

Retrovirus 증식 억제인자의 탐색 (Ⅲ)

Screening for Inhibitors of Reverse Transcriptase (Ⅲ)

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 생물학적 반응조절물질 (BRM) 생산기술개발의 세부과제 “Retrovirus 증식 억제 인자의 탐색(Ⅲ)” 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1992. 6.

주관연구기관명: 한국과학기술연구원 유전공학연구소

총괄연구책임자: 정 태화(한국과학기술연구원 유전공학연구소 책임연구원)

연구책임자: 이 정준(한국과학기술연구원 유전공학연구소 책임연구원)

연구원: 김 영호(한국과학기술연구원 유전공학연구소 선임연구원)

이 성우(한국과학기술연구원 유전공학연구소 연구원)

김 세은(한국과학기술연구원 유전공학연구소 연구원)

류 택승(한국과학기술연구원 유전공학연구소 연구원)

김 영희(한국과학기술연구원 유전공학연구소 연구원)

요 약 문

I. 제목: Retrovirus 증식억제 인자의 탐색(Ⅲ)

Ⅱ. 연구개발의 목적과 중요성

미생물과 생약에서의 생체활성물질 탐색은 관련분야인 유전공학, 천연물화학등의 발전과 함께 그 중요성이 더욱 커져 세균감염이나 암 등의 질병치료에 쓰이는 약물과 농업, 축산업에 쓰이는 수많은 화합물들이 직접 미생물 발효액과 생약으로부터 분리, 정제되어 그대로 이용되거나 화학적으로 변화시킨 유도체로 널리 이용되고 있다. 그러나 항암 및 항바이러스성 항생물질은 그 절대적 필요성과 긴박성, 그리고 개발하려는 노력에 비해 성과도 적고 발전도 느린 분야이다. 바이러스에 기인한 암에 유용한 물질을 screening 하는 데는 바이러스 특유의 life-cycle에 있어서 어떤 단계를 특이적으로 차단하는 약물이 바람직하다. Retrovirus는 DNA를 중간체로 하여 복제하는 RNA virus를 말하는데 복제된 DNA는 숙주세포의 chromosome에 integration되어 provirus로 존재한다. 이 virus DNA가 세포의 성장과 증식에 관여하는 어떤 유전자에 영향을 주어서 DNA의 전사를 증진시키면 악성 전환이 유발되는 것으로 생각된다.

AIDS의 원인 바이러스도 retrovirus에 속하는데, 성인 T-cell leukemia의 원인인 HTLV-1이 분리, 동정된 후 AIDS의 원인 바이러스로서 HTLV-Ⅲ/LAV가 분리되었는데, 모두 비슷한 retrovirus로 T-림파구를 표적세포로 한다. 이런 retrovirus의 증식에 필수적인 역전사 효소(reverse transcriptase: RT)의 존재가 1970년대에 보고되었고, 많은 retrovirus의 역전사 효소들은 성질이 유사한 것으로 알려졌다. Retrovirus의 증식을 억제하는 방법은 여러 단계가 고려될 수 있지만 가장 효과적

인 단계는 역전사 효소를 저해하는, 즉 바이러스의 RNA가 DNA로 복제되는 것을 방지하는 초기 단계로 간주되고 있다. 따라서 역전사 효소를 선택적으로 저해하는 물질은 우수한 항바이러스성 화합물로 기대되고 또한 AIDS에 대한 화학요법제로도 사용될 수 있을 것이다. 역전사 효소 저해제에 의해 AIDS 바이러스의 증식을 억제하려는 시도의 최초의 예는 HPA-23을 AIDS 환자에 사용한 것인데, 그 후 suramin이 *in vitro*에서 AIDS 바이러스의 감염과 표적세포 장애효과를 억제하는데 착안하여 AIDS 환자 치료에 사용했다는 보고도 있다. 현재는 substrate analog인 AZT(3'-azido-deoxythymidine)가 가장 유망하여 FDA의 인가를 받았으나 bone marrow의 기능을 위축시키고 T-cell을 포함한 적혈구 생산을 떨어뜨리는 등의 심각한 부작용이 있으며 반감기가 짧고 심한 두통을 동반한다고 한다.

역전사 효소를 저해하는 기존의 항생물질로는 adriamycin계와 ansamycin계의 여러 종 그리고 streptonigrin 등이 보고되었는데 RNA polymerase와 DNA polymerase를 모두 저해하여 선택성이 없다.

최근에 AMV(avian myeloblastosis virus)의 역전사 효소를 model로 screening된 revistin, retrostatin, limocrocin, sakyomycin 그리고 다른 방법에 의존했지만 이 효소를 저해할 것으로 기대되는 oxetanocin 등이 보고되었다. 이중 sakyomycin과 oxetanocin은 AIDS virus의 증식을 억제하는 효과가 있음이 보고되었다.

여러종의 바이러스로부터 분리된 RT는 서로 성질이 유사한 것으로 알려져 있어, 본 연구에서는 AMV RT를 첫 단계의 모델 효소로 사용하여 RT 저해물질을 screening하고 RT에 대하여 활성이 있는 화합물에 대해서는 HIV의 *nef* gene을 CAT(chloramphenicol acetyl transferase)로 치환한 SVCAT virus의 *in vitro* 세포 배양에서 증식 저해활성을 검색하여 최근 급속한 속도로 감염되고 있는 AIDS와 그와 관련된 질병을 치료하는 생리활성물질을 개발하고자 하였다.

아울러 암세포의 형태학적 변화를 유도시키는 화합물은 암세포의 성장이나 분화, 신호전달체계에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 기대되어 인체유암세포주인 MCF-7 cell을 이용하여 형태학적인 변화를 유도하는 화합물을 찾고자 하였다.

Ⅲ. 연구의 내용과 범위

1. 토양 방선균의 분리 배양 및 시료의 제조

전국 각지에서 채집한 토양시료 일정량을 멸균증류수로 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 으로 희석한 후 arginine-glycerol-salt agar, HV agar, Bennet medium에 0.1ml씩 도말하여 28°C에서 72시간동안 배양하여 나타난 single colony를 Bennet medium에 옮겨서 colony의 모양, 가용성 색소의 생성유무, spore의 형성유무 및 형태 등을 관찰하여 각기 다르다고 판단되는 균주만을 선별하여, fermentation 배지에서 7일간 액체배양하였다. 또다른 방법으로는 생리식염수에 현탁한 토양시료 일정량을 augmentin 과 nystatin을 포함한 OMYM medium에 도말하여 각기 다르다고 생각되는 균주를 선별하여 MCLM-1과 MCLM-2 배지에서 6일간 액체배양하였다. 이상과 같은 방법으로 배양한 배양액 5ml를 취하여 동결건조한 후 CH_2Cl_2 과 MeOH 1:1의 혼합용매로 추출하고 500 μl 로 농축하여 이를 시료로 하였다.

2. 생약시료의 제조

1차년도에서 reverse transcriptase에 저해활성을 보였던 생약중 대다수의 활성성분으로 추정되는 58종의 polyphenol 화합물을 20mg/ml의 농도가 되도록 DMSO에 녹이고, 최종농도가 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다.

3. Reverse transcriptase 저해활성

방선균의 배양액과 생약 성분들에 대하여 AMV(avian myeloblastosis virus)의 reverse transcriptase를 이용하여 각 화합물의 inhibition 정도를 측정하였으며, template - primer로는 poly(rA)-oligo(dT)를 사용하였다. Reverse transcriptase에 높은 저해활성을 보인 성분들에 대하여는 4단계로 단계별 희석하여 각 성분에 대한 IC₅₀를 측정하였다.

4. Syncytia forming assay

Reverse transcriptase의 저해활성과 HIV virus에 대한 직접적인 저해활성을 관찰하기 위해서 HIV의 *nef* gene을 CAT로 치환한 SVCAT virus를 이용하여 *in vitro*에서 syncytia forming assay를 실시하였다.

5. 인체유암세포주 MCF-7 cell에 대한 형태학적 변화 유도활성 측정

방선균 배양액과 생약 시료를 3단계로 단계별 희석하여 MCF-7 cell의 형태학적 변화 유도활성을 관찰하였다. MCF-7 cell은 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며 시료 처리후 48시간 만에 현미경 하에서 형태변화 유도를 관찰하였다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. 방선균 배양액의 RT 저해활성

Fermentation 배지에서 배양한 300종의 방선균 배양액에 대해서 reverse transcriptase inhibition assay를 실시한 결과 35종이 60% 이상의 저해활성을 나타내었으며, 그 중 높은 활성을 나타낸 *Streptomyces* sp. AZ01에 대하여 활성성분의 분리를 행하였다.

2. *Streptomyces* sp. AZ01의 배양 및 활성성분의 분리

Streptomyces sp. AZ01을 MCLM-1배지를 이용해서 28°C에서 6일간 배양하여 얻은 6l의 배양액을 8,000 rpm에서 원심분리하여 cell debris와 supernatant로 나누는 다음, cell debris의 EtOAc fraction을 silica gel column chromatography 및 prep.HPLC를 이용하여 정제한 결과 reverse transcriptase에 저해활성을 나타낸 compound I (5mg) 및 MCF-7 cell의 형태변화를 유도하는 compound II (3mg), compound III (2mg)을 얻었다.

3. Compound I, II, III의 구조 동정

Streptomyces sp. AZ01에서 얻은 compound I, II, III을 UV, MS, IR, NMR 등의 기기분석을 이용하여 분석한 결과, compound I은 isoflavonoid의 일종인 genistein유도체로 추정되고, compound II와 compound III은 각각 분자량 451과 465를 갖는 teleocidin B와 olivoretin A로 동정할 수 있었다.

4. Polyphenol 화합물의 활성측정

1) Reverse transcriptase 저해활성

주로 대극과(Euphorbiaceae)에서 분리된 58종의 polyphenol화합물을 이용하여 reverse transcriptase 저해활성을 관찰한 결과 80µg/ml의 농도에서 60% 이상의 저해활성을 보인 화합물은 36종이었다. 이들 화합물 중 구조적으로 ellagitannin류에 속하는 화합물이 대체적으로 높은 활성을 보였으며, 이들에 대하여는 다시 최종 농도가 80, 20, 5, 1.25µg/ml이 되도록 serial dilution하여 각 화합물의 IC₅₀를 구한 결과 punicafolin은 1.4µg/ml, euphorscopin과 pedunculagin은 2.4µg/ml, excoecarianin은 2.8µg/ml등의 높은 RT저해활성을 나타내었다.

2) Syncytia forming assay

RT에 대하여 높은저해활성을 보인 화합물에 대하여 SVCAT virus에 대한 직접적인 저해활성을 측정하였다. 그 결과 elaeocarpusin, euphorscopin 등 몇몇 화합물이 2.5 - 5.0 μ g/ml의 농도에서 syncytia의 형성을 저해하였으나, 거의 동일한 농도에서 세포독성을 나타내었으며 control로 사용한 AZT보다는 현저하게 낮은 활성을 나타냈다.

3) 인체유암세포주 MCF-7 cell에 대한 형태변화 유도활성

Polyphenol 화합물을 최종농도가 50 μ g/ml, 5 μ g/ml, 0.5 μ g/ml이 되도록 희석하여 인체유암세포주에 대한 형태변화 유도를 관찰한 결과 excoecarianin과 euphorscopin이 50 μ g/ml의 농도에서 MCF-7 cell의 형태변화를 유도하였다.

Summary

Nowadays the prevention and cure for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) has been the subject of the greatest scientific search in history. Despite the intense effort to develop a vaccine and to discover a cure for this almost fatal disease which destroys the victim's immune system and open the door for serious infection, no cure has been found. The inhibitor of reverse transcriptase, whose activity is characteristic of retrovirus such as AIDS-causing virus HTLV-III/LAV, might be a ideal candidate for development of chemotherapeutic agents against this disease.

This study has been initiated in the hope of finding specific inhibitors against reverse transcriptase from microbial cultured broth and oriental herbs. Reverse transcriptase originated AMV instead of HIV has been used.

Almost five hundreds *Streptomyces* sp. have been isolated from Bennet and OMYM agar plate containing augmentin and nystatin. Among these strains, we selected one strain, *Streptomyces* sp. AZ01, which showed strong inhibitory activity of reverse transcriptase and changed the morphology of MCF-7 cell. This strain was cultured in the MCLM-1 medium using 1.5 liter fermentor 4 times. The entire cultured broth was combined and cell debris was collected by centrifugation and fractionated with hexane, ethylacetate, and n-butanol successively. The ethylacetate fraction, which showed the strongest activities, was chromatographed with silica gel column, and preparative HPLC by activity guided fractionation. The compound I (genistein derivative),

compound II (teleocidin B) and compound III (olivoretin A) were isolated and their structures were elucidated by spectroscopic method such as UV, IR, NMR, and MS spectrometry. The IC_{50} of reverse transcriptase of compound I and II was 145.9 $\mu\text{g/ml}$ and 188.3 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Compound II and III rapidly changed the morphology of MCF-7 cell line.

From the previous results of this research, we knew that a lot of herbal durgs showed the strong activities of reverse transcriptase and their activities were due to the polyphenol compounds. So we tested 58 polyphenol compounds originated from Euphorbiaceae against the inhibitory activities of reverse transcriptase, syncytia forming inhibitory activities and morphology changing activities of MCF-7 cell line. Most of ellagitannin group showed strong inhibitory activities of reverse transcriptase, but they didn't show good activities in the syncytia forming assay. Excoecarine and euphorscopin changed the morphology of MCF-7 cell at the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$.

Continous efforts for screening with the combination of syncytia forming assay, reverse transcriptase inhibition assay and HIV-specific protease inhibition assay could lead to discovery of antiviral drugs from natural products.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	15
Chapter 2. Materials and Methods.....	21
1. Materials, Instruments and Media.....	21
(1) Materials and Instruments.....	21
(2) Media.....	22
2. Isolation and culture of <i>Streptomyces</i> , preparation of test solutions.....	25
3. Preparation of test solutions of medicinal herbs.....	25
4. Reverse transcriptase inhibition assay	25
5. Syncytia forming assay	32
6. Morphology change of MCF-7 cell.....	32
7. Isolation and purification of active substances from <i>Streptomyces</i> sp. AZ01.....	32
Chapter 3. Results and Discussion.....	35
1. Biological activity and structure of the metabolites from <i>Streptomyces</i> sp. AZ01.....	35
(1) Reverse transcriptase inhibitory activities.....	35
(2) Morphology change of MCF-7 cell.....	36
(3) Structure elucidation of compound I.....	37

(4) Structure elucidation of compound II.....	40
(5) Structure elucidation of compound III.....	42
2. Biological activities of medicinal herbs.....	44
(1) Reverse transcriptase inhibitory activities.....	44
(2) Syncytia forming assay	46
(3) Morphology change of MCF-7 cell.....	46
 Chapter 4. Conclusions.....	 47
 References.....	 49

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 실험재료와 방법	21
1. 시약, 기기 및 배지	21
(1) 시약 및 기기	21
(2) 배지	22
2. 방선균의 분리와 배양, 시료의 제조	25
3. 생약시료의 제조	25
4. Reverse transcriptase inhibition assay	25
5. Syncytia forming assay	32
6. MCF-7 cell에 대한 형태변화 유도활성 측정	32
7. <i>Streptomyces</i> sp. AZ01로부터 활성성분의 분리와 정제	32
제 3 장 결과와 고찰	35
1. <i>Streptomyces</i> sp. AZ01의 활성과 분리정제 및 구조동정	35
(1) Reverse transcriptase 저해활성	35
(2) MCF-7 cell의 형태변화 유도활성	36
(3) Compound I 의 구조 동정	37
(4) Compound II 의 구조 동정	40
(5) Compound III 의 구조 동정	42
2. 생약시료의 활성측정	44

(1) Reverse transcriptase 저해 활성	44
(2) Syncytia forming assay	46
(3) MCF-7 cell에 대한 형태변화 유도활성	46
제 4 장 결론 및 건의사항	47
참 고 문 헌	49

제 1 장 서 론

Retrovirus는 P. Rous 가 1911년 닭의 육종세포로부터 처음 분리하였고 다른 동물들에서도 확인되었다. 그 중에서 1950년대 L. Gross가 백혈병을 앓는 쥐로부터 포유동물의 retrovirus를 최초로 분리하였으며, murine leukemia와 관련되었음이 제시되었다. 숙주에 악성질환을 야기하는 retrovirus로는 Gibbon ape leukemia(GaLV)와 악성 및 비악성 질환을 일으키는 feline leukemia virus(FeLV)가 있으며 실제로 retrovirus에 의한 leukemia에 있어 어느 정도 면역억제 현상이 수반되는 것으로 알려져 있다.

만성진행형 질병과 관련된 retrovirus class로 lentivirus가 있는데 지금까지 비악성 질환, 예를 들면 뇌염, 신경계이상, 관절염, 폐질환, 용혈성빈혈 등의 원인으로 알려져 있으며 유제류(有蹄類)에서만 분리되었다.

그러나 lentiretrovirus에 속하는 AIDS의 원인 virus로 HTLV - III 가 사람에서 발견되었고, AIDS와 유사질환을 일으키는 Simian T-lymphotropic virus인 STLV - III가 원숭이에서 발견되었는데, 이들은 주로 T4-lymphocyte에 감염되어 치명적인 결과를 야기하는 것이 특징이다.¹⁾

AIDS의 원인인 HIV는 1983년 Montagnier등에 의해 lymphadenopathy(swollen gland)환자로부터 분리되어, lymphadenopathy-associated virus(LAV)로 명명되었다. 그러나 이 바이러스가 AIDS 원인 바이러스라는 명백한 증거는 없었는데, 1984년 Gallo 등이 Human T-lymphotropic virus III(HTLV III)를 분리한 후 AIDS 원인 바이러스로 확인되었다.^{2), 3)}

HIV는 가장 복잡한 유전자 구조를 갖는 retrovirus로 알려져 있다. 다른 retrovirus에서처럼 gag(core structural gene), env(envelope glycoprotein), pol(viral DNA polymerase) gene과 바이러스 복제와 제어에 관련된 LTR(long

terminal repeats)이 genome의 양끝에 있다.

이외에 HIV에 특이한 *tat III*, *art/trs*, *3'-orf*, *sor* 및 *R* 같은 5개의 non-structural gene 이 있으며 바이러스 복제에 있어 중요한 조절기능을 갖는 것으로 알려져 있다.

HIV의 유전자 구조 및 그 기능들이 차츰 밝혀지면서 이 바이러스의 증식을 억제하는 화합물을 탐색하는데 있어 훌륭한 target들이 제공되고 있다. 이러한 target를 요약하면 Table 1과 같다. 4)

Table 1. Stages in the replicative cycle of a pathogenic human retrovirus which may be targets for therapeutic intervention.

Stage	Potential intervention
Binding to target cell	Antibodies to the virus or cell receptor
Early entry into target cell	Drugs that block fusion or interfere with retroviral uncoating
Transcription of RNA to DNA by reverse transcriptase	Reverse transcriptase inhibitors
Degradation of viral RNA in an RNA-DNA hybrid	Inhibitors of RNase H activity
Integration of DNA into host genome	Drugs which inhibit pol gene-mediated 'integrase' function
Expression of viral genes	'Anti-sense' constructs; Inhibitors of the <i>tat-III</i> protein or <i>art/trs</i> protein
Viral component production and assembly	Myrist lation, glycosylation and protease inhibitors or modifiers
Budding of virus	Interferons

HIV는 표면의 gp120을 통해 T세포 표면의 CD4 단백질과 결합함으로써 세포내로 침입한다는 것이 알려져 gp120과 CD4의 결합을 차단하는 화합물에 대한 연구가 진행되어 cytoplasm과 transmembrane domain이 없는 soluble CD4에 대한 *in vitro* 실험에서 HIV의 결합과 표적세포에서의 복제가 저해되는 것이 알려졌다. 또한 gp120의 약 40%가 glycosylation되어 CD4와의 결합에 중요한 역할을 하므로 glycosylation 저해제에 대한 연구도 진행되어 castanospermine 및 1-deoxynogirimycin 등이 *in vitro* 에서 glycosylation 을 방해하는 것이 알려졌다.⁵⁾

이외에 phosphorylation, myristylation 등을 억제하는 물질은 AIDS 치료제로 개발될 가능성도 높다. 최근 dextran sulfate와 heparin 같은 sulfated polysaccharide가 gp120과 CD4의 결합을 억제함이 밝혀졌다.⁶⁾ 또한 gp120의 일부 분인 10개 아미노산으로 된 "peptide T"가 바이러스의 표적세포 결합을 억제한다는 보고도 있다.

HIV에는 이 바이러스 특유의 protease가 있어 p160 gag-pol의 전구 단백질을 가수분해하는데 관여한다. 이 protease는 99개의 아미노산으로 구성되어 있으며 dimer로서 효소활성을 나타낸다. Aspartic protease로 분류되는 이 protease는 proline과 aromatic 아미노산 사이를 절단하는 효소로 이 효소를 저해하면 HIV의 증식에 중요한 peptide 의 processing이 안됨으로 해서 바이러스의 기능을 상실하게 될 것이므로 이 protease저해제 연구도 활발하다.⁷⁾

표적세포의 수용체에 결합한 HIV는 세포안으로 들어가 viral RNA로부터 reverse transcriptase에 의해 DNA가 역전사되고 복제된 DNA는 double strand로 된 후 chromosome에 integration되어 provirus로 존재한다.

Anti-AIDS 약품개발의 표적으로 이 바이러스 특유의 reverse transcriptase 가

가장 효과적인 것으로 생각되어 이 효소 저해제 개발에 많은 노력이 집중되고 있다. 많은 dideoxynucleotide들이 세포내의 kinase에 의해 인산화된 후 강력하고 선택적으로 RTase를 저해하여 HIV의 복제를 억제함이 알려졌고 그중 AZT(3'-azido, 2', 3'-dideoxythymidine)가 가장 유망한 화합물로서 FDA의 인가를 받아 사용되고 있으나 bone marrow 억제 및 T-cell을 포함한 적혈구 생산감소등 심각한 부작용으로 장기간 사용에 문제가 있다.

2', 3'-dideoxycytidine(ddC)는 강력한 anti-HIV nucleoside로서 phase I 실험 중에 있는데 AZT와 마찬가지로 HIV p24 antigen을 감소시키는 작용이 있어 HIV의 복제를 억제한다는 사실이 입증되었다.

Dideoxy nucleoside 외에 reverse transcriptase를 저해하는 화합물로 pyrophosphate analog인 phosphonoformate (일명 Foscarnet)가 *in vitro* 에서 HIV 복제를 저해함이 밝혀져 임상실험중에 있고 rifamycin 유도체도 전임상시험중에 있는 것으로 보고되었다.

최근 Declercg 등은 benzodiazepine 계 화합물인 tetrahydro - imidazo [4,5,1-jk] [1,4] - benzodiazepin-2-(1H)-one과 -thione(TIBO)이 HIV의 복제를 저해하며 AZT보다 훨씬 강력하고 안정성도 좋다고 보고하였다. 이 물질도 HIV의 reverse transcriptase 를 저해할 것으로 예상하고 있다. 8)

천연물로부터 치료약품 개발을 위한 노력은 avermectin, mevacor 등의 성공 이후 다시 각광을 받아 활발하게 연구되고 있는데 AIDS 치료제 개발을 위한 screening에서는 주로 reverse transcriptase를 target으로 하고 있다. 미생물 대사산물로부터 reverse transcriptase 저해제 screening은 AMV 효소를 model로 하여 일본에서 활발하게 진행되었다.

Reverse transcriptase를 저해하는 기지 항생물질로는 adriamycin 및 그 유도체, ansamycin 계통의 수종 그리고 streptonigrin 등이 보고되었는데, 그중 RNA

template에 결합해서 DNA 전사를 저해하는 actinomycin D나 adriamycin 계열, RNA polymerase에 결합하여 효소 활성을 저해하는 ansamycin 계열의 streptovaricin, geldanamycin, rifamycin SV 유도체 등은 선택성이 결여되어 문제가 되는 듯하다.

최근 AMV 역전사효소를 model 로 screening 된 revistin⁹⁾, retrostatin¹⁰⁾, limocrociclin¹¹⁾, sakyomycin¹²⁾, oxetanocin¹³⁾ 등이 보고되었다.

한편, protoberberine과 benzophenanthridine alkaloid 중에서 fagaronine, nitidine 등이 RNA tumor virus의 역전사 효소를 저해한다는 보고¹⁴⁾⁻¹⁶⁾ 이후 식물, 해조류 등에서의 역전사 효소 저해제 탐색도 활발하다.

Alkaloid 뿐만 아니라 tannin¹⁷⁾과 flavonoid¹⁸⁾의 역전사 효소 저해활성에 관한 연구도 진행되어, hydrolyzable tannin이 poly(rA)-oligo(dT)를 template-primer로 해서 nitidine에 필적할만한 강한 저해작용이 있다는 것이 보고되었고, fisetin, quercetin, myricetin 등의 flavonoid 도 역전사 효소에 대하여 강력한 활성을 갖고 있다고 알려졌다.

최근에는 *Anemone flaccida* 라는 식물의 근경에서 분리한 두 종류의 triterpene saponin이 역전사 효소 저해활성을 갖고 있는 것으로 보고되었다.¹⁹⁾ Oleanolic acid 를 aglycone으로 하는 flaccidin B(oleanolic acid 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranoside)와 giganteaside D(oleanolic acid-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranoside)가 바로 그것인데 역전사 효소에 대한 저해활성에 있어서는 flaccidin B가 더 강하게 나타나 sugar moiety가 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 해조류에서 또한 역전사 효소를 저해하는 새로운 물질로 분리 보고된 SAE(Sea algal extract)는 galactose(73%), sulfonate(20%), 3-6-anhydrogalactose(0.65%)로 구성된 sulfated polysaccharide로 γ -carrageenan family에 속하며, *in vitro* 에서 HIV의 역전사 효소를 선택적으로 저해하는 것으로 알려져 관심을 모으고 있다.^{20), 21)}

제 2 장 실험재료와 방법

1. 시약, 기기 및 배지

(1) 시약 및 기기

AMV reverse transcriptase는 Promega에서 구입하였고, [³H]-TTP는 NEN 제품을 사용하였다. Polyadenylic acid와 oligodeoxythymidylic acid는 Pharmacia에서 구입하였고, dithiothreitol, TTP, ddTTP 등은 모두 Sigma제품을 사용하였다. Scintillation cocktail로는 NEN에서 pre-mixing한 Econofluor-2 를 사용하였으며, Scintillation counter로는 Beckman LS 6000LL analyzer를 이용하였고, 방선균 배양을 위해서는 KSI-200L shaker를 사용하였다.

방선균 선별배지에 첨가해 준 항생물질 augmentin과 nystatin은 국내 제약회사에서 공급받아 사용하였다. Chromatography용 용매는 EP, GR급의 용매를 사용하였고, HPLC 용 용매는 주로 E.Merck제품을 사용하였다. 분석용 및 분리정제용 TLC plate는 E.Merck의 Kieselgel 60 F254 및 E.Merck의 RP-18, RP-8 plate를 사용하였다. 발색시약으로는 ninhydrin, anisaldehyde-H₂SO₄를 사용하였다.

세포배양을 위하여 사용한 RPMI 1640배지와 fetal bovine serum은 Gibco사의 제품을 사용하였다.

각 화합물의 분리와 동정에 이용한 기기는 다음과 같다.

UV: Millton Roy Spectronic 3000 Array

IR: Laser Precision Analytical RFX-65 FTIR Spectrometer

NMR: Varian 500 NMR Spectrometer

HPLC: Waters System(501 Pump / 745B Data module / Automated Gradient Controller)

MS: HP 5989A MASS Spectrometer

CENTRIFUGE: Beckman Model J2-21M

FERMENTOR: L.E. Marubishi Model MD-250

(2) 배지

방선균의 분리를 위해서는 arginine-glycerol-salt agar와 HV agar, Bennet medium 및 augmentin과 nystatin을 함유한 OMYM plate를 사용하였고, 배양을 위해서는 fermentation medium, MCLM-1, MCLM-2를 사용하였으며, 그 조성은 아래와 같다.

< Arginine-glycerol-salt agar >

arginine monohydrochloride	1 g
Glycerol	12.5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ · 6H ₂ O	0.01 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.001 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.001 g
agar	20 g
cycloheximide	100 µg/ml

D. W. 1 l

adjust to pH 7.2

< HV(Humic acid-Vitamin) agar >

Humic acid	1 g (dissolved in 0.2N NaOH)
Na ₂ HP04	0.5 g
KCl	1.7 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 g
B-vitamine	trace
cycloheximide	50ny
agar	18 g

D. W. 1 l

adjust to pH 7.2

< Bennet medium >

Glucose	10 g
Bacto-peptone	2 g
Beef ext.	1 g
Yeast ext.	1 g

D. W. 1 l

adjust to pH 7.2

< Fermentation medium >

Soluble starch	20 g
Glucose	10 g
Soy bean meal	25 g
Beef extract	1 g
Yeast extract	4 g
NaCl	2 g
CaCO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	0.05 g

D. W. 1 l

adjust to pH 6.8 - 7.0

< OMYM >

Oatmeal	20 g
Glucose	2 g
Malt extract	2 g
Yeast extract	2 g
CoSO ₄ .7H ₂ O	0.006 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.003 g
MnSO ₄ .4-5H ₂ O	0.003 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.003 g

D. W. 1 l

adjust to pH 7.0

< MCLM-1 >

Oatmeal	20 g
Glucose	10 g
Malt extract	2 g
Yeast extract	2 g
Soy bean meal	10 g
Starch	12 g
CoSO ₄ . 7H ₂ O	0.006 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.003 g
MnSO ₄ . 4-5H ₂ O	0.003 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.003 g

D. W. 1 l

adjust to pH 7.0

< MCLM-2 >

Glycerol	25 g
Soytone	5 g
Glucose	5 g
Yeast extract	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
CaCO ₃	0.25 g

D. W. 1 l

adjust to pH 7.0

2. 방선균의 분리와 배양, 시료의 제조

전국 각지에서 채집한 토양시료 일정량을 멸균증류수로 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 으로 희석한 후 arginine-glycerol-salt agar, HV agar, Bennet medium와 augmentin 200 μ g/ml, nystatin 100 μ g/ml을 포함하는 OMYM plate에 각각 0.1ml씩 도말하여 28 $^{\circ}$ C에서 72시간동안 배양하여 나타난 single colony를 Bennet medium에 옮겨서 colony의 모양, 가용성 색소의 생성유무, spore의 형성유무 및 형태 등을 관찰하여 각기 다르다고 판단되는 균주만을 선별하였다.

위와 같이 선별한 방선균을 fermentation medium, MCLM-1, MCLM-2 배지 10ml에 접종하여 28-30 $^{\circ}$ C에서 6일간 220-250rpm에서 진탕배양하여 방선균의 배양액을 얻고, 배양액 5ml를 취하여 동결건조한 후 CH_2Cl_2 과 MeOH 1:1의 혼합용매로 추출하고, 500 μ l로 농축하여 이를 시료로 하였다.

3. 생약시료의 제조

1차년도에서 reverse transcriptase에 저해활성을 보였던 생약중 대다수의 활성 성분으로 추정되는 58종의 polyphenol화합물을 20mg/ml의 농도가 되도록 DMSO에 녹이고, 최종농도가 80 μ g/ml이 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다.

4. Reverse transcriptase inhibition assay

방선균의 배양액과 생약 성분들에 대하여 AMV(avian myeloblastosis virus)의 reverse transcriptase를 이용하여 각 화합물의 inhibition정도를 측정하였으며, template - primer로는 poly(rA)-oligo(dT)를 사용하였다.

본 실험에서는 assay solution의 조성을 Nakamura등이 기존에 쓰고 있던 방법을 Promega사의 standard assay condition을 참고로 하여 최종농도를 50mM Tris-HCl(pH8.3), 6mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 40mM KCl, 0.1mM TTP, 5.0μg/ml poly(rA), 0.02U/ml oligo(dT)₁₂₋₁₈, 5uCi/ml [³H]-TTP, 0.1mg/ml BSA, 3U/ml reverse transcriptase로 변경하여 사용하였다. 여기에서 RTase 1U는 standard assay condition에서 37°C로 10분간 두었을 때 1mM의 dTTP가 acid insoluble form으로 혼입되도록 하는 enzyme의 양으로 하였다.

매 실험의 적부를 판정하기 위하여 RTase inhibition assay의 지표물질로 사용한 2',3'-dideoxy thymidine 5'-triphosphate의 농도별 저해활성은 Table 2와 같으며, 이 중에서 1.0μg/ml의 농도를 control로 하여 60±5%의 저해활성을 보였을 때 반응이 적절한 것으로 판정하였다.

Table 2. Inhibitory activity of reverse transcriptase by ddTTP.

Sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	CPM		Average	% inhibition
		#1	#2		
Negative control		277.0	247.0	262.0	
Positive control	DDW	7734.0	8621.0	8177.5	
ddTTP	5	1189.0	1004.0	1096.5	89.5
	2.5	791.0	871.0	831.0	92.8
	1.25	1980.0	2171.0	2075.5	77.1
	1.00	3424.0	3195.0	3309.5	61.5
	0.625	4592.0	4214.0	4403.0	47.7
	0.3125	6408.0	6605.0	6506.5	21.1

Reverse transcriptase에 높은 저해활성을 보인 화합물들에 대하여는 4단계로 단계별 희석하여 각 성분에 대한 IC_{50} 를 측정하였다. 실험에 사용한 reaction buffer와 enzyme solution의 조성 및 실험방법은 다음과 같다.

1) Reaction buffer

Content	Volume(40)	final conc. (in 1X PM)
1.0M Tris-HCl(pH8.3)	100	50 mM
0.3M MgCl ₂	40	6 mM
1.0M Dithiothreitol	2	1 mM
1.0M KCl	80	40 mM
10mM TTP	20	0.1 mM
0.5mg/ml poly(rA)	20	5.0 μg/ml
1.0U/ml oligo(dT) ₁₂₋₁₈	40	0.02 U/ml
[³ H] TTP (1mCi/ml)	12.5	5 uCi/ml
0.5mg/ml BSA	4	0.1 mg/ml
H ₂ O	181.5	
Total	500 μl	4X no enzyme reaction mixture

2) Enzyme solution

Reverse transcriptase	0.75	3 U/ml
Dilution buffer	29.25	
H ₂ O	470	
	500 μl	4X reaction mixture (Sample + Positive)

3) 실험방법

시액 25 μ l에 enzyme solution 12.5 μ l와 reaction buffer 12.5 μ l를 가하여 균일하게 혼합한 후 Fig.2에서와 같이 37°C에서 60분간 incubation하였다. Ice bath에서 반응을 중지시키고 50 μ l의 reaction mixture중 40 μ l씩을 취하여 지름 2.4cm의 DEAE-filter paper에 흡착시켰다. Filter paper는 30분 동안 5% NaHPO₄.12H₂O 용액으로 세 번 씻고, 이어서 물로 두 번, EtOH로 한 번 세척한 다음 완전히 건조하여 남아있는 radioactivity를 xylene-based scintillation cocktail에 넣어 LSC로 측정하였다. Positive control로는 0.08% DMSO 용액과 증류수를 사용하였고, negative control은 증류수 37.5 μ l에 reaction buffer 12.5 μ l만 가하여 다른 시액들과 똑같은 조작을 거쳤다. 반응의 적정도를 확인하기 위하여 이미 RT inhibitor로 알려진 2',3'-dideoxythymidine-5'-triphosphate를 지표물질로 이용하였으며, 저해활성은 아래와 같이 inhibition percentage로 계산했다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{CPM} / \text{PC} - \text{CPM} / \text{SAMPLE}}{\text{CPM} / \text{PC} - \text{CPM} / \text{NC}} \times 100$$

Reaction mixture

- ↓ covered with parafilm.
- ↓ incubated at 37°C for 60 min.
- ↓ reaction is terminated by placing in ice-cold water bath

40μl aliquot

- ↓ soaked into 2.4cm round piece of DEAE-filter paper.
- ↓ washed 3 times with 5% Na₂HPO₄.12H₂O with intermittent shaking
for ca. 30 min.
- ↓ rinsed twice with distilled water and finally with ethanol.
- ↓ air-dried until complete dryness.

DEAE-filter paper

- ↓ transferred into scintillation vial.
- ↓ fed with 10ml xylene-based scintillation cocktail.
- ↓ counted radioactivity

CPM/NC, PC or SAMPLE

Fig. 1. Procedure of reverse transcriptase inhibition assay

5. Syncytia forming assay

미생물 배양액에서 reverse transcriptase에 저해활성을 보인 분획과, polyphenol 화합물 중 reverse transcriptase에 강한 저해활성을 보인 ellagitannin류 화합물에 대하여 AIDS 치료제로의 가능성을 test하기 위해 포항공대와의 협력으로 *in vitro*에서 syncytia forming assay를 실시하였다. Assay에 사용한 virus는 HIV의 *nef* gene을 CAT(chloramphenicol acetyl transferase)으로 바꾼 SVCAT를 이용하였고, cell은 syncytia를 잘 형성하는 SubT1을 사용하였다. 각각의 시료는 농도별로 희석하여 virus와 cell과 함께 4일동안 배양한 후 생성된 syncytia의 수를 대, 소로 나누어 count하였고 control로는 azidothymidine을 사용하였다.

6. 인체유암세포주 MCF-7 cell에 대한 형태변화 유도활성 측정

방선균 배양액과 생약 시료를 3단계로 단계별 희석하여 MCF-7 cell의 형태변화 유도를 관찰하였다. MCF-7 cell은 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂ humidified chamber를 써서 배양하였다. 시료의 활성은 MCF-7 cell을 trypsin으로 처리후 5,000 cells/well로 넣은 다음 24시간후에 시료를 가하고, 다시 48시간 배양 후에 현미경 하에서 형태변화 유도를 관찰하였다.

7. *Streptomyces* sp. AZ01로부터 활성성분의 분리와 정제

Fermentation 배지에서 배양한 300종의 방선균 배양액과 MCLM-1과 MCLM-2에서 배양한 200종의 방선균 배양액에 대해서 reverse transcriptase inhibition assay

를 실시한 결과 35종이 60% 이상의 저지활성을 나타내었으며, 그 중 높은 활성을 나타낸 *Streptomyces* sp. AZ01에 대하여 활성성분의 분리를 행하였다.

Streptomyces sp. AZ01은 28°C에서 1.5l의 fermentor에서 6일동안 4회 배양하였고, 각각의 배양액을 원심분리하여 supernatant와 cell debris로 나눈 다음 활성이 강한 cell debris를 감압 하에서 완전히 농축한 후 20mg/ml의 농도가 되도록 DMSO에 녹여 최종농도는 80µg/ml, 160µg/ml이 되도록 하여 활성을 측정하였다. 이 test solution에 대한 assay를 통해 각 용매분획의 활성여부를 확인하고, 그 중에서 가장 높은 활성을 보인 EtOAc 층에 대해서 silica gel column chromatography와 HPLC 등을 이용하여 활성성분의 분리를 시도하였다..

Cultured Broth of *Streptomyces* sp. AZ01(1.5l×4)

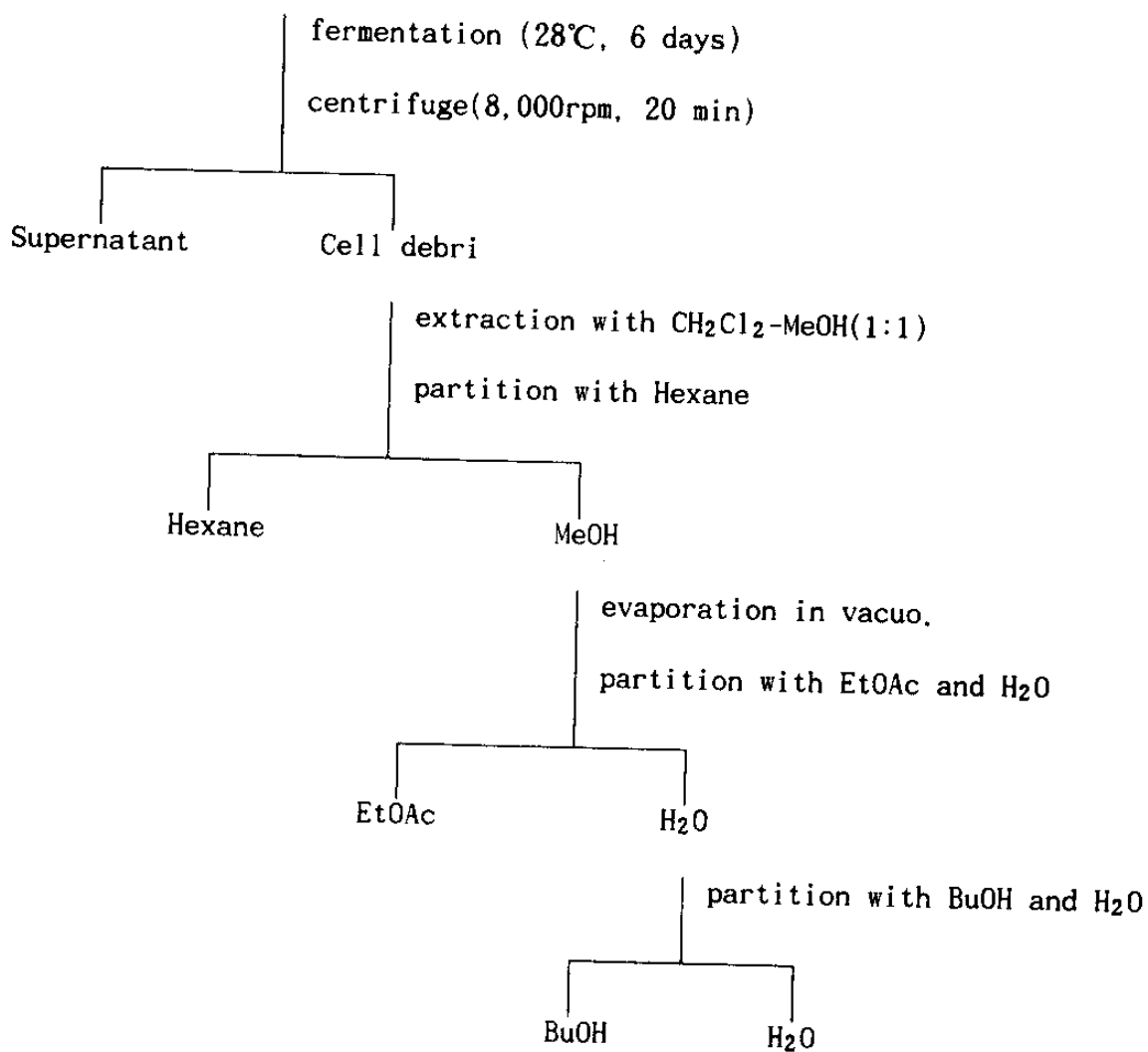


Fig. 2. Fractionation of *Streptomyces* sp. AZ01

제 3 장 결과와 고찰

1. *Streptomyces* sp. AZ01의 활성과 분리정제 및 구조동정

(1) Reverse transcriptase 저해활성

Streptomyces sp. AZ01을 MCLM-1 배지를 이용해서 28°C에서 6일간 배양해서 얻은 6l의 배양액을 8000 rpm에서 원심분리하여 cell debris와 supernatant로 나누는 다음, cell debris를 Fig. 2 와 같이 각종 유기용매 분획으로 나누었다. 각각의 분획에 대하여 최종농도를 160 μ g/ml로 조정하여 RTase 저해활성을 측정한 결과 Hexane Fr., EtOAc Fr., n-BuOH Fr., H₂O Fr.이 각각 44.5%, 57.0%, 24.0%, 4.8%의 저해활성을 나타내었다. 가장 높은 저해활성을 보인 EtOAc Fr.을 MPLC를 이용하여 dichloromethane : methanol = 20:1의 전개용매로 silica gel column chromatography를 행하였다. 계속해서 활성분획을 Delta Pak C10-100Å(7.8mm×30cm) preparative column을 사용하여 90% MeOH의 용매 조건으로 preparative HPLC를 2회 반복하여 순수화합물인 compound I(3mg), compound II(5mg), compound III(2mg)을 얻었다. 이 화합물에 대하여 reverse transcriptase에 대한 저해활성을 측정한 결과를 Table 3 에 나타내었다.

Table 3. Reverse transcriptase inhibitory activity of compound I, II and III.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	comp. I	comp. II	comp. III
400	82.5%	70.6%	9.3%
200	56.9%	58.1%	4.4%
100	33.6%	26.1%	4.2%
50	21.9%	13.8%	5.8%
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	145.9	188.3	-

(2) MCF-7 cell의 형태변화 유도활성

Streptomyces sp. AZ01의 각 분획에 대하여 MCF-7 cell의 형태변화 유도활성을 조사한 결과 Hexane Fr.과 n-BuOH Fr.은 약한 형태변화 유도활성을 나타내었으나 Ethylacetate Fr.은 강한 유도활성을 나타내었다. Silica gel column chromatography 와 preparative HPLC를 통하여 순수분리한 compound I, compound II, compound III의 세 화합물 중 compound II의 경우 2.5ng/ml의 농도에서 시료처리 2시간 후부터 MCF-7 cell의 형태변화를 유도하는 가장 강력한 활성을 보여주었다.

(3) Compound I 의 구조 동정

Compound I 은 UV 261nm에서 흡수극대를 나타냄으로 isoflavonoid의 특징적인 UV 흡수 pattern을 나타내었다. 2M NaOH 수용액을 가했을 때 275nm로 흡수대가 이동하였고, NaOAc를 가했을 때에는 272nm로, 여기에 다시 H₃BO₃를 첨가하니 263nm로 흡수밴드가 이동하였다. NaOAc는 flavonoid의 가장 강한 산성을 띠는 hydroxyl group만을 ionization시켜서 bathochromic shift를 일으키는 것으로 여기에서 compound I이 free 7-OH group을 가지는 것을 확인할 수 있었다. NaOAc/H₃BO₃ spectrum은 ortho-dihydroxy group의 존재를 확인하는 것으로 compound I에서는 거의 이동이 일어나지 않아 ortho-dihydroxy group이 존재하지 않음을 확인할 수 있었다.²²⁾

Table 4. UV spectral maxima of compound I

Compound	λ_{max} (nm) Addition			
	None	NaOH	NaOAc	NaOAc/H ₃ BO ₃
Compound I	261	275	272	263

Fig. 3 의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 8.22에서 1H의 singlet은 isoflavonoid의 H-2의 proton으로, δ 7.55와 δ 7.03의 각각 2H($J=8.4\text{Hz}$)의 doublet은 H-2',6'와 H-3',5'로 추정할 수 있었고, δ 6.49(1H, $J=1.8$) δ 6.37(1H, $J=1.8$)의 doublet은 H-6, H-8의 proton으로 결정할 수 있었다. 23).24)

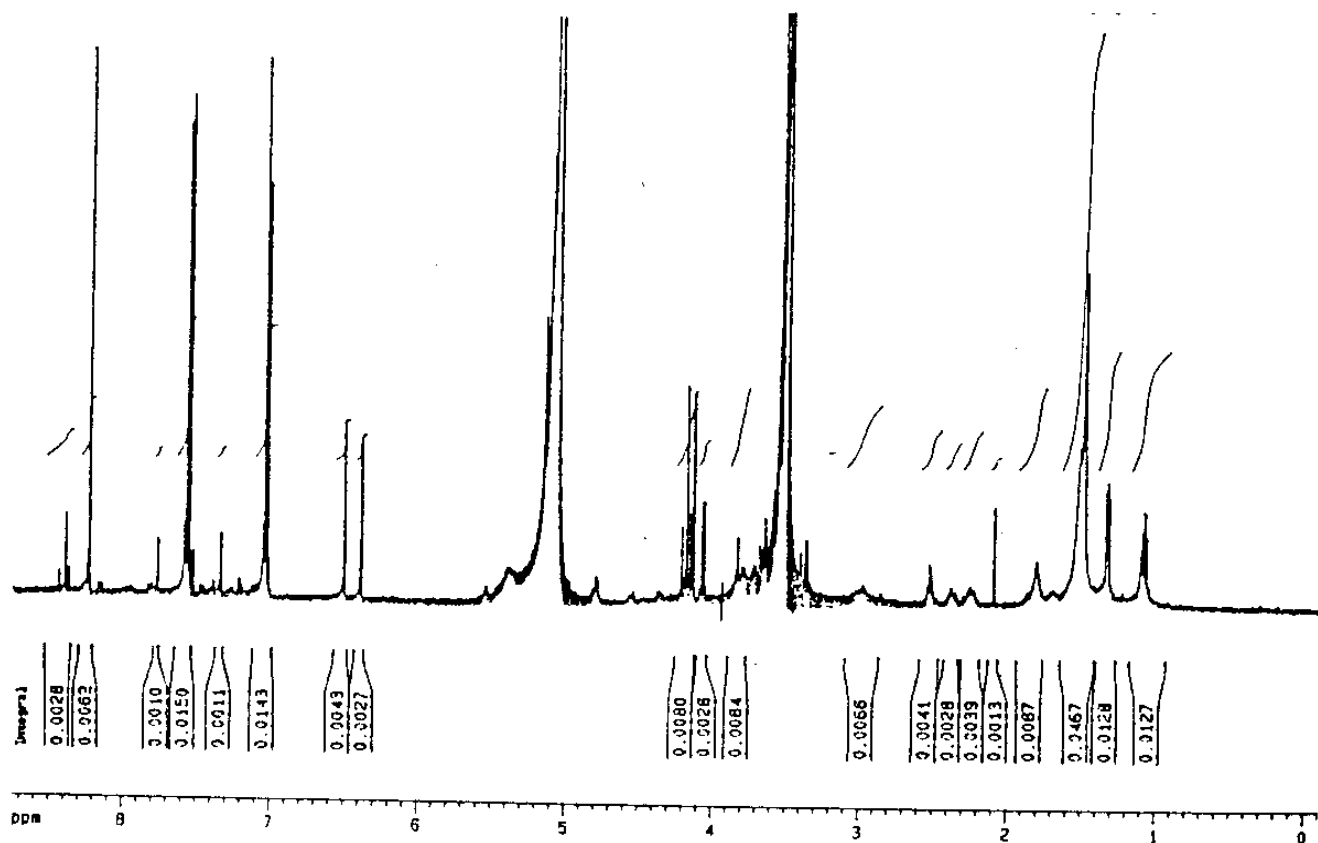


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound I (500MHz, CD_3OD)

Mass spectrum(Fig. 4)에서 m/z 118, 153, 270은 각각 Fig. 4의 fragment a, b, c와 잘 일치하나²⁵⁾ m/z 298의 fragmentation peak가 어디에서 유래했는지 확실하지 않아, 이 화합물은 genistein을 기본골격으로 갖는 genistein의 유도체로 추정하고 계속해서 구조를 동정중에 있다.

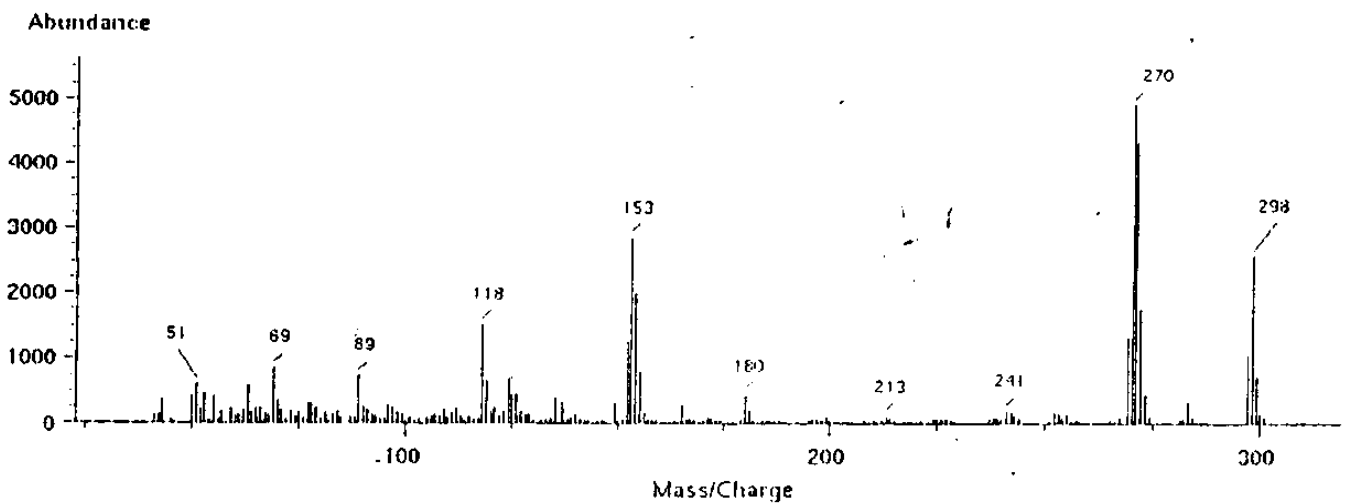
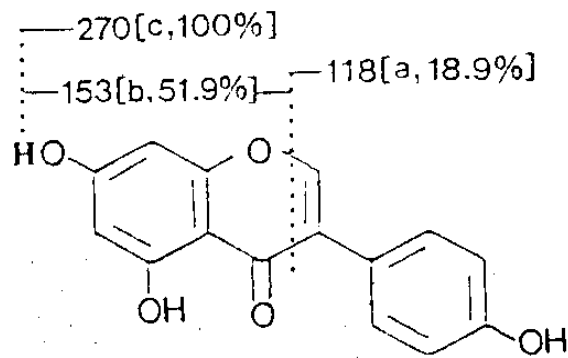


Fig. 4. Mass spectrum of compound I

(4) Compound II 의 구조 동정

Comp. II 는 233, 286, 298(sh)nm에서 UV 흡수를 나타냄으로 4-aminoindole chromophore를 가지고 있음을 알 수 있었으며, ¹H-NMR spectrum을 teleocidin B와 비교하여 볼 때(Table 5) 12번 위치의 proton을 제외하고는 각각의 chemical shift가 거의 동일함을 알 수 있었다.

Comp. II의 Mass spectrum(Fig. 5)에서도 m/z 451을 비롯하여 m/z 408, 365, 321 등의 전형적인 teleocidin B에 해당하는 fragmentation을 보이므로 comp. II는 teleocidin B로 동정하였다. (26). 27). 28)

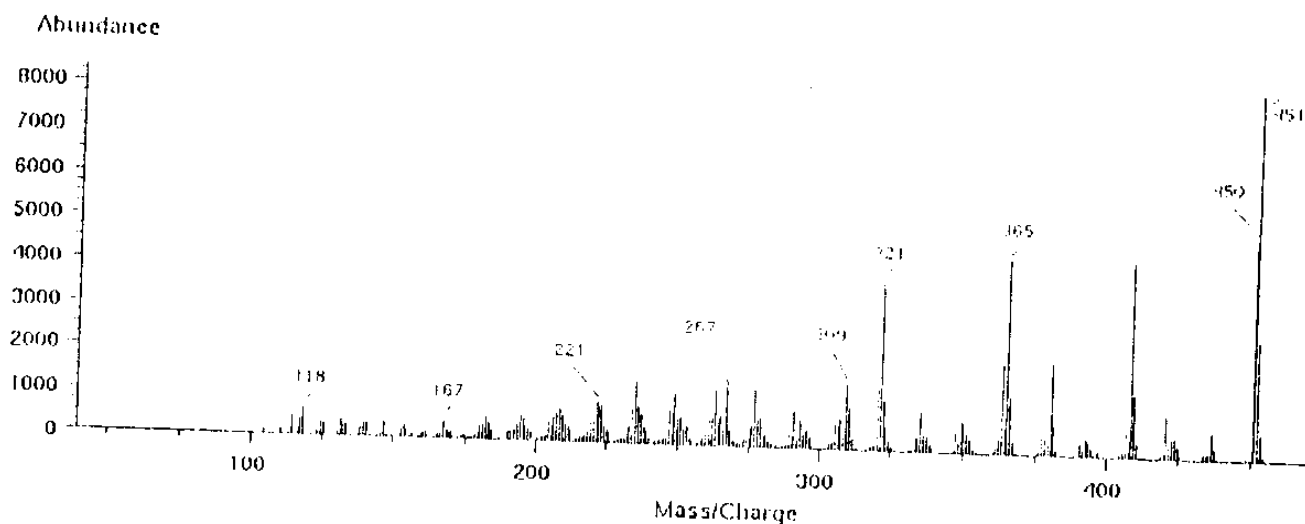
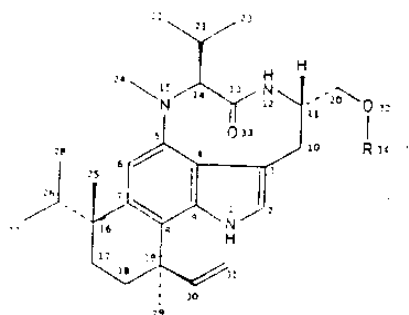


Fig. 5. Mass spectrum of compound II



R = H : Teleocidin B

R = Me : Olivoretin A

Fig. 6. Structure of teleocidin B and olivoretin A

Table 5. Comparison of ¹H-NMR chemical shifts for comp. II and teleocidin B

No.	compound II	teleocidin B
1	8.67 (1H, br s)	8.67 (1H, br s)
2	6.76 (1H, br s)	6.78 (1H, br s)
6	6.50 (1H, s)	6.50 (1H, s)
10a	3.13 (1H, br d, J=17.2)	3.10 (1H, br d, J=16.9Hz)
10b	2.91 (1H, dd, J=17.2, 3.7)	3.02 (1H, dd, J=16.9, 3.4Hz)
11	-	4.34 (1H, m)
12	6.37 (1H, br s)	7.70 (1H, br s)
14	4.29 (1H, d, J=10.2)	4.32 (1H, d, J=10.2Hz)
20a	3.70 (1H, dd, J=11.0, 4.1)	3.71 (1H, dd, J=12.1, 3.4Hz)
20b	3.48 (1H, dd, J=11.8, 7.5)	3.55 (1H, dd, J=12.1, 7.9Hz)
21	2.61 (1H, d septet, J=10.2, 6.5)	2.60 (1H, d septet, J=10.2, 6.4)
22	0.90 (3H, d)	0.91 (3H, d, J=6.4Hz)
23	0.67 (3H, d)	0.69 (3H, d, J=6.8Hz)
24	2.90 (3H, s)	2.90 (3H, s)
25	1.33 (3H, s)	1.35 (3H, s)
26	2.23 (1H, septet, J=6.8)	2.25 (1H, septet, J=6.8Hz)
27	0.52 (3H, d, J=6.7)	0.53 (3H, d, J=6.8Hz)
28	1.00 (3H, d)	1.01 (3H, d, J=6.8Hz)
29	1.50 (3H, s)	1.51 (3H, s)
30	6.14 (1H, dd, J=17.7, 10.6)	6.16 (1H, dd, J=17.5, 10.6Hz)
31a	5.40 (1H, dd, J=17.7, 1.2)	5.40 (1H, d, J=17.5Hz)
31b	5.23 (1H, dd, J=10.6, 1.2)	5.24 (1H, d, J=10.6Hz)

(Compound II: 500MHz, teleocidin B: 270MHz)

(5) Compound III 의 구조 동정

Comp. III 은 233, 286, 298(sh)nm에서 UV 흡수를 나타냄으로 comp. II 와 같이 4-aminoindole chromophore를 가지고 있음을 알 수 있었으며 ¹H-NMR spectrum을 olivoretin A와 비교하여 볼 때(Table 6) 각각의 chemical shift가 거의 동일함을 알 수 있었다.

Mass spectrum(Fig.7)에서는 olivoretin A에 해당되는 m/z 465의 base peak를 비롯하여 m/z 422, 379, 321등의 olivoretin A에 해당하는 fragmentation pattern을 보이므로 comp. III 은 olivoretin A로 동정하였다.

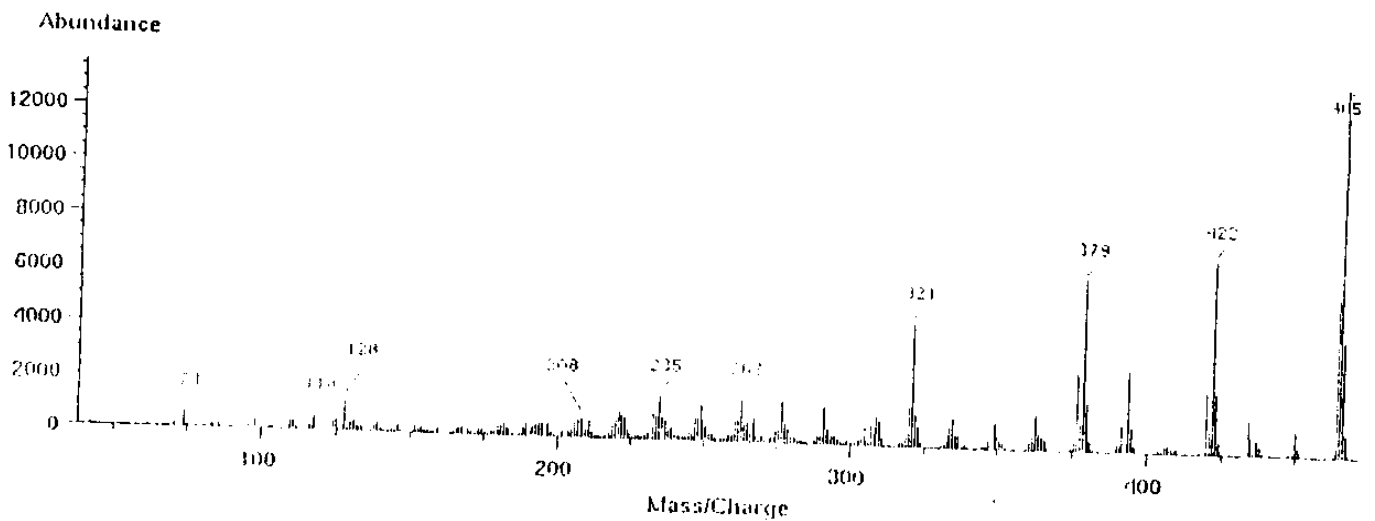


Fig. 7. Mass spectrum of compound III

Table 6. Comparison of ¹H-NMR chemical shifts for comp. III and olivoretin A

No.	compound III	olivoretin A
1	8.61 (1H, br s)	8.80 (1H, br s)
2	6.75 (1H, triplet)	6.76 (1H, m)
6	6.50 (1H, s)	6.51 (1H, s)
10a	3.13 (1H, br d, J=16.9)	3.14 (1H, br d, J=17.4Hz)
10b	2.86 (1H, dd, J=17.4, 3.8)	2.87 (1H, dd, J=17.4, 3.6)
11	4.39 (1H, m)	4.41 (1H, m)
12	6.11 (1H, br s)	6.12 (1H, br s)
14	4.27 (1H, d, J=10.2)	4.28 (1H, d, J=10.2Hz)
20	3.35 - 3.27 (2H, m)	3.38 - 3.28 (2H, m)
21	2.61 (1H, d septet, J=10.2, 6.6)	2.63 (1H, m, J=10.2, 6.6Hz)
22	0.90 (3H, d, J=6.4)	0.91 (3H, d, J=6.6)
23	0.67 (3H, d, J=6.8)	0.68 (3H, d, J=6.6)
24	2.90 (3H, s)	2.91 (3H, s)
25	1.34 (3H, s)	1.35 (3H, s)
26	2.24 (1H, septet, J=6.7)	2.25 (1H, septet, J=6.7Hz)
27	0.52 (3H, d, J=6.7)	0.54 (3H, d, J=6.7Hz)
28	1.00 (3H, d, J=6.7)	1.01 (3H, d, J=6.7Hz)
29	1.50 (3H, s)	1.51 (3H, s)
30	6.16 (1H, dd, J=17.7, 10.6)	6.17 (1H, dd, J=17.8, 10.6)
31a	5.40 (1H, dd, J=17.7, 1.2)	5.41 (1H, dd, J=17.8, 1.2)
31b	5.23 (1H, dd, J=10.6, 1.2)	5.24 (1H, dd, J=10.6, 1.2)
34	3.29 (3H)	3.30 (3H, s)

(Compound III: 500MHz, olivoretin A: 270MHz)

2. 생약시료의 활성측정

(1) Reverse transcriptase 저해 활성

전년도의 연구결과에 따라 reverse transcriptase에 대하여 높은 활성을 보였던 지유(*Sanguisorba officinalis*), 대황(*Rhei Rhizoma*), 짚신나물(*Agrimonia pilosa*)등의 생리활성성분이 polyphenol 화합물임이 밝혀지고 이러한 화합물들이 최근 host animals의 면역반응을 증진시킴으로 항암효과를 나타내며, HIV virus에 대한 복제저지활성, carcinogens의 돌연변이유발성의 저해, tumor promotion의 저해 등 다양한 생리활성을 나타낸다고 보고됨에 따라 주로 대극과(*Euphorbiaceae*)에서 분리된 polyphenol 화합물을 이용하여 reverse transcriptase 저해활성을 관찰하였다.

실험에 사용한 58종의 polyphenol 화합물 중 80 μ g/ml의 농도에서 60% 이상의 저해활성을 보인 화합물은 36종이었다. 이들 화합물 중 구조적으로 ellagitannin 류에 속하는 화합물이 대체적으로 높은 활성을 보였으며, 이들에 대하여는 다시 최종 농도가 80, 20, 5, 1.25 μ g/ml이 되도록 serial dilution하여 각 화합물의 IC₅₀를 구하였다. (Table 7)

Table 7. Inhibitory effect of polyphenol compounds against AMV reverse transcriptase.

Compound	Concentration($\mu\text{g/ml}$)				IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
	1.25	5	20	80	
Punicafolin	36.4	88.7	91.5	94.2	1.4
Elaeocarpusin	22.1	58.3	91.5	94.4	3.8
Jolkianin	-5.2	17.2	84.7	92.1	13.2
Euphorscopin	23.5	81.6	96.8	95.9	2.4
Helioscopinin A	21.9	66.4	98.7	96.9	3.0
Helioscopinin B	6.3	8.2	34.9	93.9	21.5
Macaranganin	3.4	27.5	81.6	94.9	9.2
Excoecarianin	18.0	78.0	97.8	98.5	2.8
Rugosin E	3.5	34.4	79.1	98.9	8.1
2,5-(S)-HHDP-3,6-anhydromannofuranose	45.7	59.1	88.6	93.3	1.9
1-Desgalloyl eugeniin	24.7	51.7	89.9	91.4	4.0
Eugeniin	7.6	46.1	94.7	96.1	5.4
Casuariin	0.2	19.2	66.7	93.0	13.7
Pedunculagin	29.1	73.4	96.8	94.7	2.4
Carpinusin	0.3	51.9	92.2	94.1	6.2
Acetonilgeraniin	-10.3	8.2	63.1	92.8	16.7
Mallotusin	-3.0	22.9	71.5	93.1	13.4
Ceraniin	-5.8	49.3	93.1	93.8	7.3
Hippomanin A	3.8	25.9	82.0	83.7	10.9
Gemin D		6.5	19.3	88.7	31.7
Tercatain	8.5	78.4	90.6	88.3	4.2
Putranjivaxin A	8.1	38.2	83.3	87.5	8.0

(2) Syncytia forming assay

Polyphenol 화합물의 reverse transcriptase에 대한 높은 저해활성과 HIV에 대한 직접적인 활성과의 연관성을 조사하기 위하여 각 화합물의 세포독성을 조사하고 syncytia forming assay를 실시한 결과 elaeocarpusin, gemin D, euphorscopin, jolkianin, p-methoxycinnamic acid 등이 2.5 μ g/ml의 농도에서, geraniin외 7종의 화합물이 5 μ g/ml의 농도에서 syncytia의 형성을 저해하였으나 거의 동일한 농도에서 subT1 cell에 대한 세포독성을 보였다.

(3) 인체유암세포주 MCF-7 cell에 대한 형태변화 유도활성

Polyphenol 화합물을 최종농도가 50 μ g/ml, 5 μ g/ml, 0.5 μ g/ml이 되도록 희석하여 인체유암세포주에 대한 형태변화 유도를 관찰한 결과 excoecarianin과 euphorscopin이 50 μ g/ml의 농도에서 MCF-7 cell의 형태변화를 유도하였다.

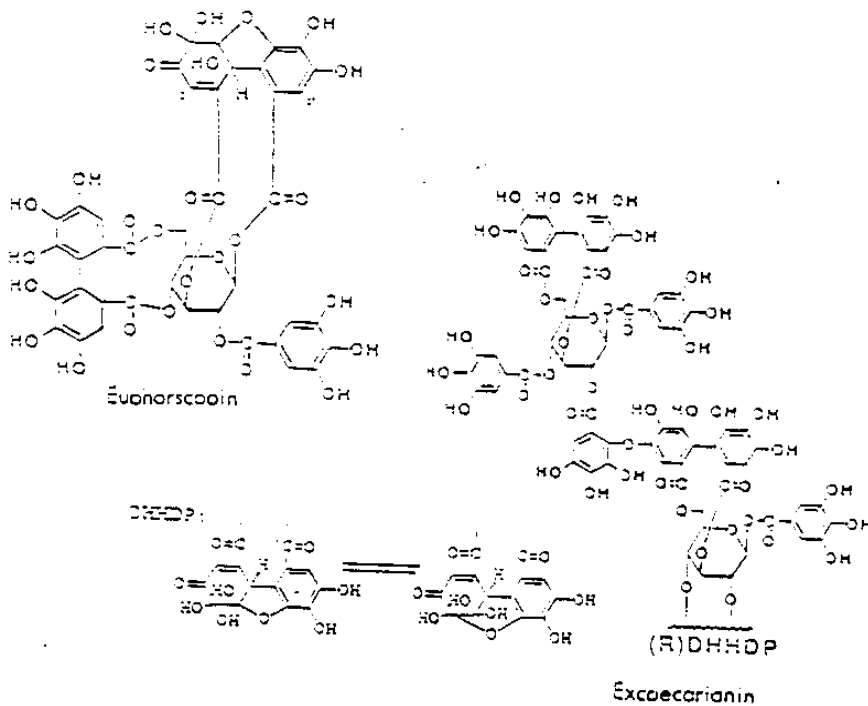


Fig. 8. Structure of euphorscopin and excoecarianin

제 4 장 결론 및 건의사항

Retrovirus의 증식에 필수적인 역전사 효소(reverse transcriptase)를 저해하는 물질을 screening하기 위해 AMV의 역전사 효소에 대한 토양 미생물 배양액 및 생약 추출물의 효소활성 저해효과를 측정하고, 그 중에서 높은 활성을 나타낸 *Streptomyces* sp. AZ01에 대하여 활성성분의 분리를 시도하였다.

Streptomyces sp. AZ01의 활성성분은 용매분획에서 EtOAc층으로 가장 많이 이행되므로 EtOAc층에 대한 silica gel column chromatography와 HPLC등을 이용한 분리법을 통하여 compound I, II, III을 각각 분리하였다. Compound I, II, III에 대한 구조 동정의 결과 compound I이 genistein 유도체, compound II가 teleocidin B, compound III가 olivoretin A로 확인되었다. 이들 화합물의 RTase에 대한 활성은 compound I이 145.9 μ g/ml, compound II가 188.3 μ g/ml의 IC₅₀값을 보임으로써 예상보다는 비교적 낮은 활성을 나타내었다.

또 이들 화합물의 MCF-7 cell에 대한 형태변화유도 활성을 측정한 결과 compound II는 2.5ng/ml의 농도에서 활성을 나타내었고, compound III 역시 강력한 형태변화 유도활성을 보여주었다. 최근 retrovirus유래의 oncogene이 세포의 증식 및 조절기구와 밀접한 관련이 있다는 것이 밝혀졌고, 이러한 oncogene으로 transformed된 세포형태를 정상으로 복귀시키는 화합물의 screening으로 몇몇 신규 화합물이 검색되었다. 비록 본 실험에서 분리한 compound II와 III이 각각 teleocidin B와 olivoretin A로 밝혀졌으나, 이러한 접근 방법을 발전시켜서 현재 retrovirus유래의 oncogene ras와 fos로 변형된 세포를 본 실험실에서 확보하여 계속 스크리닝함으로써 세포의 증식 및 분화에 관여하는 화합물의 검색도 가능하리라고 본다.

1차년도에서 reverse transcriptase에 저해활성을 보였던 생약중 대다수의 활

성성분으로 추정되는 58종의 polyphenol 화합물들의 RT저해활성을 검토한 결과 80 μ g/ml의 농도에서 60% 이상의 저해활성을 보인 화합물은 36종이었다. 이들 화합물 중 구조적으로 ellagitannin류에 속하는 화합물이 대체적으로 높은 활성을 보였으며, 이들에 대하여는 다시 IC₅₀를 구한 결과 punicafolin은 1.4 μ g/ml, euphorscopin과 pedunculagin은 2.4 μ g/ml, excoecarianin은 2.8 μ g/ml등의 높은 RT저해활성을 나타내었다. 또한 polyphenol화합물의 인체유암세포주 MCF-7 cell에 대한 형태변화 유도를 관찰한 결과 excoecarianin과 euphorscopin이 50 μ g/ml의 농도에서 MCF-7 cell의 형태변화를 유도하였다.

본 연구에서는 새롭게 확립한 reverse transcriptase inhibition assay를 통하여 실험상의 오차를 최소한으로 줄여 활성을 측정할 수 있었으며, 현재까지는 AMV의 reverse transcriptase를 이용하였으나, 최근 HIV의 reverse transcriptase gene을 확보하였으므로 이를 *E.coli*에서 발현시켜 다량의 HIV 유래의 reverse transcriptase를 분리하여 실험에 사용하면 AIDS의 치료제 개발에 좀더 가까이 접근할 수 있을 것이다.

한편 HIV의 p160 gag-pol의 전구단백질을 가수분해하는데 관여하는 바이러스 특유의 protease가 알려져 있으며, 이러한 protease를 이용하여 저해제를 검색하는 assay method도 확립되어 있어, RTase의 저해활성과 병행함으로써 AIDS치료제의 개발가능성을 높일 수 있다.

효소를 이용한 저해제의 검색은 최종적으로는 virus에 대한 직접적인 활성이 검색되어야 한다. 국내의 연구진에 의해서도 HIV virus의 배양이 계속되고 있고 HIV의 nef gene을 CAT(chloramphenicol acetyl transferase)으로 치환한 SVCAT cell을 이용하여 *in vitro*에서 virus에 대한 직접적인 활성을 검색하는 syncytia forming assay방법등이 확립되어 있으므로 앞으로 이 분야의 지속적인 연구가 진행된다면 국내에서 국제경쟁력을 갖춘 신규화합물의 개발도 가능하리라고 생각되어 지속적인 지원이 요청된다.

참 고 문 헌

- 1) Gallo, R.C., and H.Z. Streicher: In "AIDS, modern concepts and therapeutic challenges" ed by Border S., Marcel Dekker, New York and Basel (1986)
- 2) Gallo, R.C., S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.F. Palker, R. Rdefield, J. Oleske, B. Safal, G. White, P. Foster and P.D. Markham: *Science*, **224**, 500 (1984)
- 3) Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Danquet, C. Axler-Blin, F. Brunvezinet, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier: *Science*, **220**, 868 (1983)
- 4) Mitsuya H. and S. Broder : *Nature*, **325**, 773 (1987)
- 5) Karpas, A., G.W.J. Fleet, R.A. Dwek, S. Petursson, S.K. Namgoong, N.G. Ramsden, G.S. Jacob and T.W. Rademacher : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 9229 (1988)
- 6) Nakashima, H., Y. Kido, N. Kobayashi, Y. Motoki, M. Neushul and N. Yamamoto : *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **31**, 1524 (1987)
- 7) Mcquade, T.J., A.G. Tomasselli, L. Liu, V. Karacostas, B. Moss, T.K. Sawyer, R.L. Heinrikson, W.G. Tarpley : *Science*, **247**, 454 (1990)
- 8) Pauwels, R., K. Andries, J. Desmyter, D. Schols, M.J. Kukla, H.J. Breslin, A. Raeymaeckers, J.V. Gelder, R. Woestenborghs, J. Heykants, K. Schellekens, M.A.C. Janssen, E.D. Clercq and P.A.J. Janssen : *Nature*, **343**, 470 (1990)
- 9) Numata M., K. Nitta, R. Utahara, K. Maeda and H. Umezawa : *J. Antibiotics*, **28**, 757 (1975)
- 10) Nishio, M., A. Kuroda, M. Suzuki, K. Ishimaru, S. Nakamura and R. Nomi:

- J. Antibiotics*, **36**, 761 (1983)
- 11) Hanajima, S., K. Ishimaru, K. -I. Sakano, S.K. Roy, Y. Inouye and S. Nakamura ;
J. Antibiotics, **38**, 803 (1985)
- 12) Tanaka N., T. Okabe, N. Tanaka, Y. Take, Y. Inouye, S. Nakamura, H. Nakashima
and N. Yamamoto ; *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **77**, 324 (1986)
- 13) Hoshino, N., N. Shimizu, N. Shimada, T. Takita and T. Takeuchi ;
J. Antibiotics, **40**, 1077 (1987)
- 14) Sethi M.L: *J. Pharm. Sci.*, **72**, 538 (1983)
- 15) Sethi M.L: *J. Pharm. Sci.*, **74**, 889 (1985)
- 16) Sethi M.L : *Phytochemistry*, **24**, 447 (1985)
- 17) Kakiuchi, N., M. Hattori, T. Namba, M. Nishizawa, T. Yamagishi and T. Okuda ;
J. Nat. Prod., **48**, 614 (1985)
- 18) Inouye, Y., K. Yamaguchi, Y. Take and S. Nakamura ; *J. Antibiotics*, **42**, 1523
(1989)
- 19) Shen, Y. -L., W. -C. Ye, S. -X. Zhao, Y. -Z. Shu, M. Wataya, N. Kakiuchi,
M. Hattori, K. Matsuura and T. Namba; *Shoyakugaku Zasshi*, **42**, 35 (1988)
- 20) Nakashima, H., Y. Kido, N. Kobayashi, M. Neushul and N. Yamamoto ; *J. Cancer
Res. Clin. Oncol.*, **113**, 413 (1987)
- 21) Nakashima, H., Y. Kido, N. Kobayashi, Y. Motoki, M. Neushul and N. Yamamoto ;
Antimicrob. Agents and Chemother., **31**, 1524 (1987)
- 22) Ohta, N., G. Kuwata, H. Akahori and T. Watanabe ; *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 469
(1980)
- 23) Ohta, N., G. Kuwata, H. Akahori and T. Watanabe ; *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1415
(1979)

- 24) Tetsuo Hamamoto, S Gunji and T.Beppu : *J.Antibiotics*, **36**, 639 (1983)
- 25) Hazato,T., H.Naganawa, M.Kumagai, T.Aoyagi and H.Umezawa: *J.Antibiotics*,
32, 217 (1979)
- 26) 小清水弘一: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **64**, 1221 (1990)
- 27) Sakai,S., N.Aimi, K.Yamaguchi, Y.Hitotsuyanagi, C.Watanabe, K.Yokose,
Y.Koyama, K.Shudo and A.Itai: *Chem.Pharm.Bull.*, **32**, 354 (1984)
- 28) Hitotsuyanage,Y., H.Fujiki, M.Suganuma, N.Aimi, S.Sakai, Y.Endo, K.Shudo
and T.Sugimura: *Chem.Pharm.Bull.*, **32**, 4233 (1984)

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학 기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외 적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.