

## 한국산 남조류 *Microcystis*로부터 생산된 microcystin 구조와 생물활성에 관한 연구

최 병 옥 · 노 영 호 · 이 종 수\*

대전산업대학교 공업화학과, \*경상대학교 수산대학 수산가공과  
(1997년 3월 6일 접수, 1997년 5월 29일 채택)

### Studies on the Structure and Biological Activity of Microcystins Produced from Korean Cyanobacteria, *Microcystis* Species

Byoung Wook Choi, Young Ho Noh, and Jong-Soo Lee\*

Department of Industrial Chemistry, Taejon Natl. Univ. of Technology, Taejon 300-717, Korea

\*College of Fisheries, Gyeongsang Natl. Univ., Kyeongsnam 650-160, Korea

(Received March 6, 1997, Accepted May 29, 1997)

**요 약 :** 낙동강에서 채취한 남조류 *Microcystis*로부터 간독성물질이자 protein phosphatase 1과 2A의 강력한 억제제인 microcystin-LR과 microcystin-RR을 분리하였다. 이들 물질의 독성과 구조와의 관계를 알아보기 위하여 몇가지 유도체들을 합성하여 독성실험을 하였다. Glu와 MeAsp의 카르복실기를 에스테르화할 경우 독성을 잃어버리는 것을 알 수 있었다. 반면에 Mdha 잔기의 이중결합을 NaBH<sub>4</sub>로 환원하여 Ala잔기로 전환한 경우에는 독성을 그대로 유지하였고 또한 microcystin-LR의 Arg잔기의 guanidyl기를 dimethylpyrimidyl기로 변환한 경우에도 독성에는 크게 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 2개의 카르복실기는 microcystin이 독성을 나타내는데 아주 중요한 역할을 하는 반면에, Mdha 및 Arg잔기의 존재는 큰 역할을 하지 않는 것으로 여겨진다.

**Abstract :** Hepatotoxic cyanobacteria, *Microcystis* species, were collected from the Nakdong River and we could isolate hepatotoxins, microcystin-LR and microcystin-RR, which are also strong inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A. From the microcystins, several microcystin derivatives were synthesized and tested on the mouse toxicity in order to establish the structure-activity relationship. Esterification of carboxyl groups of Glu and MeAsp residue produced nontoxic compounds. However, when we reduced the Mdha residue with sodium borohydride into Ala residue, toxicity was still maintained. Also, the change of guanidyl moiety of Arg residue in microcystin-LR into dimethylpyrimidyl moiety did not change the toxicity of microcystins as well. Thus the carboxyl groups seem to play important roles in binding with protein phosphatase 1 and 2A, whereas Mdha residue and the guanidyl moiety of Arg residue do not.

### 1. 서 론

환경문제가 점차 중요한 문제로 인식되는 요즘 담수 남조류(Cyanobacteria, blue-green algae)의 번성은 많은 문제를 일으키고 있다. 이들이 무성해지면 심한 악취를 일으키며, 많은 남조류들이 독성을 가지고 있는 것으로 알려져서 가축들이 남조류가 많은 담수를 마시면 사망하기도 하는 것으로 보고되었다[1]. 이는 또한 담수 남조류가 번성하는 호수나 강물을 상수원으로 사용하게 될 때 사람들의 건강에도 문제가 될 수 있다는 것을 시사하여 주며 실제로 이러한 사례가 보고된 바도 있다[2]. 이렇게 많은 문제를 일으키는 남조류들은 대부분 *Micro-*

*cystis*, *Nodularia*, *Anabaena*, 그리고 *Oscillatoria* 등이며, 국내에서는 특히 *Microcystis aeruginosa*가 크게 문제가 되고 있다[3].

최초로 남조류의 독성이 알려진 것은 1878년에 호주에서 *Nodularia*에 의한 가축들의 죽음이 보고되면서이고[4], 이 후 미국, 캐나다, 일본, 중국, 남미, 아프리카, 유럽 등 전세계에서 남조류의 독성이 보고되면서, 이에 대한 학계의 연구가 지난 20여년 간 아주 활발하게 진행되어 왔다[5-7]. 특히 많은 연구들이 남조류들이 만들어내는 독성물질(toxin)을 분리, 정제 및 동정하고 이 독성물질들의 생물학적 작용기능을 알아보는 데 초점이 맞추어졌다.

최초로 남조류에서 분리, 동정된 남조류 독성물질은 *Nodularia*에서 얻어진 것이 아니라 *Anabaena*속에 속하는 남조류에서 분리된 신경독성(neurotoxicity)을 갖는 알칼로이드계의 anatoxin이었다. *Anabaena*가 신경독성물질을 만들어내는 반면, *Nodularia*나 *Microcystis* 들은 각각 고리형 펩티드인 nodularin 혹은 microcystin 등의 간독성물질(hepatotoxin)을 생산하는 것으로 알려졌다. *Nodularia*가 몇 군데 제한된 곳에서 발견되는 반면에 *Microcystis*는 전 세계적으로 가장 흔하게 발견되어 간독성물질에 대한 연구는 주로 microcystin에 초점이 맞춰져 왔다. 국내에서도 아직 *Nodularia*가 발견되었다는 보고는 없다.

Microcystin에 대한 구조적인 정보는 일찍이 1959년부터 얻어지기는 했으나[7], 의미 있는 정보들은 지난 20여년 사이에 얻어져 microcystin-LR(1), -LA(2), -YA(3), -YR(4) 등의 구조가 처음으로 1980년에 Botes등에 의하여 밝혀졌으며[8-12], 이들의 완전한 입체구조는 1988년 Rinehart 등에 의하여 밝혀졌다[13]. 이후에 microcystin-RR(5) 및 많은 다른 microcystin들이 *Microcystis* 및 다른 남조류들에서 분리, 동정되어 지금까지 약 40여개의 microcystin (Fig. 1)이 분리되었다[14-28].

Microcystin들은 7개의 아미노산 잔기를 가지는 고리형 펩티드 화합물로서 일반적으로 1번, 3번, 5번, 6번, 7번 잔기에 각각 D-alanine (D-Ala), D-erythro- $\beta$ -methylaspartic acid (D-erythro- $\beta$ -MeAsp), Adda [(2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,6,8-trimethyl-4,6-dienoic acid], D-glutamic acid (D-Glu), N-methyldehydroalanine (Mdha) 등을 공통적으로 가지고 있으며, 2번과 4번의 아미노산 잔기는 다양하게 변하여 많은 microcystin들을 이루며 이들 아미노산 잔기를 나타내는 영어약자를 이용하여 microcystin 화합물들을 이름짓는다. 예를 들면, microcystin-LR (1)은 2번과 4번의 아미노산이 각각 L-leucine (L-Leu)과 L-arginine (L-Arg) 임을 나타낸다. Microcystin의 구조에서 특징적인 점은 2번과 4번의 가변적인 자리의 아미노산들은 모두 L-아미노산이 채워지는 반면에 다른 자리의 아미노산들은 D-아미노산들이거나 일반적으로 발견되지 않는 구조의 아미노산들이다. 특히 Adda, D-erythro- $\beta$ -MeAsp, Mdha등은 microcystin이나 nodularin등에서만 발견되는 특징적인 구조이다.

1878년 최초로 보고된 간독성물질 nodularin(29)의 구조는 1988년 Rinehart등[13]에 의해서 처음으로 화학적 절단 및 분광학적 방법 등을 이용하여 입체구조를 포함한 그 구조가 완전히 밝혀졌다(Fig. 2). 그 결과 nodularin은 5개의 아미노산으로 이루어진 고리형 펩티드로서 microcystin-LR과 아주 유사하여, Adda, D-Glu, D-erythro- $\beta$ -MeAsp, L-Arg 등의 4개의 잔기가 일치하며, microcystin의 Mdha와 유사한 Mdhb를 가지고 있다. 즉, nodularin은 microcystin-LR에서 1번과 2번의 잔기만이 제거된 것과 아주 흡사하다. 비록 nodularin이 microcystin보다 2개의 아미노산 잔기가 부족하나 간독성 정도는 거의 같은 수준인 것으로 알려져 있다[2].

Microcystin이 다양한 유사체들로 발견되는 이유 중 하나는, microcystin이 다양한 남조류로부터 생산된다는 점이다. Microcystin은 *Microcystis* 종류 이외에도 *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc* 등에서도 발견되며, 남조류의 종류나 생산

되는 지역 및 남조류의 종류에 따라 주되게 생산되는 microcystin도 다르다[27, 28].

Nodularin을 생산하는 남조류는 *Nodularia spumigena*만이 존재하며 이 남조류에서는 지금까지 nodularin을 포함하여 5개의 유사한 구조의 독성물질들이 발견되었다[26, 29]. 최근에는 *Theonella swinhoei*라는 해면에서 motuporin이라는 물질이 분리되었는데, 이는 [L-Val<sup>2</sup>]-nodularin의 구조를 가지고 있으며 nodularin과 아주 유사한 생물학적 활성을 가진다[30].

간독성물질인 microcystin들과 nodularin, 그리고 motuporin은 생물학적으로 아주 중요한 효소인 protein phosphatase 1 및 2A (PP1, PP2A)를 선택적으로 아주 강력하게 억제하며 종양 촉진자(tumor promoter)로서도 잘 알려져 있다. 그리고 이들 효소의 역제는 microcystin과 nodularin이 가지는 간독성과 직접적으로 관계되는 것으로 알려져 있다[31]. 즉 microcystin이나 nodularin이 protein phosphatase 효소에 결합하는 것이 간독성을 유발하는 것으로 여겨진다. 따라서 이들 간독성물질은 protein phosphatase들이 관여하는 신호전달연구분야에서 중요한 재료로 사용되기도 한다.

Fig. 1과 Table 1에서 보듯이 지금까지 많은 microcystin들이 분리되었고 이들의 독성이 보고되었다. 이들 자료들을 살펴보면, microcystin이 활성을 나타내는데 중요한 역할을 하는 작용기들로서는 Adda의 입체구조, 펩티드의 고리형 구조 등이다. 반면에 2번과 4번 아미노산의 변화는 크게 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. Microcystin이 활성을 나타내기 위하여서는 Adda의 diene 구조가 모두 *trans*형태의 구조를 가져야 하는 것으로 알려졌다[22]. 그러나 Adda의 9번 위치에 methoxy기가 hydroxyl기 혹은 acetyl기로 변형된 경우에도 microcystin의 독성에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다[28]. Microcystin 혹은 nodularin의 유사체들 중에는 고리형 펩티드를 이루지 않고 Fig. 3에서 보듯이 선형 펩티드로 분리된 경우가 있다. 이들의 경우에는 전혀 독성을 보이지 않는 것으로 알려져 microcystin이 독성을 나타내기 위하여서는 고리형 펩티드의 구조를 유지하여 일정한 형태를 가지는 것이 중요하다고 여겨진다[26, 28].

본 연구에서는 낙동강 등지에 존재하는 *Microcystis*를 채취하여 독성성분인 microcystin을 대량으로 분리하고, 이 분리된 microcystin을 화학적인 변형을 통하여 여러 가지 유도체들을 합성하여 구조와 활성간의 관계에 대하여 알아보고자 하였으며 이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

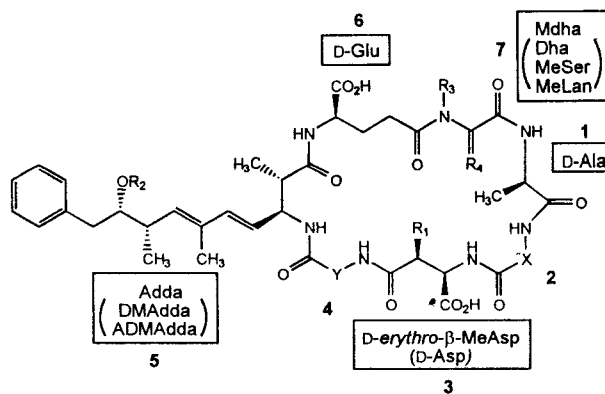
## 2. 실험

### 2.1. 남조류의 채취

담수 남조류 *Microcystis*는 낙동강 하구언에서 1996년도 7-8월경에 채취하였으며 채취한 시료는 대부분이 *Microcystis aeruginosa*로 동정되었다. 동정은 부산대학교 주기재 교수 연구실에 의뢰하여 실시하였다. 채취한 시료는 동결건조하여 이를 사용하기 전까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다.

### 2.2. 분석기기 및 재료

<sup>1</sup>H NMR (nuclear magnetic resonance) 스펙트럼은 GN-500



microcystin	X	Y	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
microcystin-LR (1)	L-Leu	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-LA (2)	L-Leu	L-Ala	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-YA (3)	L-Tyr	L-Ala	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-YR (4)	L-Tyr	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-RR (5)	L-Arg	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-AR (6)	L-Ala	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-LY (7)	L-Leu	L-Tyr	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-FR (8)	L-Phe	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-WR (9)	L-Trp	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-YM (10)	L-Tyr	L-Met	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-LAba (11)	L-Leu	L-Aba	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-M(O)R (12)	L-Met(O)	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-YM(O) (13)	L-Tyr	L-Met(O)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-HtyR (14)	L-Hty	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-HlleR (15)	L-Hlle	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
[D-Asp <sup>3</sup> ]microcystin-LR (16)	L-Leu	L-Arg	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
[D-Dha <sup>7</sup> ]microcystin-LR (17)	L-Leu	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub>
[D-Asp <sup>3</sup> , D-Dha <sup>7</sup> ]microcystin-LR (18)	L-Leu	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>2</sub>
[DMAdda <sup>5</sup> ]microcystin-LR (19)	L-Leu	L-Arg	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
[ADMAdda <sup>5</sup> ]microcystin-LR (20)	L-Leu	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
[D-Asp <sup>3</sup> ,ADMAdda <sup>5</sup> ]microcystin-LR (21)	L-Leu	L-Arg	H	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
[L-MeSer <sup>7</sup> ]microcystin-LR (22)	L-Leu	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H, CH <sub>2</sub> OH (S)
[D-Asp <sup>3</sup> ]microcystin-RR (23)	L-Arg	L-Arg	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
[D-Asp <sup>3</sup> ]microcystin-HtyR (24)	L-Htyr	L-Arg	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
[ADMAdda <sup>5</sup> ]microcystin-LHar (25)	L-Leu	L-Har	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-H <sub>1</sub> YR (26)	X <sub>1</sub>	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
microcystin-HilR (27)	X <sub>2</sub>	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>
[L-MeLan <sup>7</sup> ]microcystin-LR (28)	L-Leu	L-Arg	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H, Z (R, R)

MeAsp = *erythro*- $\beta$ -methylaspartic acid; Mdha = *N*-methyldehydroalanine; Aba = aminobutyric acid; Met(O) = methionine-*S*-oxide; Hty = homotyrosine; Hlle = homoleucine; Dha = dehydroalanine; DMAdda = *O*-demethyl-Adda; ADMAdda = *O*-acetyl-*O*-demethyl-Adda; MeSer = *N*-methylserine; Har = homoarginine; (H<sub>1</sub>)Y = 1',2',3',4'-tetrahydrotyrosine; Hil = L-hom isoleucine; MeLan = *N*-methylanthionine.

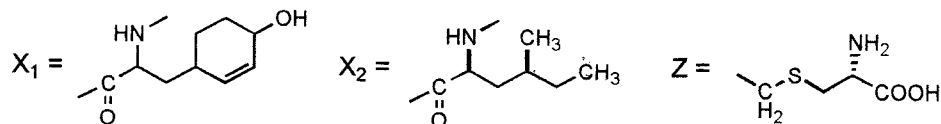


Fig. 1. Structures of selected cyclic microcystins.

분광기 (General Electric사)를 사용하였으며 CD<sub>3</sub>OD를 용매 및 내부기준물질로 사용하였다. LRFABMS(low resolution fast

atom bombardment mass spectroscopy) 스펙트럼과 HRFABMS (low resolution fast atom bombardment mass spectroscopy)

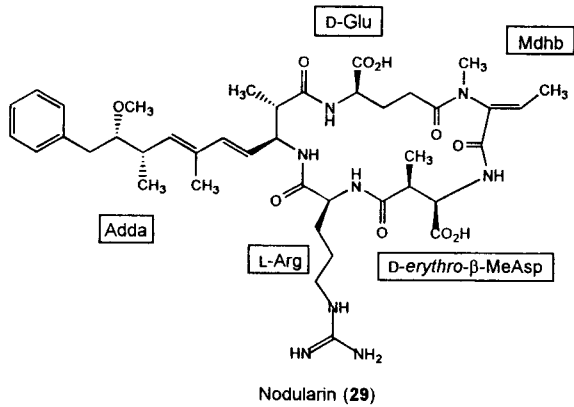


Fig. 2. Structure of nodularin.

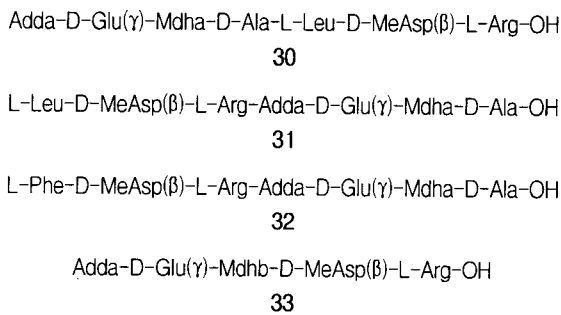


Fig. 3. Linear peptides isolated from *Microcystis* spp. and *Nodularia*.

스펙트럼은 ZAB-SE 혹은 VG 70 SE-4F 기기(VG Analytical 사)를 사용하였고, 이때 dithiothreitol-dithioerythritol을 matrix로 사용하였다[32]. 얇은 막 크로마토그래피에는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (EM Sciences사)를 사용하였고, 일반 중력 크로마토그래피에는 silica gel(Merck사)과 ODS 역상수지 (Fuji-Davison 사)를 이용하였고, ODS(octadecylsilyl, C-18) 카트리지(500 mg bed)는 Bond Elut사의 것을 이용하였다. HPLC 분석 및 분취는 HP-1050 series(Hewlett-Packard사)를 이용하여 수행하였다.

### 2.3. Microcystin의 추출, 분리 및 구조확인

Microcystin의 분리는 지금까지 잘 알려진 방법인 methanol 용매추출, 역상크로마토그래피인 ODS 크로마토그래피, 정상크로마토그래피인 silica gel 크로마토그래피를 순서대로 이용하여 어느 정도 정제된 microcystin을 분리하였으며 최종적으로 HPLC를 이용하여 순수하게 정제하였다[34].

동결건조된 시료 1 kg을 1급 시약 methanol 15 L에 현탁시켜서 기계식 교반기로 24시간 교반하였다. 이후 methanol 현탁액으로부터 용액과 녹지 않은 고체를 분리하였다. 녹지 않은 고체는 다시 새로운 methanol 10 L에 현탁시켜 48시간 동안 교반하였다. 다시 이 현탁액도 Büchner 깔대기를 이용하여 분리하였으며, 이 methanol 용액은 이미 준비된 methanol 용액과 함께 합친 후에 이들을 모두 회전증발농축기(rotary evaporator)를 이용하여 35°C에서 증발시켰다. 이렇게 얻어진 methanol 추출액은 감압건조하여 약 50 g의 갈갈색의 고체를 얻었다.

*Microcystis*의 methanol 추출물 50 g은 다시 증류수 2 L에 현탁시켜 6시간 정도 교반한 후 수용액과 물에 녹지 않는 고체를 Büchner 깔대기를 이용하여 분리하였다. Microcystin을 포함하는 2 L의 수용액은 다시 역상수지인 ODS가 채워진 유리관(2 × 30 cm)을 통과시키고 다시 500 mL의 증류수로 수지를 통과시켜 세척하였고, methanol 500 mL로 용리하여 농축한 결과 갈색의 고체 약 7 g을 얻었다.

ODS 유리관을 통하여 정제된 갈색의 고체시료는 다시 silica gel 크로마토그래피(용매; CHCl<sub>3</sub>: CH<sub>3</sub>OH: H<sub>2</sub>O = 26: 14: 3)을 이용(5 × 40 cm)하여 분리 정제되어 약 90% 정도의 순도를 갖는 100 mg의 microcystin 혼합물을 얻었다.

Microcystin을 함유하는 분획은 역상 HPLC를 통하여 최종적으로 정제하였다(용매; 0.1% ammonium acetate: methanol = 73: 27). 이에 따라 microcystin-LR(1)을 15 mg, microcystin-RR(6)을 25 mg 얻을 수 있었다.

#### 1 : LRFABMS:

$m/z$  995.5 (M + H)

#### Analysis:

Calcd for C<sub>49</sub>H<sub>75</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub> (M + H): M<sub>R</sub> 995.5563.

Found M<sub>R</sub>, 995.5571

#### 6: LRFABMS:

$m/z$  1038.3 (M + H)

#### Analysis:

Calcd for C<sub>49</sub>H<sub>76</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub> (M + H): M<sub>R</sub> 1038.5845.

Found M<sub>R</sub>, 1038.5851

### 2.4. Microcystin 유도체들의 합성

#### 2.3.1. Dimethyl ester 화합물들의 합성

Microcystin 화합물 1 혹은 6 1.5 mg을 methanol 1 mL에 녹인 후 acetic anhydride 0.2 mL를 넣고 12시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응용액을 15 mL의 증류수에 넣고 저은 후 이를 ODS 카트리지를 통과시켰다. 이후 이 카트리지를 증류수 5 mL로 씻고, methanol 5 mL를 가하여 용리하여 microcystin유도체 화합물을 포함하는 용액을 얻었다. 이 용액을 다시 감압건조하여 얻은 화합물들은 분취용 HPLC를 이용하여 최종적으로 정제하였다. 이에 따라 각각 1.2 mg(수율: 75%)의 [D-MeAsp(OCH<sub>3</sub>)<sup>3</sup>, D-Glu(OCH<sub>3</sub>)<sup>6</sup>]microcystin-LR (34), [D-MeAsp(OCH<sub>3</sub>)<sup>3</sup>, D-Glu(OCH<sub>3</sub>)<sup>6</sup>]microcystin-RR (35) 화합물들을 얻었다.

#### 34 : <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

3.7 ppm (3H, Glu-OCH<sub>3</sub>), 3.9 ppm (3H, MeAsp-OCH<sub>3</sub>)

#### LRFABMS:

$m/z$  1066.6 (M + H)

#### Analysis:

Calcd for C<sub>51</sub>H<sub>79</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub> (M + H): M<sub>R</sub> 1023.6101.

Found M<sub>R</sub>, 1023.6095

#### 35 : <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):

3.7 ppm (3H, Glu-OCH<sub>3</sub>), 3.9 ppm (3H, MeAsp-OCH<sub>3</sub>)

**LRFABMS:** $m/z$  1066.6 (M + H)**Analysis:**Calcd for  $C_{51}H_{80}N_{13}O_{12}$  (M + H):  $M_R$  1066.6383.Found  $M_R$ , 1066.6383**2.3.2. Microcystin-LDmporn의 합성**

Microcystin-LR(1) 5 mg, 10%  $NaHCO_3$  0.6 mL, 2,4-pentanedione 1.2 mL, 그리고 ethanol 1.2 mL가 섞인 용액을 100°C에서 4시간 동안 반응하였다[33]. 이후 1.0 M acetic acid 5 mL를 가한 후 10분간 더 100°C에서 반응시켰다. 반응이 끝난 용액을 상온까지 냉각시킨 후 10 mL의 diethyl ether를 첨가하여 추출하고 유기용액 층과 수용액 층으로 분리하였다. 수용액 층은 다시 새로운 10 mL의 diethyl ether를 첨가하여 마찬가지로 추출하고 수용액 층과 유기용액 층으로 나누었다. 두 번의 추출에서 얻어진 유기용액 층은 합하고 증류수 10 mL를 첨가하여 다시 추출하였고, 여기서 얻어지는 수용액 층은 먼저 얻어진 수용액과 합하였고, 이 용액 안에 존재하는 미량의 diethyl ether를 감압하에서 제거하였다. 다시 이 수용액은 ODS 카트리지를 통과시키고 methanol로 용리하여 microcystin-LR 유도체가 포함된 고체를 얻을 수 있었다. 이 반응에서 얻은 dimethylpyrimidylornithine (Dmporn) 잔기를 가지는 화합물 36은 최종적으로 분취용 HPLC에 의하여 정제하여 2.3 mg(수율: 45%)을 얻었다.

**36 :  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ):**2.3 ppm (6H, dimethylpyrimidyl 기의  $CH_3$ ),

6.4 ppm(1H, dimethylpyrimidyl 기의 aromatic proton)

**LRFABMS** $m/z$  1059.5(M + H)**Analysis:**Calcd for  $C_{51}H_{79}N_{10}O_{12}$  (M + H):  $M_R$  1059.6439.Found  $M_R$ , 1059.6450**2.3.3. Dihydromicrocystin의 합성**

Microcystin-RR(5) 3.7 mg을 1 mL의 증류수에 용해한 후  $NaBH_4$  30 mg을 조금씩 10분간에 걸쳐 넣고 27시간 동안 상온에서 교반하였다. 이후 10% acetic acid 용액을 방울방울 넣어 반응을 정지시켰고, 이 용액은 ODS 카트리지를 통과시키고, 30 mL의 증류수로 세척하고, methanol 10 mL를 용리하였다. Methanol 용액은 감압건조하였으며, 남은 물질은 HPLC로 분리하여 최종적으로 3.0 mg(수율: 81%)의 dihydromicrocystin-RR(37)을 얻을 수 있었다.

**37 :  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ):**1.43 ppm (3H, Mala의 3- $CH_3$ )**LRFABMS:** $m/z$  1040.6 (M + H)**Analysis:**Calcd for  $C_{49}H_{78}N_{13}O_{12}$  (M + H):  $M_R$  1040.6004.Found  $M_R$ , 1040.6012**2.5. 독성측정**

새로이 분리 정제된 microcystin의 독성은 시료를 물에 녹인 후 주어진 농도에서 4개의 ICR-Swiss male mice(15-25 g)에 복강 주사하였다. 이때, 측정되는  $AD_{50}$ , 독성화되는 증세, 살아 있는 시간 등을 측정하였다.

**3. 결과 및 고찰****3.1. 남조류의 채취**

낙동강에서 채취된 남조류는 *Microcystis aeruginosa*로 동정되었다. 채취한 시료는 여과 없이 동결건조하였으며 약 2 kg의 시료를 얻을 수 있었다.

**3.2. Microcystin의 분리**

Silica gel 크로마토그래피 및 HPLC를 통하여 정제된 주성분 microcystin은 microcystin-LR(1)과 microcystin-RR(6)이었다. 이는 낙동강에 존재하는 남조류 *Microcystis aeruginosa*가 microcystin-RR과 microcystin-LR을 주로 생산한다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 이들 화합물의 확인은 표준시료와 HPLC상에서 머무름 시간의 비교, LRFABMS 및 HRFABMS 결과로 알 수 있었다.

**3.3. Microcystin의 구조-활성의 연구**

정제된 microcystin들을 이용하여 이들 화합물의 유도체를 합성하였고, 이들의 독성을 알아보았다(Table 1).

**3.3.1. Microcystin-LR과 microcystin-RR의 활성**

기존에 알려진 바와 같이 microcystin-LR과 microcystin-RR 50-200  $\mu g/kg$  정도의 모두 강력한 독성을 보이는 것을 알 수 있었다. Microcystin-LR이 microcystin-RR보다 더욱 더 강력한 활성을 보이는 것으로 나타났으나 microcystin-RR의 독성도 충분히 강력하다고 말할 수 있다.

**3.3.2. 카르복실기의 중요성**

Microcystin-LR과 microcystin-RR을 acetic anhydride와 methanol로 처리하여 microcystin-LR dimethyl ester (34)와 microcystin-RR dimethyl ester(35)을 얻었다. 이에 따라 얻어진 microcystin dimethyl ester화합물들의 mouse에 대한  $LD_{50}$ 를 조사하여 본 결과 이 화합물은 전혀 독성을 가지지 않았다. 이는 카르복실기들이 microcystin이 활성을 나타내는데 아주 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. Microcystin의 독성이 protein phosphatase 1과 2A의 억제와 직접적으로 관계된다는 사실을 고려한다면 이 카르복실기들은 이 protein phosphatase들의 활성자리에 결합하는데 관여하는 것으로 볼 수 있다.

**3.3.3. Arg 잔기의 guanidine기의 중요성**

Microcystin-LR(1)의 잔기 Arg의 guanidine 작용기를 Mori [33]등이 개발한 방법인 2,4-pentanedione을 이용한 반응을 통하여 dimethylpyrimidyl 기로 전환하여 dimethylpyrimidylornithine잔기를 가지는 microcystin-LDmporn(36)을 합성하였다

(Fig. 4). 이 화합물의 독성을 검색하여 본 결과 이 물질 또한 우수한 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서 이는 guanidine기가 protein phosphatase들과 결합에 관여하지 않는다는 것을 의미하며, Arg잔기가 없는 microcystin-LA(2) 혹은 microcystin-LY(7)등이 microcystin-LR (1)과 유사한 활성을 보이는 것으로 알려진 것과 결과가 일치한다고 말할 수 있다. 즉 microcystin의 4번 잔기 위치에는 Arg과 같은 극성 아미노산이 위치하거나 Ala, Tyr, 그리고 Dmporn과 같이 크기가 큰 비극성 잔기가 위치하거나 microcystin의 활성에는 거의 영향이 없는 것을 알 수 있다. 본 연구결과는 Silva[30]등이 분리해낸 nodularin 유사체 motuporin의 활성과도 비교될 수 있다. Motuporin은 nodularin의 Arg잔기가 Val로 치환된 화합물로서 nodularin과 유사한 활성을 보이는 것으로 알려졌다. 이는 nodularin에서도 Arg 잔기가 그리 중요한 역할을 하지 않는다는 것을 의미한다.

3.3.4. Dihydromicrocystin의 활성

Fig. 5과 같이 microcystin-LR (1)과 microcystin-RR (2) 화합물을 methanol 용액에서 과량의 sodium borohydride로 처리하여 Mdha 잔기를 DL-Ala으로 변화시켜 보았으나 이 화합물 또한 전혀 활성을 보여주지 않는 것을 알 수 있었다. Sodium borohydride로 환원하여 생성되는 두 개의 입체이성질체들은 더 이상 분리하지 않고 사용하였다. 이는 dehydroalanine의 올레핀 작용기가 protein phosphatase와의 결합에 중요하게 참가하지 않는다는 것을 의미한다. 그러나 흥미롭게도 Mdha의 생합성 선구물질이라 여겨지는 L-N-methylserine (MeSer) 잔기로 치환된 [L-MeSer<sup>7</sup>]microcystin-LR(22)은 전혀 독성이 없는 것으로 보고되었다[25]. 따라서 이는 추가된 극성의 hydroxyl기가 protein phosphatase와의 정상적인 결합을 방해하는 것으로 추측할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 낙동강에 서식하는 남조류 *Microcystis aeruginosa*에서 얻어진 간독성물질인 microcystin의 활성과 구조에 관하여 알아보았다. *Microcystis aeruginosa*에서 분리된 microcystin-LR과 microcystin-RR은 모두 강력한 간독성을 지니고 있는 물질들이다. 본 연구에서는 이 화합물들이 공통적

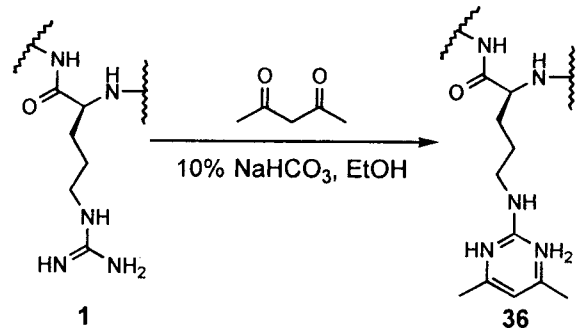


Fig. 4. Conversion of arginine residue in microcystin-LR into dimethylpyrimidylornithine residue.

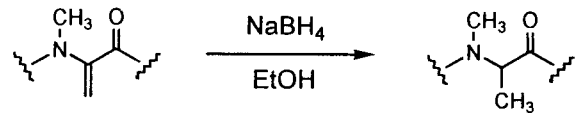


Fig. 5. Reduction of Mdha with sodium borohydride.

으로 가지고 있는 작용기들의 중요성을 살펴보기 위하여 일련의 몇 가지의 유도체를 합성하였으며 이들의 간독성을 살펴보았다.

이 결과 microcystin에 존재하는 카르복실기는 활성을 나타내는데 아주 중요한 역할을 하는 반면에, Mdha 잔기를 Mala로 변환하거나 arginine 잔기의 guanidine기를 비극성인 dimethylpyrimidyl기로 전환하는 경우에는 microcystin의 활성에 크게 변화를 주지 않는 것으로 나타났다.

본 연구에서 얻어진 결과와 그 동안 보고된 자료들을 종합하여 볼 때, microcystin의 작용기들 중에 활성을 나타내는데 아주 중요한 역할을 하는 것들은 Adda의 diene작용기의 존재 및 입체구조, Glu 및 MeAsp의 카르복실기, 그리고 펩티드의 고리형 구조이다. 반면에 Arg의 guanidine기, 그리고 Mdha의 이중결합의 존재는 활성을 나타내는데에는 역할을 하지 않는 것으로 여겨진다. 단 Mdha가 MeSer과 같이 새로운 극성 작용기가 도입되는 경우에는 활성을 나타내지 못하게 된다. 따라서 이들을 종합하여 나타내면 Fig. 3에서와 같이 표시한 부분들이 활성을 나타내는 중요한 작용기들이라 말할 수 있다.

감 사

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. Schwimmer and D. Schwimmer, "Medical Aspects of Phycology", ed. D. F. Jackson, 279, Syracuse Univ. Press, New York (1968).
2. W. W. Carmichael and R. S. Safferman, EPA/600R92/079 (1992).
3. K. S. Cho, B. C. Kim, W. M. Heo and S. Cho, S., J. Kor.

Table 1. Toxicity of Microcystins and their Synthetic Analogs

toxin	LD <sub>50</sub> (μg/kg)
microcystin-LR (1)	50
microcystin-RR (5)	200
[D-MeAsp(OCH <sub>3</sub> ) <sup>3</sup> , D-Glu(OCH <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> ]	
microcystin-LR (34)	>1000
[D-MeAsp(OCH <sub>3</sub> ) <sup>3</sup> , D-Glu(OCH <sub>3</sub> ) <sup>6</sup> ]	
microcystin-RR (35)	>1000
microcystin-LDmporn (36)	250
dihydromicrocystin-RR (37)	80

- J. Limnol.*, **22**, 179 (1989).
4. G. Francis, *Nature (London)* **18**, 11 (1878).
  5. W. W. Carmichael, "Advances in Botanical Research", ed. J. A. Callow, **12**, 47, Academic Press, London (1986).
  6. W. W. Carmichael, "Handbook of Natural Toxins", ed. A. T. Tu, **2**, 121, Marcel Dekker: New York (1988).
  7. C. T. Bishop, E. F. L. J. Anet and P. R. Gorham, *Can J. Physiol.*, **37**, 453 (1959).
  8. D. W. Botes, H. Kruger and C. C. Viljoen, *Toxicon*, **20**, 945 (1982).
  9. D. W. Botes, C. C. Vilojeon, H. Kruger, P. L. Wessels and D. H. Williams, *Toxicon*, **20**, 1037 (1982).
  10. S. Santikarn, D. H. Williams, R. J. Smith, S. J. Hammond, D. W. Botes, A. Tuinman, P. L. Wessels, C. C. Viljeon and H. Kruger, *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, 652 (1983).
  11. D. P. Botes, A. A. Tuinman, P. L. Wessels, C. L. Viljoen, H. Krugh, D. H. Williams, S. Santrkarn, R. J. Smith and S. J. Hammond, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 2331 (1984).
  12. D. P. Botes, P. L. Wessels, H. Krugh, M. T. C. Runneger, S. Santikarn, R. J. Smith, J. C. J. Barna and D. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 2747 (1985).
  13. K. L. Rinehart, K.-I. Harada, M. Namikoshi, C. Chen and C. A. Harvis, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 8557 (1988).
  14. T. Kusumi, T. Ooi and M. M. Watanabe, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 4695 (1987).
  15. T. Ooi, T. Kusumi, H. Kakisawa and M. M. Watanabe, *J. Appl. Phycol.*, **1**, 31 (1989).
  16. P. S. Gathercole and P. G. *J. chromatogr.*, **408**, 435 (1989).
  17. T. Krishnamurthy, L. Szafraniec, D. F. Hunt, J. Shabanowitz, J. R. Yates III, C. R. Hauer, W. W. Carmichael, O. Skulberg, G. F. Godd and S. Missler, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 770 (1989).
  18. R. D. Stoner, W. H. Adams, D. N. Slatkin and H. W. Siegelman, *Toxicon*, **27**, 825 (1989).
  19. J. A. O. Meriluoto, A. Sandströin, J. E. Eriksson, G. Remand, A. G. Craig and J. Chattopadhyaya, *Toxicon*, **27**, 1021 (1989).
  20. K. Sivonen, W. W. Carmichael, A. M. Dahlem, K. L. Rinehart, J. Kivtranta and S. I. Niemelä, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1990 (1989).
  21. M. Namikoshi, K. L. Rinehart and R. Sakai, *J. Org. Chem.*, **55**, 6135 (1990).
  22. K.-I. Harada, K. Ogawa, H. Murata and M. Suzuki, *Chem Res. Toxicol.*, **3**, 473 (1990).
  23. K.-I. Harada, K. Ogawa, K. Matsuura, H. Nagai, H. Murata, M. Suzuki, Y. Iteazono, N. Nakayama, M. Shirai and M. Nakano *Toxicon*, **29**, 479 (1991).
  24. K.-I. Harada, K. Ogawa, Y. Kimura, H. Murata, M. Suzuki, P. M. Thorn, W. R. Evans and W. W. Carmichael, *Chem Res. Toxicol.*, **4**, 535 (1991).
  25. M. Namikoshi, K. L. Rinehart, R. Sakai, R. R. Stotts, A. M. Dahlem, V. R. Beasley, W. W. Carmichael and W. R. Evans, *J. Org. Chem.*, **57**, 866 (1992).
  26. B. W. Choi, M. Namikoshi, F. Sun, K. L. Rinehart, W. W. Carmichael, A. M. Kaup, W. R. Evans and V. R. Beasley, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 7881 (1993).
  27. K. L. Rinehart, M. Namikoshi and B. W. Choi, *J. Appl. Phycol.*, **6**, 159 (1994).
  28. M. Namikoshi, F. Sun, B. W. Choi, K. L. Rinehart, W. W. Carmichael, W. R. Evans and V. R. Beasley, *J. Org. Chem.*, **60**, 3671 (1995).
  29. M. Namikoshi, B. W. Choi, R. Sakai, F. Sun and K. L. Rinehart, *J. Org. Chem.* **59**, 2349 (1994).
  30. E. Dlip de Silva, D. E. Williams, R. J. Andersen, H. Klix, C. F. B. Holmes and T. M. Allen, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 1561 (1992).
  31. C. MacKintoshi, K. A. Beattie, S. Klumpp, P. Cohen and G. A. Codd, *FEBS Lett.*, **264**, 187 (1990).
  32. J. L. Witten, M. H. Schaffer, M. O'Shea, J. C. Cook, M. E. Hemling and K. L. Rinehart, Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**, 350 (1984).
  33. A. Mori, T. Ichimura and H. Matsumoto, *Anal. Biochem.* **89**, 393 (1978).
  34. B. W. Choi, Ph.D. Thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign (1992).