100 ml씩 채워진 500-ml 용량의 삼각 플라스크에 접종한 후, 240 rpm 조건의 회전 진탕기를 이용하여 28°C에서 72시간 배양하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-550-3452, Fax: 82-41-551-9229
E-mail: jaehkim1@dankook.ac.kr

대량 배양을 위하여 5 l fermenter (한국발효기)를 이용하였으며, 0.5% corn starch, 3% glucose, 1.5% glycerol, 0.5% soy bean meal, 0.5% peptone, 0.1% CaCO₃ 및 0.05% antifoamer 조성의 배지 3 L를 채우고, 통기량은 0.5 vvm, 그리고 28°C, 300 rpm에서 3 일 내지 8일 동안 실시하였다. 특별한 경우 이외에는 pH는 조정하지 않았다.

균주의 특성 및 16S rDNA 서열 조사

선별된 균주의 형태학적 특성을 조사하기 위해 선별균주를 Bennet 배지에서 14 내지 21 일간 배양한 후, 전자 현미경으로 관찰 하였으며, 생리 및 생화학적 특성 및 당 이용성 등의 균주 특성도 조사하였다(8, 12, 17).

또한 16S rDNA 염기 서열 조사를 위하여 균주를 YEME 액체배지에 30°C에서 24시간 배양 한 후 3,000 rpm으로 원심 분리하여 균을 모은 다음 total DNA extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 균주의 염색체를 분리정제하여 16S rDNA 증폭을 위한 PCR의 template로 사용하였다. 16S rDNA 유전자를 증폭하기 위해 eubacteria 특이적 primer인 27F (*E. coli* numbering 8 - 27 ; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492 - 1510; 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하였다. 염기 서열은 Bioneer사에 시료를 의뢰하여 결정하였다. 시료의 염기 서열은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 분석하였다.

생산 균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. (3), ISP Strain key (12), Shirling and Gottlieb (17) 그리고 Lechevalier and Lechevalier (8) 등의 방법에 준하여 실시하였다.

Herbimycin A 및 Dihydroherbimycin A의 정제

Herbimycin A와 dihydroherbimycin A는 다음과 같이 정제되었다. 배양액 5 L를 pH 7.0으로 조정한 후 3,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 균체를 제거하고 여기에 동일 부피의 ethyl acetate (EtOAc)를 첨가하여 30분간 추출하였다. 활성 물질이 포함된 EtOAc 층은 분액깔때기를 이용하여 분리하고 rotary evaporator로 40°C에서 감압 농축하여 450 mg의 추출물을 얻었다. 농축된 활성 성분은 5 ml의 methanol (MeOH)에 녹인 후 acetone (Me₂CO)으로 평형 시킨 Sephadex LH-20 컬럼 (5.5×40 cm)에 흡착시킨 다음 동일용매로 용출시켰다. 이때 유속은 2 ml/min이었고 10 ml씩 분획하였다. 이때 herbimycin A 분획이 먼저 42에서 53번 사이의 분획에서 용출되어 감압 농축하여 125 mg의 조정제물을 얻었다. 이를 1 ml의 MeOH에 녹여서 CHCl₃:MeOH(10 : 0.2, v/v)로 평형 시킨 silica gel 컬럼 (1.5×40 cm)에 흡착시킨 후 동일 용매계로 2 ml/min의 유속으로 용출시켜, 약 16 ml씩 분획하였다. 그 결과 7번에서 14번 사이의 분획에서 herbimycin A 활성 성분이 용출되었으며 이들을 모아 감압 농축한 후 진공 건조하여 32 mg의 노란색 분말을 얻었다.

Dihydroherbimycin A는 Sephadex LH-20 컬럼에서 64에서 69

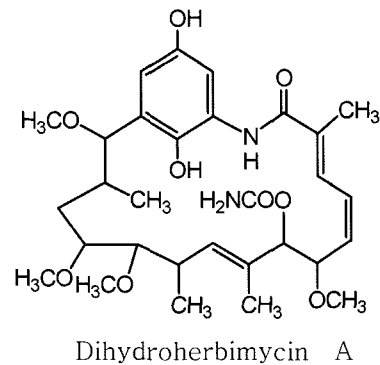
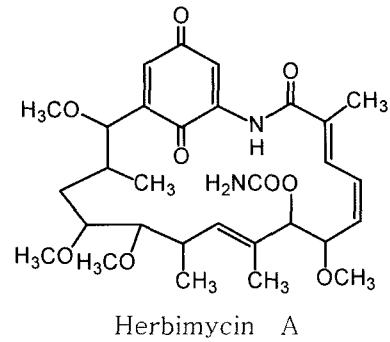


Fig. 1. Chemical structures of herbimycin A and dihydroherbimycin A.

번 분획에서 용출되었다. 이들을 모아서 감압 농축한 결과 70 mg의 조정제물을 얻었다. 이를 1 ml의 EtOAc에 녹인 다음 CHCl₃ : MeOH (10 : 2, v/v)로 평형 시킨 silica gel 컬럼 (2.5×30 cm)에 흡착시킨 후 동일 용매계로 2 ml/min의 유속으로 용출시켜, 약 16 ml씩 분획하였다. 활성 성분은 12에서 17번 사이의 분획에서 용출되었다. 이들을 모은 후 감압 농축하여 15 mg을 얻었고 이를 다시 CHCl₃ 1 ml에 녹인 후 CHCl₃ : MeOH (10 : 0.2, v/v)로 평형 시킨 silica gel 컬럼 (1.5×20 cm, v/v)에 흡착시킨 후 동일 용매계로 1 ml/min의 유속으로 용출시켜, 10 ml씩 분획하였다. 25에서 31번 사이에서 활성 성분이 용출되었고 이들을 감압 농축한 후 진공 건조하여 10 mg의 흰색 분말을 얻을 수 있었다.

정제 완료된 herbimycin A와 dihydroherbimycin A의 순도 확인을 위해 HPLC (HP - 1100, Hewlett Packard) 분석을 실시하였다. 먼저 herbimycin A 시료를 1 mg/ml의 농도로 acetonitrile (CH₃CN)에 녹여 20 µl를 injection한 후 µ-Bondapak C₁₈ 컬럼(10 µm, 3.9×300 mm, Waters)을 이용한 20%에서 90% acetonitrile의 linear gradient법으로 1 ml/min의 유속으로 용출하며 270 nm에서의 chromatogram을 관찰하였다. Herbimycin A의 retention time은 15.3분이었다(Fig. 2). 또한 표준물질과의 비교를 위해 Sigma Chemical (St. Louis, USA)로부터 구입한 herbimycin A와 이 실험에서 정제된 herbimycin A를 각각 1 mg씩 2 ml의 acetonitrile (CH₃CN)에 녹여 상기 조건으로 분석한 결과 단일 peak로 나타났으므로 본 실험에서 실제로 herbimycin A가 정제되었음을 확

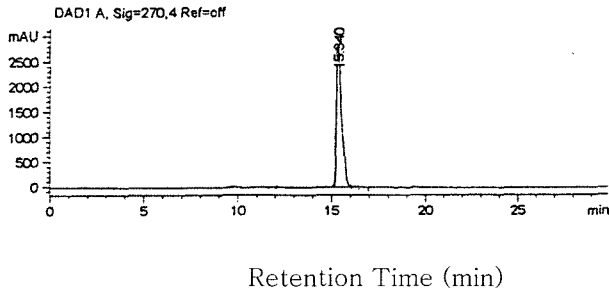


Fig. 2. HPLC chromatogram of herbimycin A.

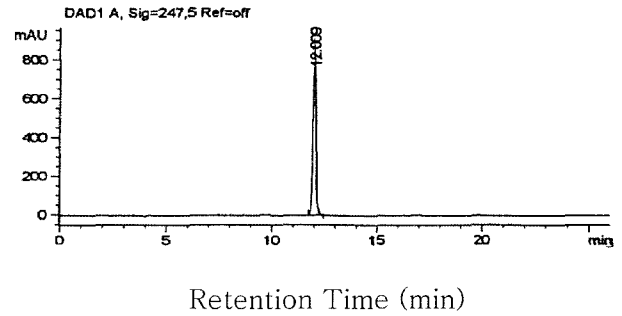


Fig. 4. HPLC chromatogram of dihydroherbimycin A.

인하였다(Fig. 3). Dihydroherbimycin A는 0.3 mg/ml의 농도로 acetonitrile에 녹여 herbimycin A와 동일한 조건으로 분석을 실시하여 247 nm의 chromatogram을 관찰하였다. Dihydro-herbimycin A의 retention time은 12.0분이었다(Fig. 4).

이화학적 분석

Herbimycin A 및 dihydroherbimycin A의 열안정성 측정을 위해 시험관에 각 시료 1 mg씩을 취한 다음 MeOH 1 ml씩을 가하여 완전히 녹인 후 뚜껑을 밀봉하였다. 이것을 60°C로 조정된 수조에 넣고 10분 단위로 채취한 후 *Bacillus subtilis* 및 *Micrococcus luteus* 에 대한 항균활성을 측정하였다.

pH 안정성 측정을 위해서는 준비된 시험관에 시료 1 mg씩을 취한 다음 MeOH 1 ml씩을 가하여 녹이고, 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH 이용하여 pH를 2에서 10까지 2단위씩 차이가 나도록 조정 후 밀봉하였다. 이것을 실온에서 24시간 방치한 후 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl를 이용하여 중화시킨 다음 동일 균주에 대하여 항균 활성을 측정하였다.

정제된 herbimycin A와 dihydroherbimycin A를 CHCl₃에 녹여 silica gel TLC plate F₂₅₄ (0.2 mm, Merck)에 점적하고 각종 용매로 전개한 후 R_f 값을 구하였다. 이어서 KMnO₄, H₂SO₄, ninhydrin 및 Sakaguchi 등의 시약을 이용하여 물질의 반응성을 확인 하였다.

그밖에 FT-IR spectrum, UV spectrum, ESI-MS spectrum 실시하였고 그 결과를 STN (The Scientific and Technical Information Network) data base의 CAS(Cheical Abstracts Service) online 검색을 실시하여 정제된 항산화 물질이 herbimycin A 및

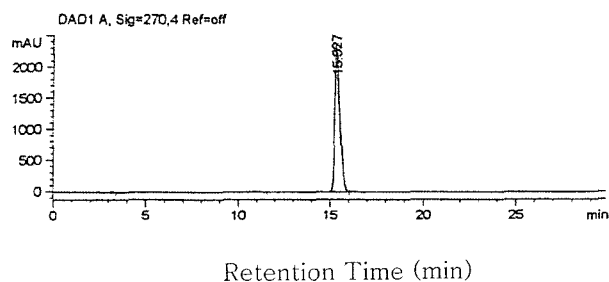


Fig. 3. HPLC chromatogram of herbimycin A plus herbimycin A.

dihydroherbimycin A임을 동정하였다 (논문 준비중).

항균 활성 검색

항균 활성의 측정은 일반적인 paper-disk법을 이용하였다. Test organism인 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Comamonas terrigena* ATCC 8461 및 *E. coli* (NIHJ) No. 34 등의 세균은 nutrient agar에서 배양하였고 *Aspergillus niger* ATCC 6272 및 *Candida albicans* ATCC 7491 등의 곰팡이는 Sabouraud agar를 이용하여 배양하였다. 시료는 각각 1 mg을 1 ml의 MeOH에 녹인 후 paper disk (ADVANTEC, 직경 8 mm)에 50 µl (50 µg)을 흡착시킨 후, 각각의 test organism이 접종된 agar plate에 올려놓았다. 세균은 37°C에서 24 시간 배양하였고 곰팡이류는 27°C에서 48시간 배양한 후 생장저해를 측정하였다. 항생 활성은 억제환의 직경을 측정하여 확인하였다.

항암 활성 측정

항암 활성의 측정은 사람의 폐암 세포(A549), 자궁암(HE-C-1-B), 대장암(HT-29) 및 백혈병 세포(HL-60) 등을 대상으로 실시하였는데 이들은 모두 ATCC (Rockville, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 분석에 사용된 camptothecin (CPT)과 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical (St. Louis, USA)의 제품을 사용하였다.

항암 활성 평가에서, A549, HEC-1-B와 HT-29등의 세포는 5×10³ cells/well 농도로, HL-60 세포는 1.5×10⁴ cells/well의 농도로 96 well plate에 plating한 후 각 시료를 여러 농도로 가한 다음 5% CO₂, 37°C의 조건에서 48시간 배양한 후 MTT법(11)으로 증식 저해 활성을 평가하였다.

세포 독성 시험

In vitro 활성 검색이 세포를 이용한 반응이므로 선택적 억제 효과인지 세포 독성에 의한 것인지를 확인하기 위해서 마우스에서 유래된 leukemia 세포인 L5178Y 및 P388 (ATCC, USA)를 이용하여 세포 독성 시험을 수행하였다. 수회 계대 배양하여 지수 성장기의 세포를 RPMI 1640 배지(10% fetal bovine serum, gentamycin 50 µg/ml 함유)로 희석하여 2×10⁴ cells/ml되게 하여

세포 부유액을 제조한다. 96-well micorplate에 적당 농도로 희석된 시료를 20 µl씩 넣고 여기에 세포 부유액 180 µl를 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양한 후 MTT법으로 증식 저해 활성을 측정하였다.

결 과

선별 균주의 특성 및 동정

본 균주의 포자 사슬은 spiral 형태를 나타내며 20 개 이상의 포자가 연결되어 있었다. 포자는 매끄러운 표면을 갖고 있었고, 너비 약 0.4 - 0.6 µm 길이 약 0.4 - 0.9 µm인 타원형이었다. 생리 및 생화학적 특성을 분석한 결과 starch, casein, gelatin을 가수분해하고 catalase와 indole을 생산하는 것으로 나타났다. Skim milk coagulation test에서는 양성 반응을 보였으며, NaCl에 대한 내성은 3% 이하였다. 생육 최적 온도와 pH는 각각 28°C와 pH 7.0이었고 melanoid 색소를 생성하지 않았다.

당 이용성을 조사한 결과, sorbose, sorbitol, inositol, L-rhamnose의 이용성은 없는 것으로 나타났으며, 그 외에 D-glucose, L-arabinose, D-raffinose, D-xylose, D-fructose, D-mannose, sucrose 등의 당들은 이용할 수 있는 것으로 나타났다.

Whole-cell hydrolysate 을 이용한 세포벽 분석 결과, L,L-diaminopimelic acid (LL-DAP) 및 glycine이 검출되었으므로 세포벽은 Type-Ⅰ임을 알 수 있었고, 지방산으로는 anteiso-15:0 (12-methyltetradecanoate) 및 iso-16:0 (14-methylpentadecanoate)이 주요 지방산으로 관찰되었다. 16S rDNA 염기 서열은 여러 종류의 *Streptomyces* 균주들과 높은 유사도를 보였지만 약 380 bp의 부분적인 서열만 비교되었으므로 species 수준에서의 동정은 이루어 지지 못하였다. 이상의 화학 분류학적 특성과 16S rDNA 염기 서열 유사성을 바탕으로 이 균주는 *Streptomyces* sp. AO-0511로 명명하였다.

Herbimycin A 및 dihydroherbimycin A의 이화학적 특성

항균활성 측정법을 이용한 열 안정성 실험에서 herbimycin A는 10분이 경과 하면서 약 40% 이상의 활성의 소실을 보였고 50분이 경과 할 때까지 약 50% 이상의 활성은 유지하였으나 60분이 경과할 때는 잔존 활성이 40% 이하로 급격히 낮아짐이 관찰되었다. Dihydroherbimycin A는 10분이 경과하면서 10%가 조금 넘는 활성의 소실을 보였으나, 그 후 60분까지 80%가 넘는 잔존 활성을 유지하였으므로 herbimycin A에 비하여 비교적 안정한 물질로 사료되었다.

pH 안정성 시험에서 herbimycin A는 pH 2에서 6까지 90% 이상의 잔존 활성을 보였으나 pH 8 이상의 알칼리 영역에서 급

Table 2. Color reaction of herbimycin A and dihydroherbimycin A

Test	Herbimycin A	Dihydroherbimycin A
Molish	Negative	Negative
Sakaguchi	"	"
Ninhydrin	"	"
H ₂ SO ₄	Positive	Positive
KMnO ₄	"	"
DPPH	"	"

격한 활성의 소실이 관찰되었다. Dihydroherbimycin A 역시 pH 8 이상의 알칼리 영역에서 잔존 활성이 완전히 소실되는 것이 관찰되었다. 이로서 herbimycin A와 dihydroherbimycin A 모두 산성 영역의 pH에서는 비교적 안정하였으나 알칼리 영역의 pH에서는 매우 불안정한 물질로 추정되었다.

TLC를 위해 herbimycin A와 dihydroherbimycin A를 각종 전개 용매로 전개시킨 결과, 각각의 R_f 값은 Table 1과 같이 CHCl₃ : MeOH (10 : 0.2, v/v) 혼합 용매에서 0.21 과 0.14, CHCl₃ : MeOH : acetic acid (10 : 0.5 : 0.1, v/v/v) 혼합용매에서 0.68과 0.29, EtOAc : benzene (5 : 5, v/v) 혼합용매에서 0.22와 0.05, EtOAc : n-hexane (10 : 1, v/v) 혼합용매에서는 0.59와 0.31 이었다. Dihydroherbimycin A가 모든 전개 용매계에서 더 낮은 R_f 값을 나타낸 것은 herbimycin A보다 극성이 높은 구조적인 특성에 기인한 것으로 사료되었다. 각종 시약을 이용한 발색 반응은 Table 2에 정리하였다. 발색 반응의 KMnO₄와 H₂SO₄ 시험에서는 모두 양성을, ninhydrin 시험에서는 음성을 나타냈고, Molish 및 Sakaguchi 반응에서도 음성으로 나타났는데, 이로서 환원당 및 구아니딜기 같은 강 염기성 관능기는 존재하지 않는 물질로 추정되었다.

항균 활성

Herbimycin A와 dihydroherbimycin A의 항균 활성을 Table 3에 나타내었다. 이들은 모두 *Bacillus subtilis* ATCC 6633과 *Micrococcus luteus* ATCC 9341에 대해서는 약한 활성을 나타냈으나 그 외의 다른 Gram 양성 세균, 곰팡이 및 효모들에 대해서는 저해 활성을 나타내지 않았다.

항암 활성

Herbimycin A와 dihydroherbimycin A의 인간 암 세포주에 대한 증식 억제 활성은 표준 물질로 사용된 camptothecin과 비교하였다(Table 4). 여기에서 herbimycin A과 dihydroherbimycin A는 난소암 세포(endometrial cancer cell)인 HEC-1-B, 대장암 세포(colon cancer cell)인 HT-29에 대해서는 거의 동등하였으나, 폐암 세포(lung cancer cell)인 A 549 세포에 대해서는 4 - 6 배정

Table 1. R_f values of herbimycin A and dihydroherbimycin A on the silica gel TLC plate

Solvent system	Herbimycin A	Dihydroherbimycin A
1. Chloroform : Methanol (10 : 0.2)	0.21	0.14
2. Chloroform : Methanol : Acetic acid (10 : 0.5 : 0.1)	0.68	0.29
3. Ethyl acetate : Benzene (5 : 5)	0.22	0.05
4. Ethyl acetate : n-Hexane (10 : 1)	0.59	0.31

Table 3. Antimicrobial spectrum of herbimycin A and dihydroherbimycin A

Test microorganisms	Diameter of inhibition zone (mm)	
	Herbimycin A	Dihydroherbimycin A
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11.6	11.9
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	11.0	11.3
<i>E. coli</i> (NIH) No.34	-	-
<i>Comamonas terrigena</i> ATCC 8461	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 6272	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 7491	-	-

도, 백혈병 세포(leukemia cell)인 HL-60 세포에 대해서는 1,000 배 이상의 강력한 증식 저해 활성을 나타냈다.

세포 독성

L5178Y 및 P388 cell을 이용한 herbimycin A와 dihydroherbimycin A의 세포 독성을 Table 5에 정리하였다. Herbimycin A의 L5178Y 세포에 대한 세포 독성은 면역 억제제인 cyclosporin A에 비해 높았지만 항진균제인 tunicamycin 및 cycloheximide와 항암제인 camptothecin에 비해서는 현저하게 낮게 나타났다. P388 세포에 대해서는 cyclosporin A보다 강하지만 camptothecin보다는 약한 세포 독성을 보였다. Dihydroherbimycin A는 herbimycin A에 비해서 낮은 세포 독성을 보였는데 특히 P388 세포에 대해서는 nystatin을 제외한 모든 약제보다 약한 세포 독성을 나타내었다.

고찰

일반적으로 방향족 고리의 서로 다른 탄소에 탄화수소가 고리 형태로 연결된 화합물들은 ansamycin류의 물질로 분류되는데, herbimycin과 함께 geldanamycin 및 mabcen I 등 많은 물질이

Table 4. Anticancer activities of camptothecin, herbimycin A and dihydroherbimycin A against human cancer line (IC₅₀, μ M)

Compound	Human cancer cell line			
	A 549	HEC-1-B	HL-60	HT-29
Camptothecin	26.5	98.4	22.0	4.42
Herbimycin A	4.50	41.0	<0.017	5.64
Dihydroherbimycin A	7.67	26.0	<0.017	4.20

Table 5. Cytotoxicities of herbimycin A, dihydroherbimycin A and known antifungal compounds

Compound	IC ₅₀ (μ M)	
	L5178Y	P388
Antimycin A	0.54	0.36
Nystatin	4.86	>100
Tunicamycin	0.049	1.83
Cycloheximide	0.035	0.10
Cyclosporin A	14.6	5.65
Camptothecin	0.055	0.37
Herbimycin A	0.12	1.74
Dihydroherbimycin A	1.02	14.5

알려져 있다(6). 본 실험실의 항산화물질 탐색 과정에서 새로운 물질이 탐색되지 못하고 기존에 알려진 herbimycin A와 dihydroherbimycin A이 발견되었다. 이러한 사실은 다양한 기기 분석을 통하여 확인되었다. 즉 UV-Vis spectrum에서 herbimycin A는 270 nm에서 최대흡광도(λ_{max})를 나타내었고 392 nm에서는 특징적인 흡광도를 나타내었는데 이는 Omura 등(15)의 결과와 완전히 일치하는 결과였다. 정제된 두 가지 물질의 hydroxyl group의 존재 여부가 IR spectrum 분석에서 확실히 구별되었으나, 다른 작용기들의 spectrum은 거의 동일하게 관찰되었다. ESI-MS 분석에서 정제된 각 물질의 분자량 차이가 2로 확인되었지만, 거의 동일한 pattern의 fragment peak들이 관찰되었다. 이상의 결과로 두 물질이 상당히 유사한 구조의 물질임을 추정할 수 있었다 (논문 준비중).

HPLC 결과 두 물질 모두 단일 피크로 검출되어 높은 순도로 정제되었음을 알 수 있었다. 이때 herbimycin A의 retention time은 15.3 분으로써 dihydroherbimycin A의 12.0분에 비해서 길었는데(Fig. 3), 이는 비극성 컬럼을 이용한 동일 용매 조건에서 dihydroherbimycin A의 극성이 상대적으로 높은 것으로 추정할 수 있었다. TLC 분석에서는 마찬가지로 이유로 dihydroherbimycin A이 더 낮은 R_f 값을 보였다.

항생 물질로서의 활성은 두 물질 모두 그람 양성 박테리아에 대해서만 매우 약하게 확인되었는데, 이는 Omura 등(15)에 의해 발표된 항생활성 결과 (MIC ; μ g/ml), *Bacillus subtilis* PCI 219 (>200), *Sarcina lutea* PCI 1001 (>200) 및 *Escherichia coli* NIHJ (>200 μ g)와 매우 유사한 것으로, 항생 물질로의 개발을 위해서는 유도체를 합성하거나 천연물로부터의 새로운 유도체 분리 등 새로운 방법이 도입되어야 할 것으로 판단되었다.

항암 활성 및 세포 독성 실험의 비교에서 herbimycin A와 dihydroherbimycin A는 표준 물질로 사용된 camptothecin에 비해 세포 독성은 낮은 반면 항암 활성은 강한 물질로 확인 되었다. Camptothecin은 중국 camptotheca 나무와 아시아 nothapodytes 나무에서 발견된 물질로 topoisomerase I을 저해함으로써 강한 항암 활성을 나타내는 물질로 알려져 있다 (4). 이로써 항산화 물질로 스크리닝 되어 분리된 herbimycin A와 dihydroherbimycin A가 약효와 안전성의 측면에서 항암제로서의 개발 가능성을 보여주는 물질로 평가받을 수 있는 것으로 판단되고 있다. Herbimycin은 tyrosine kinase 저해제로써 암세포의 사멸과 관련된 것으로 알려져 있다. 예를 들면 대장암 세포(Colo-205)의

apoptosis를 유발하지만(10), 반대로 U937, HL60 등의 백혈구 종양 세포에서는 scr kinase p53/p56 Lyn을 저해하여 apoptosis를 억제한다고 보고되었다(2). 또는 I κ B kinase를 저해하여 NF- κ B 의존적 유전자 발현을 막아줌으로써 염증을 억제한다는 보고도 있다(13). 그러나 이러한 활성들이 항산화 활성과 연관되어 있는지는 알려져 있지 않은 실정이다.

Dihydroherbimycin A에 관해서는 아직까지 인간 암세포에 대한 항암 활성이나 항산화 활성 및 기타 생리 활성에 대한 보고가 없으며 이 실험에서 항암 활성과 세포 독성이 최초로 보고되었다. 특히 dihydroherbimycin이 herbimycin에 비해서 더 안정적이며 낮은 세포 독성을 지니는 것으로 나타나므로 앞으로 지속적인 연구를 진행 할 가치가 있는 물질로 사료 되었다.

참고문헌

- Bendich, A., L.J. Machlin, O. Scadurra, G.W. Burton, and D.D.M. Wayner. 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Radical Biol. Med.* 2, 419-444.
- Bezombes, C., I. Plo, V.M. Mas, A. Quillet-Mary, A. Negre-Salvayre, G. Laurent, and J. Jaffrezou. 2001. Oxidative stress-induced activation of Lyn recruits sphingomyelinase and is requisite for its stimulation by Ara-C. *FASEB J.* 15, 1583-1588.
- Buchner, R.E., and N.E. Gibbons. 1974, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 724-829.
- Fleming, A.B, K. Haverstick and W.M. Saltzman. 2004. In vitro cytotoxicity and in vivo distribution after direct delivery of PEG-camptothecin conjugates to the rat brain. *Bioconjug. Chem.* 15, 1364-1375.
- Hotta, K and S. Horinouchi. 1994. *바이오사이언스와放線菌*. 醫藥出版社(日本, 東京). pp. 43-80.
- Iwai, Y., A. Nakagawa, N. Sadakane, and S. Omura. 1980. Herbimycin B, a new benzoquinoid ansamycin with anti-TMV and herbicidal activities. *J. Antibiotics* 33, 1114-1119.
- Kalakoutskii, L.V. and N.S. Agre. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* 40, 469-524.
- Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier. 1981. Chapter 147. Introduction to the order *Actinomycetales*. pp. 1915-1922. In *The Prokaryotes*. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, vol II. eds. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trueper, A. Balowa and H.G. Schlegel. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Lin, L.Z., G. Blasko, and G.A. Cordell. 1988. Proton NMR analysis of herbimycins and dihydroherbimycins. *J. Nat. Prod.* 51, 1161-1165.
- Mancini, M., B.O. Anderson, E. Caldwell, M. Sedghinasab, P.B. Paty, and D.M. Hockenbery. 1997. Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *J. Cell Biol.* 138, 449-469.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.
- Nomomura, H., 1974, Key for classification and identification of 485 species of *Streptomyces* included in ISP. *J. Ferment. Technol.*, 52, 78-94.
- Ogino, S., K. Tsuruma, T. Uehara, and Y. Nomura. 2004. Herbimycin A abrogates nuclear factor- κ B activation by interacting preferentially with the I κ B kinase subunit. *Mol. Pharmacol.* 65, 1344-1351.
- Omura, S., A. Nakagawa, and N. Sadakane. 1979. structure of herbimycin, a new ansamycin antibiotic. *Tetrahedron Lett.* 44, 4323-4326.
- Omura, S., Y. Iwai, Y. Takashi, N. Sadakane, and A. Nakagawa. 1979. Herbimycin A, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *J. Antibiotics* 32, 255-261.
- Shibata, K., S. Satsumabayashi, A. Nakagawa, and S. Omura. 1986. The structure and cytotoxic activity of herbimycin C. *J. Antibiotics* 39, 415-423.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. System Bacteriol.* 16, 313-340.
- Turturro, F., M.D. Arnold, A.Y. Frist, and K. Dulford. 2002. Model of inhibition of the NPM-ALK kinase activity by herbimycin A. *Clin. Cancer Res.* 8, 240-245.
- Uehara, Y., M. Hori, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1986. Phenotypic change from transformed to normal induced by benzoquinoid ansamycins accompanies inactivation of p60^{src} in rat kidney cells infected with Rous sarcoma virus. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2197-2206.

(Received February 2, 2006/Accepted March 14, 2006)

ABSTRACT: Chemical Characteristics and Biological Activities of Herbimycin A and Dihydroherbimycin A Produced by a Soil Isolate *Streptomyces* sp. AO-0511

Hung Bae Chang¹, Se Chan Kim¹, and Jae-heon Kim* (Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea and ¹Korea Bio Polytechnic College, 315-1 Chae-woon-ri, Ganggyeong-eub, Nonsan-Si 320-905, Korea)

A streptomycete strain was isolated from the soil samples from Korea. The chemotaxonomy and 16S rDNA sequencing confirmed that the strain belonged to the genus *Streptomyces* and we named it *Streptomyces* sp. AO-0511. Two antibiotics, herbimycin A and dihydroherbimycin A produced by this strain were tested for their physico-chemical and biological characteristics. Both compounds were stable under acidic pH. Dihydroher-

bimycin A was more heat-stable and polar compared with herbimycin A. Only weak antibacterial activities were detected against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Micrococcus luteus* ATCC 9341. However, herbimycin A and dihydroherbimycin A showed strong inhibitory activities on lung cancer cells (A549 cells) and leukemia cells (HL-60). The cytotoxicity was determined using L5178Y and P388 cell lines. The results showed that herbimycin A and dihydroherbimycin A had lower toxic effects on the cells compared with the standard compounds, comptohecin and cyclosporin A. Therefore, both compounds could be good candidates for the development of new anticancer drugs.