

## 제주도 방선균 유래 oxazolomycin 계열 KSM-2690 B의 구조 결정과 항균활성에 관한 연구

정형주<sup>1.#</sup> · 김주영<sup>1.#</sup> · 엄수현<sup>2</sup> · 문규호<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 약학대학, <sup>2</sup>연세대학교 약학대학

### Structure Elucidation and Antibacterial Activity of Oxazolomycin Family KSM-2690 B Derived from Actinomycete Collected in Jeju Island

Hyeongju Jeong<sup>1.#</sup>, Jooyoung Kim<sup>1.#</sup>, Soohyun Um<sup>2</sup>, and Kyuho Moon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Yonsei Institute of Pharmaceutical Sciences, Yonsei University, Incheon 21983, Korea

**Abstract** – KSM-2690 B (**1**), a peptide-polyketide hybrid compound, was discovered from an actinomycete strain (CJD 1) isolated from Dong-Baek hill on Jeju Island, Republic of Korea. The chemical structure of **1** was identified by using NMR, MS, and UV spectroscopic analyses. Careful analysis of 1D and 2D NMR data revealed that KSM-2690 (**1**) has an oxazole ring, a  $\beta$ -lactone- $\gamma$ -lactam spirocycle ring, and both triene and diene structures. KSM-2690 B (**1**) showed inhibitory activities against *E. coli* at 200  $\mu$ g/mL.

**Keywords** – Actinomycete, Secondary metabolite, KSM-2690 B, Oxazolomycin family, Jeju Island

항생제 저항성이란 미생물이 특정 메커니즘을 통해 항생제의 효과를 회피하는 능력을 획득한 것이다.<sup>1)</sup> 항생제 저항성은 병원성 미생물의 억제와 사멸을 더욱 어렵고 복잡하게 만들어, 이에 따른 새로운 항생제의 개발과 사용이 필요하다. 그 대표적인 예로, methicillin에 대한 저항성을 가지게 된 *Staphylococcus aureus*을 들 수 있다.<sup>2)</sup> *S. aureus*가 획득한 항생제 저항성에 대응하기 위하여 글리코펩타이드계 항생제인 vancomycin이 사용되었고,<sup>3)</sup> 새로운 항생제의 사용은 또 다른 vancomycin 저항성 균주인 *Enterococcus*의 출현을 야기했다.<sup>4)</sup> 이외에도 균주 *Pseudomonas aeruginosa*는 약물 ciprofloxacin,<sup>5)</sup> *Escherichia coli*는 tetracycline,<sup>6)</sup> *Candida albicans*는 Fluconazole<sup>7)</sup>에 저항성이 보고된 바 있고, 현재 사용 중인 항생제 역시 항후 내성균의 출현 가능성이 높으므로, 이전의 항생제와는 다른 새로운 구조를 지닌 새로운 항생제의 개발 또는 기존 물질의 새로운 활성을 찾는 연구가 필요하다.

다양한 종류의 세균, 진균류는 다른 미생물로부터 자신을 지키기 위해, 혹은 경쟁에서 살아남기 위해 항생물질을 생성한다.<sup>8)</sup> 이러한 항생물질들이 미생물에 감염된 사람에게 적용되었을 때, 미생물 생장 억제 및 사멸의 효과를 나타낼 수 있다. 특히 오늘날 사용하는 항생제 중 70%가 방선균에서 유래된 만큼 방선균 유래 이차대사물질은 신약 개발의 중요한 원천으로 여겨지고 있다.<sup>9)</sup> 최근에는 ceublantins,<sup>10)</sup> mohangamide A,<sup>11)</sup> boholamide A<sup>12)</sup> 등 새로운 구조의 항생물질 발견 또는 알려진 물질의 새로운 항생 활성이 보고되었다. 이에 본 연구에서는 새로운 항생제를 만들어내는 미생물을 찾고자 제주도의 여러 토양을 채취하였고, 그로부터 방선균주를 분리하였다. 분리된 방선균의 LC/MS screening을 진행하여 이차대사물질의 UV spectrum 및 mass spectrum 화학적 특징을 분석하였다. 그 중 난대성 상록수림 지역인 동백동산에서 분리한 CJD1 균주가 최대 흡수파장 230 nm, 275 nm를 가지며 mass spectrum 결과 *m/z* 값이 670인 oxazolomycin계의 화합물을 생산함을 확인하였다. 이 후 균주를 대량배양 한 후, 추출하여 HPLC을 이용하여 oxazolomycin계의 화합물을 분리 및 정제하였고, nuclear magnetic resonance spectroscopy(NMR spectroscopy),

#These authors contributed equally to this work

\*교신저자(E-mail): khmoon@jnu.ac.kr

(Tel): +82-62-530-2934

high resolution mass spectrometry (HRMS)를 이용하여 물질의 구조를 밝혔다. 본 연구에서는 해당 화합물이 기존에 알려진 oxazolomycin 계열 KSM-2690 B (1)임을 밝히고, 이의 새로운 항균 활성을 보고하여 항생물질로서의 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

**균주 분리** - 시료는 2021년 5월 21일 제주도 동백동산의 토양 샘플을 채집하였고 분리배지는 SIM agar (1 L of water, casein 0.4 g, starch 1 g, KNO<sub>3</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CaCO<sub>3</sub> 0.1 g, agar 18 g, and cycloheximide 25 mg, nalidixic acid 10 mg)를 사용하여 방선균주를 선택적으로 분리하였다. 균주 CJD1의 형태학적 특징을 살펴보았을 때, 방선균의 가장 큰 특징인 균사와 sporulation을 관찰할 수 있었다. 균주는 전남대학교 약학대학 약품분석학 연구실에서 저온냉동 보관 중이다.

**기기 및 시약** - <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR, HMBC, HSQC, COSY, TOCSY, ROESY는 800 MHz NMR spectrometer(BRUKER, USA)를 사용하였다(한국기초과학지원연구원 오창센터). Mass spectra는 Agilent사의 Q-TOF LC/MS system을 이용하여 측정하였다. LC/MS는 Agilent사의 G6125B, column은 Phenomenex사의 Luna C<sub>18</sub> 100 × 4.6 mm을 이용하였다. Preparative HPLC는 Shimadzu사의 Prominence Modular HPLC, column은 YMC사의 YMC-Pack ODS-A-C<sub>18</sub> 250 × 20 mm을 이용하였다. Semi-preparative HPLC는 Waters사의 Waters 1525 Binary HPLC Pump를 이용하였고, column은 YMC사의 YMC-Pack ODS-A-C<sub>18</sub> 250 × 10 mm을 이용하였다. HPLC에 사용한 용매는 Samchun사의 HPLC grade acetonitrile을 사용하였다.

**추출 및 분리** - 분리 배지에서 얻은 균주를 YEME agar 배지(1 L of water, glucose 10 g, yeast extract 3 g, malt extract, peptone 5 g, soybean extract 2 g, agar 18 g)에의 선조접종을 통하여 strain을 얻었다. K 배지(1 L of water, glucose 2 g, yeast extract 3 g, mannitol 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, starch 5 g, malt extract 5 g, soy bean extract 5 g)를 이용한 LC/MS screening을 통하여 물질 1을 확인하였다. 이후 3 L Ultra Yield® Flasks에 K배지를 이용하여 1 L씩, 총 6 L 배양하였고, 4일째에 Ethyl Acetate 12 L를 사용하여 추출한 후 여과하였다. 여과한 여액을 감압농축기를 이용하여 28 °C에서 농축하여 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물을 MeOH:H<sub>2</sub>O 20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0으로 분획한 후 화합물 1이 존재하는 60%와 80%를 함께 농축하였다. Preparative HPLC(YMC-Pack ODS-A-C<sub>18</sub> 250 × 20 mm, flow rate 8 mL/min, UV 254 nm, aq. acetonitrile 43%)을 이용하여 27.5분에 용출된 물질을 감압 농축 후 semi prep HPLC

(YMC-Pack ODS-A-C<sub>18</sub> 250 × 10 mm, flow rate 2 mL/min, UV 254 nm, aq. acetonitrile 40%)를 이용한 이차 정제를 통해 물질 1(5 mg)을 얻었다.

**항균활성** - *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *Erwinia rhapsodica*에 대하여 항균 활성 실험을 진행하였다. 각 균을 24시간 키운 다음 OD<sub>600</sub> 값 측정 후 initial OD value를 0.0008로 맞추어 실험하였다. 화합물은 DMSO에 녹여 초기 농도 200 µg/mL로 Mueller Hilton broth를 사용하여 연속 2배 희석하여 96-well plate에 준비하였고, 각 well에 균을 분취하여 30 °C에서 배양 후 1시간 마다 600 nm에서 OD value를 측정하여 균 저해 활성을 확인하였다. Positive control로 *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. rhapsodica*에 대해서 gentamicin을 *C. albicans*에 대해서는 cycloheximide를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

제주 토양을 채집하여 방선균주를 분리하였고, 균주의 소량 배양 후, LC/MS를 이용하여 이차대사물질 분석을 진행하였다. 균주의 이차 대사물질 중 UV λ<sub>max</sub> 230, 275 nm, m/z 670인 물질 1을 분리하였다. 화합물 1의 화학식은 HRMS와 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR을 통해 C<sub>36</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>으로 결정되었다(HRMS m/z 670.3730 [M + H]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>36</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub> 670.3704).

<sup>1</sup>H NMR spectrum을 분석하였을 때 화합물 1은 11개의 olefinic protons, 12개의 aliphatic protons, 1개의 N-methyl, 1개의 O-CH<sub>3</sub>, 포함 8개의 methyl group을 확인할 수 있었고, <sup>13</sup>C 그리고 HSQC NMR을 통해 3개의 carbonyl carbon (δ<sub>C</sub> 176, 174.4, 170.2), 10개의 methine기와 3개의 quaternary carbon 포함 13개의 olefinic carbon을 확인할 수 있었다. 화합물 1의 spectral data를 문헌<sup>13)</sup>과 비교하여 KSM-2690 B (Fig. 1)로 동정하였고, COSY, HSQC, HMBC, TOCSY 등 2D NMR 분석으로 oxazole ring과 triene moiety, diene moiety, spiro-bicyclic β-lactone-γ-lactam subunit 구조를 가진 oxazolomycin계 화합물임을 밝혔다(Fig. 2, 3).

KSM-2690 B (1)의 구조는 2D NMR 분석을 통해 규명하였다. oxazole ring은 H-12' (δ<sub>H</sub> 6.90)와 C-13' (δ<sub>C</sub> 151.1), C-11' (δ<sub>C</sub> 150.5)의 HMBC correlation, deshielding 된 C-11', 12'와 13'에 의하여 규명되었다. oxazole ring과 backbone은 H-10' (δ<sub>H</sub> 3.55 [2H])와 C-11'의 HMBC correlation에 의해 연결되었다. UV spectrum의 λ<sub>max</sub>에 의해 triene moiety, diene moiety의 존재를 추측하였고, H-4', 5', 6', 7', 8', 9' (δ<sub>H</sub> 6.40, 6.32, 5.93, 6.75, 5.78)의 COSY correlation과 H-8, 9, 10, 11 (δ<sub>H</sub> 5.61, 6.12, 6.12, 5.61)의 COSY, TOCSY signal로 triene moiety, diene moiety를 구성하였다. Spiro-bicyclic β-lactone-γ-lactam subunit 중 lactone은 H-16 (δ<sub>H</sub> 5.00)과

**Table 1.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR data of KSM-2690 B (1) in  $\text{DMSO}-d_6^a$ 

Position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, $J$ Hz)	HMBC
1	174.4		H2, NCH <sub>3</sub> , H13
2	43.4	2.36(1H, q, 7.0)	H13
3	80.7		H2, H5, H13, H16
4	82.4	3.35(H, t, 6.0)	H2, H5, OCH <sub>3</sub>
5	31.7	1.96(H, m) 1.13(H, m)	H6, H7, H14
6	36.5	1.60(H, m)	H4, H5, H7, H14
7	74.9	3.83(H, t, 6.5)	H5, H6, H8, H14
8	129.6	5.61(H, dd, 14.5, 6.0)	H7, H11
9	130.0	6.12(H, m)	H8, H10
10	130.0	6.12(H, m)	
11	134.2	5.61(H, dd, 14.5, 6.0)	
12	40.2	3.71(2H, m)	H10, H11
13	9.6	1.04(3H, d, 7.5)	H2
14	15.8	0.87(3H, d, 6.5)	H5, H7
15	83.5		H16, 16-CH <sub>3</sub> , NCH <sub>3</sub>
16	77.0	5.00(H, q, 6.5)	16-CH <sub>3</sub>
17	170.2		H16
1'	176.0		H3', H14', H15', NH
2'	45.8		H3', H14', H15'
3'	72.8	4.63(H, s)	H5', H14', H15', H16'
4'	140.0		H3', H16'
5'	123.2	6.40(H, d, 12.0)	H3', H7', H16'
6'	124.2	6.32(H, t, 11.5)	H5', H7'
7'	126.8	5.93(H, t, 11.0)	H5', H8', H9'
8'	127.8	6.74(H, dd, 14.5, 11.5)	H6', H10'
9'	128.7	5.78(H, m)	H7', H10'
10'	28.0	3.55(2H, d, 7.0)	H8', H9'
11'	150.5		H'9, H10' H12', H13'
12'	121.7	6.90(H, s)	H10', H12', H13'
13'	151.1	8.24(H, s)	H12'
14'	21.3	0.97(3H, s)	H3', H15'
15'	24.5	1.10(3H, s)	H3', H14',
16'	19.7	1.73(3H, s)	H3', H5', H15'
16-CH <sub>3</sub>	16.6	1.70(3H, d, 6.5)	
NCH <sub>3</sub>	25.7	2.78(3H, s)	
OCH <sub>3</sub>	55.7	3.15(3H, d, 5.5)	H4
3-OH			
7-OH			
3'-OH			
NH		7.69(H, t, 5.5)	

<sup>a</sup> $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  data were recorded at 800 and 200 MHz, respectively.

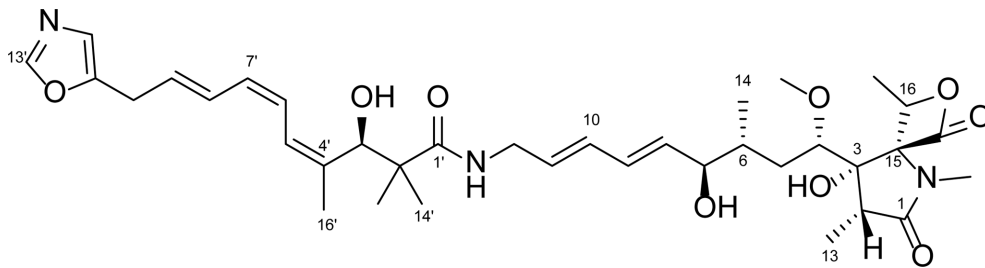


Fig. 1. Structure of KSM-2690 B (1).

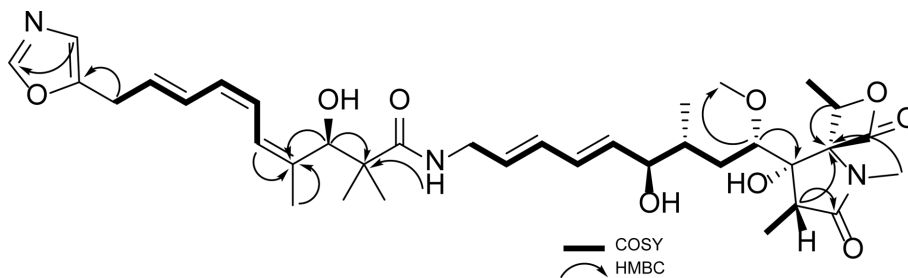


Fig. 2. Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of KSM-2690 B (1).

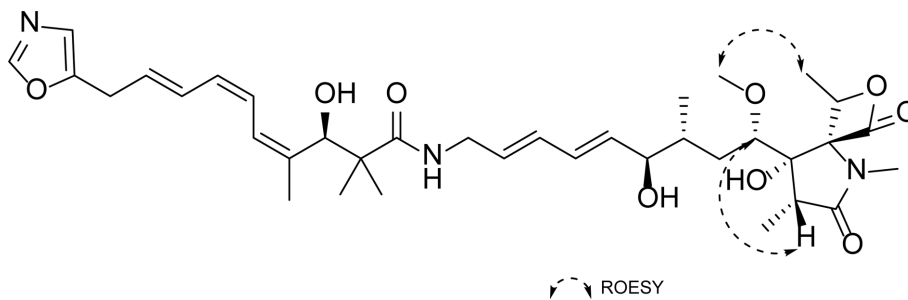


Fig. 3. Key ROESY correlations of KSM-2690 B (1).

carbonyl carbon C-17 ( $\delta_{\text{C}}$  170.2), quaternary carbon C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  83.5) HMBC correlation 그리고 16- $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  1.70)와 H-16 간의 COSY correlation에 의해 구성되었고, lactam은 H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  2.36)와 carbonyl carbon C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  174.4)와 quaternary carbon C-3, C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  80.7, 83.5) 그리고  $N$ - $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  2.78)로부터 C-15의 HMBC signal에 의해 규명되었다.

물질의 Stereochemistry는 coupling constant 값과 ROESY correlation을 확인하고 문헌과 chemical shift를 비교하여 규명하고자 하였다. Triene moiety의 coupling constant는 각각  $^3J_{\text{HH}} = 11$  Hz, 14 Hz로 KSM-2690 B와 동일하게 4'Z, 6'Z, 8'E로 결정되었다. H-2와 H-4의 ROESY signal과 16- $\text{CH}_3$ 과 O- $\text{CH}_3$  사이의 ROESY correlation을 확인할 수 있었고, chemical shift 비교를 통해 16-methyloxazolomycin<sup>14)</sup>의 isomer인 KSM-2690 B와 동일한 2R, 3S, 15S, 16R 인 구조로 예상된다. KSM-2690 B의 항균활성 실험은 *E. rhapsodicus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *E. coli*에 대해 진행하였으며, *E. coli*에 대하여 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 25% 저해 활성을 보였

고, 다른 균주들에 대해서는 활성을 보이지 않았다.

## 결론

제주도 동백동산에서 샘플을 채집하여 방선균주를 분리하였고, 액체배양 후 LC/MS screening을 통해 타겟을 설정하고 대량배양과 HPLC를 사용한 물질의 순수 분리, 정제 과정을 거쳐 NMR, 질량분석 및 분광학적 분석을 통해 물질의 구조를 KSM-2690 B로 규명하였다. 이전 문헌에서 밝혀진 KSM-2690 B (1)를 생산하는 균주는 일본 도치기현 토양 샘플에서 분리되었으나, 이번 연구를 통해 국내에 서식하는 방선균주로부터 유래된 화합물을 보고하였다. 또한 *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*에 대한 항균활성 이외에 추가적으로 *E. coli*에 항균활성이 있음을 확인하여, 이에 알려진 화합물의 새로운 생리활성 연구를 통한 항생제 개발 가능성을 제시하였다고 생각된다.

## 사 사

이 논문은 전남대학교 학술연구비(과제번호2021-2434)지원에 의하여 연구되었음. This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grants funded by the Republic of Korea (2021R1C1C1009609, 2022R1A4A3022401) and Korea Basic Science Institute under the R&D program (Project No.C230430) supervised by the Ministry of Science and ICT.

## 인용문헌

- Davies, J. and Daives, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 417-433.
- Lakhundi, S. and Zhang, K. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**: e00020-18.
- Chambers, H. R. and Deleo, F. R. (2009) Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 629-641.
- Raza, T., Ullah, S. R., Mehmood, K. and Andleeb, S. (2018) Vancomycin resistant enterococci: A brief review. *J. Pak. Med. Assoc.* **68**: 768-772.
- Lister, P. D., Wolte, r D. J. and Hanson, N. D. (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**: 582-610.
- Zhang, T., Wang, C. G., Lv, J. C., Wang, R. S. and Zhong, X. H. (2012) Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian *Escherichia coli* in North China. *Poult. Sci.* **91**: 2774-2777.
- Berkow, E. L. and Lockhart, S. R. (2017) Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect. Drug Resistance.* **10**: 237-245.
- Procópio, R. E., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L. and Araújo, J. M. (2012) Antibiotics produced by streptomycetes. *Braz. J. Infect. Dis.* **16**: 466-471.
- Jakubiec-Krzyszniak, K., Rajnisz-Mateusiak, A., Guspiel, A., Ziemska, J. and Solecka J. (2018) Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Pol. J. Microbiol.* **67**: 259-272.
- Moon, K., Xu, F. and Seyedsayamdost, M. R. (2019) Cebulantin, a cryptic lanthipeptide antibiotic uncovered using bioactivity-coupled *HiTES*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **58**: 5973-5977.
- Bae, M., Kim, H., Moon, K., Nam, S. J., Shin, J., Oh, K. B. and Oh, D. C. (2015) Mohangamides A and B, new dilactone-tethered pseudo-dimeric peptides inhibiting *Candida albicans* isocitrate lyase. *Org. Lett.* **17**: 712-715.
- Seo, J. and Moon, K. (2021) Structure and bioactivity of bohohamide A from a tidal mudflat actinomycete. *Korean J. Pharmacogn.* **52**: 203-207.
- Otani, T., Yoshida, K. I., Kubota, H., Kawai, S., Ito, S., Hori, H., Ishiyama, T. and Oki, T. (2000) Novel triene-beta-lactone antibiotics, oxazolomycin derivative and its isomer, produced by *Streptomyces* sp. KSM-2690. *J. Antibiot.* **53**: 1397-1400.
- Ryu, G., Hwang, S. and Kim, S. K. (1997) 16-Methyloxazolomycin, a new antimicrobial and cytotoxic substance produced by a *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **50**: 1064-1066.

(2023. 3. 8 접수; 2023. 3. 24 심사; 2023. 3. 27 게재확정)