

갯벌 방선균 유래 Boholamide A의 구조 및 생리활성에 대한 연구

서정원 · 문규호*

전남대학교 약학대학

Structure and Bioactivity of Boholamide A from a Tidal Mudflat Actinomycete

Jeongwon Seo and Kyuho Moon*

College of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

Abstract – LC/MS approach targeting secondary metabolites of bacterial strain resulted in the discovery of boholamide A (**1**), from the culture of marine actinomycete strain which was isolated from a tidal mudflat in Muan, Republic of Korea. Boholamide A (**1**), a cyclodepsipeptide with HDMN, APD, glycine, and valine was structurally determined by using 1D/2D NMR spectroscopy, mass spectrometry and UV spectroscopy. Boholamide A (**1**) showed the inhibitory activity against *Bacillus subtilis*, with IC₅₀ value of 0.08 mM.

Keywords – Bacterial secondary metabolite, Structural determination, Boholamide A, Cyclodepsipeptide, Tidal mudflat

해양은 지구 표면적의 71%를 차지하며 갯벌과 같은 퇴적층을 포함해 여러 환경으로 이루어져 있다. 해양미생물들은 다양한 온도와 염도, 수압, 빛, 영양 조건의 해양환경에 적응하기 위해 여러 이차 대사 물질을 생산한다.^{1,2)} 이러한 해양 천연물은 생물학적 활성을 나타내며, 의약품 및 식품 보조제로서의 잠재력을 가지고 있다. 1985년부터 2012년 사이 해양에서 분리된 생리 활성 물질 4196개 중 37%가 해양 미생물에서 발견되었고, 그 중 47%는 해양 방선균의 이차대사물질로부터 보고되어, 해양 방선균은 생리활성 물질 생산의 중요한 자원으로 인식되고 있다.³⁾ 해양 방선균은 항산화,⁴⁾ 항균, 면역 조절 및 항암 활성을 포함하는 생리 활성을 가지는 천연물을 생산하는데,^{5,6)} 이러한 다양한 생리 활성은 polyketides, terpenes, alkaloids, fatty acids 및 peptides 등 여러 구조의 물질로부터 발생한다.⁶⁻⁹⁾ 최근까지도 portobelamides,¹⁰⁾ fusaindoterpene,¹¹⁾ citronamine A¹²⁾와 같이 구조적으로 새롭고 생리 활성을 보이는 해양 방선균 유래 이차 대사 산물에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

해양 환경 중에서도 만조와 간조가 반복되며 높은 염분과 수압, 온도, 일조량에 극심한 변화가 나타나는 갯벌에서 서식하는 방선균은 보고되지 않은 특이성이 있는 균주일 가

능성이 높고, 새로운 이차 대사 산물을 생산할 것이라 생각하였다. 이에 람사르 습지 1732호로 지정된 서해 무안 황토갯벌에서 시료를 채집하여 방선균을 분리하였다. 분리된 방선균들을 소량 배양한 후, 배양액 추출물의 LC/MS screening을 진행하여, 균주가 생산하는 이차 대사 산물의 자외선흡광 스펙트럼 및 질량분석을 통해 대사물질의 화학적 특징을 분석하였다. 이후 actinomycete에 속하는 균주 JMS59가 자외선 흡광스펙트럼 분석 결과 225 nm와 265 nm에서 최대 흡수파장을 보이고, 질량 대 전하비(*m/z*) 466 값을 가지는 물질을 다량 생성하는 것을 확인하였다. 이에 peptide성 물질이 생산되었음을 예상하였고, 선택된 균주의 중량 배양 후, 배양액의 추출을 진행하여, 목표하고자 한 이차 대사 물질을 분리 및 정제하였다. 이후 핵자기공명스펙트럼, 질량분석을 통한 물질의 구조 규명을 진행하였다. 본 연구에서는 해당 물질이 기존에 알려진 cyclodepsipeptide 구조의 boholamide A(**1**)임을 밝히고, 새로운 항균 생리활성의 검증결과를 보고하며, 항균 물질 자원으로서의 사용 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

균주 분리 – 시료는 2020년 8월 무안 황토갯벌에서 지표면 5-10 cm 깊이의 토양시료를 채취하였다. 분리배지는

*교신저자(E-mail): khmoon@jnu.ac.kr
(Tel): +82-62-530-2934

KUSTER agar(glycerol 10 g, casein 0.3 g, K_2HPO_4 2 g, NaCl 2 g, $MgSO_4$ 0.05 g, $CaCO_3$ 0.02 g, $FeSO_4$ 0.01 g, agar 18 g, 1 L of sea water), 항생물질은 cycloheximide(25 mg/L), nalidixic acid(10 mg/L)을 사용하여 분리배지를 제작하였고, 배지에 도말하여 방선균주를 선택적으로 분리하였다.

균주 분류 및 동정 - 균주는 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 GenBank database 비교를 하여 동정하였고, *Nocardioopsis dassonvillei*와 99%의 유사도를 확인하였다. 시료 및 균주는 전남대학교 약학대학 약품분석학 연구실에 보관 중이다.

기기 및 시약 - 1H 및 ^{13}C NMR, 1H - 1H COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY NMR 측정을 위해 600MHz NMR spectrometer(BRUKER, USA)를 이용하여 측정하였다(한국 기초과학지원연구원 광주센터, 한국). NMR 분석에 사용한 용매는 $DMSO-d_6$ 를 사용하였다. High resolution mass spectrometry는 JMS-T200GC GC/HRTOFMS system(JEOL, Japan)을 사용하였다(전남대학교, 광주, 한국). LC/MS는 Agilent G6125B MSD system에 연결된 Agilent 1260 Infinity II LC system(Agilent Technologies, USA)를 이용하였고, column은 Phenomenex Luna C_{18} , 100 mm \times 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex, USA)를 사용하였다. Semiprep HPLC는 1525 binary HPLC pump(Waters Corporation, USA)를 이용하였고, column은 YMC-Pack ODS-A- C_{18} , 250 mm \times 10 mm, 5 μm (YMC, Japan)을 사용하였다.

추출 및 분리 - 분리 배지를 통해 분리한 균주를 YEME agar(glucose 10 g, yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, soybean extract 2 g, agar 18 g, 1 L water) 배지에 선 조절종을 통하여 균주를 얻었다. YEME broth 배지에 배양 후 LC/MS screening을 진행하여 물질 1의 생산을 확인하였다. 이후 1 L erlenmeyer flask에 YEME 배지를 이용하여 400 mL씩 총 10 L 배양하였고, 5일째에 원심분리기(Labogene, Denmark)를 통해 cell을 제거 후, filter paper(Chmlab, Spain) 및 진공펌프를 사용하여 배양액만을 여과하였다. 얻어진 여액에 대해 역상 고체 추출법을 진행하였고, 고정상은 ODS-A C_{18} , 50 μm silica gel(YMC, Japan)을 column에 충전하여 사용하였다. 용매 분획은 MeOH:H₂O =20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0 순으로 용리하여 진행하였고, MeOH:H₂O=80:20 분획을 감압농축하여 물질 1이 존재하는 혼합 분획물을 얻었다. 분획물을 대상으로 semiprep HPLC를 수행하였고, 이 때 이동상은 단일농도로서 50:50 H₂O/acetonitrile(0.1% formic acid)을 사용하였으며, 유속 2 mL/min로 이동상을 흘려주었을 때 33분에 용출된 물질 1을 12 mg 얻었다.

Boholamide A(1) - white solid; UV, λ_{MAX} 225, 265 nm; 1H and ^{13}C NMR, Table I; HRMS m/z 465.28516 [M]⁺, (calcd for $C_{24}H_{39}N_3O_6$, 465.28389).

항균활성 - *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*,

Bacillus subtilis, *Erwinia rhapontici*, *Candida albicans*에 대한 항균활성을 시험하였다. 병원균을 12시간 키운 다음 OD₆₀₀ 측정 후 초기 농도를 OD₆₀₀=0.0008로 맞추어 실험을 하였다. 물질은 10 mg/mL 농도로 DMSO에 녹여 준비하였고, 초기농도 0.41 mM로 Mueller Hilton broth를 사용하여 연속 2배 희석하여 96-well plate에 준비하였다. 각 well에 병원균을 분취하고 37°C에서 배양 후, 24시간까지 600nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 균 성장 저해도를 확인하고자 하였다. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia rhapontici*에 대한 positive control로 gentamycin을 사용하였고, *Candida albicans*에 대한 positive control로는 cycloheximide를 사용하였다.

결과 및 고찰

무안 황토 갯벌을 채집하여 방선균주를 선택적으로 분리하였고, 본 연구에 사용한 JMS59 균주에 대해 LC/MS screening을 진행하였다. 이 후 UV λ_{MAX} 225, 265 nm; m/z 466.3 인 대사물질을 목표로 하여 분획 및 HPLC를 이용하여 물질 1을 분리하였다. 물질 1의 분자식은 HRMS와 1H , ^{13}C NMR 분석을 통해 $C_{24}H_{39}N_3O_6$ 로 결정되었다. HRMS m/z 465.28516 [M]⁺, (calcd for $C_{24}H_{39}N_3O_6$, 465.28389).

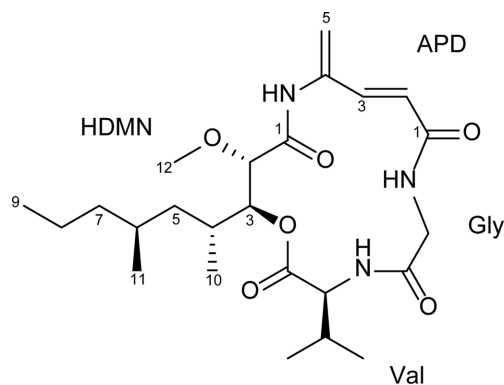
1H NMR의 spectrum 분석 결과, 물질 1은 4개의 olefinic proton, 1개의 O-methyl기, 3개의 exchangeable proton을 확인할 수 있었고, aliphatic chain과 메틸기들이 분포함을 알 수 있었다. 또한 ^{13}C 및 HSQC NMR 분석을 통해, 4개의 carbonyl carbon(δ_C 167.0, 168.3, 169.0-중첩), 4개의 methylene, 4개의 olefinic carbon의 존재를 확인하였다(Table I). 물질 1의 spectral data를 문헌^{13,14}과 비교하여 boholamide A로 동정하였고(Fig. 1), 1H - 1H COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY 분석을 진행하여 3-hydroxy-4,6-dimethyl-2-methoxy-nonanoic acid(HDMN), 4-amido-2,4-pentadieneoate(APD), glycine, valine를 가진 cyclodepsipeptide임을 밝혔다(Fig. 2, 3).

Boholamide A(1); HDMN의 부분 구조는 COSY, TOCSY, HMBC correlation을 통해 규명하였다. COSY 및 TOCSY correlation은 aliphatic chain의 연결을 보여주며, δ_{H-12} 3.29와 δ_{C-2} 78.8 간의 HMBC correlation과 3번 위치의 수소와 탄소의 화학적 이동값(δ_H 5.13, δ_C 73.8)을 통해 methoxy group이 존재함을 확인하였다. APD 구조는 COSY, TOCSY, HMBC correlation을 통해 구조를 규명하였고, δ_{NH} 9.64, δ_{C-1} 167.0이 rakicidina A의 APD와 유사한 값을 나타내는 것을 확인하였다.¹⁵ δ_{H-2} 6.34와 δ_{H-3} 6.83의 coupling constants 값이 $^3J_{HH}=15$ Hz로 trans 이중결합을 가지고 있음을 보여준다. 또한 δ_{H-5} 5.65, 5.42의 말단 methylene group으로부터 δ_{C-3} 138.1, δ_{C-4} 137.4 로의 HMBC correlation을 확인하여 APD

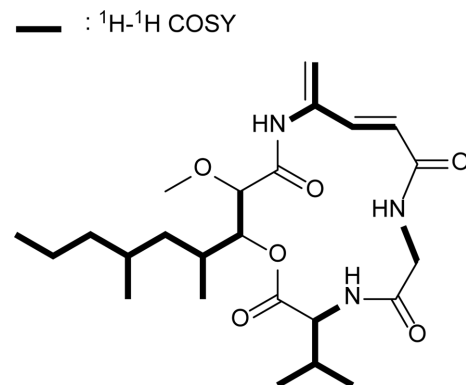
Table I. ^1H and ^{13}C -NMR data of bohohamide A (1) in $\text{DMSO-}d_6^a$

unit	no.	$\delta^{13}\text{C}$, type	$\delta^1\text{H}$, mult (J Hz)
HDMN	1	168.3, C	
	2	78.8, CH	4.08, d (9.0)
	3	73.8, CH	5.13, dd (9.0, 2.0)
	4	30.0, CH	2.09, m
	5	40.6, CH_2	1.21, m; 0.91, m
	6	28.8, CH	1.55, m
	7	38.6, CH_2	1.19, m; 0.99, m
	8	19.4, CH_2	1.31, m; 1.22, m
	9	14.3, CH_3	0.84, t (7.0)
	10	14.2, CH_3	0.93, d (6.0)
	11	19.7, CH_3	0.82, d (6.0)
	12	56.8, O- CH_3	3.29, s
APD	1	167.0, C	
	2	119.0, CH	6.34, d (15.0)
	3	138.1, CH	6.83, d (15.0)
	4	137.4, C	
	5	116.0, CH_2	5.65, s; 5.42, s
	NH		9.64, s
Gly	1	169.0, C	
	2	44.2, CH_2	4.17, dd (17.0, 5.0); 3.51, dd (17.0, 8.0)
	NH		7.66, dd (8.0, 5.0)
Val	1	169.0, C	
	2	57.6, CH	4.29, dd (9.5, 7.0)
	3	31.5, CH	1.94, dq (7.0, 7.0)
	4	19.3, CH_3	0.87, d (7.0)
	5	18.3, CH_3	0.87, d (7.0)
	NH		8.78, d (9.5)

^1H and ^{13}C data were recorded at 600 and 125 MHz, respectively.

**Fig. 1.** Structure of bohohamide A (1).

구조를 분석하였다. δ_{H} 7.66, 8.78 및 9.64의 exchangeable proton을 확인하였다. Glycine과 valine은 COSY correlation

**Fig. 2.** ^1H - ^1H COSY correlations of bohohamide A (1).

에서 대표적인 특징을 나타냈는데, NH (δ_{H} 7.66) 와 H_α (δ_{H} 4.17, 3.51, δ_{C} 44.2), H_α 의 δ_{H} 4.17과 δ_{H} 3.51간의 COSY

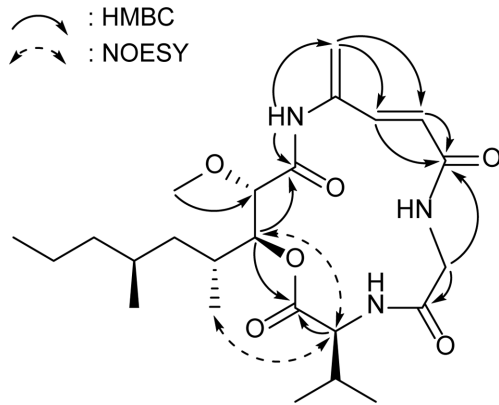


Fig. 3. Key HMBC, NOESY correlations of bohohamide A (1).

correlation으로부터 glycine임을 확인하였고, NH (δ_{H} 8.78)와 H_{α} (δ_{H} 4.29, δ_{C} 57.6)의 COSY correlation으로부터 valine임을 확인할 수 있었다. HDMN의 $\delta_{\text{H}-3}$ 5.13와 APD의 δ_{NH} 9.64는 각각 HDMN의 $\delta_{\text{C}-1}$ 168.3 과 HMBC correlation을 보이며 amide 결합되어 있음을 확인하였다. 또한, HDMN의 $\delta_{\text{H}-3}$ 5.13과 valine의 $\delta_{\text{H}-2}$ 4.29는 동시에 valine의 $\delta_{\text{C}-1}$ 169.0 과 HMBC correlation을 나타내어 ester 구조임을 규명하였다. 마지막으로 APD의 $\delta_{\text{H}-2}$ 6.34, $\delta_{\text{H}-3}$ 6.83과 glycine의 $\delta_{\text{H}-2}$ 4.17, 3.51은 APD의 $\delta_{\text{C}-1}$ 167.0와 HMBC correlation을 확인하여 최종 cyclodepsipeptide 구조임을 알 수 있었다. 밝혀진 물질의 입체구조 규명을 위하여 coupling constant 값 분석 및 NOESY correlation을 각각 확인하였다. HDMN의 $\delta_{\text{H}-2}$ 4.08와 $\delta_{\text{H}-3}$ 5.13의 coupling constants 값이 $^3J_{\text{HH}}=9$ Hz로 anti configuration임을 확인하였고, HDMN의 $\delta_{\text{H}-3}$ 5.13, $\delta_{\text{H}-10}$ 0.93과 valine의 $\delta_{\text{H}-2}$ 4.29 사이의 NOESY correlation을 통하여 상대적 입체 구조를 결정할 수 있었다(Fig. 3). 이는 앞서 보고된 bohohamide A의 입체구조와 비교하여 동일함을 확인하였다.

Bohohamide A의 항균 활성 실험은 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia rhapontici*, *Candida albicans*에 대해 진행하였으며, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Erwinia rhapontici*, *Candida albicans*에 대해서는 뚜렷한 활성 효과가 나타나지 않은 반면, *Bacillus subtilis*에 대해서 IC_{50} 가 0.08 mM로서 저해 활성을 보였다.

결론

전남 무안 황토갯벌로부터 방선균을 분리하였고, 균주 배양, 추출 후 분획물을 얻었다. HPLC를 이용하여 물질을 순수 분리한 후 NMR 및 질량분석, 분광학적 분석을 통해 물질의 구조를 bohohamide A로 동정하였다. 문헌¹³⁾에 따르면 bohohamide A는 human meningioma cell인 CH157에 대한

저해 활성을 가지고 있다고 보고된 바 있으며, 본 연구를 통해 새로이 밝혀진 *Bacillus subtilis*에 대한 항균 활성을 나타냄을 확인하였다. 이에 본 연구결과는 향후 갯벌 서식 방선균주의 생리활성 이차대사물질연구에 대한 가능성을 제시하였다고 사료된다.

인용문헌

- Hamed, I., Ozogul, F., Ozogul, Y. and Regenstein, J. M. (2015) Marine bioactive compounds and their health benefits: a review. *Compr. Rev. Food. Sci. F.* **14**: 446-465.
- Lindequist, U. (2016) Marine-derived pharmaceuticals - challenges and opportunities. *Biomol. Ther.* **24**: 561-571.
- Hu, Y., Chen, J., Hu, G., Yu, J., Zhu, X., Lin, Y., Chen, S. and Yuan, J. (2015) Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Mar. Drugs* **13**: 202-221.
- Abdelmohsen, U. R., Szesny, M., Othman, E. M., Schirmeister, T., Grond, S., Stopper, H. and Hentschel, U. (2012) Antioxidant and anti-protease activities of diazepinomicin from the sponge-associated *Micromonospora* strain RV115. *Mar. Drugs* **10**: 2208-2221.
- Mayer, A. M. and Hamann, M. T. (2005) Marine pharmacology in 2001-2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **140**: 265-286.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. and Prinsep, M. R. (2012) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **29**: 144-222.
- Solanki, R., Khanna, M. and Lal, R. (2008) Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* **48**: 410-431.
- Subramani, R. and Aalbersberg, W. (2012) Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* **167**: 571-580.
- Fenical, W. and Jensen, P. R. (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 666-673.
- Demirkiran, O., Almaliti, J., Leao, T., Navarro, G., Byrum, T., Valeriote, F. A., Gerwick, L. and Gerwick, W. H. (2021) Portobelamides A and B and caciqueamide, cytotoxic peptidic natural products from a *caldora* sp. marine cyanobacterium. *J. Nat. Prod.* **84**: 2081-2093.
- Guo, Y. W., Liu, X. J., Yuan, J., Li, H. J., Mahmud, T., Hong, M. J., Yu, J. C. and Lan, W. J. (2020) L-tryptophan induces a marine-derived *fusarium* sp. to produce indole alkaloids with activity against the zika virus. *J. Nat. Prod.* **83**: 3372-3380.

12. Prebble, D. W., Holland, D. C., Robertson, L. P., Avery, V. M. and Carroll, A. R. (2020) Citronamine A, an antiplasmodial isoquinoline alkaloid from the australian marine sponge *Citronia astra*. *Org. Lett.* **22**: 9574-9578.
13. Torres, J. P., Lin, Z., Fenton, D. S., Leavitt, L. U., Niu, C., Lam, P. Y., Robes, J. M., Peterson, R. T., Concepcion, G. P., Haygood, M. G., Olivera, B. M. and Schmidt, E. W. (2020) Boholamide A, an apd-class, hypoxia-selective cyclodepsipeptide. *J. Nat. Prod.* **83**: 1249-1257.
14. Fangzhi, H., Guangju, L., Xuhai, Z., Yahui, D., Liang, W., Yijing, W., Yue, C., and Quan, Z. (2021) Total synthesis and structure revision of boholamide A. *Org. Lett.* **23**: 4976-4980.
15. McBrien, K. D., Berry, R. L., Lowe, S. E., Neddermann, K. M., Bursuker, I., Huang, S., Klohr, S. E. and Leet, J. E. (1995) Rakacidins, new cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora* sp. fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **48**: 1446-1452.

(2021. 11. 4 접수; 2021. 11. 19 심사;
2021. 11. 29 게재확정)