

택사 (*Alismatis Rhizoma*)에서 분리한 Protostane계 화합물과 그 유도체의 FPTase 억제활성

이상명 · 권병목¹ · 민병선^{2*}

한국인삼공사 중앙연구원, ¹한국생명공학연구원, ²대구가톨릭대학교 약학대학

FPTase Inhibition Effect of Protostanes from *Alismatis Rhizoma* and Derivatives from Alisol B 23-acetate

Sang Myung Lee, Byoung Mog Kwon¹ and Byung Sun Min^{2*}

Korea Ginseng Corporation Central Research Institute, Daejeon 305-805, Korea

¹Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 305-606, Korea

²College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

Abstract – The purpose of this research is to study of inhibitory activity of protostane type triterpens against farnesyl-protein transferase (FPTase). The ingredients of *Alismatis Rhizoma*, alisol B 23-acetate, C 23-acetate, alisol B and A 24-acetate, and thirteen synthetic analogues from alisol B 23-acetate exhibited inhibition activity against FPTase by scintillation proximity assay method. As a result, alisol C 23-acetate, one of the constituents of *Alismatis Rhizoma*, the synthetic analogues carboxylated and hydroxylated on branch chain of protostane exhibited a significant inhibitory activity. However, the compounds significantly lowered the inhibitory activity, when there is no 3 position keto on protostane skeleton.

Key words – *Alismatis Rhizoma*, Alisol, Farnesyl-protein transferase (FPTase)

대표적 이노 생약중의 하나인 택사 (*Alismatis Rhizoma*)는 택사 (*Alisma orientalis* (G. Samuelsson) Juz, Alismataceae) 또는 기타 동속근식물의 근경으로 겨울에 잎이 마른 다음에 채취하여 수염뿌리와 껍질을 제거하고 음건한 후 이를 대소로 나누어 물에 담가 수분이 스며들면 내외의 습기가 갈아졌을 때 썰어서 말린 것이다.^{1,2)}

택사의 화학성분에 관한 연구로서 Murata 등은^{3,4)} alisol A, B, A 24-acetate, B 24-acetate, C 23-acetate를 분리하였으며 Fukuyama 등⁵⁾ 11-deoxyalisol, alisol D, 16 β -hydroxyalisol B 23-acetate와 16 β -methoxyalisol B 23-acetate를 분리하여 그의 화학적 구조를 밝힌 바 있다. Yoshikawa 등은⁶⁾ 11-deoxyalisol B, 11-deoxyalisol B 23-acetate, alisol E 23-monoacetate, alisol F, G를 확인 하였다. Zeng 등은⁷⁾ 미량 물질로서 alizexol A를 *A. orientalis*에서 분리하였다. 이들 화합물은 protostane 계 화합물로서 choline성 acetyltransferase를 복구하는 작용이 발견되었으며⁸⁾ 16-ketoalisol A는 간질환을 치료하는 것으로 알려져있다.⁹⁾ 또한 Lee등은¹⁰⁾ 택사의

벤젠 추출물이 L1210 암세포주에 대하여 ED₅₀ 13.8 μ g/ml의 세포독성을 가지는 것을 확인하여 택사 함유성분의 항암활성 가능성을 제시하였다.

천연물로부터 새로운 계열의 화합물 즉, 선도화합물을 찾으려는 연구는 선택적인 작용기전을 가진 항암화학요법제의 개발에 중요하게 인식되어 왔다. 천연물은 오랫동안 질병의 예방 및 치료에 사용되어 왔으므로 어떤 면에서는 실질적인 임상실험을 해왔다고 볼 수 있다. 우리는 선택적인 작용기전을 가진 항암활성 물질을 개발하기 위하여 mechanism-based bioassay방법으로서 farnesyl-protein transferase (FPTase) inhibition assay를 행하였다. FPTase는 세포의 증식과 분화를 조절하는 신호전달 과정에 관여하는 효소로서 farnesyl pyrophosphate의 farnesyl group을 라스 (ras) 단백질에 전달하는 역할을 한다.¹¹⁾ 한편, 라스 단백질은 성장조절인자를 통한 신호전달과정에서 가장 중요한 역할을 하는 단백질로서 ras proto oncogenes에 의해 발현되는데 이 ras gene (H, K, N-ras)은 다양한 사람의 종양에서 oncogenic gene으로서 처음 발견되었고 라스 단백질의 생물학적 활성이 췌장암 (90%), 폐암 (50%), 직장암 (50%), 갑상선암 (30%)에서 비

*교신저자 (E-mail): bsmin@cu.ac.kr
(Tel): +82-53-850-3613

정상적으로 mutation되어 있는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 이에 따라 FPTase의 저해제 탐색을 통하여 함암제를 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있는데 지금까지 연구된 저해제 중 천연물에서 유래된 것으로 patulin,¹³⁾ fusidienol,¹⁴⁾ RPR113228,¹⁵⁾ cylindrol A,¹⁶⁾ SCH 58450,¹⁷⁾ barceloneic acid A,¹⁸⁾ actinoplanic A, B¹⁹⁾ 등이 있다.

우리는 택사로부터 alisol B 24-acetate를 비롯한 4종의 화합물을 분리하고²⁰⁾ alisol B 24-acetate로부터 13종의 유기화학적 유도체를 합성하여 다양한 암세포주에 대하여 세포독성과 아울러 그의 활성-구조의 상관성을 밝힌 바 있다.²¹⁾ 이 논문은 이들 화합물의 farnesyl-protein transferase에 대한 억제효과를 연구하기 위하여 scintillation proximity assay (SPA)를 수행하고 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

시약 - FPTase 억제활성실험에 사용한 Q-Sepharose는 Pharmacia Biotech (UK), Farnesyl transferase [³H]SPA enzyme assay kit는 Amersham (UK)사에서 구입하였으며 그 외, Trisma base, EDTA, EGTA, Phenylmethylsulfonyl fluoride, Leupeptin, DTT는 Sigma-Aldrich (US)에서 구입하여 사용하였다.

실험재료 - 본 실험에 사용된 4종의 alisol계 화합물은 생약재 시장에서 판매하는 택사를 구입하여 크로마토그래피법으로 분리하여 alisol B 23-acetate (**1**), alisol C 23-acetate (**2**), alisol B (**3**), alisol A 24-acetate (**4**)을 ¹H, ¹³C NMR 등의 정성적 기기분석법으로 확인하여 사용하였고²⁰⁾ 12종의 alisol계 화합물의 유도체는 alisol B 24-acetate를 유기화학적으로 부분구조 변형하여 ¹H, ¹³C NMR로 확인하여 사용하였다. 구조변형된 화합물은 23S-acetoxy-11β, 24R,25-trihydroxyprotost-13(17)-en-3-one (**5**), 23S-acetoxy-24R,25-epoxy-3α,11β-dihydroxyprotost-13(17)-en-3-one (**6**), 23S-acetoxy-24R,25-epoxyprotost-11(12),13(17)-dien-3-one (**7**), 11β,23S-diacetoxy-24R,25-epoxyprotost-13(17)-en-3-one (**8**), 23S-acetoxy-13(17),24R(25)-diepoxy-11β-hydroxyprotost-3-one (**9**), 13(17),24R(25)-diepoxy-11,23S-dihydroxyprotostan-3-one (**10**), 24R,25-epoxy-11β,23S-dihydroxyprotost-13(17)-en-3-one (**11**), oxidation of E-4 with HIO₄ (**12**), 11β,23S,24R,25-tetrahydroxyprotost-13(17)-en-3-one (**13**), oxidation of **13** with HIO₄ (**14**), oxidation of **14** with Tollen's reagent (**15**), 23S-acetoxy-24R(25)-epoxy-11β,23S-dihydroxyprotost-13(17)-en-3-hydroxyimine (**16**)이다.²¹⁾

발암유전자 FPTase 억제 활성 검사 - Scintillation Proximity Assay (SPA)방법에 의해 측정하였다. FPTase 활성은 Biotin-KKSKTKCVIM (FPTase의 기질로서 Ki-ras C-terminal sequence)에 [³H] farnesyl pyrophosphate로부터

[³H]의 전이를 측정하여 결정 하였다. 20 μl의 farnesyl pyrophosphate, 20 μl의 biotin lamin B peptide, 10 μl 시료 용액 (in DMSO), 10 μl의 완충용액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 2 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 0.01% Triton X-100)을 넣고 3분 동안 정치한 후 40 μl의 FPTase를 넣어주고 37°C에서 60분간 반응시킨다. 150 μl의 STOP/bead 시약을 첨가하여 잘 섞어서 반응을 정지시킨 후 30분간 상온에서 방치시킨 후 1450 Microbeta Counter (Wallac, US) 방사능 측정기를 이용하여 다음의 방법으로 억제 정도를 측정하였다.

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times 1 - \frac{\text{Sample (cpm)} - \text{Blank2 (cpm)}}{\text{Control (cpm)} - \text{Blank1 (cpm)}}$$

Blank 1: without sample and enzyme

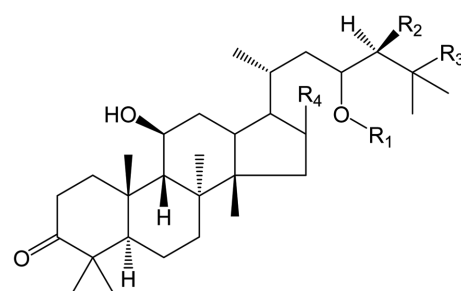
Blank 2: with sample and without enzyme

Control: without sample and with enzyme

대조약물로는 gliotoxin을 사용하였다.

결과 및 고찰

택사로부터 분리한 4종의 protostane계 화합물 (Fig. 1) alisol B 23-acetate (**1**), alisol C 23-acetate (**2**), alisol B (**3**), alisol A 24-acetate (**4**)에 대하여 발암관련 유전자 중의 하나인 FPTase에 대한 억제활성을 검사하였다. 아울러 protostane 화합물의 FPTase에 대한 구조 및 활성관계를 연구하기 위하여 12종의 alisol 유도체를 화합물 **1**로부터 유기화학적으로 부분구조 변형하여 (Fig. 2) 그의 활성을 검사하였다.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	—O—		H
2	Ac	—O—		O
3	H	—O—		H
4	H	OAc	OH	H

Fig. 1. Chemical structures of protostane type triterpenoids from *Alismatis Rhizoma*.

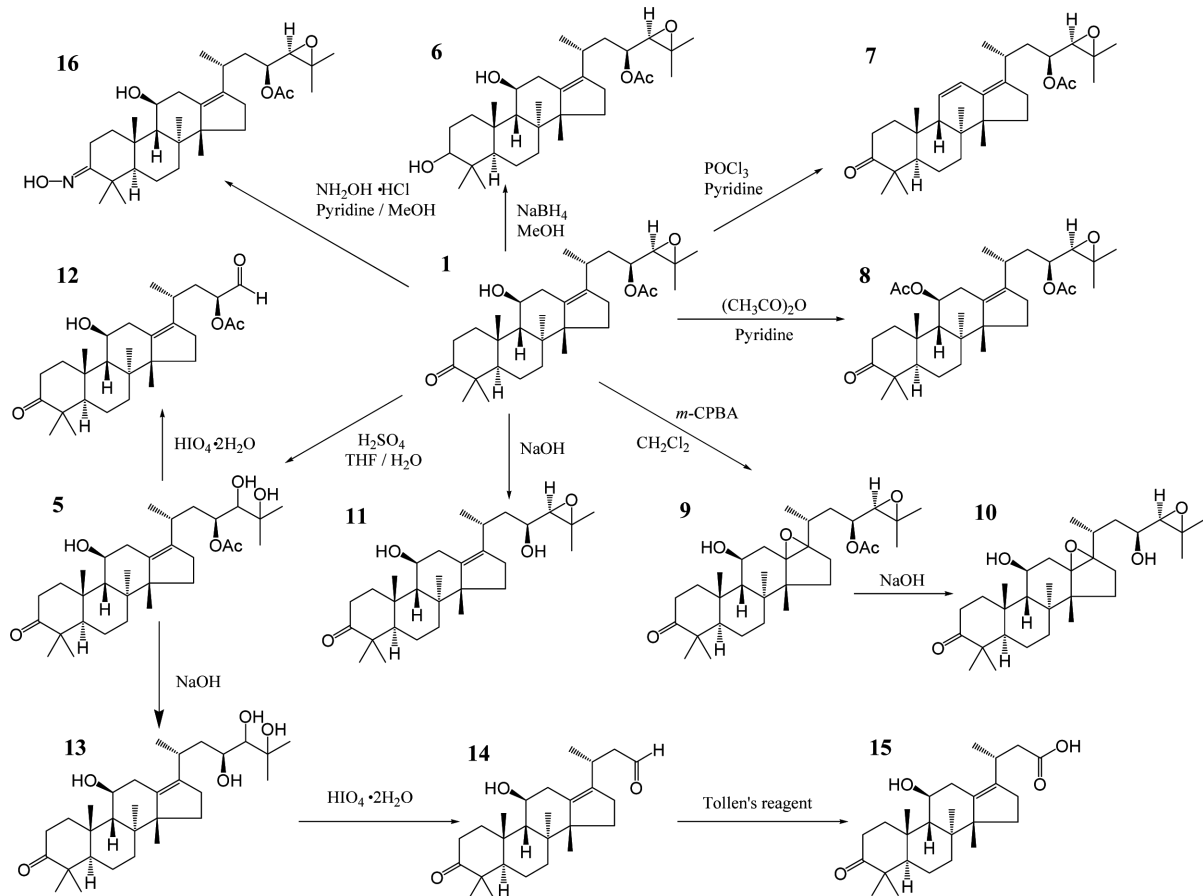


Fig. 2. Synthetic analogues from alisol B 23-acetate (1).

Table I. Farnesyl-protein transferase inhibition activities of each compound

^a Comp.	Inhibition (%)	Comp.	Inhibition (%)
1	65	10	72
2	77	11	54
3	54	12	60
4	57	13	79
5	44	14	60
6	0	15	89
7	40	16	0
8	47		
9	34	^b gliotoxin	50

^aEach sample used 1 mg/ml. ^bGliotoxin as positive control used 4.6 $\mu\text{g/ml}$

텍사 함유 protostane 계 화합물의 발암관련 유전자 FPTase에 대한 억제활성은 화합물 2가 1 mg/ml의 농도에서 77%의 억제활성을 나타내며 활성이 가장 높았다. 텍사에서 분리한 4종의 alisol 화합물들은 50% 이상의 FPTase 억제활성을 나타내었으며 특히 R₄위치에 카르보닐기가 존재하는 경

우 (화합물 2) 활성이 다소 높아짐을 알 수 있었고 그 외 특이한 구조에 대한 활성의 상관성은 유추하기 힘들었다. 그런 이유로 protostane계 화합물의 FPTase 억제활성을 증가된 화합물을 연구 하기 위하여 텍사에 가장 다량으로 함유되어 있으며 FPTase 억제활성이 비교적 강한 화합물 1을 유기화학적 방법으로 구조 변형을 시도하여 12종의 화합물 1 유도체를 만들었다. 즉, protostane 골격의 측쇄의 에폭시환을 개환하여 수산기를 증대시키거나 (화합물 5, 13), 12, 16번 위치의 이중결합을 에폭시화하여 에폭시환을 증대시키거나 (화합물 9, 10), 측쇄의 길이를 감소시키는 (화합물 12, 14, 15) 등의 구조변형을 행하여 그들의 FPTase에 대한 억제 활성을 관찰하였다. 특이한 점은 다른 protostane계 화합물보다 훨씬 강한 세포독성을²¹⁾ 보였던 화합물 16의 FPTase에 대한 억제활성은 현저하게 낮아진다는 것이다. 이 화합물들은 protostane 골격의 3번 위치에 존재하는 keto기 대신에 hydroxyimine이 치환된 화합물로서 3번 위치의 keto기가 억제활성에 중요한 영향을 미친다는 것을 유추할 수 있다. 이 현상은 3번 위치의 keto기가 수산기로 환원될 경우에도 억제효과가 사라지는 것을 알 수 있다 (화합물 6). 측쇄의 에폭시환을 개환하여 diol 또는 triol을 형성하거나

Table II. IC₅₀ values of active compounds against farnesyl-protein transferase

^a Comp.	^b IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mM)
E-4	0.5	0.97
S-6	0.4	1.02
S-9	0.4	0.81
S-11	0.2	0.48
gliotoxin	0.0046	0.014

^aEach compound was examined wide five concentrations.

^bIC₅₀ value represents the concentration that caused 50% inhibition of FPTase activity.

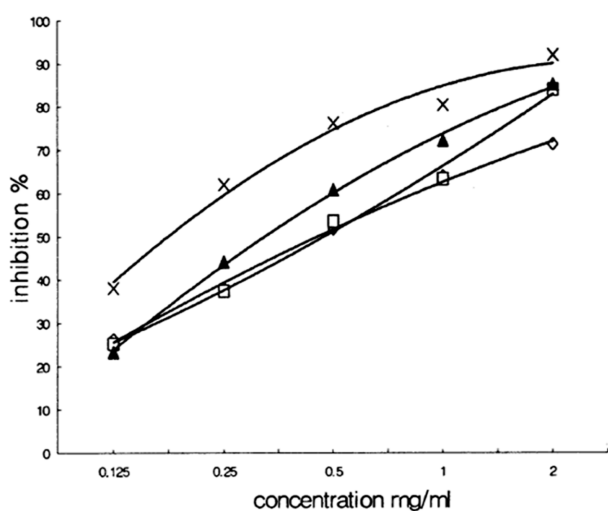


Fig. 3. Farnesyl-protein transferase activity curves of more active protostanes; ◇- : 1, □- : 10, ▲- : 13, -X- : 15

(화합물 5, 13) 13, 17위치의 이중결합에 에폭시환이 형성한 화합물 10의 억제활성은 다소 증대 되었으며 측쇄에 carboxylic acid가 도입된 화합물 15의 경우 억제활성이 크게 증가 됨을 알 수 있었다 (Fig. 2, Table I). 이들 화합물 중 억제활성도가 상대적으로 높은 4종의 화합물의 IC₅₀ 값을 측정하였다 (Table II). 각 화합물은 5개의 농도로 측정 하였으며 대조약물로서 gliotoxin을 사용하였다. 각 화합물의 IC₅₀ 값은 대조약물보다 사용량에 있어서 낮은 수치를 나타내었으나 대조약물의 분자량에 의하여 그의 몰 농도의 비교에서는 높은 수치로 나타났다. 또한, 이들 화합물의 억제활성은 농도의존적으로 증가함을 그래프를 통하여 알 수 있었다 (Fig. 3).

결 론

택사로부터 분리한 4종의 alisol계 화합물과 alisol B 23-acetate로부터 구조변환된 13종의 화합물을 대상으로 farnesyl-

protein transferase (FPTase)에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 scintillation proximity assay (SPA)를 실시하였다. 그 결과 택사로부터 분리한 4종의 화합물 중 alisol C 23-acetate가 가장 강한 억제활성을 나타내었다. 13 종의 Alisol B 23-acetate 유도체에 대한 억제활성실험에서는 측쇄에 carboxylic acid가 도입된 화합물 15가 89.4% (1 mg/ml)로 나타났다. 또한 3번 위치에 keto기가 존재하지 않는 화합물 6, 16의 경우 억제활성이 사라지며 이 경우 13, 17위치에 에폭시환이 생성된 화합물 10의 경우 약간의 억제활성이 존재한다. 그리고 측쇄의 위치에 수산기가 도입되었을 때 억제활성이 증대함을 알 수 있다. 따라서 protostane계 화합물의 FPTase의 활성은 3번 위치의 keto기의 존재가 필수적이며 측쇄에 카르복실산이 도입되거나 수산기가 도입된 화합물일 경우 그의 억제활성이 증대된다는 것을 유추 할 수 있다.

사 사

이 논문은 2009년도 정부재원(교육과학기술부 기초연구사업 중견연구자지원사업 핵심연구지원사업비)으로 한국연구재단의 지원을 받아 연구되었음(NRF-2009-0084675).

인용문헌

1. 생약학교재편찬위원회, 생약학 (2006) 1:283, 동명사, 서울.
2. 정보섭, 신민교, 도해향약(생약)대사전 (1990) 1:269, 영림사, 서울.
3. Murata, T., Shinohara, M. and Miyamoto, M. (1970) Biological-active triterpens of Alismatis Rhizoma. I. Isolation of the alisol. *Chem. Pharm. Bull.* **18**: 1347-1353.
4. Murata, T., Shinohara, M. and Miyamoto, M. (1970) Biological active triterpenes of Alismatis Rhizoma. I. Isolation of the alisol. *Chem. Pharm. Bull.* **18**: 1369-1384.
5. Fukuyama, Y., Geng, P., Wang, R., Yamada, Y. and Nakagawa, K. (1988) 11-deoxy alisol C and alisol D: New protostane-type triterpenoids from Alisma plantago-aquatica. *Planta Med.* **54**: 445-447.
6. Yoshikawa, M., Hatakeyma, S., Tanaka, N., Matsuoka, T., Yamahara, J. and Murakami, N. (1993) Crude drugs from aquatic plants. II. On the constituents of the rhizome of Alisma orientale juzep. *Chem. Pharm. Bull.* **41**: 2109-2112.
7. Zeng, L., Pen, X. and Ru, Y. (1995) Alizexol A, a novel protostane type of triterpen from Alisma oriental (SAM) juzep. *Chin. Chim. Lett.* **6**: 675-678.
8. Yamada, S., Yamaguchi, T., Naito T. and Hashimoto, K. (1995) New alisol, and cerebral function-improving agent containing alisol compound as active ingredient. *Japanes Patent.* JP07173188.
9. Kimura, H., Ogata, T. and Sato, Y. (1992) Therapeutic agent of hepatic disease containing alismol-relating compound as

- active ingredient. *Japans Patent*. JP04077420.
10. Lee, J. H., Kang, K. S. and Ahn, B. J. (1986) Cytotoxic screening of oriental drugs and folklores against L1210 cells. *K. J. Pharmacol.* **17**: 286-291.
 11. Pomplino, D. L., Rands, E., Schaber, M. D., Mosser, S. D., Anthony, N. J. and Gibbs, J. B. (1992) Steady-state kinetic mechanism of Ras farnesyl-protein transferase. *Biochem.* **31**: 3800-3807.
 12. Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. (1993) Function and regulation of RAS. *Ann Rev. Biochem.* **62**: 851-891.
 13. Miura, S., Hasumi, K. and Endo, A. (1993) Inhibition of protein prenylation by patulin. *FEBS Letter* **318**: 88-90.
 14. Singh, S. B., Jones, E. T., Goetz, M. A., Bills, G. F. and Nallin, M. (1994) Fusidinol: A novel inhibitor of ras farnesyl-protein transferase from *fussidium griseum*. *Tetradron Lett.* **35**: 4693-4696.
 15. Van der Pyl, D., Cans P., Debernard, J. J., Herman, F., Lelievre, Y., Tahraoui, L., Vuilhorgne, M. and Leboul, J. (1995) RPR113228, a novel farnesyl-protein transferase inhibitor produced by *Chrysosporium lobatum*. *J. Antibiot.* **48**: 736-737.
 16. Singh, S. B., Zink, D. L., Bills, G. F., Jenkins, R. G., Silverman, K. C. and Lingham R. B. (1995) Cylindrol A: a Novel inhibitor of ras farnesyl-protein transferase from *Cylindrocarpon lucidum*. *Tetrahedron Lett.* **36**: 4935-4938.
 17. David, W. P., Robert, W. P., Raymond, L. B., Raymond, Y., Mohindar, S. P., Mahesh, P. W., Robert, B. and Stephen J. C. (1995) SCH 58450, a novel farnesyl protein transferase inhibitor possessing a 6a, 12a:7,12-diepoxybenz[a]anthracene ring system. *Tetrahedron Lett.* **36**: 6995-6998.
 18. Jayasuriya, H., Ball, R. G., Zink, D. L., Smith, J. L., Goetz, M. A., Jenkins, R. G., Nallin-Omstead, M., Silverman, K. C., Bills, G. F. and Lingham, R. B. (1995) Barceloneic acid A, a new farnesyl-protein transferase inhibitor from a Phoma species. *J. Nat. Prod.* **58**: 986-991.
 19. Silverman, K. C., Cascales, C., Genilloud, O., Sigmund, J. M., Gartner, S. E., Koch, G. E., Gagliardi M. M., Heimbuch, B. K., Nallin-Omstead, M., Sanchez, M., Diez, M. T., Martin, I., Garrity, G. M., Hirsch, C. F., Gibbs, J. B., Singh, S. B. and Lingham, R. B. (1995) Actinoplanic acids A and B as novel inhibitors of farnesyl-protein transferase. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **43**: 610-616.
 20. Lee, S. M., Kho, Y. H., Min, B. S., Kim, J. H., Na, M. K., Kang, S. J., Maeng, H. Y. and Bae, K. H. (2001) Cytotoxic triterpenoides from *Alismatis Rhizoma*. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 524-526.
 21. Lee, S. M., Min, B. S. and Bae, K. H. (2002) Chemical modification of alisol B 23-acetate and their cytotoxic activity. *Arch. Pharm. Res.* **25**: 608-612.
- (2011. 6. 17 접수; 2011. 8. 11 심사; 2011. 8. 11 게재확정)