

## Rous Sarcoma Virus에 의해 형질전환된 NRK 세포의 형태변화를 유도하는 활성물질 MT 1155의 분리와 생물학적 활성

안종석\* · 안순철 · 김보연 · 박문수 · 임동선 · 윤병대 · 이현선 · 민태익  
한국과학기술연구원 유전공학연구소 미생물공학연구실

### Purification and Biological Activities of MT 1155 Inducing Morphological Change of Rous Sarcoma Virus-Transformed Normal Rat Kidney Cell

Ahn, Jong-Seog\*, Soon-Cheol Ahn, Bo-Yeon Kim, Moon-Su Park,  
Dong-Sun Lim, Byung-Dae Yoon, Hyun-Sun Lee 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 GMT 1155 and purified the active compound, MT 1155, on the morphological reversion of ts/NRK cell from the isolate. MT 1155 was identified as toyocamycin having antifungal and antitumor activities from physico-chemical properties and UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and mass spectrum. MT 1155 showed the morphologically reversional activity on ts/NRK cell and the cytotoxicity on CTLL cell at the final concentrations of 1.7 μM and 0.2 μM, respectively and its IC<sub>50</sub> value on protein kinase A enzyme was 2.3 μM. Also it had strong antifungal activity against several pathogenic fungi but not antibacterial activity. And it did not inhibit both protein kinase C activity and the bleb-formation of K562 cell induced by phorbol esters.

1980년대에 들어서 발암유전자의 산물이 세포증식의 정보전달에 관련된 성장인자, 성장인자수용체, G protein, protein kinase 등이 밝혀지면서 정상세포와는 달리 세포증식기구의 이상화에 의한 무절제한 세포증식이 일어나는 암세포에서 발암유전자의 기능을 규명하는 중요한 계기가 되었다(1). 이에 따라 항암제의 개발과 발암기작의 해석을 위해서 미생물의 대사산물로부터 발암유전자의 기능과 세포증식에서 중요한 역할을 하는 protein kinase 등의 세포 정보전달과정을 저해하는 물질을 탐색하고자 하는 연구가 시작되었다(2). Uehara 등(3, 4)이 *src* 발암유전자가 coding하는 tyrosine kinase를 저해하는 물질로서 방선균으로부터 제조활성물질인 herbimycin A를 발견한 이래, 방선균으로부터 *erb-B* 발암유전자의 발현산

물인 상피세포 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)의 tyrosine kinase를 저해하는 물질로 Umezawa 등(5, 6)은 erbstatin, lavendustin을, Akiyama 등(7)은 *Pseudomonas*로부터 genistein을 분리하여 보고하였다.

이러한 발암유전자의 산물을 저해하는 물질을 탐색하기 위해서는 발암유전자의 산물인 tyrosine kinase를 동물세포로부터 분리하여 저해활성을 검색해야 하나, 이들 tyrosine kinase 등은 세포내에 아주 적은 양으로 존재하여 분리하기가 용이하지 않다. 그러므로 Uehara 등은 발암유전자 *src*를 갖는 온도 감수성 변이주 Rous sarcoma virus에 의해 형질전이된 normal rat kidney(ts/NRK) 세포를 33°C에서 배양하면 viral *src* gene이 발현되어 transformed phenotype이 되어 세포가 계속적으로 분열하여 multi-layer가 되기 위한 원형의 세포가 나타나지만 39°C에서 배양하면 *src* gene이 repression되어 정상세

**Key words:** *src*, NRK cell, morphology reversion, toyocamycin

\*Corresponding author

포의 형태를 나타낸다는 점에 착안하여 *src*에 의해 형질전이된 NRK cell의 세포형태를 정상세포의 형태로 전환시키는 것을 관찰함으로써 *src*의 tyrosine kinase 저해물질을 탐색할 수 있음을 보고하였다(3, 4).

본인들은 *src* 발암유전자의 tyrosine kinase를 저해하는 물질을 탐색하기 위하여 *src*에 의해 형질전환된 NRK cell의 형태변화를 유도하는 물질을 탐색하던 중 국내의 토양에서 분리한 방선균의 배양액으로부터 이러한 활성을 나타내는 물질을 분리하였기에 이 활성물질의 생물학적인 활성과 구조를 규명하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 활성균주의 배양

토양으로부터 분리한 방선균 분리주 GMT 1155를 사용하여 안 등(8)의 배지조성 및 배양조건으로 141 발효조에서 5일간 배양하였다.

### 활성물질의 분리 및 정제

배양액을 원심분리(6,000 rpm, 10분)하여 상등액과 균체로 나누었다. 상등액은 Diaion HP-20에 흡착시키고 column내의 여액을 증류수로 씻어낸 후 50% (v/v) methanol로 활성물질을 용출하였으며, 균체내의 활성물질은 60%(v/v) acetone으로 추출, 여과하였다. 각각의 활성물질을 합하여 감압농축하고 buthanol로 3회 추출하였으며 buthanol 추출물을 소량의 전개용매에 녹여 2회 silica gel column chromatography(chloroform : methanol = 20 : 1과 10 : 1)하였다.

### 항균활성 측정

Paper disk에 시료용액(1 mg/ml)을 50  $\mu$  흡수시킨 뒤 피검균을 접종한 검정 plate에 올려놓고 30~37°C 항온기에서 배양하여 나타나는 생육저지환의 크기를 측정하였다.

### 온도감수성 ts/NRK 세포의 형태전환 검정

Rous sarcoma virus Prague strain의 온도감수성 변이주인 ts25에 의해 형질전이된 normal rat kidney 세포인 ts/NRK 세포를 사용하였다(3, 4). ts/NRK 세포의 배지는 Dulbecco modified medium에 /당 1.0 g의 glucose와 heat inactivated calf serum을 5% 첨가한 것을 사용하였으며 배양온도를 permissive 온도인 33°C 와 non-permissive 온도인 39°C 로 맞춘

5% 농도의 CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. 33°C 에서 배양하던 ts/NRK 세포 100  $\mu$ l(1.5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml)를 96 well microtiter plate에 접종하여 12시간 CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하고 검정시료를 2  $\mu$ l 첨가한 후 12~16 시간 33°C 에서 다시 배양하여 inverted microscope로 세포의 형태가 39°C 에서 배양한 세포의 형태로 변하는 지를 관찰하였다. 이때 양성표준물질로는 herbimycin A를, 음성표준물질로는 증류수를 사용하였다.

### K562 세포(human chronic leukemic cell) 소포형성 저해활성 검정

안 등(8)의 방법과 같이 96 well microplate에 RPMI 1640 배지의 K562 세포 (1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml) 100  $\mu$ l를 접종하고 검정시료액 10  $\mu$ l를 첨가하여 37°C 항온기에서 1시간 배양한 후 PDBu를 최종농도가 1  $\mu$ g/ml 되게 처리하고 10분 후 inverted microscope로 세포 표면의 소포형성 유무를 관찰하였다.

### Protein Kinase C(PKC) 저해활성 검정

Huang 등(9)이 사용한 방법과 같이 30 mM Tris-HCl(pH 7.5), 6 mM magnesium acetate, 0.12 mM ATP, 0.25 mM EGTA, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.04% NP-40, 100  $\mu$ g/ml phosphatidyl serine, 20  $\mu$ g/ml DAG, 1 mg/ml histone III-S가 함유된 반응액 20  $\mu$ l에 소의 작은 뇌로부터 부분 정제한 PKC 조효소액 5  $\mu$ l와 검정 시료액 5  $\mu$ l를 첨가하여 PKC의 기질로 사용된 histone III-S의 인산화 정도를 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP를 사용하여 측정하였다. 이때 표준 물질로는 PKC 저해제로 알려진 staurosporine(10)을 사용하였다.

### Protein Kinase A(PKA) 저해활성 검정

Takai 등(11)의 방법과 같이 60 mM potassium phosphate(pH 6.5), 1.5 mM magnesium acetate, 3 mM aminophylline, 0.006 mM cAMP, 0.004 mM DTT, 0.06 mM ATP, 1  $\mu$ Ci/ml [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP가 함유된 반응액 20  $\mu$ l에 1 mg/ml histone VIII-S, PKA 20  $\mu$ l, 검정 시료액 10  $\mu$ l를 넣어 반응시켰으며 histone의 인산화 정도를 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP를 사용하여 측정하였다. 이때 표준물질로는 staurosporine을 사용하였다.

### CTLL(mouse cytotoxic T-lymphoma) 세포에 대한 세포 독성 검정

CTLL 세포를 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free PBSA buffer로 2번 세척하여 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml의 농도가 되게 RPMI 1640

(10% FBS) 배지로 현탁하여 96 well microplate에 100  $\mu$ l씩 넣고 검정 시료를 10  $\mu$ l 첨가한 뒤 37°C CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하여 CTLL 세포의 생존수를 측정하였으며 이때, CTLL세포의 성장을 위해 interleukin-2(IL-2)를 1  $\mu$ l 첨가하였다(12).

### 사용기기 및 시약

GMT 1155의 배양을 위해 14l jar 발효조(New Brunswick Scientific Co.)를 사용하였고 활성물질의 분리를 위해 Diaion HP-20(Nippon Rensui Co.), silica gel(Merck Co.)를 사용하였다. 세포 배양에는 Dulbecco modified 배지(GIBCO), RPMI1640(GIBCO), heat inactivated calf serum(Hyclone Co.), fetal calf serum(Hyclone Co.) 등을 사용하였으며 효소저해활성을 측정하기 위하여 PKA(Sigma Co.), casein(Sigma Co.), histone III-S(Sigma Co.), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(Amersham Co.)를 구입하여 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-6A, UV spectroscopy는 Shimadzu spectrophotometer, NMR spectrum은 Bruker AMX-500 NMR spectrometer를 사용하였다.

## 결 과

### 활성균주의 분리

전국각지의 토양으로부터 방선균을 분리하여 항생물질 생산용 배지에서 30°C, 1주일간 배양한 뒤 배양액 5 ml에 acetone 10 ml을 가하여 하룻밤 방치한 후 추출하였다. 상등액에서 acetone을 제거한 후 검

정시료로 사용하여 ts/NRK 세포의 형태전환을 관찰하였으며 양성표준물질로는 herbimycin A를 사용하였다. 그 결과 ts/NRK 세포형태를 변형된 세포형태에서 정상세포의 세포형태로 전환시키는 방선균 분리주 GMT 1155를 선별하였다(Fig. 1).

### 활성물질의 분리 및 정제

분리주 GMT 1155가 생산하는 활성물질을 분리하기 위하여 Fig. 2와 같은 방법으로 행하였다. 2차례의 silica gel column chromatography를 통하여 각 분획들을 TLC(chloroform : methanol=6 : 1)로 전개하여 UV(254 nm)로 확인하는 동시에 ts/NRK 세포의 형태전환에 대한 활성을 측정하여 활성을 나타내는 분획만을 모았다. 활성분획을 감압농축한 후 소량의 methanol에 녹여 4°C에 방치하여 옅은 노란색의 침상 또는 prism 모양의 결정물을 얻었으며 Senshupak ODS column( $\phi$ 10 mm $\times$ 25 cm), 유속 2 ml/min, 전개용매 methanol : H<sub>2</sub>O(1 : 1), UV 254 nm 등의 HPLC 조건에서 retention time 10.4분에서 단일 peak로 검출되어 순수분리되었음을 확인하였다.

### MT 1155의 물리·화학적 성질

순수 분리된 MT 1155의 물리·화학적 성질을 살펴본 결과 Table 1과 같았다. 옅은 노란색의 침상내지는 prism의 형태를 하고 있으며 DMSO에는 잘 녹으나 hexane, ether에는 전혀 녹지 않았으며 물과 기타 유기용매에는 약간 녹았다. Methanol에 녹여 UV 흡수파장을 측정한 결과 최대흡수파장이 중성에서는

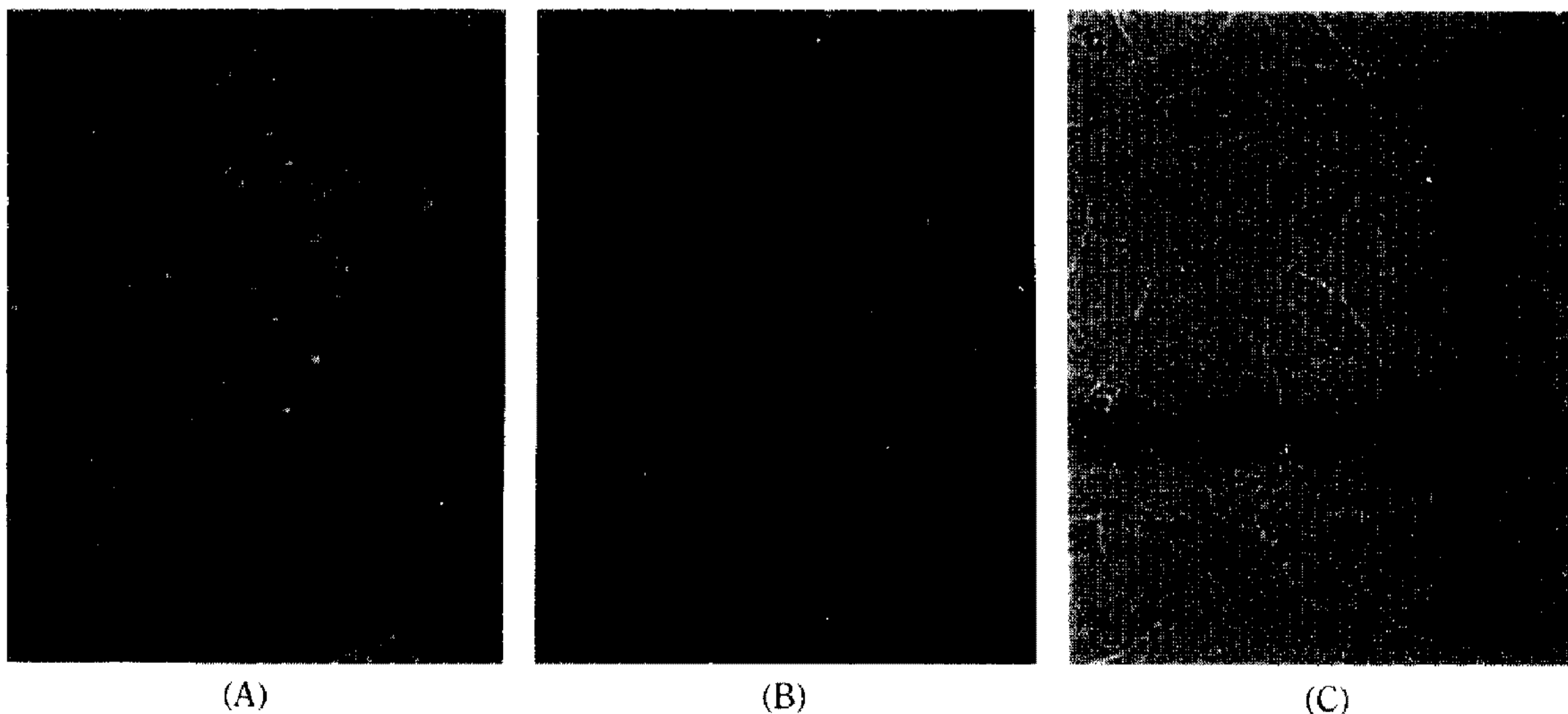
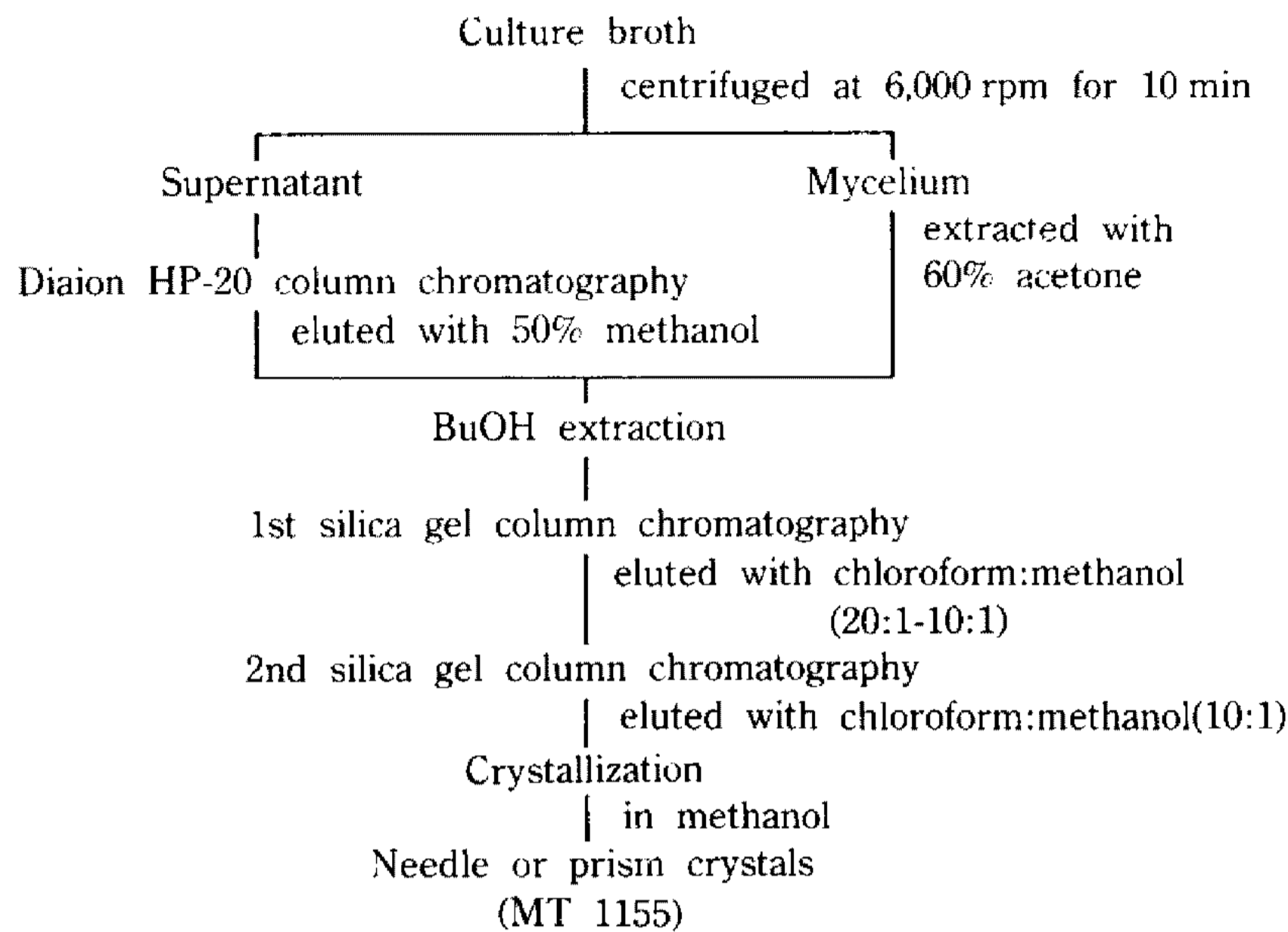


Fig. 1 Morphological change of ts/NRK cell.

(A) transformed cell morphology at 33°C, (B) normal cell morphology at 39°C, (C) morphology of cell treated with MT 1155 at 33°C.



**Fig. 2 Purification procedure of MT 1155 from Actinomycetes isolate GMT 1155.**

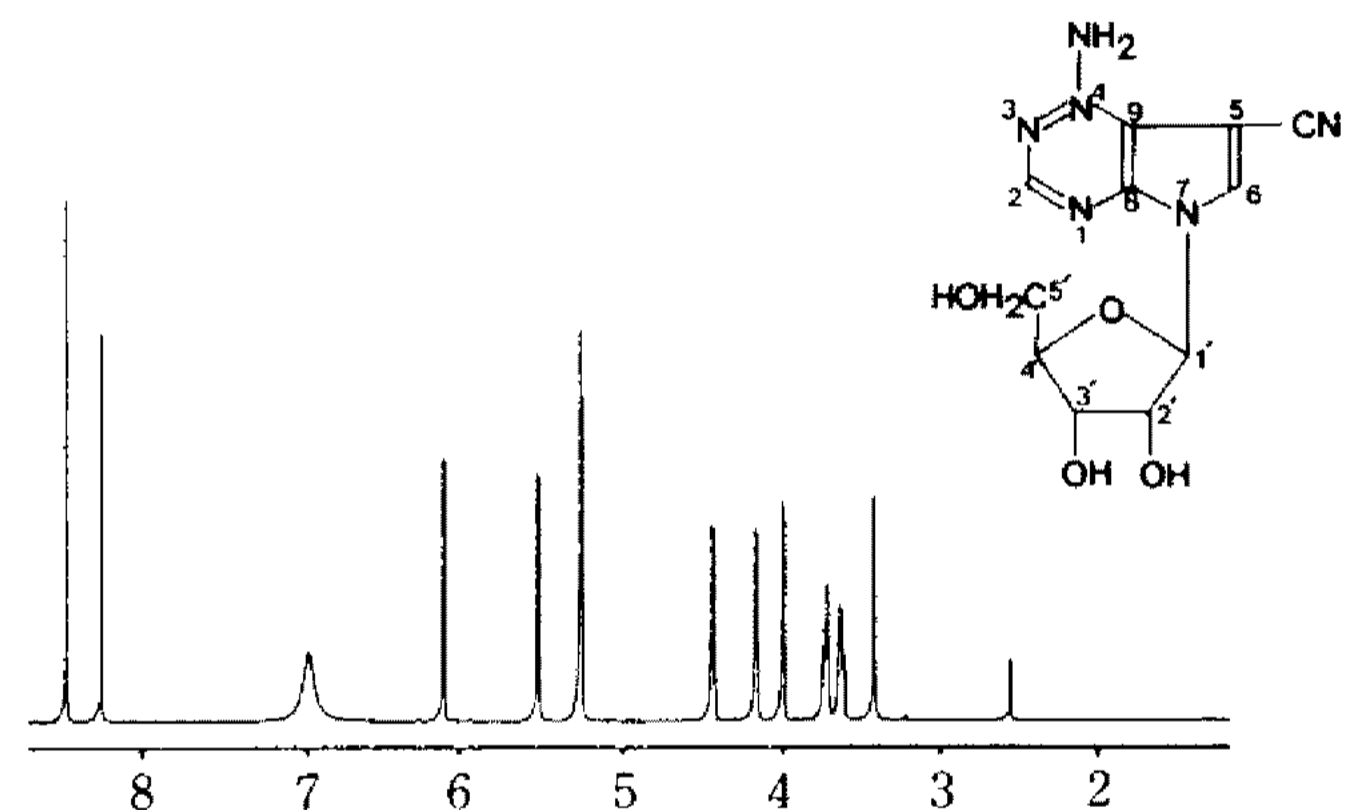
**Table 1. Physico-chemical properties of MT 1155**

Appearance	Yellowish needles or prisms
Solubility	
soluble	DMSO
slightly soluble	MeOH, acetone, chloroform, H <sub>2</sub> O
insoluble	Hexane, ether
UV $\lambda_{max}^{MeOH}$	231, 273 (neutral) 233, 279 (acidic)
$[\alpha]_D^{20}$	-61.5° (c=0.13, H <sub>2</sub> O)
Melting point	247~248°C
Molecular weight	291
Color reaction	
positive	Anisaldehyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
negative	Ninhydrin, Ehrlich, Dragendorff's, molybdophosphoric acid, anilinephthalate
TLC(R <sub>f</sub> value)	
silica gel	0.3 (chloroform:methanol=6:1)
RP-18	0.8 (methanol:H <sub>2</sub> O=7:3)

231, 273 nm이고 산성에서는 233, 279 nm로 약간 이동하였으며 nucleoside 계열의 항생물질 중 일부가 이러한 UV 흡수 형태를 갖는 것으로 알려졌다(13, 14).

### MT 1155의 구조동정

MT 1155의 구조동정을 위해 IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FAB-mass 등의 기기분석을 행하였다. IR spectrum(data 생략)에서 -NH<sub>2</sub>기와 -OH기(3400 cm<sup>-1</sup>와



**Fig. 3. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of MT 1155 and its structure (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz).**

3300 cm<sup>-1</sup>), -C≡N기(2300 cm<sup>-1</sup>), C=C기(1670 cm<sup>-1</sup>과 1600 cm<sup>-1</sup>)의 존재를 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Fig. 3)에서는 8.2 ppm(1H)과 8.5 ppm(1H)에서 purine이나 pyrimidine과 같이 heteroatom으로 된 ring내의 proton, 6.9 ppm(2H)에서 -NH<sub>2</sub>의 proton, 5.2 ppm(2H)과 5.5 ppm(1H)의 signal이 D<sub>2</sub>O 처리시 사라짐으로 보아 3개의 -OH의 proton이 존재하였으며 <sup>13</sup>C-NMR spectrum(data 생략)에서는 115.3 ppm에서 -C≡N, 87.7~61.2 ppm에서 당에서 유래된 6개의 signal이 나타났다. 이런 결과를 통해 purine과 당으로 구성된 nucleoside류로 추정되었으므로 여러가지 nucleoside 항생물질들과의 기기분석 자료들을 비교한 결과 분자량 291의 toyocamycin(15, 16)과 일치하여 MT 1155는 toyocamycin으로 동정하였다.

### MT 1155의 생물학적인 활성

Table 2에서와 같이 MT 1155는 최종농도 1.7  $\mu\text{M}$ 에서 ts/NRK 세포의 형태를 정상세포의 형태로 전환하기 시작하였다. 이런 최소저해농도는 이미 알려진 herbimycin A의 0.76  $\mu\text{M}$ 에 비하면 약 1/2 정도의 활성을 나타내는 셈이다(3). 또한 protein kinase A의 활성에 대한  $\text{IC}_{50}$ 은 2.3  $\mu\text{M}$ 로서 staurosporine보다 약 500배 정도로 저해활성이 낮았으며, IL-2의 존재하에서만 성장하는 CTLL 세포에 대해서는 최종농도 0.2  $\mu\text{M}$ 에서 cytotoxicity를 보이기 시작하였다. 그러나 최종농도 0.34 mM에서 phorbol ester에 의한 protein kinase C의 활성화로 인해 유도되는 K562 세포표면의 소포형성을 억제하지 못했고, 또한 0.42 mM에서 protein kinase C의 효소활성을 전혀 저해하지 못했다.

**Table 2. Inhibitory activities of MT 1155 against protein kinases and cellular response<sup>a)</sup>**

Enzyme or cell	Concentration ( $\mu\text{M}$ )
Protein Kinase A	2.3 <sup>b)</sup>
Protein Kinase C	>420 <sup>b)</sup>
K562	>340 <sup>c)</sup>
ts/NRK	1.7 <sup>d)</sup>
CTLL	0.2 <sup>e)</sup>

<sup>a)</sup> Each experiments were done according to "materials and methods".

<sup>b)</sup>  $\text{IC}_{50}$  values of protein kinase A and protein kinase C activities.

<sup>c)</sup> Minimal inhibitory concentration on the bleb-formation of K562 cell induced by PDBu.

<sup>d)</sup> Minimal concentration for the morphological change of ts/NRK cell induced partially.

<sup>e)</sup> Minimal inhibitory concentration on the growth of CTLL cell.

한편 기존에 이미 알려진 바와 같이 MT 1155는 Gram (+), (-) bacteria에는 전혀 활성이 없었으나 여러 가지 병원성 진균에는 강력한 항균활성을 보였다(Table 3)(15).

### 고 찰

ts/NRK의 세포형태를 정상세포의 형태로 전환하는 활성물질을 분리, 정제하여 그 구조를 동정한 결과 항진균성 항암제인 toyocamycin으로 밝혀졌다. 이 세포의 형태전환에 대한 활성을 보고한 것으로는 ansamycin 계열의 herbimycin A, macbeccin, geldanamycin(3)과 아미노산 계열인 erbstatin(5), isoflavone 계열의 orobol, genistein(17), 그 외 reveromycin(18) 등이 있으나 nucleoside류의 물질이 이러한 활성을 갖는다는 보고는 본 보가 처음이다.

Toyocamycin이 phosphatidylinositol(PI) turnover의 중요한 효소인 phosphatidylinositol kinase를 저해한다는 보고(19)와 세포내의 PI turnover는 *ras*, *src*, *erb-B*, *fms*, *fes* 등의 발암유전자의 발현에 의한 활성화에 따른 세포의 형질전이와 밀접한 관계가 있음이 보고되었다(1). 이러한 연구결과들로 미루어, ts/NRK 세포에 형질전이된 viral *src* gene의 발현 혹은 *src* gene 발현 산물인 *src* kinase의 활성을 toyocamycin이 저해하여 ts/NRK의 세포형태가 변형된 세포 형태를 나타내지 않고 정상세포의 형태로 전환된 것으로 추측된다. Toyocamycin과 유사한 nucleoside 구조를 가지고 있는 sangivamycin, tubercidin 등이 ts/NRK 세포형태를 정상세포의 형태로 전환시킨다는 보고는 없으나 세포내 정보전달과정에서 *src* tyrosine kinase와 유사한 역할을 하는 EGF receptor의 tyrosine kinase를 저해한다는 보고가 있으므로(20) *src*

**Table 3. Antimicrobial activity of MT 1155**

Test organisms	Activity*	Test organisms	Activity*
(Bacteria & Yeast)		(Fungi)	
<i>Escherichia coli</i> BE 1186	-	<i>Alternaria mali</i>	35
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	-	<i>Glomerella cingulata</i>	35
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	-	<i>Ophiobolus miyabeanus</i>	15
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	-	<i>Pelliculariae sasakii</i>	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Pyricularia oryzae</i>	35
<i>Candida albicans</i>	+	<i>Aspergillus oryzae</i>	42
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	47

\*Inhibition zone size (mm), dosage: 50  $\mu\text{g}/\text{disk}$



tyrosine kinase 활성을 저해할 가능성이 크다. 그러나 herbimycin A와 toyocamycin을 ts/NRK 세포에 처리하고 배양한 뒤 두 물질을 각각 제거하여 새로운 배지에서 다시 배양했을 때 herbimycin A의 경우는 *src* gene이 발현되어 변형된 세포형태로 전환되지만 (21) toyocamycin의 경우는 정상세포의 형태로 남아 있다. 이러한 결과를 통해 herbimycin A는 *src* gene 발현을 저해하는 것이 아니라 *src* gene의 발현산물인 *src* tyrosine kinase를 저해하는 것으로 보아(3) toyocamycin의 비가역적인 형태 전환은 herbimycin A와는 다른 작용기작을 나타내는 것으로 보인다.

Protein kinase C(PKC)는 protein tyrosine kinase (PTK)와 더불어 세포내 정보전달에 중요한 역할을 하는 효소로서, toyocamycin은 소뇌로부터 추출한 PKC 효소의 활성이나 PDBu에 의해 유도되는 K562 세포의 소포형성을 저해하지 못하였으나 세포내 정보전달과정에서 second messenger로 작용하는 cyclic AMP에 대한 의존성 protein kinase(PKA)에 대해서는 저해활성을 나타낸 반면에 유사한 구조를 가지고 있는 sangivamycin의 경우 PKC와 PKA 효소활성에 대한 50% 저해농도가 각각 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M이고 100  $\mu$ M의 농도에서 K562 소포형성을 100% 저해하는 것으로 알려졌다(20, 22). Loomis 등(22)에 의하면 toyocamycin, sangivamycin 등의 nucleoside류의 물질이 세포내의 인산화과정에 관여하는 효소에 대한 저해작용은 nucleoside류가 ATP analogue로써 ATP와 competitive inhibition하여 나타난 결과라고 추정하였다.

Cytotoxic T cell인 CTLL 세포의 성장에 IL-2가 필요하여 CTLL 세포의 세포막에 IL-2 수용체가 존재하며 IL-2 수용체에 tyrosine kinase를 coding하는 *lck*와 PI-3 kinase가 결합하여 세포의 정보전달을 진행하는 것으로 알려졌다(23). Toyocamycin이 최종농도 1.7  $\mu$ M에서 CTLL에 대한 세포독성을 보여 PKC와 PTK를 경유한 세포정보전달외에 또 다른 경로의 정보전달과정을 저해할 가능성이 있다.

현재까지 일반적인 세포내 정보전달과정은 PI turnover를 통한 PKC 의존성 경로와 PTK를 통한 PKC 비의존성 경로 2가지가 알려져 있다. Toyocamycin이 A431 세포의 membrane extract내의 PI kinase를 저해하고 EGF receptor의 autophosphorylation을 저해하는 것으로 보고되어(19, 20) ts/NRK 세포에서의 viral *src*가 PI turnover에 미치는 영향을 알아보기 위해 ts/NRK 세포를 serum이 없는 Dulbecco modified medium에서 24시간 starvation시킨 뒤 5% se-

rum을 첨가하여 viral *src*의 permissive 온도인 32 C와 nonpermissive 온도인 39C에서 배양한 결과 두 온도 모두에서 PI turnover가 활성화 되었다. 이러한 결과는 ts/NRK 세포의 viral *src*와 PI turnover가 서로 관련이 없음을 나타내는 것으로 toyocamycin이 ts/NRK의 세포형태를 정상세포의 형태로 전환하고 소뇌에서 추출한 PKC 효소활성을 저해하지 못하는 것을 종합해 볼 때 ts/NRK 세포의 viral *src*에 의한 세포정보전달은 PI turnover를 통한 PKC 의존성 경로를 거치는 것이 아니라 PTK를 통한 신호전달과정을 거치며 이런 과정을 toyocamycin이 저해하여 ts/NRK 세포의 형태가 전환되는 것으로 추정된다.

Toyocamycin에 의한 세포의 형태변화는 protein kinase 같은 효소를 저해하여 유도될 수 있으나 세포를 구성하는 cytoskeleton, fibronectin 등의 여러가지 세포환경의 변화에 따라 유도될 수 있고(24), 또한 세포의 증식과 분화의 중요한 효소인 protein kinase가 phosphate donor로서 nucleotide를 요구하므로(25) 세포성장과 분화를 조절할 수 있는 잠재적 인자로서의 가능성이 매우 높다. 따라서 toyocamycin이 ts/NRK 세포의 *src* gene 발현, *src* kinase 활성화 혹은 그외 세포형태를 변화시킬 수 있는 인자 등 어느 부위를 저해해서 ts/NRK 세포 형태전환이 유도되는지 검토해 볼 필요가 있다.

## 요 약

방선균 분리주 GMT 1155로부터 ts/NRK 세포의 형태를 변형된 세포형태에서 정상세포의 형태로 전환하는 활성물질을 분리, 정제하였다.

활성물질 MT 1155는 UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, mass, 원소분석 등의 기기분석을 통하여 항진균성 항암물질인 toyocamycin으로 동정되었다.

MT 1155는 ts/NRK 세포의 형태전환에 대한 활성외에도 PKA 효소활성 저해와 CTLL 세포에 대한 세포독성이 있으나 K562 소포형성 억제 및 PKC 효소활성에 대한 저해효과는 없었다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술처의 첨단요소연구개발사업비와 선도기술개발사업비의 일부에 의해 수행되었음을 밝히는 바이며 herbimycin A와 ts/NRK cell line을 제공해 준 Yoshioka Uehara박사님께 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Bishop, J.M. 1991. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**: 235-248.
2. Powis, G. 1991. Signalling targets for anticancer drug development. *Tips* **121**: 188-194.
3. Uehara, Y., M. Hori., T. Takeuchi and H. Umezawa. 1986. Phenotypic change from transformed to normal induced by benzoquinoid ansamycins accompanies inactivation of p60<sup>src</sup> in rat kidney cells infected with Rous sarcoma virus. *Molecular & Cellular Biology* **6**: 2198-2206.
4. Uehara, Y. and M. Hori. 1985. Screening of agents which convert 'transformed morphology' of Rous sarcoma virus-infected rat kidney cells to 'normal morphology': Identification of an active agent as herbimycin and its inhibition of intracellular src kinase. *Jpn. J. Cancer Res.* **76**: 672-675.
5. Hori, T., T. Kondo, T. Tsuji, M. Inoto and K. Umezawa. 1992. Inhibition of tyrosine kinases and src oncogene functions by stable erbstatin analogues. *J. Antibiot.* **45**: 280-282.
6. Onoda, T., H. Iinuma, Y. Sasaki, M. Hamada, T. Takeuchi and K. Umezawa. 1989. Isolation of a novel tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A, from *Streptomyces griseolavendus*. *J. Nat. Prod.* **52**: 1252-1257.
7. Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**: 5592-5595.
8. 안종석, 안순철, 이현선, 박문수, 오원근, 김보연, 민태익. 1992. 방선균 분리주 No. 1882-5로부터 Phorbol Ester에 의해 유도되는 K562 cell의 소포형성을 억제하는 물질의 분리와 동정. *산업미생물학회지* **20**: 565-573.
9. Huang, K.P., F.L. Huang, H. Nakabayashi and Y. Yoshida. 1988. Biochemical characterization of rat brain protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **263**: 14839-14845.
10. 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.
11. Takai, Y., S. Nagaya, M. Inoue, A. Kishimoto, K. Nishiyama, H. Yamamura and Y. Nishizuka. 1976. Comparison of mode of activation of guanosine 3',5'-monophosphate-dependent and adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases from silk worm. *J. Biol. Chem.* **251**: 1481-1487.
12. Hewlett, G., K.G. Stunkel and H.D. Schlumberger. 1989. A method for the quantitation of interleukin-2 activity. *J. Immunol. Methods* **117**: 243-246.
13. Isaac, B.G., S.W. Ayer, L.J. Letendre and R.J. Stornard. 1991. Herbicidal nucleosides from microbial sources. *J. Antibiot.* **44**: 729-732.
14. Seto, H., N. Koyama, H. Ogine, Y. Kodama. 1983. The structure of a novel nucleoside antibiotic, dapiramycin A. *Tetrahedron Letters* **24**: 495-498.
15. Kikuchi, K. 1955. Antibiotics from *Streptomyces* sp. No. E-212 I. *J. Antibiot. Ser. A8*: 145-147.
16. Tolman, R.L., R.K. Robins and L.B. Townsend. 1969. Pyrrolopyrimidine nucleosides. III. The total synthesis of toyocamycin, sangivamycin, tubercidin and related derivatives. *J. Am. Chem. Soci.* **91**: 2102-2108.
17. Ogawara, H., T. Akiyama, J. Ishida, S. Watanabe and K. Suzuki. 1986. A specific inhibitor for tyrosine protein kinase from *Pseudomonas*. *J. Antibiot.* **39**: 606-608.
18. Osada, H., H. Koshino and K. Isono. 1991. Reveromycin A, a new antibiotic which inhibits the mitogenic activity of epidermal growth factor. *J. Antibiot.* **44**: 259-261.
19. Nishioka, H., T. Sawa, M. Hamada, N. Shimura, M. Imoto and K. Umezawa. 1990. Inhibition of phosphatidylinositol kinase by toyocamycin. *J. Antibiot.* **43**: 1586-1589.
20. Osada, H., T. Sonoda, K. Tsunoda and K. Isono. 1989. A new biological role of sangivamycin: Inhibition of protein kinases. *J. Antibiot.* **42**: 102-106.
21. Uehara, Y., Y. Moriya, M. Hori and T. Takeuchi. 1989. Induction by herbimycin A of contact inhibition in v-src-expressed cells. *J. Antibiot.* **42**: 1831-1837.
22. 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.
23. Merida, I., E. Diez and G.N. Gaulton. 1991. IL-2 binding activates a tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol-3-kinase. *J. Immunol.* **147**: 2202-2207.
24. Umezawa, K., K. Tanaka, T. Hori, S. Abe, R. Sekizawa and M. Imoto. 1991. Induction of morphological change by tyrosine kinase inhibitors in Rous sarcoma virus-transformed rat kidney cells. *FEBS* **279**: 132-136.
25. Isono, K. 1988. Nucleoside antibiotics: Structure, biological activity and biosynthesis. *J. Antibiot.* **41**: 1711-1739.

(Received December 5, 1992)