

## 방선균 분리주 No. 1882-5로부터 Phorbol Ester에 의해 유도되는 K562 Cell의 소포형성을 억제하는 물질의 분리와 동정

안종석\* · 안순철 · 이현선 · 박문수  
오원근 · 김보연 · 민태익

한국과학기술연구원 유전공학연구소 미생물공학실

### Purification and Chemical Identification of the Inhibitor on Bleb Formation of K562 Cell Induced by Phorbol Ester from Actinomycetes Isolate No. 1882-5

Ahn, Jong-Seog\*, Soon-Cheol Ahn, Hyun-Sun Lee, Moon-Su Park,  
Won-Ken Oh, Bo-Yeon Kim and Tae-Ick Mheen

Laboratory of Microbial Technology, Genetic Engineering Research Institute,  
KIST, P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea

**Abstract** — We isolated Actinomycetes strain No. 1882-5, which produces the inhibitor on the bleb formation of K562 cell induced by phorbol ester, from soil sample. Through solvent extraction, Amberlite XAD-4, silica and Lobar low pressure LC, antifungal antibiotic MT 1882-I and bleb forming inhibitor MT 1882-II were purified from strain No. 1882-5. MT 1882-I was identified as piericidin A<sub>1</sub>(C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>N, M.W. 415) and MT 1882-II as glucopiericidin A(C<sub>31</sub>H<sub>47</sub>O<sub>9</sub>N, M.W. 577) from the analysis of physico-chemical properties and UV, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, and mass spectra of these compounds.

미생물로부터 생리활성물질의 탐색은 penicillin과 streptomycin의 발견 이래 중요성이 인식되어 현재 까지도 끊임없이 계속되고 있다. 동물세포의 활성 및 반응조절에 관한 기작이 분자생물학, 세포생물학, 면역학, 생화학 등의 발달에 따라 급속히 밝혀지고 있다. 따라서 최근에는 동물세포의 활성 및 반응을 조절할 수 있는 물질을 이들 기작에 근거하여 미생물로부터도 활발히 탐색하고 있다. 미생물로부터 탐색된 이런 물질들은 신규물질인 경우가 많고 기지물질이라도 새로운 생리활성이 밝혀지고 있다. 아울러 이들 물질을 이용하여 세포활성 및 반응 조절기작을 이해하기 위한 연구와 궁극적으로는 세포활성 및 반응조절기작의 이상화에 의해 야기되는 질병의 치료제인 항암제, 면역조절제, 순환계질환 치료제, 소염 진통제 등

으로 개발하고자하는 연구가 활발히 진행되고 있다(1-4).

강력한 발암촉진물질(tumor promoter)인 phorbol ester 화합물은 세포활성 및 반응을 다양하게 변화시킬 수 있다. Phorbol ester 화합물은 lymphocyte의 응집과 고체표면에 대한 부착능을 유도하고(5) T cell의 형태변화 및 interleukin-2(IL-2) 생성유도(6), ornithine decarboxylase의 유도, arachidonic acid 생성 촉진, prostagrandin 합성촉진, Epstein-Bar virus의 활성화(7) 등의 현상들이 밝혀졌고 현재 이에 대한 기작이 연구되고 있다. 세포외부의 자극에 의한 세포내 신호전달(cellular signal transduction)에서 중요한 조절효소인 protein kinase C(8)가 phorbol ester 화합물에 의해 선택적으로 활성화된다는 것(9)과 phorbol ester 화합물의 세포막 수용체가 protein kinase C임이 보고되었다(10). 따라서 phorbol ester 화합물은 세포활성의 조절기작과 발암화 기작에서

**Key words:** Glucopiericidin A, phorbol ester, K562 cell

\*Corresponding author

매우 중요한 역할을 함이 인식되고 있다(11).

사람의 만성골수백혈병 세포(human chronic myelogenous leukemic cell)인 K562 cell은 혈액세포의 생성과정에서 수반되는 세포분열 및 분화조절에서 이상이 생겨 분화가 일어나지 않는 미분화 혈액암세포이다(12). 이 세포는 phorbol ester화합물, DMSO 등의 여러가지 분화유도물질에 의해 적혈구(13)나 megakaryocyte(14) 등으로 분화가 일어난다. 그리고 아울러 phorbol ester에 의해서 세포표면에 작은 소포(bleb)가 형성되는 형태변화가 일어난다(15).

본인들은 동물세포의 활성 및 반응을 조절할 수 있는 물질을 미생물로부터 탐색하는 연구의 일환으로서 이상과 같은 phorbol ester 화합물의 세포활성 및 반응조절에 대한 영향중 K562 cell의 소포형성 유도를 저해하는 물질을 토양방선균으로부터 탐색하는 연구를 수행하였다. 따라서 본 논문에서는 토양으로부터 분리한 방선균의 일주가 phorbol ester 화합물에 의해 유도되는 K562 cell의 소포형성을 저해하는 물질을 생산하는 것을 확인하고 이 물질의 분리, 정제 및 화학적 구조동정에 대해 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 방선균의 분리

멸균 생리식염수 10 ml에 풍건한 토양시료 1g을 넣고 30분 동안 교반한 다음  $10^{-2} \sim 10^{-4}$ 배로 희석하여 0.1 ml를 Actinomycetes isolation agar 배지에 도말한 후 28°C 에서 7~10일간 배양하여 나타난 집락을 순수 분리하였다(16).

### 방선균 분리주 No. 1882-5의 배양

방선균 분리주 No. 1882-5의 종배지로는 l당 glucose 20g, soluble starch 10g,  $K_2HPO_4$  0.5g, yeast extract 4g, soytone 10g이 함유된 배지를 사용하였다. 본 배양은 l당 glucose 10g, soluble starch 20g,  $K_2HPO_4$  0.05g, yeast extract 4g, soybean meal 25g,  $CaCO_3$  2g이 함유된 항생물질 생산용 배지 10 l에 30°C, 2일간 배양한 종배양액 2%를 접종하여 발효조에서 통기량 0.5 vvm, 교반속도 200 rpm, 온도 30°C 에서 7일간 배양하였다.

### 소포형성저해 활성 검정

K562 cell의 배지는 RPMI 1640(GIBCO)에 fetal calf serum (Hyclone Co.) 10%와 penicillin G 100

units/ml, streptomycin 100  $\mu$ g/ml이 첨가된 것을 사용하였다. 96 well microplate에 RPMI 1640 배지의 K562 cell( $1 \times 10^5$  cells/ml) 100  $\mu$ l를 접종하고 검정시료액 10  $\mu$ l를 첨가하여 37°C 의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양한 후 phorbol 12,13-dibutylate(PDBu)를 최종농도가 1  $\mu$ g/ml되게 처리하고 10분 후 inverted microscope(Nikkon)로 세포표면에 소포의 형성유무를 관찰하였다. 이때 소포형성저해 positive control로는 staurosporine을 검정시료 대신 첨가하였고, negative control로는 PDBu만 처리하고 검정시료를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 그리고 검정시료의 소포형성 저해활성은 대조구와의 소포형성 저해정도를 비교하여 95% 이상의 소포형성 저해는 + + +, 90% 이상은  $\pm \pm \pm$ , 80% 이상은 + +, 50% 이상은  $\pm \pm$ , 30% 이상은 +, 30% 이하는  $\pm$ 로 표시하였다.

### 항균활성 측정

항균활성을 측정하기 위해 피검균을 접종한 검정 plate를 제작하여 시료용액 50  $\mu$ l를 paper disc에 흡수시킨 뒤 검정 plate에 올려놓고 30~37°C 항온기에서 배양하여 나타나는 생육저지환을 관찰하였다.

### 활성물질의 분리정제

배양액을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양상등액과 균체로 나눠 활성물질을 분리하였다. 배양상등액은 Amberlite XAD-4에 흡착시키고 50% (v/v) acetone으로 활성물질을 용출하고, 균체는 60% (v/v) acetone으로 세포내의 활성물질을 추출하여 배양상등액의 활성물질 부분과 합쳐 감압 농축하였다. Ethylacetate로 3회 반복 추출하여 농축한 후 silica gel column chromatography에서 chloroform : methanol(20 : 1)을 용매로 하여 용출시켜 항균활성을 나타내는 분획 I과 소포형성 저해활성을 나타내는 분획 II로 분리하였다.

활성분획 I을 농축한 뒤 Sephadex LH-20 column chromatography에서 methanol로 활성분획을 용출하고 methanol : H<sub>2</sub>O(9 : 1)을 용매로 Lobar low pressure LC(RP-18)를 실시하여 최종적으로 MT 1882-I을 순수분리하였다. 한편 활성분획 II는 활성분획 I과 동일하게 Sephadex LH-20 column chromatography를 하여 용출된 활성분획을 methanol : H<sub>2</sub>O(8 : 2)을 용매로 Lobar low pressure LC(RP-18)에 의해 MT 1882-II를 순수분리하였다.

**시약 및 사용기기**

분리주 No. 1882-5의 배양은 14l jar fermentor (New Brunswick Scientific Co.)을 사용하였다. TLC는 silica gel 60 F<sub>254</sub> glass plate(Merck Co.)와 RP-18 F<sub>254</sub>S(Merck Co.)를 사용하였으며 column chromatography에는 Amberlite XAD-4(Sigma Co.), silica gel 60(Merck Co.)와 Sephadex LH-20(Sigma Co.)을 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-6A를 사용하였고 UV absorption spectrum은 Shimadzu UV-260 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. <sup>1</sup>H-과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Bruker AMX-500 NMR spectrometer로 측정하였으며 내부 표준물질로는 TMS를 사용하였다. 그리고 mass spectrum은 Concept-IS mass spectrometer를 사용하여 측정하였다.

**결 과**

**방선균 분리주 No. 1882-5의 분리**

전국 각지에서 채취한 토양을 방선균 분리용 배지를 사용하여 방선균을 분리하였다. 분리된 방선균들은

항생물질 생산용 배지에 접종하여 7일간 배양한 뒤 동량의 acetone을 가하여 추출하고 원심분리하여 상등액에서 acetone을 제거한 후 K562 cell에 대한 소포형성 저해활성을 조사하였다. 이렇게 하여 PDBu에 의해 유도된 K562 cell의 소포형성을 강력하게 억제하는 분리주 No. 1882-5를 최종 선별하였다. 또한 이 분리균주는 *Staphylococcus aureus* 209와 항생물질 다제 내성변이주인 *S. aureus* R-209 및 *Candida albicans*에 항균활성을 나타냈다.

**활성물질의 분리 및 정제**

분리주 No. 1882-5가 생산하는 활성물질을 분리하기 위하여 Fig.1과 같은 방법으로 실시하였다. 각 분획은 TLC(chloroform : MeOH=9 : 1)로 전개하여 UV(254 nm)로 확인하는 동시에 K562 세포표면의 소포형성 억제와 피검균 *S. aureus* 209에 대한 항균 활성을 측정하여 항균활성을 나타내는 활성분획 I과 K562 세포표면의 소포형성을 억제하는 활성분획 II로 나누어 활성을 나타내는 각각의 물질을 분리하여 MT 1882-I과 MT 1882-II로 명명하였다. 또한 분리된 MT

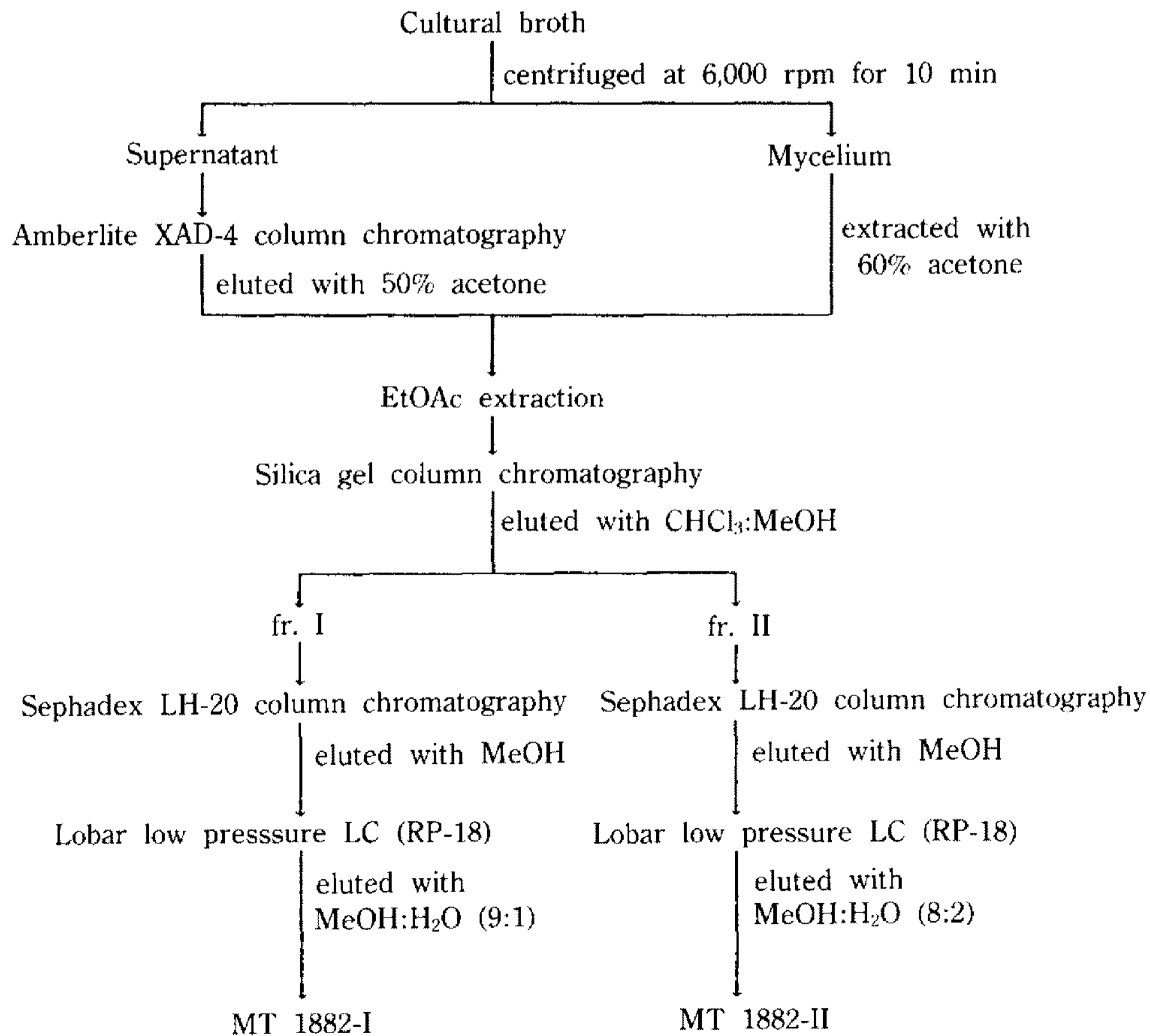


Fig. 1. Purification procedure of active substances from the isolate No. 1882-5.

Table 1. Physico-chemical properties of MT 1882-I and MT 1882-II

	MT 1882-I	MT 1882-II
Appearance	Pale yellow, viscous oil	Amorphous powder
Solubility		
soluble		MeOH, EtOH, EtOAc, chloroform
insoluble		H <sub>2</sub> O
Molecular formula	C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> O <sub>4</sub> N	C <sub>31</sub> H <sub>47</sub> O <sub>9</sub> N
UV $\lambda_{max}^{MeOH}$		230, 237, 267 nm (in neutral) 230, 237 nm (in acidic) 230, 237, 273 nm (in basic)
Color reaction		
positive		Anisaldehyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , I <sub>2</sub> , 20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , FeCl <sub>3</sub> Dragendorff's, Ehrlich, molybdophosphoric acid
negative		Ninhydrin
Stability	Unstable under light	Stable
TLC (R <sub>f</sub> value)		
silica gel <sup>2)</sup>	0.83	0.33
RP-18 <sup>2)</sup>	0.21	0.45

1) Solvent system: CHCl<sub>3</sub>/MeOH=9/1; 2) solvent system: MeOH/H<sub>2</sub>O=8/2

1882-I과 MT 1882-II가 HPLC에서 단일 peak로 검출되었으므로 순수분리 되었음을 확인하였다.

#### MT 1882-I과 MT 1882-II의 물리·화학적 성질

순수분리된 MT 1882-I과 MT 1882-II는 Table 1에 나타난 바와 같이 여러가지 물리, 화학적 성질이 서로 유사한 것으로 확인되었다. MT 1882-I은 노란색의 oil로 대부분의 유기용매에 잘 녹았으며 상온에 방치하였을 때 매우 불안정하였다. MT 1882-II는 옅은 노란색 분말로 용해성은 MT 1882-I과 유사하였으나 상온에서 매우 안정하였다. MT 1882-I과 MT 1882-II의 UV 흡수 spectrum은 거의 동일한 것으로 중성 methanol에 녹였을 때 230, 237, 267 nm에서 최대흡수파장을 나타냈으며 산처리시 266 nm의 최대흡수파장이 273nm로 이동하였고 알카리 처리시 사라졌다. 이런 특징의 UV 흡수 spectrum을 나타내는 것으로는 항진균성 항생물질로 알려진 piericidin 유도체들로서 MT 1882-I과 MT 1882-II는 piericidin 계열의 물질로 추정하였다(17, 18).

#### MT 1882-I과 MT 1882-II의 구조동정

MT 1882-I의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 piericidin 유도체들의 spectrum과 비교한 결과 piericidin A<sub>1</sub>과 일치하였다(Table 2). 0.71~1.71 ppm에서 linear chain

Table 2. Assignments for <sup>1</sup>H-NMR spectra of MT 1882-I, MT 1882-II and piericidin A<sub>1</sub><sup>1)</sup>

Proton No.	MT 1882-I	MT 1882-II	Piericidin A <sub>1</sub> <sup>2)</sup>
1	3.28 (d, 2H)	3.20 (d, 2H)	3.30 (d)
2	5.31 (t)	5.38 (t, 1H)	5.30 (t)
4	2.69 (d, 2H)	2.68 (d, 2H)	2.73 (d)
5	5.50 (m)	5.58 (dt, 1H)	5.45 (m)
6	6.00 (d)	6.04 (d, 1H)	6.00 (d)
8	5.12 (d)	5.23 (d, 1H)	5.12 (d)
9	2.60 (m)	2.65 (m, 1H)	2.66 (m)
10	3.54 (d)	3.70 (d, 1H)	3.53 (d)
12	5.38 (q)	5.38 (q, 1H)	5.35 (q)
13	1.54 (d, 3H)	1.54 (d, 1H)	1.57 (d)
14	1.65 (s, 3H)	1.64 (s, 3H)	1.68 (s)
15	0.71 (d, 3H)	0.76 (d, 3H)	0.76 (s)
16	1.52 (s, 3H)	1.53 (s, 3H)	1.54 (s)
17	1.71 (s, 3H)	1.70 (s, 3H)	1.70 (s)
6'	1.90 (s, 3H)	1.95 (s, 3H)	2.00 (s)
7'	3.72 (s, 3H)	3.95 (s, 3H)	3.78 (s)
8'	3.85 (s, 3H)	3.82 (s, 3H)	3.85 (s)
1''	—	4.12 (d, 1H)	—
2''	—	3.47 (m, 1H)	—
3''	—	3.34 (m, 1H)	—
4''	—	3.47 (m, 1H)	—
5''	—	3.43 (m, 1H)	—

1) Chemical shifts in ppm downfield from TMS, solvent CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz.

2) Assignments were based on comparison with the literature (18).

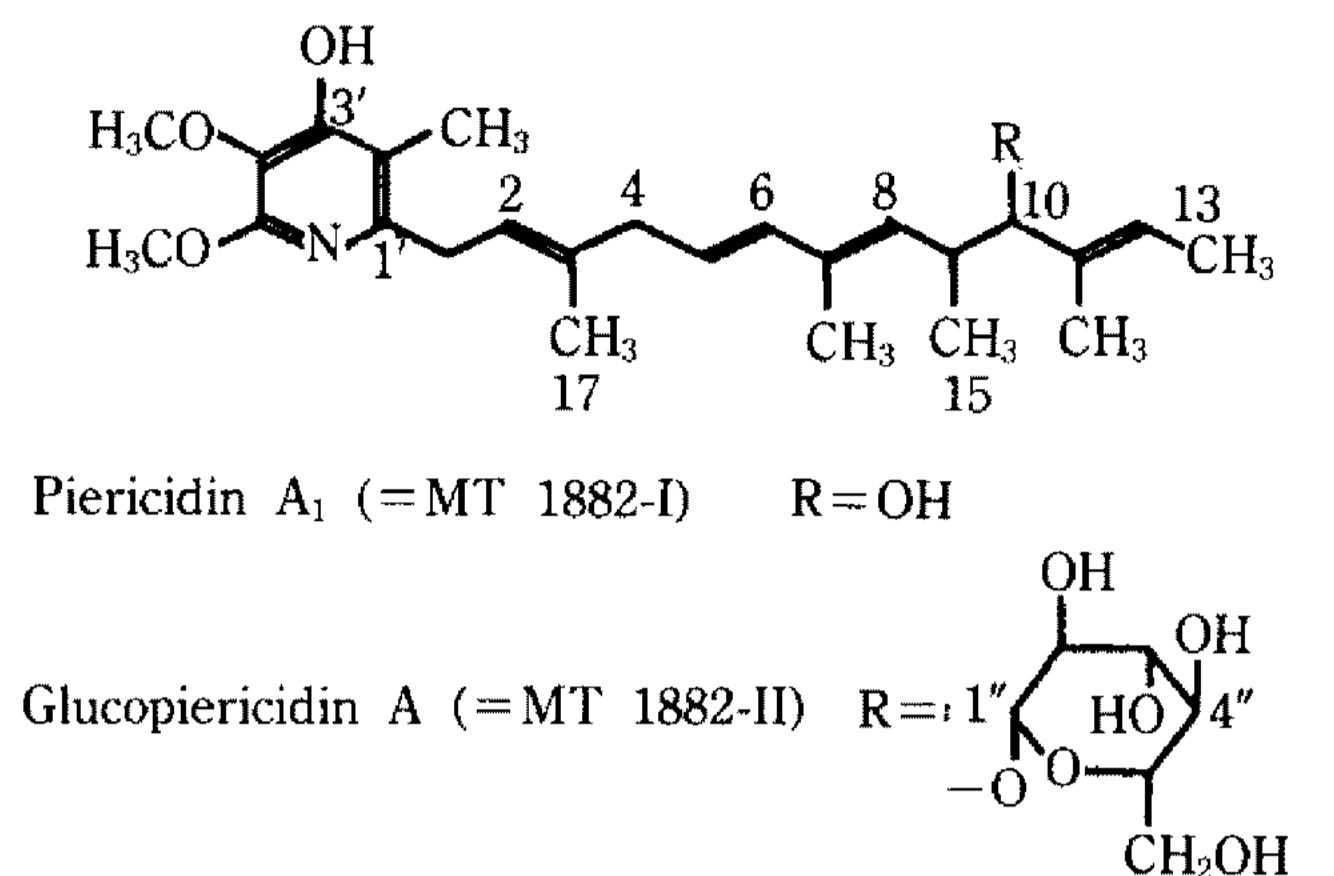


Fig. 2. Structure of piericidin A<sub>1</sub> and glucopiericidin A.

에 결합된 5개의 -CH<sub>3</sub>기의 proton, 1.90, 3.72, 3.85 ppm에서 pyrimidine ring에 연결된 -CH<sub>3</sub>와 2개의 -OCH<sub>3</sub>기의 proton이 존재함을 확인할 수 있었다. Mass spectrum에서는 piericidin A<sub>1</sub>의 spectrum과 같이 linear chain의 9번, 10번 탄소사이의 절단으로 m/e 330, 331의 강한 peak가 나타났다(data 생략). 따라서 이화학적 성질, <sup>1</sup>H-NMR과 mass spectrum을 통하여 MT 1882-I은 항진균성 항생물질인 piericidin A<sub>1</sub>(C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>N, MW 415)으로 동정되었다(Fig. 2).

또한 MT 1882-II의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 검토한 결과(Table 2), MT 1882-I과 거의 유사하였으나 3.3

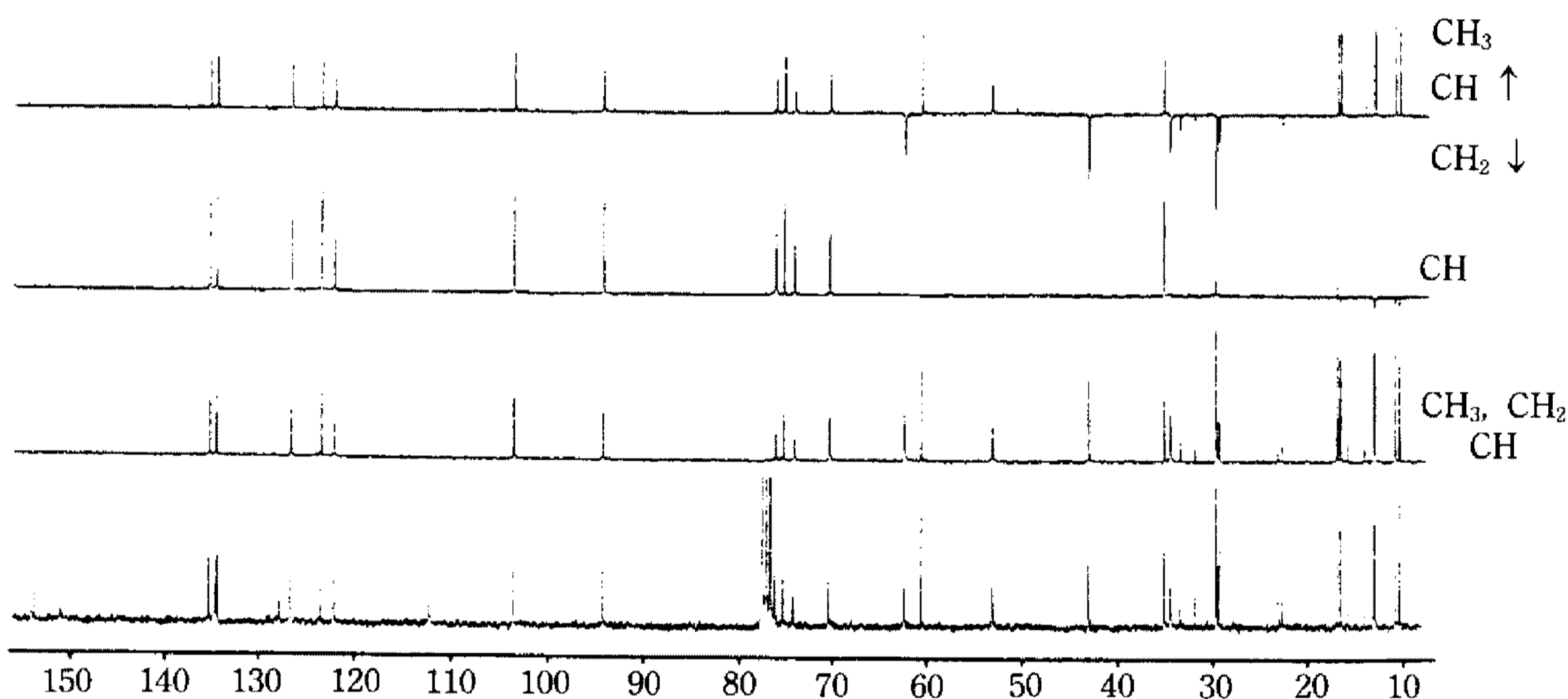


Fig. 3. <sup>13</sup>C-DEPT NMR spectrum of MT 1882-II (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Table 3. Antimicrobial activities of MT 1882-I and MT 1882-II

Test organisms	Activity					
	MT 1882-I (μg/ml)			MT 1882-II (μg/ml)		
	125	6.25	31.25	125	62.5	31.25
<i>Escherichia coli</i> BE1186	- <sup>1)</sup>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1102	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	+ <sup>2)</sup>	+	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Ophiobolus miyabeanus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Collectotrichum laegenarium</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria mali</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Phytophthora parasitica</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Pyricularia oryzae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Glomerella cingulata</i>	+	+	+	+	-	-

1) No inhibition of growth; 2) Inhibition of growth

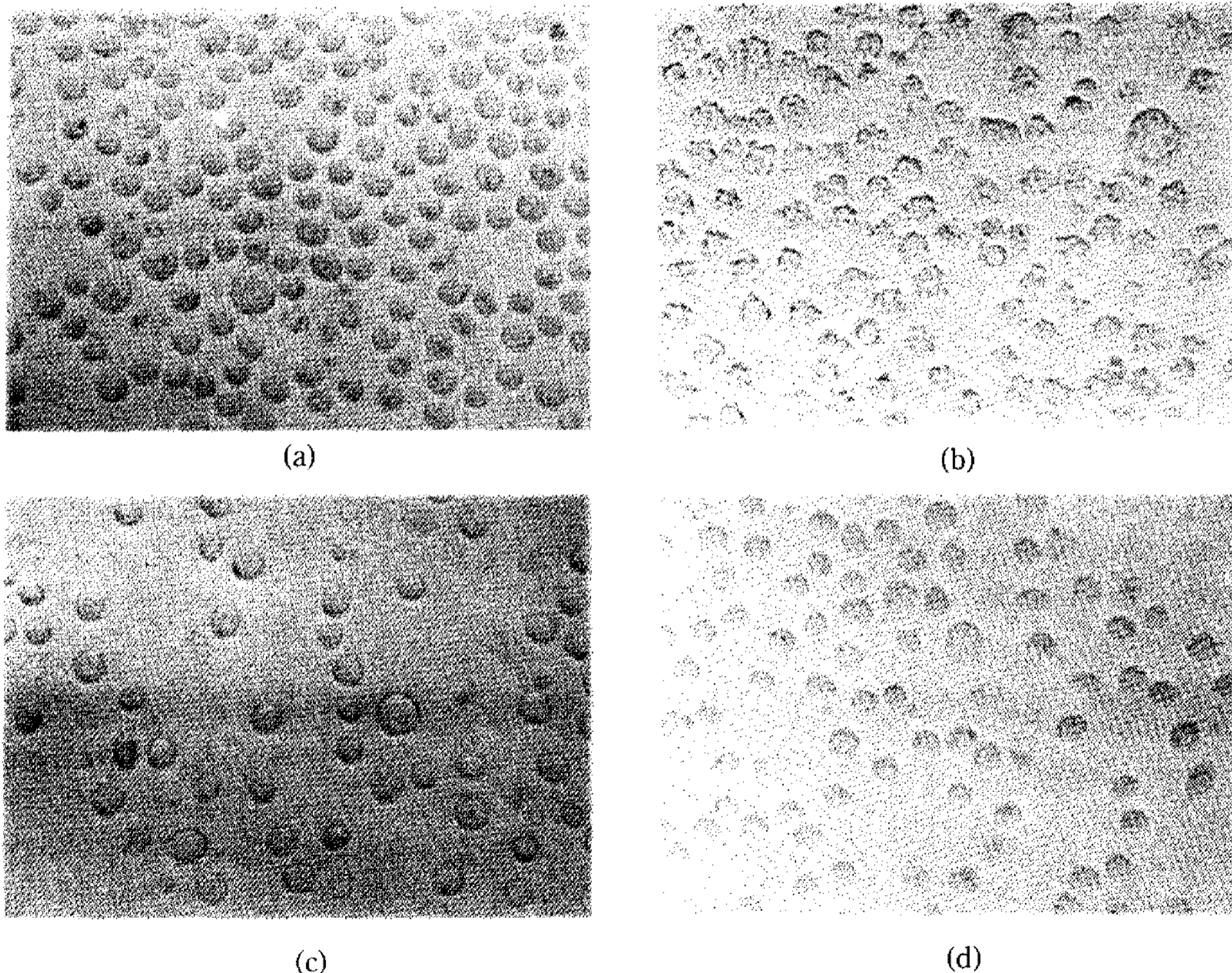
~3.6 ppm, 4.15 ppm의 proton signal을 통하여 piericidin A<sub>1</sub>의 기본 골격외에 -CH 형태의 proton이 더 존재할 것으로 추정하였다. <sup>13</sup>C-DEPT NMR spect-

**Table 4. Inhibitory activities of MT 1882-I and MT 1882-II on bleb-formation of K562 cell**

Final conc. (μg/ml)	Activity	
	MT 1882-I	MT 1882-II
1000	Cytotoxic <sup>1)</sup>	Cytotoxic <sup>1)</sup>
500	—	Cytotoxic
250	—	+++
125	—	+++
62.5	—	+++
31.3	—	+++
15.6	—	±±±
7.8	—	++
4.0	—	+
2.0	—	±
1.0	—	—
0.5	—	—

1) Cells were disrupted by sample addition.

rum(Fig. 3)에서도 piericidin A<sub>1</sub>의 spectrum과 유사하였으나 당에서 유래된 것으로 추측되는 62.5, 70.8, 74.4, 75.5, 76.4, 103.8 ppm에서 새로운 탄소 signal이 나타났고 82.9 ppm 사이에서 나타나야 할 linear chain의 10번 탄소 signal이 94.2 ppm으로 약 11 ppm down field shift된 것으로 보아 MT 1882-II의 대략적인 구조는 piericidin A<sub>1</sub>의 10번 탄소에 당이 결합된 형태로 추정하였다. 또한 한개의 anomeric proton이 4.13 ppm에서 J=7.5 Hz, doublet로 나타난 것과 103.8 ppm의 anomeric carbon으로 보아 이 sugar는 glucose로 추정되며 β-glycosidic linkage를 하고 있는 것으로 생각된다. 따라서 현재까지 piericidin 유도체에 당이 결합된 것으로 보고된 3'-rhamnopericidin A<sub>1</sub>(19), 3'-deoxytalopericidin A<sub>1</sub>(20), glucopericidin A, B(21), glucopericinol A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>(22) 등과의 기 분석 자료를 비교하였다. 그 결과 MT 1882-II의 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR에서 새로 나타난 signal들이 piericidin A<sub>1</sub>의 10번 탄소에 glucose한 분자가 β-linkage로 결합된 glucopericidin A와 일치하였다. 따라서 MT 1882-II는 glucopericidin A(C<sub>31</sub>H<sub>47</sub>O<sub>9</sub>N, MW 577)로 동정하였다(Fig. 2).



**Fig. 4. Inhibition of bleb-formation on K562 cell by MT 1882-II.**

(a) K562 only; (b) K562+PDBu; (c) K562+staurosporine+PDBu; (d) K562+MT 1882-II+PDBu

### MT1882-I과 MT 1882-II의 생물학적 활성

순수 분리된 MT 1882-I과 MT 1882-II가 나타내는 Gram 양성균과 Gram 음성 세균, 병원성 진균, K562 세포형태 변화에 대한 생물학적 활성을 조사하였다. MT 1882-I은 세균보다 진균에 보다 강한 활성을 보였으나 MT 1882-II는 *Candida albicans*, 병원성 진균에 약한 항균활성을 보였다(Table 3). 이러한 결과들은 piericidin A<sub>1</sub>의 기본 골격에 당이 결합함으로써 항균활성이 증가했다는 보고와는 상당한 차이를 보였다(21). 또한 K562 세포표면의 소포형성을 억제하는 활성은 MT 1882-I의 경우 최종농도 1 mg/ml에서 전혀 활성을 나타내지 않았으나 MT 1882-II는 2.0 µg/ml에서부터 활성을 보이기 시작했다(Table 4, Fig. 4). 따라서 MT 1882-II(gluco-piericidin A)가 K562 cell의 소포형성을 저해할 수 있는 것은 piericidin A<sub>1</sub>에 결합된 glucose에 의한 것으로 추측된다.

## 고 찰

이상의 결과로부터 본인들은 K562 cell의 phorbol ester 화합물에 의해 유도되는 소포형성을 저해할 수 있는 물질을 방선균 분리주 No. 1882-5로부터 분리, 정제하여 최종적으로 gluco-piericidin A로 동정할 수 있었다.

현재 phorbol ester 화합물에 의한 K562 cell의 소포형성에 관한 기작이 아직 명확히 밝혀져 있지 않지만 protein kinase C(PKC)의 활성화에 의한 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 이동에 따른 세포막 구조의 변화가 일어난다는 설명과 세포골격유지를 위한 주요 구조단백질인 actin filament 형성의 변화에 의한 것으로 설명되고 있다(15). 그러나 phorbol ester 화합물에 의한 소포형성은 10~20분 이내의 짧은 시간에 일어난다는 점과 PKC 억제물질들이 소포형성을 저해한다는 연구결과로 인해, PKC 활성화에 의한 세포막 구조변화로 이해되고 있는 추세이다(23). 현재까지 phorbol ester 화합물에 의해 유도되는 K562 cell의 소포형성을 억제하는 미생물 유래 물질들은 indolocarbazole alkaloid인 staurosporine류의 물질들과(24) perylenequinone인 calphostin류의 물질들(25) 및 nucleoside인 sangivamycin(26) 등의 PKC 저해물질들이 보고되어 있으나, piericidin 계열의 gluco-piericidin A가 K562 cell의 소포형성을 저해한다는 것은 본 논문에서 처음으로 보고하는 것이다. 따라서 gluco-piericidin A가 PKC의 활성을 저해하는지와 또는

PKC를 직접 저해하지 않아도 PKC의 활성화에 따른 세포내 신호전달과정의 다른 기작을 저해하는지에 대한 검토를 본 연구실에서 현재 진행 중이다.

또한 유사한 기본 골격을 갖는 piericidin A<sub>1</sub>의 경우는 소포형성에 대한 저해활성이 없었다. 이러한 결과는 기존에 보고된 piericidin A<sub>1</sub>보다 gluco-piericidin A의 항균활성이 증진되었다는(21) 것과는 상반되므로 K562 cell의 소포형성 저해활성과 piericidin A<sub>1</sub> 및 gluco-piericidin A의 구조상관 관계를 검토할 필요가 있다. 한편 최근에 piericidin 계열의 piericidin B<sub>1</sub> N-oxide가 epidermal growth factor(EGF)에 의해 유도되는 세포내 신호전달(cellular signal transduction)과정의 중요한 매개자인 phosphatidyl inositol (PI)의 turn-over를 A<sub>431</sub> cell에서 저해한다고 보고되었다(27). 따라서 gluco-piericidin A가 PI turn-over에 작용하는 phosphatidyl inositol kinase와 phospholipase C에 저해효과가 있는지를 검토할 필요가 있다.

한편 3'-deoxytalopiericidin A<sub>1</sub>가 항종양활성이 있음이 최근에 밝혀졌으므로(22) 본인들은 gluco-piericidin A와 piericidin A<sub>1</sub>의 암세포들에 대한 세포독성을 조사하고 이러한 항종양활성이 세포증식에 관여하는 신호전달과정을 저해하여 나타나는지에 대한 생물학적 활성에 대한 연구를 진행시켜 추후에 발표하고자 한다.

## 요 약

Phorbol ester에 의해 유도되는 K562 cell의 소포형성을 저해하는 물질을 생산하는 방선균 분리주 No. 1882-5를 토양으로부터 분리하였다. 분리주 No. 1882-5로부터 용매추출, Amberlite XAD-4, silica, Lobar low pressure LC를 거쳐 항진균 활성물질 MT 1882-I과 K562 cell의 소포형성을 억제하는 활성물질 MT 1882-II를 분리하였다. 이 물질들에 대한 이화학적 성질의 조사와 UV, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, mass spectrum의 분석에 의하여 MT 1882-I은 piericidin A<sub>1</sub>(C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>O<sub>4</sub>N, MW 415), MT 1882-II는 gluco-piericidin A(C<sub>31</sub>H<sub>47</sub>O<sub>9</sub>N, MW 577)로 동정하였다.

## 사 사

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업비에 의해 수행되었음을 밝히는 바입니다.

## 참고문헌

1. Demain, L.A., G.A. Somkuti, J.C. Hunter-Cevera, H.W. Rossmore. 1989. *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*. Elsevier, The Netherlands.
2. Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics, pp. 33-68. In M. Goodfellow, S. T. Williams, M. Mordarski(ed.), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London.
3. Hidaka, H. 1985. *Inhibitors in Modern Biology and Medicine*, Kyoritz Press Co., Tokyo.
4. Kohsaka, M., T. Kino, H. Hatanaka, T. Goto, M. Okuhara, H. Aoki, H. Imanaka. 1988. Isolation of immunomodulators from microbial sources, pp. 195-199. In Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara (ed.), *Biology of Actinomycetes '88*, Proceedings of 7th International Symposium on Biology of Actinomycetes, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
5. Rovera, G., T.G. O'Brien and L. Diamond. 1979. Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. *Science* **204**: 868-870.
6. Stoeck, M., R. Lees, G. Pantaleo and H.R. MacDonald. 1989. Comparison of phorbol-12-myristate-13-acetate and dioctanoyl-sn-glycerol in the activation of EL4 thymoma cells. *J. Cell. Physiol.* **138**: 541-547.
7. Koshimizu, K. 1990. Chemical studies on natural products which modulate cell proliferation and differentiation. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **64**: 1221-1230.
8. Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312.
9. Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257**: 7847-7851.
10. Niedel, J.E., L. Kuhn and G.R. Bandenberk. 1983. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 36-40.
11. Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**: 693-698.
12. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio. 1975. Human chronic myelogenous cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**: 321-334.
13. Anderson, L.C., M. Jokinen and G.C. Gahmberg. 1979. Induction of erythroid differentiation in the human leukemia cell line K562. *Nature* **278**: 364-365.
14. Tabilio, A., G.P. Pelicci, G. Vinci, P. Mannoni, I.C. Civin, W. Vainchenker, U. Testa, M. Lipinski, H. Rochant and J. Breton-Gorius. 1983. *Cancer Res.* **43**: 4569-4574.
15. Magae, J., C. Watanabe, H. Osada, X.C. Cheng and K. Isono. 1988. Induction of morphological change of human myeloid leukemia by a novel antibiotic, tautomycin. *J. Antibiot.* **41**: 932-937.
16. 안종석, 이영선, 안순철, 이정형, 윤병대, 민태익. 1991. Actinomycin계열 항생물질 MT-497을 생산하는 방선균 분리주 No. 497의 동정. *산업미생물학회지* **19**: 561-567.
17. Tamura, S., N. Takahashi and S. Miyamoto. 1963. Isolation and physiological activities of piericidin A, a natural insecticide produced by *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **27**: 576-582.
18. Yoshida, S., K. Yoneyama, S. Shiraishi, A. Watanabe and N. Takahashi. 1977. Isolation and physical properties of new piericidins produced by *Streptomyces pactum*. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 849-862.
19. Kimura, K., S. Nakayama, N. Nakajima, M. Yoshihama, N. Miyata and G. Kawanishi. 1990. A new piericidin rhamnoside, 3'-rhamno piericidin A<sub>1</sub>. *J. Antibiot.* **43**: 1341-1343.
20. Iwasaki, H., K. Kamisango, H. Kuboniwa, H. Sasaki and S. Matsubara. 1991. 3'-Deoxytalopiericidin A<sub>1</sub>, a novel analog of antitumor antibiotics from oligotroph. *J. Antibiot.* **44**: 451-452.
21. Mstsumoto, M., K. Mogi, K. Nagaoka, S. Ishizeki, R. Kawahara and T. Nakashima. 1987. New piericidin glucosides, glucopiericidin A and B. *J. Antibiot.* **40**: 149-156.
22. Funayama, S., M. Ishibashi, Y. Anraku, M. Miyauchi, H. Mori, K. Komiyama and S. Omura. 1989. Novel cytotoxic antibiotics, glucopiericidinols A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological characteristics. *J. Antibiot.* **42**: 1734-1740.
23. Osada, H., J. Magae, C. Watanabe and K. Isono. 1988. Rapid screening method for inhibitors of protein kinase C. *J. Antibiot.* **41**: 925-931.
24. Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto and F. Tomita. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**: 397-402.
25. Kobayashi, E., K. Ando, H. Nakano, T. Iida, H. Ohno, M. Morimoto, T. Tamaoki. 1989. Calphostins(UCN-1028), novel and specific inhibitors of protein kinase C. *J. Antibiot.* **42**: 1470-1481.



26. Loomis, C.R. and R.M. Bell. 1988. Sangivamycin, a nucleoside analogue, is a potent inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**: 1682-1692.
27. Nishioka, H., T. Sawa, H. Naganawa, T. Takeuchi and K. Umezawa. 1991. Isolation and structure

determination of a novel phosphatidyl inositol turnover inhibitor, piericidin B1 N-oxide. *J. Antibiot.* **44**: 1283-1285.

**(Received September 23, 1992)**