

극지생물 유래 생리활성 이차대사물질 발굴연구

Discovery of bioactive secondary metabolites from Antarctic
and Arctic organisms



원광대학교 산학협력단

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지적응 고유생물 유래 대사체의 상용화 구축사업” 과제의 위탁연구 “극지 생물 유래 생리활성 이차대사물질 발굴연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 01. 28.

총괄연구책임자 : 임 정 한

위탁연구기관명 : 원광대학교
산학협력단

위탁연구책임자 : 오 현 철

참 여 연 구 원 : 김 관 우

“ : 김 혜 진

“ : 박 진 수

“ : 윤 치 수

“ : 김 동 철

“ : 고 원 민

“ : 트란홍광

요 약 문

I. 제 목

- 극지생물 유래 생리활성 이차대사물질 발굴연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 필요성

- 천연물은 다양한 구조 및 생리활성을 풍부하게 지니고 있는 자원으로 인식되고 있지만, 극지환경에 서식하는 생물종은 생리활성 물질탐색의 대상으로서 많은 연구가 이루어지지 않은 미지의 생물자원이다.
- 또한 극지생태계는 극한 환경 조건에 적응 및 지속적인 생명활동이 유지 된 것으로 그 특성상 현재까지 발굴된 이차대사물질과는 상이한 화학구조 및 생리 활성을 가지는 이차 대사물질이 발굴될 가능성이 매우 높아 분자구조의 다양성을 구축할 수 있다.

2. 목표

- 극지 고유 생물자원 유래의 이차대사물질 추출물을 대상으로 성분 및 활성 추적법을 적용하여 항염, 항당뇨등의 생리활성을 보유한 순수 이차대사물질을 발굴하여 극지 고유생물 대사체를 규명한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

연구개발 목표	극지고유생물자원으로부터 항염/항당뇨 생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴	
성과목표	세부 연구개발 내용	연구범위
(1차년도) 극지고유생물 자원으로부터 항염 생리활성을 지닌 이차대사물질 을 발굴	○ 극지생물을 대상으로 methanol을 이용 저분자 추출물 시료 추출 및 농축	15 종 추출
	○ 활성 추적 법을 이용한 생리활성 물질의 분리	5 종 분리
	○ 각종 크로마토그래피 기법을 적용	
	○ 분리된 이차대사물질에 대한 분광학적 자료검토를 통한 구조규명	3 종 분석
	○ 항염/PTP1B 생리활성 검색법 운용	1 종 검토
	○ 분자 수준에서의 활성 기전 연구	
(2차년도) 극지고유생물 자원으로부터 항염 생리활성을 지닌 이차대사물질 을 발굴	○ 극지생물을 대상으로 methanol을 이용 저분자 추출물 시료 추출 및 농축	10 종 추출
	○ 활성 추적 법을 이용한 생리활성 물질의 분리	5 종 분리
	○ 각종 크로마토그래피 기법을 적용	
	○ 분리된 이차대사물질에 대한 분광학적 자료검토를 통한 구조규명	6 종 분석
	○ 항염/PTP1B 생리활성 검색법 운용	2 종 검토
	○ 분자 수준에서의 활성 기전 연구	
(3차년도) 극지고유생물 자원으로부터 항염 생리활성을 지닌 이차대사물질 을 발굴	○ 극지생물을 대상으로 methanol을 이용 저분자 추출물 시료 추출 및 농축	10 종 추출
	○ 활성 추적 법을 이용한 생리활성 물질의 분리	5 종 분리
	○ 각종 크로마토그래피 기법을 적용	
	○ 분리된 이차대사물질에 대한 분광학적 자료검토를 통한 구조규명	6 종 분석
	○ 항염/PTP1B 생리활성 검색법 운용	2 종 검토
	○ 분자 수준에서의 활성 기전 연구	

IV. 연구개발결과

성과목표	연구 내용	연구범위
(1차년도) 극지고 유생물 자원으 로부터 항염 생리활 성을 지닌 이차대 사물질 을 발굴	○극지생물 유래 추출물 의 제조	- 극지생물 유래 진균 SF6291 균주의 배양 추출물 682 mg 외 14종의 균주배양 추출물 확보
	○생리활성 대사체의 분 리	- 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 10종의 대사체 분리
	○활성 대사체의 구조 분석	- 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 Curvularin 외 8종의 대사체 구조분석 완료
	○활성 대사체의 활성 기작 검토	- 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 항염증 활성 확인
(2차년도) 극지고 유생물 자원으 로부터 항염 생리활 성을 지닌 이차대 사물질 을 발굴	○극지생물 유래 추출물 의 제조	- 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물 175 mg 외 14종의 균주배양 추출물 확보
	○생리활성 대사체의 분 리	- 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 8종의 대사체 분리
	○활성 대사체의 구조 분석	- 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 Pyranonigirin A 외 7종의 대사체 구조분석 완 료
	○활성 대사체의 활성 기작 검토	- 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체 에 대한 항염증 활성 확인 - 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체 에 대한 PTP1B 효소 억제 활성 확인
(3차년도) 극지고 유생물 자원으 로부터 항염 생리활 성을 지닌 이차대 사물질 을 발굴	○극지생물 유래 추출물 의 제조	- 극지생물 유래 진균 SF7160 균주의 배양 추출물 100.7 mg 외 9종의 균주배양 추출물 확보
	○생리활성 대사체의 분 리	- 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물로부터 4종의 대사체 분리 - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 5종의 대사체 분리
	○활성 대사체의 구조 분석	- 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물로부터 [(3S, 8R)-8- Hydroxyhexylitaconic acid] 외 3종의 대사체 구조분석 완료 - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 neuchromenin 외 4종의 대사체 구조분석 완료
	○활성 대사체의 활성 기작 검토	- 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체 에 대한 항염증 활성 확인 - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 PTP1B 효소 억제 활성 확인

V. 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구에서 확인된 항염 및 PTP1B 저해화합물들은 물질특허 획득이 가능하며 향후 추가적인 활성 확인을 통하여 기능성소재나 기타 의약품으로의 개발 가능성을 타진해 볼 수 있다.
- 또한 만약 단일 물질로서 의약품으로 개발 등이 불가능해도 chemical probe로서 다양한 생명과학의 분야에서 고가의 연구용 소재로서 상업적으로 개발해도 전망이 밝다고 사료된다.
- 따라서 향후에 후속 연구로서 본 연구에서 사용된 소재로부터 물질을 대량 확보 하고 이를 활용하여 세포 및 실험동물수준에서 관련 활성을 검증 등의 추가 연구가 필요하다고 사료된다.



SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Discovery of bioactive secondary metabolites from Antarctic and Arctic organisms

II. Purpose and Necessity of R&D

1. Needs

Polar organisms are unknown biological resources, that are not well investigated as sources of bioactive substances. These materials have characteristic for adapting and progressing to extreme environment. Thus, it is possible that these organisms would have unique chemical structures and biological effects different from secondary metabolites discovered up to now from conventional natural resources. Therefore, it is necessary to investigate chemistry and biology of secondary metabolites from polar organisms as new sources of novel chemical structures that can be further developed into new drugs.

2. Aims

Isolation of various biologically active secondary metabolites from relatively untapped natural sources of polar area through bioassay-guided fractionation and investigation.

III. Contents and Extent of R&D

Objective	Isolation and determination of mechanism of anti-inflammatory/anti-diabetic bioactive secondary metabolites from polar organisms
-----------	--

Detail objective	Detail contents	Research range
(1 st year) Isolation and determination of mechanism of anti-inflammatory /anti-diabetic bioactive secondary metabolites from polar marine organism	○ Manufacturing extract from polar marine microorganisms in Methanol	15 extracts
	○ Retaining useful extract from activity-guided screening polar marine microorganisms in methanol	5 metabolites
	○ Application of various chromatography	
	○ Determination of chemical structure of isolated secondary metabolites based on spectroscopic data	3 analysis
	○ Isolation of bioactive substances using activity-guided screening	1 evaluation
(2 nd year) Isolation and determination of mechanism of anti-inflammatory /anti-diabetic bioactive secondary metabolites from polar marine organism	○ Manufacturing extract from polar marine microorganisms in Methanol	10 extracts
	○ Retaining useful extract from activity-guided screening polar marine microorganisms in methanol	5 metabolites
	○ Application of various chromatography	
	○ Determination of chemical structure of isolated secondary metabolites based on spectroscopic data	6 analysis
	○ Isolation of bioactive substances using activity-guided screening	2 evaluation
(3 rd year) Isolation and determination of mechanism of anti-inflammatory /anti-diabetic bioactive secondary metabolites from polar marine organism	○ Manufacturing extract from polar marine microorganisms in Methanol	10 extracts
	○ Retaining useful extract from activity-guided screening polar marine microorganisms in methanol	5 metabolites
	○ Application of various chromatography	
	○ Determination of chemical structure of isolated secondary metabolites based on spectroscopic data	6 analysis
	○ Isolation of bioactive substances using activity-guided screening	2 evaluation

IV. R&D Results

Result objective	Detail objective	Results
(1 st year) Isolation and determination of mechanism of anti-inflammatory/anti-diabetic bioactive secondary metabolites from polar marine organism	Manufacturing extract from polar microorganisms	- 14 methanol extracts from SF6291 are manufactured.
	Isolation of bioactive metabolome	- 10 active metabolites were isolated from extract of SF6155
	Examination of chemical structure of metabolome	- Determination of chemical structure is completed about 8 metabolites
	Examination of activation mechanism of metabolome	- Determination of anti-inflammatory/anti-diabetic effects from SF5859
(2 nd year) Isolation and determination of mechanism of anti-inflammatory/anti-diabetic bioactive secondary metabolites from polar marine organism	Manufacturing extract from polar microorganisms	- 14 methanol extracts from SF7078 are manufactured.
	Isolation of bioactive metabolome	- 8 active metabolites were isolated from extract of SF5929
	Examination of chemical structure of metabolome	- Determination of chemical structure is completed about 7 metabolites
	Examination of activation mechanism of metabolome	- Determination of anti-inflammatory/anti-diabetic effects from SF5929
(3 rd year) Isolation and determination of mechanism of anti-inflammatory/anti-diabetic bioactive secondary metabolites from polar marine organism	Manufacturing extract from polar microorganisms	- 9 methanol extracts from SF7160 are manufactured.
	Isolation of bioactive metabolome	- 9 active metabolites were isolated from extract of SF7078, SF7123
	Examination of chemical structure of metabolome	- Determination of chemical structure is completed about 7 metabolites
	Examination of activation mechanism of metabolome	- Determination of anti-inflammatory/anti-diabetic effects from SF7123

V. Application Plans of R&D Results

1. Contribute to the bio-active secondary metabolites depository
2. Collection of marine sources of polar ocean database
3. Provide lead compounds for the developments of drugs and/or other functional agents



C O N T E N T S

1. Introduction	13
2. Trends in research	18
3. Research results	21
4. Research achievements and impacts	116
5. Perspective on the application of research results	118
6. Collected scientific information during research process	119
7. References	120

목 차

제 1 장 서론	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	21
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	116
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	118
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	119
제 7 장 참고문헌	120

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

- 천연물은 다양한 구조 및 생리활성을 풍부하게 지니고 있는 자원으로 인식되고 있지만, 극지환경에 서식하는 생물종은 생리활성 물질탐색의 대상으로서 많은 연구가 이루어지지 않은 미지의 생물자원임
- 따라서 이상과 같이 신규 의약 소재 및 기타 기능성 소재의 원천재료로서의 무한한 잠재가치를 가지는 극지고유생물 유래 이차대사물질을 효과적으로 분리하고 관련 기초자료를 제공하기 위하여 본 연구에서는 다음과 같은 연구내용을 수행하고자 함
 - 극지고유생물자원 유래 대사체 추출물 확보
 - 약물타겟 효소 및 세포수준의 생리활성 검정법을 이용한 검색계 운영
 - 표준화된 분획 방법을 적용하여 대사체 추출물로부터 혼합물의 성분을 특정 할 수 있는 대사체 분획물 확보
 - 활성 및 성분 추적법을 적용하여 이차대사물질 발굴 및 항염, 항당뇨, 피부질환 개선 생리활성 검정
- 본 과제의 연구목표인 극지 고유생물의 생물공학적 보전가치를 규명하고 활용기반을 구축하여 차세대 국가 성장 동력 창출 의 기초자료를 제공에 기여 하고자 함

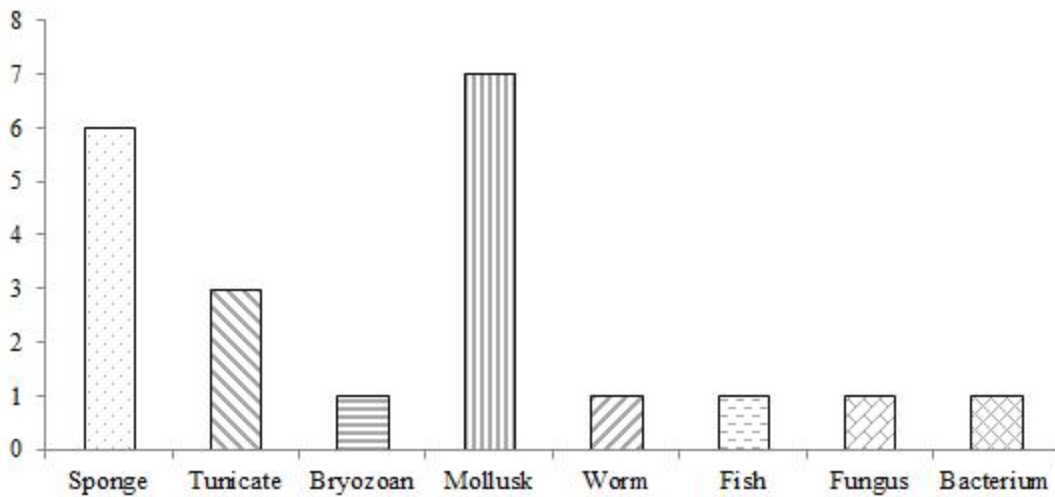
제 2 절 연구개발의 필요성

- 지금까지 인류가 질병의 치료에 사용하고 있는 대부분의 의약품은 식물이나 미생물의 대사산물이나 성분들에서 유래한 것으로 현재 가장 많이 사용하고 있는 항암제, 항생제, 면역억제제, 콜레스테롤 합성 저해제, 당뇨병 치료제들은 그 기원이 대부분 미생물의 대사산물이나 식물에서 발견된 2차 대사산물들에서 출발한 것들임
- 특히 질병의 원인이 발현된 단백질의 이상화나 유전자의 발현조절의 이상화로 기인한다는 결과가 밝혀지면서 의약품의 개발을 위한 새로운 방법으로 원인 단백질의 구조를 밝히고 작용점을 정확히 분석하여 이를 근거로 화학합성에 의해서 이들을 조절하는 화합물을 설계하거나 수백만 개의 chemical library에서 특이적 조절제를 HTS에 의해서 발굴하고 이 화합물을 출발물질로 하여 의약품으로 개발을 시도하고 있음

- 그러나 식물이나 미생물유래의 2차 대사산물들은 단백질과 화합물의 구조와 활성과의 상관관계를 예측할 수 없었던 경우가 대부분이고 화합물을 분리하여 활성을 분석한 후에나 단백질 구조와의 상관관계를 알 수 있을 정도로 현재까지의 구조기반 설계기술에서 불가능한 새로운 화합물을 제공할 수 있음
- 따라서 이들 대사산물의 발굴은 타겟 단백질과 결합부위를 분석하여 새로운 화합물의 설계를 가능하게 하거나 타겟 단백질이나 질병원인의 새로운 기작을 제공할 수 있는 기술로 여전히 그 중요성이 인정되고 있음
- 아울러 화학합성의 어려움이나 자연계에 존재하는 2차 대사산물은 앞으로 발굴될 수 있는 화합물의 구조를 전혀 예측할 수 없기 때문에 현재 확보된 chemical library의 화합물 골격과 유도체의 다양성의 한계를 극복할 수 있어서 여전히 의약품개발을 위한 중요한 선도물질의 제공원으로 인식됨
- 따라서 생물자원유래의 2차 대사산물이 의약품개발을 위한 화합물의 제공원으로 사용하는 이유는 2차 대사산물의 화합물 구조의 다양성에 기인하며 의약활성을 예측할 수 없는 골격구조의 다양성과 아울러 유도체들의 변환성의 부가로 인간이 예상할 수 있는 화학합성의 골격구조와 유도체들의 다양성 한계를 극복하는 새로운 돌파구를 제공할 가능성이 높음.
- 이러한 화합물의 다양성은 자연계에 존재하는 생물종의 종류가 무수히 많고 또한 각각의 생물종은 그 생육조건이나 환경에 따라 대사 기작이 달라지게 되어 이들이 생산하는 2차 대사산물은 다양성을 무한적으로 제공할 수 있을 것으로 기대됨
- 신약개발에 있어 이차대사산물이 가지는 다양성의 가치는 많은 과학자들이 새로운 구조를 가지는 이차대사산물의 발굴에 관심을 가지게 하는 중요한 요인이며 특히
 “The most interesting natural products come mainly from recently accessed biota”의 인식하에 새로운 환경의 생물종에 대한 관심이 높아지고 있음
- 예를 들면 체계적인 해양생물을 대상으로 한 연구는 식물 등 육상 생물계에 대한 연구에 비해 상당히 늦은 1970년대 중반에 시작 되었으며 약 2500 여종의 새로운 물질 1977-1987년 사이에 이 해양생물로 부터 분리된바 있으며, 최근 2012년에 1241종, 2013년에 1163종, 2014년에 1378의 새로운 물질이 분리되었다. 이는 해양생물체가 주요한 신물질의 보고로서 가치고 가지고 있음을 보여주는 증거라 볼 수 있음 [참고문헌 1-4]
- 해양 생물은 지구 생물자원의 상당 부분을 구성한다는 점과 독특한 구조, 대사 경로, 생

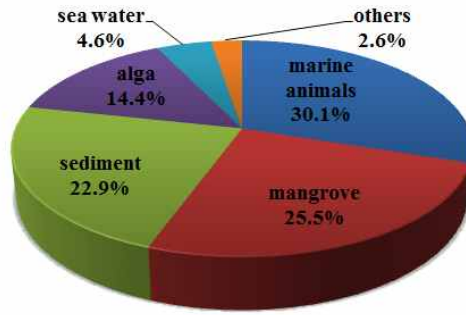
식 시스템, 화학 방어 메커니즘을 갖기 때문에 새로운 화합물의 제공 원으로서 과학적 관심이 높아지고 있는 생물자원이며 실질적으로 해양유래의 천연물은 그 구조가 육상에서 분리되는 물질과 상이한 경우가 많음으로 신약 개발 시 중요한 요소로 인식되는 분자구조의 다양성구축면에서 장점을 지니고 있음 [참고문헌 5]

- 최근 들어 의약품으로의 임상 평가가 진행되는 해양유래의 천연물의 경우 대부분 대형 해양생물에서 분리된 것으로서 실질적으로는 이들과 공생하거나 관련된 미생물들에 의해 생산된다는 결과가 알려지고 있으며 따라서 해양유래 미생물에 대한 관심도 높아지고 있음 [참고문헌 6,7]



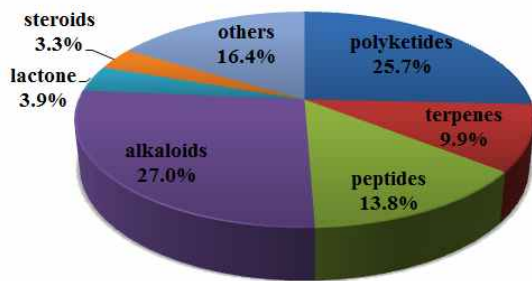
[그림] 현재 임상실험단계에 진입한 해양유래 대사체의 생산 해양생물종에 따른 분류

- 해양미생물 중에서 최근 해양 유래 진균에서 얻은 이차대사물질들이 주목받고 있고, 특히 1990년대 이후 발표된 구조들의 수가 급격히 증가되었으며 그 중 많은 물질들이 구조적으로 독특하고, 흥미를 유발하는 생물학적, 약리학적 특징들을 가지고 있음이 밝혀지고 있음 [참고문헌 6]
- 최근의 연구결과를 보면 대부분의 해양환경유래의 진균 종은 *Aspergillus* 나 *Penicillium*속에 속하는 종들이며 보고되는 신규 2차 대사물질의 생산균주는 해양동물이나 식물에서 분리된 종임을 알 수 있으며 특히 남중국해에서 분리된 2차 대사물질에 대한 보고가 증가 하고 있는 추세임

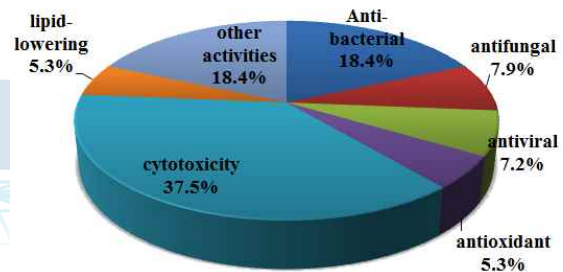


[그림] 신규 대사체를 생산하는 해양 진균의 분리원

- 현재 보고되는 2차 대사산물의 구조는 대부분 alkaloids 나 polyketides 형이며 그 외 다른 형태의 화합물도 보고되고 있으며 생물활성의 측면에서는 다수의 세포독성효과와 항생작용이 보고되고 있음



[그림] 해양진균 유래 신규 대사체의 구조적 특성



[그림] 해양진균 유래 신규 대사체의 생물학적 활성

- 따라서 해양미생물분리의 대상이 되는 해양 환경이나 해양생물종의 범위를 확대하고 생리활성검색법의 종류나 범위를 확대한다면 해양 진균은 향후에도 신약개발의 가능성을 가지는 천연물탐색의 좋은 생물자원이 될 수 있을 것으로 기대됨
- 따라서 본 연구에서 관심을 가지고 수행하고자 하는 항염증 활성을 가지는 극지환경 유래 해양진균으로 부터의 2차대사물질 발굴은 신규 천연물 또는 기지의 물질이나 신규의 생리활성을 확인할 가능성이 높다고 평가 됨
- 현재 사용되는 대부분의 염증 치료제는 스테로이드 계열과 NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs) 이며, 이들 치료제의 치료효과는 인정되나 경우에 따라 심각한 부작용이 발생한다. 따라서 상기 약물의 작용기전과 구별되는 작용기전에 근거한 항염증 치료제의 개발이 필요함

- 또한 만성염증이 직접, 간접적으로 심장질환, 암, 당뇨, 관절염, 치매등과 같은 만성질환과 관련이 있는 것이 밝혀짐으로서, 항염증 약물에 대한 조사는 그 중요성이 더욱 커지고 있으며 이 경우 다양한 염증인자의 생성을 억제하는 천연물의 탐색이 중요한 연구 분야가 될 수 있음. 최근에는 해양천연물을 이용한 항염증 연구 또한 활발하게 이루어지고 있음 [참고문헌 8]

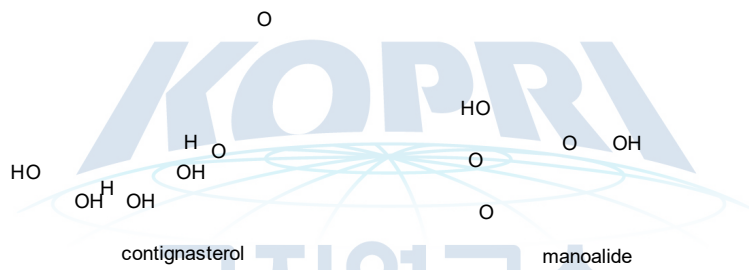
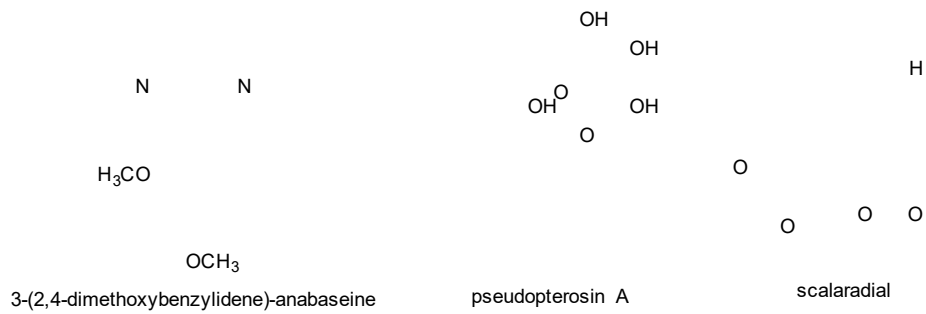


그림. 전임상연구 또는 임상시험단계의 항염증 효과를 가진 해양유래 선도물질

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

- 선진국들은 쇄빙선, 대륙기지 및 남북극권 국가 간의 공동연구를 통하여 극지 해양생물에 대한 자원탐사를 실시하고 있으며, 현재에도 과학 활동의 명목으로 미답지역의 생물자원을 확보하고 있음
- 극지생물다양성, 생물계통·진화, 스트레스반응 등에 대한 연구를 위해 2007/2008 IPY를 통하여 국제공동연구 체계가 이루어지고 있으며, 이외 저온효소 등의 신규 생물소재 연구를 공식적으로 보고
- SCAR 내 EBA(Evolution and Biodiversity in the Antarctic) 프로그램에서는 남극생물의 진화, 적응, 생태적 서식처의 다양성, 다양성의 예측 등에 대한 연구를 진행
- 미국은 북극이사회 회원국이자 남극조약 원초서명국으로 국립과학재단(National Science Foundation: NSF)이 극지연구정책 및 연구사업을 총괄하고 있으며, 재단 내의 극지프로그램연구청(Office of Polar Program: NSF-OPP)이 크게 남극연구부와 북극연구부로 구분되어 남극·북극 과학 연구를 담당하고 있음
- 러시아는 극지연구소 (Arctic and Antarctic Research Institute of Roshydromet: AARI)가 연구 활동을 주관하여 담당하고 있으며 남북극 환경 구성요소(빙설권, 수권, 지권, 대기권, 고층대기권) 내 기작 및 기작 간 상호작용에 대한 규명, 원거리 탐사 및 심부빙하시추 기술개발 및 수행, 동토공학, 북극 생태연구, 남북극 해양활동 지원을 위한 수문기상 연구 및 실시간 모니터링 활동 등 활발한 연구를 진행 중임
- 영국은 LTMS (Long-term Monitoring and Survey) 장기 모니터링 및 관측 프로그램은 별도로 운영하고 있으며, 국립해양센터를 중심으로 해양 생물다양성 조사(Census of Marine Life)를 실시하여 남극해에 서식하는 생물종과 환경을 보고하였으며, 해양생명공학의 소재로 특유의 방어 기작을 지닌 극지 저서동물 연구를 확대하고 있음

- 호주의 남극연구소는 영국의 남극연구소와 공동으로 30년 가까이 약 5년 단위의 장기 프로그램을 통해 남극 수산자원과 해양생태계 변동과정 연구를 지속적 수행 중
- 중국은 ‘중국 극지연구소’ 주도하에 ‘극지표본자원 공유 플랫폼’ 사업을 통하여 남극지역을 대상으로 자원 활용이 가능한 남극 광물, 생물자원을 수집하고 있으며, 해양사업 발전계획에 따라 2020년까지 해양환경 변화와 해양생물자원의 지속가능한 이용, 대양 및 심해 연구에 대한 지원을 강화함
- 우리나라와 함께 북극 이사회 옵저버 국가로 활동 중인 일본은 일본 문부과학성 산하 국립 극지연구소(National Institute of Polar Research: NIPR)가 남북극 연구 활동을 주관하고 있으며, 크게 다섯 개로 구성된 연구그룹의 하나인 생명과학 연구 그룹은 해양생물연구, 육상생물연구, ‘펭귄, 크릴, 해포 등 생물에 대한 해동생태연구’등으로 나뉘어짐
- 칠레의 University of Chile의 연구진은 남극유래의 균주로부터 nitroasterric acid 계열의 대사체 4종을 분리 하였음 [참고문헌 9]
- 미국의 University of Alabama at Birmingham의 연구진은 수년간 남극유래 해양생물을 대상으로 한 이차대사물질 연구를 지속적으로 수행하고 있으며, 최근 2016년에 남극유래 균주로부터 methicillin 내성을 갖는 darwinolide라는 대사체를 분리 하였음 [참고문헌 10]
- 이탈리아의 Consiglio Nazionale Delle Ricerche - Istituto Di Chimica Biomolecolare의 연구진은 남극유래의 nudibranch로부터 granuloside라는 대사체를 분리 하였음 [참고문헌 11]
- 중국의 Ocean University of China의 연구진과 South China Sea Institute of Oceanology의 연구진은 각각 남극유래의 균주로부터 chrodrimanins 대사체 2종과 α -pyrone merosesquiterpenoids계열 대사체 6종을 분리 하였음 [참고문헌 12,13]
- 노르웨이의 UiT The Arctic University of Norway의 연구진은 수년간 남극유래 해양생물을 대상으로 한 이차대사물질 연구를 지속적으로 수행하고 있으며, 최근 2014년에 남극유래 해초로부터 synoxazolidinones 대사체 2종과 pulmonarins 대사체 2종을 분리 하였음 [참고문헌 14]

제 2 절 국내 기술개발 현황

- 1985년 이후 물질특허제의 도입과 함께 천연물 과학 분야에 대한 관심이 높아져 한국생명공학연구원, 한국과학기술원, 한국화학연구원, 한국해양연구원 등을 중심으로 천연물 성분 연구에 대한 관심이 증대하고 있음
- 우리나라에서는 2001년을 시작으로 천연물신약연구개발촉진계획이 수립됨에 따라 경쟁력 있는 글로벌 천연물신약 연구기반을 구축하고, 만성, 난치성, 노인성 질환 치료 천연물신약을 개발하기 위해서 정부차원의 지원이 한층 강화되었으며 최근 3차 천연물 신약연구개발촉진계획 (2011~2015)이 수립되어 기존사업 확대 및 신규 사업에 투자되었음
- 그러나 국내의 경우 천연물신약개발에 기초가 되는 천연물 생리활성 탐색기술과 약리작용 및 독성연구 등에 대한 기초연구가 아직 미흡한 편이며 이에 따라 대부분의 천연물 성분 및 생리활성 연구가 지속적, 조직적, 효율적, 체계적으로 이루어지지 못하고 있음
- 우리나라는 1988년 남극에 세종기지가 건설되면서 본격적인 극지에 관한 과학적 연구가 시작되었고, 북극에 관한 연구는 2002년 노르웨이 스텔바드 군도 스피츠베르겐 섬 니알슨에 한국해양연구원이 다산과학기지를 개설한 후부터 본격적으로 시작되었음
- 2004년 한국해양연구원 부설 극지연구소 설립 후 학연 협동연구가 활발히 진행되고 있으며, 다산과학 기지가 있는 니알슨 섬은 국제적인 북극 연구 단지로서 우리나라를 비롯한 노르웨이, 독일, 영국, 프랑스, 일본, 이탈리아, 중국, 인도 등 9개국 이 기지를 운영하고 있고 국가 간 협력 또는 연구소 간의 협력에 기반 한 국제 공동연구를 진행 중임
- 우리나라의 극지연구소는 극지바이오 연구 활성화를 위하여 극지생물 DB 구축/운영, 극지저온 생물 연구, 극지 생물해양 연구, 극지생물 기능 유전체 연구 등을 통해 극한환경 적응기작, 대사체 확보 및 활용연구를 진행하고 있음
- 우리나라에는 BT분야 연구개발 예산의 높은 투자 비중에도 불구하고 해양 바이오 분야에 대한 지원은 미흡, BT 예산 대비 3%에 불과하며, 극지분야 선진국들과 달리 극지연구 활동을 주관할 수 있는 국가적 단위의 독립 연구기관이 없으며, 정부부처 간에 원활한 업무협조를 위한 공식적인 체계가 구축되어 있지 않음
- 특히 양극해 해양생물 관련 연구의 경우 양극해의 독특한 극한환경으로 인한 자원 확보의 어려움이 존재하므로 해양생물자원 활용 연구 및 산업화의 저변확대를 위해서는 제한생물자원의 체계적인 확보 및 관리를 위한 국토해양부차원의 지원정책이 필요함

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 범위 및 연구 수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근 방법)
극지 생물 유해 추출물 제조 및 표준화된 분획과정을 적용한 대사체 추출물 유래 분획물 라이브러리 구축 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○극지 연구소로부터 극지유래 양극해 해양생물 소재를 제공받고 각 생물체의 특성에 맞춰 적절한 조 추출물을 확보 ○극지 생물, 극지생물 유래 미생물, 해양생물들 의 극지생물 유래 시료에 대한 MeOH/EtOAc 추출물을 제작 ○각 추출물로부터 생리활성 물질을 탐색하기 위하여 건조된 시료로부터 MeOH/EtOAc(1L)를 이용하여 3일간 추출을 두 번 진행 ○얻어진 MeOH/EtoAc 추출물에 대하여 C₁₈-functionalized silica gel flash column chromatography를 수행 하였으며, 용출 용매로는 단계 적 기울기 용리법을 사용 [20%, 40%, 60%, 80%, and 100% (v/v) MeOH in H₂O (500ml each)]. ○크로마토그래피를 통해 얻어진 분획물들에 대한 NMR data 분석을 통해 우선 연구 진행 후보 분획물 선정
생리 활성 대사체 분리/구조분석 연구 및 활성 기작 분석 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○각 분획물에 대한 1차적인 생리 활성 검색을 진행하며, 이때 2가지 이상의 검색 방법 이용 ○기본적으로 항염증 활성(Nitrite 생성 억제), PTP1B 억제효과를 탐색 ○각 분획물에 대한 생리 활성 결과와 1H NMR 측정 및 연구책임자의 다양한 구조분석 경험을 토대로 한 해석을 통하여 초기단계에서 추출물에 함유된 성분의 형태를 예상하고 이를 기초로 우선 연구 대상 선정 ○탐색대상으로부터 검정계에 의해 선정된 시료는 활성 대사체의 분리, 정제를 시행하며, 활성 대사체가 존재하는 분획을 적당한 이동상으로 column chromatography (CC)를 실시하여 활성 대사체를 분리 정제 하며 칼럼 크로마토그라피는 필요에 따라 순상 실리카겔, 역상 실리 카겔, Sephadex LH-20, Cellulose 등의 고정상을 이용하여 실행 ○분리된 활성 대사체는 NMR, Mass, IR, UV 흡수과장분석 등의 기기 분석을 통하여 구조를 규명하고 구조의 특이성과 생리 활성도를 비 교 및 활성 작용 기작 분석 진행 ○분리된 활성 대사체는 항염증 기전, PTP1B 기전 등 다양한 활성 기 작 분석을 통해 대사체가 갖는 새로운 생리 활성을 탐색하는 연구 진행

제 2 절 해양유래 미생물의 이차대사물질 분리

○ 1차년도 세부목표 1-1: 극지해양미생물 유래 추출물의 제조

연구 내용	연구 결과
극지생물 시료를 이용하여 추출물 제작	- 극지생물 유래 진균 SF6291 균주의 배양 추출물 682 mg 외 14종의 균주배양 추출물 확보

[별첨1-1] 극지생물 유래 미생물 시료를 이용한 추출물 제작 목록

NO	Sample ID	유래 소재	추출용매	추출물 무게
1	SF6291	극지생물 유래 미생물	EtOAc	682 mg
2	SF6340	극지생물 유래 미생물	EtOAc	570 mg
3	SF6379	극지생물 유래 미생물	EtOAc	510 mg
4	SF7013(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	112.9 mg
5	SF7013(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	277.2 mg
6	SF7024(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	197.5 mg
7	SF7024(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	245.4 mg
8	SF7026(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	73 mg
9	SF7026(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	223 mg
10	SF7043(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	40 mg
11	SF7043(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	87 mg
12	SF7099(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	17 mg
13	SF7099(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	35 mg
14	SF7071(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	100 mg
15	SF7071(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	148 mg

○ 1차년도 세부목표 1-2: 생리활성 대사체의 분리

연구내용	연구결과
확보된 추출물에서 활성 대사체 분리 연구	- 전단계에서 확보된 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 10종의 대사체 분리 - 양극해 해양생물 유래 진균 SF6796V 균주의 배양 추출물로부터 3종의 대사체 분리

[별첨1-2-1] 극지생물 유래 진균 SF5859 로부터 이차대사물질의 분리

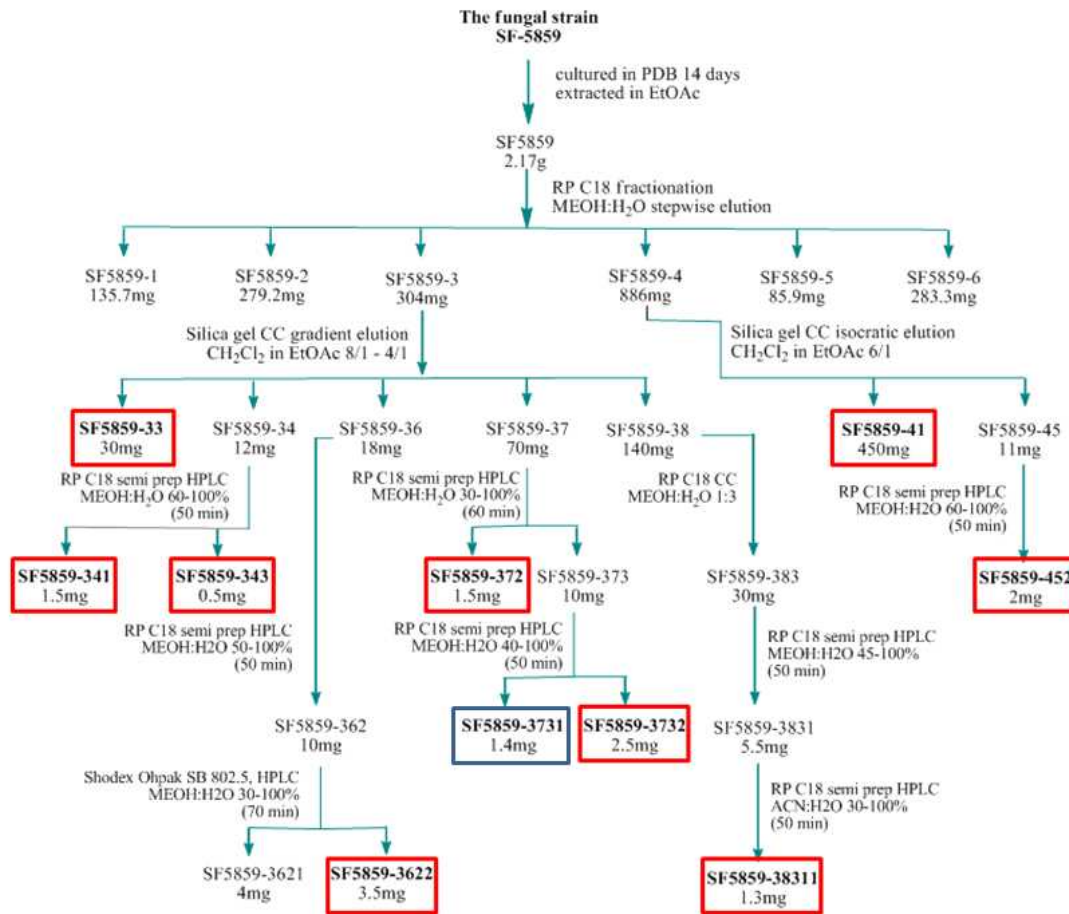


Figure 1. 진균 SF5859으로부터 분리된 단일화합물의 분리도

진균 SF5859는 각각 300 ml의 질석배지 [0.4% (w/v) potato starch, 2% (w/v) dextrose, 1.9% NaCl (w/v), 25% (w/v) vermiculite,]가 담긴 10개의 Fernbach flask (300 mL)에서 배양되었다. 각각의 Fernbach flask에 2 ml의 균 배양액을 접종하여 25 °C에서 14일간 배양하였다. 질석배지는 EtOAc (4 L)로 한 번 추출하였고, 추출액은 여과지로 여과하여 추출물 SF5859 (2.17 g)을 얻었다. 추출물은 C18 flash column chromatography (CC, 4.5 x 30 cm)를 수행하였고, 이 때 용출 용매로는 단계적 기울기 용리법[20%, 40%, 60%, 80%, 100% (v/v) MeOH in H₂O (400 mL each)]을 사용하여 6개의 분획물 SF5859-1~6을 얻었다.

분획물 SF5859-3에 대하여 Silicagel C.C (2.0 x 30 cm) CH₂Cl₂-EtOAc [8:1 (200 ml) and 4:1 (150 ml)]을 수행 후 TLC 분석에 근거하여 SF5859-33 (30 mg, R_f = 0.3)과 7개의 소분획물 SF5859-31~8을 얻었다. 소분획물 SF5859-34에 대하여 reversed phase HPLC [YMC pack ODS-A (150 mm x 20 mm), 60-100% MeOH in H₂O (0.1 % HCOOH), in 50 min, flow rate = 5 mL / min]을 수행하여 SF5859-341 (1.5 mg, t_R = 13.5 min)과 SF5859-343 (0.5 mg, t_R = 19 min)을 얻었다. 소분획물 SF5859-36에 대하여 reversed phase HPLC [50-100% MeOH in H₂O (0.1 % HCOOH), over 50 min]을 수행하여 두 개의 분획물을 얻었고, 이 중 SF5859-362에 대하여 reversed phase HPLC [Shodex Ohpak SB 802.5, 30-100% MeOH in H₂O, over 70 min]을 수행하여 SF5859-3622 (3.5 mg, t_R = 46 min)을 얻었다. 소분획물

SF5859-37에 대하여 reversed phase HPLC [30-100% MeOH in H₂O (0.1 % HCOOH), in 60 min]을 수행하여 **SF5859-372** (1.5 mg, t_R = 28 min)과 두 개의 다른 소분획물을 얻었고, 이 중 소분획물 SF5859-373에 대하여 reversed phase HPLC [40-100% MeOH in H₂O (0.1 % HCOOH), in 50 min]을 수행하여 **SF5859-3731** (1.4 mg, t_R = 19 min)과 **SF5859-3732** (2.5 mg, t_R = 20.5 min)을 얻었다. 소분획물 SF5859-38에 대하여 우선 reversed phase HPLC [45-100% MeOH in H₂O (0.1 % HCOOH), in 50 min]을 수행하여 SF5859-3831을 얻은 후 reversed phase HPLC [30-100% ACN in H₂O (0.1 % HCOOH), over 50 min]을 수행하여 **SF5859-38311** (1.3 mg, t_R = 22 min)을 얻었다.

분획물 SF5859-4에 대하여 silicagel C.C (3 cm × 30 cm) CH₂Cl₂-EtOAc (7:1)을 수행하여 4 개의 소분획물과 주 분획물인 **SF5859-4-1** (450 mg, R_f = 0.35)을 얻었다. 소분획물 SF5859-45에 대하여 preparative reversed phase HPLC [60-100 % MeOH in H₂O (0.1 % HCOOH), over 50 min]를 수행하여 **SF5859-452** (2 mg, t_R = 13 min)를 얻었다.

○ 1차년도 세부목표 1-3: 활성 대사체의 구조 분석

연구 내용	연구 결과
분리한 활성 대사체의 구조 분석	- 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 Curvularin 외 8종의 대사체 구조분석 완료

[별첨 1-3] 극지생물 유래 진균 SF5859로부터 분리된 이차대사물질의 구조분석

진균 SF5859에서 10개의 curvularin 계열 이차대사물질을 분리 하였다. 새로운 화합물 2개 (**SF5859-3731**, **SF5859-38311**)와 8개의 알려진 화합물 [Curvularin (**SF5859-41**), dyhydrocurvularin (**SF5859-33**), cis-dyhydrocurvularin (**SF5859-341**), (11R, 15R)-11-hydroxycurvularin (**SF5859-372**), (11S, 15R)-11-hydroxycurvularin (**SF5859-3732**), 11- α -methoxycurvularin (**SF5859-452**), 11- β -methoxycurvularin (**SF5859-3622**), curvularin B (**SF5859-343**)]이 분리되었다. **SF5859-3731**은 아직 명확한 구조가 확인되지 않았다.

[별첨 1-3-1] SF5859-41(Curvularin)

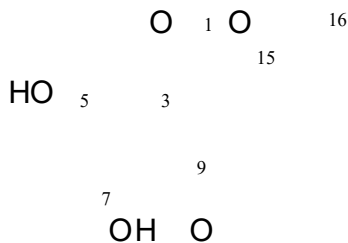


Figure 2. Structure of SF5859-41

SF5859-41의 Mass data를 통해 $C_{16}H_{20}O_5$ 의 분자식을 확인하였다. 화합물 SF5859-41 의 1H NMR 스펙트럼에서 olefinic protons δ 6.33 ($J = 2.0$ Hz, H-4), 6.38 ($J = 2.0$ Hz, H-6), oxygenated methine proton δ 4.90 (H-15), germinal coupling ($^2J_{2a/2b} = 15.6$ Hz, $^2J_{10a/10b} = 15.2$ Hz)을 갖는 2개의 methylene protons δ 3.69 (H-2a), 3.77 (H-2b), 2.77 (H-10a), 3.07 (H-10b), 4개의 methylene protons, 1개의 methyl proton δ 1.18 (H-16)이 확인 되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 carbonyl carbon δ 206.10 (C-9), ester carbon δ 170.32 (C-1), oxygenated methine carbon δ 71.84 (C-15), 4개의 aromatic quaternary carbons δ 120.47 (C-8), 136.16 (C-3), 159.35 (C-5), 157.48 (C-7)를 포함한 16개의 신호를 확인하였다. 화합물의 정확한 구조를 확인 하기 위하여 optical rotation을 측정하여 $[\alpha]_D = -37.05$ (EtOH)값과 reference 값 optical rotation $[\alpha]_D = -33.0$ (EtOH)과 비교하였고, reference 속 NMR 데이터와 비교를 통해 SF5859-41의 구조는 curvularin 으로 동정되었다. [참고문헌 15]

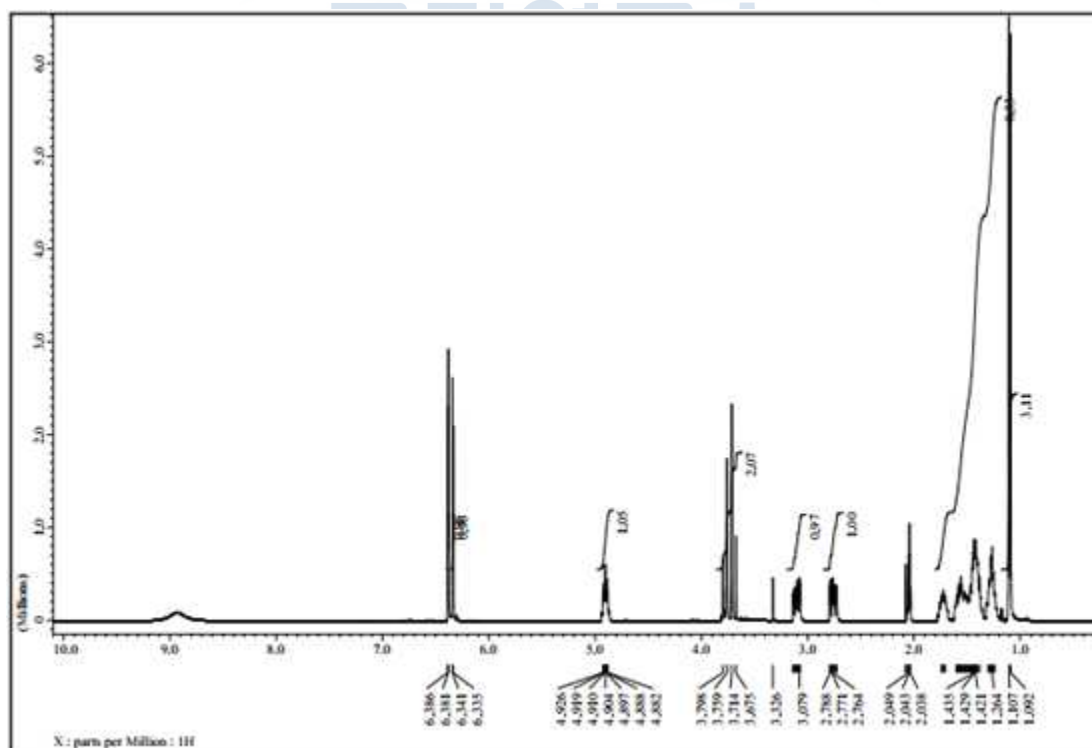


Figure 3. 1H NMR spectrum of SF5859-41

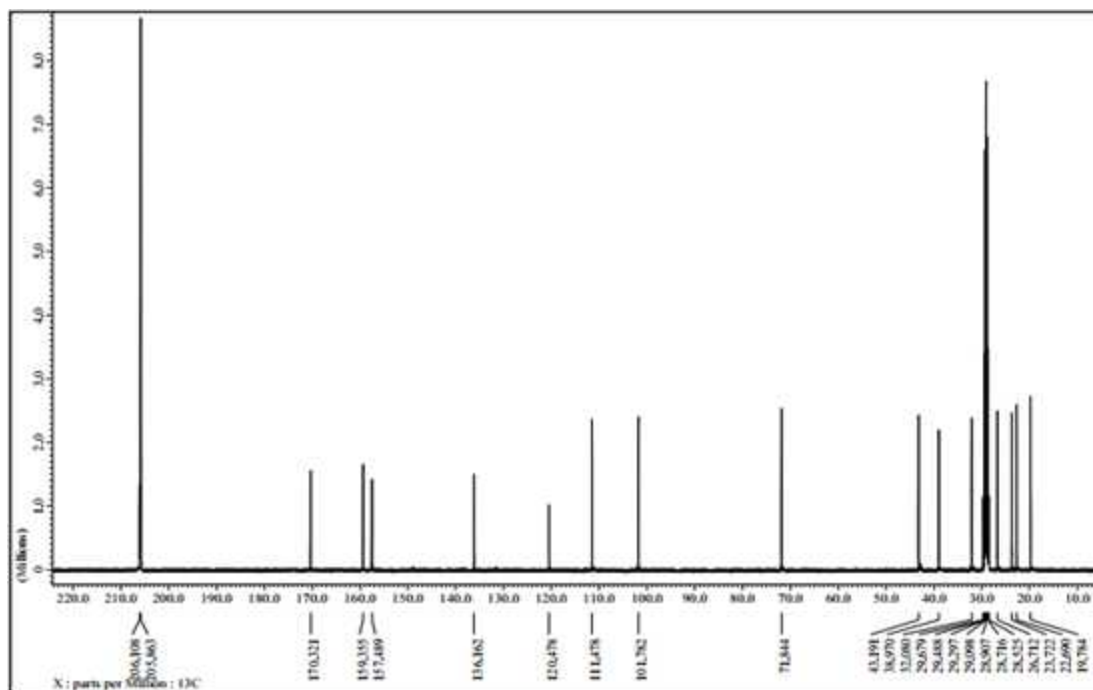


Figure 4. ^{13}C NMR spectrum of SF5859-41

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5859-41

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ (ppm)	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, J in Hz)
1	170.32	C _q	-
2a	38.97	CH ₂	3.69 (d, 15.6)
2b			3.77 (d, 15.6)
3	136.16	C _q	-
4	111.47	CH	6.33 (d, 2.0)
5	159.35	C _q	-
6	101.78	CH	6.39 (d, 2.0)
7	157.48	C _q	-
8	120.47	C _q	-
9	206.1	C _q	-
10a	43.19	CH ₂	2.77 (ddd, 15.2, 9.6, 2.4)
10b			3.07 (ddd, 15.2, 8.8, 2.8)
11a	136.16	CH ₂	1.70-1.78 (m)
11b			1.22-1.61 (m)
12	111.47	CH ₂	1.22-1.61 (m)
13	22.69	CH ₂	1.22-1.61 (m)
14	26.71	CH ₂	1.22-1.61 (m)
15	23.72	CH ₂	1.22-1.61 (m)
16	32.08	CH ₃	1.10 (d, 6.4)

^arecorded in Acetone-*d*₆, ^b100 MHz, ^c400 MHz,

[별첨 1-3-2] SF5859-33 (dehydrocuvularin)

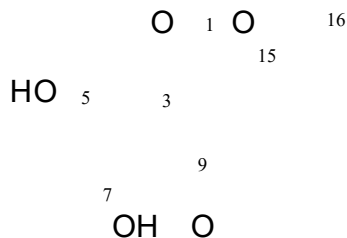


Figure 5. Structure of SF5859-33

SF5859-33의 Mass data를 통해 $C_{16}H_{18}O_5$ 의 분자식을 확인하였다. 1H NMR 스펙트럼에서 olefinic proton δ 6.78 (H-10), 6.57 (H-11)의 coupling constant ($J= 15.6$ Hz)를 통해 trans 형태인 것을 확인하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 carbonyl carbon δ 196.41 (C-9), ester carbon δ 171.03 (C-1), aromatic methine carbons δ 101.97 (C-6), 112.77 (C-4), aromatic quaternary carbon δ 139.4 (C-3), 162.9 (C-5), 165.9 (C-7), 115.5 (C-8)], olefinic carbons δ 133.80 (C-10), 148.93 (C-11), oxygenated carbon δ 72.07 (C-15), 4개의 methylene carbons, methyl carbon δ 19.50 (C-16)을 포함한 16개의 신호가 나타났다.

SF5859-33의 1H , ^{13}C NMR 스펙트럼을 통해 curvularin 와 유사한 골격을 가지지만 C-10, C-11 위치에 이중결합이 존재하는 것을 확인하였다. 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 optical rotation을 측정하여 $[\alpha]_D=-51.6$ (EtOH)값과 reference 값 optical rotation $[\alpha]_D=-79.8$ (EtOH)을 비교하였고, NMR 데이터를 비교를 통해 SF5859-33의 구조는 dehydrocuvularin 으로 동정되었다. [참고문헌 16]

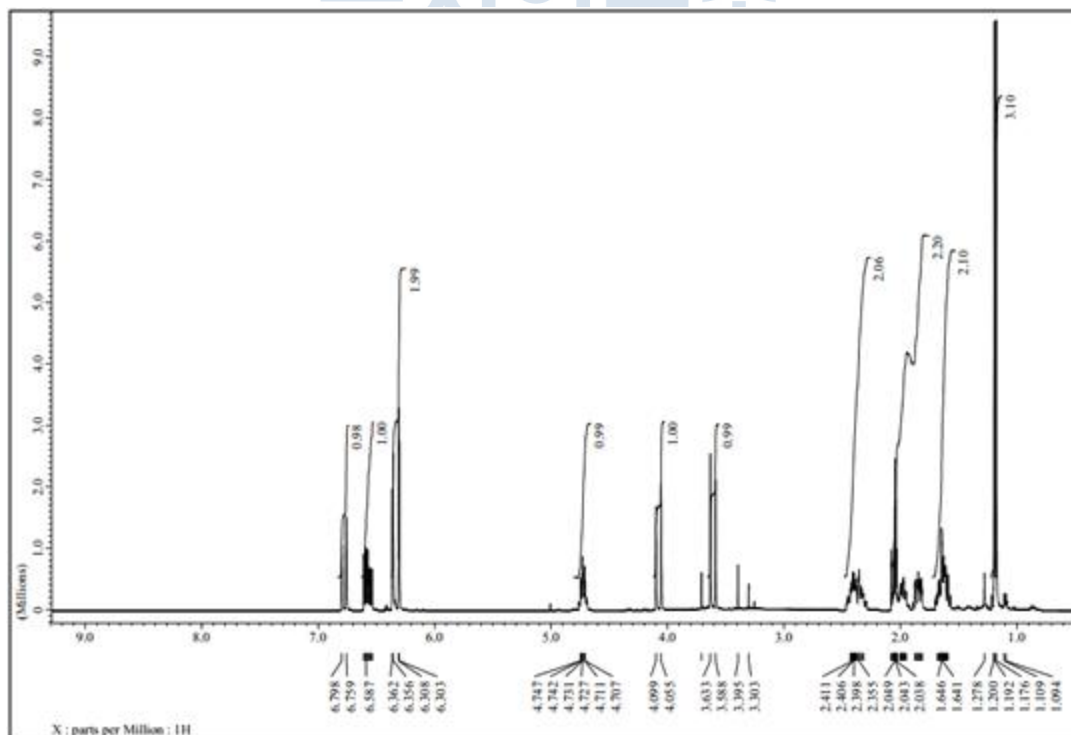


Figure 6. 1H NMR spectrum of SF5859-33

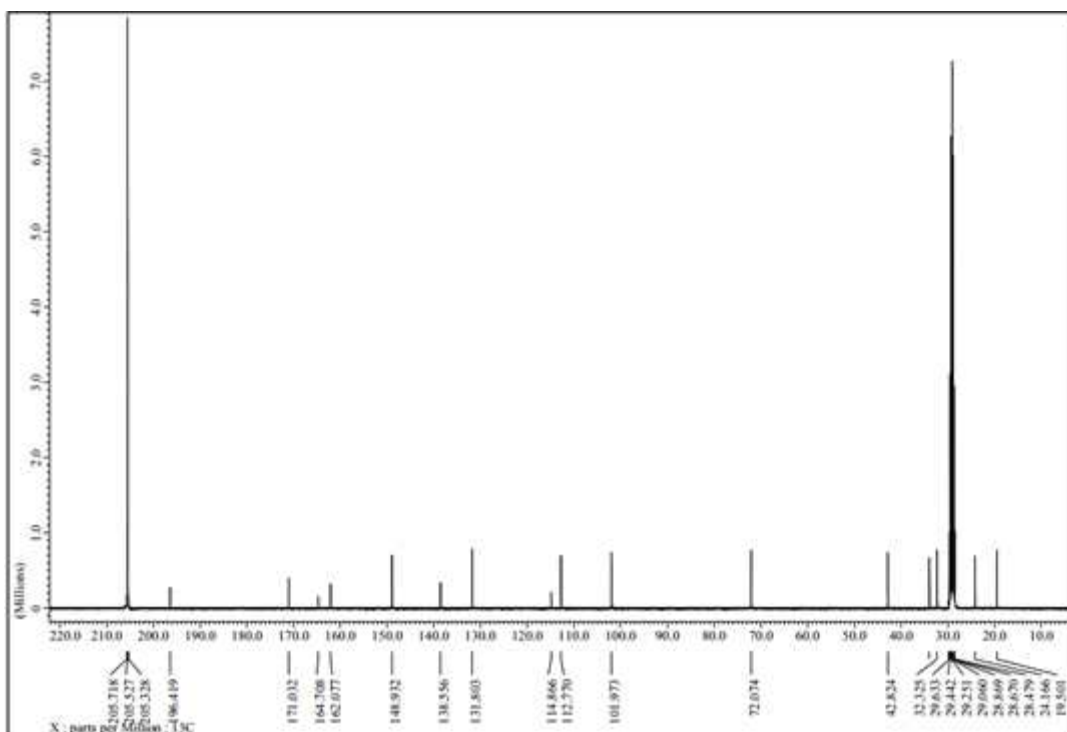


Figure 7. ^{13}C NMR spectrum of SF5859-33

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5859-33

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ (ppm)	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, J in Hz)
1	171.03	C_{q}	-
2a	42.82	CH_2	3.60 (d, 17.6)
2b			4.07 (d, 17.6)
3	138.55	C_{q}	-
4	112.77	CH	6.35 (d, 2.4)
5	162.07	C_{q}	-
6	101.97	CH	6.30 (d, 2.4)
7	164.7	C_{q}	-
8	114.86	C_{q}	-
9	196.41	C_{q}	-
10	131.8	CH	6.77 (d, 15.6)
11	148.93	CH	6.57 (ddd, 15.6, 8.8, 4.8)
12	32.32	CH_2	2.38 (m)
13a	24.16	CH_2	1.64 (m)
13b			2.03 (m)
14a	33.94	CH_2	1.64 (m)
14b			1.84 (m)
15	72.07	CH	4.72 (m)
16	19.5	CH_3	1.18 (d, 6.4)

^arecorded in Acetone- d_6 , ^b100 MHz, ^c400 MHz

[별첨 1-3-3] SF5859-341 (new compound)

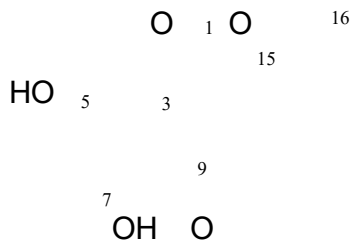


Figure 8. Structure of SF5859-341

SF5859-341의 Mass data를 통해 $C_{16}H_{18}O_5$ 의 분자식을 확인하였다. 화합물 SF5859-341와 SF5859-33 (dehydrocuvularin)의 1H , ^{13}C NMR 스펙트럼 비교 결과 SF5859-341이 olefinic group δ 132.48 (C-10), 141.80 (C-11)의 존재와, coupling constant ($J=12$ Hz)를 가지며 cis 형태를 가진 proton δ 6.52 (td, $J=12, 2.0$ Hz, H-10), 5.86 (dt, $J=12.0, 7.6$, H-11)이 존재하는 것을 제외하고, 두 화합물은 매우 유사한 구조를 가지는 것으로 밝혀졌다. 화합물 SF5859-341과 cis-dehydrocuvularin의 1H NMR 스펙트럼 비교결과 같은 $CDCl_3$ 용매에서 화학적 이동값이 동일하게 나왔지만 optical rotation 측정결과 각각 +7.3 (EtOH), -19.89 (EtOH)로 다르게 측정되었다. 따라서 두 화합물은 enantiomer 형태로 존재하고, SF5859-341의 절대 구조는 15번 위치가 R인 것으로 확인하였다. [참고문헌 17]

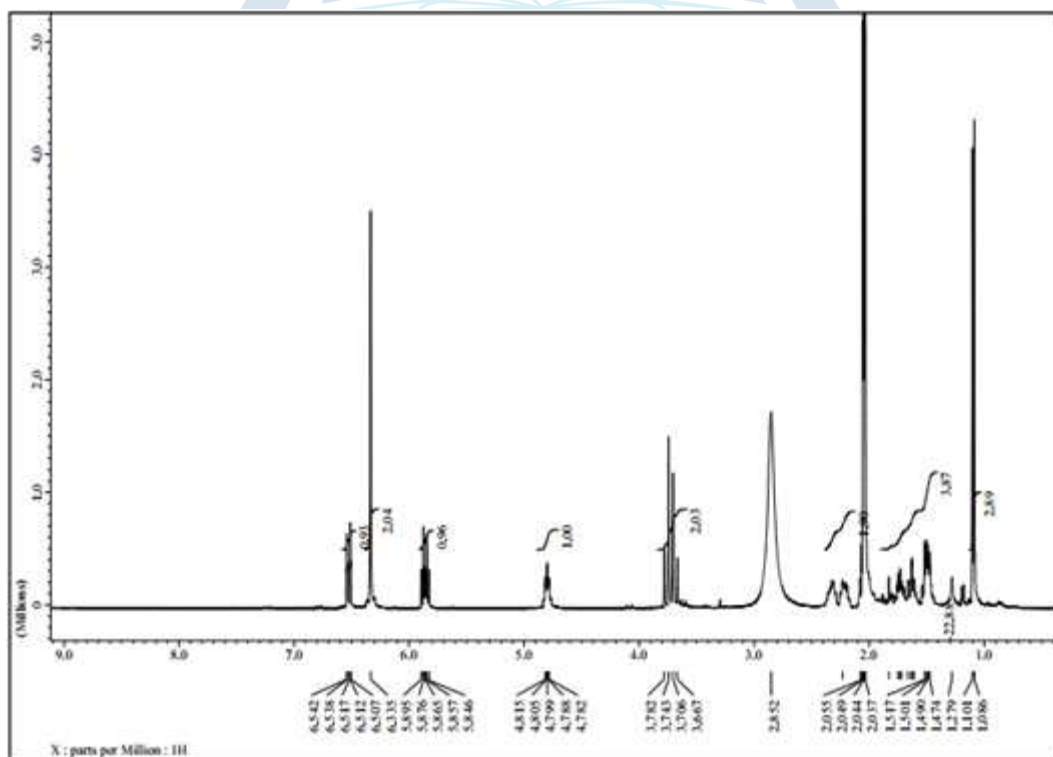


Figure 9. 1H NMR spectrum of SF5859-341

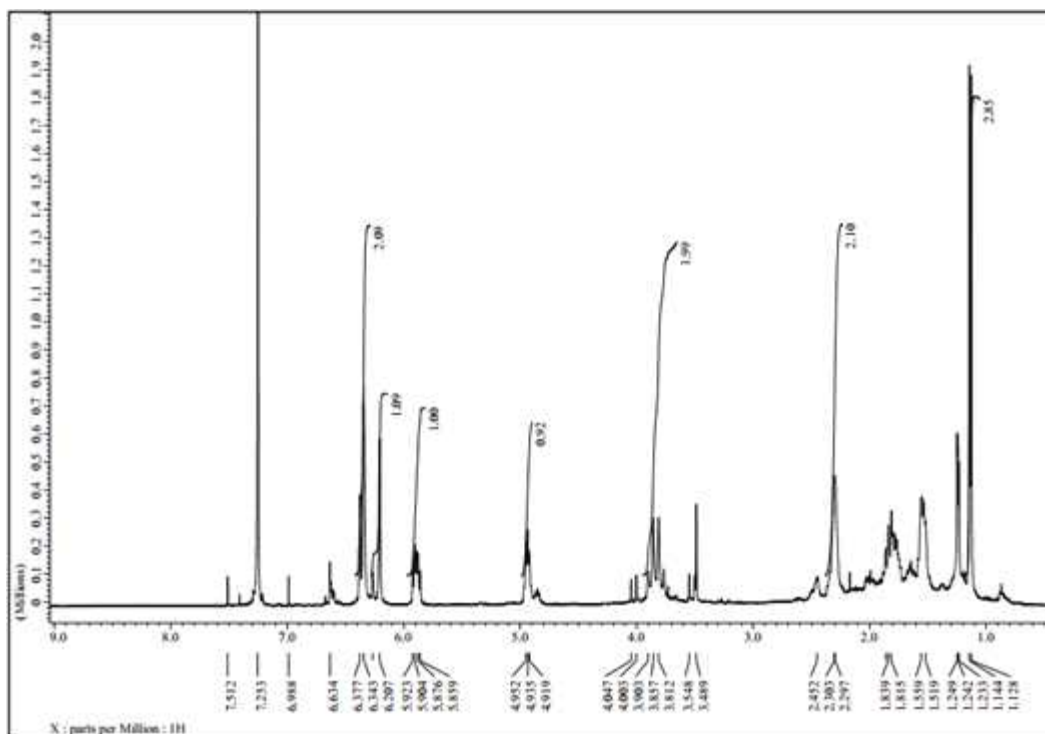


Figure 10. ^1H NMR spectrum of SF5859-341

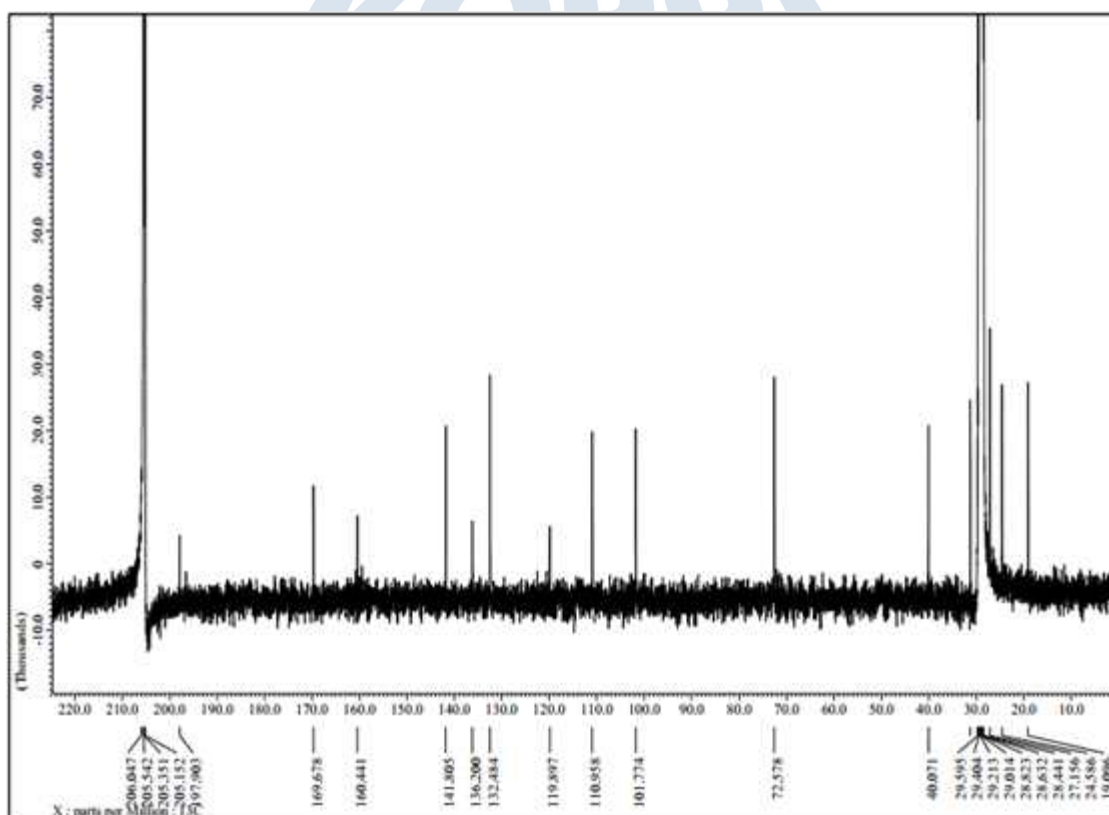


Figure 11. ^{13}C NMR spectrum of SF5859-341

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5859-341

Position	SF5859-341			Cis-dehydrocurvularin
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d,c}}$ (mult, J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d,c}}$ (mult, J in Hz)
1	169.67		-	-
2a	40.07	3.68 (d, 15.6)	3.79 (d, 18.0)	3.82 (d, 18.0)
2b		3.76 (d, 15.6)	3.87 (d, 18.0)	3.88 (d, 18.0)
3	136.2	-	-	-
4	110.95	6.33 (s)	6.20 (s)	6.22 (d, 1.5)
5	160.44		-	-
6	101.77	6.33 (s)	6.34 (s)	6.34 (d, 1.5)
7	160.44	-	-	-
8	119.89	-	-	-
9	197.9	-	-	-
10	132.48	6.52 (dt, 12.0, 2.0)	6.36 (d, 13.6)	6.38 (d, 12.5)
11	141.8	5.86 (dt, 12, 7.6)	5.89 (m, 13.6, 7.6)	5.91 (ddd, 12.5, 6.6, 6.6)
12	27.15	2.26 (m)	2.30 (m)	2.32 (m)
13a	24.58	1.50 (m)	1.55 (m)	1.57 (m)
13b		1.74 (m)		
14a	31.27	1.50 (m)	1.78 (m)	1.80 (m)
14b		1.63 (m)		
15	72.57	4.80 (m)	4.93 (m, 6.4)	4.96 (m)
16	19.09	1.09 (d, 6.0)	1.13 (d, 6.4)	1.16 (d, 6.6)

^a recorded in Acetone- d_6 , ^b100 MHz, ^c400 MHz, recorded in CDCl_3

극지연구소

[별첨 1-3-4] SF5859-372 [(11S, 15S)-11-hydroxycurvularin]

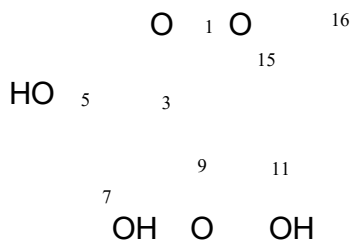


Figure 12. Structure of SF5859-372

SF5859-372의 Mass data를 통해 $C_{16}H_{20}O_6$ 의 분자식을 확인하였다. 1H NMR 스펙트럼에서 olefinic protons δ 6.30 (H-4), 6.40 (H-6), oxygenated methine protons δ 4.08 (H-11), 4.82 (H-15), 5개의 methylene protons, methyl proton δ 1.10 (H-16)을 확인하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 carbonyl carbon δ 204.88 (C-9), ester carbon δ 170.06 (C-1), aromatic methine carbons δ 101.76 (C-6), 111.18 (C-4), aromatic quaternary carbons δ 136.23 (C-3), 157.68 (C-5), 159.61 (C-7), 120.27 (C-8), oxygenated carbons δ 66.09 (C-11), 72.07 (C-15), 5개의 methylene carbons, methyl carbon δ 20.7 (C-16)을 포함한 16개의 신호를 확인하였다. 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 optical rotation을 측정하여 $[\alpha]_D = -14.9$ (EtOH)값과 reference의 NMR 및 optical rotation 데이터를 비교를 통해 SF5859-372의 구조는 (11S, 15S)-11-hydroxycurvularin 로 동정되었다. [참고문헌 16]

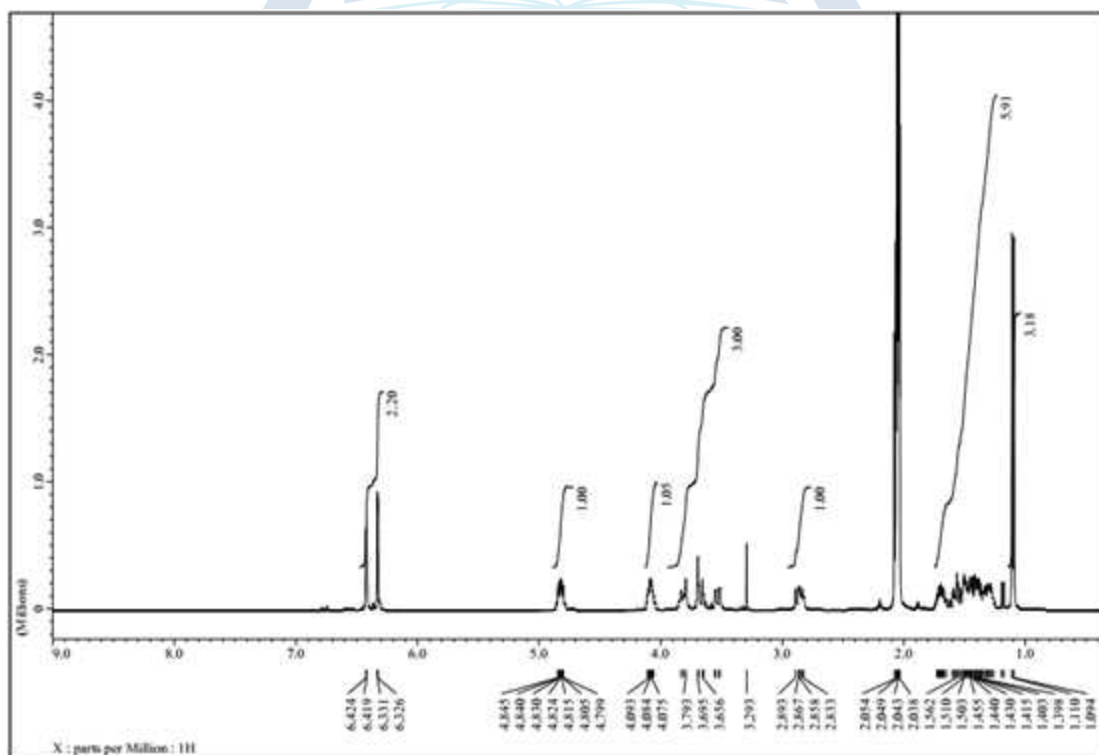


Figure 13. 1H NMR spectra of SF5859-372

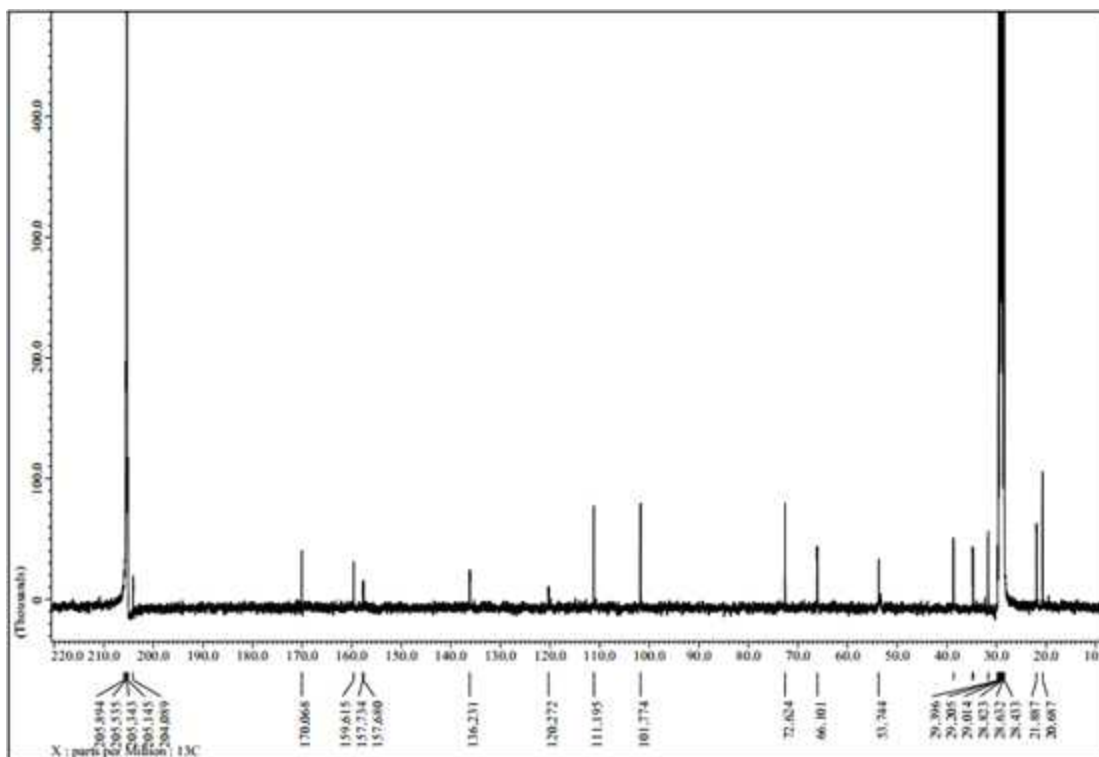


Figure 14. ^{13}C NMR spectra of SF5859-372

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5859-372

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ (ppm)	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, J in Hz)
1	170.06	C_{q}	-
2	38.69	CH_2	3.81 (d, 15.6)
			3.68 (d, 15.6)
3	136.23	C_{q}	-
4	111.18	CH	6.32 (d, 2.0)
5	157.68	C_{q}	-
6	101.76	CH	6.42 (d, 2.0)
7	159.61	C_{q}	-
8	120.27	C_{q}	-
9	204.88	C_{q}	-
10	53.74	CH_2	2.84 (dd, 14.0, 10.4)
			3.53 (dd, 14.0, 2.4)
11	66.09	CH	4.08 (m)
12	34.67	CH_2	1.43 (m)
13	21.9	CH_2	1.31 (m)
			1.69 (m)
14	31.66	CH_2	1.49 (m)
15	72.62	CH	4.82 (m)
16	20.7	CH_3	1.1 (d, 6.4)

^a recorded in Acetone- d_6 , ^b100 MHz, ^c400 MHz

[별첨 1-3-5] SF5859-3732 [(11R, 15S)-11-hydroxycurvularin]

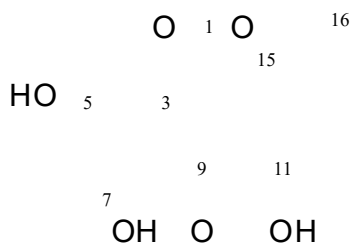


Figure 15. Structure of SF5859-3732

SF5859-3732의 Mass data를 통해 $C_{16}H_{20}O_6$ 의 분자식을 확인하였다. 1H NMR 스펙트럼에서 coupling constant 값이 2.0 Hz 인 meta 관계에 있는 olefinic proton δ 6.33 (H-4), 6.41 (H-6), oxygenated methine protons δ 3.98 (H-11), 4.93 (H-15)을 확인하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 carbonyl carbon δ 203.62 (C-9), ester carbon δ 169.87 (C-1), aromatic methine carbons δ 111.61 (C-4), 101.85 (C-6), 4개의 aromatic quaternary carbons δ 136.73 (C-3), 159.75 (C-5), 158.34 (C-7), 119.79 (C-8), oxygenated carbons δ 66.88 (C-11), 70.75 (C-15), 5개의 methylene carbons, methyl carbon을 포함한 16개의 신호를 확인하였다.

SF5859-3732의 1H , ^{13}C NMR 스펙트럼을 통해 SF5859-372 [(11R, 15S)-11-hydroxycurvularin]와 유사한 것이 확인 되었다. 문헌조사를 통해 NMR과 optical rotation 데이터를 비교를 통해 SF5859-3732의 구조는 (11R, 15S)-11 hydroxycurvularin로 동정되었다. [참고문헌 16]

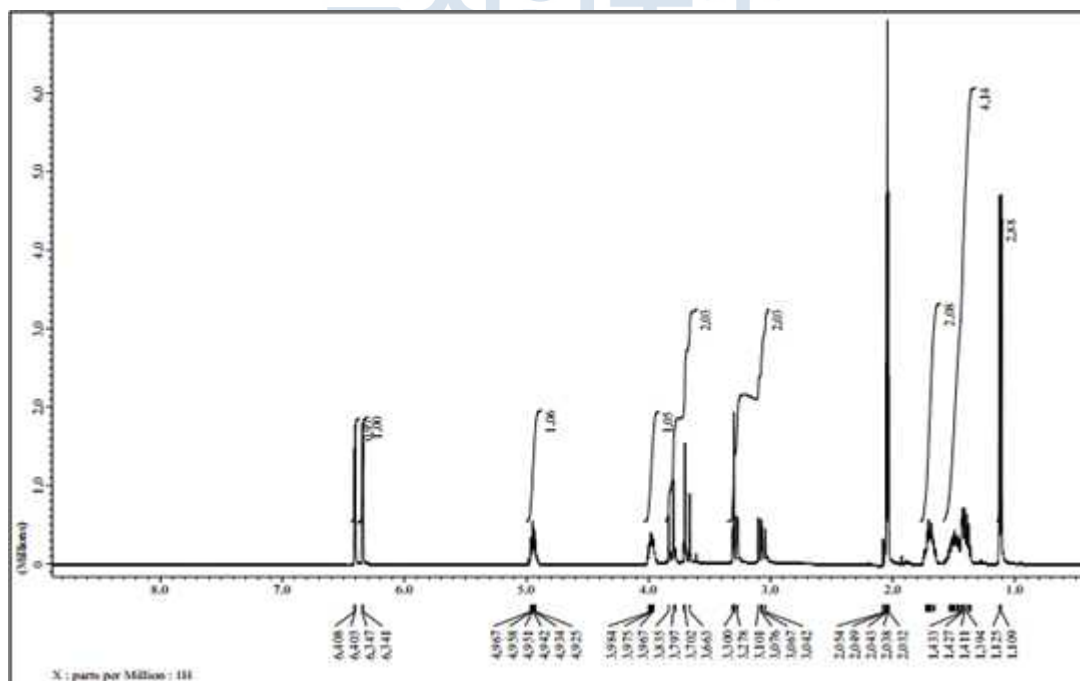


Figure 16. 1H NMR spectrum of SF5859-3732

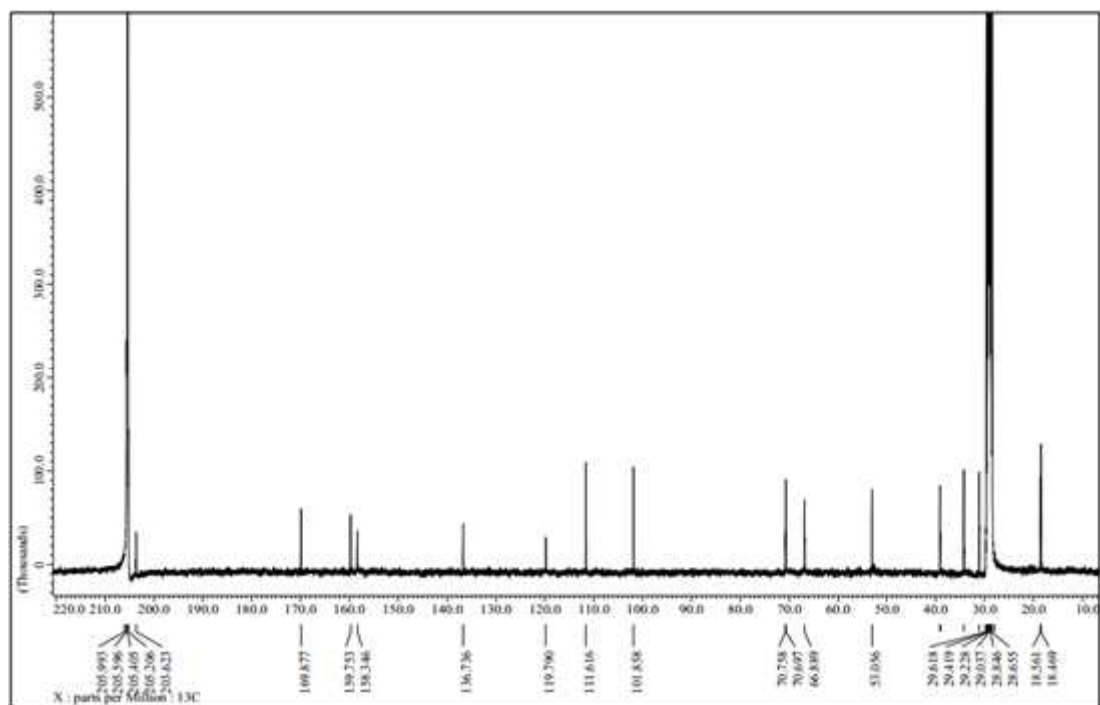


Figure 17. ^{13}C NMR spectra of SF5859-3732

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5859-3732

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ (ppm)	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, J in Hz)
1	169.87	C	-
2	39.08	CH_2	3.68 (d, 15.2)
			3.81 (d, 15.2)
3	136.73	C	-
4	111.61	CH	6.33 (d, 2.0)
5	159.75	C	-
6	101.85	CH	6.41 (d, 2.0)
7	158.34	C	-
8	119.79	C	-
9	203.62	C	-
10	53.05	CH_2	3.29 (dd, 14.0, 4.5)
			3.06 (dd, 14.0, 10.0)
11	66.88	CH	3.98 (m)
12	34.27	CH_2	1.4 (m)
			1.7 (m)
13	18.56	CH_2	1.5 (m)
14	31.13	CH_2	1.4 (m)
			1.7 (m)
15	70.75	CH	4.93 (m)
16	18.46	CH_3	1.1 (d, 6.4)

^arecorded in Acetone- d_6 , ^b100 MHz, ^c400 MHz

[별첨 1-3-6] SF5859-452 (11- α -methoxycurvularin)

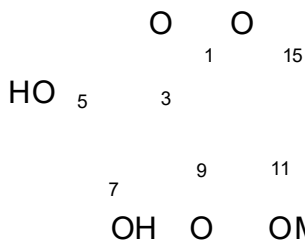


Figure 18. Structure of SF5859-452

SF5859-452의 Mass data를 통해 $C_{17}H_{22}O_6$ 의 분자식을 확인하였다. SF5859-452의 ^1H NMR 스펙트럼에서 olefinic protons δ 6.33 (H-4), 6.43 (H-6), oxygenated methine protons δ 4.79 (H-15), 3.66 (H-11), methoxyl proton δ 3.30 (11-OCH₃)가 나타났다. Acetone-*d*₆ 용매에서 측정된 ^1H NMR 스펙트럼의 비교를 통해 화합물 SF5859-372 [(11R,15R)-11-hydroxycurvularin]와 유사한 골격을 가지지만 11번 탄소위치에 methoxy 작용기가 다른 것을 확인하였다. 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 optical rotation을 측정하여 $[\alpha]_D^{25} = -23.4$ (EtOH) 값과 reference 값 $[\alpha]_D^{25} = -17.0$ (EtOH)과 비교하였고 reference에서 사용한 CDCl_3 용매에서 측정된 ^1H NMR 스펙트럼과의 비교를 통해 SF5859-452의 구조는 11- α -methoxycurvularin 구조로 동정되었다. [참고문헌 18]

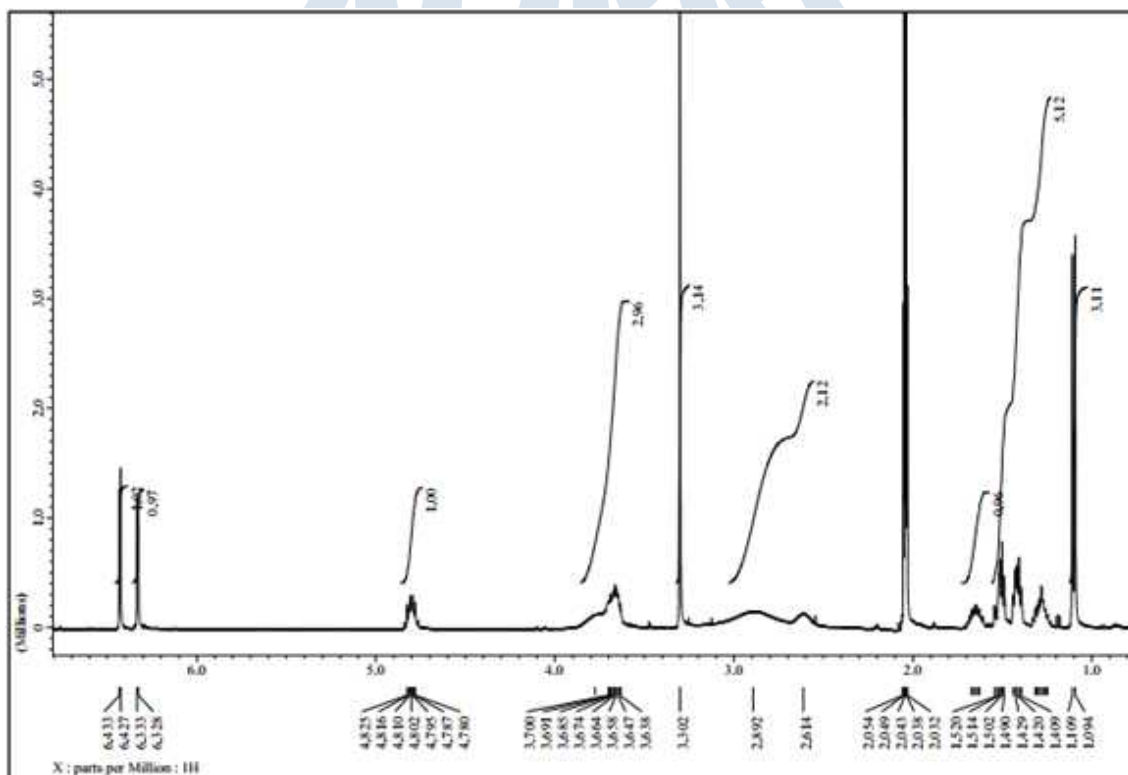


Figure 19. ^1H NMR spectra of SF5859-452

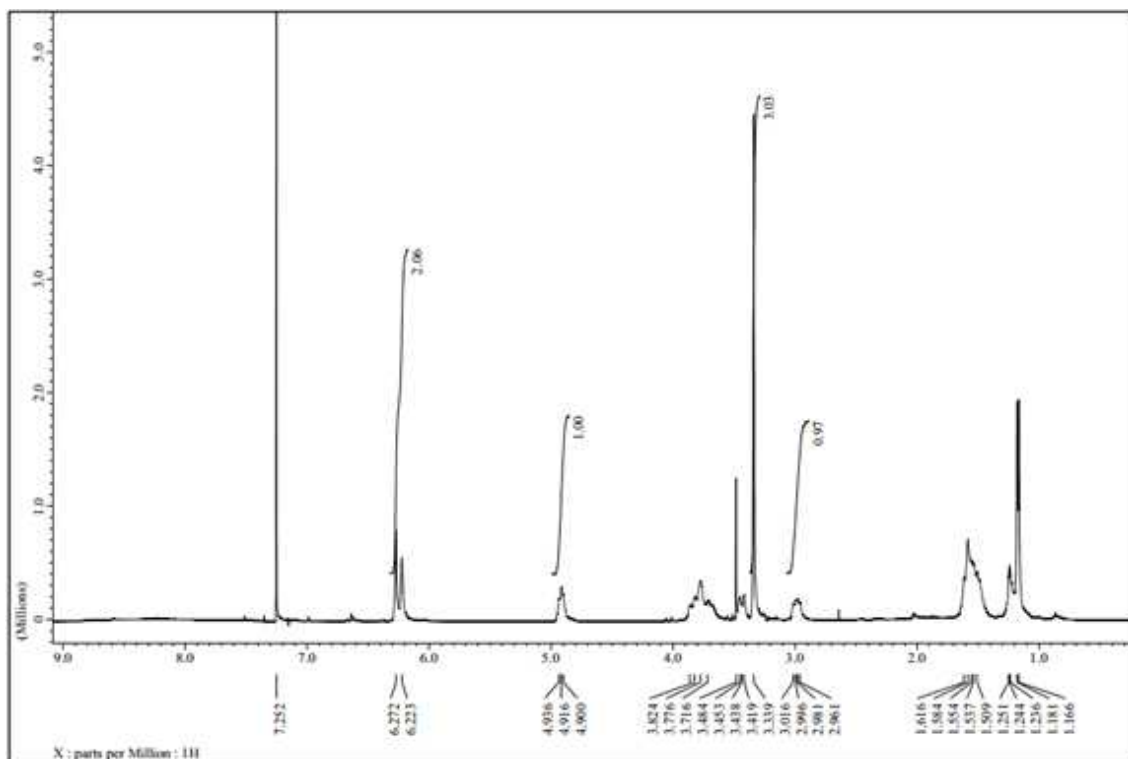


Figure 20. ^1H NMR spectra of SF5859-452

Table 6. ^1H NMR data of SF5859-452

Positon	SF5859-452		11- α -methoxycurcularin
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (mult, J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{c,b}}$ (mult, J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{c,b}}$ (mult, J in Hz)
1	-	-	-
2a	3.77 (br)	3.71-3.86 (overlap)	3.70 (dd, 15.6, 6.8)
2b	3.77 (br)	3.71-3.86 (overlap)	3.89 (d, 15.6)
3	-	-	-
4	6.32 (d, 2.0)	6.22 (s)	6.22 (d, 1.6)
5	--	-	-
6	6.42 (d, 2.0)	6.27 (s)	6.29 (d, 1.6)
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10a	2.61 (br)	2.89 (br)	3.01 (dd, 14.8, 8.8)
10b	2.89 (br)	3.43 (br)	3.39 (d, 12.0)
11	3.65 (m)	3.80 (br)	3.81 (d, 3.6)
12	1.42 (m)	1.51-1.61 (overlap)	1.53-1.62 (overlap)
13a	1.30 (m)	1.51-1.61 (overlap)	1.53-1.62 (overlap)
13b	1.65 (m)	1.51-1.61 (overlap)	1.53-1.62 (overlap)
14	1.50 (m)	1.51-1.61 (overlap)	1.53-1.62 (overlap)
15	4.80 (m)	4.91 (m)	4.92 (t, 6.8)
16	1.10 (d, 6.0)	1.17 (d, 6.0)	1.19 (d, 7.2)
17	3.30 (s)	3.34 (s)	3.36 (s)

^arecorded in Acetone- d_6 , ^b400 MHz, ^crecorded in CDCl_3

[별첨 1-3-7] SF5859-3622 (11-β-methoxycurvularin)

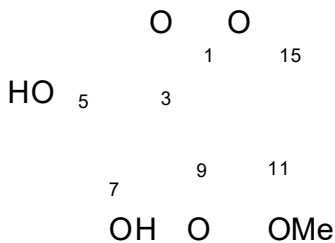


Figure 21. Structure of SF5859-3622

SF5859-3622의 ^1H NMR 스펙트럼에서 olefinic protons δ 5.95 (H-4), 6.34 (H-6), oxygenated methine protons δ 5.13 (H-15), 3.78 (H-11), methoxyl proton δ 3.25 (11-OCH₃), 5개의 methylene protons과 methyl proton δ 1.24 (H-16)이 나타났다. 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 optical rotation을 측정하여 11-β-methoxycurvularin 과 비교하였고 reference에서 측정한 ^1H NMR 스펙트럼과의 비교를 통해 SF5859-3622의 구조는 11-β-methoxycurvularin 구조로 동정되었다. [참고문헌 18]

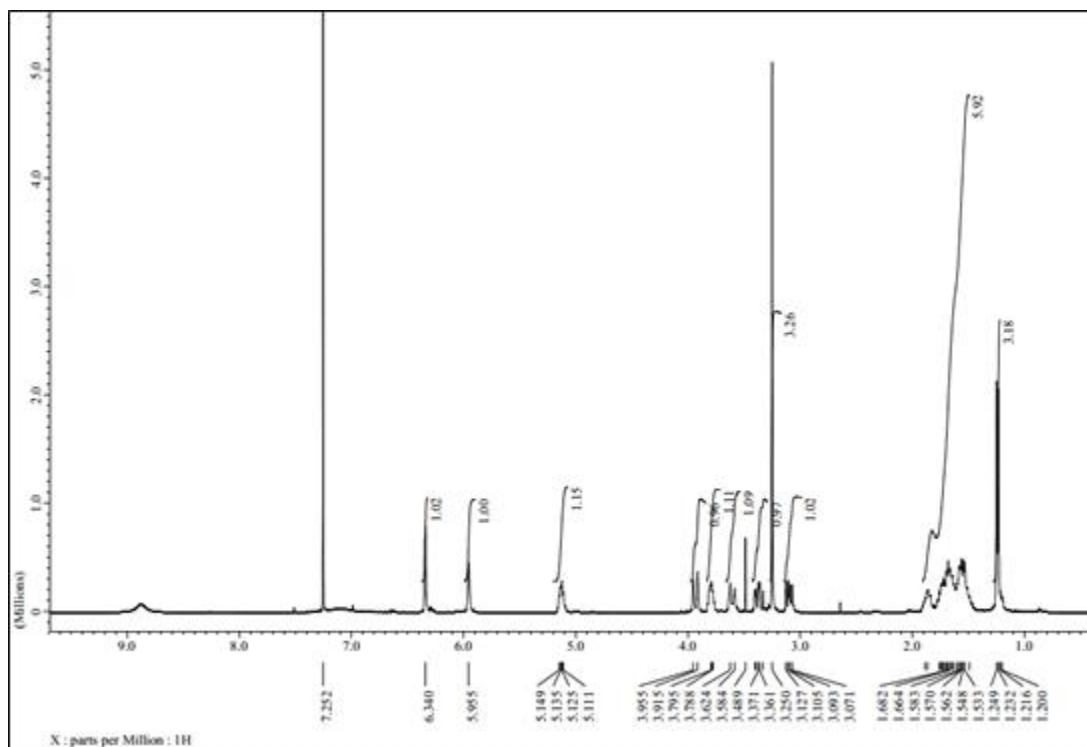
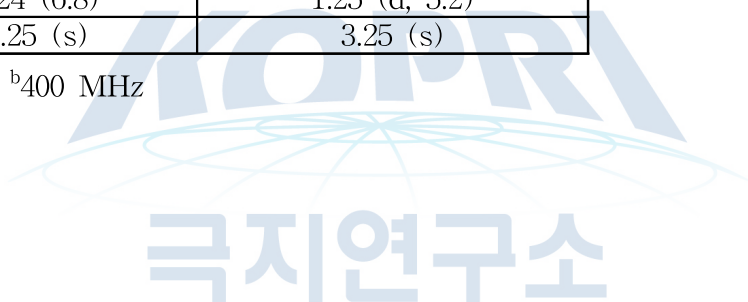


Figure 22. ^1H NMR spectrum of SF5859-3622

Table 7. ^1H NMR data of SF5859-3622

Position	SF5859-3622	11- β -methoxycurvularin
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (mult, J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (mult, J in Hz)
1	-	-
2a	3.60 (d, 16.0)	3.59 (d, 16.5)
2b	3.93 (d, 16.0)	3.95 (d, 15.9)
3	-	-
4	5.95 (s)	5.97 (d, 2.4)
5	-	-
6	6.34 (s)	6.34 (d, 2.4)
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10a	3.10 (dd, 13.6, 8.8)	3.13 (dd, 14.1, 8.1)
10b	3.38 (dd, 13.6, .0)	3.33 (d, 5.2)
11	3.78 (m)	3.78 (d, 14.1)
12	1.53-1.86 (overlap)	1.55-1.87 (overlap)
13	1.53-1.86 (overlap)	1.55-1.87 (overlap)
14	1.53-1.86 (overlap)	1.55-1.87 (overlap)
15	5.13 (m)	5.13 (t, 6.0)
16	1.24 (6.8)	1.25 (d, 5.2)
17	3.25 (s)	3.25 (s)

^arecorded in CDCl_3 , ^b400 MHz



[별첨 1-3-8] SF5859-343 (curvularin B)

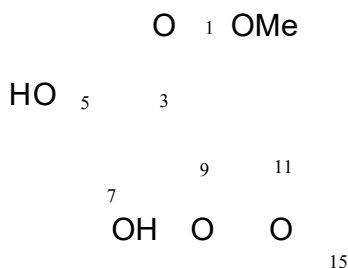


Figure 23. Structure of SF5859-343

SF5859-343의 ^1H NMR 스펙트럼에서 olefinic protons δ 6.30 (H-4), 6.32 (H-6), oxygenated methine protons δ 3.40 (H-15), 3.66 (H-11), methoxyl proton δ 3.60 (17-OCH₃), methylene protons δ 3.57 (H-2), 3.69 (H-2), 2.86 (H-10), 3.04 (H-10), methyl proton δ 1.05 (16-H)이 나타났다. SF5859-343의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 carbonyl carbon δ 204.0 (C-9), ester carbon δ 171.3 (C-1), aromatic carbons δ 160.08 (C-7), 160.06 (C-5), 136.3 (C-3), 120.0 (C-8), 112.0 (c-4), 102.0 (C-6), oxygenated methine carbons δ 75.8 (C-11), 73.9 (C-15), methoxyl carbon δ 51.0 (C-17), methylene carbons δ 50.4 (C-10), 38.9 (C-2), 33.0 (C-13), 31.0 (C-12), 23.3 (C-14), methyl carbon δ 21.5 (C-16) 이 나타났다.

^1H NMR 과 ^{13}C NMR 스펙트럼을 통해 curvularin 평면구조가 확인되었다. 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 optical rotation을 측정하여 $[\alpha]_D = -15.2$ (EtOH) 값과 reference 값 $[\alpha]_D = -22.0$ (EtOH)과 비교하여 입체구조를 확인하였고, reference에서 사용한 CDCl₃ 용매에서 측정한 ^1H NMR 스펙트럼과의 비교를 하였으나 용해도가 좋지 않아 acetone-*d*₆의 NMR 분석을 통해 SF5859-343의 구조는 curvularin B 구조로 동정되었다. [참고문헌 19]

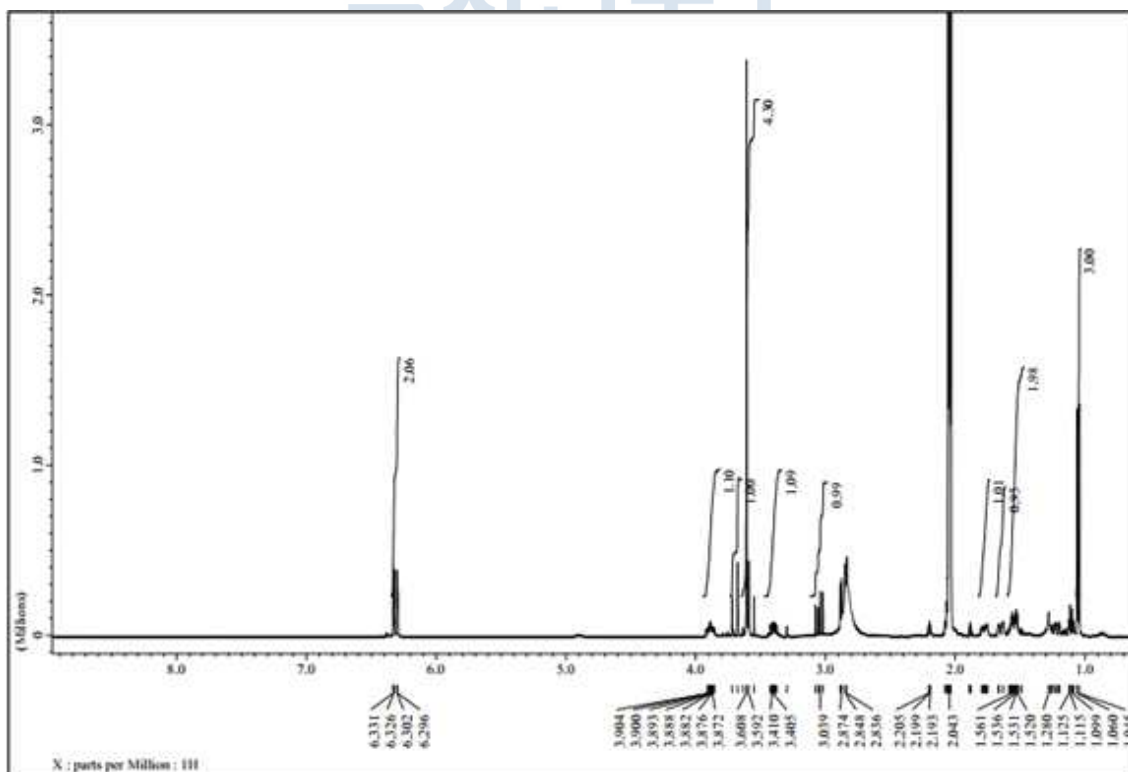


Figure 24. ^1H NMR spectra of SF5859-343 recorded in Acetone-*d*₆

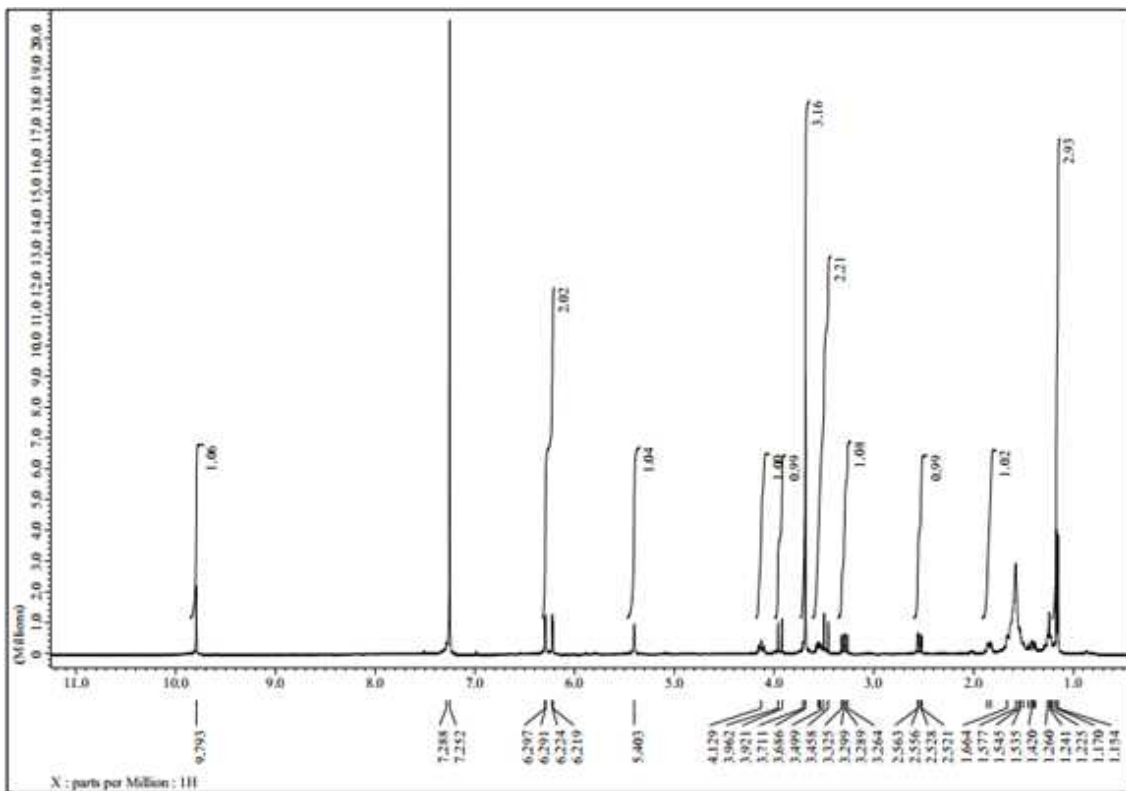


Figure 25. ^1H NMR spectra of SF5859-343 recorded in CDCl_3

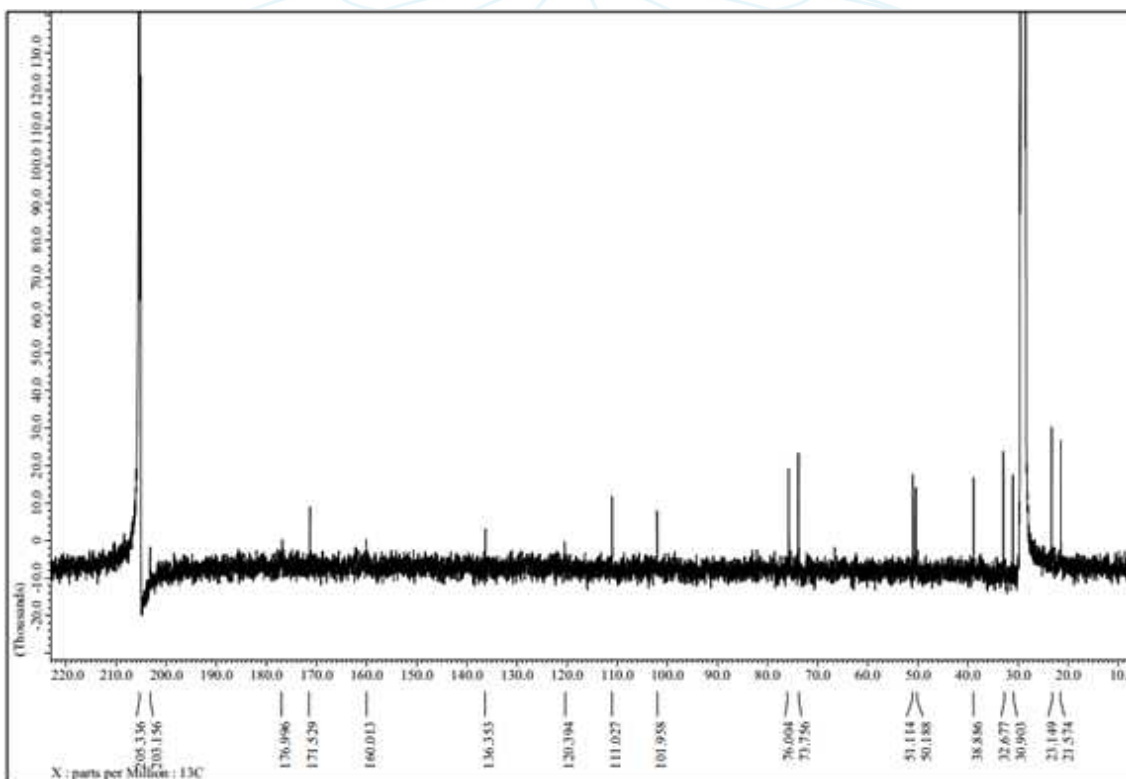


Figure 26. ^{13}C NMR spectra of SF5859-343 recorded in $\text{Acetone-}d_6$

Table 8. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5859-343

Position	SF5859-343				Curvularin B
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ (ppm)	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d,c}}$ (mult, J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d,c}}$ (mult, J in Hz)
1	171.33	C_{q}	-	-	-
2a	38.88	CH_2	3.57 (d, 16.4)	3.47 (d, 16.4)	3.54 (d, 16.6)
2b			3.69 (d, 16.4),	3.94 (d, 16.4)	3.94 (d, 16.6)
3	136.3	C_{q}	-	-	-
4	111.02	CH	6.30 (d, 2.4)	6.22 (d, 2.4)	6.21 (d, 2.4)
5	160.06	C_{q}	-	-	-
6	102.02	CH	6.32 (d, 2.4)	6.29 (d, 2.4)	6.27 (d, 2.4)
7	160.08	C_{q}	-	-	-
8	120	C_{q}	-	-	-
9	203.15	C_{q}	-	-	-
10a	50.39	CH_2	2.86 (dd, 15.2, 8.4)	3.29 (dd, 14.4, 10.4)	3.33 (dd, 14.3, 10.1)
10b			3.04 (dd, 15.2, 8.4)	2.54 (dd, 14.4, 2.8)	2.58 (dd, 14.3, 3.2)
11	75.79	CH	3.88 (m)	4.13 (m)	4.15 (m, 10.1, 3.2)
12a	31.04	CH_2	1.28 (m)	1.41 (m)	1.43 (m, 13.5, 3.7)
12b			1.64 (m)	1.53-1.66 (overlap)	1.68 (m, 13.5)
13a	32.95	CH_2	1.12 (m)	1.53-1.66 (overlap)	1.59 (m)
13b			1.54 (m)	1.85 (m)	1.88 (m, 3.6, 3.7)
14a	23.32	CH_2	1.54 (m)	1.24 (m)	1.27 (m, 9.1, 3.6)
14b			1.76 (m)	1.53-1.66 (overlap)	1.62 (m, 2.1)
15	73.86	CH	3.40 (m)	3.56 (m)	3.58 (m, 6.1, 9.1, 2.1)
16	21.46	CH_3	1.05 (d, 6.4)	1.16 (d, 6.4)	1.19 (d, 6.1)
17	51.01	CH_3	3.60 (s)	3.68 (s)	3.71 (s)

^arecorded in Acetone- d_6 , ^b100 MHz, ^c400 MHz, ^drecorded in CDCl_3

[별첨 1-3-9] SF5859-38311 (new compound)

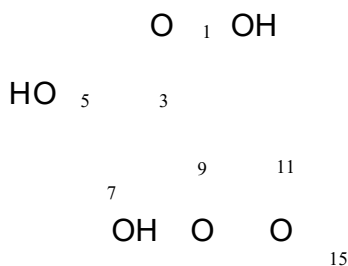


Figure 27. Structure of SF5859-38311

SF5859-38311의 ^1H NMR 스펙트럼에서 olefinic protons δ 6.35 (H-4), 6.47 (H-6), oxygenated methine protons δ 4.16 (H-11), 3.51-3.59 (H-15), methylene protons, methyl proton δ 1.18 (H-16)이 나타났다. SF5859-38311의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 carbonyl carbon δ 207.3 (C-9), ester carbon δ 172.6 (C-1), aromatic methine carbons δ 111.8 (C-4), 105.0 (C-6), oxygenated methine carbons δ 78.7 (C-11), 75.4 (C-15)가 나타났고, 4개의 aromatic quaternary carbons과 4개의 methylene carbons과 methyl carbon이 나타났다.

^1H NMR 과 ^{13}C NMR 스펙트럼을 통해 화합물 SF5859-343 (curvularin B)와 유사한 골격을 가지지만 1번 탄소위치에 methoxy 작용기가 없고 hydroxyl 작용기가 있는 것을 확인하였다. 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 optical rotation을 측정하여 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +13.66$ (EtOH) 값과 reference 값 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -22.0$ (EtOH)과 비교하여 입체구조를 확인하였으나 선광도 값이 일치하지 않아 입체구조는 불명확한 상태이다. reference에서 사용한 CDCl_3 용매에서 측정한 ^1H NMR 스펙트럼과의 비교를 하였으나 용해도가 좋지 않아 acetone- d_6 용매상의 NMR 분석을 통해 SF5859-38311의 구조는 새로운 구조로 동정되었다. [참고문헌 19]

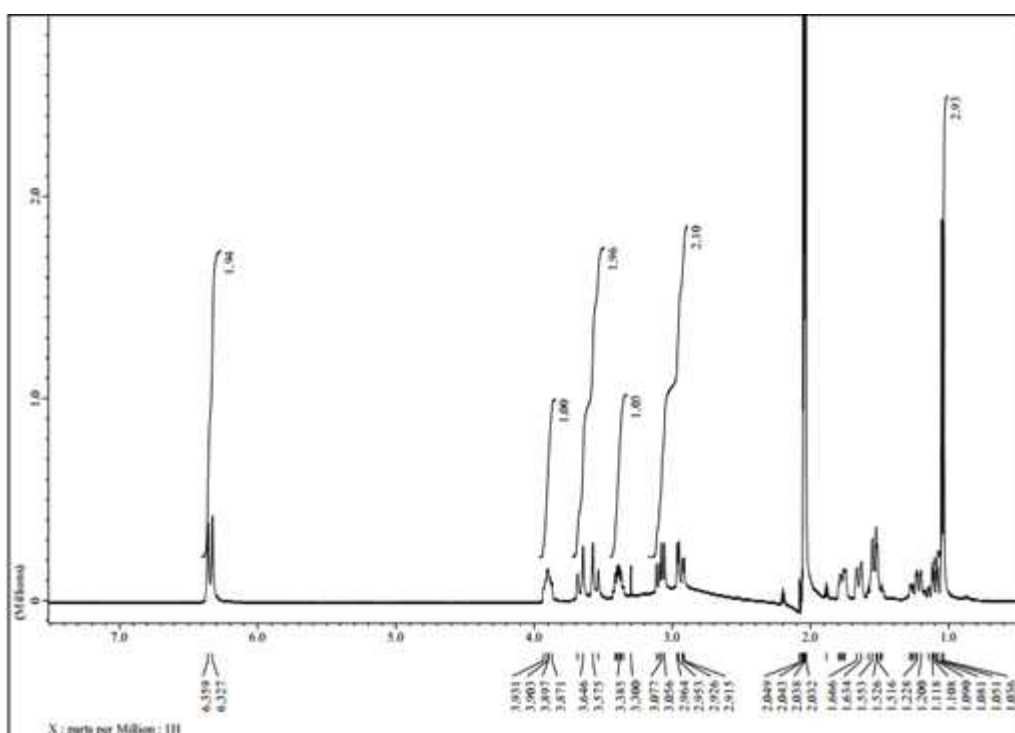


Figure 28. ^1H NMR spectra of SF5859-38311 recorded in Acetone- d_6

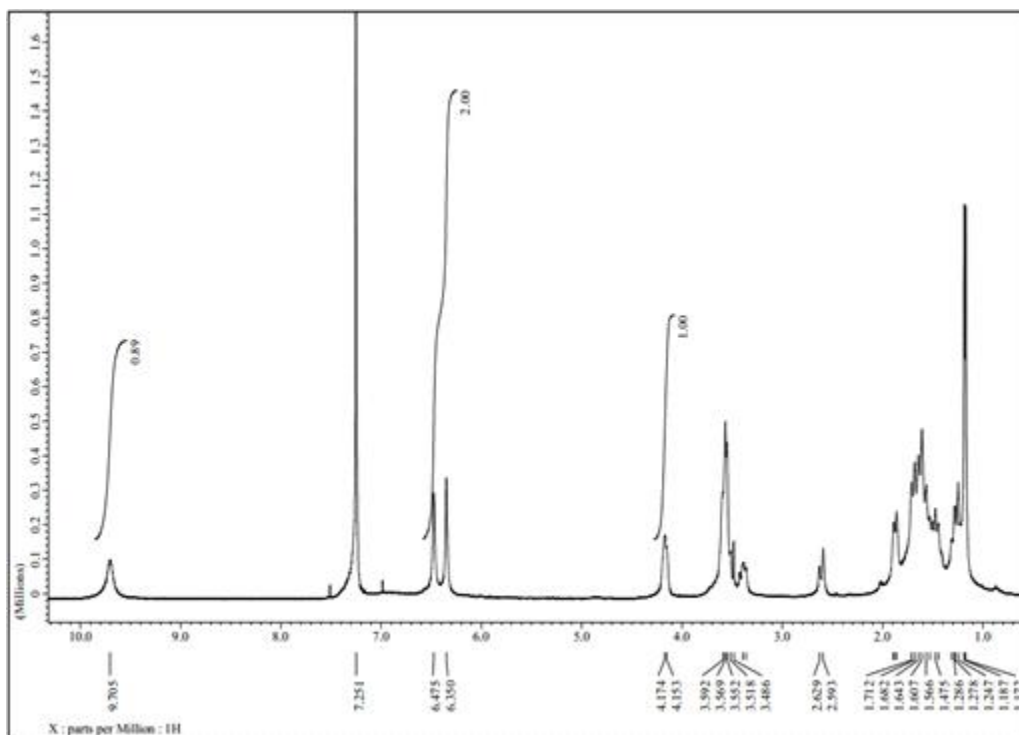


Figure 29. ^1H NMR spectra of SF5859-38311 recorded in CDCl_3

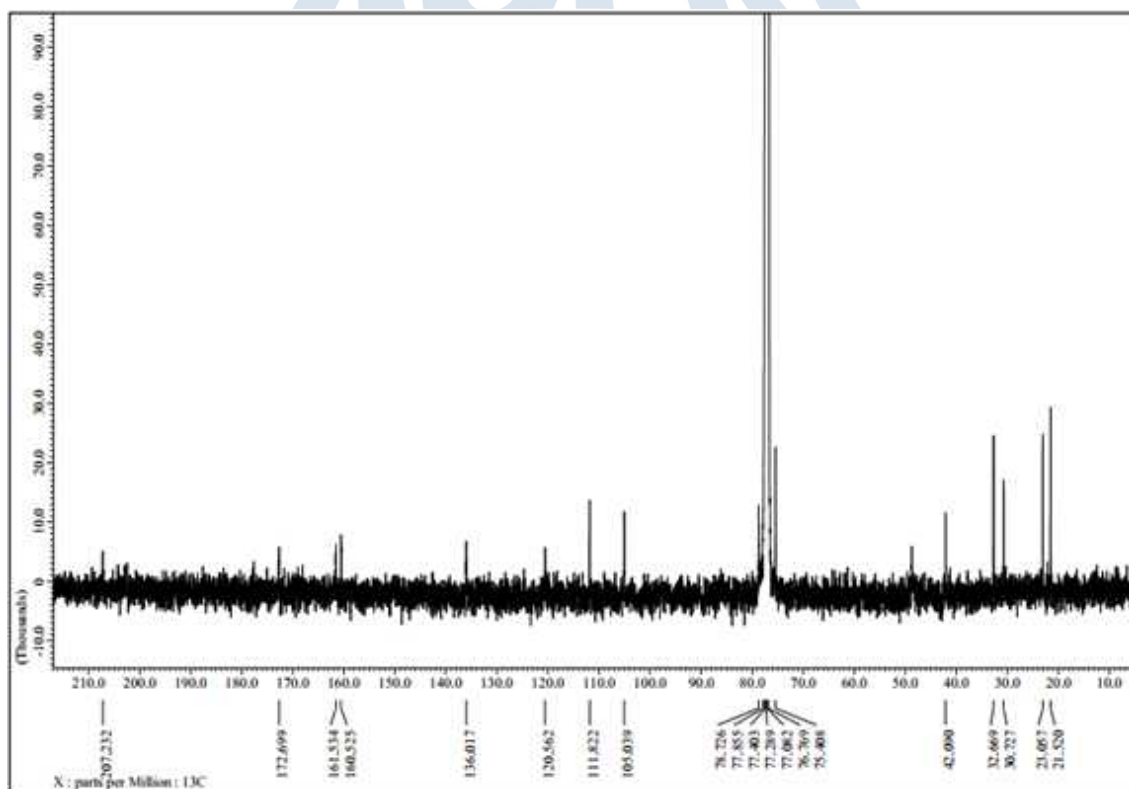


Figure 30. ^{13}C NMR spectra of SF5859-38311 recorded in CDCl_3

Table 9. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5859-38311

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ (ppm)	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (mult, J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{d,e}}$ (mult, J in Hz)
1	172.64	C_{q}	-	-
2	42.08	CH_2	3.51-3.59 (overlap)	3.55 (d, 15.6)
				3.66 (d, 15.6)
3	136.01	C_{q}	-	-
4	111.82	CH	6.35 (s)	6.32 (s)
5	161.53	C_{q}	-	-
6	105.03	CH	6.47 (s)	6.35 (s)
7	160.52	C_{q}	-	-
8	120.47	C_{q}	-	-
9	207.32	C_{q}	-	-
10	48.55	CH_2	3.39 (m)	3.08 (dd, 15.2, 8.4)
			2.61 (br)	2.93 (dd, 15.2, 4.8)
11	78.72	CH	4.16 (brd)	3.89 (m)
12	30.72	CH_2	1.44-1.71 (overlap)	1.53 (brd, 13.2)
				1.65 (brd, 13.2)
13	32.66	CH_2	1.44-1.71 (overlap)	1.22 (m)
				1.77 (m)
14	23.05	CH_2	1.27 (m)	1.10 (m)
				1.54 (overlap)
15	75.4	CH	3.51-3.59 (overlap)	3.38 (m)
16	21.52	CH_3	1.18 (d, 6.0)	1.04 (d, 6.0)
OH	-	-	9.70 (brs)	-

^arecorded in CDCl_3 , ^b100 MHz, ^c400 MHz, ^drecorded in Acetone- d_6

[별첨 1-3-10] SF5859-3731 (unknown)

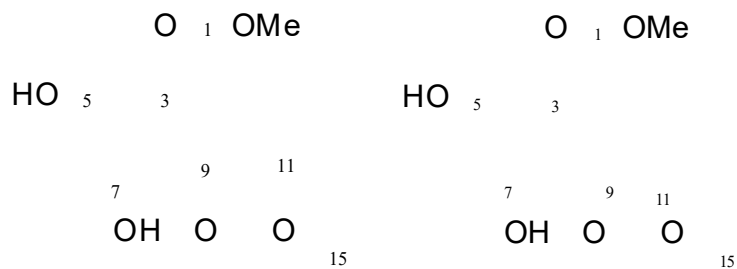


Figure 31. Structure and 2D NMR correlation of SF5859-3731

SF5859-3731의 ^1H NMR 과 ^{13}C NMR 스펙트럼을 통해 화합물 SF5859-343 (curvularin B) 와 유사한 골격을 가지는 것을 확인하였다. 화합물의 정확한 구조를 확인하기 위하여 COSY 와 HMBC 스펙트럼을 측정하였다. COSY 스펙트럼을 통해 $\text{H}_{16}\text{-H}_{15}\text{-H}_{14}\text{-H}_{13}\text{-H}_{12}\text{-H}_{11}\text{-H}_{10}$ correlation을 확인하였다. HMBC 스펙트럼을 통해 δ 3.60 (H-17)에서 δ 171.7 (C-1)로의 correlation, δ 3.62 (H-2a), 3.75 (H-2b)에서 δ 171.7 (C-1), 136.5 (C-3), 111.2 (C-4), 120.2 (C-8)로의 correlation, δ 2.98 (H-10)에서 δ 205.2 (C-9), 69.0 (C-11)로의 correlation을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 curvularin B 구조와 평면구조가 일치하는 것을 확인하였다. optical rotation을 측정하여 $[\alpha]_{\text{D}}=+24.16$ (EtOH) 값과 reference 값 $[\alpha]_{\text{D}}=-22.0$ (EtOH)과 비교하여 입체구조를 확인하였으나 선광도 값이 일치하지 않아 입체구조는 불명확한 상태이다. [참고문헌 19]

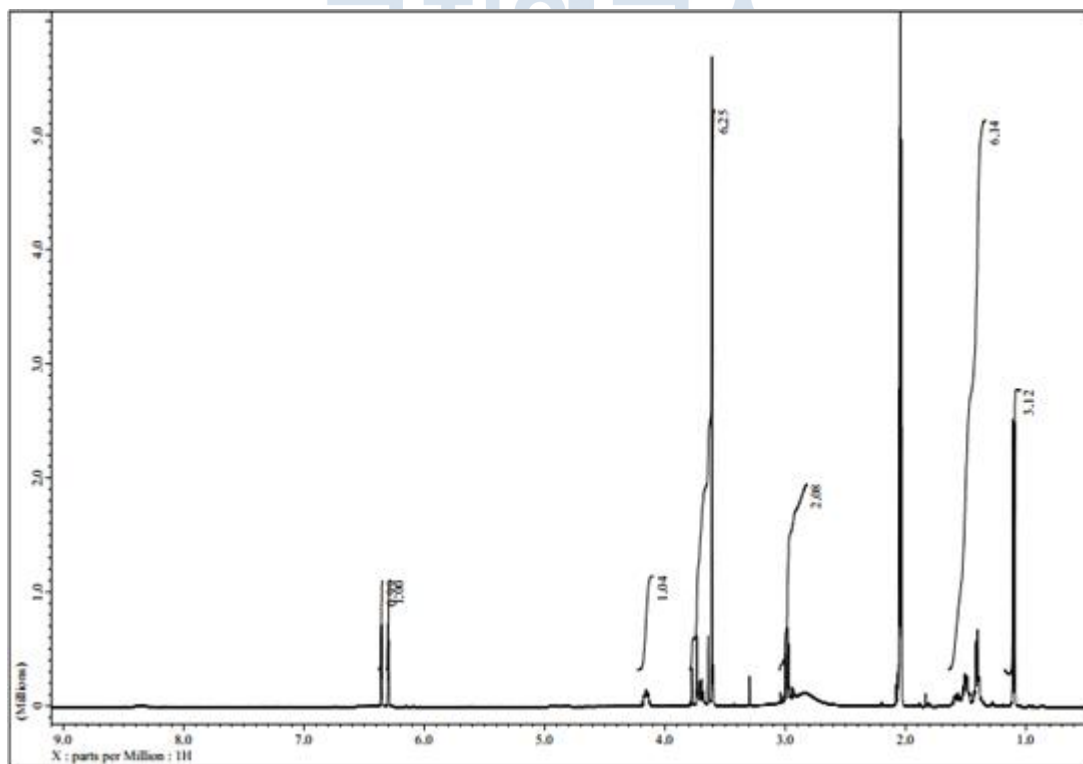


Figure 32. ^1H NMR spectrum of SF5859-3731 recorded in Acetone- d_6

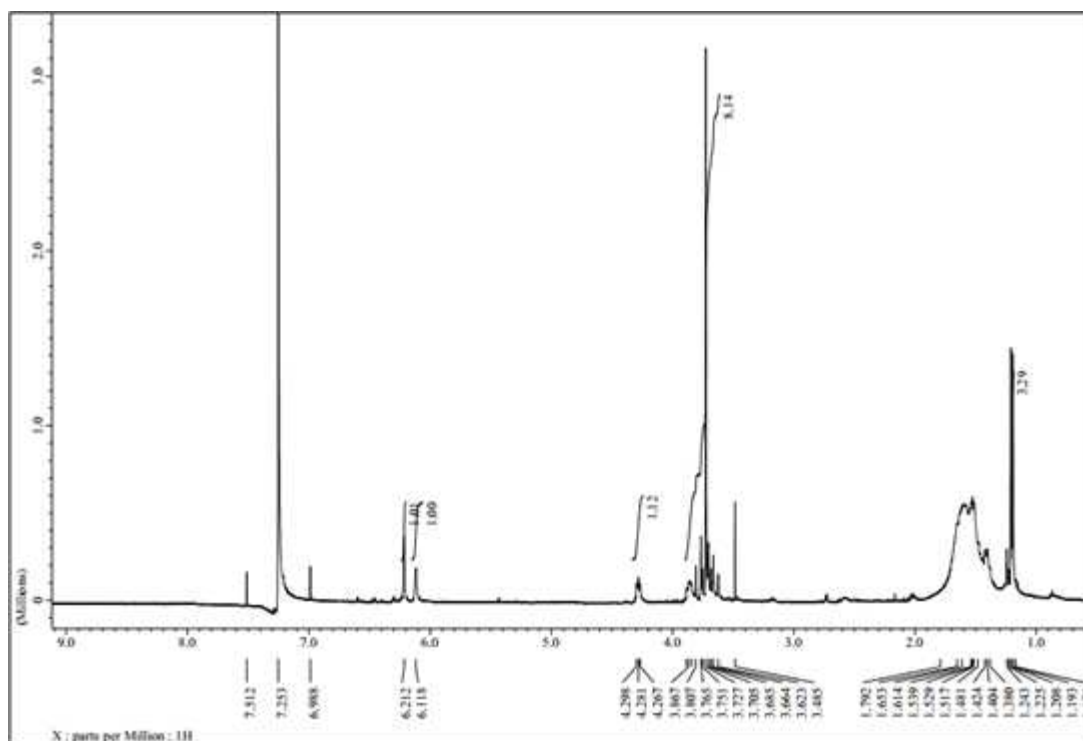


Figure 33. ^1H NMR spectrum of SF5859-3731 recorded in CDCl_3

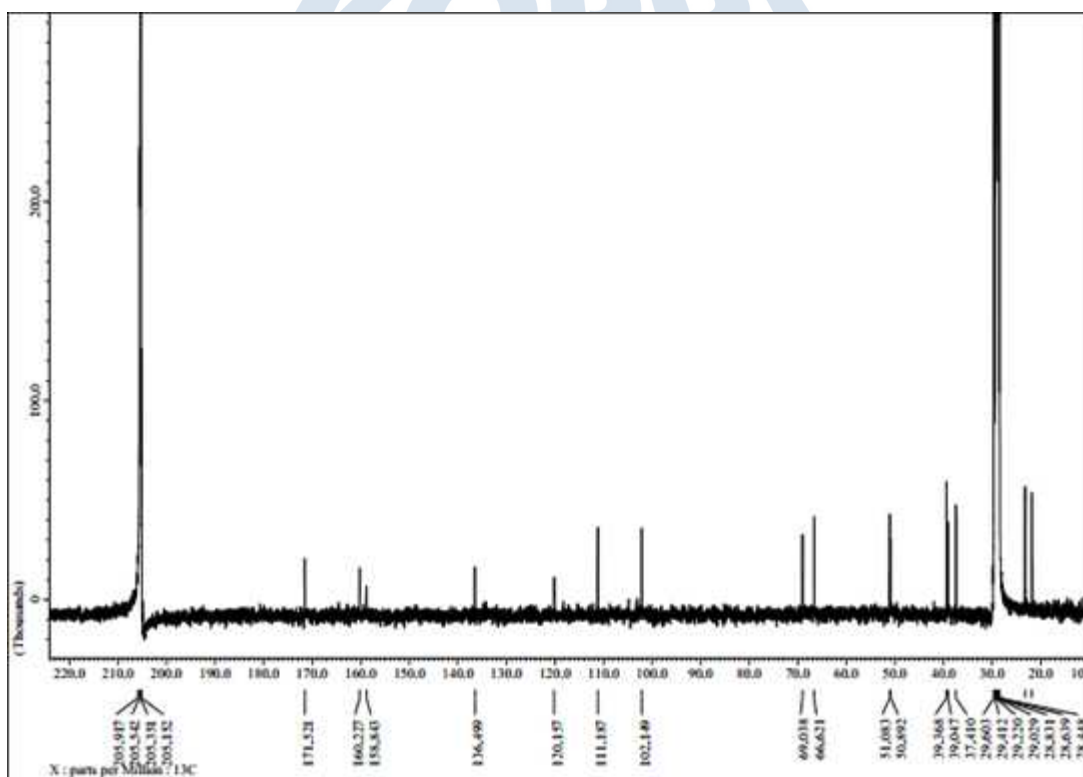


Figure 34. ^{13}C NMR spectrum of SF5859-3731

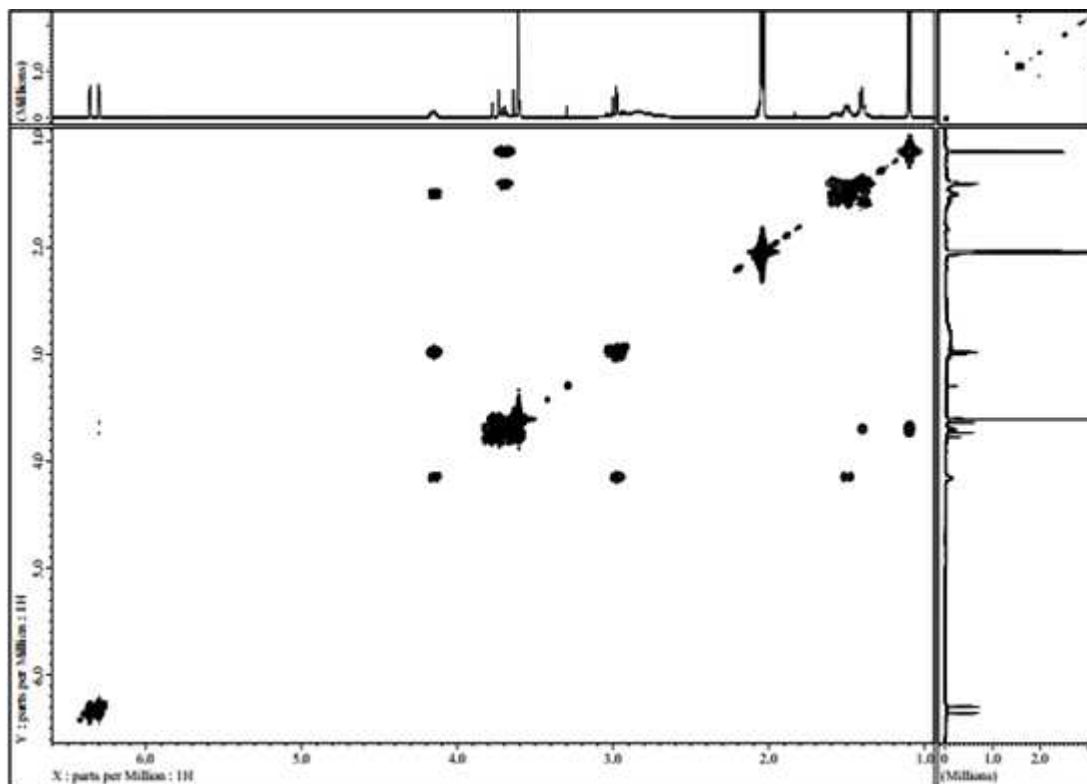


Figure 35. ^1H - ^1H COSY spectrum of SF5859-3731

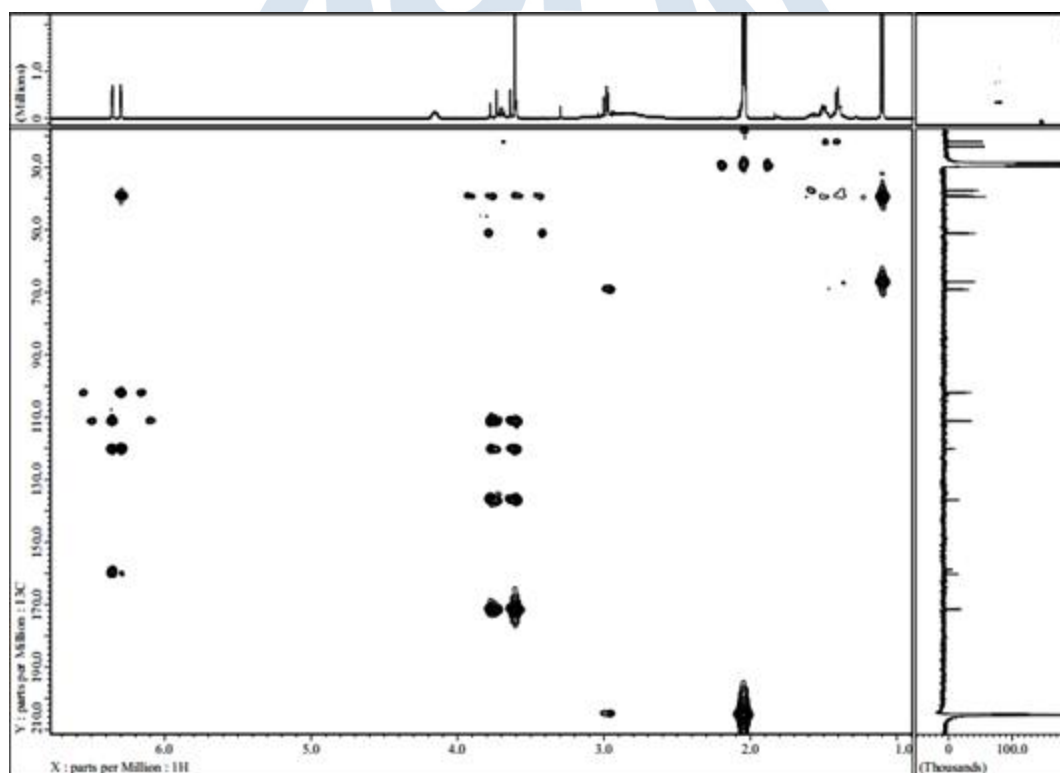


Figure 36. ^1H - ^{13}C HMBP spectrum of SF5859-3731

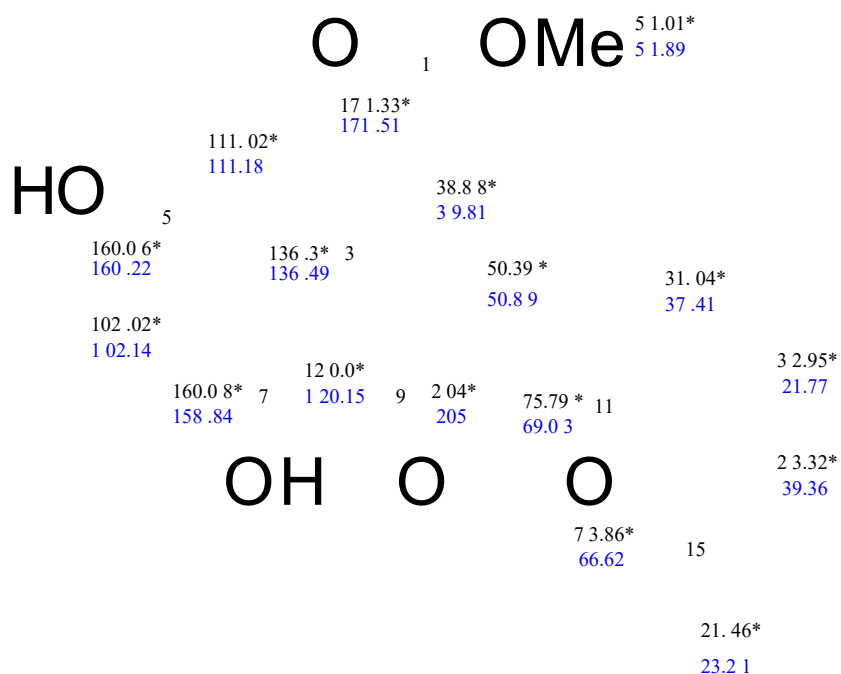


Figure 37. Comparison ^{13}C NMR data (recorded in same Acetone- d_6) between SF5859-3731 and SF5859-343(*)

Table 10. ^1H and ^{13}C data of SF5859-3731

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$ (ppm)	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (mult, J in Hz)	HMBC	COSY
1	171.51	C_{q}	-	-	-
2a	39.04	CH_2	3.62 (d, 16.4)	1, 3, 4, 8	2
2b			3.75 (d, 16.4)		
3	136.49	C_{q}	-	-	-
4	111.18	CH	6.29 (d, 2.0)	2, 6, 8	6
5	160.22	C_{q}	-	-	-
6	102.14	CH	6.35 (d, 2.0)	4, 8, 7	4
7	158.84	C_{q}	-	-	-
8	120.15	C_{q}	-	-	-
9	205.15	C_{q}	-	-	-
10a	50.89	CH_2	2.98 (m)	9, 11	11
10b			2.98 (m)		
11	69.03	CH	4.15 (m)	-	10, 12
12	37.41	CH_2	1.5 (m)	13, 14, 11	11, 13
13	21.77	CH_2	1.4 overlap		12, 14
14	39.36	CH_2	1.4 overlap	13, 11	13, 15
15	66.62	CH	3.7 (q, 6.4)	13	14, 16
16	23.21	CH_3	1.1 (d, 6.4)	15, 14	15
17	51.89	CH_3	3.6 (s)	1	-

^arecorded in Acetone- d_6 , ^b100 MHz, ^c400 MHz

○ 1차년도 세부목표 1-4: 활성 대사체의 활성 기작 검토

연구 내용	연구 결과
분리한 활성 대사체의 활성 기작 검토	- 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 항염증 활성 확인

[별첨1-4] 극지생물 유래 진균 SF5859로부터 분리한 대사체의 활성 검토

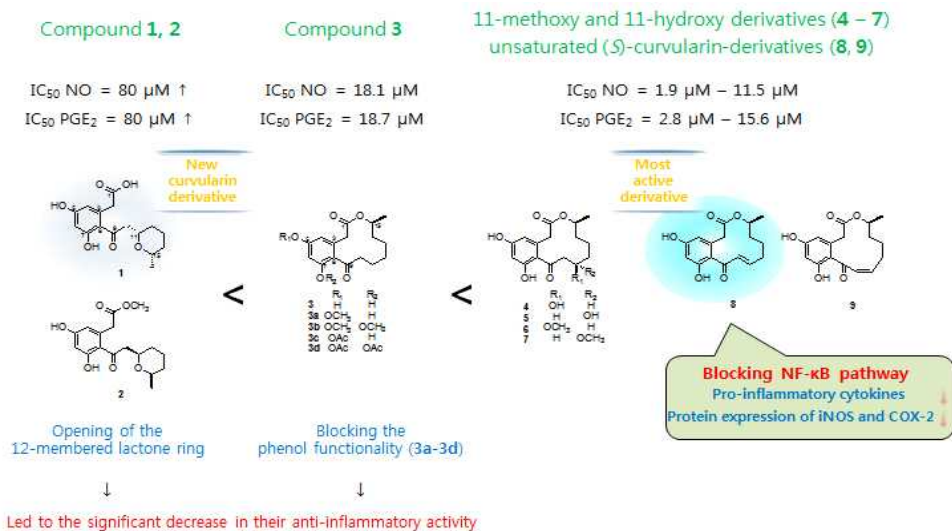
○ 극지생물 유래 미생물 SF5859로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 SF5859-311 외 8종의 대사체의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과 SF5859-41 외 6종은 항염 효과가 우수하게 나타났으며, 그 중 SF5859-33은 마우스 대식세포 유래 대식세포 (macrophage)에서 항염증 관련 기전 연구를 탐색하였음.

Table 11. Inhibitory Effects of 1 - 9 against NO and PGE₂ production in LPS-treated RAW264.7 macrophages

Compounds	IC ₅₀ (μM)		Cytotoxicity (μM) ^a
	NO	PGE ₂	
curvulone C (1)	>80	>80	> 80
curvulone B (2)	>80	>80	> 80
curvularin (3)	18.1 ± 5.2	18.7 ± 4.9	40
hydroxycurvularin (4)	11.5 ± 2.7	15.6 ± 5.2	40
(11S,15S) 11 hydroxycurvularin (5)	7.2 ± 1.6	14.1 ± 4.0	40
(11R,15S) 11 methoxycurvularin (6)	2.6 ± 0.4	3.0 ± 1.3	20
(11S,15S) 11 methoxycurvularin (7)	3.5 ± 0.5	6.0 ± 1.9	20
(10E,15S) 10,11 dehydrocurvularin (8)	1.9 ± 0.3	2.7 ± 0.4	20
(10Z,15S) 10,11 dehydrocurvularin (9)	4.4 ± 0.8	6.2 ± 1.1	20

^aThe maximum concentration not affecting cell viability.

○ 극지생물 유래 미생물 SF5859로부터 분리한 화합물 9종 및 유도체 4종에 대하여 항염증 활성을 구조활성 상관관계에 따라 비교하였음.



○ 5859-33 (compound **8**)의 항염증 효과 기전을 탐색하기 위하여 다음 연구를 진행하였음. 먼저 RAW264.7세포에서 pro-inflammatory mediator의 증강에 영향을 주는 protein인 cyclooxygenase (COX)-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현에 compound **8**이 미치는 영향을 알아 보고자 하였음. 그 결과 LPS 처리시 증가하던 COX-2, iNOS의 발현이 compound **8**을 농도별로 전 처리 하였을 때 현저하게 감소시킴을 확인하였음. 또한, 5859-33 (compound **8**)은 RAW264.7세포에서 LPS로 유발된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현을 현저히 억제시키는 효과가 있었음.

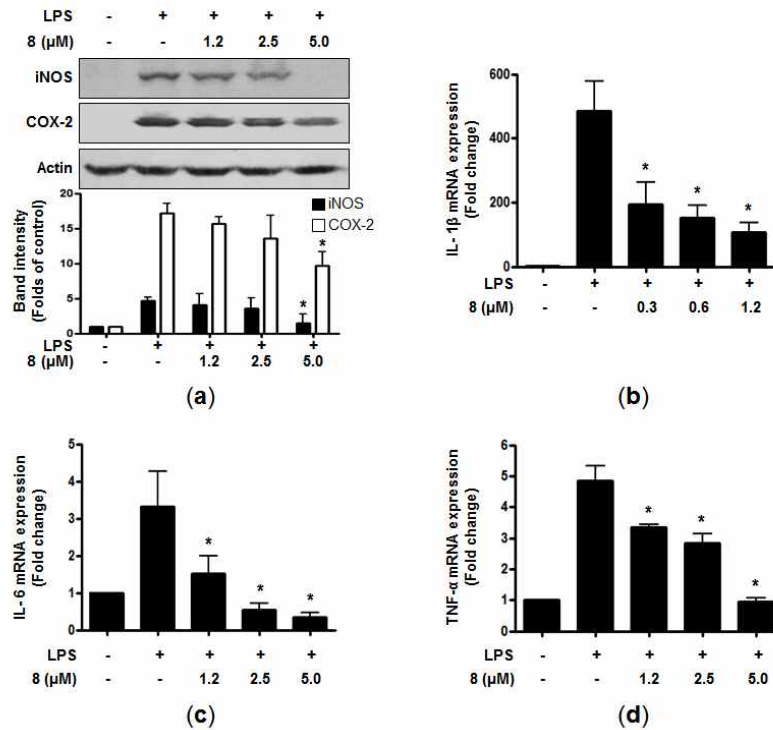


Figure 38. Effects of **8** on protein expression levels of iNOS and COX-2 (a), and mRNA expression levels of IL-1 β (*I11b*) (b), IL-6 (*I16*) (c), and TNF- α (*Tnf*) (d) in RAW264.7 macrophages. The cells were pre-treated for 3 h with the indicated concentrations of **8** and stimulated for 24 h (a), and 6h (b-d) with LPS (1 μ g/mL). The measurement of western blot analysis and RNA quantification for *I11b*, *I16*, and *Tnf* expression were performed as described in the Materials and Methods. Representative data from three independent experiments were shown. * $p < 0.05$ compared with the group treated with LPS.

○ 5859-33 (compound **8**) 의 항염증 효과 기전을 탐색하기 위하여 다음 연구를 진행하기 위해서 iNOS, COX-2 발현을 시키는 상위 signal 에 해당되는 nuclear factor κ B (NF- κ B) pathways 를 억제하는 효과가 있었음.

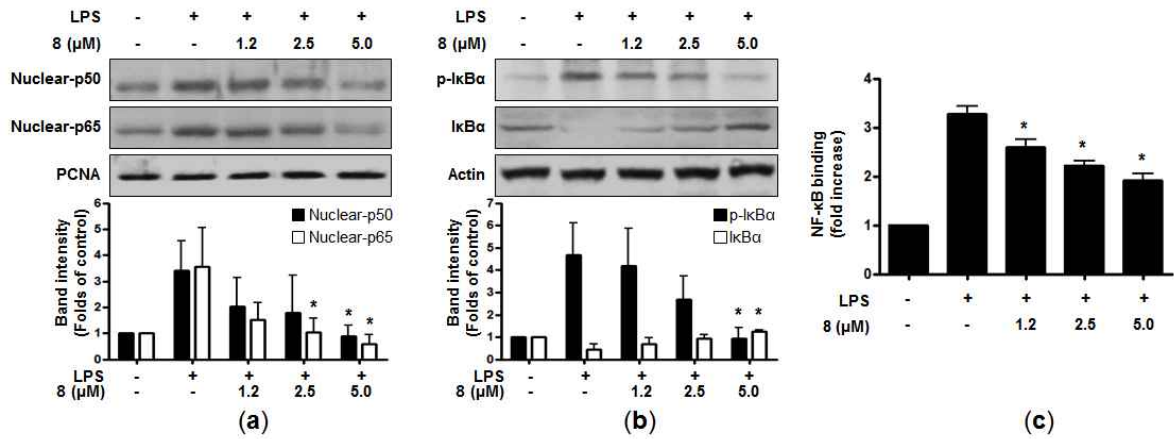


Figure 39. Effects of **8** on NF- κ B activation (nuclear-p50 and p65) (a), I κ B α phosphorylation and degradation (b), and the DNA binding activity of NF- κ B (c) in LPS-treated RAW264.7 macrophages. Cells were pre-treated with the indicated concentrations of **8** for 3 h and stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 1 h. Western blot analysis (I κ B α and p-I κ B α in the cytoplasm and NF- κ B in the nucleus) was performed as described in the Materials and Methods. Representative blots from three independent experiments were shown. A commercially available NF- κ B ELISA kit (Active Motif) was used to test the nuclear extracts and determine the degree of NF- κ B binding. The data shown represent the mean values of three independent experiments. * p < 0.05 compared with the group treated with LPS.

○ 5859-33 (compound **8**) 의 다른 항염증 활성 기전을 탐색하고자 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways에 미치는 영향에 대해 연구를 진행함. MAPK는 NF- κ B와 더불어 염증을 조절하는 주요한 인자라고 알려져 있음. MAPK 크게 세 가지 경로로 나뉘는데, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), p38이 있음. Compound **8**이 RAW264.7세포에서 MAPK에 미치는 영향을 알아보았으며, 그 결과 compound **8**이 LPS로 활성화되는 ERK, JNK, p38 MAPK 인산화에 영향이 없음을 확인하였음.

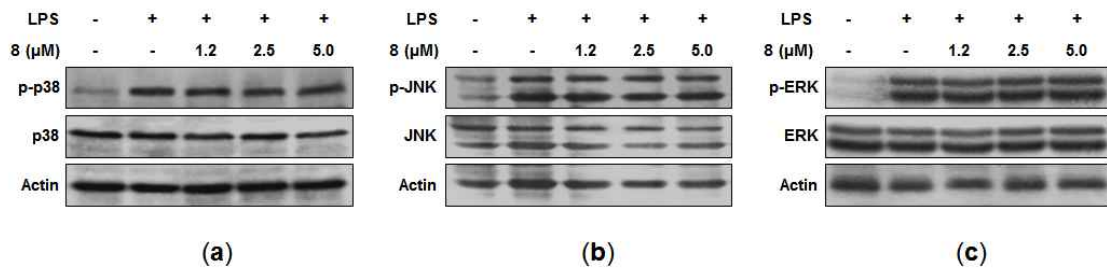


Figure 40. Effects of **8** on p38 (a), JNK (b), and ERK (c) phosphorylation in RAW264.7 macrophages. Cells were pre-treated with the indicated concentrations of **8** for 3 h and stimulated for 30 min with LPS (1 μg/mL). Cell extracts were subjected to western blotting with antibodies specific for phosphorylated-p38 (p-p38), phosphorylated JNK (p-JNK), or phosphorylated ERK1/2 (p-ERK). Membranes were stripped and re-probed to measure the total abundance of each MAPK as a control measurement. Representative blots from three independent experiments are shown.



□ 2차년도 세부목표 2: 극지고유생물자원으로부터 항염 생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴

○ 세부목표 2-1: 극지생물 유래 추출물의 제조

연구 내용	연구 결과
극지생물 시료를 이용하여 추출물 제작	- 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물 175 mg 외 15종의 균주배양 추출물 확보

[별첨 2-1] 극지생물 유래 시료를 이용한 추출물 제작 목록

NO	Sample ID	유래 소재	추출용매	추출물 무게
1	SF7078(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	175 mg
2	SF7078(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	78 mg
3	SF7086(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	220 mg
4	SF7086(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	1460 mg
5	SF7111(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	163.5 mg
6	SF7111(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	1500 mg
7	SF7123(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	70 mg
8	SF7123(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	70 mg
9	SF7136(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	936.3 mg
10	SF7142(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	15.1 mg
11	2017-Ant-001	극지 유래 해양생물	MeOH	70 g
12	2017-Ant-023	극지 유래 해양생물	MeOH	90 g
13	2017-Ant-031	극지 유래 해양생물	MeOH	48 g
14	2017-Ant-042	극지 유래 해양생물	MeOH	45 g
15	2017-Ant-102	극지 유래 해양생물	MeOH	59.44 g

○ 2차년도 세부목표 2-2: 생리활성 대사체의 분리

연구 내용	연구 결과
확보된 추출물에서 활성 대사체 분리 연구	- 전단계에서 확보된 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 8종의 대사체 분리

[별첨 2-2] 극지생물 유래 진균 SF5929로부터 이차대사물질의 분리

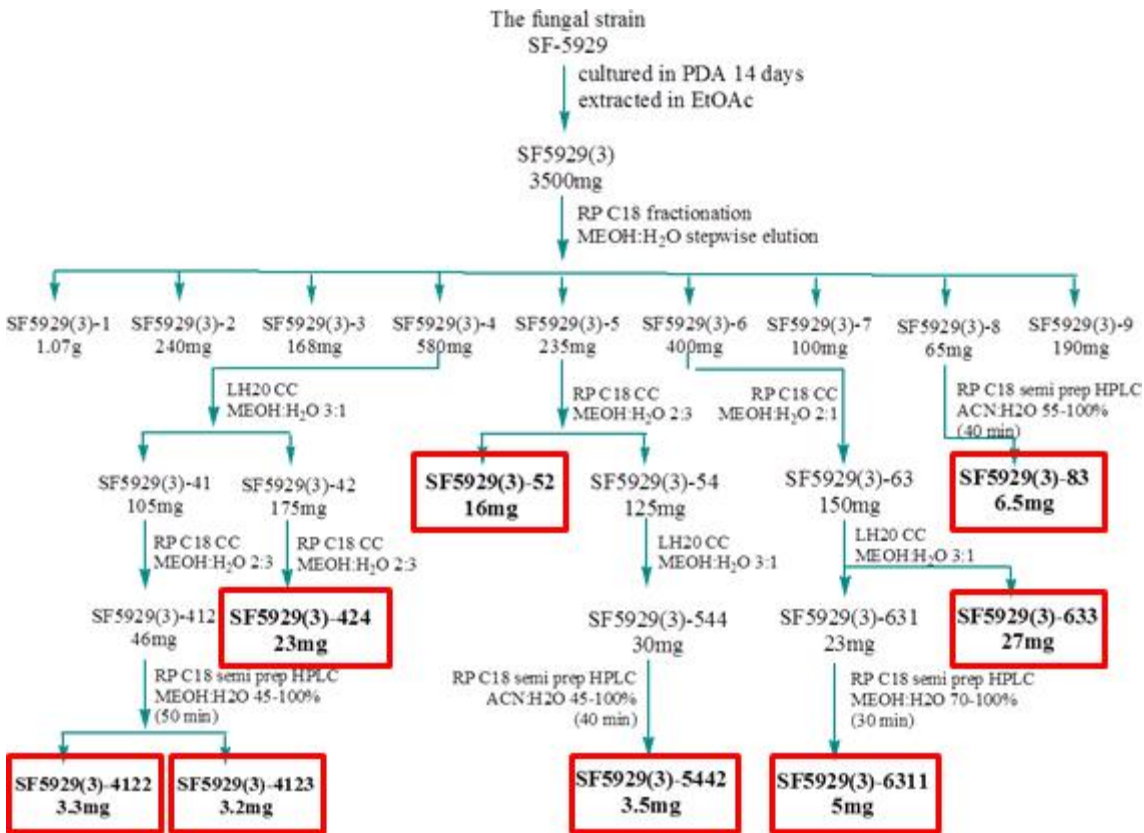


Figure 1. 진균 SF5929으로부터 분리된 단일화합물의 분리도

진균 SF5929는 각각 300 ml의 PDA배지 [% (w/v) potato starch, % (w/v) PDA, % (w/v) dextrose, % NaCl (w/v)]가 담긴 10개의 Fernbach flask (300 mL)에서 배양되었다. 각각의 Fernbach flask에 2 ml 의 균 배양액을 접종하여 25 °C에서 14 일간 배양하였다. PDA배지는 EtOAc (4 L)로 한 번 추출하였고, 추출액은 여과지로 여과하여 추출물 SF5929(3) (3500 mg)을 얻었다. 추출물은 C18 flash column chromatography (CC, 4.5 x 30 cm)를 수행하였고, 이때 용출 용매로는 단계적 기울기 용리법[20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 100% (v/v) MeOH in H₂O (400 mL each)]을 사용하여 9개의 분획물 SF5659(3)-1~9을 얻었다.

분획물 SF5929(3)-4는 먼저 고정상으로 Sephadex LH-20을 이용하여 이동상 컬럼 (3 x 35cm) 3/1 (V/V), MeOH/물 혼합액을 사용하여 SF5929(3)-41과 SF5929(3)-42의 소분획물을 얻었다. SF5929(3)-41의 하위 분획은 C₁₈ CC (1.5 x 30cm)에서 MeOH/water [2/3 (V/V)] 로 수행하였고 그 후 소분획물 SF5929(3)-412에 대하여 RP C₁₈ prep HPLC [45-100% MeOH in H₂O (0.1% HCOOH) over 50 min]를 수행하여 **SF5929(3)-4122** (3.3 mg, t_R = 18min) and **SF5929(3)-4123** (3.2 mg, t_R = 19 min)를 얻었다. 비슷하게, 두 번째 하위 분획 SF5929(3)-42 또한 RP C₁₈ CC (1.5 x 30 cm) 이용하여 MeOH/water [2/3 (v/v)]를 수행하여 **SF5929(3)-424** (23 mg, R_f = 0.25)를 얻었다.

분획물 SF5929(3)-5는 RP-C₁₈ (2.0 x 30 cm)으로 채워진 크로마토그래피 컬럼을 적용하였다.

다음으로 컬럼은 MeOH/H₂O [2/3 (v/v)] 혼합액으로 용리시켜 SF5929(3)-52 (16mg, R_f = 0.3) 및 3개의 다른 분획 SF5929(3)-51~54를 얻었다. 4 번째 분획물인 SF5929(3)-54를 Sephadex LH-20 컬럼 이용하여 MeOH/H₂O [3/1 (v/v)] 혼합액으로 용출시킨 후, 컬럼 YMC pack ODS-A (150 x 20 mm) 이용하여 RP C₁₈ prep HPLC [254nm, ACN in water (0.1% HCOOH), 45 % to 100 % in 40 min, flow rate = 5mL/min] 로 추가 정제하여 5929(3)-5442 (3.5 mg, t_R = 20 min)를 얻었다.

분획물 SF5929(3)-6는 RP-C18 컬럼 (2.0 x 30 cm) 및 MeOH/H₂O [2/1 (v/v)] 혼합액으로 용리시켜 세 개의 소분획물 SF5929(3)-61~63을 얻었다. 세 번째 소분획물 SF5929(3)-63은 Sephadex LH-20 컬럼 [(2.5 x 35 cm, MeOH/H₂O 혼합액 3/1 (v/v)] 으로 용리하여 SF5929(3)-633 (27 mg) 및 두 개의 다른 소분획물 SF5929(3)-631, SF5929(3)-632을 얻었다. 이 소분획물들 중에서, SF5929(3)-631은 RP C₁₈ prep HPLC [70-100% MeOH in H₂O (0.1% HCOOH), 30 min]을 수행하여 SF5929(3)-6311 (5 mg, t_R = 18 min)을 얻었다.

다른 분획물 SF5929(3)-8에서는 RP C₁₈ prep HPLC [55-100%, ACN in H₂O (0.1% HCOOH), over 40 min]을 수행하여 SF5929(3)-83 (6.5 mg, t_R = 21 min)을 얻었다.

○ 2차년도 세부목표 2-3: 활성 대사체의 구조 분석

연구 내용	연구 결과
분리한 활성 대사체의 구조 분석	극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 Pyranonigrin A 외 7종의 대사체 구조분석 완료

[별첨 2-3] 극지생물 유래 진균 SF5929로부터 분리된 이차대사물질의 구조분석

PDA 배지에서 배양된 추출물 SF5929(3)으로부터 8개의 이차대사물질이 분리되었다. 새 화합물 (SF5929(3)-52)와 7개의 알려진 화합물 [Pyranonigrin A (SF5929(3)-424), Campyrones C (SF5929(3)-4122), Campyrones A (SF5929(3)-4123), Fonsecin (SF5929(3)-5442), Funalenone (SF5929(3)-633), Carbonarones A (SF5929(3)-6311), 그리고 Rubrofusarin B (SF5929(3)-83) 이 분리되었다.

[별첨 2-3-1] SF5929(3)-52 (new compound)

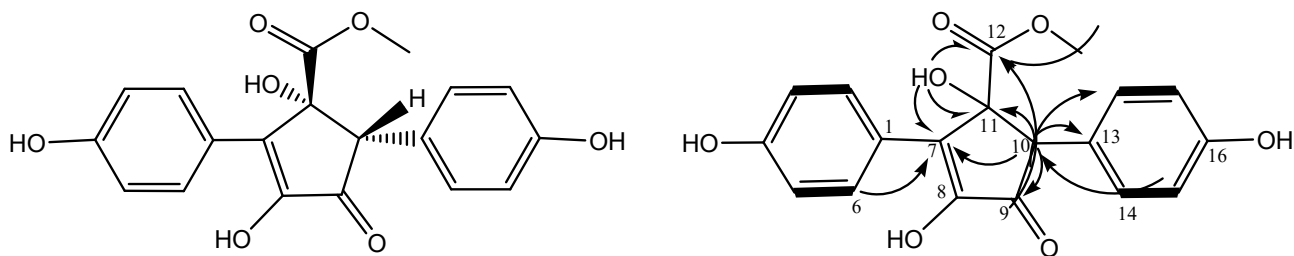


Figure 2. Structure, HMBC and COSY correlations of SF5929(3)-52

SF5929(3)-52는 ESI-MS 측정을 통해 분자량 356 g/mol, $C_{19}H_{16}O_7$ 의 분자식을 확인하였다. 1H NMR 스펙트럼에서 2개의 proton에 상응하는 2개의 para-substituted phenyl ring, 2개의 ortho-coupled proton이 확인되었다 [δ 6.69 (H-15/17), 6.78 (H-3/5), 6.90 (H-14/18), 7.78 (H-2/6)]. δ_H 3.13 ppm 에서의 신호는 1개의 methoxy group (H-19), 그리고 δ_H 3.87 ppm 에서의 신호는 methine group (H-10)에 속하는 것으로 확인되었다. 1H NMR 스펙트럼에서 4개의 broad hydroxyl proton [δ 6.41 (4-OH), 9.38 (16-OH), 9.84 (4-OH), 10.27 (8-OH)]이 확인되었다.

SF5929(3)-52의 ^{13}C 및 DEPT 스펙트럼에서 19개의 carbon 신호는 1개의 methoxy group [δ 52.19 (C-19)], 1개의 methine group [δ 62.94 (C-10)], 그리고 4개로 overlapping된 8개의 aromatic methine group [δ 115.19 (C-15/17), 115.73 (C-3/4), 130.88 (C-14/18), 131.56 (C-2/6)]과 함께 2개의 ester carbonyl carbon이 있는 9개의 quaternary carbon [δ 171.8 (C-12), 194.9 (C-9)]으로 확인되었다 (Figure 2,5,6). SF5929(3)-52의 ^{13}C NMR 데이터와 (\pm)-tylophilusin A 에 대해 보고된 문헌과 비교하였을 때 (\pm)-tylophilusin A의 구조에서 carbon quaternary sp^3 carbon 대신에 10번 위치에서 methine의 존재를 제외하고 광범위한 유사성을 나타내었다 [참고문헌 20]. 또한, 1H - 1H COSY 및 HMBC 스펙트럼의 자세한 분석 결과로 평면 구조를 확인하였다. H-2 와 H-6에서 C-7과 H-14와 H-18에서 C-10에 이르는 HMBC 상관관계는 phenyl ring이 C-7과 C-10 위치에서 중심 고리에 연결되어 있음을 보여 주었다 (Figure 2). 10번 위치의 sp^3 methine group은 H-10에서 C-7, C-9, C-11, C-12, C-13, C-14 및 C-18으로의 HMBC 상관관계에 의해 추정되었다. Hydroxyl group과 C-11의 결합은 11-OH에서 C-7, C-11, 및 C-12로의 HMBC 상관관계에 의해 결정되었다.

반면에, C-10과 C-11의 상대 배치는 ROESY 실험에 의해 결정되었다. Methoxyl proton (H-19)와 methine proton (H-10) 사이의 cross-peak는 12-OMe와 10-phenyl이 같은 면에 위치하여 SF5929(3)-52의 상대 배치는 10S*, 11R* 로 확인되었다. 결과적으로, SF5929(3)-52의 구조는 앞의 근거에 기초하여 새로운 천연물로 확인되었다.

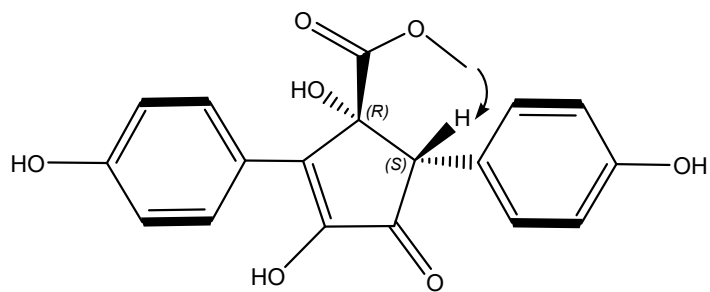


Figure 3. Key NOESY correlations of SF5929(3)-52

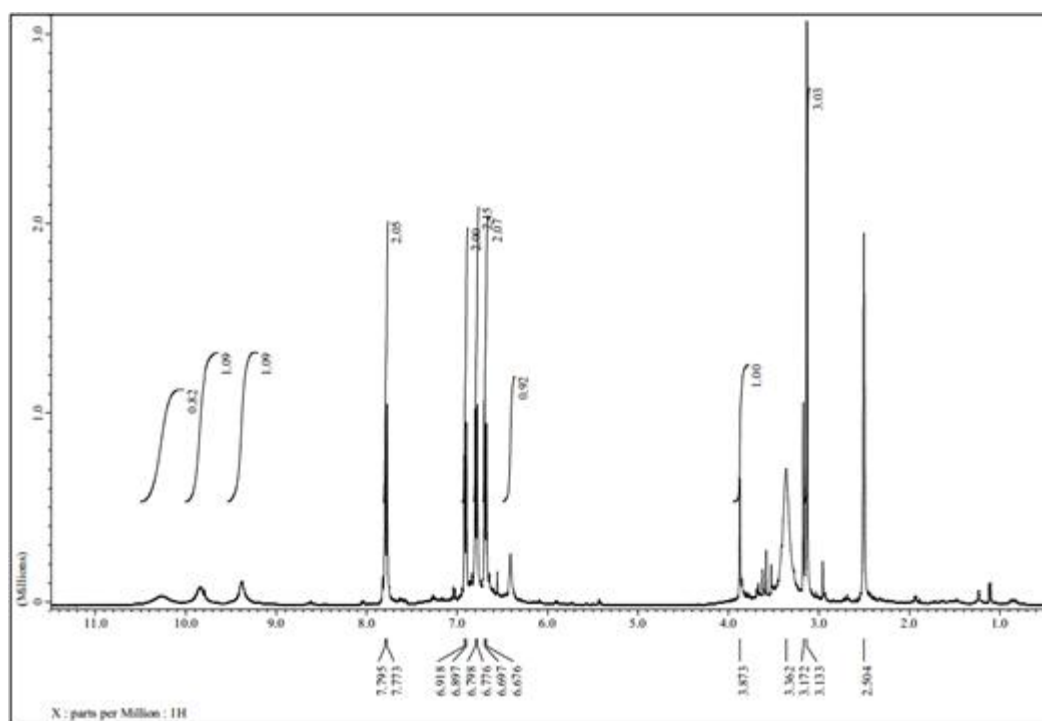


Figure 4. ^1H NMR spectra of SF5929(3)-52

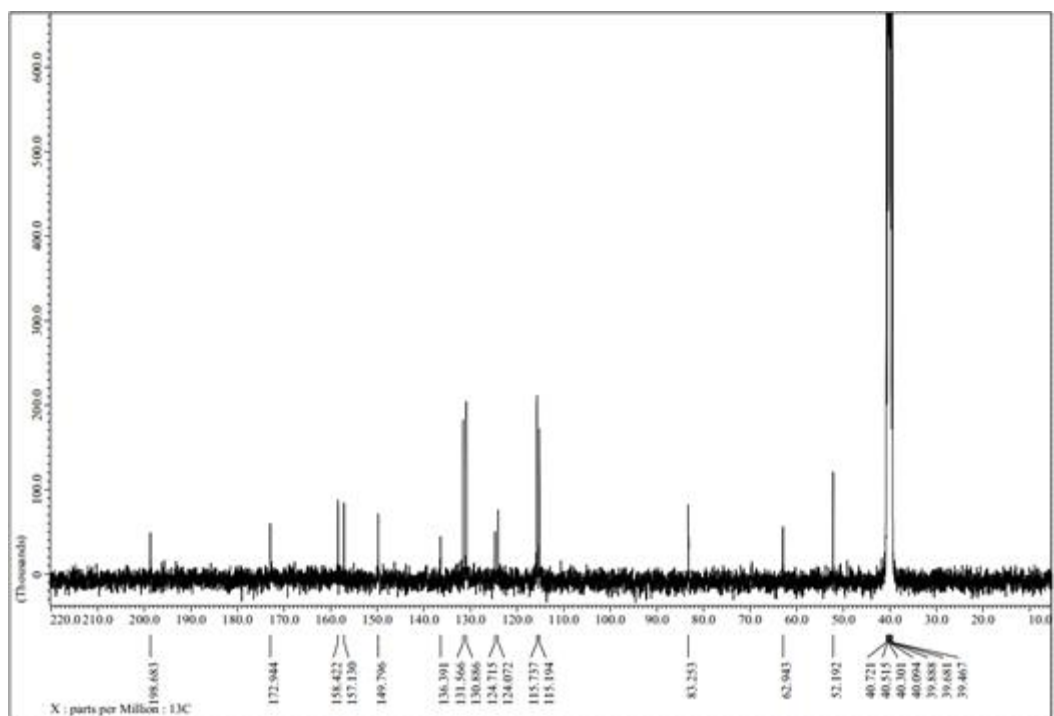


Figure 5. ^{13}C NMR spectra of SF5929(3)-52

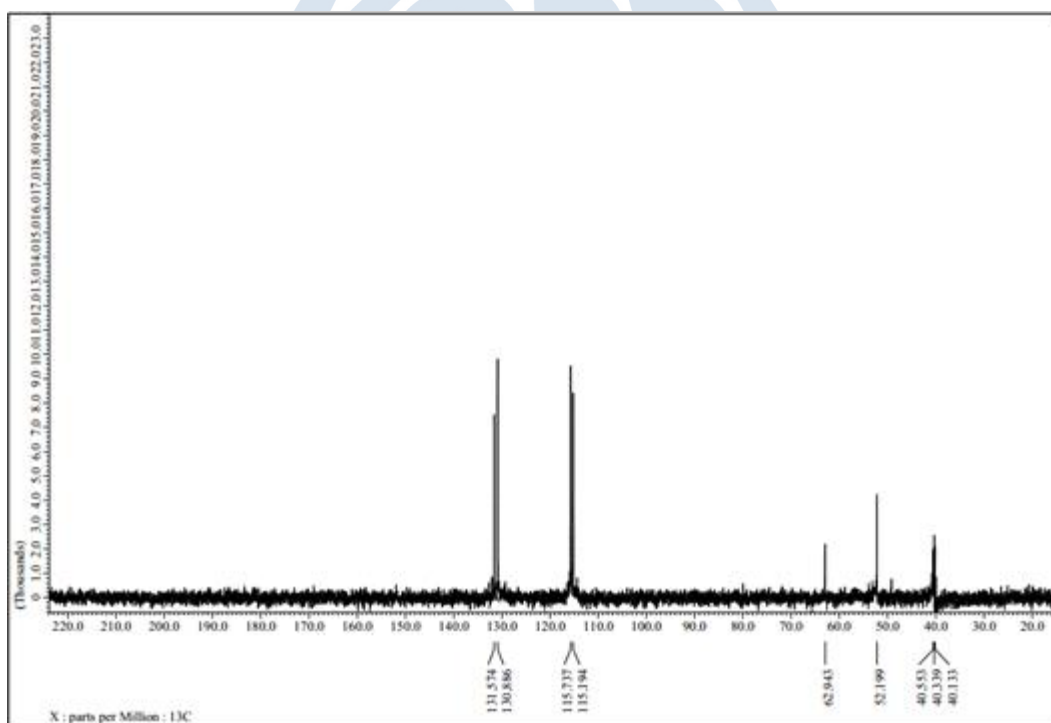


Figure 6. DEPT NMR spectra of SF5929(3)-52

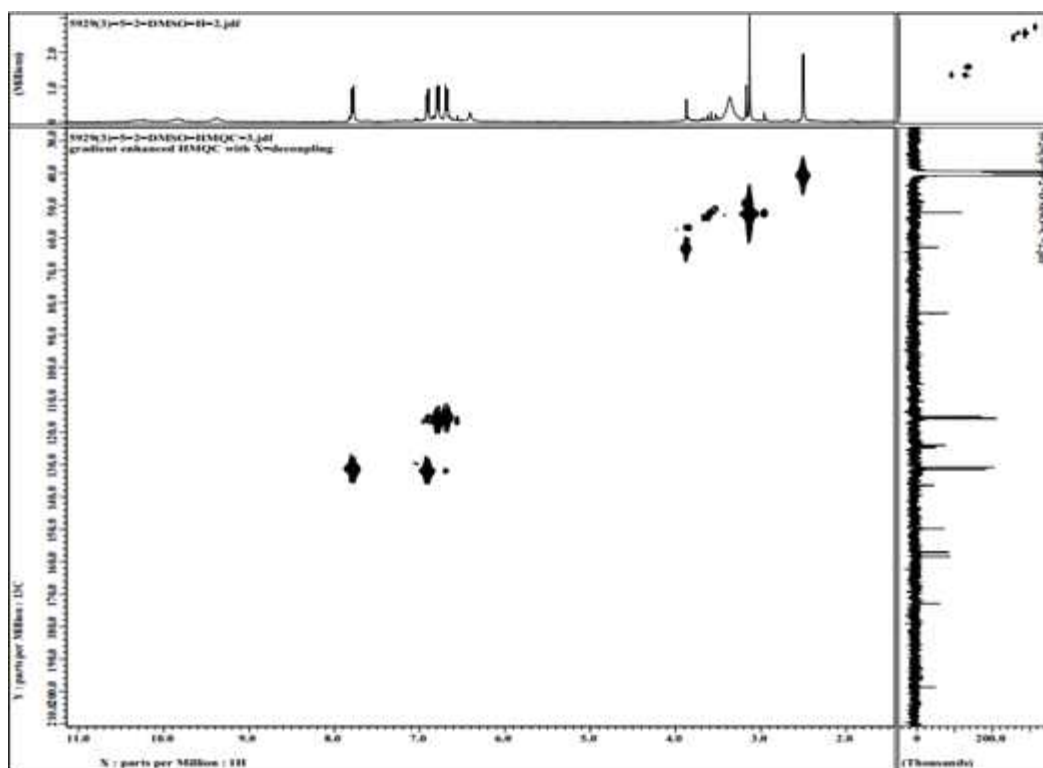


Figure 7. HMQC NMR spectra of SF5929(3)-52

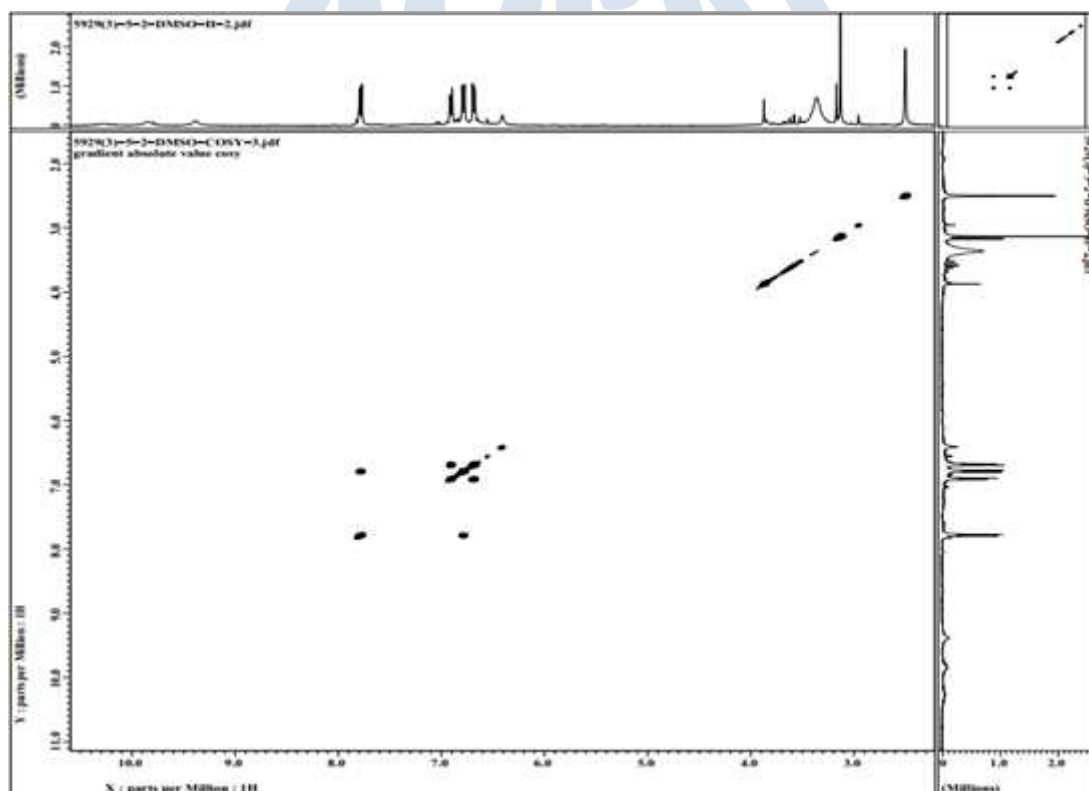


Figure 8. COSY NMR spectra of SF5929(3)-52

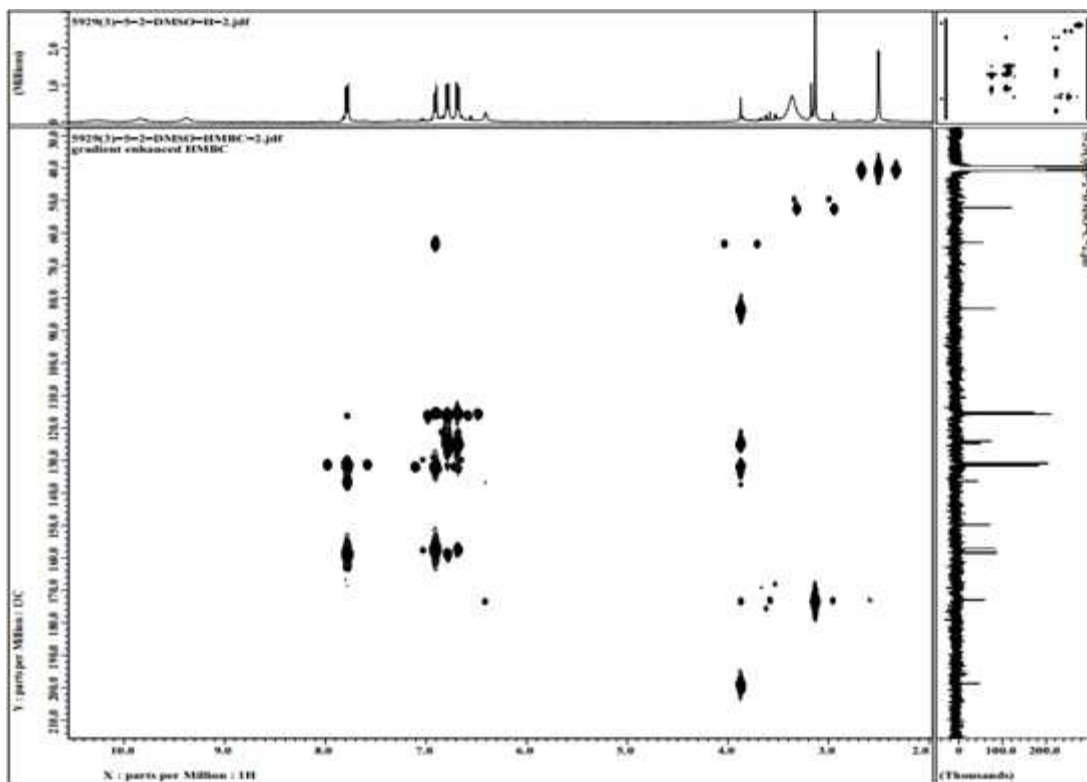


Figure 9. HMBC NMR spectra of SF5929(3)-52

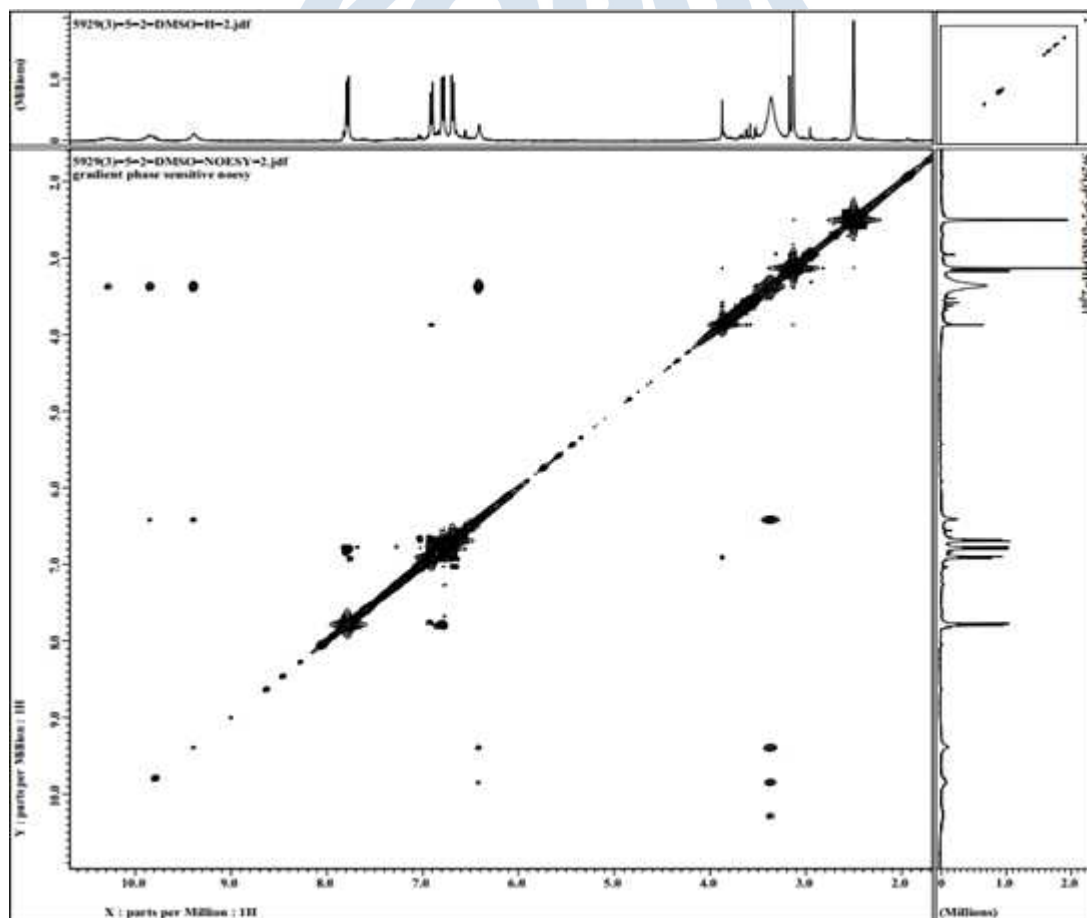


Figure 10. ROESY NMR spectra of SF5929(3)-52

Table 1. NMR data for SF5929(3)-52

Position	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult (J in Hz)	COSY	HMBC
1	124.07, C	-		-
2	131.56, CH	7.78, d (8.8)	3	2, 3, 4, 6, 7
3	115.73, CH	6.78, d (8.8)	2	1, 2, 3, 4, 5
4	158.42, C	-		-
5	115.73, CH	6.78, d (8.8)	6	1, 3, 4, 5, 6
6	131.56, CH	7.78, d (8.8)	5	2, 4, 5, 6, 7
7	136.33, C	-		-
8	149.79, C	-		-
9	198.59, C	-		-
10	62.94, CH	3.87, s		7, 9, 11, 12, 13, 14, 18.
11	83.25, C	-		-
12	172.94, C	-		-
13	124.72, C	-		-
14	130.88, CH	6.90, d (8.8)	15	10, 15, 16
15	115.19, CH	6.69, d (8.8)	14	13, 14, 15, 16, 17
16	157.12, C	-		-
17	115.19, CH	6.69, d (8.8)	18	13, 15, 16, 17, 18
18	130.88, CH	6.90, d (8.8)	17	10, 16, 17
19	52.19, CH ₃	3.13, s		12
4-OH	-	9.84, br		
8-OH	-	10.27, br		
11-OH	-	6.41, br		7, 10, 11, 12
16-OH	-	9.38, br		

^a Recorded in DMSO, ^b 100MHz, ^c 400 MHz

[별첨 2-3-2] SF5929(3)-424 (Pyranonigrin A)

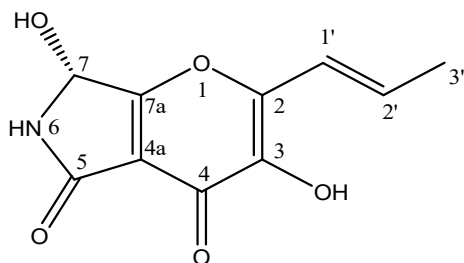


Figure 11. Structure of SF5929(3)-424

ESI-MS에 (m/z [], []) 의해 SF5929(3)-424의 분자량과 분자식은 223 g/mol과 $C_{10}H_9NO_5$ 로 확인되었다. SF5929(3)-424의 1H NMR 스펙트럼에서 δ_H 6.47 (dq, 15.6, 6.8 Hz, H-2') 및 6.58 (dd, 15.6, 1.2 Hz, H-1')의 2개의 sp^2 methine proton 이 이중 결합에 속하는 것을 확인하였다. 또한, H-1' 과 H-2' 에 대한 multiplicity 와 coupling constant는 1H NMR δ_H 1.93 (dd, 6.8, 1.2 Hz, H-3') 에서 관찰된 H-2' 와 methyl proton 사이의 trans orientation 및 connection을 제시하였다. 나머지 proton 신호는 두 개의 hydroxyl proton [δ 6.78 (7-OH), 9.67 (3-OH)] 및 질소 [δ 8.61 (8-NH)]에 결합된 proton으로 확인되었다. SF5929(3)-424의 ^{13}C NMR 스펙트럼은 10개의 신호가 있음을 보여주었다. Oxygen-substituted methine group은 δ_C 75.61 (C-7)에서의 낮은 화학적 이동에 의해 확인되었다. sp^2 methine 탄소에 대한 resonance signal은 δ_C 119.4 (C-1'), δ_C 132.03 (C-2')에서 추정되었다. 또한, ^{13}C NMR에서 6개의 quaternary carbon을 포함하는 2개의 carbonyl carbon [δ_C 165.47 (C-5), 169.51 (C-4)]과 함께 4개의 다른 sp^2 carbonyl carbon [δ_C 112.17 (C-4a), 142.65 (C-3), 146.42 (C-2), 174.67 (C-7a)]을 확인하였다. SF5929(3)-424과 Pyranonigrin A의 1H 및 ^{13}C NMR 비교 결과 유사한 화학적 이동값을 보였다 [참고문헌 21]. 게다가 Pyranonigrin A의 optical rotation value와 일치하여 SF5929(3)-424는 Pyranonigrin A라는 결론을 얻었다.

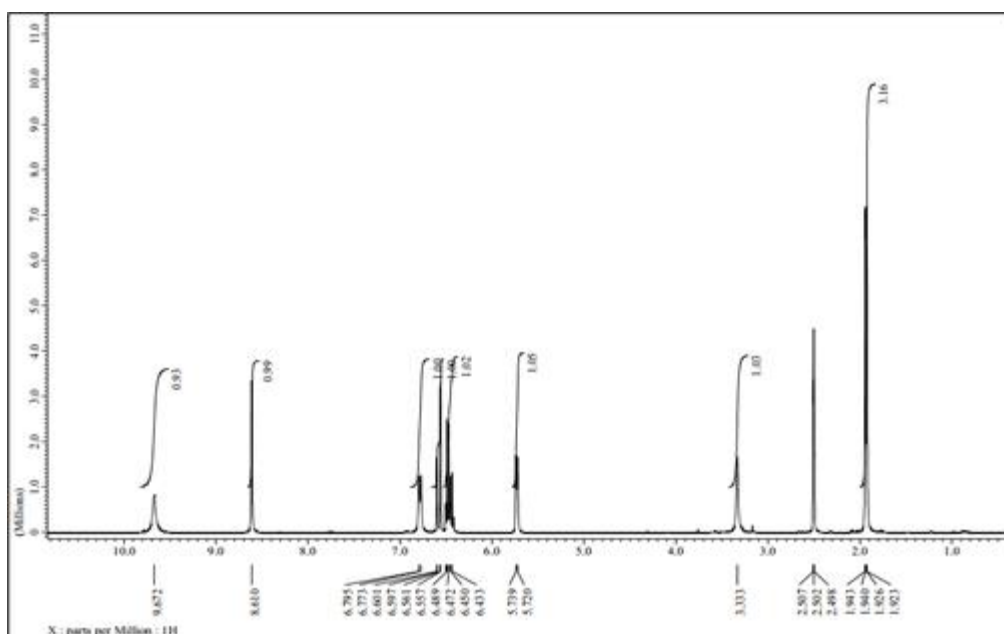


Figure 12. 1H NMR spectra of SF5929(3)-424

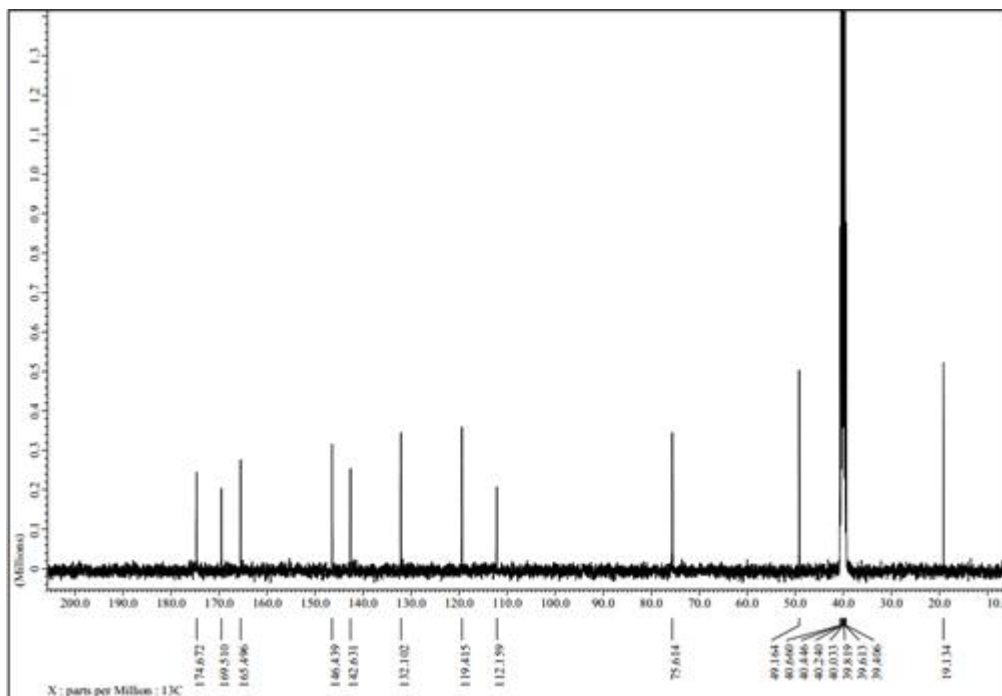


Figure 13. ^{13}C NMR spectra of SF5929(3)-424

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data for SF5929(3)-424

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult (J in Hz)
1	-	-
2	146.42	-
3	142.65	-
4	169.51	-
4a	112.17	-
5	165.47	-
6	-	8.61 d (0.8)
7	75.61	5.72 d (7.2)
7a	174.67	-
1'	119.44	6.58 dd (15.6, 1.2)
2'	132.03	6.47 dq (15.6, 6.8)
3'	19.14	1.93 dd (6.8, 1.2)
7-OH	-	6.78 d (9.2)
3-OH	-	9.67 s

^a Recorded in DMSO, ^b 100MHz, ^c 400 MHz

[별첨 2-3-3] SF5929(3)-4122 (Campyrones C)

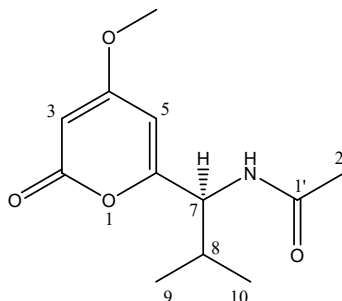


Figure 14. Structure of SF5929(3)-4122

SF5929(3)-4122의 ESI-MS 스펙트럼은 m/z 에서 강한 ion peak을 보임으로써, 분자량 239 g/mol 및 분자식 $C_{12}H_{17}NO_4$ 을 나타내었다. 1H NMR 스펙트럼에서 전형적인 low field proton 신호인 2개의 sp^2 methine proton [δ_H 5.56 (H-3), 6.10 (H-5)] 신호가 질소 [δ_H 4.39 (H-7)] 와 또 다른 methyl group [δ_H 1.19 (H-2')]과 같은 1개의 특이한 methoxyl proton [δ_H 3.85 (4-OCH₃)] 에 결합된 것을 확인하였다 (Table 3, Figure 15). 1H NMR 스펙트럼에서 3개의 aliphatic proton [δ_H 0.90 (H-10), 0.97 (H-9), 2.13 (H-8)] 도 관찰되었다.

반면에, ^{13}C NMR 스펙트럼에서 2개의 sp^2 methine [δ_C 87.6 (C-3), 100.9 (C-5)], 2개의 sp^2 quaternary carbons [δ_C 163.2 (C-6), 172.1 (C-4)], 그리고 1개의 methine carbon [δ_C 57.2 (C-7)], downfield에서의 화학적 이동을 보이는 2개의 methyl groups [δ_C 21.0 (C-2'), 55.7 (4-OCH₃)]과 함께 2개의 다른 carbonyl carbons [δ_C 165.5 (C-2), 171.9 (C-1')]를 포함하는 12 개의 탄소 신호가 확인되었다. (Table 3, Figure 16) aliphatic fragment로 나타나는 3 개의 신호 [δ_C 17.6 (C-9), 18.4 (C-10), 30.1 (C-8)] 가 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 확인되었다.

앞에서의 근거들은 화합물의 구조에서 α -pyrones 의 존재를 확인하였다. 또한, SF5929(3)-4122 및 Campyrones C 의 1H 및 ^{13}C NMR 데이터의 비교는 유사한 화학적 이동값을 나타내었고, 둘째로 optical rotation 또한 같은 negative 였으며, 이러한 결과로 두 화합물이 동일하다는 것을 확인하였다 [참고문헌 22].

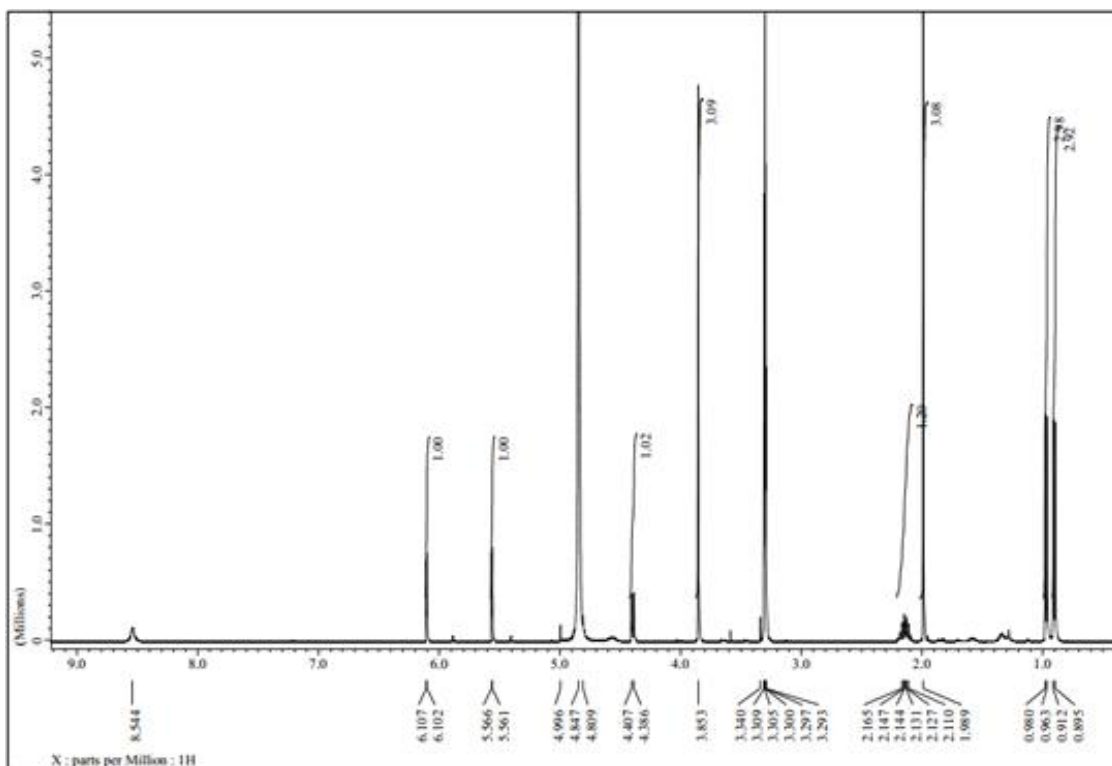


Figure 15. ^1H NMR spectra of SF5929(3)-4122

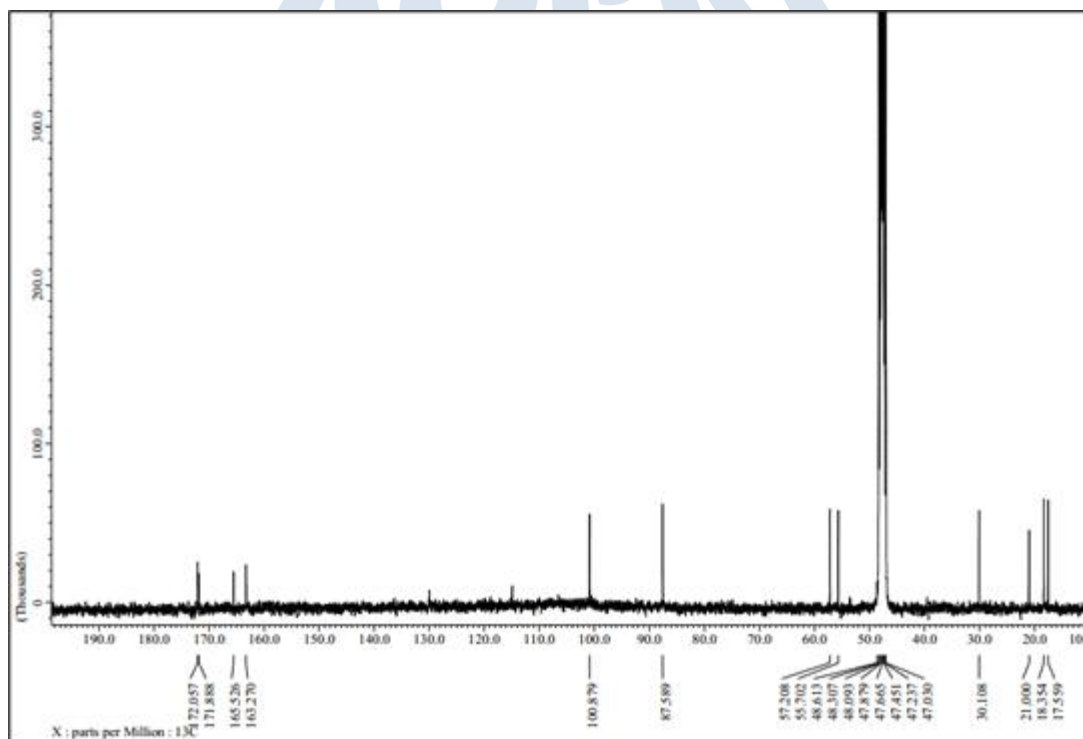


Figure 16. ^{13}C NMR spectra of SF5929(3)-4122

Table 3. NMR data of SF5929(3)-4122

Position	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult (J in Hz)
2	165.5	-
3	87.6	5.56, d (1.6)
4	172.1	-
5	100.9	6.10, d (1.6)
6	163.2	-
7	57.2	4.39, d (8.4)
8	30.1	2.13, qd (6.4, 1.6)
9	17.6	0.97, d (6.4)
10	18.4	0.90, d (6.4)
1'	171.9	-
2'	21.0	1.99, s
OCH3	55.7	3.85, s
NH	-	8.54, br

^a Recorded in MeOD-*d*₄, ^b 100MHz, ^c 400 MHz



[별첨 2-3-4] SF5929(3)-4123 (Campyrones A)

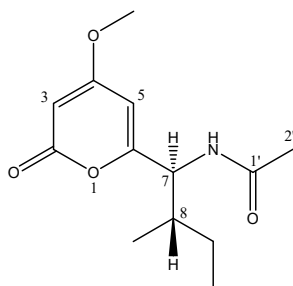


Figure 17. Structure of SF5929(3)-4123

SF5929(3)-4123의 분자식은 m/z []에서 관찰된 분자 이온 피크에 따라 분자량이 253 g/mol 인 $C_{13}H_{19}NO_4$ 로 결정되었다. SF5929(3)-4123의 1H 및 ^{13}C NMR 데이터는 α -pyrones [δ_C 87.59 (C-3), 101.03 (C-5), 163.25 (C-6), 165.54 (C-2), 171.81 (C-4)]과 acetyl group [δ_C 172.06 (C-1')]의 존재 때문에 SF5929(3)-4122 (Campyrones C) 와 매우 유사하게 나타났다. NMR 스펙트럼은 또한 SF5929(3)-4122의 구조에서 iso-propyl group의 대신 aliphatic fragment sec-butyl [δ_C 9.82 (C-10), 14.64 (C-11), 24.83 (C-9), 36.27 (C-8)]의 차이가 나타났다. 또한, SF5929(3)-4123의 1H 및 ^{13}C NMR 데이터는 Campyrones A 의 이전에 발표된 값과 완전히 일치하였다 [참고문헌 22]. 따라서 SF5929(3)-4123은 Campyrones A로 확인되었다.

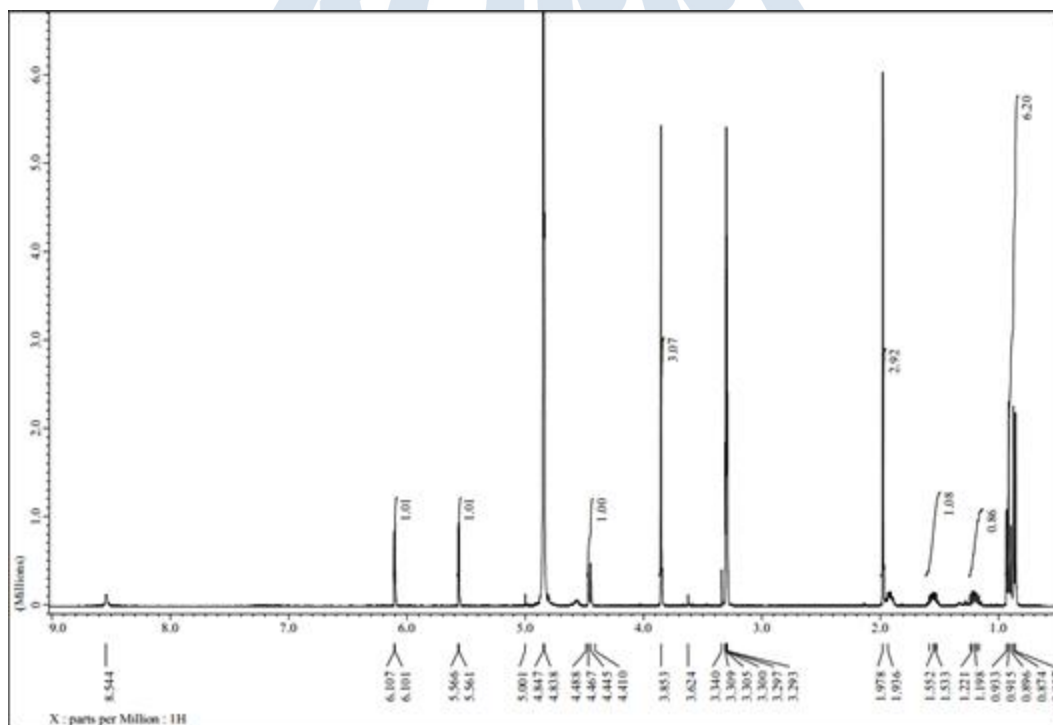


Figure 18. 1H NMR spectra of SF5929(3)-4123

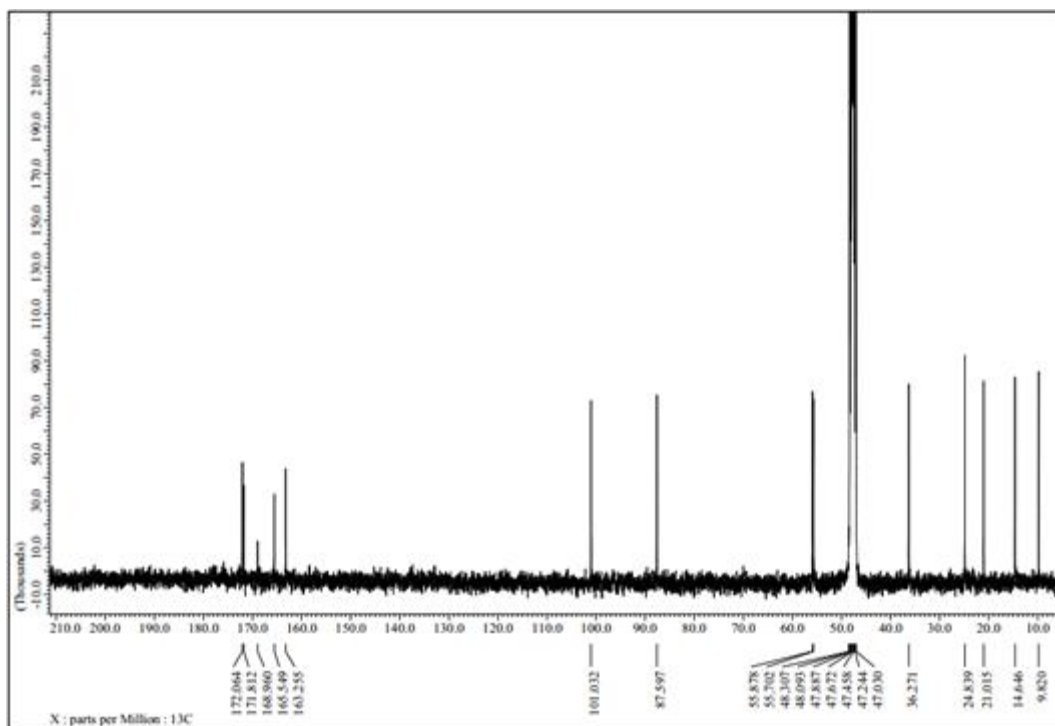


Figure 19. ^{13}C NMR spectra of SF5929(3)-4123

Table 4. NMR data of SF5929(3)-4123

Position	$\delta_{\text{C}}^{a,b}$	$\delta_{\text{H}}^{a,c}$ mult (J in Hz)
2	165.54	-
3	87.59	5.56, d (2.0)
4	171.81	-
5	101.03	6.10, d (2.0)
6	163.25	-
7	55.70	4.45, d (8.8)
8	36.27	1.91, m
9	24.83	1.56, m
		1.20, m
10	9.82	0.91, t (7.2)
11	14.64	0.86, d (6.8)
1'	172.06	-
2'	21.05	1.97, s
OCH ₃	55.87	3.85, s
NH		8.54, br

^a Recorded in MeOD-*d*₄, ^b 100MHz, ^c 400 MHz

[별첨 2-3-5] SF5929(3)-633 (Funalenone)

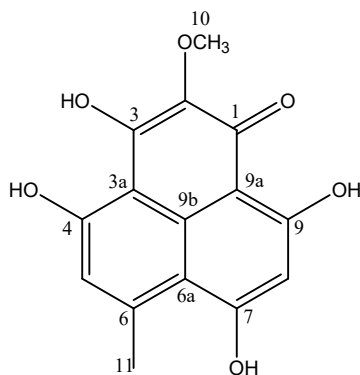


Figure 20. Structure of SF5929(3)-633

SF5929(3)-633의 분자식 및 분자량은 각각 288 g/mol, $C_{15}H_{12}O_6$ 으로 확인되었다. m/z []의 ESI-MS 스펙트럼에서 발견된 신호에 의해 확인되었다. SF5929(3)-633의 ^{13}C NMR 스펙트럼은 1개의 methyl carbon [δ_C 25.85 (C-11)], 1개의 methoxy carbon [δ_C 60.19 (C-10)], 2개의 aromatic methine carbon [δ_C 100.46 (C-8), 117.32 (C-5)] 뿐 아니라 1개의 carbonyl carbon [δ_C 168.73 (C-1)]을 포함하는 11개의 sp^2 quaternary carbon 신호를 나타내었고, 나머지 중에서, 4개의 그룹은 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 weak peak 및 화학적 이동에 기초하여 산화탄소로 분류되었다 [δ_C 163.53 (C-3), 165.50 (C-4), 166.45 (C-7), 170.65 (C-9)]. (Table 5, Figure 22) 또한, 1개의 methyl [δ_H 2.80 (H-11)], 1개의 methoxyl [δ_H 3.82 (H-10)] 및 2개의 aromatic methine groups [δ_H 6.43 (H-8), 6.78 (H-5)]의 존재가 1H NMR 스펙트럼에서 관찰되었다 (Table 5, Figure 21).

게다가, SF5929(3)-633의 구조는 문헌에 인용된 Funalenone 의 ^{13}C NMR 화학적 이동과 유사하기 때문에 Funalenone 으로 확인되었다 [참고문헌 23].

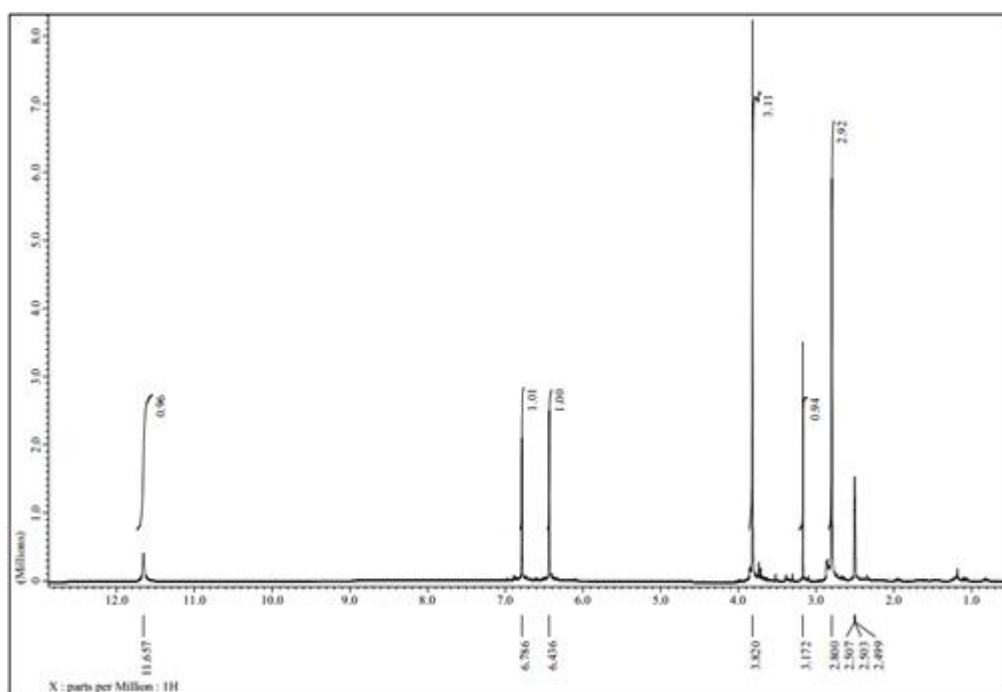


Figure 21. 1H NMR spectra of SF5929(3)-633

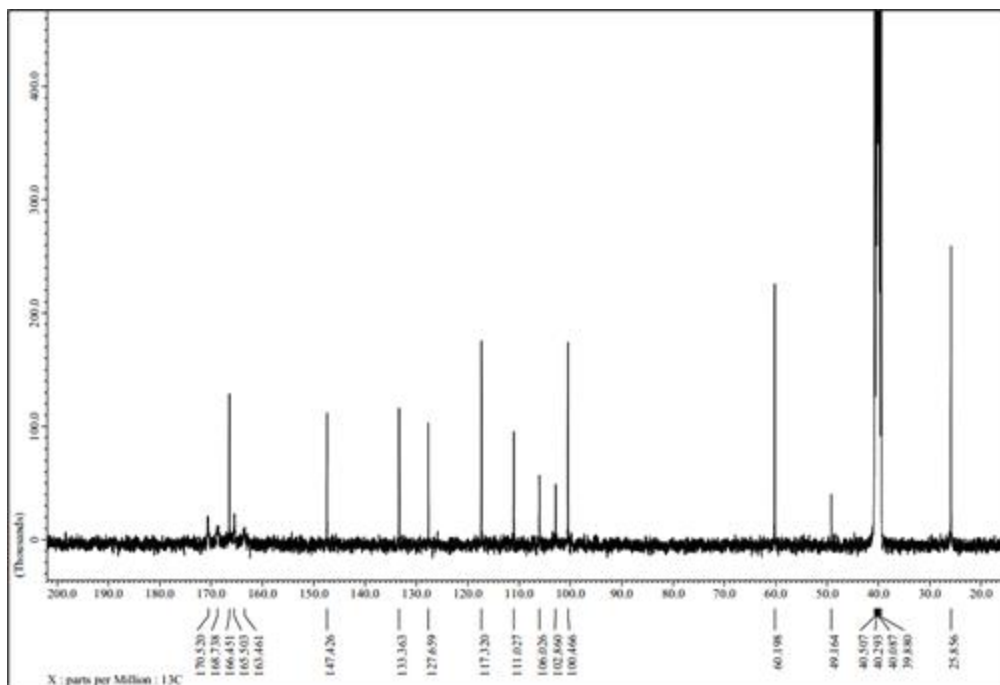


Figure 22. ^{13}C NMR spectra of SF5929(3)-633

Table 5. NMR data of SF5929(3)-633

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult (J in Hz)
1	168.73	-
2	133.36	-
3	163.46	-
4	165.5	-
5	117.32	6.78, s
6	147.42	-
7	166.45	-
8	100.46	6.43, s
9	170.65	-
10	60.19	3.82, s
11	25.85	2.80, s
3a	106.02	-
6a	111.02	-
9a	102.85	-
9b	127.65	-

^a Recorded in DMSO, ^b 100MHz, ^c 400 MHz

[별첨 2-3-6] SF5929(3)-83 (Rubrofusarin B)

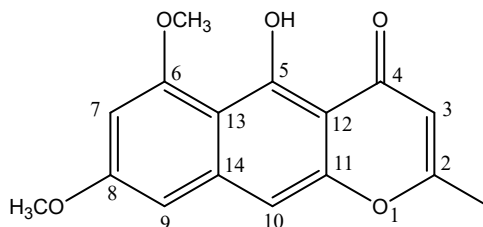


Figure 23. Structure of SF5929(3)-83

SF5929(3)-83의 ESI-MS 스펙트럼은 m/z [14,14]에서 ion peak를 나타내었다. 2개의 fragment 모두 분자식과 분자량이 각각 $C_{16}H_{14}O_5$ 및 286 g/mol로 나타났다. SF5929(3)-83의 1H NMR 스펙트럼은 aromatic 영역에서 4개의 methine [δ_H 6.18 (H-3), 6.46 (H-7), 6.84 (H-9), 7.15 (H-10)]과 phenyl ring 에 부착된 1개의 methyl proton [δ_H 2.38 (2- CH_3)]을 나타냈다 (Table 6, Figure 24). 1H NMR 스펙트럼의 downfield에서 methoxyl proton [δ_H 3.87 (6- OCH_3), 3.87 (6- OCH_3)] 로 나타난 2개의 신호가 있었다.

SF5929(3)-83의 1H NMR 스펙트럼을 문헌 [참고문헌 24]과 비교하면 유사한 화학적 이동값이 나타났으며 (Table 6), 그 결과 SF5929(3)-83는 Rubrofusarin B로 확인되었다 .

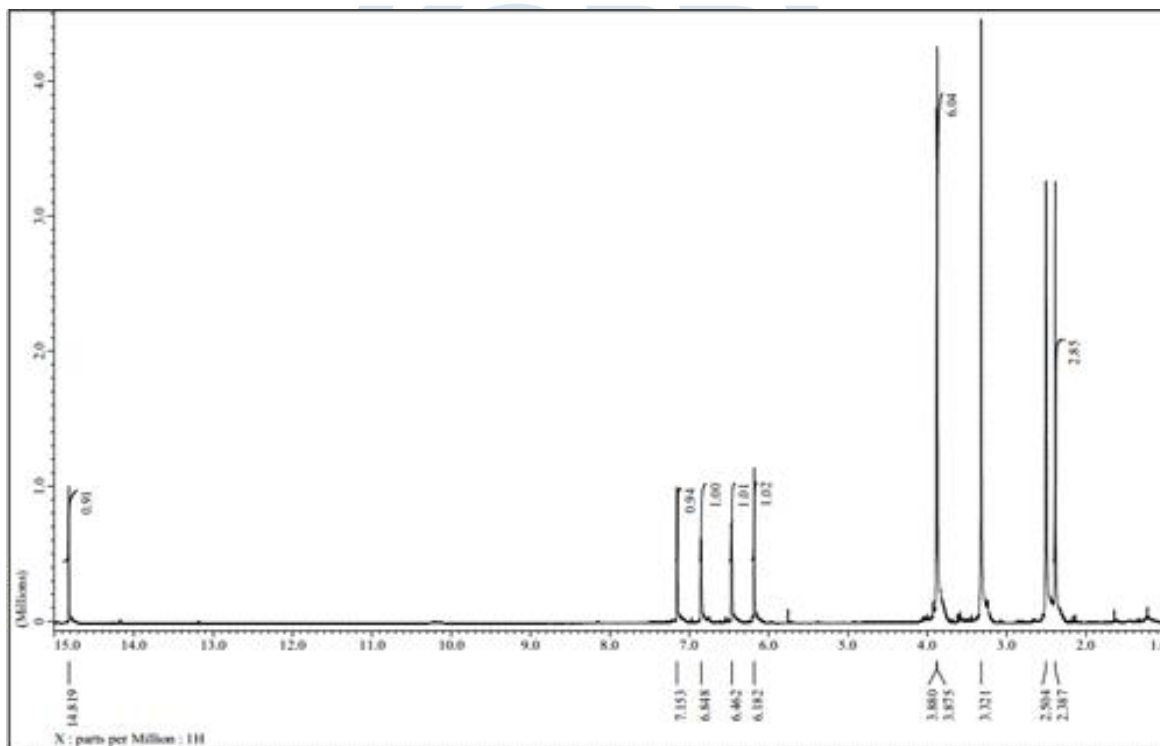


Figure 24. 1H NMR spectra of SF5929(3)-83

Table 6. The comparison ^1H NMR data of SF5929(3)-83 with Rubrofusarin

Position	Rubrofusarin B	SF5929(3)-8-3
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ mult, (J in Hz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ mult (J in Hz)
3	6.18 (s)	6.18 (s)
7	6.47 (d, 2.2)	6.46 (s)
9	6.85 (d, 2.2)	6.84 (s)
10	7.16 (s)	7.15 (s)
2-CH ₃	2.39 (s)	2.38 (s)
6-OCH ₃	3.88 (s)	3.87 (s)
8-OCH ₃	3.88 (s)	3.88 (s)
5-OH	14.81 (s)	14.81 (s)

^a record in DMSO, ^b 400 MHz



[별첨 2-3-7] SF5929(3)-5442 (Fonsecin)

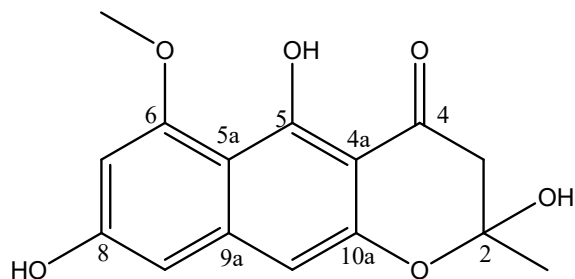


Figure 25. Structure of SF5929(3)-5442

SF5929(3)-5442 는 mass spectrometry (ESI-MS)에서 m/z [], and []의 major ion을 나타내어 분자량 290 g/mol 및 $C_{15}H_{14}O_6$ 이라는 분자식을 확인하였다. SF5929(3)-5442의 1H NMR 스펙트럼에서 3개의 aromatic methine proton [δ_H 6.30 (H-7), 6.41 (H-10), 6.46 (H-9)], 1개의 methyl proton [δ_H 3.85 (8-OCH₃)] 및 1개의 methyl proton [δ_H 1.59 (H-15)] 이 함께 존재하는 것을 확인하였다 (Table 7, Figure 26). 1H NMR 스펙트럼에서 aromatic ring에 결합된 2개의 hydroxyl group [δ_H 10.23 (8-OH), 14.19 (5-OH)] 이 명백하게 관찰되었다. H-7 and H-9의 coupling constant (2.0 Hz)의 multiplicity (doublet) 는 두 proton 모두 meta correlation을 나타내었다. 1H NMR 스펙트럼은 또한 proton이 배타적으로 geminal coupling ($^2J_{3a/3b} = 16.8$ Hz)을 나타내는 분리된 methylene group [δ_H 2.71 (H-3a), 3.16 (H-3b)]을 나타냈다.

SF5929(3)-5442의 ^{13}C NMR 스펙트럼은 15개의 신호를 보여주었고, 또한 carbonyl carbons [δ_C 198.13 (C-4)]도 나타내었다 (Table 7, Figure 27). 3개의 sp^2 methine carbon [δ_C 97.10 (C-7), 102.07 (C-9), 101.56 (C-10)]와 methylene carbon [δ_C 48.2 (C-3)]의 존재는 DEPT 스펙트럼 분석에 의해 확인되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서 8개의 나머지 탄소 신호는 quaternary carbon 로 확인되었는데 이것은 sp^3 carbon [δ_C 100.58 (C-2)]가 2개의 산소에 결합되었기 때문이다. 다른 것들은 sp^2 quaternary carbon 으로 추정되었다.

추가적인 확인은 SF5929(3)-5442의 1H 및 ^{13}C NMR 데이터를 문헌과 비교하여 확인되었다 [참고문헌 25]. 위의 근거들과 비교 결과 SF5929(3)-5442는 Fonsecin으로 확인되었다.

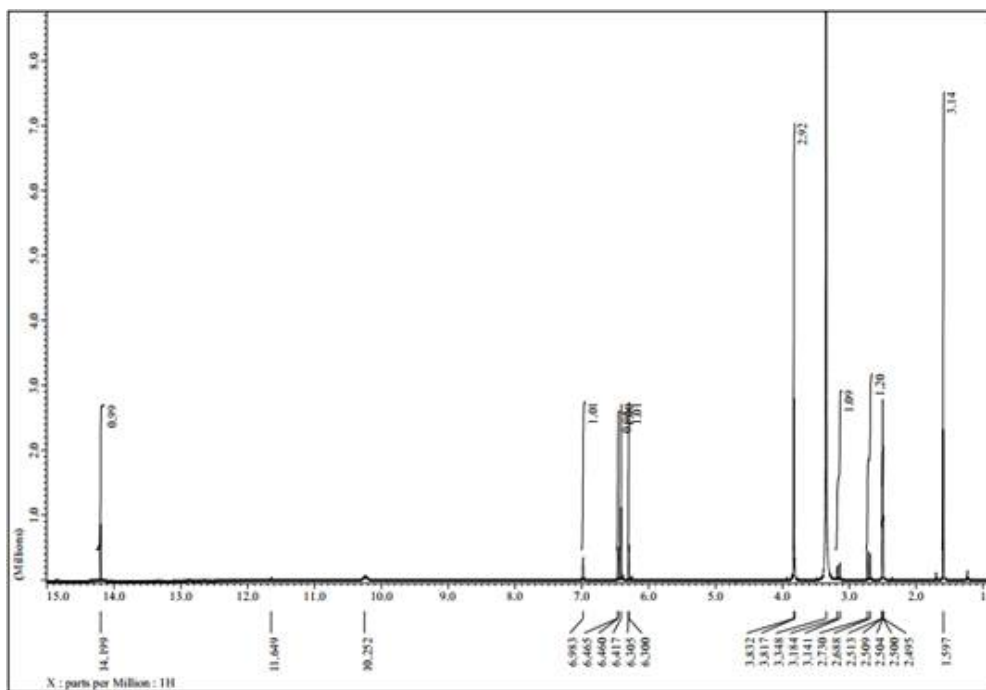


Figure 26. ^1H NMR spectra of SF5929(3)-5442

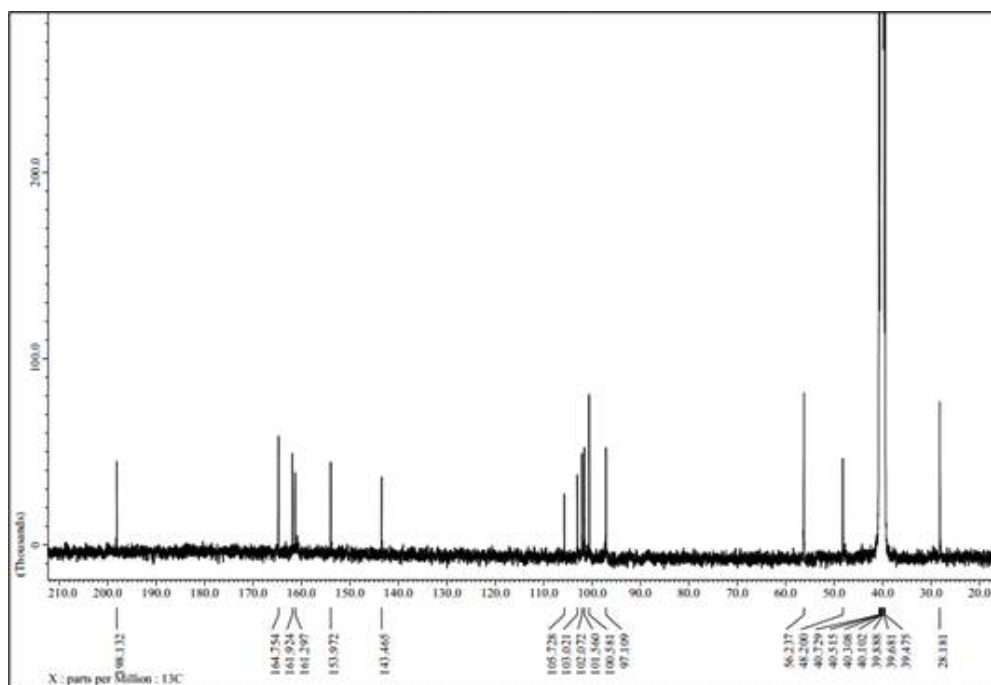


Figure 27. ^{13}C NMR spectra of SF5929(3)-5442

Table 7. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5929(3)-5442

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult (J in Hz)
2	100.58	-
3a	48.2	2.71, d (16.8)
3b		3.16, d (16.8)
4	198.13	-
5	164.75	-
6	161.92	-
7	97.10	6.30, d (2.0)
8	161.29	-
9	102.07	6.46, d (2.0)
10	101.56	6.41, s
10a	153.97	-
4a	103.02	-
5a	105.72	-
9a	143.46	-
15	28.18	1.59, s
OCH-3	56.23	3.85, s
2-OH	-	6.98, s
5-OH	-	14.19, s
6-OH	-	10.23, br

^a Recorded in DMSO, ^b 100MHz, ^c 400 MHz



[별첨 2-3-8] SF5929(3)-6311 (Carbonarones A)

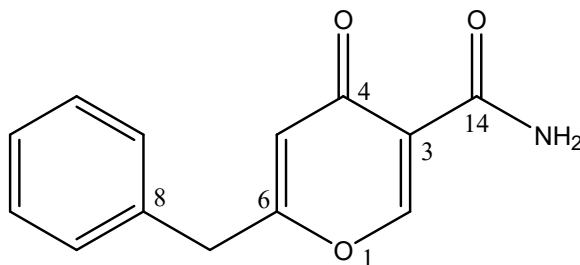


Figure 28. Structure of SF5929(3)-6311

SF5929(3)-6311의 ESI-MS 스펙트럼은 m/z []에서 ion 이 나타나고, 따라서 229 g/mol의 분자량 및 $C_{13}H_{11}NO_3$ 의 분자식을 제시한다. benzyl group의 존재는 SF5929(3)-6311의 1H 및 ^{13}C NMR 데이터 분석에 의해 추정되었다 (Table 8). 1H NMR 스펙트럼에서 6개의 aromatic carbon [δ_C 134.70 (C-8), 128.67 (C-9/13), 128.96 (C-10/12), 127.26 (C-11)]에 상응하여 δ_H 7.32 (5H)에서 5개의 proton overlapping을 포함하는 신호를 확인하였다.

SF5929(3)-6311의 1H NMR 스펙트럼은 또한 downfield 영역에서 2개의 다른 aromatic methine proton [δ_H 6.31 (H-5), 8.75 (H-2)], 1개의 methylene proton [δ_H 3.97 (H-7)]을 보여 주었다. 그에 비해, ^{13}C NMR 스펙트럼의 13개 신호는 phenyl group에서 6개의 carbon 뿐 아니라 2개의 carbonyl carbon [δ_C 164.89 (C-14), 178.58 (C-4)] 과 γ -pyrone fragment에 포함되는 4개의 탄소 신호를 포함하였다 (Figure 30).

또한, SF5929(3)-6311의 1H 및 ^{13}C NMR 데이터의 화학적 이동을 문헌에 발표된 Carbonarones A의 화학적 이동과 비교하여 두 화합물이 동일한 것을 확인하였다 [참고문헌 26].

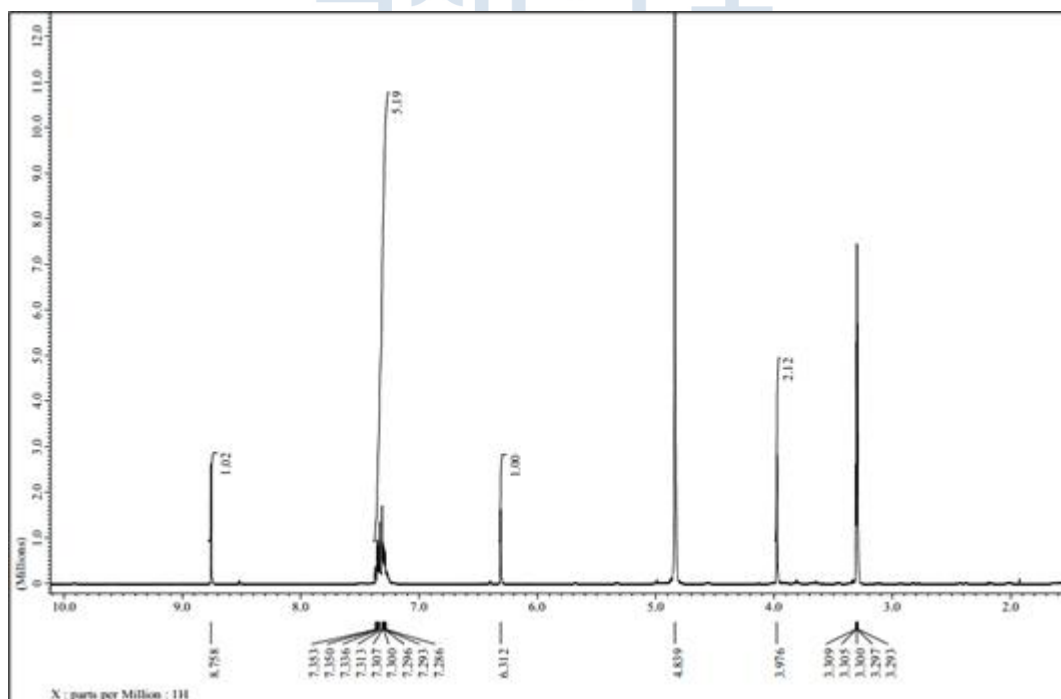


Figure 29. 1H NMR spectra of SF5929(3)-6311

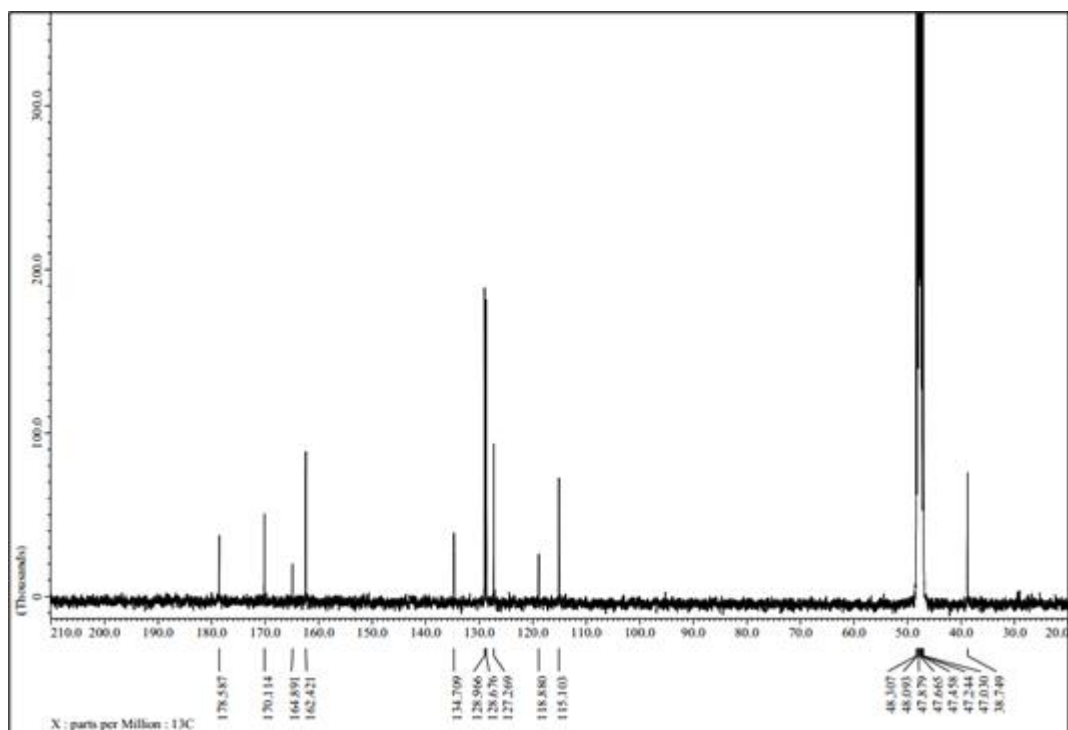


Figure 30. ^{13}C NMR spectra of SF5929(3)-6311

Table 8. ^1H and ^{13}C NMR data of SF5929(3)-6311

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$ mult (J in Hz)
2	162.42	8.75, s
3	118.88	-
4	178.58	-
5	115.10	6.31, s
6	170.11	-
7	38.74	3.97, s
8	134.70	-
9	128.67 ^o	7.32 ^o
10	128.96 ^o	7.32 ^o
11	127.26	7.32 ^o
12	128.96 ^o	7.32 ^o
13	128.67 ^o	7.32 ^o
14	164.89	-
14-NH ₂	-	
4-OH	-	

^a recorded in MeOD-*d*₄, ^b 100 MHz, ^c 400 MHz, ^o overlapping signal

- 2차년도 세부목표 2-4: 활성 대사체의 활성 기작 검토

연구 내용	연구 결과
분리한 활성 대사체의 활성 기작 검토	- 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 항염증 활성 확인 - 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 PTP1B 효소 억제 활성 확인

[별첨2-4-1] 극지생물 유래 진균 SF5929로부터 분리한 대사체의 항염증 활성 검토

- 극지생물 유래 미생물 SF5929 로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 SF5929(3)-52, SF5929(3)-424, SF5929(3)-4122, SF5929(3)-4123, SF5929(3)-633, SF5929(3)-83 의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과 SF5929(3)-83에서 마우스 대식세포 유래 RAW264.7 세포와 마우스 microglial 유래의 BV2 세포에서 항염효과가 우수하게 나타났음.
- SF5929(3)-52은 RAW264.7세포에서 LPS로 유발한 nitrite 생성을 감소시키는 효과가 없었음 (figure 31).

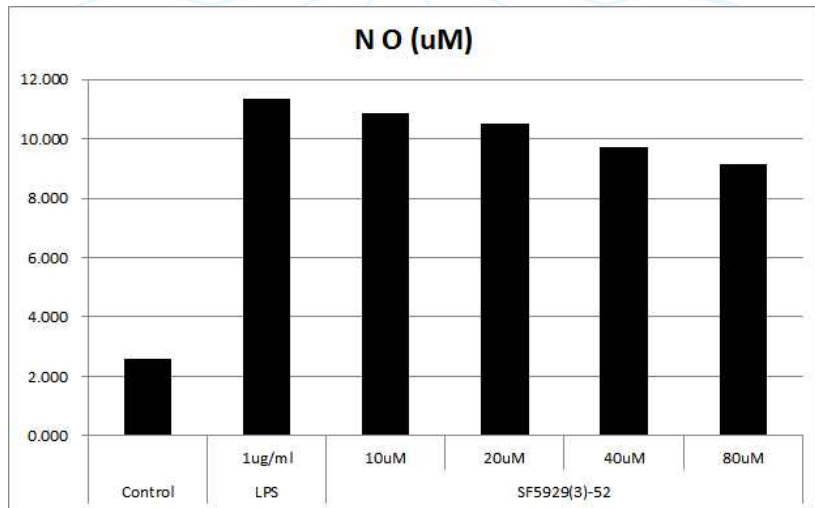


Figure 31. The effects of SF5929(3)-52 on nitrite in RAW264.7 macrophages stimulated with LPS.

- SF5929(3)-424, SF5929(3)-4122, SF5929(3)-4123, SF5929(3)-633, SF5929(3)-83 중에서 SF5929(3)-83 은 RAW264.7세포에서 LPS로 유발한 nitrite 생성을 감소시키는 효과가 있었음 (Figure 32).

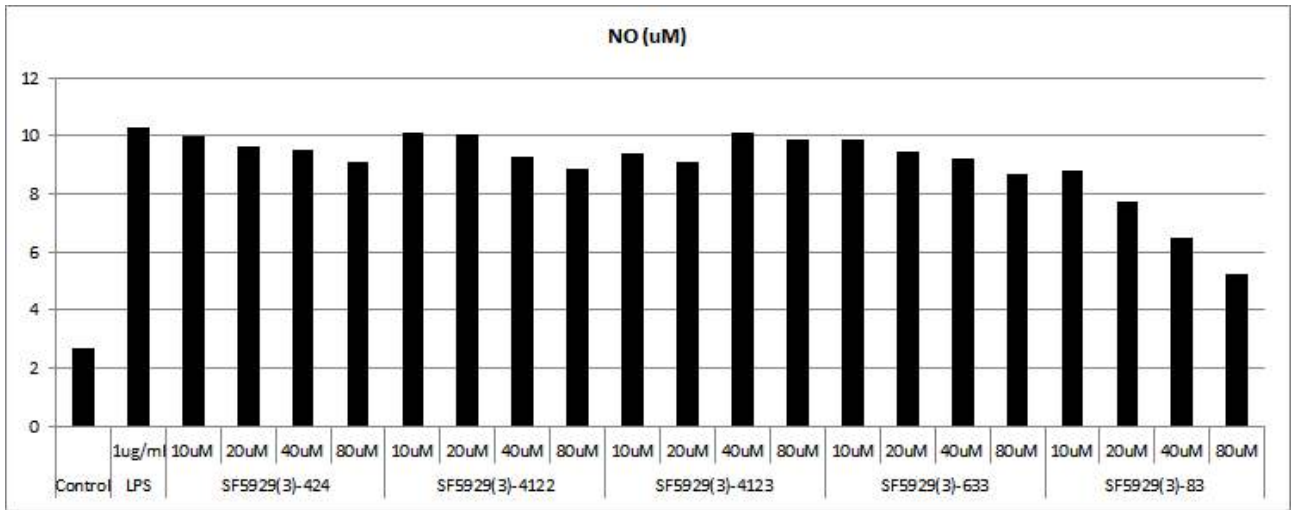


Figure 32. The effects of SF5929(3)-424, SF5929(3)-4122, SF5929(3)-4123, SF5929(3)-633, and SF5929(3)-83 on nitrite in RAW264.7 macrophages stimulated with LPS.

- **SF5929(3)-52**은 BV2세포에서 LPS로 유발한 nitrite 생성을 감소시키는 효과가 없었음 (Figure 33).

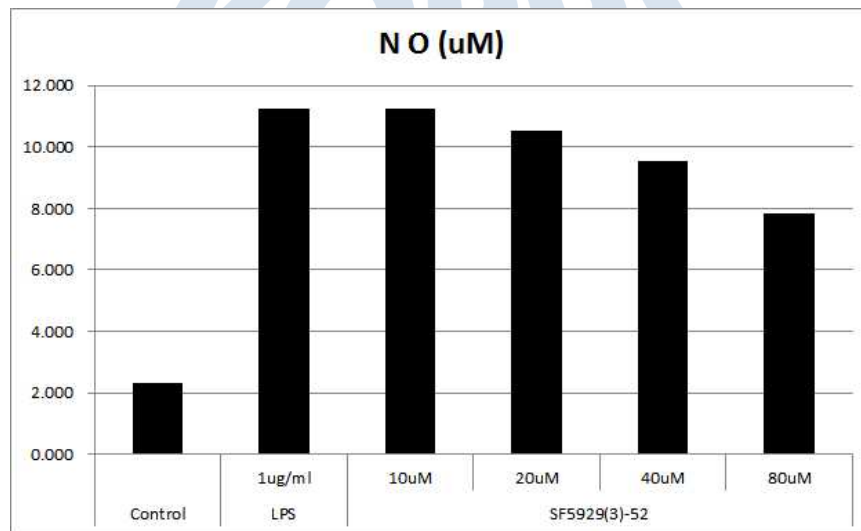


Figure 33. The effects of SF5929(3)-52 on nitrite in BV2 stimulated with LPS.

- **SF5929(3)-424**, **SF5929(3)-4122**, **SF5929(3)-4123**, **SF5929(3)-633**, **SF5929(3)-83** 중에서 **SF5929(3)-83** 은 BV2세포에서 LPS로 유발한 nitrite 생성을 감소시키는 효과가 있었음 (Figure 34).

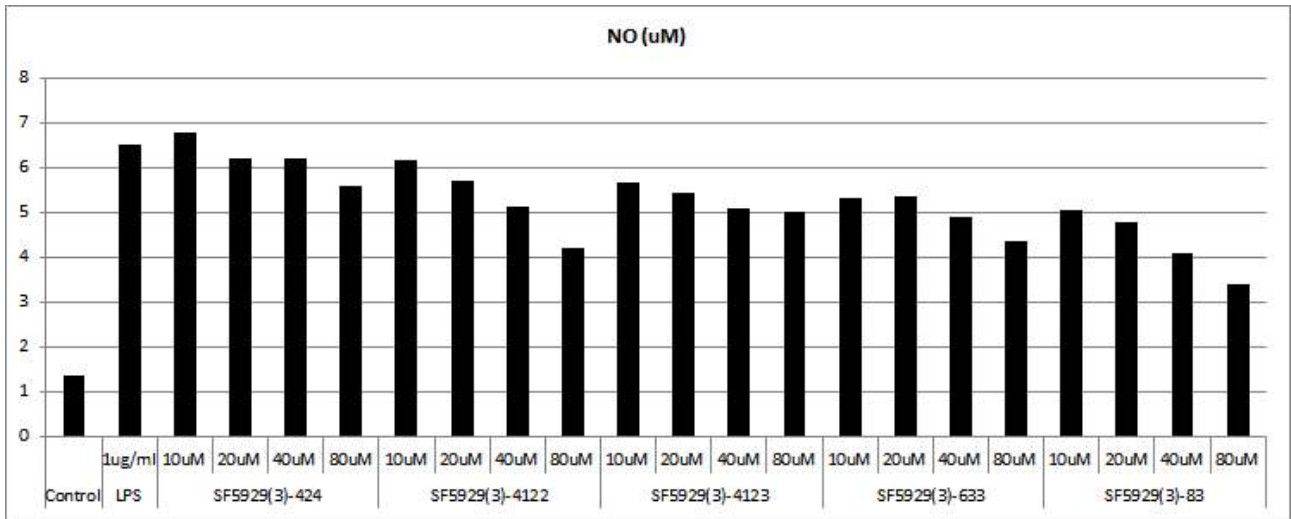


Figure 34. The effects of SF5929(3)-424, SF5929(3)-4122, SF5929(3)-4123, SF5929(3)-633, and SF5929(3)-83 on nitrite in BV2 stimulated with LPS.

○ 이와 같은 결과를 바탕으로 추후에 항염증을 나타내는 세부 기전을 밝히는 연구를 진행할 예정입니다.



[별첨2-4-2] 극지생물 유래 진균 SF5929로부터 분리한 대사체의 PTP1B 효소 억제 활성 검토

- 극지생물 유래 미생물 SF5929로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 SF5929(3)-52, SF5929(3)-424, SF5929(3)-4122, SF5929(3)-633, SF5929(3)-83, SF5929(3)-5422 의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과 SF5929(3)-52, SF5929(3)-633, SF5929(3)-83, SF5929(3)-5422에서 PTP1B 효소 억제 활성 효과가 우수하게 나타났음

Table 9. PTP1B inhibitory activity with IC₅₀ values of SF5929 series

Compounds	PTP1B Inhibitory Effects ^a (IC ₅₀ Values=μM)
SF5929(3)-52	8.1 ± 0.4
SF5929(3)-424	>20
SF5929(3)-4122	>20
SF5929(3)-633	6.1 ± 0.3
SF5929(3)-83	6.5 ± 0.3
SF5929(3)-5442	3.3 ± 0.2
Ursolic acid ^b	4.3 ± 0.2

^a Values present mean ± SD of triplicate experiments; ^b Positive control

- SF5929(3)-52, SF5929(3)-633 의 PTP1B 효소 억제 활성에 대한 특성을 확인하기 위해 kinetic assay를 진행한 결과 두 화합물은 비경쟁적으로 PTP1B 효소 활성 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였음 (Figure 35).

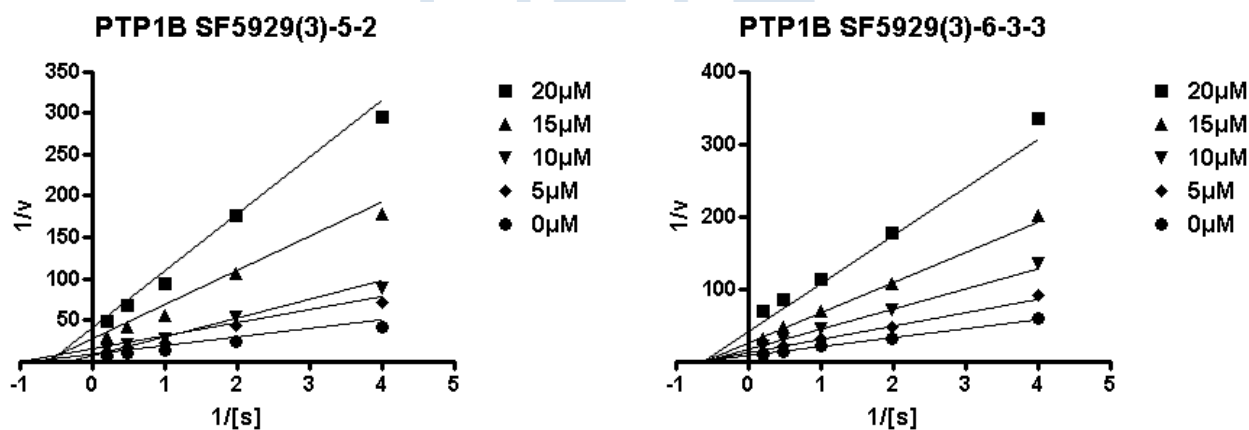


Figure 35. A Lineweaver-Burk plot for SF5929(3)-52 and SF5929(3)-633 in the inhibition of PTP1B. The data represent the mean values ± SD of three experiments. The concentrations (μM) of SF5929(3)-52 and SF5929(3)-633 are indicated.

- 3차년도 성과목표 3: 극지고유생물자원으로부터 항염 생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴
- 세부목표 3-1: 극지생물 유래 추출물의 제조

연구 내용	연구 결과
극지생물 시료를 이용하여 추출물 제작	- 극지생물 유래 진균 SF7160 균주의 배양 추출물 100.7 mg 외 9종의 균주배양 추출물 확보

[별첨 3-1] 극지생물 유래 시료를 이용한 추출물 제작 목록

NO	Sample ID	유래 소재	추출용매	추출물 무게
1	SF7160	극지생물 유래 미생물	EtOAc	100.7 mg
2	SF7169	극지생물 유래 미생물	EtOAc	29.3 mg
3	SF7172	극지생물 유래 미생물	EtOAc	460 mg
4	SF7173	극지생물 유래 미생물	EtOAc	119.4 mg
5	SF7174	극지생물 유래 미생물	EtOAc	325 mg
6	SF7181	극지생물 유래 미생물	EtOAc	121.6 mg
7	SF7183	극지생물 유래 미생물	EtOAc	322.6 mg
8	SF7195	극지생물 유래 미생물	EtOAc	369.8 mg
9	SF7197	극지생물 유래 미생물	EtOAc	157.8 mg
10	SF7296	극지생물 유래 미생물	EtOAc	50.6 mg

- 3차년도 세부목표 3-2: 생리활성 대사체의 분리

연구 내용	연구 결과
확보된 추출물에서 활성 대사체 분리 연구	- 전단계에서 확보된 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물로부터 4종의 대사체 분리 - 전단계에서 확보된 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 5종의 대사체 분리

[별첨 3-2-1] 극지생물 유래 진균 SF7078로부터 이차대사물질의 분리

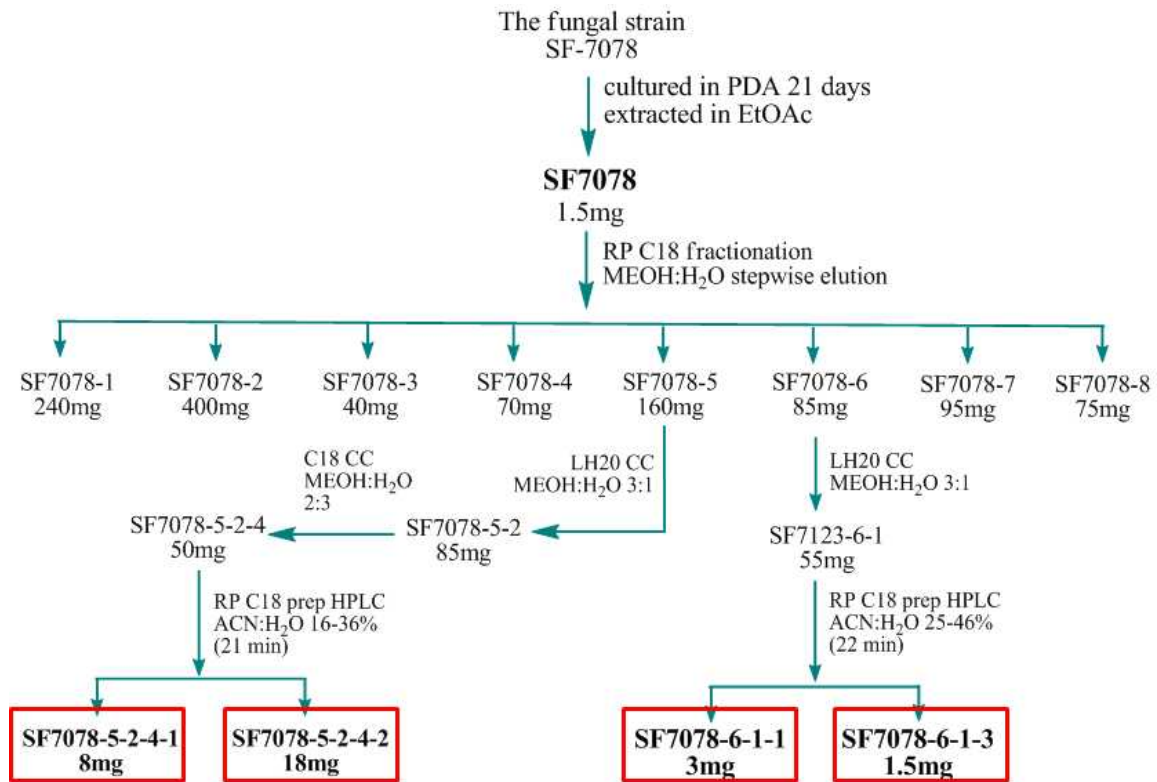


Figure 1. 진균 SF7078으로부터 분리된 단일화합물의 분리도

진균 SF7078는 각각 300 ml의 PDA배지 [% (w/v) potato starch, % (w/v) PDA, % (w/v) dextrose, % NaCl (w/v)]가 담긴 10개의 Fernbach flask (300 mL)에서 배양되었다. 각각의 Fernbach flask에 2 ml 의 균 배양액을 접종하여 25 °C에서 14 일간 배양하였다. PDA배지는 EtOAc (4 L)로 한 번 추출하였고, 추출액은 여과지로 여과하여 추출물 SF7078 (1500 mg)을 얻었다. 추출물은 C₁₈ flash column chromatography (CC, 4.5 x 30 cm)를 수행하였고, 이 때 용출 용매로는 단계적 기울기 용리법[20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 100% (v/v) MeOH in H₂O (400 mL each)]을 사용하여 8개의 분획물 SF7078-1~8을 얻었다.

분획물 SF7078-5는 먼저 고정상으로 Sephadex LH-20을 이용하여 이동상 컬럼(3 x 35cm) 3/1 (V/V), MeOH/물 혼합액을 사용하여 SF7078-5-1부터 SF7078-5-4의 소분획물을 얻었다. 두 번째 하위 분획인 SF7078-5-2는 RP C₁₈ CC (1.2 x 30 cm) 이용하여 MeOH/water [2/3 (v/v)]를 수행하여 4 개의 소분획물을 얻었고 그 중 소분획물 SF7078-5-2-4 는 RP C₁₈ prep HPLC [16-36% ACN in H₂O (0.1% HCOOH) over 21 min]로 정제하여 **SF7078-5-2-4-1** (8 mg, tR = 19 min) 과 다른 대사체 **SF7078-5-2-4-2** (18 mg, tR = 20 min)를 얻었다.

유사하게, 분획물 SF7078-6은 Sephadex LH-20 (2.0 x 30 cm)으로 채워진 크로마토그래피 컬럼을 적용하였다. 다음으로 컬럼은 MeOH in H₂O [3/1 (v/v)] 혼합액으로 용리시켜 SF7078-6-1부터 SF7078-6-3의 3개의 분획을 얻었다. 첫 번째 소분획물 SF7078-6-1은 YMC pack ODS-A (150x20 mm)컬럼 사용하여 RP C₁₈ prep HPLC [210nm, gradient of ACN in water (0.1% HCOOH) (25% to 46% in 22 minutes), flow rate = 5mL/min]을 수행하여 **SF7078-6-1-1** (3 mg, tR = 16.5 min) 및 **SF7078-6-1-3** (1.5mg, tR = 21 min)을 얻었다.

[별첨 3-2-2] 극지생물 유래 진균 SF7123 로부터 이차대사물질의 분리

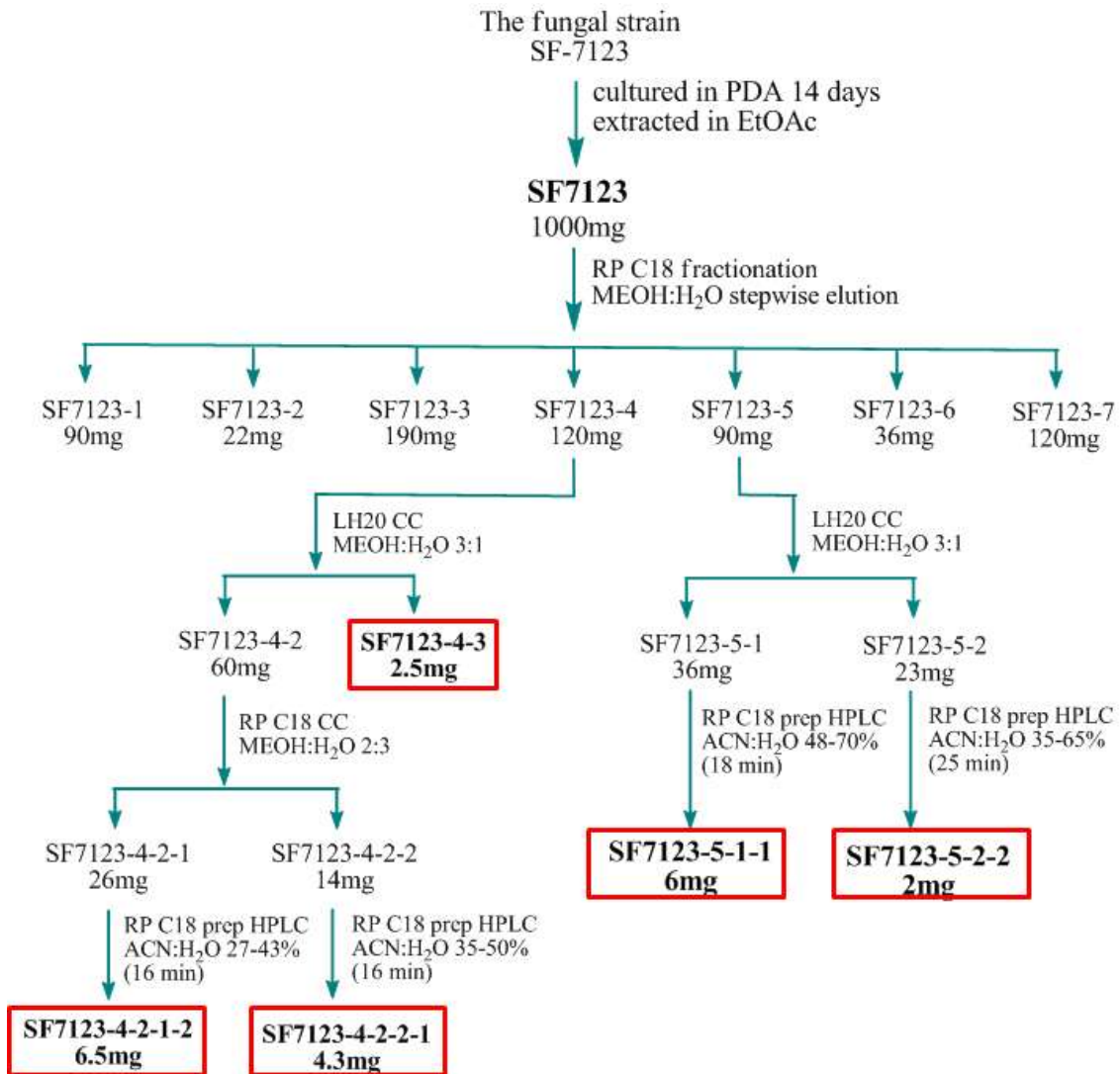


Figure 3. 진균 SF7123으로부터 분리된 단일화합물의 분리도

진균 SF7123는 각각 300 ml의 PDA배지 [% (w/v) potato starch, % (w/v) PDA, % (w/v) dextrose, % NaCl (w/v)]가 담긴 10개의 Fernbach flask (300 mL)에서 배양되었다. 각각의 Fernbach flask에 2 ml 의 균 배양액을 접종하여 25 °C에서 14 일간 배양하였다. PDA배지는 EtOAc (4 L)로 한 번 추출하였고, 추출액은 여과지로 여과하여 추출물 SF7123 (1000 mg)을 얻었다. 추출물은 C₁₈ flash column chromatography (CC, 4.5 x 30 cm)를 수행하였고, 이 때 용출 용매로는 단계적 기울기 용리법[20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 100% (v/v) MeOH in H₂O (400 mL each)]을 사용하여 8개의 분획물 SF7123-1~8을 얻었다.

분획물 SF7123-4는 먼저 고정상으로 Sephadex LH-20을 이용하여 이동상 컬럼(3 x 35cm) 3/1 (V/V), MeOH/물 혼합액을 사용하여 대사체 SF7123-4-3 (2.5 mg)를 얻었고, 두 개의 소분획물 SF7123-4-1와 SF7123-4-2을 얻었다. 소분획물 SF7123-4-2는 RP C₁₈ CC (1.2 x 30 cm) 이용하여 MeOH/water [2/3 (v/v)]를 수행하여 3 개의 소분획물을 얻었고 그 중

SF7123-4-2-1은 RP C₁₈ prep HPLC [27-43% ACN in H₂O (0.1% HCOOH) over 16 min]로 정제하여 대사체 **SF7123-4-2-1-2** (6.5 mg, t_R = 15min)를 얻었다. 유사하게, 소분획물 SF7123-4-2-2 또한 C₁₈ prep HPLC [35-50% ACN in H₂O (0.1% HCOOH) over 16 min]를 수행하여 대사체 **SF7123-4-2-2-1** (4.3 mg, t_R = 15.5 min)를 얻었다.

SF7123-5는 Sephadex LH-20 (2.0 x 30 cm)으로 채워진 크로마토그래피 컬럼을 적용하였다. 다음으로 컬럼은 MeOH in H₂O [3/1 (v/v)] 혼합액으로 용리시켜 SF7123-5-1부터 SF7123-5-3의 3개의 분획을 얻었다. 첫 번째 소분획물 SF7123-5-1은 YMC pack ODS-A (150 x 20 mm)컬럼 사용하여 RP C₁₈ prep HPLC [254nm, gradient of ACN in water (0.1% HCOOH) (48% to 70% in 18 min), flow rate = 5mL/min]을 수행하여 **SF7123-5-1-1** (6 mg, t_R = 17 min)을 얻었다. 다른 대사체 **SF7123-5-2-2** (2 mg, t_R = 23 min)는 두 번째 소분획물 SF7123-5-2를 RP C₁₈ prep HPLC [35-65% ACN in H₂O (0.1% HCOOH) over 25 min]을 수행하여 얻었다.

○ 3차년도 세부목표 3-3: 활성 대사체의 구조 분석

연구 내용	연구 결과
분리한 활성 대사체의 구조 분석	- 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물로부터 [(3S, 8R)-8-Hydroxyhexylitaconic acid] 외 3종의 대사체 구조분석 완료 (별첨 1-3-1) - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 neuchromenin 외 4종의 대사체 구조분석 완료 (별첨 1-3-2)

[별첨 3-3-1] 극지생물 유래 진균 SF7078로부터 분리된 이차대사물질의 구조분석

PDA 배지에서 배양된 추출물 SF7078으로부터 4개의 이차대사물질이 분리되었다. 4개의 알려진 화합물 SF7078-5-2-4-1 [(3S, 8R)-8-Hydroxyhexylitaconic acid], SF7078-6-1-1 [(3S,8R)-8-Hydroxy-3-carboxy-2-methylenonanoic acid], SF7078-5-2-4-2 [(3S)-9-Hydroxy-3-carboxy-2-methylenonanoic acid] 그리고 SF7078-6-1-3 (tensyuc acid B)이 분리되었다.

[별첨 3-3-1-1] SF7078-5-2-4-1 [(3S, 8R)-8-Hydroxyhexylitaconic acid]

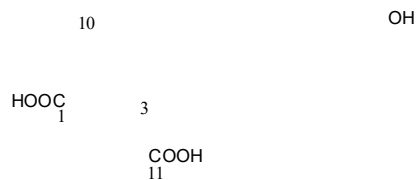


Figure 3. Structure of SF7078-5-2-4-1

SF7078-5-2-4-1의 ^1H NMR 스펙트럼에서 down field region [δ_{H} 3.53 (H-3), 4.29 (H-8)]에서 두 개의 methine, 그리고 1 개의 methyl group [δ_{H} 1.01 (H-9)], exo-methylene group [δ_{H} 5.65/6.10 (H-10)]를 나타내는 2 개의 신호가 확인되었다. ^1H NMR 스펙트럼에서의 나머지 신호는 4 개의 methylene group으로 확인되었다. (Table 1, Figure 4)

SF7078-5-2-4-1의 ^{13}C NMR 스펙트럼(Table 1, Figure 4)에서 2 개의 carbonyl groups [δ_{C} 168.06 (C-1), 173.75 (C-11)], 2 개의 다른 sp² signals [δ_{C} 125.86 (C-10), 140.41 (C-2)] 뿐 아니라 1 개의 oxygenated methine [δ_{C} 66.23 (C-8)] 및 methyl group [δ_{C} 24.19 (C-9)]으로 확인되는 11 개의 탄소 신호가 나타났다. 나머지 신호는 4 개의 methylenes 과 1 개의 methine [δ_{C} 47.20 (C-3)]으로 확인되었다.

SF7123-4-2-2-1 의 ^1H 및 ^{13}C NMR 데이터를 (3S,8R)-8-Hydroxy-3-carboxy-2-methylenenonanoic acid과 비교하여 광범위한 유사성이 나타났다. 결과적으로, 앞서 말한 증거를 바탕으로 두 화합물의 구조는 동일한 것으로 확인하였다. [참고문헌 27]

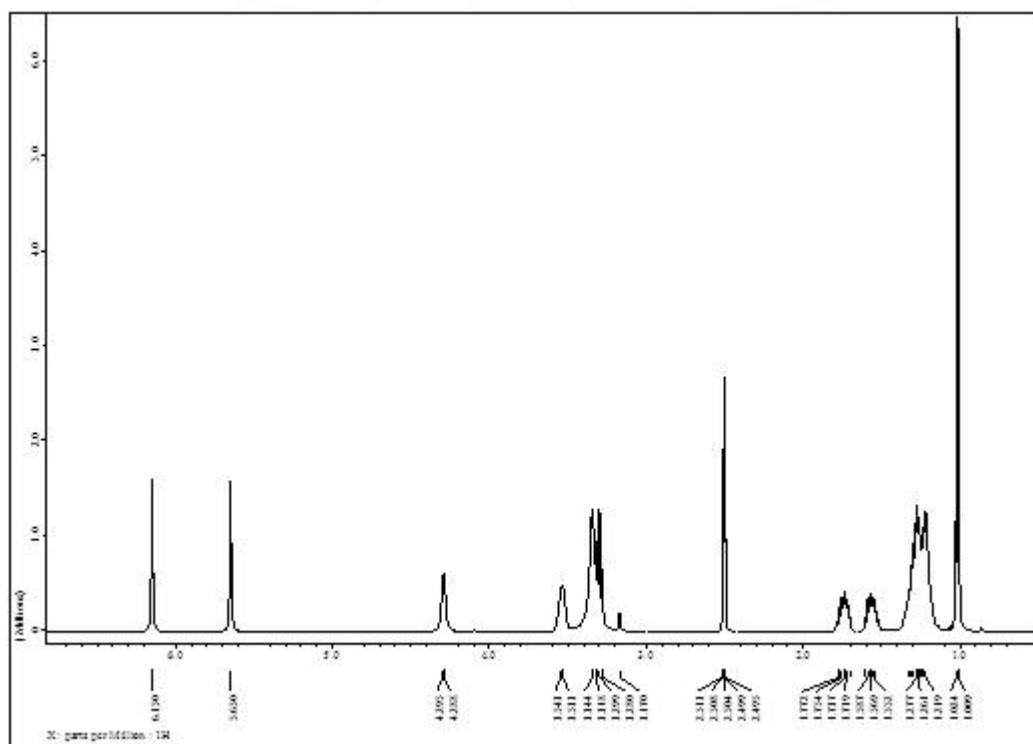


Figure 4. ^1H NMR spectra of SF7078-5-2-4-1

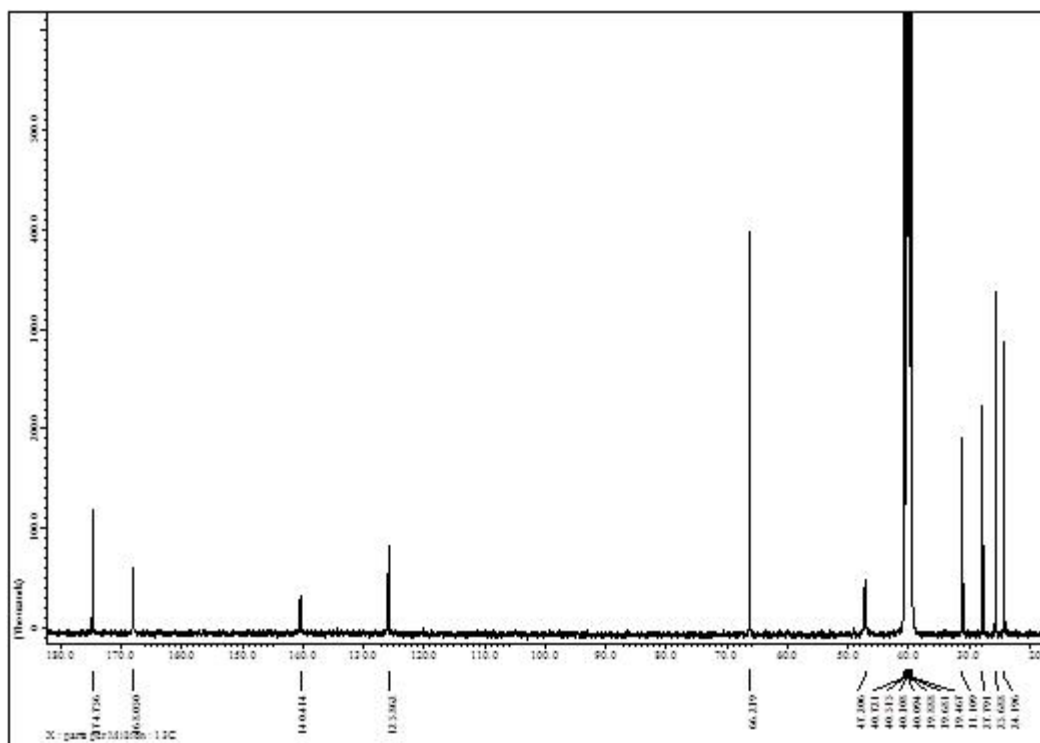


Figure 5. ^{13}C NMR spectra of SF7078-5-2-4-1

Table 1. NMR data for SF7078-5-2-4-1

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult (J in Hz)
1	168.06	-
2	140.41	-
3	47.20	3.53 (m)
4	31.10	1.73 (m) 1.56 (m)
5	27.79	1.26 ^e
6	25.68	1.26 ^e
7	39.68 ^e	1.26 ^e
8	66.23	4.29 (m)
9	24.19	1.01 (d, 6.0)
10	125.86	6.10 (s) 5.65 (s)
11	173.75	-

^aRecorded in DMSO, ^b100MHz, ^c400 MHz

^eoverlapping signal

[별첨 3-3-1-2] SF7078-6-1-1 [(3S,8R)-8-Hydroxy-3-carboxy-2-methylenenonanoic acid]

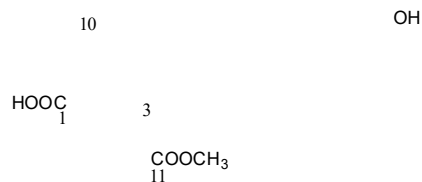


Figure 6. Structure of SF7078-6-1-1

SF7078-6-1-1의 ¹H and ¹³C NMR 데이터는 H-12에서 C-11로의 HMBC 상관관계 (Figure 9)에 의해 정의된 methoxyl group [δ_H 3.64 (H-12) and δ_C 51.06 (C-12)]의 존재를 제외하고 SF7078-6-1-1과 (3S,8R)-8-Hydroxy-3-carboxy-2-methylenenonanoic acid 사이의 유사한 화학적 이동값과 함께 SF7078-5-2-4-1과 유사한 분광학적 데이터가 나타났다. [참고문헌 27]

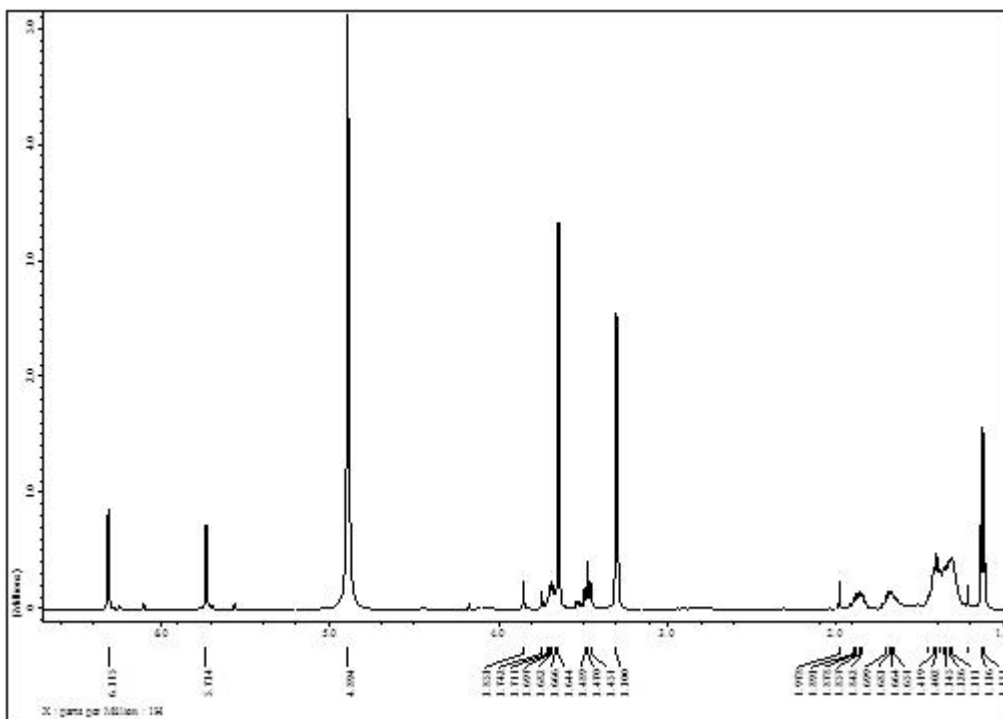


Figure 7. ¹H NMR spectra of SF7078-6-1-1

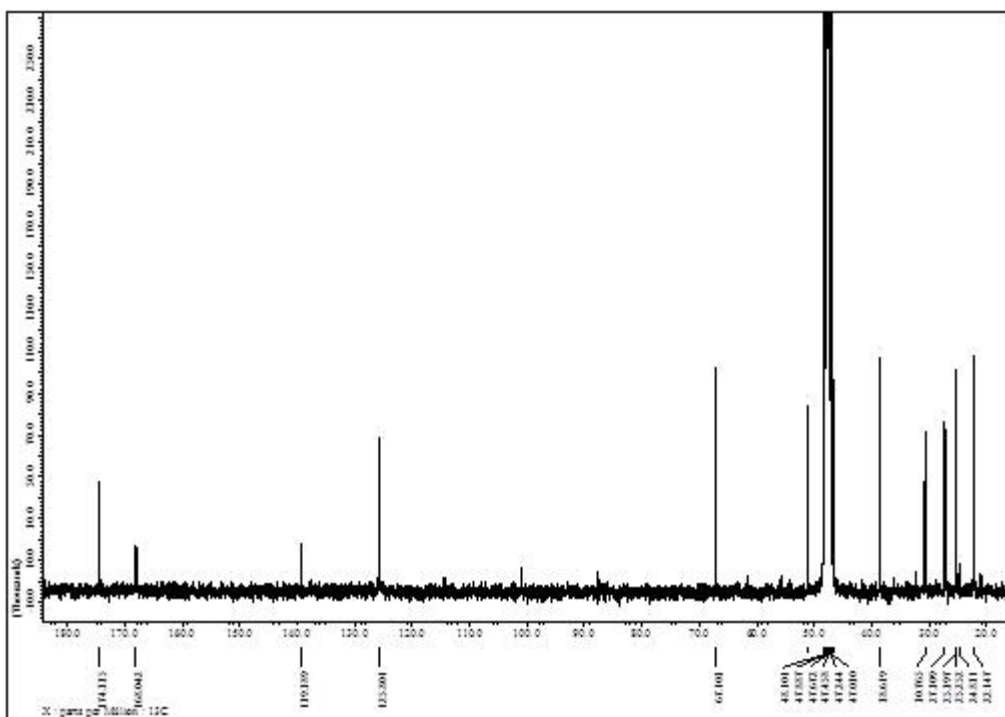


Figure 8. ^{13}C NMR spectra of SF7078-6-1-1

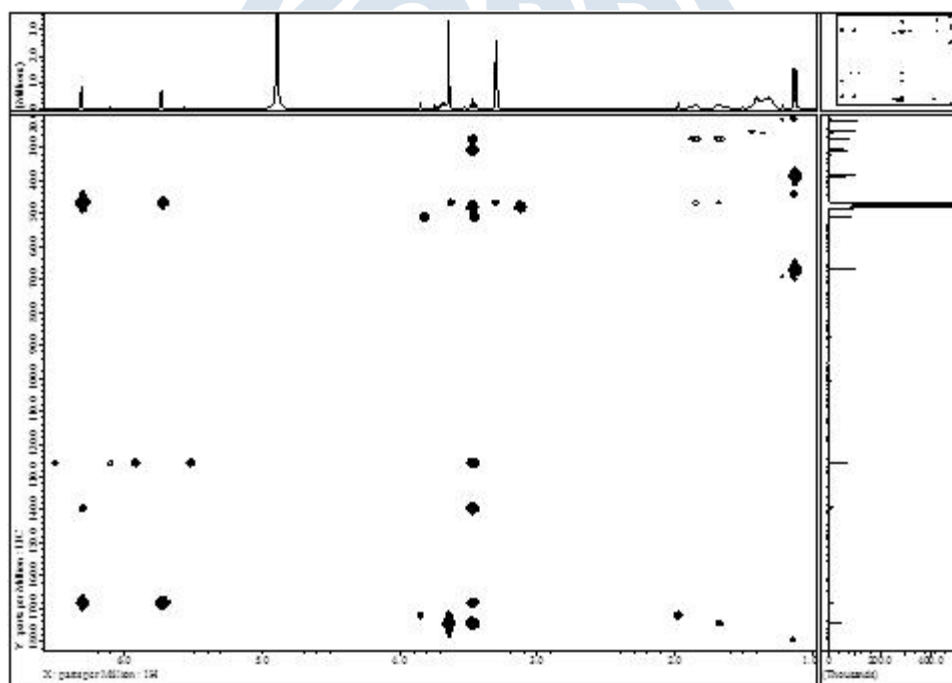


Figure 9. HMBC spectra of SF7078-6-1-1

Table 2. NMR data for SF7078-6-1-1

Position	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult (J in Hz)
1	168.04	-
2	139.38	-
3	47.20	3.47 (t, 7.6)
4	30.76	1.85 (m) 1.68 (m)
5	27.30	1.35 ^e
6	25.25	1.35 ^e
7	38.61	1.35 ^e
8	67.10	3.68 (m)
9	22.14	1.11 (d, 6.0)
10	125.80	6.31 (s) 5.73 (s)
11	174.35	-
12	51.06	3.64 (s)

Recorded in MeOD-*d*6, ^b100MHz, ^c400 MHz

^eoverlapping signal



[별첨 3-3-1-3] SF7078-5-2-4-2 [(3S)-9-Hydroxy-3-carboxy-2-methylenenonanoic acid]

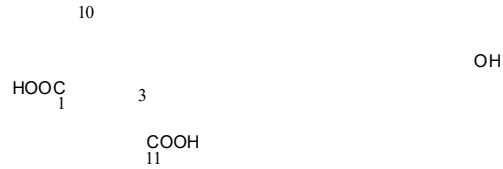


Figure 10. Structure of SF7078-5-2-4-2

SF7078-5-2-4-2의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 11 개의 탄소 신호는 2 개의 carbonyl carbons [δ_{C} 168.27 (C-1), 175.82 (C-11)], 1 개의 sp² methylene carbon [δ_{C} 125.55 (C-10)], 그리고 sp² quaternary carbon [δ_{C} 139.72 (C-2)]를 포함하는 것이 확인되었다. protonated methylene [δ_{C} 61.62 (C-9)]의 존재, 1 개의 methine [δ_{C} 46.83 (C-9)] 그리고 four methylene을 나타내는 4 개의 신호 또한 이 스펙트럼에서 확인되었다.

SF7078-5-2-4-2의 ^{13}C NMR 데이터는 (3S)-9-Hydroxy-3-carboxy-2-methylenenanoic acid 과 비교하여 유사한 화학적 이동값을 나타내어 결론적으로 두 화합물은 동일하다는 것을 확인하였다. [참고문헌 27]

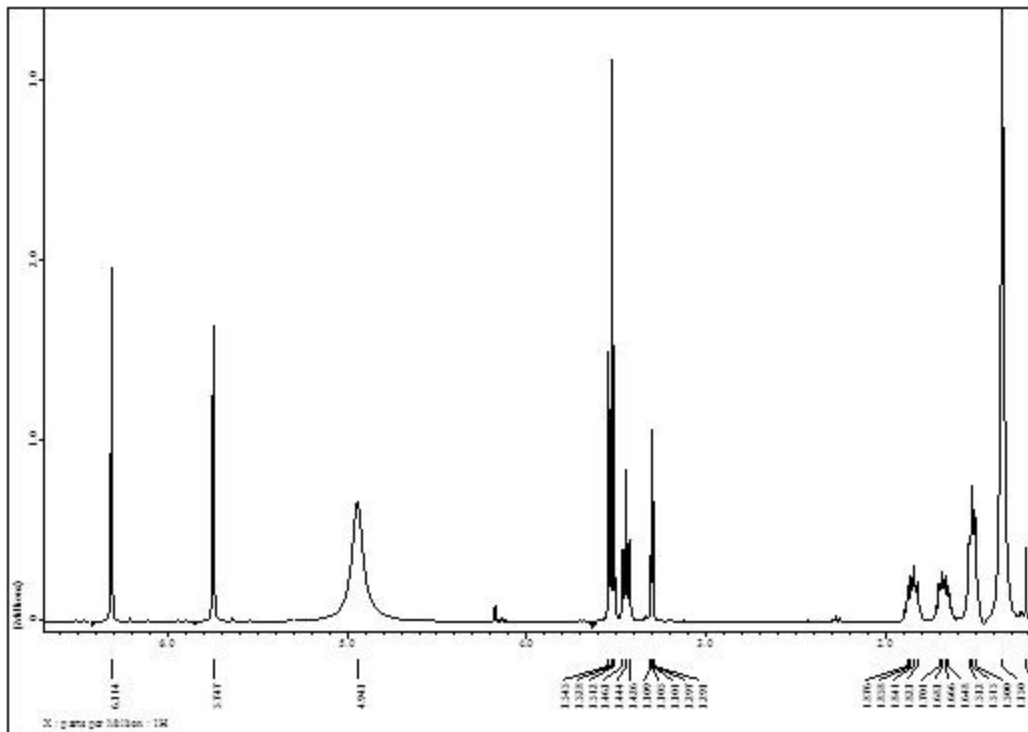


Figure 11. ^1H NMR spectra of SF7078-5-2-4-2

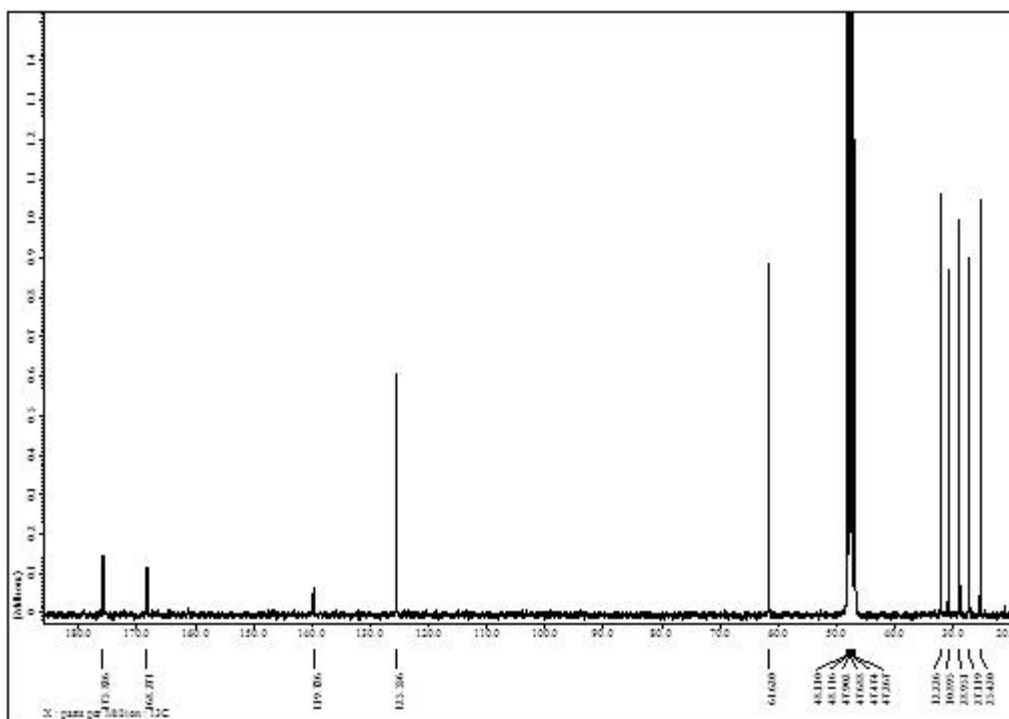


Figure 12. ^{13}C NMR spectra of SF7078-5-2-4-2

Table 3. NMR data of SF7078-5-2-4-2

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult (J in Hz)
1	168.27	-
2	139.72	-
3	46.83	3.44, t (7.6)
4	30.89	1.84, m
		1.66, m
5	27.33	1.34, m
6	28.95	1.34, m
7	25.42	1.34, m
8	32.22	1.51, m
9	61.62	3.52, t (6.8)
10	125.55	6.31, s
		5.74, s
11	175.82	-

^aRecorded in MeOD-*d*6, ^b100MHz, ^c400 MHz

^eoverlapping signal

[별첨 3-3-1-4] SF7078-6-1-3 (tensyuc acid B)

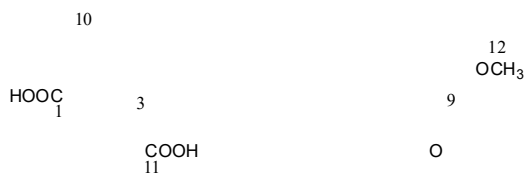


Figure 13. Structure of SF7078-6-1-3

SF7078-6-1-3의 ^{13}C NMR 스펙트럼은 3 개의 carbonyl carbons [δ_{C} 169.18 (C-1), 174.60 (C-11), 176.26 (C-9)], 2 개의 다른 sp² carbons [δ_{C} 125.00 (C-10), 140.33 (C-2)] 그리고 1 개의 methoxyl carbon [δ_{C} 50.62 (C-12)]를 포함하는 12 개의 탄소 신호가 나타났다. 나머지 탄소 신호는 5 개의 methylene carbon 및 1 개의 methine group [δ_{C} 48.02 (C-3)]로 나타났다. ^1H NMR 에서의 강한 peak는 H-12에서 C-9 로의 HMBC 상관관계에 의해 그 위치가 추측된 1 개의 methoxyl group [δ_{H} 3.63 (H-12)]를 나타내었다.

SF7078-6-1-3 의 ^{13}C NMR에 대한 상세한 분석과 그에 대한 tensyuc acid B의 NMR 데이터와의 비교는 유사한 화학적 이동값을 나타내어 두 화합물이 모두 tensyuc acid B과 동일한 것으로 결론 내렸다. [참고문헌 28]

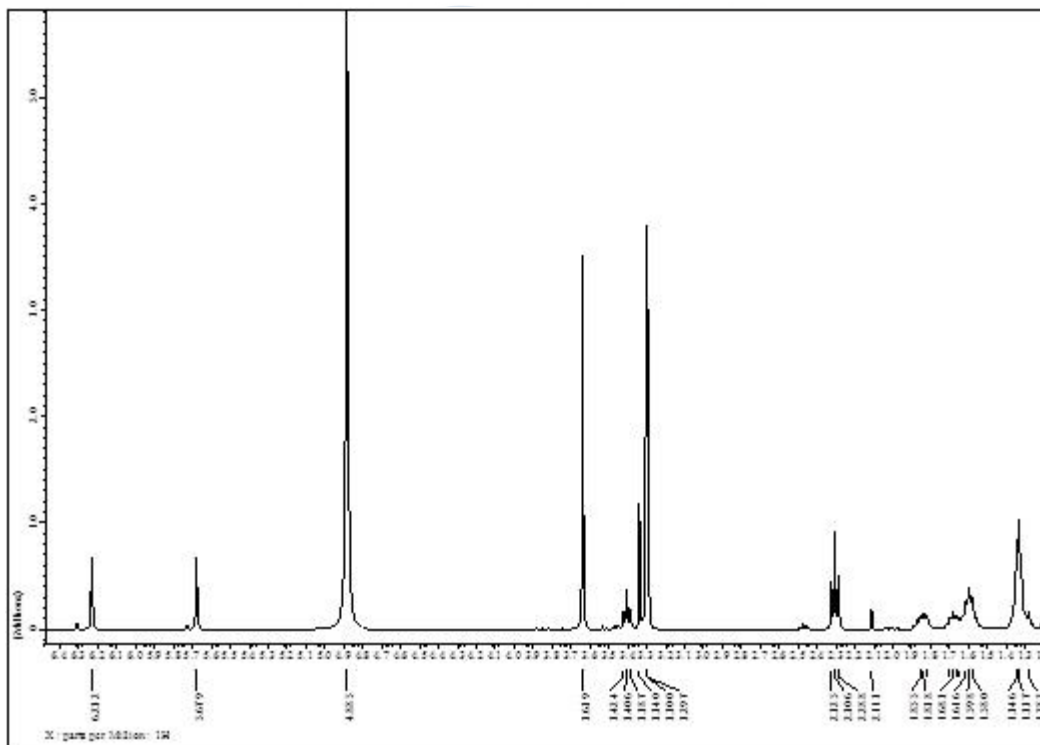


Figure 14. ^1H NMR spectra of SF7078-6-1-3

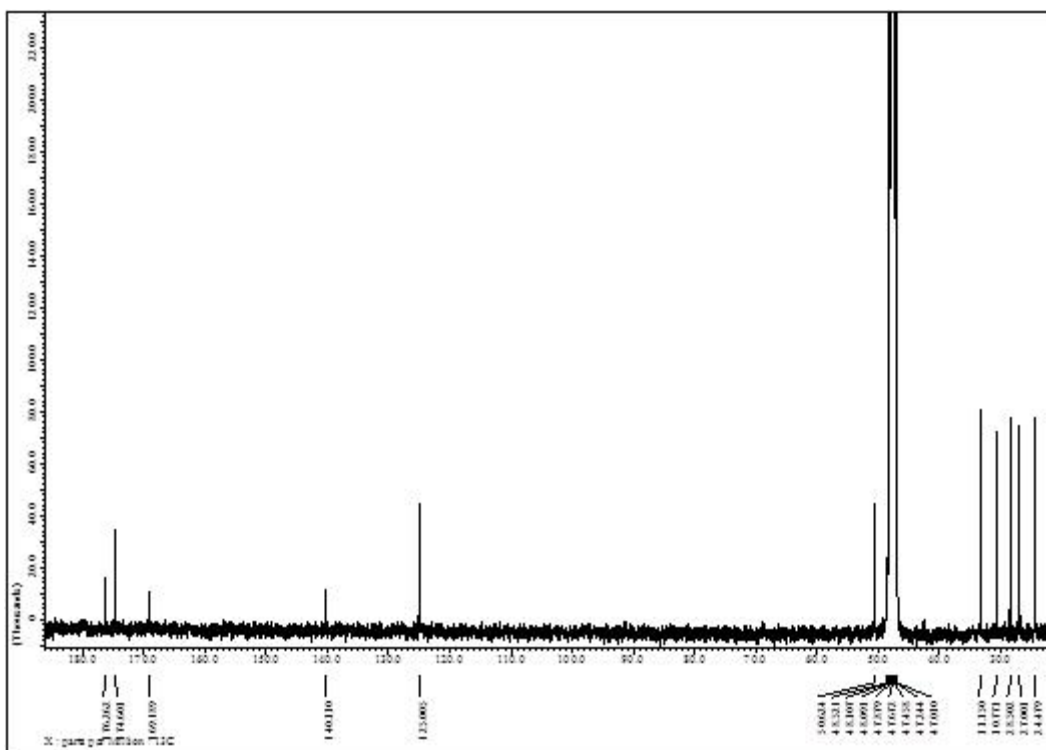


Figure 15. ^{13}C NMR spectra of SF7078-6-1-3

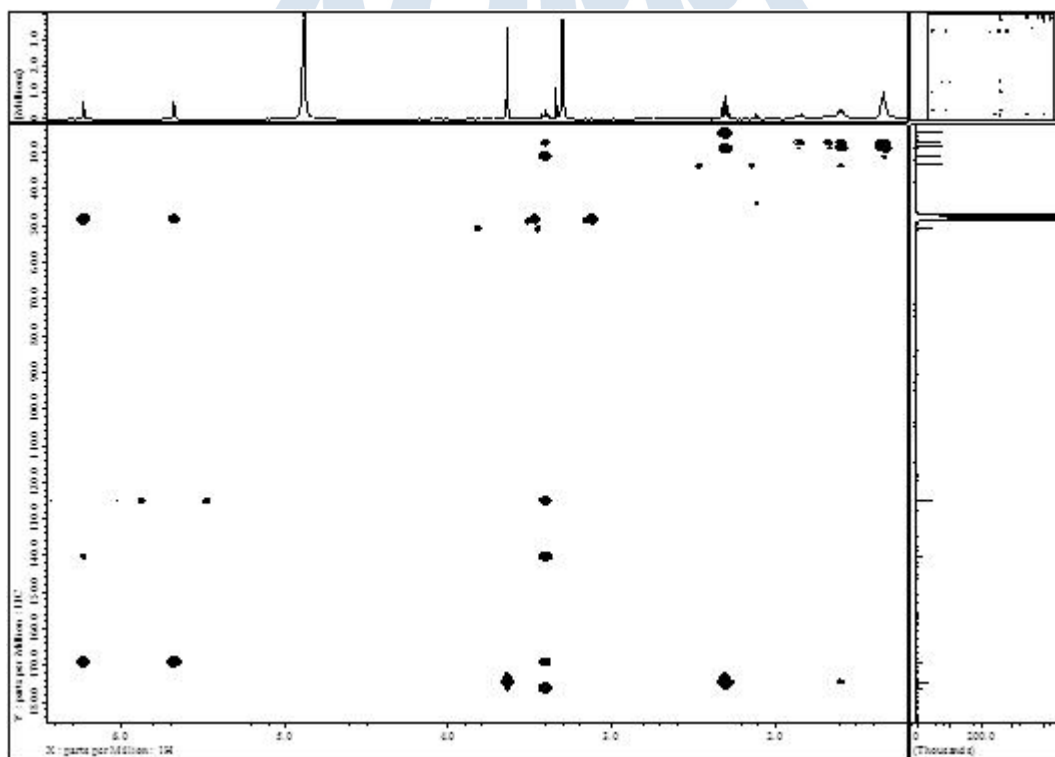


Figure 16. HMBC spectra of SF7078-6-1-3

Table 4. NMR data of SF7078-6-1-3

Position	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult (J in Hz)
1	169.18	-
2	140.33	-
3	48.02 ^e	3.40 (t, 7.6)
4	30.77	1.83 (m) 1.66 (m)
5	27.00	1.33 ^e
6	28.50	1.33 ^e
7	24.47	1.61 (m)
8	33.35	2.30 (t, 7.6)
9	176.26	-
10	125.00	6.23 (s) 5.67 (s)
11	174.60	-
12	50.62	3.63

^aRecorded in MeOD-*d*4, ^b100MHz, ^c400 MHz

^eoverlapping signal



[별첨 3-3-2] 극지생물 유래 진균 SF7123 로부터 분리된 이차대사물질의 구조분석

PDA 배지에서 배양된 추출물 SF7123으로부터 5개의 이차대사물질이 분리되었다. 1 개 신규 화합물 [SF7123-4-2-2-1]과 함께 4개의 알려진 화합물 neuchromenin [SF7123-4-2-1-2], deoxyfunicone [SF7123-5-1-1], myxotrichin C [SF7123-4-3] 그리고 asterric acid [SF7123-5-2-2]이 분리되었다.

[별첨 3-3-2-1] SF7123-4-2-2-1 (new compound)

SF7123-4-2-2-1는 HR-ESI-MS 측정을 통해 분자량 262 g/mol 과 C₁₄H₁₄O₅의 분자식을 확인하였다. 이 화합물의 선광도는 -344.63의 [α]²⁰_D (c 0.48, CH₃OH)를 나타내었다.

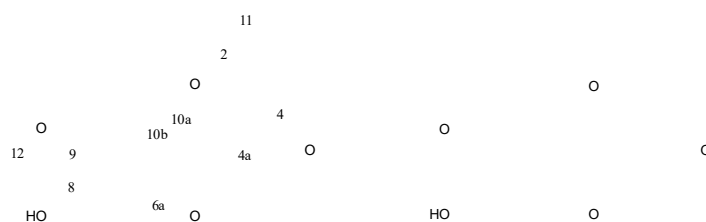


Figure 17. Structure, key HMBC and COSY correlations of SF7123-4-2-2-1

SF7123-4-2-2-1의 ¹³C NMR 스펙트럼 (Table 5, Figure 19)는 1개의 methylene carbon [δ_c 42.22 (C-3)], 1 개의 methyl group [δ_c 19.29 (C-11)], 그리고 1개의 carbonyl group [δ_c 189.64 (C-4)]을 포함하는 14개의 탄소 신호가 확인되었다. 2개의 oxygenated carbons [δ_c 75.97 (C-2), 62.77 (C-5)]과 2개의 aromatic methine carbons [δ_c 103.43 (C-7), 107.59 (C-10)]도 확인되었다. 게다가 6개의 sp² quaternary carbon signals [101.08 (C-4a), 154.95 (C-6a), δ_c 153.16 (C-8), 143.45 (C-9), 106.56 (C-10a), 164.4 (C-10b)] 또한 ¹³C NMR 스펙트럼에서 나타났다.

게다가, SF7123-4-2-2-1의 ¹H-¹H COSY and HMBC spectrum (Table 5, Figure 20, Figure 21) 의 상세한 분석을 통해 평면구조임을 확인하였다. methoxy group과 C-9의 결합은 11-OCH₃에서 C-9로의 HMBC 상관관계에 의해 결정되었다.

SF7123-4-2-2-1의 ¹H 및 ¹³C NMR 데이터를 neuchromenin (Tanada, Y. and Mori, K. (2001)와 비교하여 neuchromenin의 구조에서 hydroxyl group 대신 C-9 에 부착된 methoxy carbon 의 존재를 제외하고 광범위한 유사성들이 나타났다. 결과적으로, 앞서의 결과를 바탕으로 SF7123-4-2-2-1의 구조는 새로운 천연물로 확인되었고 9-methoxynecuchromenin로 명명되었다. [참고문헌 29]

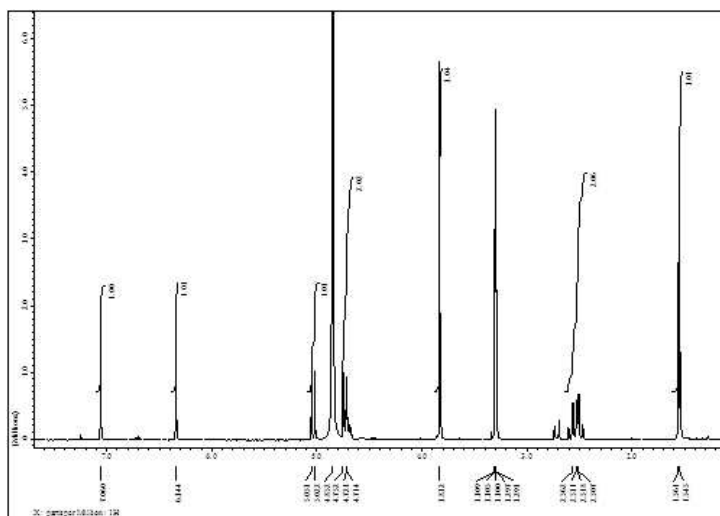


Figure 18. ^1H NMR spectra of SF7123-4-2-2-1

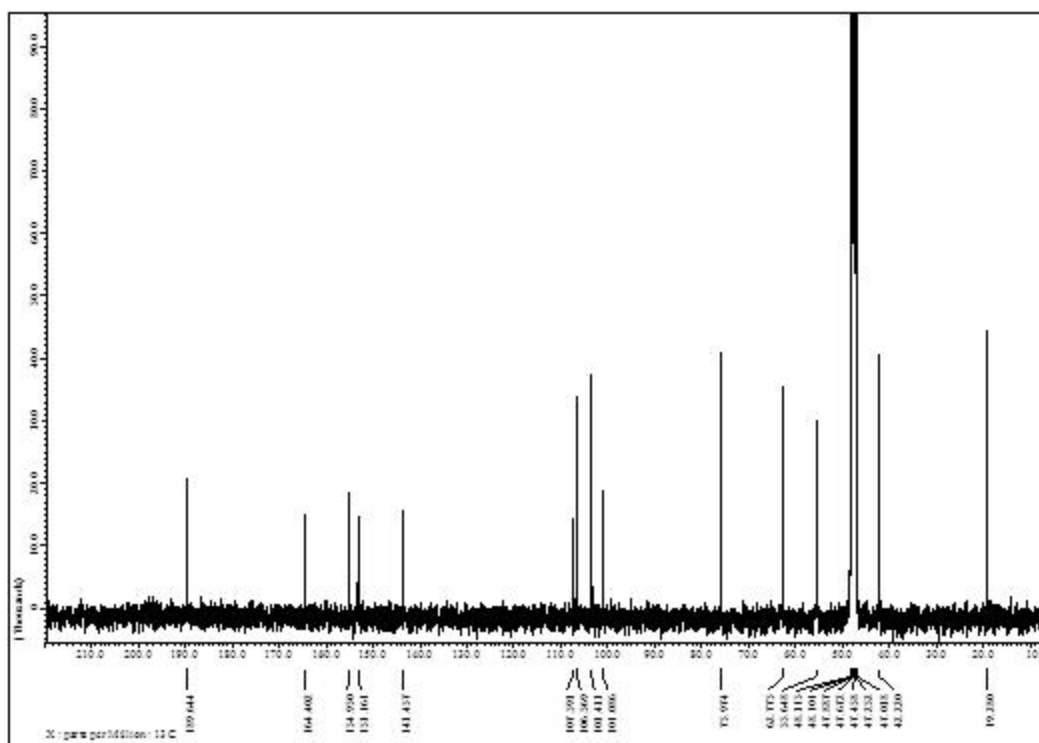


Figure 19. ^{13}C NMR spectra of SF7123-4-2-2-1

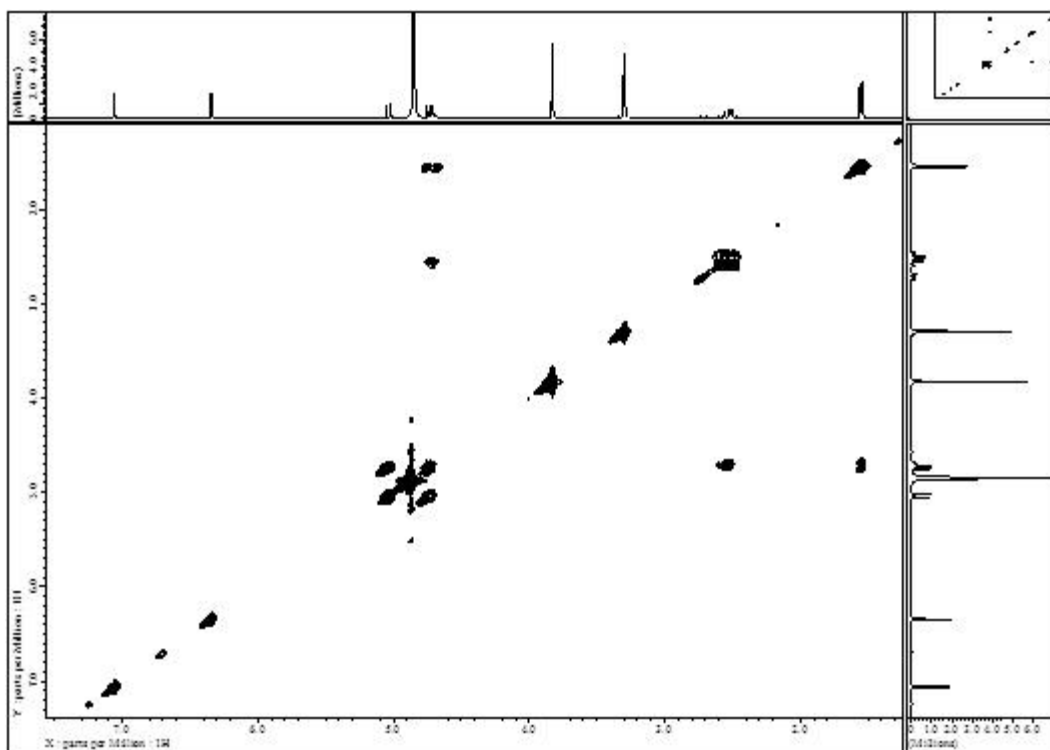


Figure 20. COSY spectra of SF7123-4-2-2-1

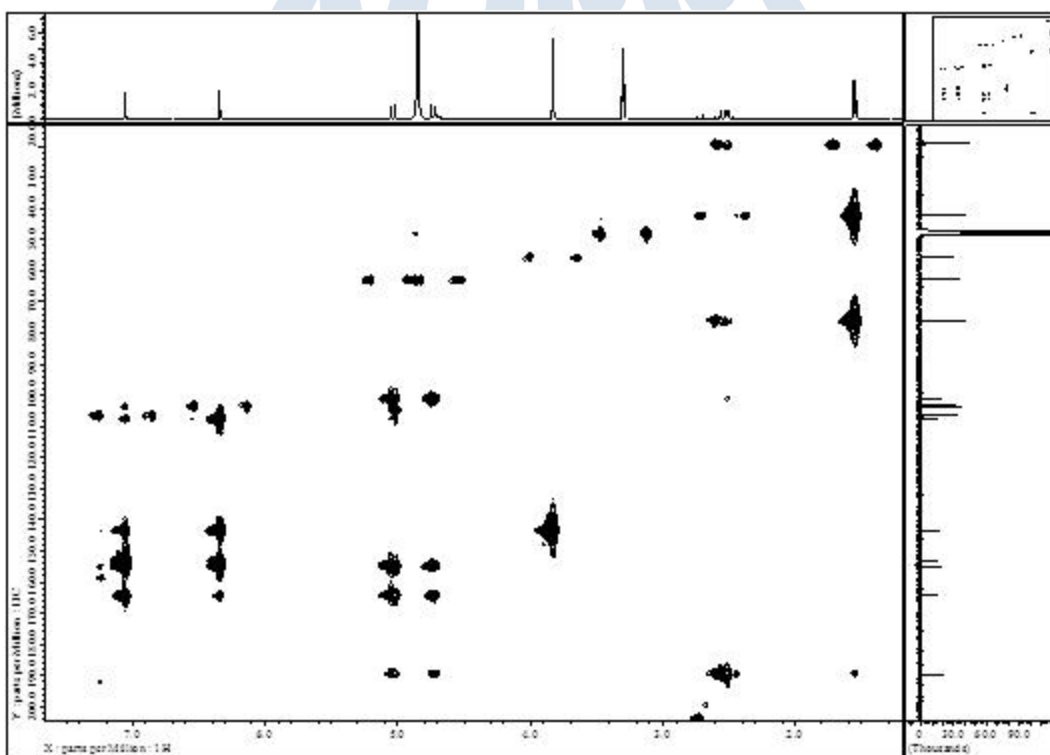


Figure 21. HMBC spectra of SF7123-4-2-2-1

Table 5. NMR data of SF7123-4-2-2-1

Position	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult (J in Hz)	HMBC
2	75.97	4.72 (m) ^e	
3	42.22	2.53 (m)	19.28, 75.97, 189.64
4	189.64	-	-
4a	101.08	-	-
5	62.77	5.03 (d, 12.0), 4.73 (d, 12.0) ^e	101.08, 154.95, 164.40, 189.64
6a	154.95	-	-
7	103.43	6.34 (s)	107.59, 143.45, 153.16, 154.95, 164.40
8	153.16	-	-
9	143.45	-	-
10	107.59	7.06 (s)	107.59, 143.45, 153.16, 154.95, 164.40
10a	106.56		
10b	164.4	-	-
11	19.29	1.55 (d, 6.4)	42.22, 75.97, 189.64
12	56.64	3.83 (s)	143.45

^aRecorded in DMSO, ^b100MHz, ^c 400 MHz ^eoverlapping signal



[별첨 3-3-2-2] SF7123-4-2-1-2 (neuchromenin)

SF7123-4-2-1-2는 HR-ESI-MS 측정을 통해 분자량 248 g/mol 과 $C_{13}H_2O_5$ 의 분자식을 확인하였다. 이 화합물의 선광도는 -512.66 의 $[\alpha]^{20}_D$ (c 0.72, CH_3OH)를 나타내었다.

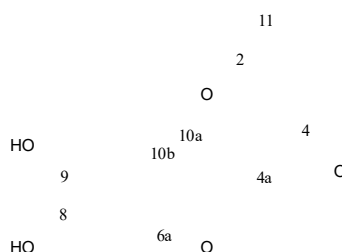


Figure 22. Structure of SF7123-4-2-1-2

SF7123-4-2-1-2의 1H 및 ^{13}C NMR 데이터는 SF7123-4-2-2-1의 분광학적 데이터와 유사하게 나타났는데, SF7123-4-2-1-2의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 2개의 oxygenated carbons [δ_c 75.80 (C-2), 62.66 (C-5)], 2개의 sp^2 methine carbons [δ_c 103.02 (C-7), 109.61 (C-10)], 1개의 a carbonyl group [δ_c 198.65 (C-4)] 및 methylene carbon [δ_c 42.18 (C-3)] 과 methyl group [δ_c 19.26 (C-11)]을 포함하는 13개의 탄소 존재가 확인되었기 때문이다. (Table 6, Figure 23). 게다가, 6개의 sp^2 quaternary carbon signals [δ_c 101.14 (C-4a), 153.87 (C-6a), 107.88 (C-10a), 164.69 (C-10b), 152.01 (C-8), 140.48 (C-9)] 또한 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 확인되었다. 두 가지 구조들의 차이점은 methoxy carbon의 신호의 부재였다.

SF7123-4-2-1-2의 1H and ^{13}C NMR (Table 6)을 neuchromenin 의 문헌과 비교하여 (Tanada, Y. and Mori, K. (2001) 유사한 화학적 이동값이 나타났다. 또한 이것의 선광도값은 neuchromenin의 값과 일치하여 SF7123-4-2-1-2가 neuchromenin.라는 결론을 얻었다. [참고문헌 29]

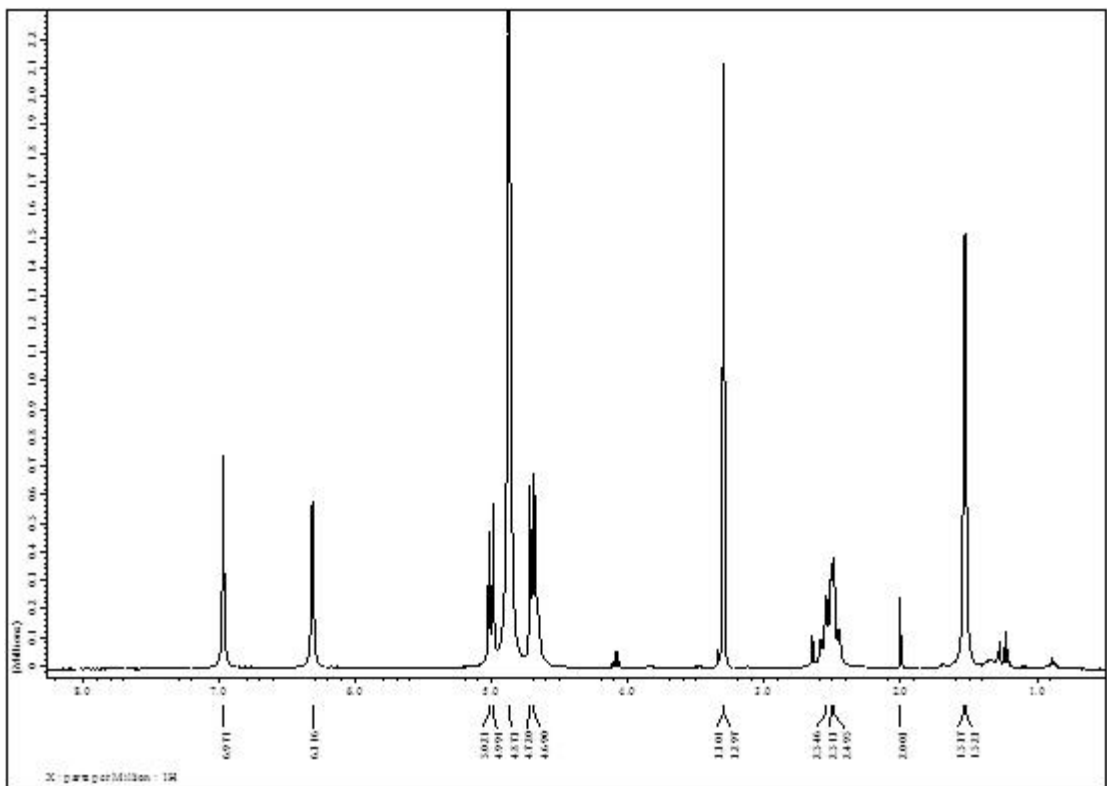


Figure 23. ^1H NMR spectra of SF7123-4-2-1-2

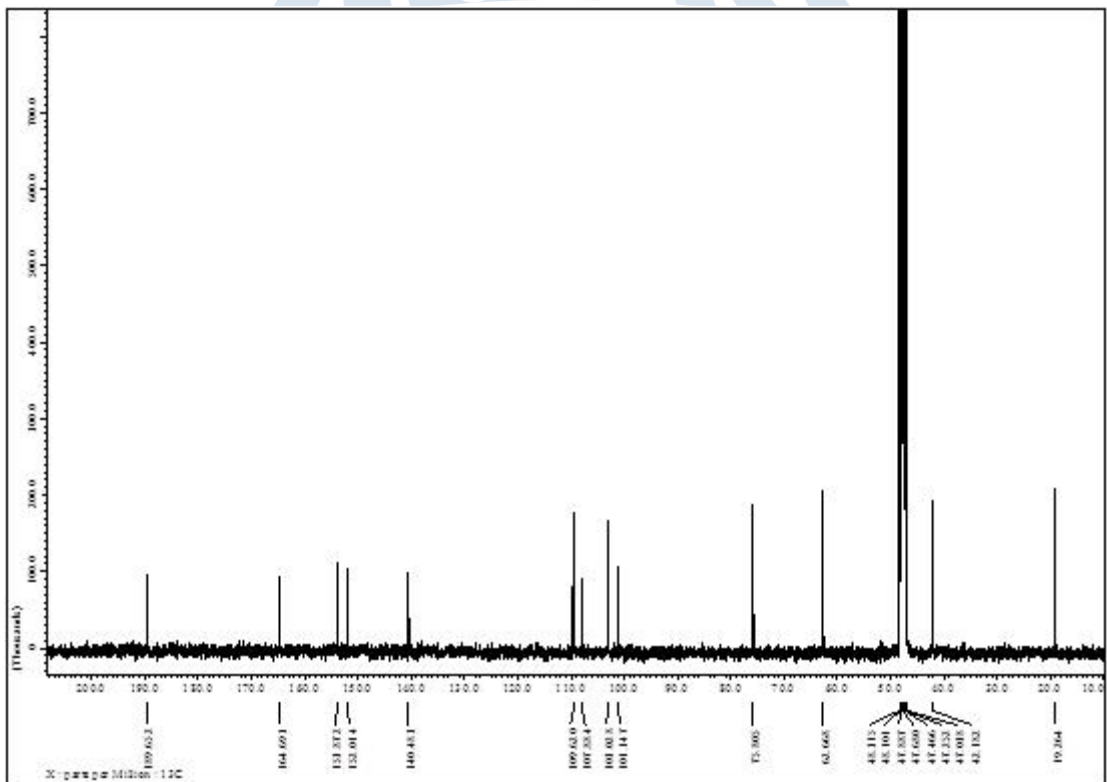


Figure 24. ^{13}C NMR spectra of SF7123-4-2-1-2

Table 6. NMR data for SF7123-4-2-1-2.

Position	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult (J in Hz)
2	75.80	4.69 (m) ^e
3	42.18	2.51 (m)
4	198.65	-
4a	101.14	-
5	62.66	5.01 (d, 12.0), 4.70 (d, 12.0) ^e
6a	153.87	-
7	103.02	6.31 (s)
8	152.01	-
9	140.48	-
10	109.61	6.97 (s)
10a	107.88	-
10b	164.69	-
11	19.26	1.53 (d, 5.6)

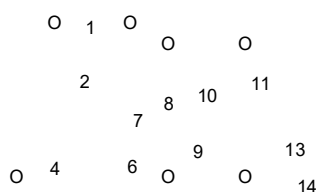
^aRecorded in MEOD-*d*₆, ^b100MHz, ^c400 MHz

^eoverlapping signal



[별첨 3-3-2-3] SF7123-5-1-1 (deoxyfunicone)

SF7123-5-1-1의 HR-ESI-MS 스펙트럼에 의해 C₁₉H₁₈O₇의 분자식과 358 g/mol의 분자량으로 확인되었다.



16

Figure 25. Structure of SF7123-5-1-1

SF7123-5-1-1의 ¹H NMR 스펙트럼 (Table 7, Figure 26)에서 2개의 sp² methine protons [δ_H 6.67 (dq, 15.6, 6.8 Hz, H-14) and 6.05 (d, 15.6 Hz, H-15)]이 이중결합에 속하며, H-14와 H-15의 multiplicity 및 coupling constant는 trans orientation를 제시한다. ¹H NMR 스펙트럼은 또한 4개의 aromatic methine protons [δ_H 6.06 (H-12), 6.62 (H-5), 7.07 (H-3), 8.50 (H-9)]으로 추론되었다. 나머지 proton 신호는 3개의 methoxy proton [δ_H 3.77 (1-OCH₃), 3.85 (4-OCH₃), 3.72 (6-OCH₃)] 및 methyl proton [δ_H 1.93 (H-16)]로 확인되었다.

반면에, ¹³C NMR 스펙트럼에서 methoxy group으로 나타나는 3개의 신호 [δ_C 52.47 (1-OCH₃), 55.72 (4-OCH₃), 56.14 (6-OCH₃)]와 함께 6개의 sp² methine [δ_C 105.29 (C-3), 103.10 (C-5)], 1개의 methyl carbon [δ_C 18.69 (C-16)]를 포함하는 18개의 탄소 신호가 확인되었다. 다른 탄소 신호와 함께 [δ_C 129.94 (C-2), 160.93 (C-4), 157.47 (C-6), 126.14 (C-10), 161.44 (C-11)] 3개의 carbonyl carbons [δ_C 166.55 (C-1), 191.99 (C-8), 176.0 (C-11)]를 포함하는 8개의 sp² quaternary carbons가 ¹³C NMR 스펙트럼에서 관측되었다.

SF7123-5-1-1의 구조는 ¹³C NMR 스펙트럼에서 CDCl₃로 19개의 탄소와 quaternary aromatic carbon 신호의 부재가 그것의 flexibility 및 relaxation time t_2 에 의해 나타났다. 두 번째로 [δ_C 124.44 (C-7)]에 존재하는 신호는 MEOD-*d*₄에서 기록되었다 (Figure 28).

SF7123-5-1-1의 ¹H 및 ¹³C NMR 을 deoxyfunicone의 문헌과 비교하여 (Sassa, Nukina et al. 1991) 유사한 화학적 이동값이 나타났으므로 deoxyfunicone의 값과 일치하여 SF7123-5-1-1가 deoxyfunicone 라는 결론을 얻었다. [참고문헌 30]

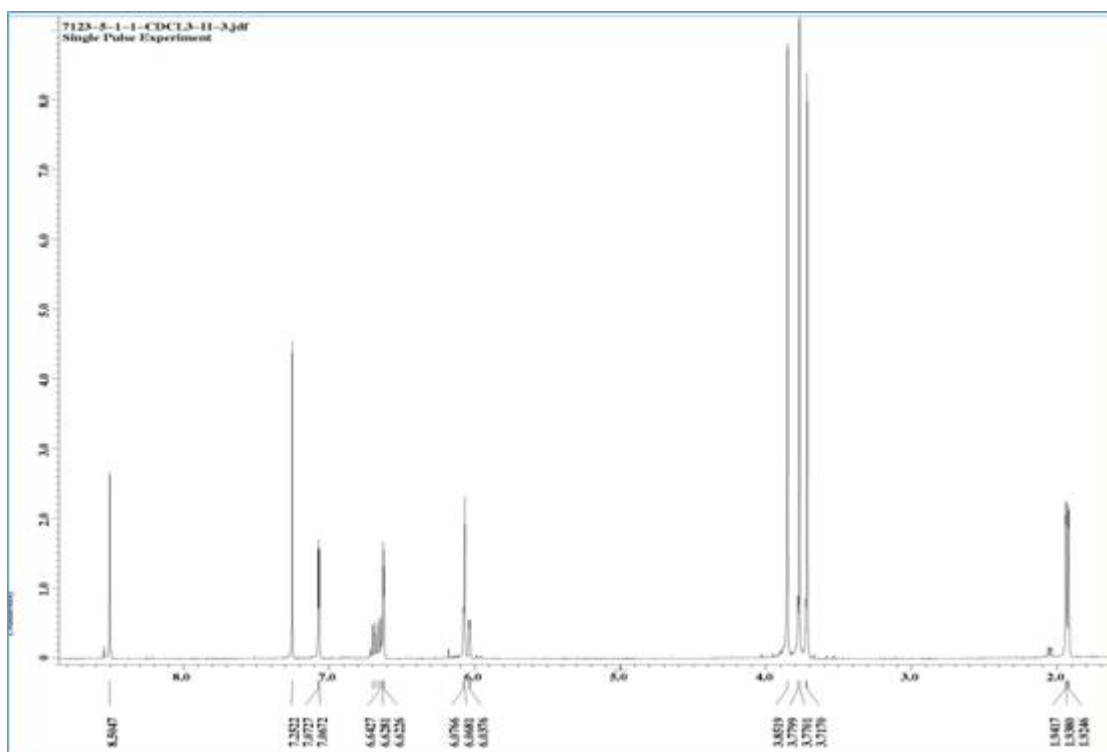


Figure 26. ^1H NMR spectra of SF7123-5-1-1

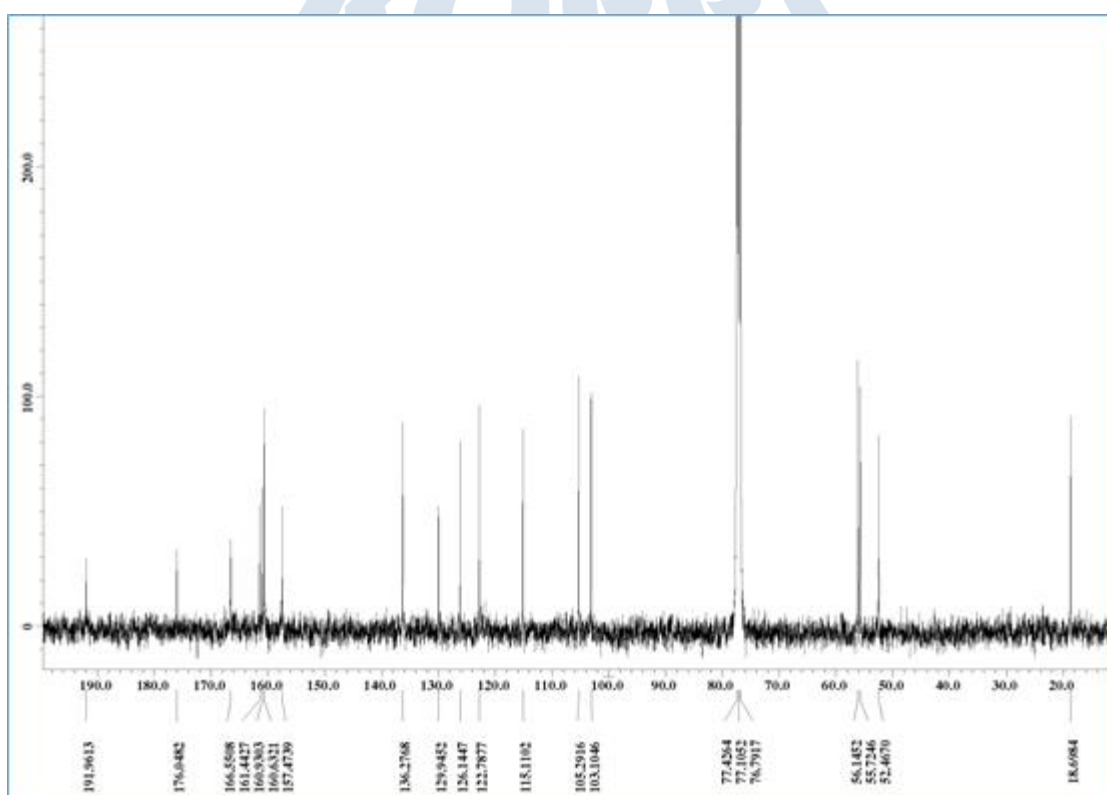


Figure 27. ^{13}C NMR spectra of SF7123-5-1-1 recorded in CDCl_3

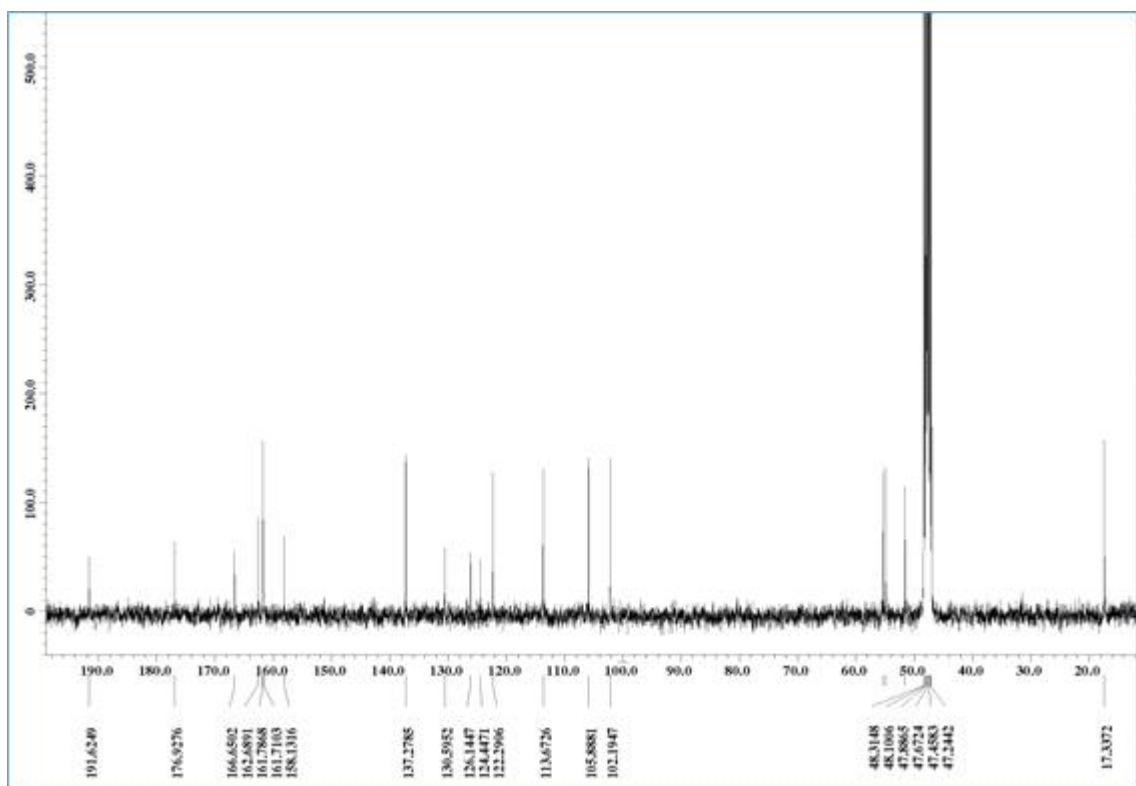


Figure 28. ^{13}C NMR spectra of SF7123-5-1-1 recorded in MEOD- d_4

Table 7. NMR data of SF7123-5-1-1

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ mult (J in Hz)
1	166.55	-
2	129.94	-
3	105.29	7.07 (d, 2.0)
4	160.93	-
5	103.10	6.62 (d, 2.0)
6	157.47	-
7	n.d	-
8	191.99	-
9	160.63	8.50 (s)
10	126.14	-
11	176.00	-
12	115.11	6.06 s
13	161.44	-
14	122.78	6.05 (d, 15.6)
15	136.27	6.67 (dq, 15.6, 6.8)
16	18.69	1.93 (dd, 6.8,1.2)
C1-OCH ₃	52.47	3.77 s
C4-OCH ₃	55.72	3.85 s
C6-OCH ₃	56.14	3.72 s

^arecorded in CDCl₃ ^b100 MHz, ^c400MHz

^drecorded in MEOD- d_4 , nd: not detect.

[별첨 3-3-2-4] SF7123-4-3 (myxotrichin C)

SF7123-4-3 의 분자식 및 분자량은 각각 246 g/mol, C₁₃H₁₀O₅ 으로 확인되었다.

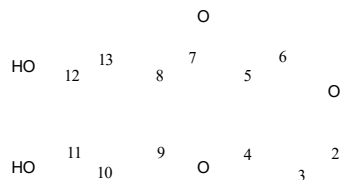


Figure 29. Structure of SF7123-4-3

SF7123-4-3의 ¹³C NMR 스펙트럼은 protonated methylene carbon [δ_C 64.22 (C-6)]과 methyl carbon [δ_C 18.79 (C-1)]를 포함하는 13개의 탄소 신호가 나타났다. 나머지는 3개의 sp² methine carbons [δ_C 94.4 (C-3), 102.55 (C-10), 107.45 (C-13)], 1개의 carbonyl group [δ_C 173.79 (C-1)] 그리고 2개의 다른 sp² quaternary carbons [δ_C 101.24 (C-5), 116.75 (C-8)]와 함께 5개의 protonated quaternary carbons [δ_C 167.85 (C-2), 160.28 (C-4), 152.06 (C-9), 150.9 (C-11), 144.38 (C-12)] 포함하는 11개의 sp² 탄소가 나타났다.

반면에 SF7123-4-3의 ¹H NMR 스펙트럼에서 3개의 sp² methine protons [δ_H 5.56 (H-3), 6.82 (H-10), 7.34 (H-13)], 또한 protonated methylene [δ_H 5.21 (H-6)]과 methyl group [δ_H 2.0 (H-1)]의 존재도 나타났다.

SF7123-4-3의 ¹H 및 ¹³C NMR의 상세한 분석을 통해 myxotrichin C (Yuan, Wang et al. 2013)의 NMR 데이터와 비교하여 유사한 화학적 이동값이 나타났으므로 SF7123-4-3가 myxotrichin C 라는 결론을 얻었다. [참고문헌 31]

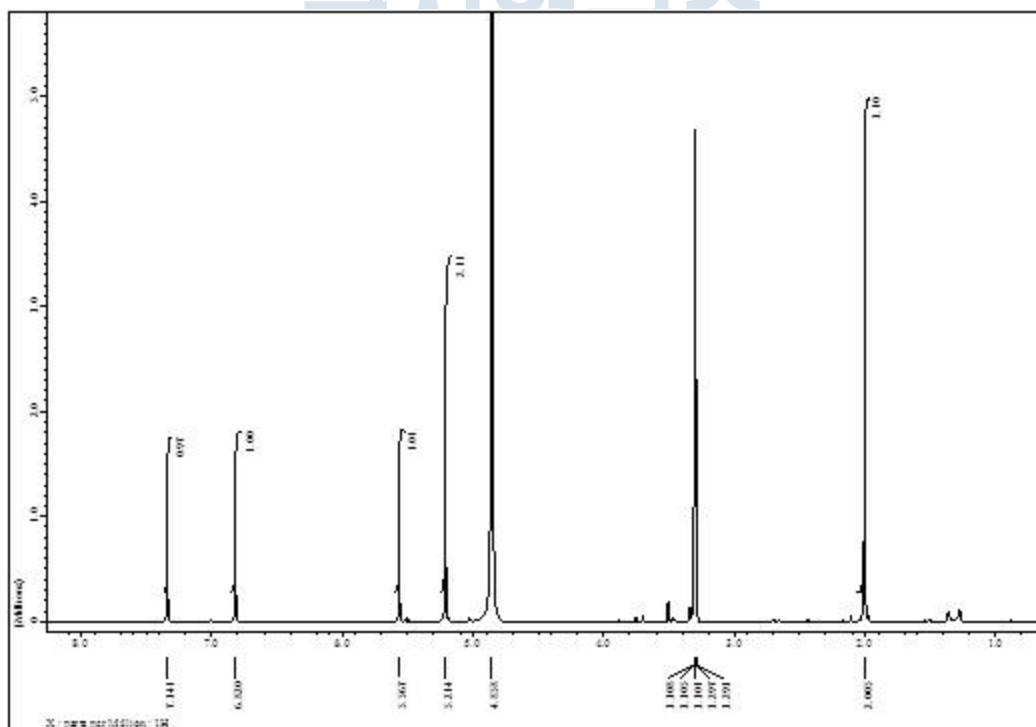


Figure 30. ¹H NMR spectra of SF7123-4-3

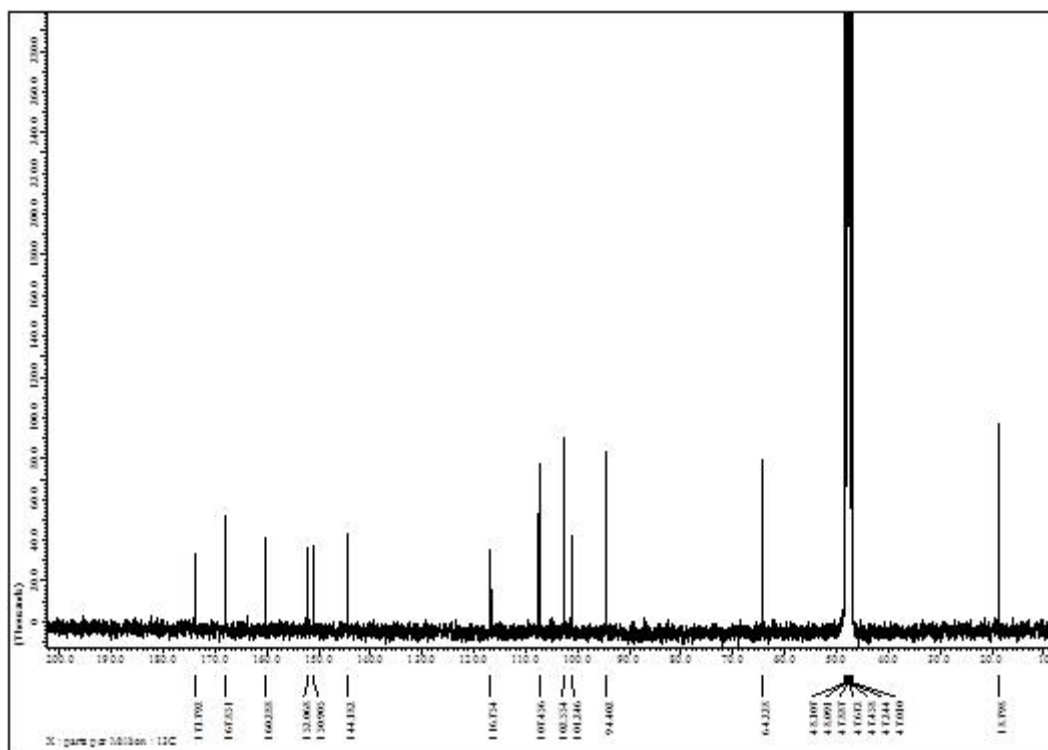


Figure 31. ^{13}C NMR spectra of SF7123-4-3

Table 8. NMR data of SF7123-4-3

Position	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,d}}$ mult (J in Hz)
1	18.79	2.0 (s)
2	167.85	-
3	94.4	5.56 (s)
4	160.28	-
5	101.24	-
6	64.22	5.21 s
7	173.79	-
8	116.75	-
9	152.06	-
10	102.55	6.82 s
11	150.9	-
12	144.38	-
13	107.45	7.34 s

^aRecorded in MeOD-*d*₄, ^b100MHz, ^c400 MHz

[별첨 3-3-2-5] SF7123-5-2-2 (Asterric acid)

SF7123-5-2-2 의 분자식 및 분자량은 각각 348 g/mol, C₁₇H₁₆O₈ 으로 확인되었다.

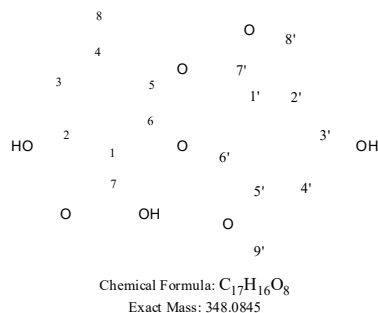


Figure 32. Structure of SF7123-5-2-2

SF7123-5-2-2의 ¹³C NMR 스펙트럼(Table 9, Figure 34) 에서 1개의 methyl carbon [δ_c 20.64 (C-18)], 2개의 methoxyl carbon [δ_c 51.45 (C-8'), 55.42 (C-9')] 그리고 4개의 aromatic methine carbons [δ_c 110.82 (C-3), 104.76 (C-5), 108.02 (C-2'), 104.82 (C-4')] 뿐만 아니라 1개의 carbonyl carbon [δ_c 165.83 (C-7')] 포함하는 8개의 sp² quaternary carbon signals을 나타내었고 5개의 신호는 oxygenated carbons [δ_c 163.01 (C-2), 159.63 (C-6), 134.47 (C-6'), 153.84 (C-5'), 155.80 (C-3')]로 분류되었다.

또한, methyl [δ_H 2.80 (H-11)], methoxyl [δ_H 3.82 (H-10)], 4개의 aromatic methine groups [δ_H 6.43 (H-8), 6.78 (H-5)]의 존재는 ¹H NMR 스펙트럼에서 관측되었다 (Table 9, Figure 33).

게다가, carbonyl carbon (C-7) 과 sp² quaternary carbon (δ_c 102.1 (C-1)]의 신호가 없음에도 불구하고 HMBC의 관측이 H-3, H-5에서 C-1 (Table 9) 까지 mass spectra으로 실제 peak가 나타나기 때문에 SF7123-5-2-2 의 구조는 문헌에서 인용된 asterric acid (Liao, Shen et al. 2012)과 ¹H 및 ¹³C NMR 의 화학적 이동값의 유사성으로 인해 asterric acid로 확인되었다. [참고문헌 32]

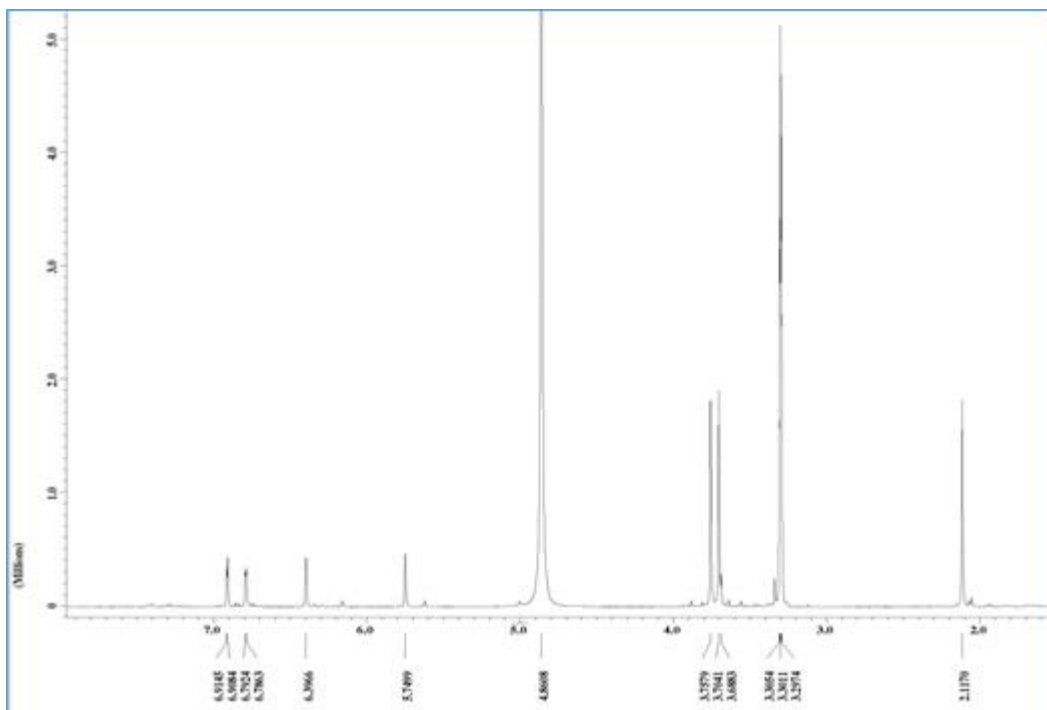


Figure 33. ^1H NMR spectra of SF7123-5-2-2

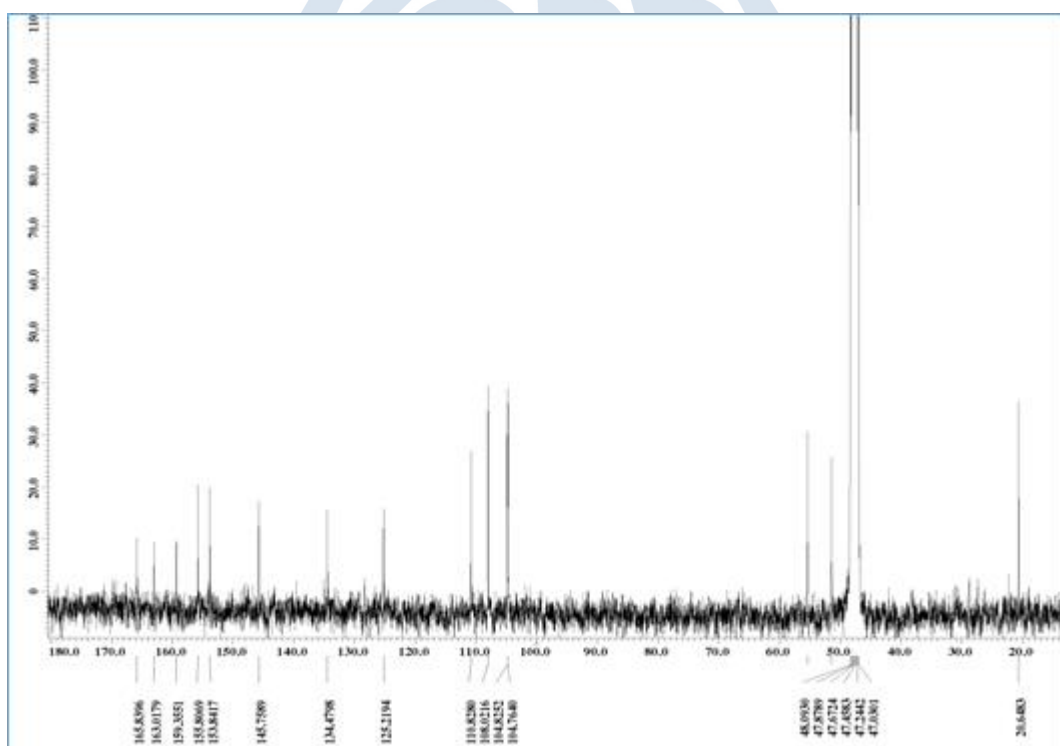


Figure 34. ^{13}C NMR spectra of SF7123-5-2-2

Table 9. NMR data of SF7123-5-2-2

Position	δ^a C	δ^a H	HMBC
1	102.1 ^c	-	
2	163.01	-	
3	110.82	6.39 s	20.64, 104.76, 163.01, 102.1
4	145.75	-	
5	104.76	5.74 s	20.64, 110.82, 159.30, 102.1
6	159.63	-	
7	nd		
8	20.64	2.11 s	104.76, 110.82, 145.75
1'	125.21	-	
2'	108.02	6.90 d 2.4	104.82, 134.47, 155.80, 165.80
3'	155.80	-	
4'	104.82	6.78 d 2.4	108.02, 134.47, 155.80, 153.84
5'	153.84	-	
6'	134.47	-	
7'	165.83	-	
8'	51.45	3.70	165.83
9'	55.42	3.75	153.84

^arecorded in MEOD, ^cnot detected (nd), observed from HMBC cross peaks



- 3차년도 세부목표 3-4: 활성 대사체의 활성 기작 검토

연구 내용	연구 결과
분리한 활성 대사체의 활성 기작 검토	- 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 항염증 활성 확인 (별첨 1-4-1) - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 PTP1B 효소 억제 활성 확인 (별첨 1-4-2)

[별첨3-4-1] 극지생물 유래 진균 SF7123로부터 분리한 대사체의 항염증 활성 검토

- 극지생물 유래 미생물 **SF7123** 으로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 **SF7123-4212, SF7123-511, SF7123-4221, SF7123-522, SF7123-43** 의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과에서 마우스 대식세포 유래 RAW264.7 세포와 마우스 microglial 유래의 BV2 세포에서 항염증효과가 우수하게 나타났음.
- SF7123-4212, SF7123-522, SF7123-43은 RAW264.7, BV2 세포에서 LPS로 유발한 nitrite, PGE₂ 생성을 감소시키는 효과가 나타남 (Table 10).

Table 10. The effects of SF7123 on nitrite and PGE₂ in RAW264.7 and BV2 cells stimulated with LPS.

Compounds	NO Inhibitory Effects		PGE ₂ Inhibitory Effects	
	(IC ₅₀ Values = μ M)		(IC ₅₀ Values = μ M)	
	BV2 cells	RAW264.7 cells	BV2 cells	RAW264.7 cells
SF7123-511	n.d.	n.d.	n.d.	50.2 \pm 2.5
SF7123-4212	2.7 \pm 0.1	4.7 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2	4.1 \pm 0.0
SF7123-4221	n.d.	n.d.	n.d.	53.4 \pm 2.7
SF7123-522	28.0 \pm 1.4	41.5 \pm 2.0	25.2 \pm 1.3	30.0 \pm 1.5
SF7123-43	10.6 \pm 0.5	40.0 \pm 2.0	32.3 \pm 1.6	n.d.

- SF7123-4212의 항염증 관련 활성 검토를 위해 RAW264.7, BV2 세포에 1.0, 2.0, 4.0 μ M을 처리한 후 3시간 배양하고 LPS 1 μ g/ml을 처리하여 유발한 염증 반응에 의해 생성되는 IL-1 β , TNF- α , IL-6 및 IL-12의 억제 효과를 살펴 봄. 그 결과 IL-1 β , TNF- α , IL-6 및 IL-12의 억제 효과가 우수하게 나타났음 (Figure 35).

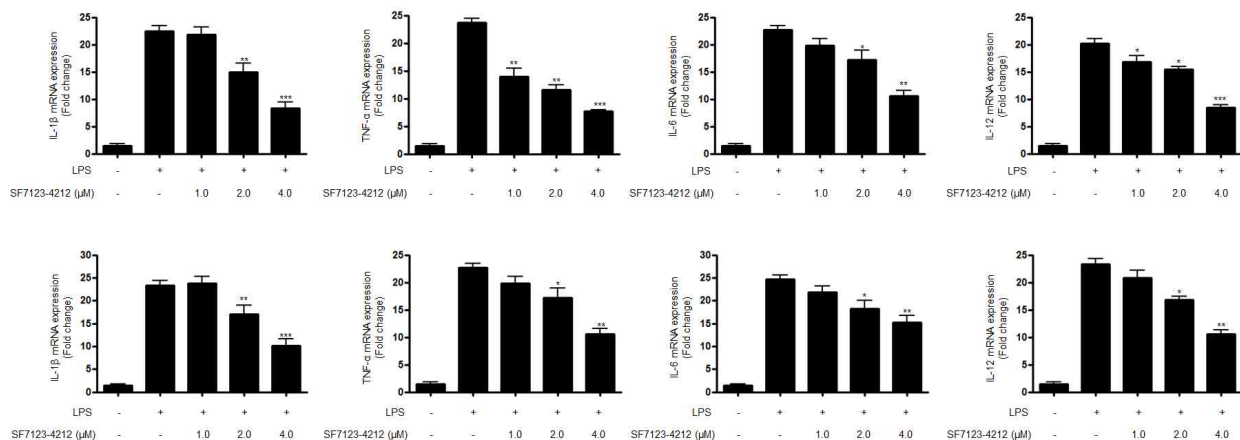


Figure 35. The effects of SF7123-4212 on IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C), and IL-12 (D) mRNA expression stimulated with LPS. Cells were pre-treated for 3 h with the indicated concentrations of SF7123-4212 and then stimulated for 6 h with LPS (1 μ g/mL). The data represent the mean values of three experiments \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with the group treated with LPS.

○ BV2, RAW264.7 세포에 SF7123-4212를 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μ M을 처리한 후 3시간 배양하고 LPS 1 μ g/ml을 처리하였음. LPS 처리 후 24시간 후에 전염증 mediator에 영향을 주는지 확인하기 위해 iNOS와 COX-2 발현을 western blot으로 관찰하였음. LPS에 의해 증가하던 iNOS, COX-2 단백질의 발현은 SF7123-4212에 의해 농도 의존적으로 억제되었음 (Figure 36).

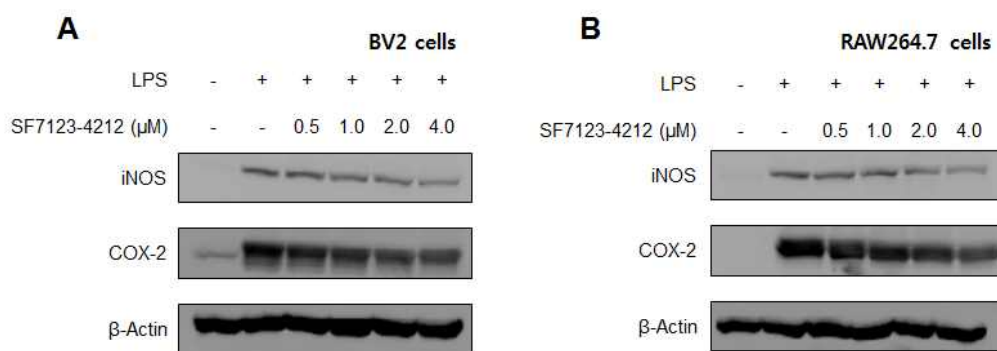


Figure 36. The effects of SF7123-4212 on the protein expression of iNOS and COX-2 in BV2 and RAW264.7 cells stimulated with LPS. Cells were pretreated for 3 h with the indicated concentrations of SF7123-4212 and then stimulated for 24 h with LPS (1 μ g/mL).

○ SF7123-4212의 항염증 관련 활성화기전 검토를 위해 LPS로 유발한 염증 반응에 의해 나타나는 NF- κ B 경로의 세포 핵 내로의 이동 여부를 알아보았음. LPS에 의해 핵 안으로 이동하던 NF- κ B p65

과 p50이 SF7123-4212 에 의해 억제되었음. 또한, 농도 의존적으로 SF7123-4212를 처리하였을 때, LPS에 의해 증가하였던 IκB-α의 degradation이 억제되었으며, p-IκB-α의 인산화가 억제되는 경향을 확인하였음 (Figure 37).

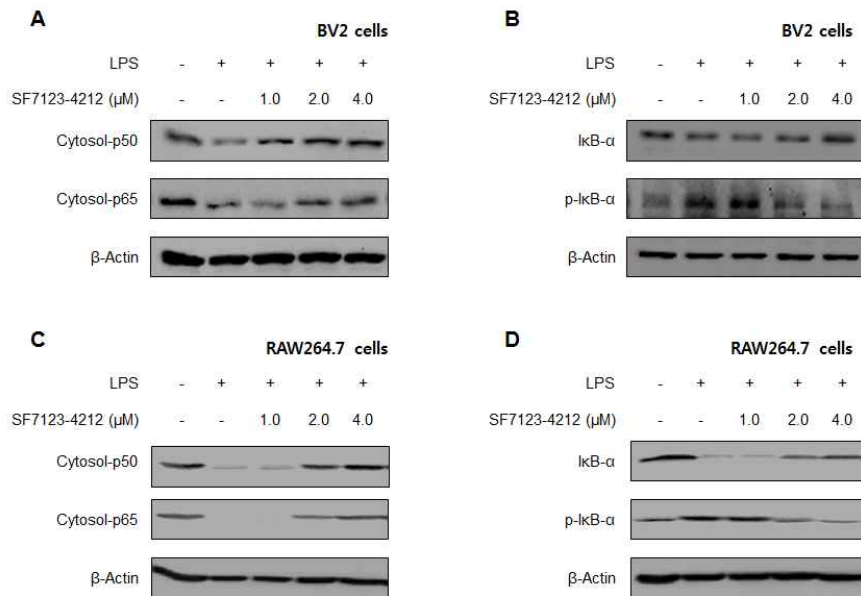


Figure 37. The effects of SF7123-4212 on NF-κB activation (A, C) and IκB-α phosphorylation and degradation (B, D), in BV2 and RAW264.7 cells. Cells were pre-treated for 3 h with the indicated concentrations of SF7123-4212 and stimulated for 1 h with LPS (1 μg/mL).

[별첨3-4-2] 극지생물 유래 진균 SF7123로부터 분리한 대사체의 PTP1B 효소 억제 활성 검토

- 극지생물 유래 미생물 SF7123 으로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 SF7123-4212, SF7123-511, SF7123-4221, SF7123-522, SF7123-43의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과 SF7123-511, SF7123-43 에서 PTP1B 효소 억제 활성 효과가 우수하게 나타났음 (Table 11).

Table 11. PTP1B inhibitory activity with IC₅₀ values of SF7123 series

Compounds	PTP1B Inhibitory Effects ^a (IC ₅₀ Values=μM)
SF7123-511	44.9 ± 2.2
SF7123-4212	n.d.
SF7123-4221	n.d.
SF7123-522	n.d.
SF7123-43	18.5 ± 0.9
Ursolic acid ^b	3.1 ± 0.2

^aValues present mean ± SD of triplicate experiments; ^bPositive control

○ SF7123-511, SF7123-43 의 PTP1B 효소 억제 활성에 대한 특성을 확인하기 위해 kinetic assay를 진행한 결과 SF7123-511은 경쟁적으로 SF7123-43은 비경쟁적으로 PTP1B 효소 활성 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였음 (Figure 38).

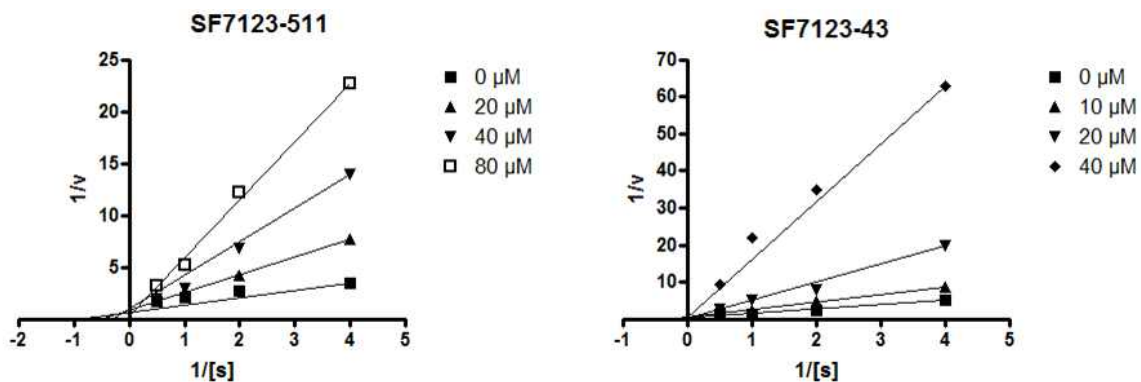


Figure 38. A Lineweaver-Burk plot for SF7123-511 and SF71234-43 in the inhibition of PTP1B. The data represent the mean values \pm SD of three experiments. The concentrations (μM) of SF7123-511 and SF71234-43 are indicated.



제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발 목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도 (%)
(1차년도) 극지고유생물자원으로부터 항염생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴	1-1	○극지생물 유래 추출물의 제조 - 극지생물 유래 진균 SF6291 균주의 배양 추출물 682 mg 외 14종의 균주배양 추출물 확보	100
	1-2	○생리활성 대사체의 분리 - 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 10종의 대사체 분리	100
	1-3	○활성 대사체의 구조 분석 - 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 Curvularin 외 8종의 대사체 구조분석 완료	100
	1-4	○활성 대사체의 활성 기작 검토 - 극지생물 유래 진균 SF5859 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 항염증 활성 확인	100
(2차년도) 극지고유생물자원으로부터 항염생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴	2-1	○극지생물 유래 추출물의 제조 - 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물 175 mg 외 14종의 균주배양 추출물 확보	100
	2-2	○생리활성 대사체의 분리 - 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 8종의 대사체 분리	100
	2-3	○활성 대사체의 구조 분석 - 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 Pyranonigirin A 외 7종의 대사체 구조분석 완료	100
	2-4	○활성 대사체의 활성 기작 검토 - 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 항염증 활성 확인 - 극지생물 유래 진균 SF5929 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 PTP1B 효소 억제 활성 확인	100
(3차년도) 극지고유생물자원으로부터 항염생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴	3-1	○극지생물 유래 추출물의 제조 - 극지생물 유래 진균 SF7160 균주의 배양 추출물 100.7 mg 외 9종의 균주배양 추출물 확보	100
	3-2	○생리활성 대사체의 분리 - 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물로부터 4종의 대사체 분리 - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 5종의 대사체 분리	100
	3-3	○활성 대사체의 구조 분석 - 극지생물 유래 진균 SF7078 균주의 배양 추출물로부터 [(3S, 8R)-8-Hydroxyhexylitaconic acid] 외 3종의 대사체 구조분석 완료 - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 neuchromenin 외 4종의 대사체 구조분석 완료	100
	3-4	○활성 대사체의 활성 기작 검토 - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 항염증 활성 확인 - 극지생물 유래 진균 SF7123 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체에 대한 PTP1B 효소 억제 활성 확인	100

제 2 절 대외 기여도

1. 기술적 측면

- 세계적으로 생명자원 확보경쟁이 치열해지는 상황에서 “양극해양자원의 확보 및 보존 ⇨ 가치 발굴 및 정보화 ⇨ 활용 및 산업화의 운영체계 구축”이라는 양극유래 해양생명자원의 선순환 구조를 위한 거시적 구도 하에서 양극해 유래 해양미생물자원의 이차대사물질 탐색 연구는 양극해양 생명자원의 가치 발굴 및 정보화 단계를 촉진시키는 촉매의 역할을 할 것으로 기대된다.
- 발굴되는 생리활성 물질은 직접 의약품 또는 기능성 소재로의 개발을 위한 후속 연구개발에 활용되거나 의약품의 합성 연구 등에 선도물질이나 모델화합물로의 역할을 할 것으로 기대된다.

2. 경제·산업적 측면

- 신규 소재로서 물질특허를 획득하여 독점적 활용 권에 의한 물질특허 사용료나 양도료로서 막대한 수입을 기대할 수 있다.
- 새로운 물질의 제조나 생산에 대한 관련 특허의 확보가 가능하여 물질특허 외에도 이의 활용에 의한 수입도 가능하다.
- 국내에서 최종 상품화에 성공하면 관련 식품의약산업이나 제약산업의 성장과 활성화에 획기적인 전기를 마련할 수 있다.
- 최종 상업화에 성공하는 경우는 앞서 기술한 연구의 필요성 중 경제 산업적 측면에서 밝힌 구체적인 시장성을 감안하여 국내시장 및 수출에 의한 상당한 경제적 가치를 창출할 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 생리활성물질탐색의 미개척분야인 양극해 서식 해양생물자원 활용을 위한 화학성분 및 생리활성 DB 구축의 기초자료로 활용이 가능할 것이다.
- 구축되는 대사체 분획물 라이브러리는 향후 관련 연구자와의 공동연구의 연구소재로 추가 활용이 가능할 것이다.
- 발굴된 대사체의 생리활성을 기초로 하여 미지의 생명현상 규명 또는 질병현상 규명과 관련된 연구 분야에 chemical probe 으로서도 활용이 가능하다.
- 발굴되는 생리활성 물질은 의약품의 합성연구 등에 선도물질이나 모델화합물로서의 역할이 가능하다.
- 신규 소재로서 물질특허를 획득하여 독점적 활용 권에 의한 물질특허 사용료나 양도료로서 막대한 수입을 기대할 수 있다.
- 새로운 물질의 제조나 생산에 대한 관련 특허의 확보가 가능하여 물질특허 외에도 이의 활용에 의한 수입도 가능하다.
- 국내에서 최종 상품화에 성공하면 관련 식품의약산업이나 제약 산업의 성장과 활성화에 획기적인 전기를 마련 할 수 있다.
- 최종 상업화에 성공하는 경우는 앞서 기술한 연구의 필요성 중 경제 산업적 측면에서 밝힌 구체적인 시장성을 감안하여 국내시장 및 수출에 의한 상당한 경제적 가치를 창출 할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 없음



제 7 장 참고문헌

1. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830(6); 3670-3695, 2013.
2. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 31(2); 160-258, 2014.
3. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 32(2); 116-211, 2015.
4. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 33(3); 382-431, 2016.
5. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem Biol*. 19(1); 85-98, 2012.
6. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat Prod Rep*. 28(2); 290-344, 2011.
7. Drug discovery from marine microbes. *Microb Ecol* 65(4); 800-806, 2013.
8. Marine natural products with anti-inflammatory activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(4); 1645-1666, 2016.
9. 3-Nitroasteric Acid Derivatives from an Antarctic Sponge-Derived *Pseudogymnoascus* sp. *Fungus*. *J Nat Prod*. 78(4); 919-923, 2015.
10. Darwinolide, a New Diterpene Scaffold That Inhibits Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm from the Antarctic Sponge *Dendrilla membranosa*. *Org Lett*. 18(11); 2596-2599, 2016.
11. Granuloside, A Unique Linear Homosesterterpene from the Antarctic Nudibranch *Charcotia granulosa*. *J Nat Prod*. 78(7); 1761-1764, 2015.
12. Chrodripanins I and J from the Antarctic Moss-Derived Fungus *Penicillium funiculosum* GWT2-24. *J Nat Prod*. 78(6); 1442-1445, 2015.
13. Antiviral Merosesquiterpenoids Produced by the Antarctic Fungus *Aspergillus*

ochraceopetaliformis SCSIO 05702. J Nat Prod. 79(1); 59–65, 2016.

14. Antifouling Compounds from the Sub-Arctic Ascidian *Synoicum pulmonaria*: Synoxazolidinones A and C, Pulmonarins A and B, and Synthetic Analogues. J Nat Prod. 77(9); 2105–2113, 2014.
15. Inhibitors of Inducible NO Synthase Expression: Total Synthesis of (S)-Curvularin and Its Ring Homologues..ChemMedChem.3(6); 924–939, 2008.
16. Apralactone A and a New Stereochemical Class of Curvularins from the Marine Fungus *Curvularia* sp.. European Journal of Organic Chemistry. 2008(30); 5085–5092, 2008.
17. Novel curvularin-type metabolites of a hybrid strain ME 0005 derived from *penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. Tetrahedron Letters 30(17); 2241–2244, 1989.
18. First Total Syntheses and Spectral Data Corrections of 11- α -Methoxycurvularin and 11- β -Methoxycurvularin. The Journal of Organic Chemistry 72(25); 9846–9849, 2007.
19. Curvularin-Type Metabolites from the Fungus *Curvularia* sp. Isolated from a Marine Alga. European Journal of Organic Chemistry 2010(36); 6928–6937, 2010.
20. (\pm)-Tylopilusins, Diphenolic Metabolites from the Fruiting Bodies of *Tylopilus eximius*. Journal of Natural Products 75(12); 2228–2231, 2012.
21. Reassessing the Structure of Pyranonigrin. Journal of Natural Products 70(7); 1180–1187, 2007.
22. Structures and absolute configuration of three α -pyrones from an endophytic fungus *Aspergillus niger*. Tetrahedron 69(34); 7147–7151, 2013.
23. Funalenone, a novel collagenase inhibitor produced by *Aspergillus niger*. J Antibiot (Tokyo). 52(12); 1095–1100, 1999.
24. TMC-256A1 and C1, new inhibitors of IL-4 signal transduction produced by *Aspergillus niger* var *niger* TC 1629. J Antibiot (Tokyo). 55(8): 685–692, 2002.

25. Re-identification of *Aspergillus nidulans* wA gene to code for a polyketide synthase of naphthopyrone. *Tetrahedron Letters*. 40(1); 91-94, 1999.
26. Carbonarones A and B, new bioactive gamma-Pyrone and alpha-Pyridone derivatives from the marine-derived fungus *Aspergillus carbonarius*. *J Antibiot (Tokyo)* 60(2): 153-157.
27. Oxygenated hexylitaconates from a marine sponge-derived fungus *Penicillium* sp. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 59(1); 120-123, 2011.
28. Tensyucic Acids, New Antibiotics produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. *Chem. Pharm. Bull.* 55(9); 1338-1341, 2007.
29. Synthesis and absolute configuration of (2)-neuchromenin, a neurotrophic metabolite of *Eupenicillium javanicum* var. meloforme, and its enantiomer. *European Journal of Organic Chemistry*. 196321966, 2001.
30. Deoxyfunicone, a new γ -pyrone metabolite from a resorcylicide-producing fungus (*Penicillium* sp.) *Agricultural and Biological Chemistry*. 55(9); 2415-2416, 1991.
31. Austdiol, fulvic acid and citromycetin derivatives from an endolichenic fungus, *Myxotrichum* sp. *Phytochemistry Letters*. 6(4); 662 - 666, 2013.
32. Asperjinone, a nor-neolignan, and terrein, a suppressor of ABCG2-expressing breast cancer cells, from thermophilic *Aspergillus terreus*. *Journal of Natural Products*. 75; 630-635, 2012.

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁연구기관에서 수행한 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 수행한 위탁연구의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

