

해조류 공생미생물의 Receptor Tyrosine Kinase 억제효능 검색

윤금자 · Guohua Yang · Zhile Feng · Viviane N. Nenkep · Xavier Siwe-Noundou

Alain S. Leutou · 김군도¹ · 조희영² · 최홍대³ · 손병화*

부경대학교 화학과, ¹부경대학교 미생물학과, ²한국화학연구원, ³동의대학교 화학과

Screening on Receptor Tyrosine Kinase Inhibitory Activity of Marine Algae-Derived Symbiotic Microorganisms

Keumja Yun, Guohua Yang, Zhile Feng, Viviane N. Nenkep, Xavier, Siwe-Noundou,

Alain S. Leutou, Gun-Do Kim¹, Heeyeong Cho², Hong Dae Choi³, and Byeng Wha Son*

Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Pharmacology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-343, Korea

³Department of Chemistry, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

Abstract – In order to screen new receptor tyrosine kinase inhibitor which is expected to be anticancer drug lead, we have investigated receptor tyrosine kinase inhibitory activity on the marine alga-derived symbiotic microorganisms (500 strains). The significant activities (over 70% inhibition at 10 µg/ml) were observed in the extracts of ten strains (Strain No.: MFA018, 019, 206, 242, 325, 335, 343, 344, 354, 356), isolated from marine red algae, five strains (Strain No.: MFA030, 126, 213, 324, 339), isolated from the brown algae, and one strain (Strain No.: MFA272), isolated from the marine green algae, respectively. Among the active strains, MFA019 and 356 showed strong receptor tyrosine kinase inhibitory activity with IC₅₀ values of 0.6 and 0.9 µg/ml, respectively.

Key words – Marine algae, Symbiotic marine microorganism, Receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor, Antitumor drug lead

해양생물은 해수중이라는 폐쇄계의 특이한 환경, 즉 높은 염의 농도, 수압, 적은 일조량, 신체 표면이 해수 중에 노출되어 있어 병원미생물의 침입을 받기 쉬운 환경 하에서 서식하고 있어 육상생물과 극히 다른 대사체계 혹은 생체방어계로 진화되었을 것으로 보고되고 있다. 특히, 해양생물은 그들만의 특이한 공생관계에 의해 해양생태계를 유지하고 있으며, 따라서 해양생물의 공생관계와 생체방어시스템에 관한 이해와 기초적 지식은 의약품 등의 정밀화학 산업의 발전으로 연결 가능하므로 매우 중요하다.¹⁾

공생미생물류는 체외효소에 의한 유기물의 분해로 영양을 섭취하는 특이한 생물 군으로서, 유기물을 분해하여 환경을 유지하고 개선하여 생물의 생태계를 유지하는 중요한 역할을 담당하고 있을 뿐 만 아니라, 특이한 분자구조와 다양한 생물활성을 발현하는 많은 종류의 2차 대사성분을 생

산하여, 지금까지 보고된 생리활성 천연물의 약 25 %가 균류로부터 분리된 2차 대사산물로 알려져 있다.²⁾ 균류의 수는 약 150만종 정도로 추산되고 있으나 대부분이 육상에서 분리된 종으로서, 그 중 5000-7000종이 현재 배양 보존되어 기초적 연구에 이용되고 있으며,^{3,4)} 나아가, 발효식품, 주류, 식음료, 의약품, 기초화합물, 기능성 고분자 등의 공업원료를 생산하는데 폭 넓게 이용되고 있다.⁵⁾ 해양미생물로부터 생리활성물질을 생산하는 해양미생물균주를 개발하기 위한 기초연구로서 해양소재로부터 분리된 미생물을 대상으로 라디칼소거활성,^{6,7)} tyrosinase저해활성⁸⁾ 및 항균활성⁹⁾을 조사하여 유의성 있는 생물활성 해양미생물균주를 개발하였다. 해양미생물유래 항암약물탐색의 일환으로서,^{10,11)} 해조류로부터 500 균주의 해양미생물을 분리하고, 이들을 대상으로 receptor tyrosine kinase (RTK) 억제 효능을 *in vitro*에서 검색하여 항암선도물질생산 해양미생물 자원의 기초자료를 조사하였다.

*교신저자 (E-mail): sonbw@pknu.ac.kr
(Tel): +82-51-629-5592

재료 및 방법

해조류의 채집 및 공생미생물의 분리 - 2008년 통영시 옥지도 연안에서 해조류 (홍조류, 갈조류, 녹조류)를 채집하여 멸균한 봉지에 담아 실험실로 운반한 후 -20°C에서 보관하면서 공생미생물을 분리하였다 (균주번호 MFA001~500).

1) 자낭과 분리

Petri dish에 여지를 깔고, 여기에 채집한 숙주재료(해조류)를 얹어놓고, 멸균해수를 가하여 27-29°C에서 15-30일간 배양한 후 현미경하에서 자낭과로부터 자낭포자를 멸균 침을 이용하여 채취한 후 배지 상에서 계대 배양하여 공생균주를 분리하였다.

2) 해조류의 표면균류 분리

숙주재료를 무균 하에서 agar 평판배지 (SWS+agar 혹은 YPG+agar) 상에 놓고, 배양한 후, 현미경하에서 순수 균사 (hyphae)를 채취하거나, 배지상의 균사를 계대 배양하여 표면 공생균주를 분리하였다.

3) 해조류의 내면균류 분리

무균 상태에서 숙주재료의 표면을 멸균 증류수, 70% 에탄올, 멸균 증류수 순으로 세척한 후, 해부용 메스 (scalpel)로 조직의 내부를 노출시킨 다음 내부조직을 채취하여 agar 평판배지 (SWS+agar 혹은 YPG+agar) 상에 놓고, 배양한 후, 현미경하에서 순수 균사 (hyphae)를 채취하거나, 배지상의 균사를 계대 배양하여 내면 공생균주를 분리하였다.

1차 배양 (10 ml scale), 추출 및 표준시료 - 분리한 균주를 각각 10 ml의 YPM배지 (0.2% yeast extract, 0.2% peptone, 0.4% mannitol, 100% seawater)에서 27-29°C, 15일간 배양한 후, 배양액에 같은 양 (10 ml)의 메탄올-아세톤 (1:1)을 가하여 추출한 다음, 탈지면 여과하여 얻은 추출액의 유기용매를 유거하고 남은 수용액을 HP-20 column에 주입하고, 증류수로 세척하여 탈염 처리한 후, 메탄올 및 아세톤 순으로 순차적으로 용출한 다음 유기용매를 유거하여 500종의 추출물 (No. 001-500)을 얻었다. 이들을 표준시료로 이용하여 활성 억제 효능 검색을 시행하였다.

시약 및 기기 - Tris HCl, MgCl₂, MnCl₂, DTT, Tween-20, HEPES, NaCl, EDTA, BSA, Substrate (PolyGlu:Tyr, 4:1), ATP 등은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)의 제품들을 사용하였고, Streptavidin Donor, P-Tyr-100 Acceptor beads, Fusion alpha-microplate analyzer는 PerkinElmer사 (Shelton, CT, USA) 제품을 사용하였다.

시약조제 - Kinase assay buffer는 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 2 mM DTT, 0.01% Tween-20의 조건으로 조제하였고, Capture buffer (2.5 x concentrated)는 62.5 mM HEPES (pH 7.4), 250 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.25% BSA의 조건으로 조제하였다. 기질 (PolyGlu:Tyr, 4:1)은 ATP가 함유된 kinase assay buffer로

희석하였고, Streptavidin donor와 p-Tyr-100 acceptor bead는 최종농도가 각각 20 µg/ml이 되도록 capture buffer로 희석해서 조제하였다.

In vitro kinase assay - 해조류의 공생미생물 유래 각 추출물들의 epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase 활성 억제도는 PerkinElmer사의 Alpha Screen® system을 응용하여 측정하였다. Alphascreen이란 Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay를 의미하며, Luminescent oxygen radical channel을 이용하는 immunoassay 방법이다. Assay는 384 well plate (Greiner Bio-one, NC, USA)를 사용하여 전체 reaction vol. 25 µl에서 이루어졌고, 분리 정제된 EGFR 효소는 Sigma사로부터 구입하였다. 추출물 1 µl, ATP (최종농도 100 mM)가 함유된 kinase buffer 4 µl, EGFR 효소 5 µl를 넣고, 15분 동안 상온에서 반응시킨 후 기질 (PolyGlu:Tyr, 4:1) 5 µl를 넣고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 여기에 donor와 acceptor bead 혼합물 (1:1 ratio)을 10 µl 넣은 다음, 빛을 차단한 상태로 상온에서 1시간 동안 추가 반응시킨 후, 효소의 활성 억제도를 측정하였다. 해조류 공생미생물의 추출물 500개를 대상으로 최종농도 50 µg/ml에서 활성 억제도를 1차적으로 검색하여 활성 시료를 선정 한 다음, 최종농도 10 µg/ml에서 2차 검색을 진행하여 최소 70% 이상의 억제효과를 나타내는 시료를 대상으로 IC₅₀ 값을 조사하였다.

결과 및 고찰

EGFR은 세포표면수용체 (transmembrane growth factor receptor) 중 하나로 아미노산 티로신잔기의 인산화로 활성화되는 약 180 kDa의 단백질이다.^{12,13} EGFR은 상피세포와 상피세포 암의 양상을 결정하는 신호전달 과정에 있어서 중요한 역할을 담당한다.¹⁴ 이러한 EGFR의 과잉 발현과 자가 조절의 상실은 다양한 고형암을 유발한다. 그러므로 EGFR의 kinase 활성을 억제할 수 있는 억제제는 암 뿐만 아니라 성장성 질환에도 효과적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 전망하고 있다. 현재 EGFR를 작용점으로 예후를 예측하고 치료에 이용할 수 있는 중요한 분자적 표식자로 이용하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다.¹⁵⁻¹⁷ EGFR은 receptor tyrosine kinase의 일종으로 ligand인 epidermal growth factor (EGF)와의 결합에 의하여 kinase 도메인이 인산화 되면서 활성화된다. EGFR의 활성화는 세포의 증식에 중요한 역할을 하며, 많은 종양에서 그 활성화가 보고되어 있다.¹⁸ 따라서, 항종양 활성물질 탐색의 일환으로서 EGFR kinase 활성을 억제할 수 있는 억제제에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 해조류로부터 분리한 공생균류로부터 EGFR kinase에 대한 활성억제 물질을 탐색하고자 경남 통영시 옥지도 해역에서 채집한 해

Table I. EFGR kinase inhibitory activity at conc. 50 µg/ml of the extracts from the marine alga-derived microorganisms

Sample no.	% Inhibition (n=2)	Host marine algae
003	95.73	NapJak PaRae* / (G)** / (Edible)
015	85.89	SaiDaGaSi UMU / (R)** / (Edible)
017	70.93	Cham DoBak / (R)
018	87.78	SaiDaGaSi UMU / (R) / (Edible)
019	96.89	SaiDaGaSi UMU / (R) / (Edible)
030	88.03	Pae / (B)**
072	96.33	SanHoMal / (R)
126	97.16	MoJaBan / (B) / (Edible)
188	71.04	SaiDaGaSi UMU / (R) / (Edible)
199	69.85	Ip-KkoSiRaeGi / (R)
202	70.03	DoBak / (R)
206	89.44	Cham GopSeul-I / (R)
213	96.70	GomPi / (B) / (Edible)
242	96.08	Gae UMU / (R) / (Edible)
272	94.52	Cham PaRae / (G) / (Edible)
290	75.53	Red KKaMakSal / (R)
324	97.31	DaSiMa / (B) / (Edible)
325	97.42	Cham GaSaRi / (R) / (Edible)
335	96.70	SeoSil / (R) / (Edible)
339	96.45	OiTolGe MoJaBan / (B) / (Edible)
343	96.24	KkoSiRaeGi / (R) / (Edible)
344	97.09	KkoSiRaeGi / (R) / (Edible)
354	96.79	Gim / (R) / (Edible)
356	96.89	UMUGaSari / (R) / (Edible)
366	70.27	Unidentified
387	100.07	Cham GopSeul-I / (R)
405	97.09	JinDuBal / (R)
421	81.26	Unidentified
423	93.48	CheongGak / (G) / (Edible)
433	71.50	Cham DoBak / (R)
442	72.83	Unidentified
452	84.95	Unidentified
454	87.87	Gim / (R) / (Edible)
467	100.15	Unidentified
500	81.30	Unidentified

*Korean name of the marine alga.

**G (Green alga); B (Brown alga); R (Red alga).

조류에서 분리한 미 동정 해양균류 (500 균주)를 해수로서 조제한 YPM 배지(10 ml)에 접종하여 29°C에서 14일간 배양한 후, 같은 양 (10 ml)의 methanol-acetone (1:1)으로 추출하였다. 추출액을 탈염 처리하여 얻은 500종의 추출물을 표준시료와 비교하여 EGFR kinase 활성 억제도를 *in vitro* kinase assay를 이용하여 분석하였다. 500종의 추출물을

Table II. EFGR kinase inhibitory activity at conc. 10 µg/ml of the extracts from the marine alga-derived microorganisms

Sample no.	% Inhibition (n=2)
003	27.52
015	28.61
017	50.98
018	91.42
019	94.03
030	86.43
072	58.04
126	71.54
188	44.96
199	34.41
202	50.54
206	70.37
213	90.67
242	89.56
272	75.66
290	58.69
324	88.81
325	88.33
335	77.00
339	85.65
343	82.37
344	87.85
354	84.59
356	88.73
366	5.17
387	32.54
405	61.05
421	6.59
423	46.52
433	46.20
442	19.55
452	12.42
454	43.68
467	10.11
500	0.32

Alpha Screen® system을 사용하여 50 µg/ml의 농도에서 1차 검색한 결과, 35종의 추출물에서 EGFR kinase 활성저해 효과가 관찰되었다 (Table I). 1차 선별된 35종의 시료를 대상으로 10 µg/ml의 농도로 2차 검색을 진행한 결과 (Table II), 16종의 시료에서 EGFR kinase의 활성도를 70% 이상 억제하는 유의성 있는 활성억제 효과가 관찰되었다 (Table III). 공생미생물의 숙주별 활성 빈도는 홍조류, 갈조류 및 녹조류의 공생미생물들에 대하여 각각 10 균주, 5 균주 및 1 균주에서 EGFR kinase 활성저해 효과가 관찰되어, 홍조

Table III. EGFR kinase inhibitory activity at various concentration of the selected 16 kinds of extracts from the marine alga-derived microorganisms

Sample no.	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)						
	10	2.0	0.4	0.08	0.016	0.0032	0.00064
018	94.11	34.95	15.51	6.19	-11.19	4.00	
019	104.11	83.66	36.74	6.46	4.45	-5.15	
030	86.62	36.41	8.75	7.25	-1.41	-14.54	
126	53.67	1.38	13.28	3.90	-17.50	-0.24	-7.17
206	50.48	-0.63	-3.87	-4.48	-25.77	-1.91	-9.06
213	80.20	24.73	-7.89	2.33	5.12	-4.99	-4.71
242	88.30	26.74	20.93	5.74	-6.61	-6.61	-12.25
272	78.80	22.27	14.40	10.77	-0.18	-0.35	-1.97
324	97.35	51.49	18.75	8.42	12.11	-2.81	1.16
325	93.05	37.75	17.08	11.32	-3.26	0.66	-0.63
335	80.48	31.27	-4.71	-13.98	-15.15	-4.60	-17.16
339	90.81	38.19	19.42	19.31	6.52	7.41	-3.59
343	88.80	27.92	8.98	4.29	-16.72	-9.06	-20.4
344	93.27	48.86	15.85	-0.96	-8.62	-13.37	-19.51
354	86.68	44.06	18.31	15.57	11.49	-2.36	-3.65
356	100.53	70.15	26.52	14.62	7.86	-9.18	-23.14

Table IV. IC_{50} values for EGFR kinase inhibitory activity against the selected 16 kinds of extracts from the marine alga-derived microorganisms

Sample no.	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
018	2.6
019	0.6
030	2.8
126	9.7
206	9.9
213	4.1
242	3.2
272	4.2
324	1.6
325	2.4
335	3.6
339	2.2
343	3.3
344	1.9
354	2.0
356	0.9

류의 공생미생물에서 가장 높은 활성억제 빈도가 관찰되었다(Table I-III). 나아가, EGFR kinase 활성억제 효과가 관찰된 시료의 활성 억제도를 정량적으로 검색하기 위하여 16종의 시료를 순차적으로 5 배씩 희석한 다음, 희석한 각각

의 시료에 대한 EGFR kinase를 억제하는 IC_{50} 값을 조사하였다(Table IV). *In vitro* kinase assay 결과, 강한 EGFR kinase 활성억제 효과를 나타낸 균주의 경우 0.6-9.9 $\mu\text{g/ml}$ 범위의 IC_{50} 값이 관찰되었다. 그 중, 매우 강한 EGFR kinase 억제활성은 홍조류에서 분리된 균주번호 MFA019 (IC_{50} : 0.6 $\mu\text{g/ml}$) 및 356 (IC_{50} : 0.9 $\mu\text{g/ml}$)에서 관찰되었으며, 그 다음으로 비교적 유의성 있는 EGFR kinase 활성억제 효과는 갈조류에서 분리된 균주번호 MFA324 (IC_{50} : 1.6 $\mu\text{g/ml}$) 및 홍조류에서 분리된 균주번호 MFA344 (IC_{50} : 1.9 $\mu\text{g/ml}$)에서 관찰되었다(Table IV). 그러나 녹조류에서 분리된 균주번호 MFA272 (IC_{50} : 4.2 $\mu\text{g/ml}$)는 홍조 및 갈조류에서 분리된 균주보다는 높은 농도에서 EGFR kinase 활성억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과로부터 다양한 해조류로부터 분리한 공생균류를 대상으로 EGFR kinase에 대한 활성억제 물질의 탐색 및 그 물질들의 화학적 구조 규명과, 세포생물학적 작용 기작의 연구는 새로운 천연 유래의 작용점-특이적 항암 선도 물질의 탐색에 있어서 중요한 연구의 대상 시료로서 충분한 가치가 있다고 생각된다.

사 사

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구이며(KRF-2008-314-F00048), 2단계 BK21 지원에 감사드립니다(핵09B2519).

인용문헌

1. Fusetani, N. (ed.) (2000) *Drugs from the sea*. Karger, Basel, Switzerland.
2. Henkel, T., Brunne, R. M., Muller, H. and Reichel, F. (1999) Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew. Chem., Int. Ed.* **38**: 643-647.
3. Dreyfuss, M. M. and Chapela, I. H. (1994) In Gullo, V. P. (ed.), *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*, Butterworth-Heinemann: Boston, MA.
4. Tubaki, K. (1992) Marine Microorganism as Drug Resources. In Yajima, H., Shioiri, T. and Ohizumi, Y. (ed.), *Marine Resources for Drug Discovery*. 313-334. Hirokawa Publishing Co. Tokyo, Japan.
5. Demain, A. L. and Sanchez, S. (2009) Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* **62**: 5-16.
6. Choi, J. S., Lee, W. K., Son, B. W., Kim, D. -S., Choi, H. D., Choi, J. S., Jung, J. H., Im, K. S. and Choi, W. C. (2000) Screening on radical scavenging activity of marine microalgae. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 252-255.
7. Li, X., Li, Y., Nam, K. W., Kim, D. -S., Choi, H. D. and Son, B. W. (2002) Screening of radical scavenging activity from the marine-derived fungus. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 219-223.
8. Li, X., Li, Y., Jeong, J. H., Lee, K. T., Choi, H. D. and Son, B. W. (2003) Screening of tyrosinase inhibiting activity from the marine-derived fungus. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**: 138-141.
9. Li, Y., Li, X., Son, B. W. and Choi, H. D. (2003) Screening of antimicrobial activity from the marine-derived fungus. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**: 142-144.
10. Li, Y., Li, X. and Son, B. W. (2005) Antibacterial and radical scavenging epoxy-cyclohexenones and aromatic polyols from a marine isolate of the fungus *Aspergillus*. *Nat. Prod. Sci.* **11**: 136-138.
11. Zhang, Y. Ahn, E. -Y., Jiang, Y., Kim, D. -K., Kang, S. -G., Wu, C., Kang, S. -W., Park, J. -S., Son, B. W. and Jung, J. J. (2007) 3-Chloro-2,5-dihydroxybenzyl alcohol activates human cervical carcinoma HeLa cell apoptosis by inducing DNA damage. *Int. J. Oncol.* **31**: 1317-1323.
12. Casalini, P., Iorio, M. V., Galmozzi, E. and Mnard, S. (2004) Role of HER receptors family in development and differentiation. *J. Cell Physiol.* **200**: 343-350.
13. Ranson, M. (2004) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Br. J. Cancer* **90**: 2250-2255.
14. Herbst, R. S. (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **59** (2 suppl); 21-26.
15. Dei Tos, A. P. and Ellis, I. (2005) Assessing epidermal growth factor expression in tumors: what is the value of current test methods? *Eur. J. Cancer* **41**: 1383-1392.
16. De Luca, A., Pignata, S., Casamassimi, A., D'Antonio, A., Gridelli, C., Rossi, A., Cremona, F., Parisi, V., De Matteis, A. and Normanno, N. (2000) Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reverse transcription-PCR assay. *Clin. Cancer Res.* **6**: 1439-1444.
17. El-Rayes, B. F., and LoRusso, P. M. (2004) Targeting the epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer* **91**: 418-424.
18. Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., and Burgess, A. W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* **284**: 31-53.

(2010년 1월 23일 접수)