

## 항생물질 Bicyclomycin의 작용기전

박 형 근

서울대학교 약학대학

Bicyclomycin(BCM)은 1972년에 일본 Hokkaido, Sapporo지방의 토양균종의 하나인 *Streptomyces Sapporoneosis*<sup>1</sup>의 배양액으로부터 최초로 분리된 항생물질로서 특히 Gram(-) 박테리아인 *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae*, *Neisseria gonorrhoeae* 등에 대한 선택적인 항균효과<sup>1</sup>를 가지고 있고 Streptomycin, Kanamycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Aminobenzylpenicillin 및 naldixic acid 등에 대해 고차내성을 가지고 있지 않다. BCM은 구조적인면에서 [4.2.2]bicyclic구조를 가지고있는 특이한 항생물질로서 C(1)-triole부분, diketopiperazine부분 그리고 C(5)-C(5a)exomethylene의 3 부분으로 크게 나눌수 있다 (Fig. 1). BCM은 *E. coli*에 대한 항균력으로서 250-500 µg/mL의 MIC value를 가지고 있고 급성독성으로서 LD<sub>50</sub>가 4g/Kg 이상으로 거의 독성이 없는 것이 특징이다. 현재 Fujisawa pharmaceutical Ltd.로부터 Bicozamycin이라는 상품명으로 설사치료제 용도로 시판되고 있다.

BCM의 약리작용기전은 1979년에 화학적인 유기반응모델을 이용하여 Iseki등에의해 처음으로 제안되었다<sup>2</sup>. 즉 BCM이 수용액중에서 C(6)-N(10)의 hemiaminal 결합의 분해에 의해  $\alpha, \beta$ -unsaturated ketone 구조를 갖는 중간체를 형성한후 생체내 receptor의 nucleophilic 부분과 1,4 Michael addition complex를 형성하여 궁극적으로 항균작용이 일어날 것으로 추정하였다. 이러한 가설은 실제로 methanthiol을 nucleophile로 사용한 화학적 model study에 의해 증명되었고 Abuzar와 Kohn에 의해 수행된 pH변화에 따르는 BCM의 반응성 연구에 의해 더욱 자세하게 확인되었다<sup>3-6</sup>(Scheme 1). 특히 Abutar와 Kohn에 의한 연구에서 physiological한 환경과 비슷한 pH 7 - 8에서의 반응과정이 실제 생체내에서 일어나는 작용기전일 것으로 추측되었다. 1994년 Zweifka와 Kohn은 UV에 의한 변이실험으로 BCM에 내성을 갖는 *E. coli* 균주를 얻은 후 이들로부터 얻은 chromosome DNA Library를 검색하여 RNA transcription termination factor인 rho protein이 BCM의 target receptor인 것을 밝혀내었다<sup>7</sup>. Rho protein은 1969년 R. Jeffery에 의해 *E. coli*에서 최초로 발견된 enzyme으로서 분자량이 47KDa 이고 hexamer의 형태로 RNA의 transcription termination에 관계한다<sup>8</sup>. 그 mechanism(Fig. 2)을 살펴보면 RNA transcription시 만들어진 RNA의 5'쪽에 hexamer의 형태로 rho protein이 휘감겨 (rho)<sub>6</sub>:RNA complex를 형성한 후 ATP를 ADP로 가수분해 시키면서 transcription이 진행되는 3'쪽으로 이동하여 완성된 RNA를 DNA template와 RNA polymerase로부터 이탈시킴으로써 transcription을 종결하게 된다<sup>9</sup>. Rho protein의 활성검색방법에는 rho가 가지고있는 ATPase activity를 측정하는 간접적인 방법과 rho-dependent termination site을 갖고 있는 DNA template를 이용하여 *in vitro*에서 transcription termination 억제현상을 직접 측정하는 방법이 있다. Rho protein이 BCM의 target receptor라는 사실은 *in vitro* 실험을 통하여 BCM이 rho의 ATPase 활성(IC<sub>50</sub> = 60 µM)<sup>10</sup> 및 transcription termination활성(IC<sub>50</sub> = 5 µM)<sup>11</sup>을 억제하는 것으로 증명되었다 (Fig. 3, 4). 이상의 유기반응에 의한 작용기전 model study 및 target receptor의 발견으로부터 Park 과 Kohn은 더욱 구체적인 BCM의 생체내 작용기전에 관한 가설을 세울 수가 있었다. 즉 rho protein의 binding site에 존재하는 nucleophilic moiety가 BCM의 C(5)-C(5a) exomethylene 부분에 1,4-Michael addition하여 비가역적인 complex

를 형성함으로써 rho의 RNA transcription termination 활성이 소실되어 항균작용이 일어날 것으로 예상하였다. 이상의 구체화된 작용기전 가설을 검증하기 위하여 Park등은 구조적으로 1,4-addition에 의한 비가역적인 covalent modification이 불가능한 BCM의 유도체인 C(5)-C(5a)-dihydrobicyclomycin(DHBCM)을 이용하였다. 즉 비가역적인 covalent modification이 불가능한 DHBCM과 비가역적인 covalent modification이 가능한 BCM의 생물학적 또는 생화학적인 활성을 비교하여 비가역적인 covalent modification이 갖는 중요성을 검토하였다. 그 결과 Figure 5 에서와 같이 MIC test (DHBCM, 1 mg/mL), ATPase activity test, 그리고 transcription termination activity test에서 DHBCM은 BCM보다 다소 활성은 떨어지지만 상당한 활성을 유지하는 것으로 나타났다<sup>10</sup>. 이는 이상에서 제안된 BCM과 rho의 covalent modification에 의한 작용기전과 상반된 결과로서 비가역적인 작용기전 대신 가역적인 binding process가 보다 중요한 작용기전이 될 수도 있다는 간접적인 결과로 해석되었다. Binding process에 의한 작용기전은 BCM과 rho의 가역적인 complex(rho:BCM)의 존재를 검색함으로써 확인할 수 있었다<sup>10</sup>. Rho:BCM의 존재는 희석 또는 투석을 통한 enzyme활성의 회복에 의해 증명될 수 있었다(Fig. 6)<sup>10</sup>. 즉 BCM에 의해 95% 이상의 활성억제를 확인한 rho sample을 10배로 희석시켰을 때 평형이 역방향으로 전이하여 비활성의 rho:BCM complex가 활성형의 free rho 형태로 되돌아가 ATPase 활성이 부분적(50%)으로 회복되는 것을 알 수 있었다. 또한 투석을 통해 BCM을 완전히 제거한후에는 98% 이상 enzyme의 활성이 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 가역적인 rho:BCM complex의 존재 및 가역적인 binding을 통한 BCM의 작용기전을 뒷받침하고 있다. Rho와 BCM의 가역적 binding과정의 자세한 mechanism은 Michaelis-Menten Kinetic study에 의해 자세히 분석되어졌다(Fig. 7, 8). 즉 ATP와 BCM의 농도변화에 따른 rho의 ATPase 활성을 측정한 결과 BCM은 ATP에 대하여 reversible noncompetitive inhibition 경향을 보였고<sup>10</sup>, ligand로서 poly(dC)의 농도와 BCM의 농도를 변화시켜 rho의 ATPase 활성을 측정한 결과 BCM은 poly(dC)에 대하여 reversible mixed inhibition 경향을 보였다<sup>11</sup>. 이상의 Kinetic study에서 BCM의 binding site는 ATP의 binding site와 구별되고 rho hexamer가 5'에서 3'방향으로 이동하는 것을 유도하는 secondary RNA의 binding site가 BCM에 의해 영향을 받아 그 이동 속도가 느리져 정상적인 transcription termination이 억제되어 궁극적으로 항균작용이 일어난다는 것을 추론할 수 있었다. 가역적인 binding process가 중요한 작용기전이라는 상기 결과를 바탕으로 BCM의 binding site의 검색 연구가 진행되었다. 우선 X-ray결정구조에 의한 연구가 시도되었으나 rho가 평형상태로 hexamer이외에 일부 tetramer와 dimer와 함께 공존하고 있어서 rho의 결정을 얻는데 실패하였다. Park 등은 차선의 방법으로 covalent modification이 가능한 BCM probe를 합성하여 이용하는 방법을 시도하였다. 65개의 BCM유도체를 이용한 SAR study<sup>12-16</sup>결과로부터 BCM의 구조중 binding affinity에 큰 영향을 주지 않는 C(5)-C(5a) exomethylene 부분의 변환에 의해 photoaffinity 및 reductive amination probe를 얻었다<sup>17</sup>. 얻은 probes들의 예비실험결과 reductive amination의 경우 photoaffinity probe보다 비교적 높은 수율로 재현성있는 covalent modification이 관찰되어 reductive amination probe에 의한 binding site의 검색이 시도되었다. 즉 rho에 reductive amination probe를 ATP의 존재하에서 일정시간 incubation 하여 binding site주변의 Lys moiety와 imine을 형성시키고 이어 NaBH<sub>4</sub>로 환원하여 비가역적인 covalent modification을 수행하였다(Fig. 9). 그후 정제된 enzyme adduct를 digestion 한 후 mass spectroscopy를 이용한 분석으로 BCM probe 가 Lys181에 modification 된 것을 알 수 있었다(Fig. 10).

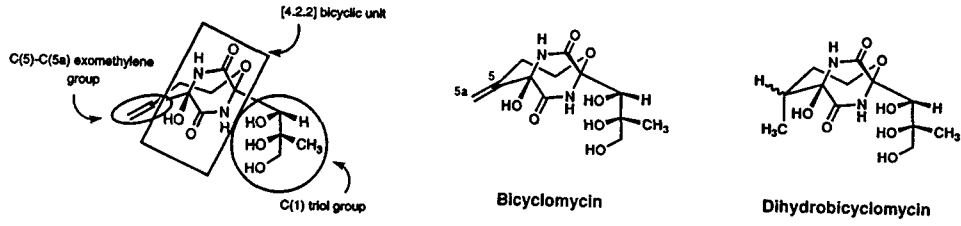
결론적으로 BCM의 *E. coli*에서의 target receptor는 RNA transcription termination factor인 rho protein으로서 그 작용기전은 BCM이 rho factor의 RNA secondary binding site에 영향을 주어 rho의 transcription termination 활성을 억제시켜 항균작용이 일어나

는 것으로 예상된다. 또한 reductive amination probe를 이용하여 BCM의 binding site가 rho의 Lys181 근처인 것을 알수 있었다<sup>18</sup>.

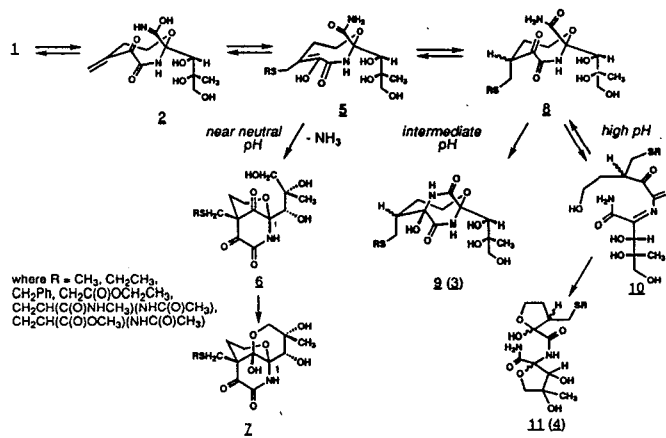
#### 참고문헌

1. (a) Miyoshi, T.; Miyairi, N.; Aoki, H.; Kohsaka, M.; Sakai, H.; Imanaka, H., *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 569. (b) Kamiya, T.; Maeno, S.; Hashimoto, M.; Mine, Y. *Ibid.*, **1972**, *25*, 576. (c) Nishida, M.; Mine, Y.; Matsubara, T. *Ibid.* **1972**, *25*, 582. (d) Nishida, M.; Mine, Y.; Matsubara, T.; Goto, S.; Kuwahara, S. *Ibid.*, **1972**, *25*, 594.
2. Someya, A.; Iseki, M.; Tanaka, N. *J. Antibiot.*, **1979**, *32*, 402.
3. Abuzar, S.; Kohn, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 4089.
4. Abuzar, S.; Kohn, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4895.
5. Abuzar, S.; Kohn, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 3114.
6. Abuzar, S.; Kohn, H. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 4000.
7. Zwiefka, A.; Widger, W. R.; Kohn, H. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 3564.
8. Roberts, J. W. *Nature*, **1969**, *224*, 1169.
9. (a) Lowery, C.; Richardson, J. P. *J. Biol. Chem.*, **1977**, *252*, 1375. (b) Lowery, C.; Richardson, J. P. *J. Biol. Chem.*, **1977**, *252*, 1381. (c) Galluppi, G. R.; Richardson, J. P. *J. Mol. Biol.*, **1980**, *138*, 513. (d) Finger, L. R.; Richardson, J. P. *Biochemistry*, **1981**, *20*, 1640. (e) Engel, D.; Richardson, J. P. *Nucleic Acids Res.*, **1984**, *12*, 7389. (f) Ceruzzi, M. A. F.; Bektesh, S. L.; Richardson, J. P. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 9412. (g) Chen, C.-Y. A.; Galluppi, G. R.; Richardson, J. P. *Cell*, **1986**, *46*, 1023. (h) Richardson, J. P.; Ruteshouser, E. C. *J. Mol. Biol.*, **1986**, *189*, 413-419. (i) Chen, C. A.; Richardson, J. P. *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 11292. (j) Faus, I.; Richardson, J. P. *J. Mol. Biol.*, **1990**, *212*, 53. (k) Faus, I.; Richardson, J. P. *Biochemistry*, **1989**, *28*, 3510. (l) Richardson, J. P. *Cell*, **1991**, *64*, 1047. (m) Jin, D. J.; Burgess, R. R.; Richardson, J. P.; Gross, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 1453.
10. Park, H. -G.; Zhang, X.; Moon, H. -S.; Zwiefka, A.; Cox, C.; Gaskell, S. J.; Widger, W. R.; Kohn, H. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, *323*.
11. Magyar, A.; Zhang, X.; Kohn, H.; Widger, W. R. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25369
12. Park, H. -G.; Vela, M. A.; Kohn, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 473.
13. Zhang, Z.; Park, H. -G.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5346.
14. Park, H. G.; Zhang, Z.; Widger, W. R.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7750.
15. Santillan, A.; Park, H. G.; Zhang, X.; Widger, W. R.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7756.
16. Park, H. G.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Widger, W. R.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7764.
17. Cho, H.; Park, H. G.; Zhang, X.; Riba, I.; Gaskell, S. J.; Widger, W. R.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5432.
18. Cho, H.; Park, H. G.; Zhang, X.; Riba, I.; Gaskell, S. J.; Widger, W. R.; Kohn, H. unpublished results

Fig 1. Bicyclomycin 및 Dihydrobicyclomycin의 구조

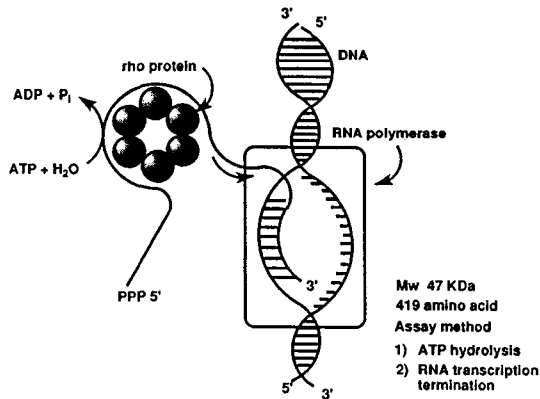


Scheme 1. pH 변화에 따른 Nucleophile에 대한 Bicyclomycin의 반응성



Abuzar, S.; Kohn, H., *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 4089; 1989, 111, 4895; 1990, 112, 3114

Fig 2. Rho dependent RNA transcription termination process



Roberts, J. W. et al. *Nature*, 1969, 224, 1169

Fig 3. Bicyclomycin의 ATPase 활성억제 효과

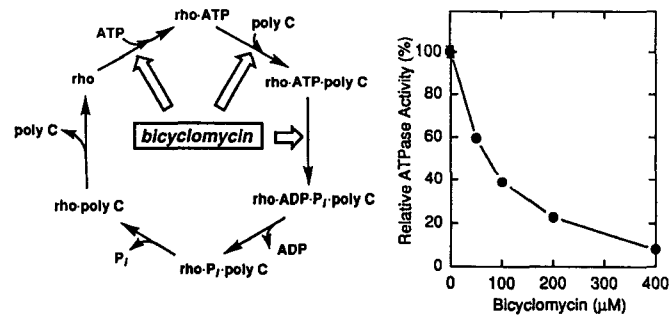


Fig 4. Bicyclomycin의 RNA transcription termination 활성억제 효과

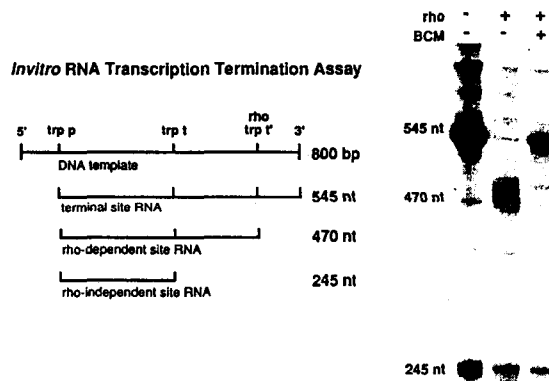


Fig 5. Bicyclomycin과 Dihydrobicyclomycin의 활성효과 비교

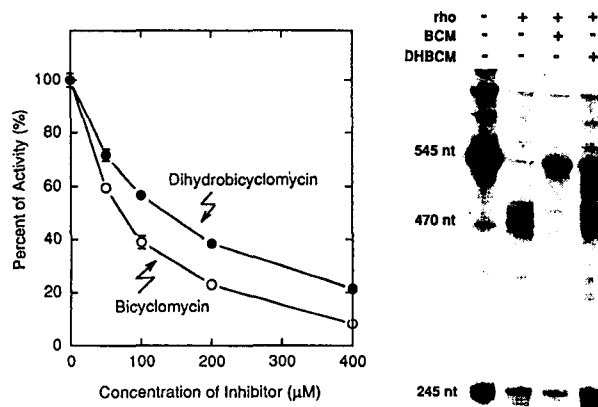


Fig 6. Bicyclomycin의 reversible ATPase활성억제 효과

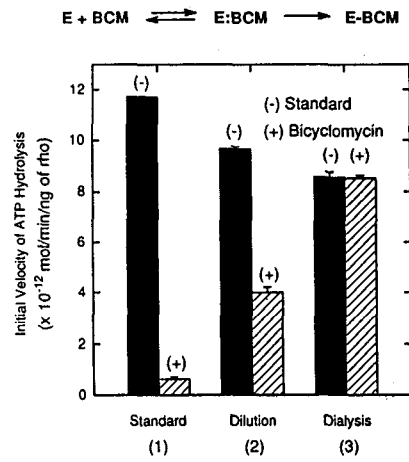


Fig 7. Bicyclomycin의 ATP에 대한 Kinetic Study

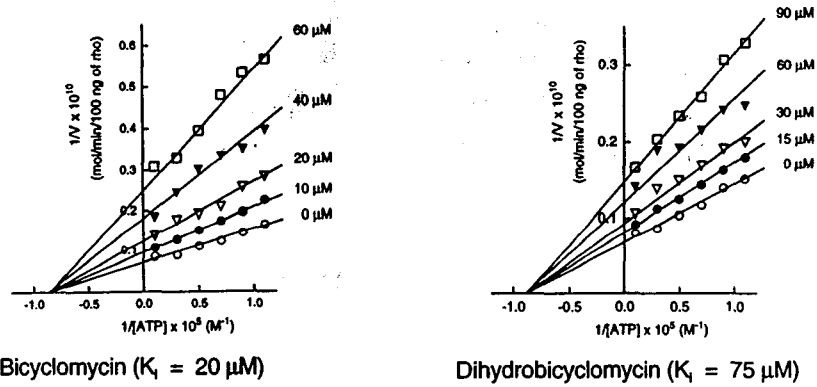


Fig 8. Bicyclomycin의 poly(dC)에 대한 Kinetic Study

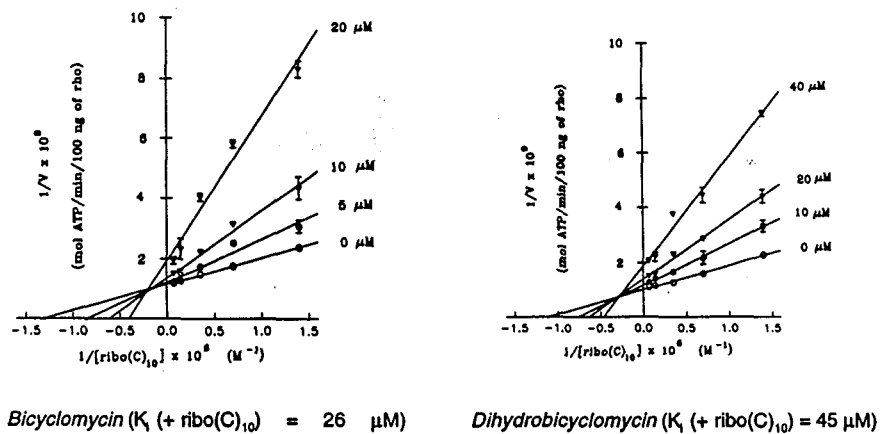


Fig 9. Reductive amination probe에 의한 rho modification

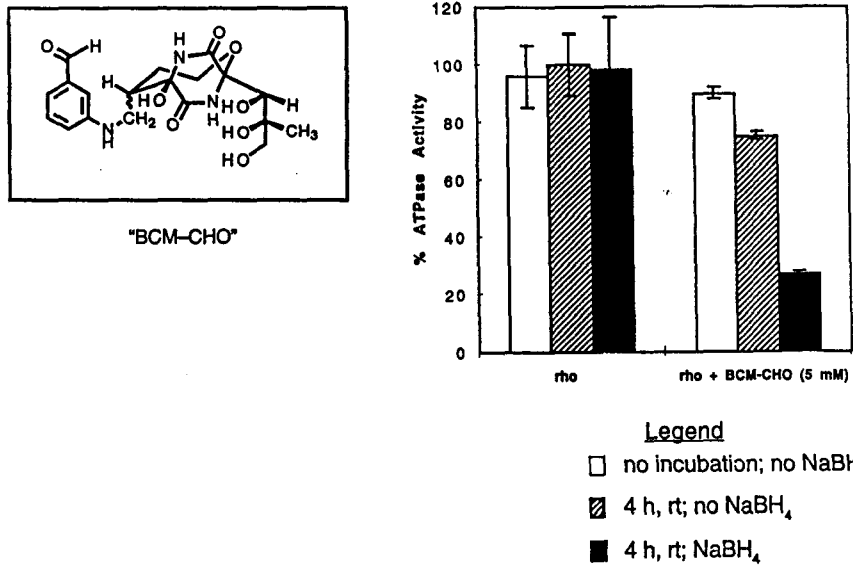


Fig 10. Modified rho 및 digestion fragment의 Mass spectroscopy

