BSPE 00452-739-4

해산 갯지렁이의 천연물에 대한 탐색연구

An Exploratory Study on the Natural Products of Marine Polychaete Worms

1995. 2.

한 국 해 양 연 구 소

제 출 문

한국해양연구소장 귀하

본 보고서를 "해산 갯지렁이의 천연물에 대한 탐색연구"사업의 최종보고서로 제출합니다.

1995년 2월

공동연구책임자: 서 영 완
신 종 헌
정 지 형
연 구 원: 최 진 우
노 정 래
백 은 주
윤 종 배

요 약 문

I. 제 목

해산 갯지렁이의 천연물에 대한 탐색 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양생물에 대한 집중적인 연구는 1960년대 말에 본격적으로 시작되었다. 이미 발표된 천연물의 수도 5500을 상회하며 그 중 상당수가 강력한 생리활성도를 가진 것으로 판명되어 이미 50 여 물질이 특허를 획득한 후 의약품으로 개발단계에 와 있다.

하지만 이 분야의 놀라운 발전에도 불구하고 해양 천연물의 상업화란 측면에서 문제가 전혀 없는 것은 아니다. 먼저 신규 생리활성물질의 대량생산에 대한 어려움이다. 현재까지 대량생산이 성공한 예는 보고되지 않았으며 앞으로도 신물질의 산업적인 응용을 방해하는 가장 큰 요인으로 등장할 것으로 예상된다. 또 다른 문제는 시료채집의 어려움이다. 이전에는 조간대나 30 m 이내의 천해에 서식하는 생물만 채집해도 손쉽게 새로운 대사물질을 추출할 수 있었지만 지금은 채집이 용이한 생물에 대해서는 대부분 집중적인 연구가 이루어져 신규 생리활성물질을 추출할 가능성은 매우 희박하다.

이러한 문제점들을 해결하기 위한 한 방편으로 대량양식이 가능한 생물이면서 지금까지 연구가 집중되지 않은 해양생물을 선정하는 것이다. 이러한 여건을 고려해 볼 때 연구대상생물

로 해산 갯지렁이를 선정하는 것이 바람직한 것으로 생각된다. 이것은 해산 갯지렁이가 지금까지 연구도 별로 시도되지 않았을 뿐만 아니라 갯펄에서 쉽게 대량으로 채집할 수 있고 또 양식도 가능하기 때문이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 해산 갯지렁이를 포함해서 연구가 집중되지 않은 거의 모든 동물에 대해 1994년 이전에 천연물 화학적인 연구결과의 대부분을 수집하여 체계적으로 분석하였다.

2. 기초 생리활성도 측정, TLC 분석 그리고 수소 핵자기 공명분석에 의하여 흥미 있는 신규 생리활성 천연물의 존재 가능성을 확인하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 의충동물(Euchiura), 절지동물(Arthropoda), 반색동물(Hemichordata) 및 환형동물(Annelida, polychaetes)에 대해서 이루어진 거의 모든 연구결과가 생물학적 기원, 물질구조 형태, 생리활성도에 따라 체계적으로 분석되었으며 이 자료는 이런 동물들에 대한 본격적인 연구가 시도될 때 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

2. 해산 갯지렁이의 유기추출물에 대해서 TLC, flash vacuum silica chromatography 및 핵자기 공명 측정과 같은 화학적 방법에 의하여 분석되었으며 흥미 있는 2차 대사물질의 존재가 확인되었다.

3. 해산 갯지렁이의 조추출물에 대해 brine shrimp lethality, DNA cleavage, antimicrobial activity 그리고 cytotoxicity와 같은 생리활성도 측정이 이루어 졌다. 대부분의 생리활성도에 대해 활성을 거의 나타내지 않았으며 약간의 세포독성만이 확인이 되었다. 이 결과는 항암이나 항종양 효과가 존재하지 않을 가능성 보다는 오히려 선택성과 특이성이 크면서 생체내에 독성이 적은 새로운 생리활성물질의 존재 가능성을 제시해 주고 있다.

이 결과들을 근거로 해산 갯지렁이로부터 특이한 천연물을 분리할 가능성에 대해서 논의 되었으며 앞으로 좀 더 구체적이고도 체계적인 연구가 필요할 것이다.

Summary

I. Tltle

An Exploratory Study on the Natural Products of Marine Polychaete Worms

II. Objectives and Significance

Intensive studies on the marine organisms were started in the late 1960s. More than 5500 marine natural products have been isolated, and many of these compounds are found to be biologically active. Until recently, about 50 secondary metabolites from marine organisms have been awarded by patents and have been in the process of being developed as drugs and other industrially useful agents.

Despite tremendous progress in this field, however, severe problems in view of developing a commercial drug from the sea have been discovered. One of the most difficult problems is that sufficient amounts of metabolites are very difficult to obtain due to a difficulty of collecting samples in large quantities. Another one is that it is becoming increasingly difficult to find new compounds from marine algae and benthic colonial animals which are easily collected by using SCUBA. In order to solve these problems, cultivation of marine organisms or selection of target organisms which have been scarcely investigated can be suggested. Polychaete

worms are widely distributed in the Korean Waters and are among the most abundant benthic organisms of intertidal soft-bottom. Therefore, an exploratory study on the natural products of marine polychaete worms was tried on the basis of these possibilities.

III. Contents and Scope

1. Most of the research papers on the natural products from marine polychaete worms prior to 1994 were collected, organised, and annalyzed according to structure types of metabolites.

2. On the basis of the results of primary bioactivity tests, thin layer chromatography, flash vacuum silica chromatography, and proton NMR anaylses, possibility of isolating both biologically-active and structurally-unique natural products from the marine polychaete worms has been investigated.

IV. Results and Suggestions

1. Most of papers on marine natural products of non-colonial invertebrates including Annelida(polychaetes), Arthropoda, Echiura, and Hemichordata were collected and analyzed according to biological origin, structure type, and bioactivity. This would be useful in overviewing trends and recent development on the research

of marine animals.

2. Organic crude extracts from marine polychaetes were analyzed by chemical methods including TLC, flash vacuum silica chromatography, and proton nuclear magnetic resonance measurement. As a result, the existence of novel secondary metabolites except commonly distributed steroids and fatty acids was confirmed.

3. The crude extracts were also tested for biological activities such as brine shrimp lethality, DNA cleavage, antimicrobial activity, and cytotoxicity. The extracts have not exhibited significant activity on most assays except modest cytotoxiciy. These results might suggest the possibility on the presence of some other specific bioactivities minimizing side effect in *in vivo* system.

Based upon these results, possibility of isolating novel natural products from the polychaete worms has been discussed.

Contents

Summary 7

List of Figures 11

List of Tables 15

Chapter 1. Introduction 21

Chapter 2. Secondary metabolites isolated from marine polychaetes 24

2.1. Background 24

2.2. Sorting of polychaetes 26

2.2.1. *Perinereis aibuhitensis* 26

2.2.2. *Marphysa sanguinea* 32

2.3. Secondary metabolites isolated from marine polychaetes 34

Chapter 3. Bioactivity assays 48

3.1. Brine shrimp assay 48

3.2. DNA cleavage assay 50

3.3. Antimicrobial activity assay 50

3.4. Cytotoxicity 52

3.5. Cytotoxicity on lymphocyte 56

Chapter 4. Experimental 57

4.1. Instruments and reagents 57

4.2. Collections and extractions 58

4.3. Bioactivity assays..... 60

Chapter 5. Conclusion..... 66

5.1. Results and discussion..... 66

5.1.1. TLC analysis..... 66

5.1.2. Proton NMR spectral analysis..... 69

5.1.3. Bioactivity test..... 106

5.2. Discussion..... 112

References..... 113

목 차

요 약 문 3

그림목차 11

표목차 15

제 1 장. 서론 21

제 2 장. 해산 갯지렁이에서 추출된 천연물 24

2.1. 연구의 배경 24

2.2. 해산 갯지렁이의 동정 26

2.2.1. 청충(두토막눈썹 참갯지렁이) 26

2.2.2. 본충(바위털 갯지렁이) 32

2.3. 해산 갯지렁이에서 추출된 천연물 34

제 3 장. 생리활성도 측정 48

3.1. 바다새우 치사율 검사 48

3.2. DNA 절단 검사 50

3.3. 항미생물 검사 50

3.4. 세포독성능 검사 52

3.5. 림프구에 대한 독성 검사 56

제 4 장. 실험방법 57

4.1. 기기 및 시약 57

4.2. 해산 갯지렁이의 채집 및 유기물질의 추출 58

4.3. 생리활성도 측정 60

제 5 장. 결론 66

5.1. 결과 및 토의 66

5.1.1. TLC 분석 66

5.1.2. 수소 핵자기 공명 스펙트럼 분석 69

5.1.3. 생리활성도 측정 106

5.2. 토의 112

참고문헌 113

List of Figures

Fig. 2-1. Taxonomical characteristics of *Pirinereis aibuhitensis* 28

Fig. 2-2. Heteronereid of *Pirinereis aibuhitensis* 31

Fig. 2-3 Taxonomical characteristics of *Marphysa sanguinea* 33

Fig. 5-1. Results of silica thin layer chromatographic analysis of the organic extracts from the polychaetes 67

Fig. 5-2. Results of silica thin layer chromatographic analysis of the frations separated by flash vacuum silica chromatography 68

Fig. 5-3. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-1 70

Fig. 5-4. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-2 71

Fig. 5-5. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-3 72

Fig. 5-6. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-4 73

Fig. 5-7. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-5 74

Fig. 5-8. Proton NMR spectrum of the residue obtained from aqueous layer of sample P94-1 75

Fig. 5-9. Proton NMR spectrum of the residue obtained from acqueous layer of sample P94-2 76
Fig. 5-10. Proton NMR spectrum of the residue obtained from aqueous layer of sample P94-3 77
Fig. 5-11. Proton NMR spectrum of the residue obtained from aqueous layer of sample P94-4 78
Fig. 5-12. Proton NMR spectrum of the residue obtained from aqueous layer of sample P94-5 79
Fig. 5-13. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #1 of n-BuOH layer residue of sample P94-1 80
Fig. 5-14. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #2 of n-BuOH layer residue of sample P94-1 81
Fig. 5-15. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #3 of n-BuOH layer residue of sample P94-1 82
Fig. 5-16. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #4 of n-BuOH layer residue of sample P94-1 83
Fig. 5-17. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #5 of n-BuOH layer residue of sample P94-1 84
Fig. 5-18. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #6 of n-BuOH layer residue of sample P94-1 85
Fig. 5-19. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #7

of n-BuOH layer residue of sample P94-1 86
Fig. 5-20. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #8
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 87
Fig. 5-21. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #9
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 88
Fig. 5-22. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #10
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 89
Fig. 5-23. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #11
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 90
Fig. 5-24. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #12
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 91
Fig. 5-25. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #13
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 92
Fig. 5-26. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #14
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 93
Fig. 5-27. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #15
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 94
Fig. 5-28. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #16
of n-BuOH layer residue of sample P94-1 95
Fig. 5-29. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #1
of aqueous layer residue of sample P94-1 96

Fig. 5-30. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #2
of aqueous layer residue of sample P94-1 97
Fig. 5-31. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #3
of aqueous layer residue of sample P94-1 98
Fig. 5-32. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #4
of aqueous layer residue of sample P94-1 99
Fig. 5-33. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #5
of aqueous layer residue of sample P94-1 100
Fig. 5-34. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #6
of aqueous layer residue of sample P94-1 101
Fig. 5-35. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #7
of aqueous layer residue of sample P94-1 102
Fig. 5-36. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #8
of aqueous layer residue of sample P94-1 103
Fig. 5-37. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #9
of aqueous layer residue of sample P94-1 104
Fig. 5-38. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #10
of aqueous layer residue of sample P94-1 105
Fig. 5-39. DNA cleavage assay on crude extracts of polychaete worms 107

List of Tables

Table 5-1. Bioassay results on the polychaete samples..... 111

제 1 장 서 론

60년대 말에 본격적으로 시작된 해양 천연물 화학은 급속도로 발전하고 있다. 70년대 중반 이후에는 해양 천연물에 대한 연구논문이 매년 100편 이상 발표되고 있으며 이미 발표된 해양 천연물의 수도 5500을 상회하여 그 중 상당수가 강력한 생리 활성도를 가진 것으로 판명되었다. 이미 50물질이 특허를 획득한 후 일부는 의약품으로 개발 단계에 와 있다.

하지만 해양 천연물의 상업화란 측면에서 문제가 전혀 없는 것은 아니다. 먼저 시료채집의 어려움이다. 수년 전만 해도 조간대나 수심 30 m 이내의 천해에 서식하는 생물만 채집해도 손쉽게 새로운 대사물질을 추출할 수 있었지만 지금은 채집이 용이한 생물에 대해서는 대부분 집중적인 연구가 이루어져 신규 생리활성물질을 추출할 가능성은 매우 희박하다. 따라서 새로운 생리활성물질을 추출할 가능성을 높이기 위해서는 더욱 채집하기 어려운 생물 즉 발견하는 빈도가 낮은 종이나 심해 저서생물로 대상을 확대할 수 밖에 없기 때문에 시료채집의 어려움은 해양 천연물에 대한 연구가 집중될 수록 더욱 심화될 것이 확실하다.

또 다른 문제는 해양생물에서 분리한 신규 생리활성 물질의 대량생산에 대한 어려움이다. 현재까지 해양 천연물의 대량생산이 성공한 예는 아직 보고되지 않았으며 앞으로도 이 대량생산의 어려움은 신물질의 산업적인 응용을 방해하는 가장 큰 요인으로 등장할 것으로 예상된다.

이러한 문제점들을 해결하기 위하여 예상되는 방법으로는 유전공학의 기법을 이용하는 것과 해양생물의 대량양식등인데 먼저 유전공학은 그 적용범위가 무한정이므로 연구가치가 대단히 높으나, 이 방법을 적용하기 위해서는 먼저 대상생물의 genetic mapping을 통하여 목표하는 천연물의 생산을 지시하는 유전자의 부분을 결정해야 하는등 선행되어야 할 연구가 많아 가까운 시일내에는 실현이 어려울 것이

다.

가까운 장래에 가시화 될 가능성이 더욱 큰 천연물의 대량 생산방식은 양식이다. 응용하고자 하는 천연물을 생산하는 해양생물을 대량으로 양식하여 천연물을 추출하는 것은 비용이 비교적 저렴할 뿐만 아니라 단기간에 양식방법의 개발이 가능할 것으로 생각되는 해양생물이 적지 않아 많은 관심을 모으고 있다. 대량양식을 위한 해양 동식물로는 모두가 다 가능성이 있지만 주목할 만한 생물로는 갈조류나 홍조류를 포함한 대형 해조류 및 저서 다모류를 제시할 수 있다.

해조류는 해양 천연물 화학의 초창기 대상생물로서 연구가 가장 많이 집중된 생물로서 양식하기도 다른 생물들에 비해서 비교적 쉬울 것으로 생각된다. 해조류가 비록 연구가 많이 된 생물이기는 하지만, 해양 천연물 화학을 시작한 사람들이 대부분 유기화학자들이었기 때문에 추출한 물질의 특이한 구조골격에 대해서만 관심이 많았으며 생리활성도에서는 거의 관심이 없었다. 이러한 결과로 해조류의 많은 생리활성물질들이 screening도 해보지 못한 채 사장되었다. 따라서 해조류의 대사물질에서 강력한 신규 생리활성물질을 발견할 가능성은 매우 높다고 할 수 있다.

저서 다모류 또한 매우 가능성이 높은 연구대상생물로 선정될 수 있다. 지금까지 천연물 화학적인 연구가 집중된 연구대상생물은 해조류, 해면, 강장, 원색, 극피, 연체동물등이 주류를 이루고 있으며 저서 다모류를 포함해서 이들을 제외한 다른 동물들은 간헐적으로 이루어진 연구결과가 발표되었을 뿐이다. 그러나 半索動物(Hemichordata)에 속하는 Pterobranchia綱의 *Cephalodiscus gilchristi*로부터 강력한 항암효과를 보이는 pyrazine alkaloids인 cephalostatins이 분리되었으며 또 환형동물(Annelida)에 속하는 Polychaeta綱의 *Thelepus setosus*로부터 유명한 육상천연물 griseofulvin과 구조와 생리활성도가 유사한 강력한 항진균 물질인 thelepin이 분리되었다. 이러한 결과는 지금까지 연구가 집중되지 않은 다른 생물에서도 강력한 생리활성물질이 분리될 가능성을 제시해 주고 있다.

앞에서 언급한 모든 여건들을 고려해 볼 때 우선적으로 환형동물문에 속하는 Polychaeta綱 즉 해산 갯지렁이를 연구대상생물로 선정하는 것이 바람직한 것으로 사료된다. 그 이유로는 이 동물의 종류가 10000 여종 정도로 연구대상이 매우 다양할 뿐만 아니라 해양 생태계에서 유기물질을 분해시키기 때문에 생체내에 흥미 있는 대사물질이 존재할 가능성이 매우 크다. 더우기 이들에 대한 천연물 화학적인 연구가 거의 이루어 지지 않아 지금까지 겨우 수 편의 논문만 발표되었으므로 새로운 생리활성물질이 추출될 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

이 뿐만 아니라 polychaete worms는 우리나라의 바닷가의 갯펄에서 쉽게 대량으로 채집할 수 있고 양식도 시도된 적이 있어 해양생물로부터 신물질 개발에 있어서 최대의 장애요소인 생리활성물질의 대량생산의 어려움도 쉽게 해결 될 수 있을 것으로 여겨지기 때문이다.

제 2 장 해산 갯지렁이(polychaetes)에서 추출된 천연물

2. 1. 연구의 배경

해조류, 해면, 강장, 원색, 극피, 연체동물등을 제외한 기타의 해양 척추 및 무척추 동물에서 분리된 천연물의 수는 지극히 소수에 불과하다. 따라서 본 연구에서는 저서군체 동물을 제외한 해양동물을 새로운 연구대상생물이라는 측면에서 해산 갯지렁이와 같이 다루었으며 여기에서는 이 해양생물들의 분류학적인 위치와 지금까지 발표된 천연물의 구조상의 특징을 간단히 다루었다. 천연물 화학적인 연구결과가 보고된 동물은 의충동물, 절지동물, 반색동물 및 환형동물등이다.

의충동물문(蟻蟲動物門, Echiura)은 아주 작은 동물군으로 모두 바다에 살고 해저의 모래진흙속에 U자 모양의 구멍을 파고 살며 다소 이동한다. 세계적으로 70종 정도 밝혀져 있으며 우리 나라에서는 삼면연안에 4종이 밝혀져 있다.

절지동물문(節肢動物門, Arthropoda)은 동물계 종들의 3/4 이상을 차지하는 큰 군으로 거미, 곤충, 지네, 게, 새우 등을 포함하며 현재까지 90만 종이 알려져 있다. 천연물 화학적으로는 Chelicerata(鋏角亞門)에 속하는 Arachnida(蛛形綱)의 Araneae(蜘蛛目)과 그리고 같은 아문에 속하는 Crustacea(甲殼綱)의 Euphausiacea (난바다곤쟁이目)의 몇 종에 대한 연구가 이루어 졌다.

반색동물문(半索動物門, Hemichordata)은 모두 바다의 얕고 깊은 곳에서 살고, 모래진흙속에 사는 것, 이동성의 것, 다른 동물에 부착하여 사는 것이 있으며 또 부유성의 것도 보고되어 있다. 지금까지 세계적으로 100종 정도가 밝혀져 있다. 이 동물군은 Pterobranchia(익새강)와 Enteropneusta(장새강)로 나뉜다.

환형동물문(環形動物門, Annelida)은 Polychaeta(多毛綱), Myzostomida(吸口蟲綱), Oligochaeta(貧毛綱), Hirudinea(蛭綱)으로 나뉘며 우리 나라에서는 Polychaeta에 131종, Oligochaeta에 57종, Hirudinea에 2종으로 모두 190종이 밝혀져 있다.

Polychaeta강은 환형동물중 가장 기본적인 강이다. 전구엽에는 촉수, 부감촉수(palpus), 감촉수와 안점이 있다. 촉수는 종류에 따라 일부 퇴화하거나 변형되어 있다. 동부의 체절 좌우에는 측각이 있다. 측각에는 강모의 다발이 있고 또 감촉수, 아가미등을 갖고 있다. 소화관은 발달하며 구강, 인두, 식도, 장을 지나 항문에서 끝난다. 종류에 따라 구강에는 소악편(小顎片, 인두에는 대악(大顎)이 있고 근육이 발달해 있으며 식도에는 맹관이 있는 것도 있다.

혈관계는 발달해 있고 혈색소를 가지며 유생의 배설기는 원신관이지만 성체는 보통 후신관이다. 보통 암수딴몸이고 아생생식을 하는 것도 있다. 발생은 전형적인 나선형이고 trochophora 유생을 만들며 이것은 종류에 따라 여러 가지 모양의 유생으로 변태한다. 모래, 진흙속에 사는 것, 헤엄치는 것, 부유하는 것, 고착하는 것 등이 있고 주로 바다에 살며 기수와 민물에 들어 가는 것, 동물서의 것, 육상에 올라오는 것 등이 있고 또 생식시기에 군유(群遊)하는 것이 있다. 세계적으로 10,000 여종 정도가 밝혀져 있다.

Polychaeta(多毛綱)는 Orbiniida, Ctenodrilida, Psammodrilida, Cossurida, Spionida, Capitellida, Opheliida, Phyllodocida, Amphinomida, Spintherida, Eunicida, Sternaspida, Oweniida, Flabelligerida, Fauveliopsida, Terebellida 및 Sabellida목으로 나누어 진다. 본 연구에서 다룬 청충과 본충은 각각 Phyllodocida목 Nereidae과와 Eunicida목 Eunicidae과에 속한다.

2. 2. 해산 갯지렁이의 동정

2. 2. 1. 청충(두토막눈썹참갯지렁이: *Perinereis aibuhitensis*)

조간대의 니사질 또는 사니질의 퇴적물에 서식하며 때로는 기수역에서도 출현한다. 지금까지 보고된 기록에 의하면 가장 큰 개체는 230 마디에 몸의 길이가 270 mm이고 폭은 10 mm로서, 참갯지렁이류 가운데 큰 종류에 속한다. 상품으로 가치가 있는 개체들은 대개 마디가 150개 이상이며, 길이는 고정된 상태에서 13 - 17 mm이상이다.

몸의 색깔은 엷은 초록색이나, 몸통보다는 다리가 더 짙고, 등가운데에는 길이로 된 녹갈색의 줄무늬가 있다.

머리는 서양배 모양이며, 길이보다 폭이 크고, 2개의 짧은 더듬이(antenna)와 젖꼭지 모양의 큰 꼭지더듬이(palp)를 가진다. 역사다리꼴로 배열된 2쌍의 눈이 머리와 기부에 있으며 위쪽에 위치한 눈의 크기가 아래 것보다 크다.

입마디는 몸의 옆쪽으로 부풀어 확장되어 있으며 부푼 부위에는 여러 개의 주름이 있고 머리를 감싸는 형태를 취한다. 또 입마디에는 4쌍의 더듬이수염(tentacular cirrus)이 있는데 이들중 가장 긴 것은 6-8번째 마디까지 다다른다(Fig. 2-1-a).

입주머니(proboscis)는 돌출되었을 때 두 층을 형성하며 윗층의 끝부분에는 키틴질로 된 1쌍의 턱(jaw)이 나 있다. 턱에는 7개(다른 개체에서는 6-7개)의 톱니가 있다. 근육질의 두 층은 8개의 구역으로 나뉘며, 각 구역마다 이빨(또는 소악편: paragnath)이 다양하게 배열되어 있다. 이빨의 형태는 원뿔모양(conical)과 막대모양(transverse)의 두 종류이다. 각 구역별로 이빨의 배열형태와 수를 보면

제 1구역: 4개의 원뿔모양의 이빨이 마름모꼴로 나 있다.

제 2구역: 원뿔모양의 이빨이 왼쪽에는 12개, 오른쪽에는 17개가 초생달 모양으로 휘어진 불규칙적인 2열을 형성하여 나 있다.

제 3구역: 45개의 원뿔모양의 이빨이 불규칙적이긴 하지만 직사각형의 가로열을 이루고 나있다.

제 4구역: 제 2구역과 배열형태와 열의 휘어짐이 비슷하지만 휘어진 방향이 서로 반대이다. 원뿔모양 이빨이며 왼쪽에 16개 그리고 오른쪽에 13개의 이빨이 나 있다.

제 5구역: 원뿔모양 이빨 3개가 삼각형으로 배열되어 있다.

제 6구역: 이 구역은 근육질 혹이 제 5구역 양편에 돌출해 있는 곳으로 각 혹에 2개의 막대 모양의 이빨이 가로로 나 있다. 이 이빨들은 기부가 긴 직사각형으로 위에서 바라보면 막대형이나 옆에서 보면 끝이 뾰족하다.

제 7구역과 8구역: 입마디 아랫층의 옆과 뒷면이 7,8구역이며, 이곳의 가운데 부위에 원뿔모양의 이빨이 2열로 나있다. 윗쪽 열은 이빨이 1개씩 비교적 가지런히 규칙적으로 나있는 반면에 아랫쪽 열은 이빨들이 얼기설기 불규칙적으로 배열되어 있다(Fig. 2-1-b~-c).

다리는 몸통 양 측면에 붙어 있으며, 즉 각 마디 양쪽에 다리가 있는 셈이다. 몸통양쪽에 다리가 하나씩인 처음 두 마디를 제외하고는 모든 마디는 양쪽에 등다리(notopodium)와 배다리(neuropodium)라는 두 개의 다리를 갖는다. 각 다리에는 다리 근육 내부에 침(aciculum)이 하나씩 있다. 다리는 이 침을 중심으로 갈라지거나 형성되는데 대체로 혀 모양이나 그 크기나 모양은 몸의 부위에 따라 달라진다. 등다리와 배다리에는 등다리수염(dorsal cirrus)과 배다리수염(ventral cirrus)라 불리우는 손가락 모양의 돌기가 하나씩 나 있다(Fig. 2-1-d~-f).

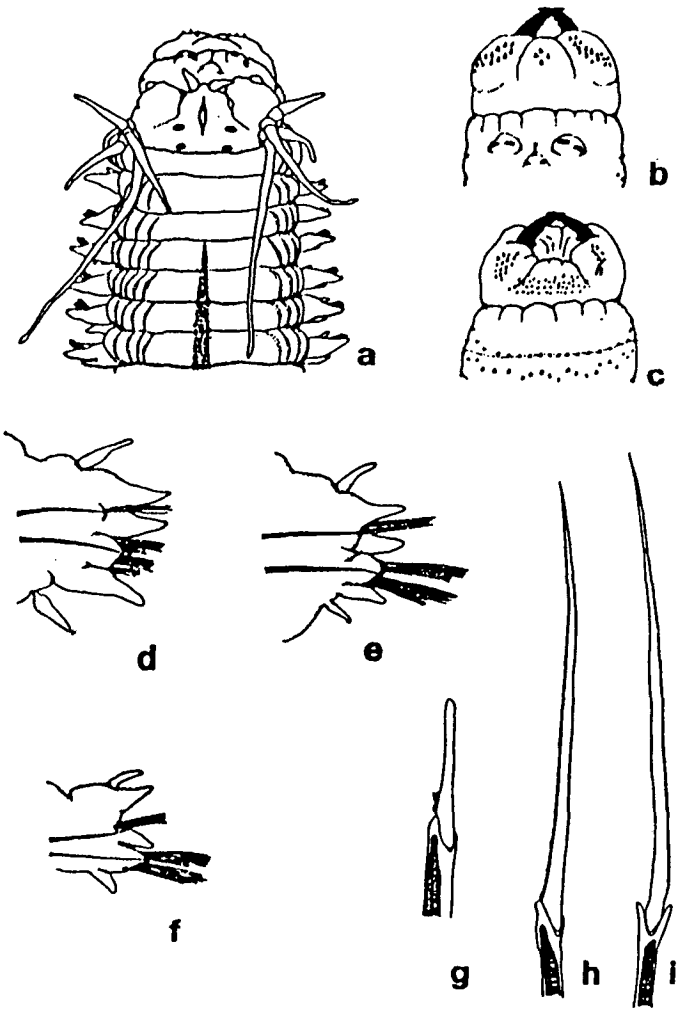


Fig. 2-1 Taxonomical characteristics of *Perinereis aibuhitensis*

a. anterior end in dorsal view

b. proboscis in dorsal view

c. proboscis in ventral view

d. the 10th setiger in anterior view

e. the 53nd setiger in anterior view

f. the 139th setiger in anterior view

g. heterogomph falciger

h. heterogomph spiniger

i. homogomph spiniger

가시는 모두 복합형이고 종류는 바늘가시(spiniger)와 갈고리가시(falciger) 두 종류가 있다. 바늘가시는 가시목의 높이가 같고 다름에 따라 동형 바늘가시(homogomph spinger)와 이형 바늘가시(heterogomph spiniger)로 나눈다. 갈고리가시는 모두 이형이다. 등다리에 난 등가시(notoseta)는 모두 동형 바늘가시이고, 배다리의 윗부분에 난 배가시(neuroseta)는 동형 바늘가시와 갈고리가시이며, 배다리 아랫부분에 난 가시는 이형 바늘가시와 갈고리가시이다. 꼬리마디(pygidium)에는 한 쌍의 가늘고 긴 꼬리수염(anal cirrus)이 나 있다(Fig. 2-1-g~-i).

성숙산란형(epitokous form 또는 heteronereid)의 형태특징: 참갯지렁이류는 성숙한 후 산란시기가 되면 몸의 외형이 변하여 유영에 알맞게 된다. 청충의 성숙산란형의 특징은 다음과 같다. 관찰 대상 개체는 총 118 마디에 몸의 길이가 37 mm이며 몸의 폭은 다리를 포함하여 7.6 mm이다. 따라서 외형이 저서생활을 할 때에 비해 옆으로 부푼 모양을 하며, 몸에는 알 또는 정소로 가득 차 있다. 몸은 크게 두 부분으로 나뉘는데, 완전히 유영형으로 바뀐 부분(epitokous region 또는 natatory region)과 일부 확대가 되었지만 유영형 이전의 모습을 어느 정도 유지하고 있는 부분(pre-epitokous region)으로 나뉜다. 색깔은 진초록색으로 전체적으로 체형변화 이전보다 더 짙은 색을 띤다.

머리는 입마디와 비교하여 매우 크게 확대되었으며, 더듬이도 커졌으나 길이는 머리 길이의 1/4정도이다. 꼭지더듬이는 상대적으로 수축되어, 머리 아래 배쪽에 위치하게 되어 등쪽에는 보이지 않는다. 두 눈은 커 졌고 앞쪽 쌍이 뒤의 것보다 약간 크다. 눈의 색은 보라색이고, 눈 주위도 보라빛을 띤다(Fig. 2-2-a).

11번째 마디 부터 28번째 마디까지는 배가시만 있으며, 29번째 마디부터 88번째 마디 까지는 몸의 아래, 위로 납작해지고 넓게 확대된 완전한 유영형을 나타낸다. 이 부분에서의 다리는 크게 확장되어 있다. 등과 배수염에는 부채꼴의 근육돌기가 생기고, 특히 배수염에는 부채꼴 돌기외에도 손가락 모양의 돌기들이 나있다. 배

다리도 부채꼴로 크게 신장되어 있다. 유영형 마디의 가시들은 모드 노(peddle) 모양의 유영가시(natatory seta)로 교체되어 있다, 89번째 이후의 마디에서도 배가시만이 발견되었다(Fig. 2-2-b～-f)..

참갯지렁이류에 있어서는 고정하여도 변화하지 않는 가시의 형태나 이빨의 형태, 배열상태, 구역당 갯수가 종을 검색하는데 중요한 형질로써 이용된다. 그러나 본 종에 있어서는 이들, 특 이빨의 갯수나 형태 그리고 배열상태에 많은 변이가 있어 종의 정의에 혼란이 있었다. 또한 해당 속 *Perinereis*의 특성인 입주머니 제 6 구역의 막대모양의 이빨이 어린 개체 또는 성체라도 개체에 따라 갯수도 2～4개로 다양하고 관찰위치에 따라 원뿔형으로 보이기도 한다. 이에 종 동정에 많은 오류가 생기기도 하고, 학자에 따라 별개의 종으로 불리기도 했다. 즉 입주머니 제 6구역의 이빨의 형태를 원뿔형으로 판단하고 *Neanthes virens*등으로 잘못 동정되기도 하고 *Nereis(Neanthes) linea* Treadwell, 1936, *Nereis(Neanthes) orientalis* Treadwell, 1936, 그리고 *Perinereis vancaurica tetradentata* Imajima, 1972등의 종으로 인식되어 왔다. 지금까지 본 종의 학명을 중국에서는 *N. linea, N. orientalis* 두 종과 *Perinereis aibuhitensis* Grube, 1878를 혼용하여 사용해 온 것으로 보이며, 한국과 일본에서는 imajima(1972)의 견해에 따라 왔다(T. Imajima, 1972).

한국 연안에서 채집된 동일 개체군내에서도 입주머니에 있는 이빨의 갯수나 배열상태에 많은 변이가 있었다. 중국의 Wu등(1985)도 이와 같은 이빨의 심한 변이를 지적하면서 Treadwell (1936)의 두 종이 동종이명임을 밝히고 *Perinereis aibuhitensis*로 정정 하였다(B. L. Wu et al, 1985).

현재 이 종이 분포하고 있는 지역을 보면 인도에서 채집기록이 있기는 하지만 주로 중국과 한국의 황해연안 조간대에서만 집중 서식하고 있는 것을 알 수 있다.

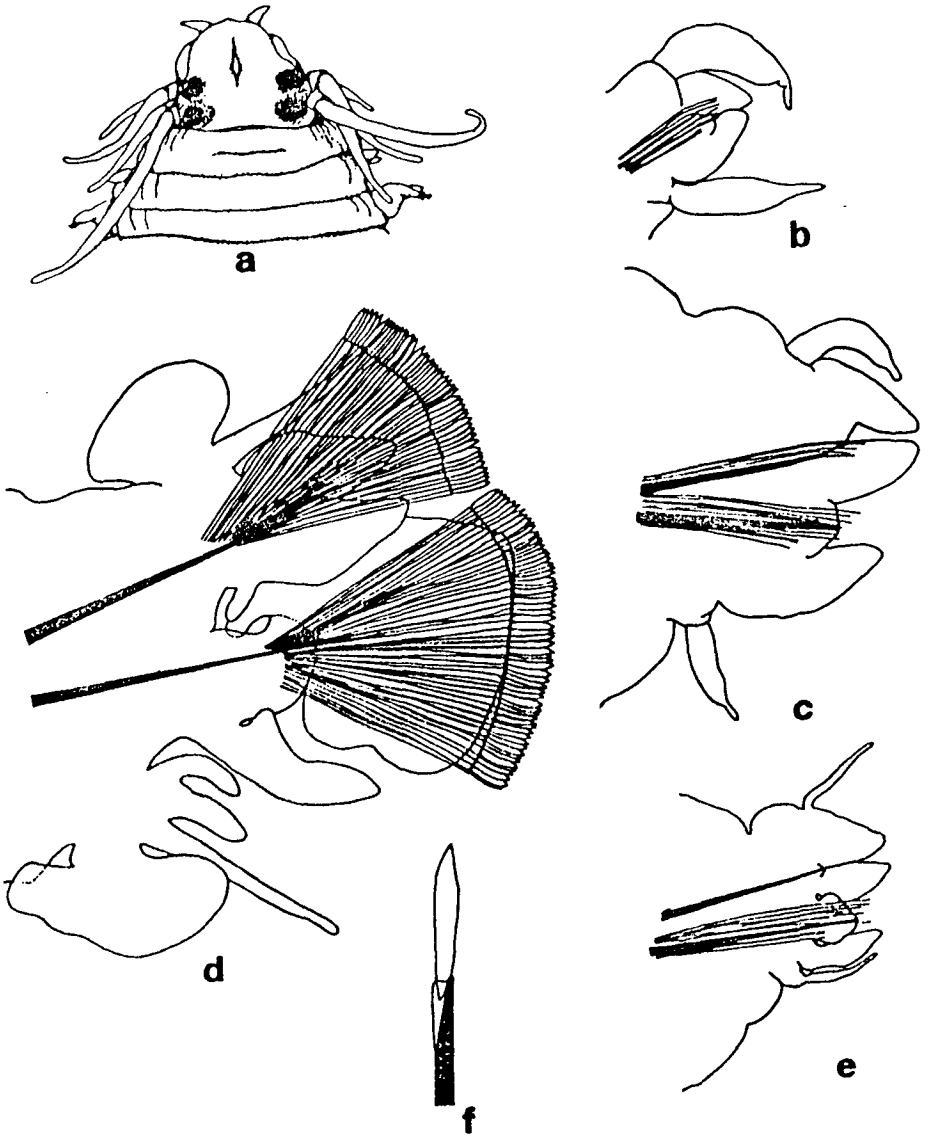


Fig. 2-2 Heteronereid of *Perinereis aibuhitensis*

a. anterior end in dorsal view

b. the 1st setiger in anterior view

c. the 11th setiger in anterior view

d. the 29th setiger in anterior view

e. the 105th setiger in anterior view

f. natatory seta

2. 2. 2. 본충(바위털 갯지렁이: *Marphysa sanguinea*)

조간대 모래지역 또는 바위지역에 서식한다. 지금까지 보고된 개체 가운데 가장 큰 종은 몸의 길이가 805 mm, 다리(parapodium)를 포함한 몸의 폭이 18 mm(50번째 가시마디에서)이며 872개의 가시마디(setiger)를 가진 개체였다. 국내에서 생산되는 상품가치가 있는 개체들은 보통 길이가 200~300 mm, 폭이 13~15 mm정도에 220~250 mm개의 가시마디를 가진다. 몸통은 몸의 앞쪽 몇 마디는 둥근편이나 그 뒷쪽으로 갈수록 넓고 납작해지나 꼬리쪽에서는 가늘어 진다.

몸의 등쪽 색깔은 금속성 광택이 나는 적갈색을 띤다. 머리(prostomium)는 양쪽으로 갈라져 있으며, 머리의 뒷쪽 등편에는 5개의 더듬이(antenna)가 있다(Fig. 2-3). 더듬이 중에는 가운데 것이 가장 긴데, 길이는 머리 길이의 2배 정도이다. 입마디(peristomium)는 두 구획으로 나누어 지며, 앞쪽 것의 길이는 뒤쪽 것의 2배 정도이다. 몸의 앞쪽에 있는 다리에는 잘 발달된 postsetal lobe와 끝이 뾰족한 등수염과 배수염(dorsal and ventral cirrus)을 가지고 있다. 첫 번째 다리의 postsetal lobe는 원통형으로 길게 신장되어 있다. 실 또는 미세한 혹 모양의 아가미(branchia)는 다리에 있으며, 보통 25~50 번째 다리에서부터 나타난다. 아가미가 처음으로 나타나는 다리의 위치는 표본의 크기에 따라 차이가 있다. 아가미의 수는 몸의 중간에 있는 다리에서 가장 많고 그 앞 또는 뒤로는 적어진다.

침(aciculum)내에 있는 갈고리는 끝이 양쪽으로 갈라져 있으며 노란색이다. 그러나 완전히 다 자란 개체에는 갈고리가 없다. 침은 단단하고 끝으로 갈수록 가늘어 지긴 하지만 끝은 뭉툭하며 검은 색이다. 침의 수는 다리마다 다른데, 첫 번째 다리에는 3개, 그리고 8개까지 증가하다가 뒷쪽으로 가면서 2개까지 줄어든다. 침의 수는 어린 개체에서는 적게 발견된다.

가시는 3종류가 있다. 단일형 가시(simple seta)는 한쪽 가장자리가 다른 쪽

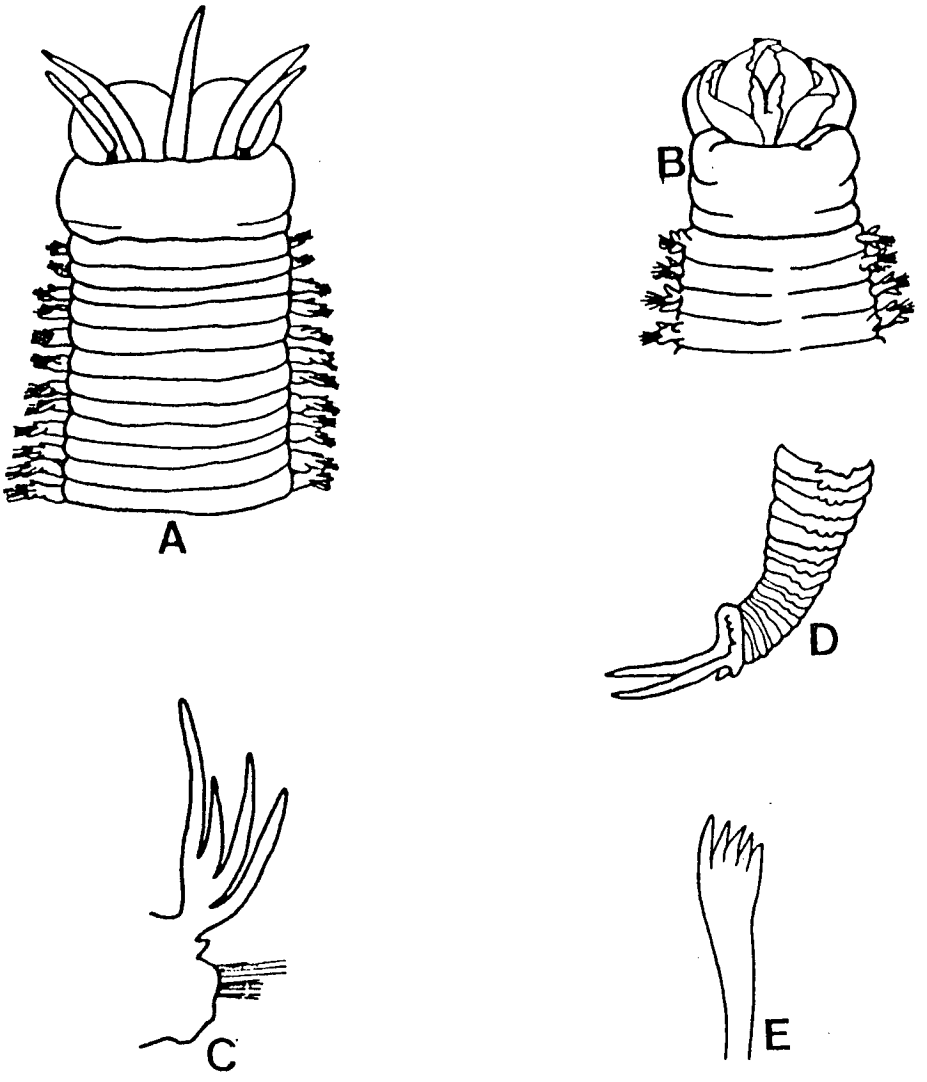


Fig. 2-3 Taxonomical charateristics of *Marphysa sanguinea*

A. anterior end, in dorsal view

B. the same, in ventral view

C. median parapodium, in anterior view

D. posterior end, in lateral view

E. pectinate sera from posterior parapodium(After Paik, 1982)

가장자리와 다르며, 매우 길고 가늘다. 빗가시(comb seta)는 30개 내외의 이빨을 가지며 자루가 달린 빗모양을 하고 있다. 그리고 복합형인 바늘가시(compound spiniger)는 침의 아래에 많이 나 있으며 가시의 한쪽 가장자리에는 미세한 톱니들이 나 있다.

큰턱(mandible)은 검은 색이며, 먹이를 자를 수 있는 석회질의 돌기들을 가진다. 작은턱 (maxilla)에는 둥글고 오목한 가장자리를 가진 장방형의 작은턱 운반기(maxillary carrier)들이 있다. 꼬리마디(pygidium)에는 2개의 긴 등수염과 2개의 짧은 배수염이 있다.

2. 3. 해산 갯지렁이에서 추출된 천연물

이미 앞에서 언급한 것처럼 저서군체 동물을 제외한 다른 해양생물들에 대한 천연물 화학적인 연구는 대단히 미미하기 때문에 본 연구는 여기에서 해산 갯지렁이를 포함한 다른 생물들에 대한 연구결과도 같이 취급하였다.

해양에서 발견되는 여러 acorn 및 tube annelid worms는 흔히 브롬화된 방향족 화합물(heteroaromatic compounds 포함)을 함유하고 있다. 이들 간단한 방향족 물질들은 그 분포가 넓어 동일 혹은 매우 유사한 물질이 여러 생물로부터 추출되는 경우가 많다. 많은 worms가 iodoform과 유사한 향기를 풍기는데 이는 iodoform이 아니라 이들 브롬화된 물질에 의한 것이다. Acorn worm *Balanoglossus biminiensis*의 향기는 2,6-dibromophenol(1)에 의한 것이다(R. B. Ashworth & M. J. Cormier, 1967). 그리고 *Glossobalanus*속과 *Balanoglossus misakiensis*속으로부터 2,6-dibromo-hydroquinone(2)이 추출되었다(T. Higa et al, 1980).

South Carolina와 Washington주에서 채취한 미세 침전물속에 서식하는 worms에 대한 연구가 이루어 졌다. 추출된 대사물질들은 *Saccoglossus*

kowalewskyi(hemichordate)의 브롬화된 phenols 및 브롬화된 pyrroles등이다(S. A. Woodin et al, 1987). 그러나 여기서 제시된 물질들의 구조에 대한 증거는 충분하지 않다.

Acorn worm *Ptychodera flava laysanica* 역시 많은 할로겐화된 phenols를 포함하고 있다. 이중에 가장 간단한 것은 2,4,6-tribromophenol(3)이다. 주대사물질들은 추출용매에 따라서 tetrabromohydroquinone이거나 tribromohydroquinone이다. 미량의 dimeric phenol ether(4)와 trimeric phenol ether(5)가 함께 얻어졌다. Dimeric phenol ether는 2,3,5-tribromo-4-methoxyphenol로부터 합성되었다(M. Iguchi et al, 1986).

Ptychodera(acorn worm)속의 새로운 종으로부터 브롬화된 방향물질이 환원된 형태의 대사물질들인 (4S,5R,6S)-4-acetoxy-2,6-dibromo-5-hydroxycyclohex-2-enone(6), 대응하는 (4S,5R,6S)-epimer(7), (3S,4R,5S,6R)-3-acetoxy-1,5-dibromo-4,6-dihydroxycyclohexene(8) 및 (4S,5R,6R)-4-acetoxy-2-bromo-5,6-epoxy-cyclohex-2-enone(9)과 대응하는 deacetyl 유도체 (10)가 분리되었다. (6), (8) 및 (9)의 구조는 X선 결정구조 분석에 의하여 결정되었으며 나머지 화합물들은 분광데이타분석에 의하여 결정되었다(T. Higa et al, 1987).

Acron worms로부터 브롬화된 indoles 또한 다수가 추출되었다. *Ptychodera flava*의 대사물질들중에 iodoform과 유사한 향기를 풍기는 물질은 3-chloroindole (11)로 확인되었다(T. Higa & P. J. Scheuer, 1975). 이 worm의 다른 시료들로부터 3-bromoindole(13), 6-bromo-3-chloroindole(14), 5,7-dibromo-6- methoxyindole(14)이 분리되었다. *Ptychodera flava*의 다른 시료로부터 indoles(15)-(16)가 추출되었다(T. Higa et al, 1980).

다른 acorn worms(Enteropneusta)로부터 많은 브롬화된 대사물질들이 분리되었다. *Balanoglossus carnosus*의 3,4,6-tribromoindole(17)이 여기에 속한다(T.

Higa et al, 1980). *Glossobalanus*속은 특이하게 치환된 4,6-dibromoindole(18)과 4,6-dibromo-2-methylindole(19)을 포함하고 있다. 그러나 이 브롬화된 indole들이 이 동물의 조추출물에서 발견되는 항미생물 작용의 주성분인지는 명확하지 않다(T. Higa et al, 1980; 1985). 4,6-Dibromoindole과 3,4,6-tribromoindole은 3,5-dibromo-nitrobenzene으로부터 합성되었다(P. Martin, 1987).

Acorn worms로부터 추출된 bromoidoles 중 가장 흥미 있는 물질들은 *Ptychodera flava*로부터 분리된 purple dye(20)와 함께 분리된 유사체인 (21)과 (22)이다. 이 물질들은 초록색을 띄는 *P. flava*의 한 시료로부터 얻어졌다. 역사적으로 유명한 Tyrian purple dye인 (20)은 예전에 연체동물인 *Murex*속의 여러 종에서 추출되었으며 상업적으로 사용된 최초의 해양 천연물이다(J. T. Baker et al, 1974).

Echurian worm *Bonellia viridis*의 암컷은 아직 성적 분화가 일어나지 않은 유충을 자기 몸의 주둥이에 부착시키고 있는데 자기가 생성한 푸른색 색소를 이용하여 이 유충을 숫컷으로 변화시킨다. 한편 자기 몸의 다른 곳에 기생하는 유충은 수컷보다 훨씬 더 큰 암컷으로 성적 분화가 일어난다. 이 성적분화를 일으키는 porphyrin계 색소 bonellin(23)의 구조는 물리적 방법에 의하여 결정되었으며 anhydrobonellin methyl ester의 X선 결정구조 분석에 의하여 확인되었다(A. Pelter et al, 1976; 1981; J. A. Ballantine et at, 1980). Bonellin dimethyl ester(24)는 합성되었다(C. J. Dutton et al, 1983). Bonellin의 아미노산 접합체들[(25)-(28)]이 *B. viridis*의 신체조직으로부터 분리되었다(A. Pelter et al, 1978). 이들중 isoleucine 접합체(26)는 neobonellin으로 불린다(L. Cariello et al, 1978).

Shrimp *Euphausia pacifica*에서 추출된 형광물질은 porphyrin계의 bile pigment(29)로 확인되었다(H. Nakamura et al 1988). 이 화합물의 구조는 분광 데이타 분석, 화학적 변환 및 분해산물의 합성에 의해서 결정되었다. 15,16-이중결합의 입체화학적 구조는 결정되지 않았다. Spider crab *Libinia emarginata*의 혈액림

프(hemolymph)로부터 insect juvenile hormone 즉 JH III(30)와 methyl farnesoate(31)이 대단히 낮은 농도로 얻어 졌다(H. Lanfer et al, 1987). 이런 계열의 물질들은 갑각류(crustaceans)에 대한 생체조절기능을 가지고 있는 것으로 추측된다. 오스트레일리아에서 발견되는 rock lobster *Panuliris longipes cygnus*로부터 비소 화합물인 arsenobetaine(32)이 추출되었다(J. S. Edmonds et al, 1977).

Hemichordate worm *Cephalodiscus gilchristi*(Pterobranchia)로부터 강력한 항암효과를 보이는 pyrazine alkaloids인 cephalostatins가 분리되었는데 이 물질들은 두 개의 steroids가 결합되어 형성되어진 화합물들이다. Cephalostatin 1(33)의 구조는 X선 결정구조 분석에 의하여 결정되었으며 cephalostatins 2-4(34)-(36)의 구조는 분광 데이타 분석에 의하여 결정되었다(G. R. Pettit et al, 1988). *C. gilchristi*의 다른 시료로부터 새로운 steroidal alkaloids인 cephalostatins 5(37)와 6(38)이 분리되었으며 이 물질들의 구조는 분광 데이타 분석에 의하여 결정되었다(G. R. Pettit et al, 1989). Cephalostatins 계열의 물질들은 모두 P388 림프구 백혈병 세포의 성장을 억제한다.

Polychaetes가 해양 천연물에서 차지하는 위치는 대단히 미미하다. 연구가 이루어진 속은 *Arenicola, Halla, Phragmatopoma, Phoronopsis, Thelepus, Perinereis*등 6-7에 불과하며 알려진 천연물의 수도 20 여개에 불과하다. Polychaetes가 갯벌이나 sand, mud등 soft bottom benthic community에서 차지하는 중요성을 고려할 때 이들의 천연물이 이렇듯 빈약함은 놀라운 일이다. 이 사실이 polychaetes 체내에서의 2차 대사가 활발하지 못한데 기인한 것인지 아니면 현재까지의 해양 천연물 연구가 대형 해조류나 해면, 강장, 원색등 군체동물에만 집중되어 상대적으로 소외되어 온 결과인지는 명확하지 않으며 향후의 보다 체계적인 연구에 의하여 밝혀질 일이다.

Polychaetes의 천연물은 거의 전부가 C_{15}이내의 비교적 간단한 탄소골격으로

이루어져 있으나 일부는 상당히 강한 생리활성 효과를 갖고 있음이 밝혀 졌다. Polychaetes의 천연물로서 가장 잘 알려진 것은 polybrominated aromatic compounds이다.

Soft bottom에 서식하는 tube-dwelling polychaete *Thelepus setosus*(family Terebellidae)로부터 3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl alcohol(39), aldehyde(40), bis(3,5-dibromo-4-hydroxy phenyl)methane(41), thelephenol(42), thelepin(43)등 다섯 개의 polybrominated compounds가 분리되었으며 이들의 구조는 원소분석, IR, UV, MS 및 화학적 변환 및 합성에 의하여 결정되었다(T. Higa and P. J. Scheuer, 1974). 이들중 3중고리 물질인 thelepin은 육상진균 *Penicillium griseofulvum*의 대사물질로 유명한 항진균제인 griseofulvin(44)과 구조적으로 유사할 뿐만 아니라 거의 동등한 수준의 항진균 효과를 보이어 상당한 관심을 모았다. Thelepin은 함께 분리된 thelephenol의 phenoxy기에 의한 oxidation/nuclephilic substitution에 의하여 합성된 것으로 추정되었으며 이 가설은 thelepin의 전합성 과정에서 증명되었다(O. Tsuge et al, 1984).

Thelepus setosus 이외에도 soft bottom에 서식하는 polychaete *Phoronopsis viridis*로부터 bromophenol계 물질인 (45)과 (46)이 분리되었다(Y. M. Sheikh and C. Djerassi, 1975). 간단한 구조로 이루어진 이들은 항균, 항진균, 방부효과와 함께 nematods와 molluscs에 대한 독성을 나타내었는데 이 사실은 bromophenols이 polychaetes의 생존을 돕는 생태학적 효과를 갖고 있을 것이라는 가정을 낳게 한다. 이 가설을 지지하는 중요한 증거로는 polychaetes 이외에도 *Saccoglossus, Balanoglossus, Glossobalanus, Ptychodera*등 동일한 환경에 서식하는 여러 종류의 hemichordates(반색동물)로부터 동일 혹은 유사한 물질이 다수 추출된 점이다(S. A. Woodin et al, 1987).

이들의 생합성적 주체에 대해서는 명백히 밝혀진 것은 아니나 서식환경에 미

루어 볼 때 공생미생물이나 포식(algae등)에 의하여 생산된 물질이 축적된 것이 아니고 polychaetes의 체내에서 tyrosine이나 phenylalanine으로부터 생합성된 것으로 추측된다(T. Higa et al, 1980; S. A. Woodin et al, 1987).

Polychaete *Halla parthenopeia*(order Eunicida, family Lysaretidae)의 epidermal-epithelial cell에 존재하는 붉은 색소 hallachrome(47)의 구조는 오랜 기간 논란의 대상이 되어 왔으나 분광학적 자료와 화학적 변환에 의하여 anthraquinone계의 물질로 밝혀 졌다(G. Prota et al, 1972). 천연물로 존재하는 anthraquinones은 polyketides의 long-chain이 축합되어 형성된 것으로 미생물 특히 진균에서 자주 발견되나 hallachrome은 산화형태에 있어서 대단히 독특한 물질이다. 즉 anthracene을 이루는 14개의 탄소중 B ring에 위치한 C-9, C-10 탄소가 반응성이 가장 높아 천연이나 합성으로 존재하는 anthraquinone이라 함은 거의 전부가 9,10-diketone을 의미함은 잘 알려져 있다. 그러나 hallachrome은 이들 위치 대신에 반응성이 훨씬 낮은 C-1, C-2가 산화된 orthoquinone으로 구성되어 있다는 점에서 유례를 찾아 볼 수 없는 독특한 물질이다(G. Prota et al, 1972). Hallachrome은 산에 대한 안정성이 매우 낮아 산성용액에서 쉽게 보라색의 결정으로 바뀌는데 이 물질은 분광학적 자료해석에 의하여 hallachrome의 oxygen 작용기의 위치가 뒤바뀐 것으로 밝혀 졌다(M. D'Agostino et al, 1986).

*Halla parthenopeia*으로부터 다른 anthracene 유도체(49)이 분리되었으며 그 구조는 분광학적 자료 해석 특히 nOe 실험에 의하여 결정되었다(G. Cimino et al, 1985). 이 물질은 공기중에서 쉽게 산화되어 hallachrome으로 변환되므로 hallachrome의 생합성적 전구물질로 추측된다. Hallachrome과 그 전구물질은 *H. parthenopeia* 이외에도 유사한 환경에 서식하는 polychaete *Lumbriconereis impatiens*에도 함유되어 있음이 밝혀 졌다(G. Prota et al, 1972; G. Cimino et al, 1985).

Lumazines는 bicyclic alkaloid인 pteridine의 C-2, C-4의 위치가 산화된 물질들이다. 이 계열에 속하는 leucettidine(50)이 카리브해에 서식하는 해면 *Leucetta microraphis*로부터 분리된 바 있다(J. H. Cardellina II et al. 1981). 최근 유영하는 polychaete *Odontosyllis undecimdonta*로부터 6-propionyllumazines [(51)-(58)]가 다수 분리되었으며 그 구조는 분광자료 해석과 화학적 변환에 의하여 결정되었다 (S. Inoue et al, 1990; 1991; H. Tanio et al, 1994). *O. undecimdonta*는 석양직후에 해수표면에 출현하여 산란하며 강한 생발광(bioluminescence)을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 lumazines가 *O. undecimdonta*의 발광이나 기타의 생태학적 역할에 관여하는 가의 여부는 알 수 없다. 최근 동일한 *O. undecimdonta*의 시료로부터 cyclic enol phosphate의 작용기를 가진 lumazine 유도체 [(59)-(61)]이 분리되었으며 분광자료 해석에 의하여 구조가 결정되었다(S. Inoue et al, 1993).

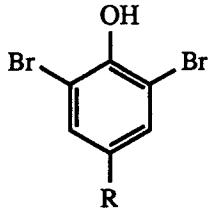
Phosphate기는 1차 대사 특히 탄소화물과 지방대사에 주로 작동하지만 2차 대사물질에 결합되어 발견되는 예는 흔하지 않으며 특히 [(59)-(61)]과 같이 cyclic enol phosphate의 형태로 발견되는 예는 극히 드물다. 물질 [(59)-(61)]을 HCl로 가수분해하면 phosphate가 유리되어 [(62)-(65)]과 같이 lumazines로 변한다. 특이한 사실은 [(59)-(61)]에 대하여 건조한 *O. undecimdonta*로부터의 H_2O 추출액을 가한 결과 상온에서 (51)과 (52)로 변환하였다(S. Inoue et al, 1993). 이러한 reductive dephosphorylation은 대단히 흥미로운 것으로서 현재 자세한 과정이 연구중에 있다.

고유한 2차 대사물질은 아니나 polychaetes 천연물의 역할에 관하여 중요한 연구결과가 보고되어 있다. Polychaetes는 서식지 및 생활상이 매우 다양한 동물이다. 이들중 Sabellariidae과에 속하는 동물들은 유충일 때는 plankton과 같은 유영생활을 하다가 성숙하면 변태(metamorphosis)를 하는 것과 동시에 단단한 기질에 부착하여 생활한다. 기질에 부착한 성체는 주변의 퇴적물과 체내로부터의 배출물을 혼합하여 몸체 주변에 단단한 tube를 형성한다. 그런데 sabellariids는 군집생활을

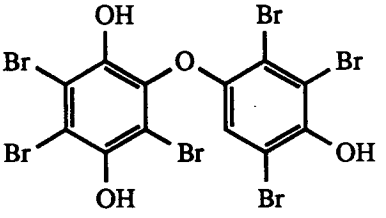
하는 동물이므로 결과적으로 무수한 tube는 한덩이로 뭉쳐져 reef를 형성하게 된다. 이것이 sabellariid polychaetes를 reef-building tube worms라고 부르는 이유이다.

Polychaetes가 형성하는 reef는 전세계의 아열대와 온대의 조간대 및 조하대에 광범위하게 분포하며 폭과 길이가 각각 수 백 m와 수 백 km에 이르기도 하며 이에 따라 tube worms와 이들이 형성한 reef는 생태학 및 환경학적인 측면에서 대단히 중요하게 여겨 진다(J. R. Pawlik, 1986). 따라서 sabellariids tube worms의 reef-building 기작에 대해서도 많은 관심이 모아 졌다. 초기의 연구에 의하면 tube worm 유충은 성체가 서식하고 있는 sand tubes나 tubes의 잔해 혹은 젊은 성체(sand tube를 아직 형성하지 못한)의 점액질에 접촉하는 즉시 변태와 부착을 하는 것으로 알려졌으며 이것은 성체가 배출하는 화학물질에 의한 것으로 추측되었다(D. P. Wilson, 1968). 근자에 이러한 현상을 일으키는 화학물질의 실체가 규명되었다(J. R. Pawlik, 1986).

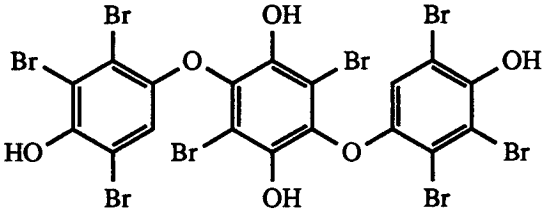
남부 California 연안에 서식하는 sabellariid(tube worm *Phragmatopoma californica*)의 sand tubes에 대한 유기 조추출물을 *P. californica*의 유충에 가한 결과 빠른 변태와 착생이 관찰되었다. Flash chromatography와 HPLC등의 분리방법을 이용하여 원인물질을 분석한 결과 불포화 지방산임이 밝혀졌으며 다양한 불포화 지방산을 이용한 동일한 실험결과 불포화 지방산중 16:1-*cis*, 18:2-*cis*, 20:4-*cis*, 20:5-*cis*등이 원인물질로 규명되었다. 천연 혹은 인공으로 존재하는 수 십개의 포화 및 불포화 지방산중 이들 4개의 불포화 지방산만이 유생의 변태를 일으키는 원인은 명확하지 않으나 3차원 model study에 의하여 공간적인 molecular length가 중요한 변수로 추측되었다(J. R. Pawlik, 1986). 즉 sabellariid tube worms의 군집은 성체가 합성하여 체표면이나 tube sands에 함유하고 있는 불포화 지방산에 유생이 접촉함으로서 형성된다는 것이 규명되었다.



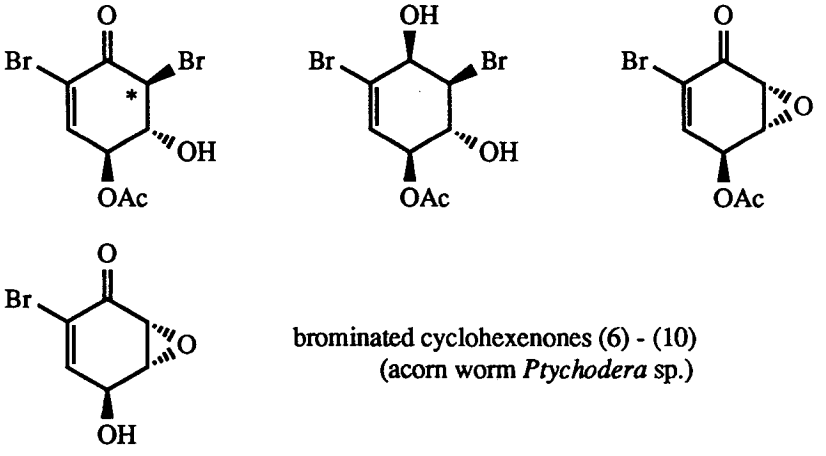
(1 - 3, R = H, Br, OH),
(various acorn and tube worms)



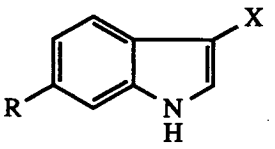
(4)
(acorn worm *Ptychodera flava laysanica*)



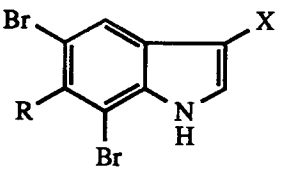
(5)
(*P. flava laysanica*)



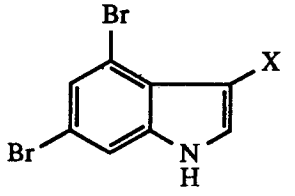
brominated cyclohexenones (6) - (10)
(acorn worm *Ptychodera* sp.)



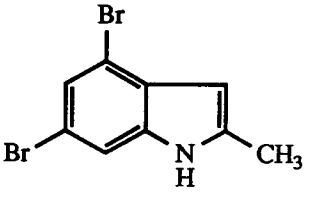
(11) : R = H, X = Cl
(12) : R = H, X = Br
(13) : R = Br, X = Cl
(16) : R = Br, X = Br
(*Ptychodera flava*)



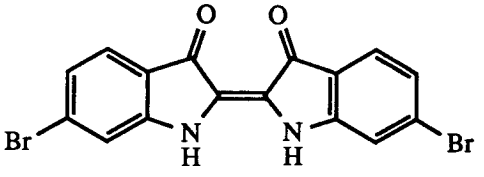
(14) : R = OMe, X = H
(15) : R = OMe, X = Br
(*P. flava*)

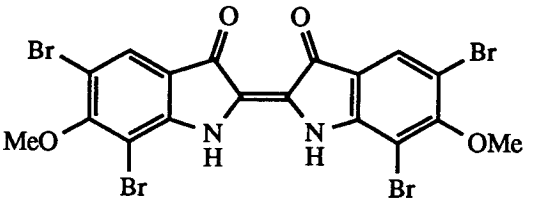


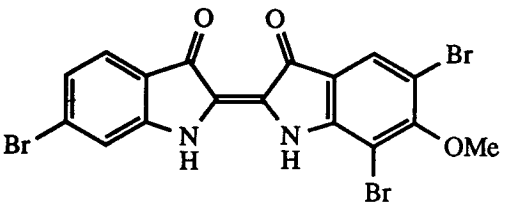
(17, X = Br)
(acorn worm *Balanoglossus carnosus*)
and (18, X = H)
(acorn worm *Glossobalanus* sp.)



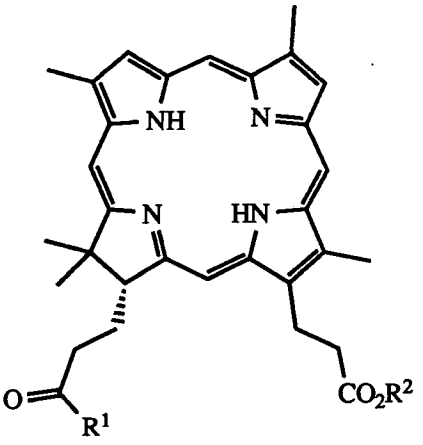
(19)
(*Glossobalanus* sp.)



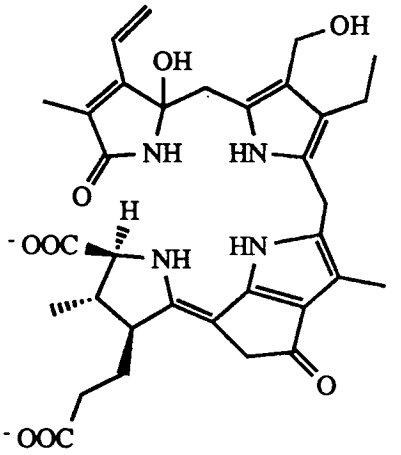




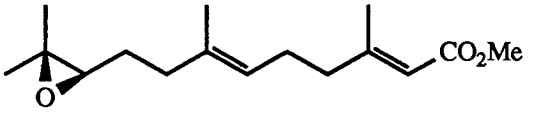
Tyrian purple (20, upper left)
and derivatives (21) - (22)
(acorn worm *Ptychodera flava*)

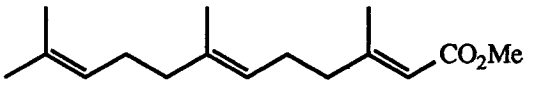


bonellin (23) : R^1 = OH, R^2 = H
(24) : R^1 = OMe, R^2 = Me
(25) : R^1 = *N*-valyl, R^2 = H
(26) : R^1 = *N*-isoleucyl, R^2 = H
(27) : R^1 = *N*-leucyl, R^2 = H
(28) : R^1 = *N*-alloisoleucyl, R^2 = H
(echurian worm *Bonellia viridis*)

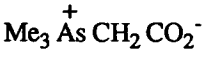


(29)
(shrimp *Euphausia pacifica*)

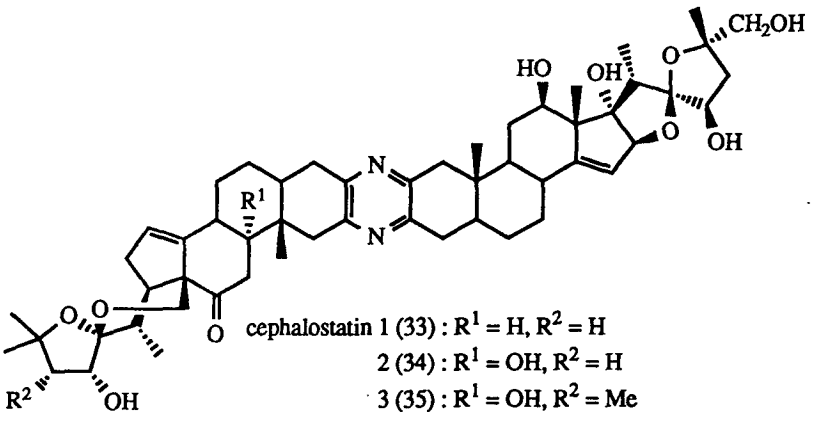




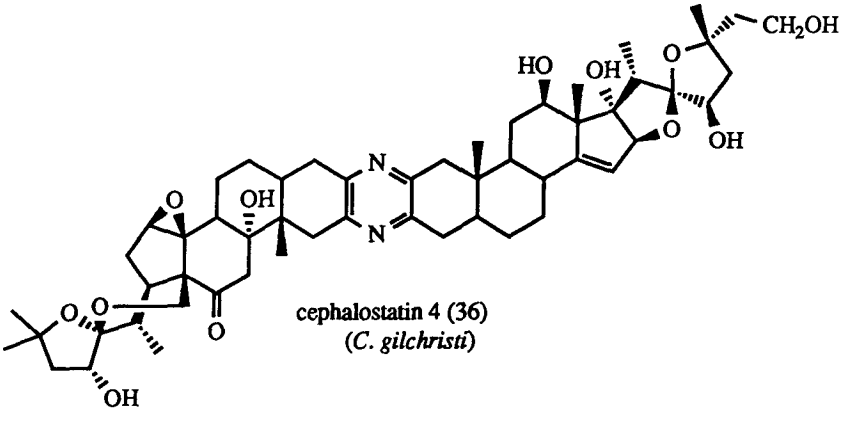
JH III (30, upper) and methyl farnesoate (31)
(spider crab *Libinia emarginata*)



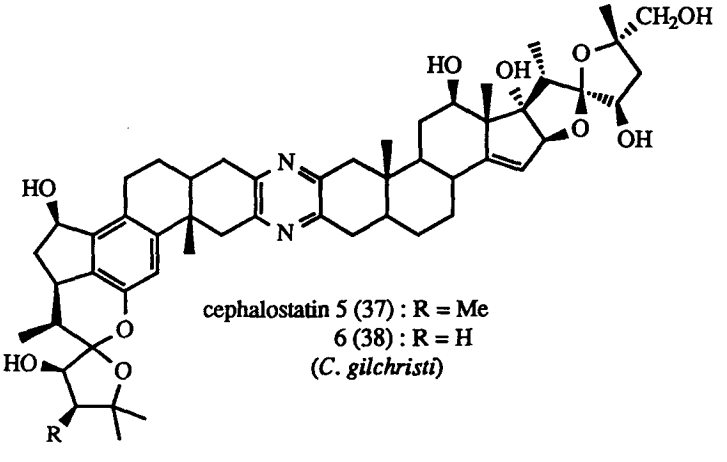
(32)
(lobster *Panuliris longipes cygnus*)



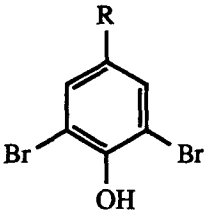
cephalostatin 1 (33) : $R^1 = H, R^2 = H$
2 (34) : $R^1 = OH, R^2 = H$
3 (35) : $R^1 = OH, R^2 = Me$
(hemichordate worm *Cephalodiscus gilchristi*)



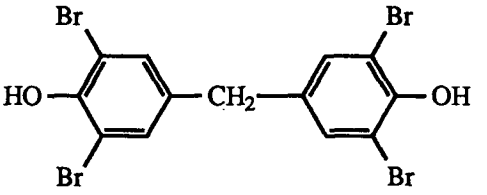
cephalostatin 4 (36)
(*C. gilchristi*)



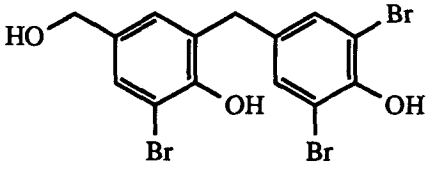
cephalostatin 5 (37) : R = Me
6 (38) : R = H
(*C. gilchristi*)



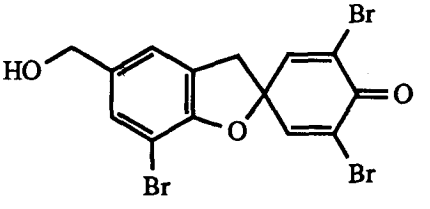
(39) R=CH_2OH
(40) R=CHO
(*Thelepus setosus*)



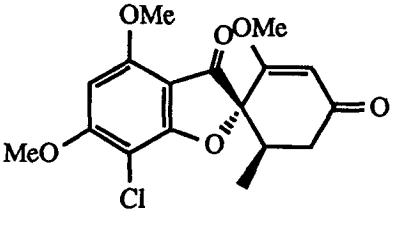
(41)
(*Thelepus setosus*)



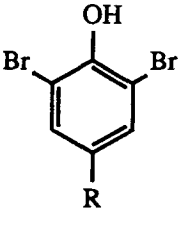
(42) thelephenol
(*Thelepus setosus*)



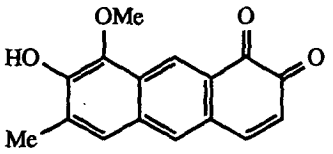
(43) thelepin
(*Thelepus setosus*)



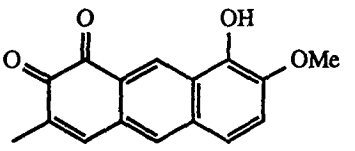
griseofulvin (44)
(microorganism *Penicillium griseofulvum*)



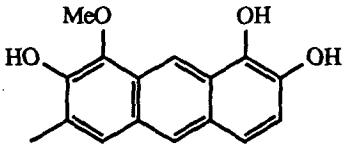
(45) R=H
(46) R=Br
(*phoronopsis viridis*)



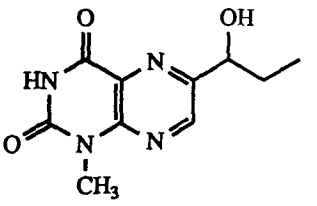
(47) hallachrome
(*Halla parthenopeia*)



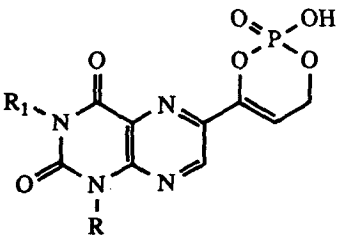
(48)
(*Halla parthenopeia*)



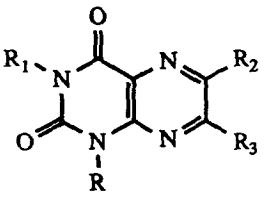
(49)
(*Halla parthenopeia*)



(50) leucettidine
(sponge *Leucetta microraphis*)



(59) $R=R_1=CH_3$
(60) $R=H$, $R_1=CH_3$
(61) $R=R_1=H$
(polychaete *Odontosyllis undecimdonta*)



(51) $R=R_1=H$, $R_2=COCH_2CH_3$, $R_3=H$
(52) $R=H$, $R_1=CH_3$, $R_2=COCH_2CH_3$, $R_3=H$
(53) $R=R_1=CH_3$, $R_2=COCH_2CH_3$, $R_3=H$
(54) $R=H$, $R_1=CH_3$, $R_2=COCH_2CH_2OCH_3$, $R_3=H$
(55) $R=R_1=CH_3$, $R_2=COCH_2CH_2OCH_3$, $R_3=H$
(56) $R=R_1=CH_3$, $R_2=COCH_2CH_2OCH_3$, $R_3=SCH_3$
(57) $R=H$, $R_1=CH_3$, $R_2=COCH_2CH_2OH$, $R_3=H$
(58) $R=R_1=CH_3$, $R_2=CH(OH)CH_2CH_3$, $R_3=H$
(polychaete *Odontosyllis undecimdonta*)

제 3 장 생리활성도 측정

3. 1. 새우 치사율 검사(Brine shrimp assay)

Brine shrimp assay(Meyer et al, 1982)는 바다새우의 일종인 brine shrimp(*Artemia salina*)를 사용하여 천연물의 전반적인 독성을 손쉽게 검색할 수 있는 일종의 *in vivo* 실험법이다. 이 검색법은 누구나 손쉽게 시행할 수 있으며 재현성이 높아 현재 본 실험실에서 1차 생리활성 검색방법으로 채용되고 있다. 모든 약물은 과량 투여하면 그것이 바로 독이되며 반대로 독성물질을 적절히 농도를 낮추어 사용하면 약리효과를 얻을 수 있다는 개념에서 이 방법을 활용하고 있다. Brine shrimp는 실제로 살충효과검색(A. S. Michael et al, 1956, W. A. Tarpley, 1958; S. Areekul and Harwood, 1960; D. S. Grosch, 1967), mycotoxin의 독성측정(R. F. Brown et al, 1968; R. F. Brown, 1969; J. Harwig et al, 1971; R. H. Eppley, 1974; E. L. Korpinen, 1974; D. Eng-Wilmot and Martin, 1979), 하천 오염물질측정(D. W. Hood et al, 1960), 수면진정제의 효과측정(A. B. Robinson et al, 1965), 쌍편모조류 독소의 독성측정(H. R. Granade et al. 1976), 모르핀류 약품의 약효측정(J. A. Richter and A. Goldstein, 1970), phorbol ester의 cocarcinogenicity측정(A. D. Kinghorn, 1967), 해양의 독성물질의 효과측정(P. Vanhaecke, 1981)등에 사용된 예가 있다. 이후 McLaughlin group에 의해 고등식물의 생리활성 성분연구에 있어서 활성성분을 추적하는데 1차 검색법으로 상용되기 시작하여 실용성이 인정되었으며 항암효과를 측정하는 *in vitro* cell culture assay로 흔히 이용되는 9KB, 9PS cytotoxicity와도 우수한 상관성을 보이는 것으로 나타났다(B. N. Meyer et al, 1982). Brine shrimp assay를 상용되고 있는 수종의 의약품들에 대해 실험한 결과 대개 1000ppm 이하의 농도에서 brine shrimp에 대해 독성을 나타내었

다(B. N. Meyer et al, 1982). 뿐만 아니라 항히스타민제와 히스타민을 함께 투여했을때 receptor에 대한 길항작용(antagonism)이 관찰되는 것으로 보아 brine shrimp 자체가 최소한의 인체와 유사한 receptor를 가지고 있는 축소형 *in vivo* system으로 볼 수도 있을 것이다(personal communication).

이 방법으로 천연물의 어떤 특정한 약리작용을 밝힐 수는 없지만 일반독성 여부를 쉽게 판별할 수 있으며 mechanism-based bioassay의 단점을 보완할 수 있다. 실제적으로 천연물 화학연구에 있어서 채집하여 검색할 수 있는 시료의 종류에는 한계가 있으며 특정 mechanism-based bioassay만으로 1차 검색을 실시할 경우 여타의 다른 약물 작용기전에 의한 활성물질들을 모두 놓칠 염려가 있는 것이다. 이에 비해 brine shrimp assay는 작은 *in vivo* system에서 전반적인 독성여부를 측정하므로 어떤 작용기전으로 활성을 나타내든 모두 검출할 수가 있다.

이 검색방법은 냉동건조된 brine shimp의 알을 부화시켜 48시간후의 유충(nauplii)을 3단계의 각기 다른 농도(eg. 10, 100, 1000 ppm)의 시료에 투입하여 24시간후의 생존여부를 통해 독성을 파악한다. 통계처리를 위해 각각의 농도에 10마리씩의 유충을 사용하며 이를 3번 반복하여 실험한다. 결과는 LC_{50}(50 % lethal concentration at which 50 % of brine shrimp die)로 나타내며 crude extract에서 LC_{50}가 1000 ppm 이하이면 유의성이 있는것으로 간주한다. Brine shimp의 알은 쉽게 구할수 있으며 건조된 상태에서 냉장 또는 냉동보관하면 수년동안 보존할 수 있으며 알을 부화시켜 결과를 보기까지는 24시간 밖에 걸리지 않는다.

Brine shrimp assay와 9KB, 9PS cytotoxicity간에는 우수한 상관성이 있는것으로 나타나므로(Fisher-Irwin test p=0.036 kappa=0.56) 항암효과 측정의 전단계 검색법으로 이용할 수도 있을것이다. Brine shrimp에 대한 독성을 추적하여 최종적으로 순수한 물질을 획득하면 좀 더 정밀하고 특정 약리작용을 볼 수 있는 mechanism-based bioassay를 진행시켜야 할 것이다.

3. 2. DNA 절단 검사(DNA cleavage assay)

DNA cleavage assay는 supercoiled covalently closed circular DNA를 기질로 사용하여 천연물로부터 항암후보 물질을 검색하는 방법이다. Supercoiled DNA내의 수천개의 염기중에서 어느 한군데만 끊어져도 form I DNA가 form II로 변하며 이것은 agarose gel electrophoresis에 의해 분리가 되므로 매우 감도가 높은 방법이다. Form I (supercoiled DNA)과 form II (nicked circular DNA)는 분자량이 같지만 압축된 형태의 form I DNA가 agarose gel 상에서 더 빨리 이동한다.

검사시료를 supercoiled DNA와 함께 일정시간 배양하여 이것을 1.2 % agarose slab gel에서 전기영동하여 DNA strand의 절단여부를 본다(Sugiyama et al, 1985; Barr et al, 1988). 이 방법으로 발견된 물질에는 epicatechin(Chrisey et al, 1988), procyanidin B_2(Chrisey et al, 1988) 그리고 일련의 5-alk(en)yl resorcinol등이 있다(Barr et al, 1988; Scannell et al, 1988).

3. 3. 항미생물 검사(Antibiotic activity assay)

고전적으로 agar diffusion methods가 항생물질을 생성하는 미생물들을 발견하는데 이용되었다. 특히 이 방법들은 그램양성 박테리아에 대한 항생물질을 발견하는데 크게 기여하였으며 그램음성 병원균 및 병균성 곰팡이류를 발견하는데도 어느 정도 기여하였다.

간단한 장치로 쉽게 항생효과(antibiotic acitivity)를 측정할 수 있는 여러 가지 방법들이 있다. 이러한 방법들은 미생물에 대한 전문적인 지식을 그렇게 많이 요구하지는 않는다. 다음의 보기는 *Trichoderma koningii*에 의해 생성된 곡물류의 병원

균에 대한 강력한 항생물질을 발견하는데 사용된 방법이다(A. Simom et al, 1988; R. W. Dunlop, 1989). 1/5 PDA(potato dextrose agar)에서 배양된 곰팡이의 colony로부터 취해진 7 mm diameter의 plug가 1/5 PDA를 포함하는 petri dish의 중앙에 설치된다. *T. koningii*의 배양액을 ethyl acetate로 추출하고 이 추출물을 크로마토그래피로 분리하여 몇 개의 분획으로 나눈다. 이 분획에서 2 mg씩을 취하여 에탄올 2 ml에 녹인 다음 이 용액 10 ㎕를 직접적으로 plug의 꼭대기에 분배한 후에 그 용매는 laminar flow cabinet에서 제거되었다. 이 dish를 20 ℃에서 incubation한 후에 이 dish에 존재하는 병원균(pathogen)의 성장속도를 에탄올로만 처리한 control과 계속적으로 2, 3, 4, 5일 후에 비교하였으며 성장에 대한 억제정도는 2일 쯤 지나면 명백하게 되었다. Control은 110 mm^2의 colony area를 보여 주었지만 테스트 시료는 32 mm^2 정도를 나타 냈다.

Agar-dilution streak assays는 추출물의 농도를 고정해 놓고 최고 7개의 다른 유기체까지 동시에 petri dish에서 실시 할 수 있는 방법이다. 이 방법을 사용하면 낮은 농도(<1%)로 존재하는 약한 antimicrobial agents도 확인할 수 있다. 사람의 전염병에 관련이 큰 대표적인 미생물들로 *Staphylococcus aureus*(the Gram positives); *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* 및 *Pseudomonas aeruginosa*(the Gram negatives); *Mycobacterium smegmatis*(the acid fasts); *Candida albicans*(yeasts and fungi)를 들 수 있다(L. A. Mitscher et al, 1987). Positive control(예, streptomycin sulfate)을 이용하면 정성 및 정량적인 분석도 가능하다(H. Jayasuriya et al, 1989).

Bioautography는 항생작용(antibacterial activity)을 screening하는데 이용되어 온 테크닉이다. 가장 흔한 방법은 agar diffusion method이다. TLC(thin layer chromatography) plate를 test organism이 주입된 agar plate와 접촉시켜 설치하면 화합물이 TLC plate로부터 agar plate로 확산된다. Incubation period후에 inhibition

zones를 적당한 stains를 이용하여 측정할 수 있다. 이러한 과정은 미생물학적인 장치를 필요로 하고 또 화합물의 형태에 따른 확산속도의 차이로 문제가 야기될 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Hamburger과 Cordell에 의해 개선된 방법은 broth에 있는 microorganism의 suspension을 dry TLC plate(silica gel)에 직접 적용하거나(M. O. Hamburger & G. A. Cordell, 1987) 혹은 TLC plate를 test bacteria의 suspension이나 fungi의 conidia를 포함하는 용기에 직접 담그는 것이다 (B. Baumgartner et al, 1990). 이렇게 처리된 plate를 습한 대기하에서 하룻밤 동안 incubation하면 형성된 inhibition zones를 dehydrogenase activity에만 특이하게 작용하는 spraying reagent 즉 p-iodonitrotetrazolium chloride에 의해서 확인할 수 있다. Tetrazolium salt는 4시간 정도 지나면 진한 핑크색으로 바뀌며 항생물질의 존재는 칼라배경에 나타나는 맑은 점에 의해서 확인될 수 있다. 박테리아의 확산에 의한 오염은 glove bag에서 활성테스트를 함으로써 감소될 수 있다. 그러나 *Bacillus subtilis*와 *E. coli*는 camptothecin, quassinoid, lignan 계열에 속하는 많은 세포독성 물질에는 민감하게 반응하지 않는다는 것이 증명되었다. 따라서 이러한 방법들은 일차적인 screening 방법으로 이용되고 있으며 다양한 새로운 항생물질의 발견을 위하여 선택적인 새로운 방법들이 개발되었다(R. L. Monaghan & J. S. Tkacz, 1990).

3. 4. 세포독성능 검사

이 활성도와 관련된 용어사용에 있어서 그 동안 상당한 혼란이 있었으나 최근 NCI에 의해서 이 개념이 명확하게 정의 되었다. Cytotoxicity는 antitumor cell에 대한 *in vitro* 활성도를 말하며 정상세포와 암세포간의 선택적인 독성을 의미하는 것은 아니다. 이에 비하여 antineoplastic 및 antitumor activity는 실험단계에서의 *in*

vivo activity를 의미하며 정상세포와 암세포간에 선택적인 활성도가 존재함을 나타낸다.

Antitumor 화합물의 발견은 조추출물에 대한 스크리닝 방법에 달려 있다. 뿐만 아니라 취해진 시료가 조추출물을 대표하는지를 확인하는 것이 중요하다. 용해도도 문제가 될 수 있으며 특히 추출물이 물에 녹지 않을 때 methanol이나 DMSO를 사용할 필요가 있다. 분광학적인 측정을 방해하는 물질의 존재등 assay에 문제가 되는 요소 역시 제거되어야 한다(J. M. Cassady et al, 1990). 해양생물로부터 얻어진 antitumor compounds에 대한 종설논문들이 발표되었으며 또 해양생물 및 남조류로부터 생리활성물질을 분리하는 방법에 대한 책도 발간되었다(M. H. G. Munro et al, 1987; 1989; J. S. Mynderse et al, 1989).

이 활성도에 대한 assays의 대부분은 NCI가 항암제를 발견하는 과정에서 개발되었다. 1981년까지 1551속 35000종에 달하는 식물로부터 유기물질들을 추출하여 여러 종류의 tumor cell에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 활성도 테스트가 이루어 졌다(M. Hamburger et al, 1991; M. Suffness et al, 1882). 많은 bioassay가 조추출물로부터 antitumor 화합물을 발견하기 위하여 사용되었으나 어떤 것들은 너무 민감해서 거짓 양성반응을 나타내었으며(Walker carcinosarcoma 256) 또 다른 것들은 감도가 떨어져서 문제가 되었다(mouse L-1210 leukemia). 최근에는 P388 murine leukemia가 민감도 및 예측도에 있어서 좋은 신뢰도를 보여 *in vitro*나 *in vivo* 모두에 있어서 좋은 결과를 보였다. 즉 이 assay의 성능을 시험하기 위하여 화학요법에 이용되는 18 개의 항암제와 천연물에 대한 측정한 결과 이 모든 시료들은 P-388 cells에서 0.01 μg이나 1.0 μg의 독성을 나타 내며 human HT-29 colon carcinoma cells의 경우에는 18개의 물질들중에 11개 만이 10 μg의 독성을 나타내었다(N. S. Burres et al, 1989). 그러나 좀 더 진보된 *in vivo* test를 위해서는 또 다른 종류의 mouse tumor가 필요하다(Lewis lung carcinoma, colon 38 및 CD8f1

mammary).

9KB human nasopharynx carcinoma나 P-388 murine leukemia(9PS)를 이용하는 *in vitro* 세포독성검사는 분획을 나누는 것을 용이하게 하는데 이용된 것이며 antitumor activity와 cytotoxicity를 구별하는 것은 아니다. 많은 antitumor 화합물이 이 스크리닝 과정을 통하여 분리되었지만 이들중에 몇 개만이 느리게 자라는 solid tumors에 대한 임상실험에서 효과가 있는 것으로 확인되었다. 이것은 일차 스크리닝으로 빠르게 자라는 tumor cell을 이용한 결과이다. 한편 *in vivo* assays에 대한 스크리닝은 돈이 많이 들고 시간이 많이 소모되기 때문에 상당히 비실제적이다. 따라서 별로 민감하지 못한 기존의 *in vivo* test system으로부터 대단히 민감한 human tumor cell line system으로 바뀌는 것이 현재의 추세이다(S.-C. Jong et al, 1989). 최근 NCI에 의해 채택된 새로운 *in vivo* 시스템은 80 - 100개의 human tumor cell lines를 포함한다(J. M. Cassady et al, 1990; M. Suffness, 1987).

항암물질을 개발하기 위한 또 다른 전략은 mechanism-based assays를 이용하는 방법이다. Carcinogenesis를 억제하는 화합물을 발견하기 위하여 지금까지 많은 bioassay system이 개발되었는데 이들은 carcinogens의 형성억제나 target에 대한 carcinogens의 결합억제(blocking) 그리고 tumor 발현의 억제등을 이용하는 방법들이다. 이들중에 효소인 glutathione transferase를 이용하는 방법이 신뢰도가 높다. 이 효소는 독성물질을 제거하는 기능을 가지며 blocking agent를 스크리닝하는데 이용된다. 또 다른 방법은 *Salmonella typhimurium*의 변이를 이용하는 assay이다(Ames test)(B. N. Ames et al, 1975). 세 번째 널리 이용되는 방법은 포유류의 세포조직을 배양하거나 동물들을 이용해서 carcinogen 그 자체의 대사과정이나 혹은 DNA와 carcinogen의 상호작용을 추적하는 것이다. 최근에 자주 이용되는 방법으로는 hamster embryo 세포조직 배양에서 benzo[a]pyrene이 carcinogenic diol-epoxide로 대사되는 과정을 이용하는 것이다. 먼저 사용되는 세포를 tritiated

benzo[a]pyrene 및 측정용 화합물과 함께 배양관에서 18-24 시간동안 배양한 후 배양액을 제거한 후에 남는 잔류물은 클로로포름, 메탄올 및 물의 혼합액으로 추출한다. 분리된 클로로포름층은 출발물질과 1차 산화화합물을 포함하며 수용액층은 2차 산화생성물들을 포함한다. 각 층에 존재하는 방사능을 측정하여 층간에 존재하는 방사능 비율을 산출한다. 이 비율은 benzo[a]pyrene의 대사과정에 작용하는 측정물질의 효과를 나타내는 함수이다. 생성된 특정 대사물질을 확인하기 위하여 HPLC(high-pressure liquid chromatography)나 ion-pair chromatography가 이용될 수 있다. 조추출물이 대사과정에 효과를 보이면 tritiated benzo[a]pyrene 및 시료물질과 함께 embryo 세포조직을 24 시간동안 배양하여 이 물질이 DNA와 benzo[a]pyrene의 결합에 미치는 효과를 측정하는 것이다. 측정결과는 세포가 성장한 후에 분리되는 DNA의 방사능양에 의해서 결정되며 만약에 benzo[a]pyrene과 DNA사이의 결합이 상당히 억제된다면 상당한 효과가 있다고 판단할 수 있다. 이 assays를 이용해서 분리한 화학억제제로서 isoflavones인 biochanin A와 genistein 그리고 flavones인 apigenin과 chrysin이 있으며 다른 isoflavone이나 flavone 유도체들과 이 물질들을 비교해 보면 5와 7 위치에 hydroxyl group이 존재할 때 강한 억제효과를 보인다는 것이 확인되었다(J. M. Cassady et al, 1990).

마지막으로 많은 양의 추출물들을 빨리 스크리닝하기 위한 antimutagen assay가 Wall등에 의하여 개발되었다(M. E. Wall et al, 1988). 이 assay는 Ames S-9 대사활성하에서 2-aminoanthracene의 변이활성억제를 측정하는 것이다(B. N. Ames et al, 1975). 추출물이 수용액층에서 얻어질 경우에 변이활성 효과에 역작용을 하는 histidine이 상당량 포함되는 경우가 있으며 이런 경우에는 mutagen 없이 활성도를 측정해 보는 것이 필요하다. 이 assay는 분류학적으로 39개과 식물을 대표하는 2000개 이상의 추출물에 대해 적용되었으며 80개 정도의 시료에서 억제활성이 발견되었다(M. E. Wall et al, 1988).

3. 5. 림프구(Lymphocyte)에 대한 독성 검사

Murine splenocyte는 검사시료의 면역조절 활성을 검색하는데 이용될 수 있다 (N. Weismann et al., 1985). Bestatin, arphamenines A & B, amastatin등은 tritiated thymine의 incorporation을 증가시켰다. 이러한 mitogenic activity는 macrophage를 제거하거나 세포를 concanavalin A나 lipopolysaccharide로 전처리하면 나타나지 않았다. 비슷한 접근방법으로 Nakamura는 murine splenocyte를 이용하여 245가지 미생물 배양액의 면역조절 활성을 검색하였다. Splenocyte를 분리 배양한 후 미생물 배양액이 tritiated thymine incorporation에 영향을 미치는 concanavalin A, phytohaemagglutin 또는 lipopolygranulocyte의 존재유무와 비교하였다. 최근에는 Wagner등이 인체 peripheral granulocyte와 lymphocyte를 이용해 면역조절 활성을 검색하였다(Wagner et al, 1988). Ficoll gradient centrifugation 방법에 의해서 heparinised peripheral blood로부터 lymphocyte를 분리하여 실험에 사용하였다. 매우 낮은 농도에서(10 ng-10 fg/ml) cytotoxic 또는 cytostatic한 물질들이 이 세포들을 활성화 시켰다. 그러므로 이러한 세포 활성화 반응을 이용하여 면역증강제를 발견, 규명하는데 이용할 수 있을 것이다.

임상 전단계에서 이루어진 연구결과에 의하면 매우 낮은 농도(3-7 ng/ml)에서 cytosine arabinoside, adriamycin, methotrexate등의 항암물질이 면역증강 효과를 나타내는 것이 밝혀 졌다(Sachs, 1982). 의약개발의 관점에서 보면 이러한 낮은 농도에서 약효를 볼 수 있으면 인체에 대한 독성문제를 쉽게 해결할 수 있을 것이다.

제 4 장 실험방법

4. 1. 기기 및 시약

NMR 측정은 Varian Unity-500을 이용하였다. Proton NMR은 500 MHz에서 측정하였으며 chemical shift는 internal standard인 TMS(tetramethylsilane)나 $CDCl_3$를 이용하여 측정하였다. 모든 NMR 실험은 Varian사에서 공급한 Vnmr software를 이용하였으며 실험에 이용된 pulse width, transmitter power, delay 및 evolution time들은 기 측정된 값을 이용하였다. Rotavapor는 Buchi RE-101과 121를 사용하였다. 유기물질의 추출에 이용한 methanol과 dichloromethane은 EP등급을 재증류하여 사용하였다. Spray reagent는 anisaldehyde- H_2SO_4(anisaldehyde 6 ml, ethanol 108 ml, sulfuric acid 6 ml, glacial acetic acid 1.2 ml의 혼합액)를 사용하였다.

Brine shrimp assay에 사용한 sea salts는 Sigma사 제품을 사용하였으며 brine shrimp eggs는 San Francisco Bay 사 제품을 사용하였다.

DNA cleavage assay에 사용된 시약 및 재료로는 supercoiled DNA: Φx174 RFI DNA(Biolabs), buffer: Tris-acetate-EDTA buffer(Sigma), ethidium bromide(Nacalai tesque), agarose(Sigma), DMSO(dimethylsulfoxide)(Sigma), bleomycin sulfate(Sigma), Polaroid film: ISO 3000/36, 667(Polaroid)을 사용하였으며 기기는 incubator(Vision Scientific, VS-1203 P3), electrophorisis kit(Sanplatech), power supply(Vision Scientific, KMC-101), UV lamp(Spectroline, ENF-240c), UV DNA photographic system(Seolin Scientific)을 사용하였다. 괄호 안에 표시된 제품회사명이다.

Antimicrobial and antifungal assays에 사용된 배지는 Nutrient(peptone from

meat 5.0 g, meat extract 3.0 g, pH 7.0), YM(yeast extract 3.0 g, malt extract 3.0 g, peptone from meat 5.0 g, glucose 10.0 g, pH 7.0) 및 Tryptic soy[peptone from casein(BBL) 15.0 g, peptone from soymeal(BBL), sodium chloride 5.0 g, pH 7.3]를 사용하였다.

세포독성실험에 사용한 세포는 한국 세포주 은행에서 분양받은 Human adenocarcinoma인 DLD-1와 Mouse Lympoid neoplasm인 P388D1을 사용했다. 사용된 배지와 혈청은 Gibco 제품을, 항생제와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma 제품을, culture flask는 Falcon제품, 96 well plate는 Nunc제품을 사용하였으며, 세포배양기는 Revco사의 CO_2 incubator를 사용하였다. 세포수 측정은 Hemacytometer를 사용하였다.

4. 2. Polychaetes의 채집 및 유기물질의 추출

Polychaete worm *Perinereis aibuhitensis*는 인천(P94-1), 경남 거제(P94-4), 전북 군산(P94-5)에서 각각 7월, 9월, 10월에 5, 3, 5kg씩 채집하였으며 *Marphysa sanguinea*는 충남 당진(P94-2), 경남 거제(P94-3)에서 각각 3, 4 kg을 채집하였다.

냉동보관중인 시료 P94-1, P94-2, P94-3, P94-4, P94-5을 각각 1.5, 1.5, 0.5, 0.5, 0.5 kg을 해빙시킨 후에 그 각각에 methanol을 가하고, 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 여과하였으며 이 과정을 다시 반복하였다. 추출용매를 dichloromethane로 바꾼 후에 똑 같은 과정을 반복하여 유기물질을 추출하였다. 각 시료에 대하여 이렇게 추출된 물질을 모두 합하여 n-buthanol과 물층으로 partition하였으며 각층을 분리하여 용매를 제거한 후에 무게를 측정한 결과 물층에서 P94-1, P94-2, P94-3, P94-4, P94-5가 67.06, 135.30, 17.90, 31.83, 22.96 g 얻어 졌으며 n-BuOH층에서는 24.08, 36.26, 11.27, 22.3, 7.35 g이 각각 얻어졌다. 이 조추출

물들에 대한 biological activity test를 실시하였다.

n-Buthanol층에서 얻어진 잔류물중에 P94-1의 시료중 일부(12.1 g)를 silica vacuum flash chromatography를 이용하여 몇 개의 분획으로 나누었다. 용출용매는 100% 헥산에서 시작하여 에틸아세테이트의 양을 5% 씩 증가시켜 70% 헥산/에틸아세테이트까지 사용하였으며 추가적으로 100% 에틸아세테이트, 아세톤, 메탄올을 사용하였다. 사용된 용출용매의 부피는 분획마다 500 ml씩 이었으며 각 분획에서 얻어진 양은 다음과 같다: fx-1(100% hexane, 0.03 g), fx-2(5% EtOAc/hexane, 0.9 g), fx-3(10% EtOAc/hexane, 3.89 g), fx-4(15% EtOAc/hexane, 1.14 g), fx-5(20% EtOAc/hexane, 0.72 g), fx-6(25% EtOAc/hexane, 0.26 g), fx-7(30% EtOAc/hexane, 0.19 g), fx-8(35% EtOAc/hexane, 0.16 g), fx-9(40% EtOAc/hexane, 0.11 g), fx-10(45% EtOAc/hexane, 0.11 g), fx-11(50% EtOAc/hexane, 0.11 g), fx-12(60% EtOAc/hexane, 0.06 g), fx-13(70% EtOAc/hexane, 0.02 g), fx-14(100% EtOAc, 0.03 g), fx-15(100% acetone, 0.13g), fx-16(100% MeOH, 2.82 g).

물층에서 얻어진 잔류물의 일부(3.0 g)를 덜어서 Sephadex LH 20 gel permeation chromatography로 분리를 시도하였다. 용출용매는 10% aqueous methanol을 각 분획마다 100 ml 씩 사용하였으며 분리된 양은 다음과 같다: fx-1(0.01 g), fx-2(0.02 g), fx-3(0.120 g), fx-4(1.16 g), fx-5(1.27 g), fx-6(0.387 g), fx-7(0.320 g), fx-8(0.232 g), fx-9(0.07 g), fx-10(0.04 g).

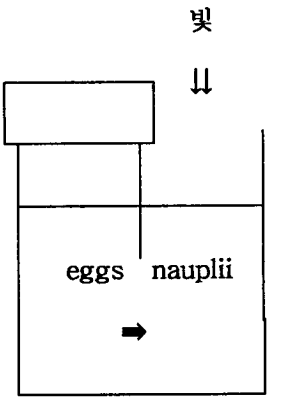
4. 3. 생리활성도 측정

4. 3. 1. 새우 치사율 검사(Brine shrimp assay)

1. Brine shrimp (*Artemia salina*)의 알을 소금물 (30 g/ℓ, 물의 온도는 대략 22 ℃~26 ℃를 유지, 소량의 yeast extracts 첨가)에 넣는다.

   *소금은 Sigma사의 sea salts를 사용, 물은 2차 이상의 증류수를 사용한다.

2. 알을 넣는 chamber는 칸막이로 분리하고 칸막이 아랫부분에 통로를 만들어 부화한 brine shrimp의 유충이 통과할 수 있도록 한다. 알을 넣은 compartment를 뚜껑으로 덮고 인조광 하에서 48시간 방치하면 부화된 brine shrimp의 유충은 헤엄 쳐서 밝은쪽으로 모이게 된다.



3. 검사시료를 준비한다.

   가) Test할 농도에 따라 10~30 ㎎을 준비한다.

   나) 준비한 시료를 10 ㎎/㎖ 의 비율로 시료가 잘 녹는 solvent에 용해시킨

다.(예를 들어 MeOH extracts는 MeOH로, $CHCl_2$ extracts는 $CHCl_2$로 용해시킴).

4. 각 시료에 대한 test sample은 농도에 따라 3개씩 만들고 상온에서 N_2 gas를 불어 solvent를 날리고 vacuum 하에서 다시 한번 완전하게 solvent를 제거한다.

   (test sample 농도는 시료가 30 ㎎ 일 경우에 이것을 3 ㎖의 solvent에 용해시킨 후 각각 1000 ppm은 500 ㎕, 100 ppm은 50 ㎕, 10 ppm은 5 ㎕ 씩을 넣는다.)

5. 준비된 각 test sample vial에 5 ㎖의 소금물을 넣고 용해시킨다. 잘 용해되지 않을 때에는 sonicator를 1~2분간 사용하거나 DMSO를 5 % 이내의 농도에서 첨가하여 용해시킨다.

6. control sample을 3개 준비한다 (control은 vial에 소금물만 넣은것).

7. 준비된 모든 vial에 부화된 새우를 10마리씩 넣은 후 24시간 후에 살아있는 개체 수를 센다.

8. Finney program에 의해 LD_{50}값을 계산한다. 조추출물의 경우에는 LD_{50}가 1000 ppm 이하이면 유의성이 있는것으로 간주한다.

4. 3. 2. DNA 절단 검사(DNA cleavage assay)

1. Supercoild DNA(Φx174 RFI DNA)를 Tris-acetate-EDTA buffer(1x)에 녹여 약 1500ng/50 ㎕의 농도가 되도록 조제하여 각각 test tube에 넣어 냉동고에 보관한다.

   (Tris-acetate-EDTA buffer(1x)은 stock solution(10x)를 희석시켜 사용함.)

2. 검사시 필요한 DNA는 1번에서 준비한 DNA 용액에 buffer 20 ㎕ (6x)를 넣는다.

3. 앞에서 준비한 DNA용액 5 ㎕와 검사 시료 5 ㎕(검사 시료의 농도는 통상 1000 ㎍/㎖ 에서부터 시작한다)를 혼합한다.

(검사시료는 1 ㎎을 준비하여 1 ㎖의 solvent에 녹인다. 이때 사용하는 solvent는 시료가 친수성이 있을때에는 buffer(1x)에 녹이고 친수성이 없을 때에는 10 % DMSO 에 녹인다.)

4. 혼합 용액을 incubator에서 37℃에서 5-6 시간 반응시킨다.

5. Ethidium bromide(1 %)를 함유한 0.7 % agarose gel을 준비한다.

(0.7 % agarose gel은 0.14 g의 agarose 분말을 20 ㎖의 buffer(1x)에 넣어 100 ℃의 끓는 물에서 중탕으로 완전히 용해시킨후 60 ℃의 oven에서 3-5 분가량 식힌다음 ethidium bromide를 10 ㎕ 넣어준다.)

6. 준비된 agarose 용액을 mold에 고르게 부어 40분정도 굳힌다.

7. 반응 혼합액을 agarose gel에 loading 한 후 Tris-acetate-EDTA buffer에서 1 시간 동안 (100V, 60mA) 전기 영동한다.

8. 전기 영동 후 agarose plate를 UV 365㎚에서 관찰하고 polaroid film으로 기록한다.

9. Positive control로서는 bleomycin을 사용한다.

10. 모든 glassware 및 용기는 사용전에 autoclave로 멸균한다.

4. 3. 3. 항미생물 검사(Antibiotic activity assay)

1. Activity test용 균주들(*Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Candida albicans*)을 액체배지에 접종하여 24시간 동안 25 ° C 진

탕배양기에서 배양한다.

2. 미리 준비된 고형배지에 멸균된 면봉을 가지고 액체배지에 키운 균주들을 도말한다.
3. Paper disc를 균주들을 도말한 고형배지 위에 올려 놓는다.
4. Test sample들을 알맞은 유기용매에 녹여 100 ㎕ eppendorf pippet으로 4회에 걸쳐 25 ㎕씩 paper disc에 분주한다.
5. 25 ° C 배양기에서 2일간 배양한다.
6. 고형배지에 도말한 균주에 성장억제 zone의 형성을 관찰하고, zone이 형성된 정도를 자를 가지고 측정한다.

4. 3. 4. 세포독성능 검사

물층 시료는 PBS(phosphate buffered saline)에 n-BuOH층 시료는 메탄올에 녹여 5 ㎕ 농도로 첫 반응을 시켰으며 3차에 걸쳐 10씩 희석시켜 사용하였다. 세포독성능의 측정은 Carmichael등의 MTT(methyl tetrazolium bromide) 측정법을 수정하여 사용하였다. 시료의 암세포 독성능을 측정하기 위하여 96 well plate에 대수기에 도달한 P388D1 cell(2 x 10^4 cells/ml)과 DLD-1(4 x 10^4 cells/ml)을 100 ㎕씩 접종하고 조추출물 시료를 각각 10배 연속 희석하여 100 ㎕씩 접종하고 조추출물 시료를 각각 10배 연속 희석하여 100 ㎕씩 접종하여 최종 volume이 200 ㎕가 되게 한 후 37 ℃에서 5% CO_2 농도의 항온기에 5일 간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 증류수에 녹인 MTT용액(1.1 mg/ml)을 50 ㎕씩 각각의 well에 넣어 주고 나서 최적반응 4시간 동안 37 ℃의 CO_2 항온기에 더 배양시켰다. 그 후 상등액을 버리고 150 ㎕의 dimethyl sulfoxide를 넣고 5분 동안 흔들어 formazon crystal을 잘 용해시킨 뒤 발색정도를 관찰하여 세포독성능을 판단하였다.

세포배양을 위해서 실험에 사용된 세포인 DLD-1, P388D1은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 kanamycin 20 ㎍/ml이 들어 있는 RPMI 1640 배양액을 사용하여 25 cm^2 flask에 넣어 37 ℃, 5% CO_2가 유지되는 항온기에 배양하였다. 세포독성능 측정시 P388D1은 대수기의 세포를 1500 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, PBS(-)로 1번 씻은 후에 새로운 배양액에 2 x 10^4 cell/ml로 부유시켜 사용하였으며 DLD-1의 경우는 대수기에 monolayer를 이루도록 배양시키다가 0.25% trypsin-EDTA solution으로 세포를 부유시키고 1500 rpm으로 5분동안 원심시킨 후 RPMI 1640 배지로 1번 씻은 후에 4 x 10^4 cell/ml로 부유시켜 사용하였다.

4. 3. 5. 림프구(Lymphocyte)에 대한 독성 조사

Mouse의 spleen에서 lymphocyte를 추출하여 물질의 정상세포에 대한 세포독성 양상을 조사하였다. Mouse의 배를 절개한 후 spleen을 채취하여 PBS와 함께 hand homogenizer로 부드럽게 갈아서 gause로 거른다. 2000 rpm, 4분, 4-10 ℃ 조건에서 원심분리 하였으며 최종 침전물을 RPMI-1640 혹은 D-MEM 배지로 희석하여 2-5 x 10^6 cell/ml 농도가 되도록 하여 실험에 사용하였다. 96-well microplate에 먼저 시료를 10 ㎕씩 넣은 다음 lymphocyte 현탁액을 100 ㎕씩 넣어 37 ℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 MTT를 50 ㎕씩 첨가하여 4시간 더 반응시켰다. 양성 대조군으로는 방선균 630-A 균체의 methanol 추출액을, 음성대조군으로는 PBS를 넣어 주었다. 상등액을 제거한 후 150 ㎕의 DMSO로써 formazone을 녹여서 490 nm에서 OD를 측정하였다.

4. 3. 6. Haemolytic activity assay

물질의 적혈구 용해도를 측정하기 위해서 mouse로부터 혈액을 채취하여 96-well microplate에서 반응시켰다. Mouse의 목을 잘라서 혈액을 얻은 다음 PBS로 3회 씻는다. 2000 rpm에서 4분 동안 원심분리하였으며 최종 침전물은 약 50% erythrocyte가 된다. 96-well microplate의 각 test well에 먼저 시료를 20 ㎕씩 넣은 다음 PBS로 희석한 1% erythrocyte 현탁액을 200 ㎕씩 넣는다. 양성 대조군으로 방선균 630-A 균체의 methanol 추출액을 사용하였으며 음성 대조군으로 PBS를 사용하였다. 30 ℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 육안 관찰시 시료가 용혈활성을 나타내면 적혈구가 용해되므로 투명한 상태가 되고, 용혈활성을 나타내지 않는 경우에는 적혈구가 well의 바닥에 침전되어 불투명하게 보인다. Microplate reader에서는 490 nm에서 OD를 측정하였다.

제 5 장 결 론

5. 1. 결과 및 토의

5. 1. 1. TLC 분석

각 시료들은 유기용매를 이용해서 추출한 후에 이 추출물들을 n-butanol과 물층으로 나누고 n-butanol층에서 얻어진 잔류물들은 TLC plate상에서 분석되었다. 용출용매는 n-hexane과 ethyl ether의 혼합액(v:v=50:50) 및 100% ethyl ether를 사용하였다. TLC plate용 spraying agent는 anisaldehyde-sulfuric acid 혼합액을 사용하였으며 열에 구워서 나타나는 spots를 관찰하였다. 모든 추출물이 여러 개의 흥미 있는 spots를 나타내어 천연물이 존재할 가능성이 큰 것을 보여 주었다. 특히 본충 시료인 P94-2 및 -3은 n-hexane과 ethyl ether(v:v=50:50)의 혼합액을 용출용매로 사용했을 때 Rf 0.3에서 매우 강력한 spot을 나타 내어 특이한 천연물의 존재 가능성을 나타냈다.

시료번호 P94-1의 유기 추출물을 n-butanol과 물층으로 분배한 후에 n-butanol에서 얻어진 잔류물의 일부를 silica vaccum flash chromtography에 의하여 모두 18개의 분획으로 나누었다. 용출용매는 100% 헥산에서 시작하여 에틸아세테이트의 양을 5% 씩 증가시켜 70% 헥산/에틸아세테이트까지 사용하였으며 추가적으로 100% 에틸아세테이트, 아세톤, 메탄올을 사용하였다. 이 분획들 역시 위 조추출물들과 동일한 용출용매를 사용하여 TLC plate 분석을 시도하였다(Fig. 5-1~-2).

이 분획들이 TLC plate상에서 얻어진 spots를 잘 살펴 보면 #1-9까지의 분획은 주로 지방산 에스테르와 스테로이드를 함유하고 있는 것으로 생각되며, #10-16

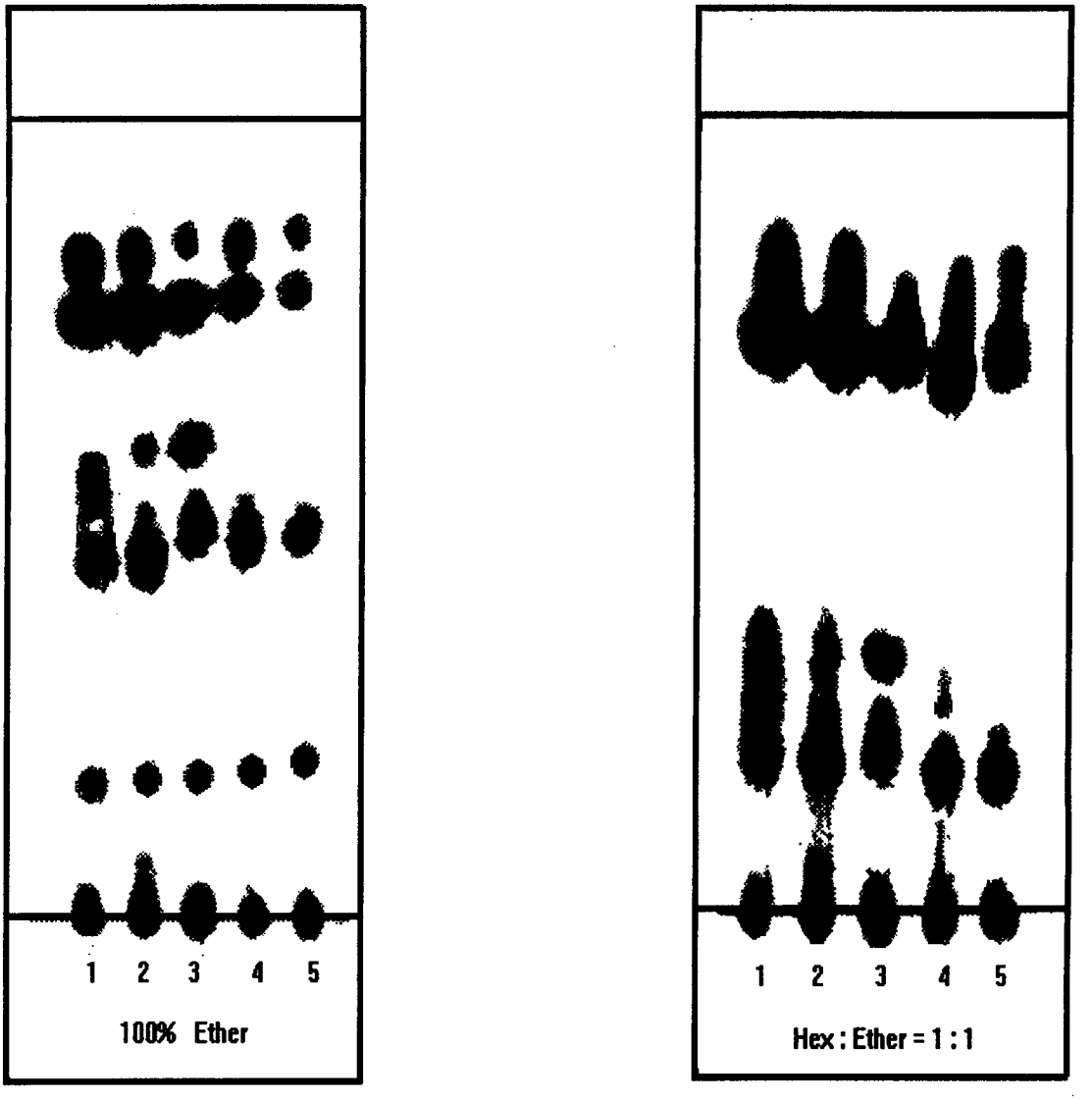
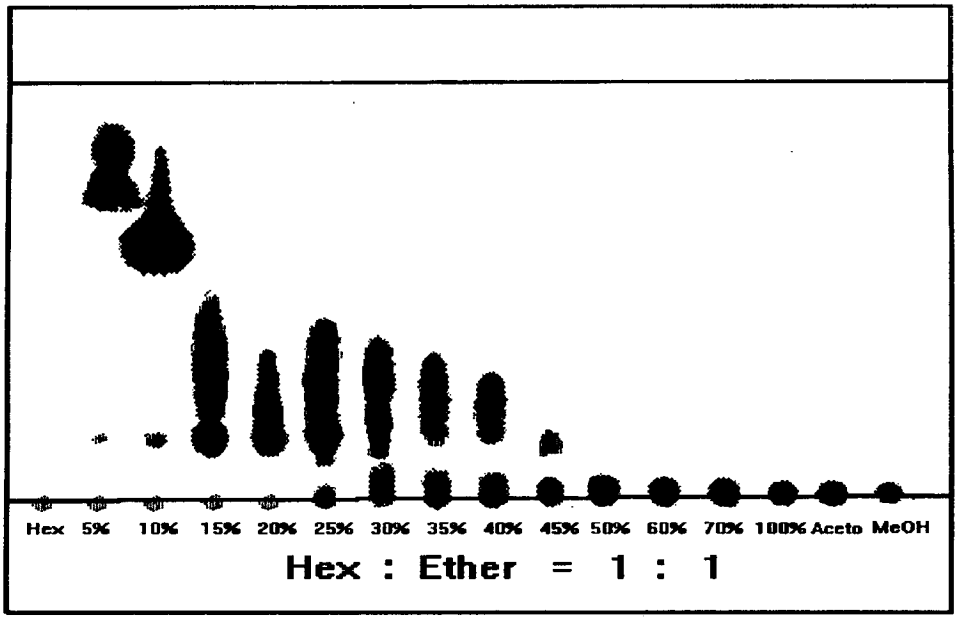


Fig.5-1. Results of silica thin layer chromatographic analysis of the organic extracts from the polychaetes, which were developed under a 1:1 mixture of n-hexane and ethyl ether, and 100% ethyl ether, respectively. Numbers 1-5 denote sample p94-1, p94-2, p94-3, p94-4, and p94-5.



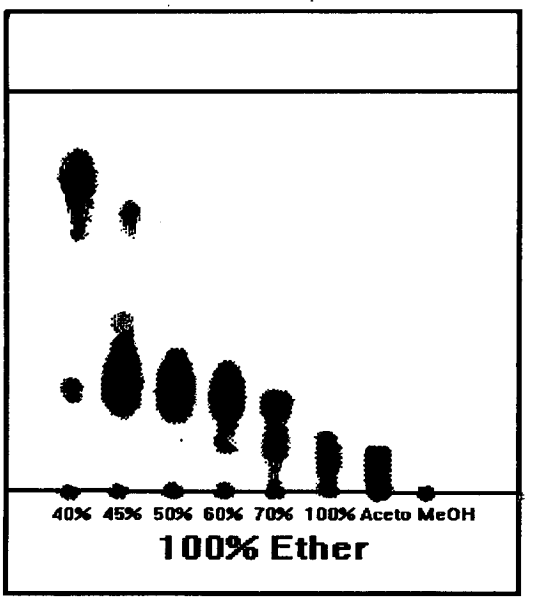


Fig.5-2. Results of silica thin layer chromatographic analysis of the fractions separated by flash vacuum silica chromatography, which were developed under a 1:1 mixture of n-hexane and ethyl ether, and 100% ethyl ether, respectively. Percentage ratio means volume of ethyl acetate to hexane.

분획의 경우에는 Rf 0.2와 0.1(용출용매: 100% ethyl ether)에서 특이한 spots이 나타난 것으로 보아 흥미 있는 2차 대사물질일 가능성이 큰 것으로 보인다.

5. 1. 2. 핵자기 공명 스펙트럼 분석

네 지역에서 채집한 갯지렁이의 추출물을 n-BuOH과 물층으로 partitioning한 후에 용매를 제거하고 남는 잔류물을 500 MHz proton NMR로 분석하였다(Fig. 5-3~-12). 먼저 n-BuOH층에서 얻어진 추출물의 분광 스펙트럼을 잘 분석해 보면 5.4, 2.8, 1.4, 0.9 ppm에 나타나는 피이크들을 보아 다량의 포화 및 불포화 지방산이 다량으로 함유되어 있음을 알 수 있다. 그러나 3-4 ppm, 7-8 ppm 사이를 잘 살펴 보면 모든 시료가 지방산만 포함하고 있는 것이 아니라 다른 대사물질들이 포함되어 있을 가능성을 확인할 수 있다.

물층에서 얻어진 추출물의 proton NMR 스펙트럼은 Fig. 5-8~-12에서 보여진 것처럼 6-9 ppm 사이에 뚜렷한 피이크들을 보여 주고 있다. Proton NMR spectrum에서 이 지역은 방향족 혹은 이중결합에 해당하는 신호들의 영역으로서 새로운 천연물의 존재 가능성을 분명하게 제시해 주고 있다.

위에서 언급한 시료번호 P94-1의 n-butanol층에 대한 silica vacuum flash chromatography 실시 결과 얻어진 18개의 분획 또한 NMR spectrum 분석을 시도하였다(Fig. 5-13~-28). 각 분획의 proton NMR 스펙트럼을 측정한 결과 100% 헥산과 5% 및 10 % 에틸아세테이트/헥산 분획은 포화 및 불포화 지방산을 대량 함유하고 있는 것으로 여겨졌으며 15-30 % 에틸아세테이트/헥산 분획은 지방산과 스테로이드의 혼합물로 생각되는 피이크들을 보여 주었다. 30% 에틸아세테이트/헥산에서부터 100% 에틸아세테이트에 걸쳐 나온 분획들은 모두 3-5 ppm 사이에 proton 신호들을 보여 주었으며 분획에 따라서는 0.5-0.7 ppm 그리고 6-7 ppm에서

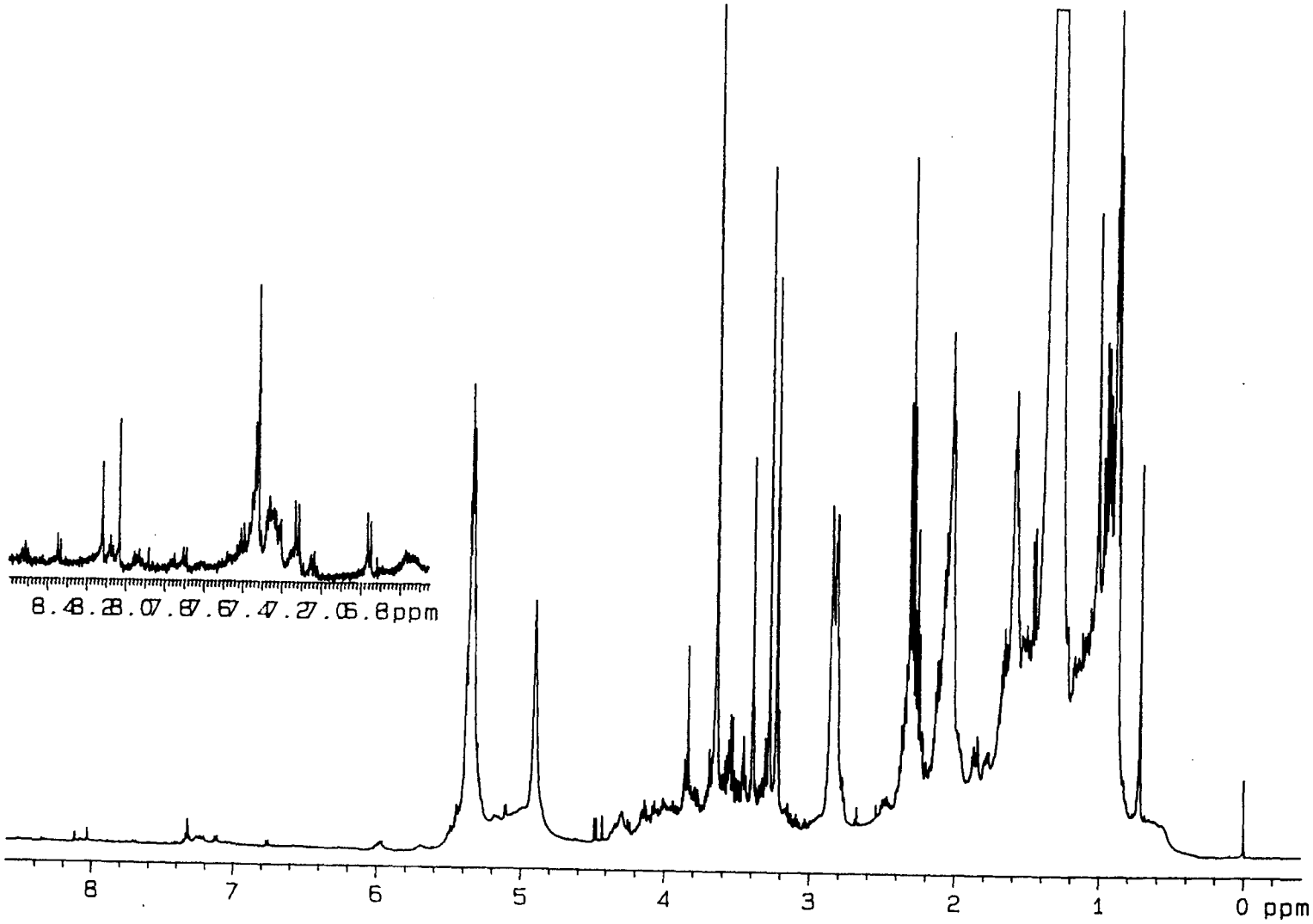


Fig. 5-3. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-1

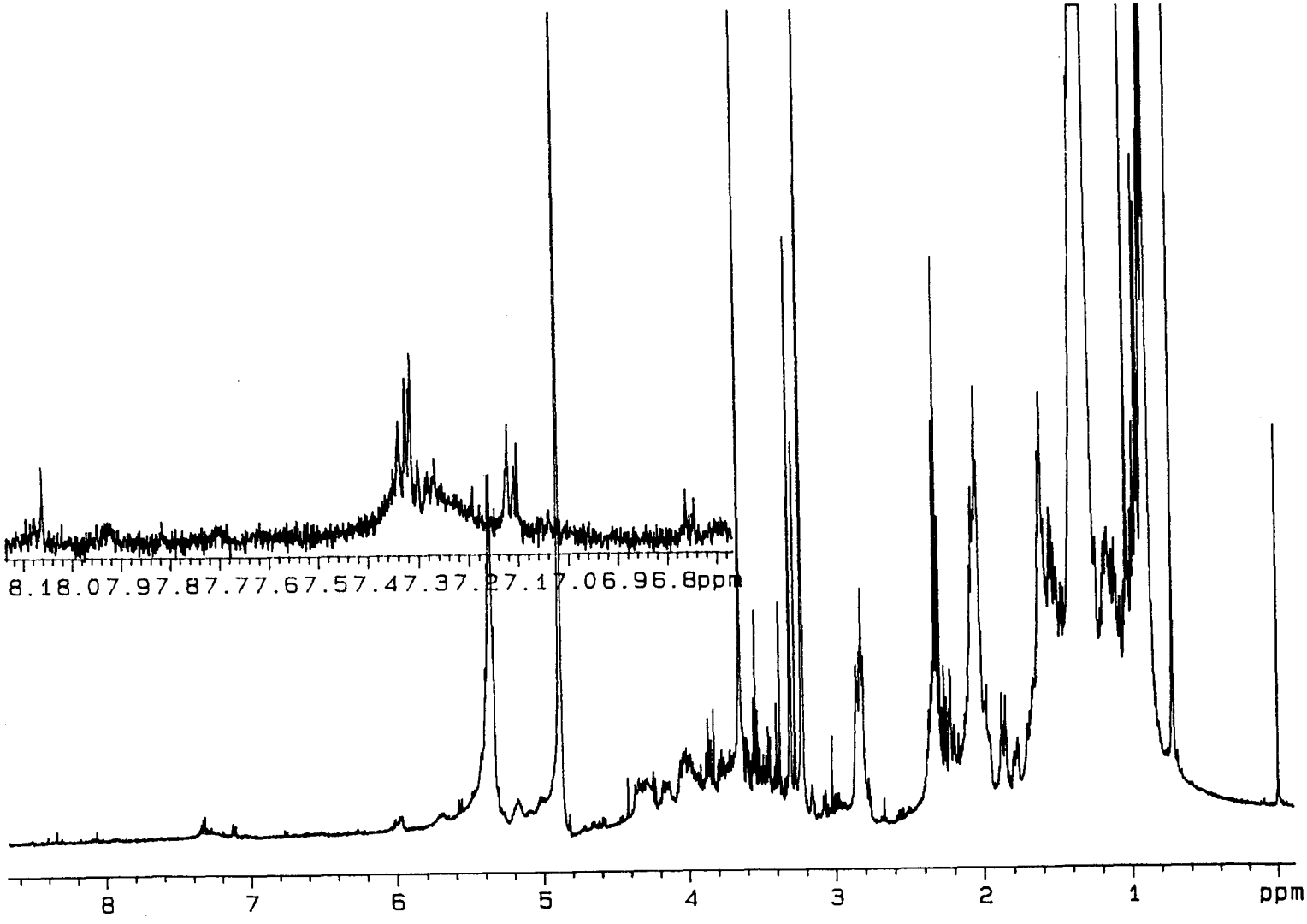


Fig. 5-4. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-2

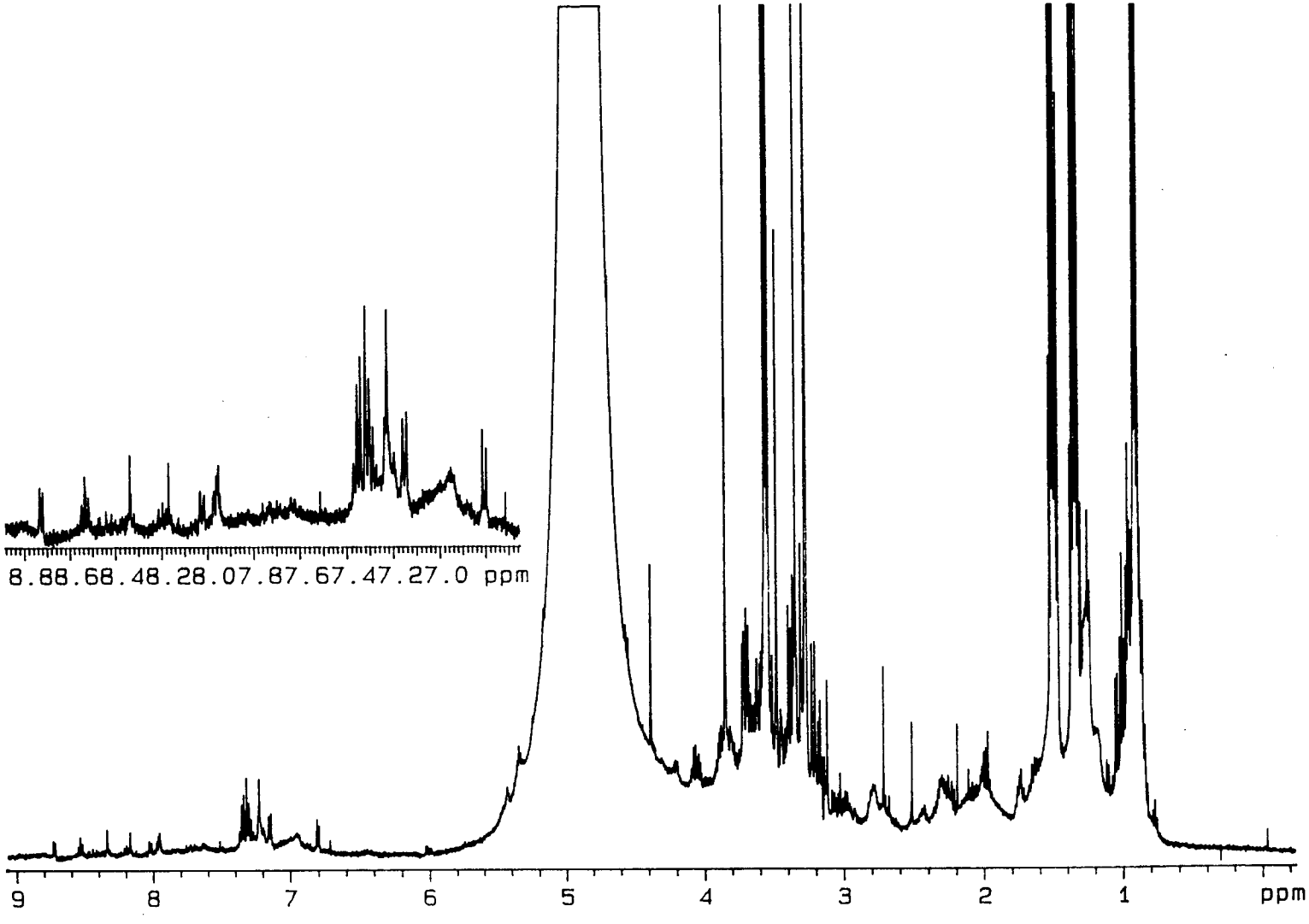


Fig. 5-5. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-3

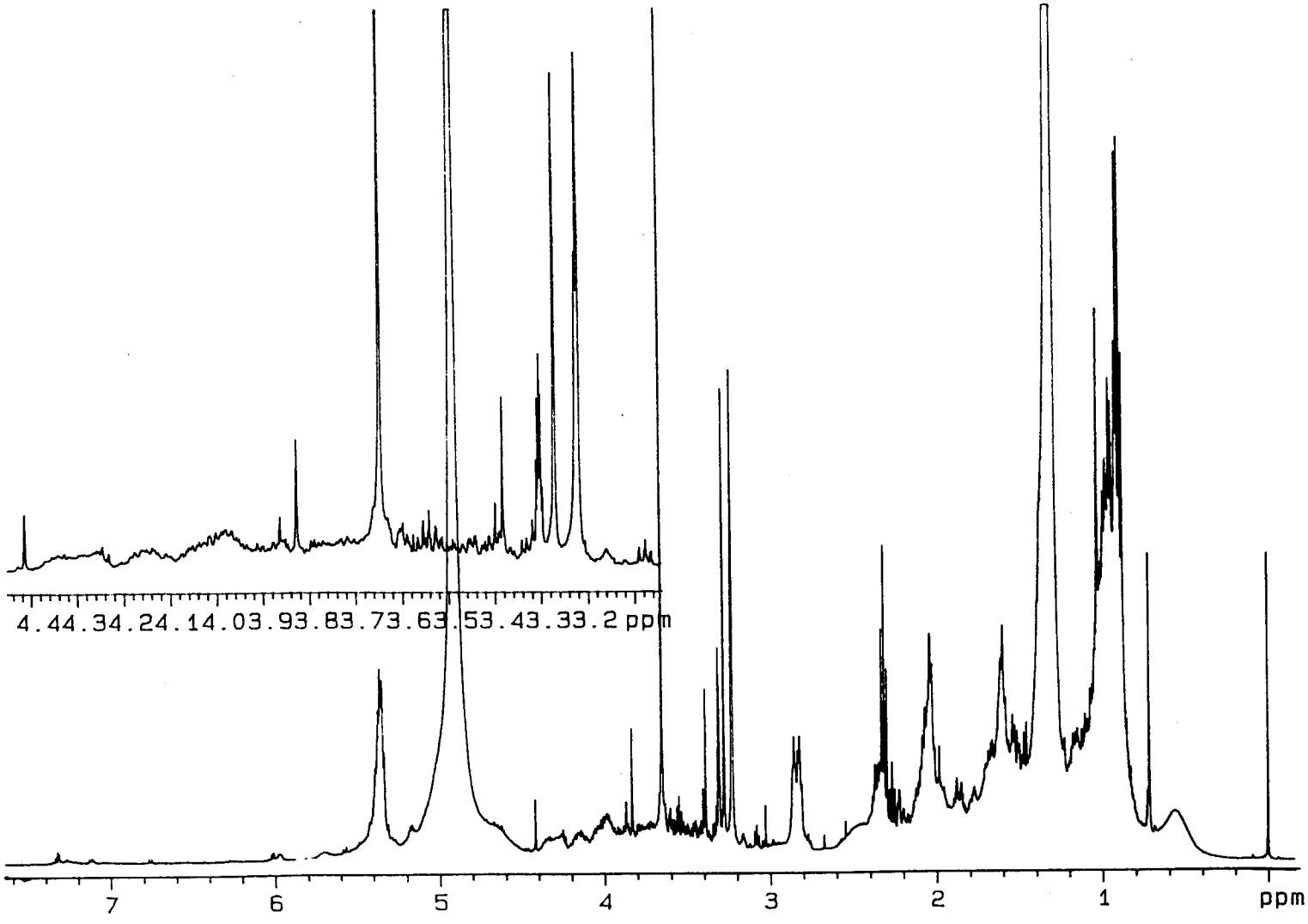


Fig. 5-6. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-4

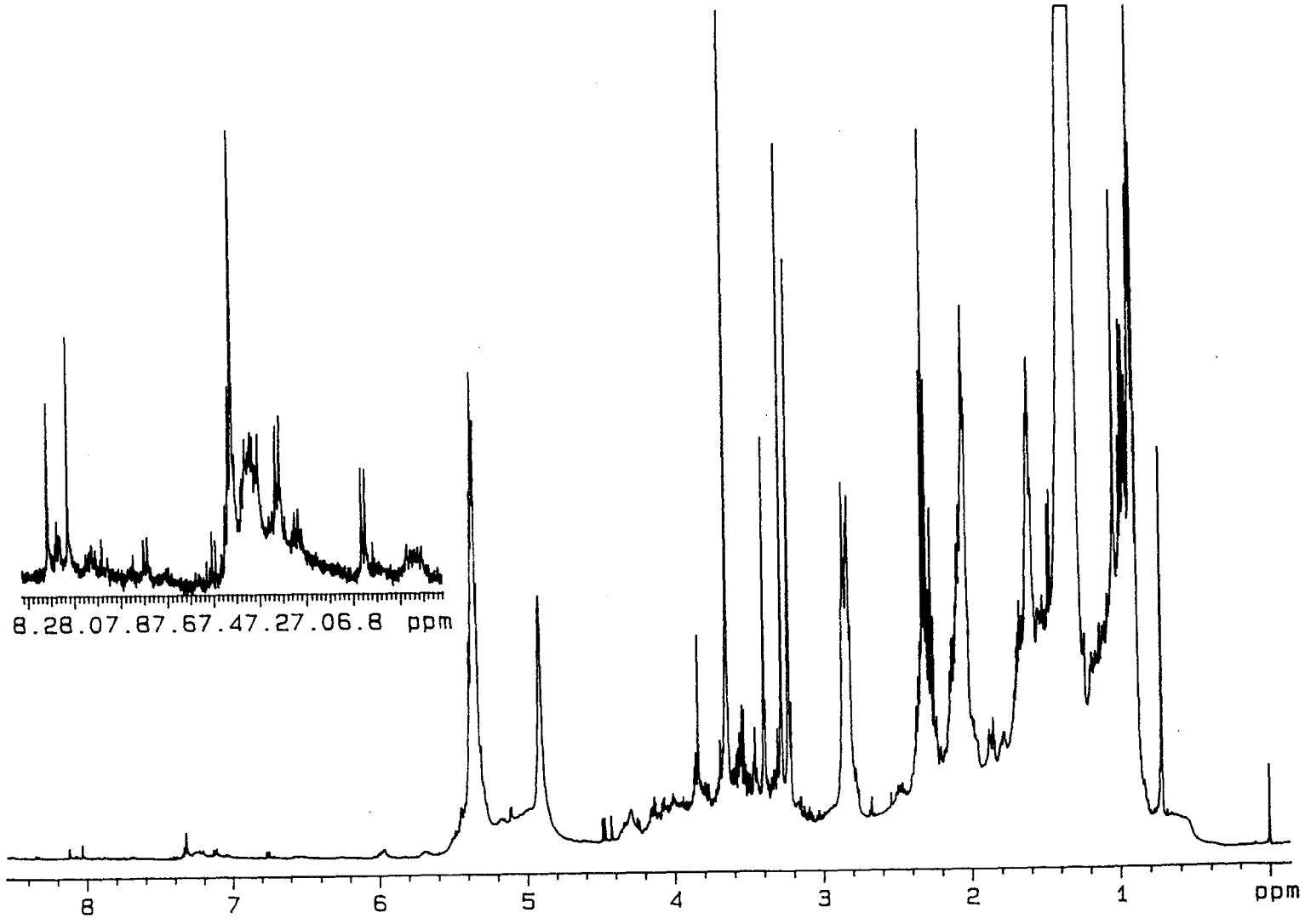


Fig. 5-7. Proton NMR spectrum of the residue obtained from n-BuOH layer of sample P94-5

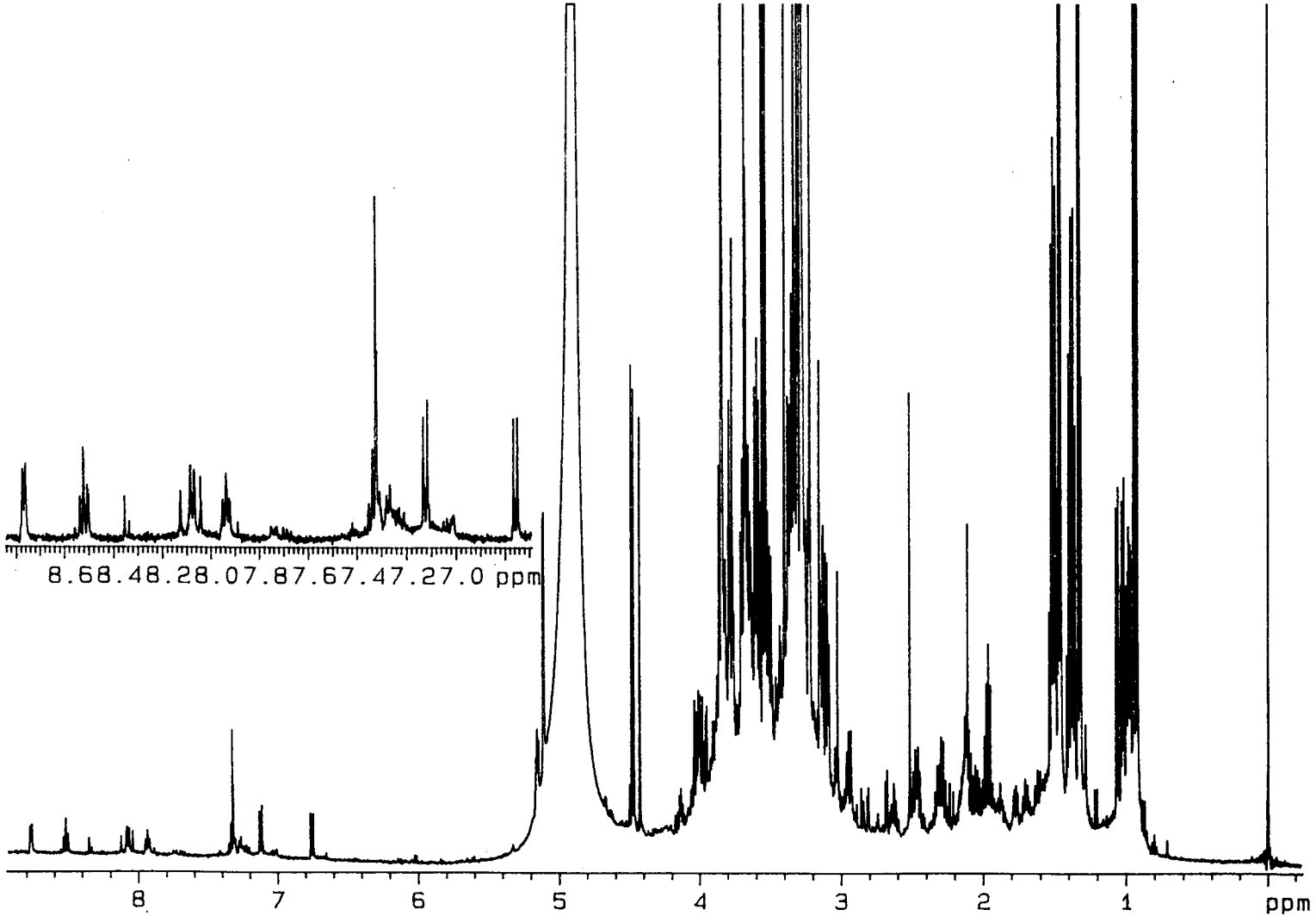


Fig. 5-8. Proton NMR spectrum of the residue obtained from aqueous layer of sample P94-1

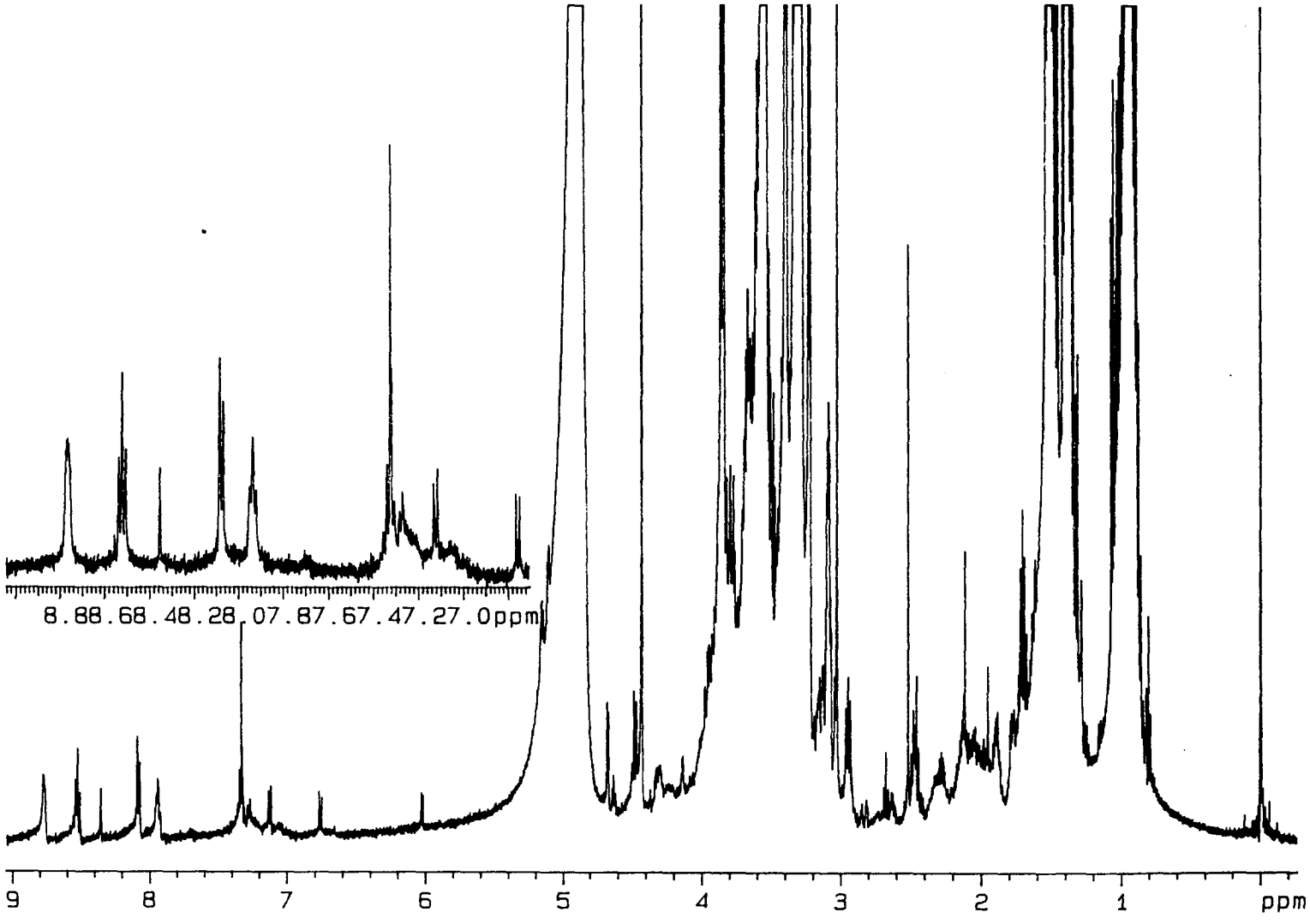


Fig. 5-9. Proton NMR spectrum of the residue obtained from acqueous layer of sample P94-2

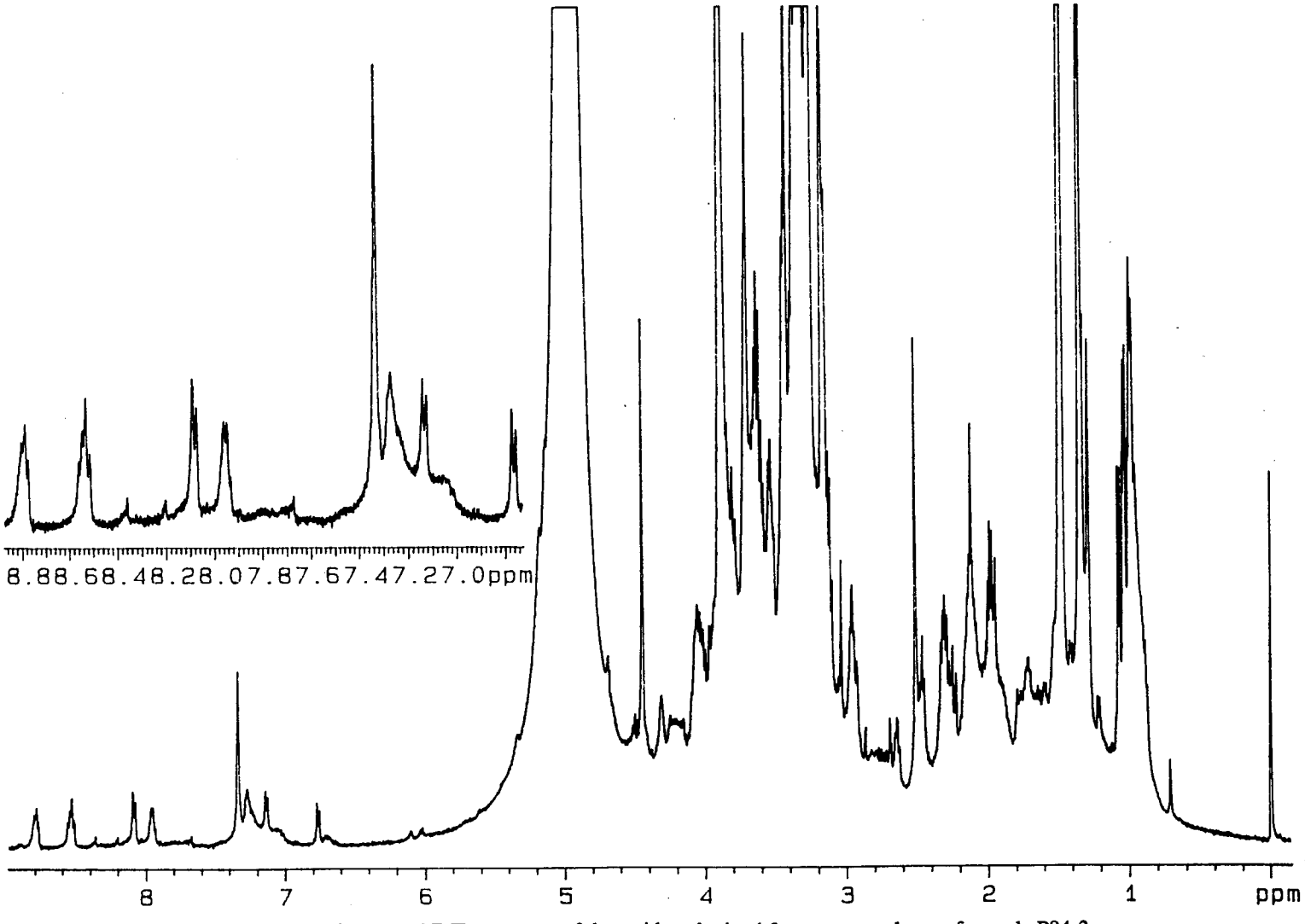


Fig. 5-10. Proton NMR spectrum of the residue obtained from aqueous layer of sample P94-3

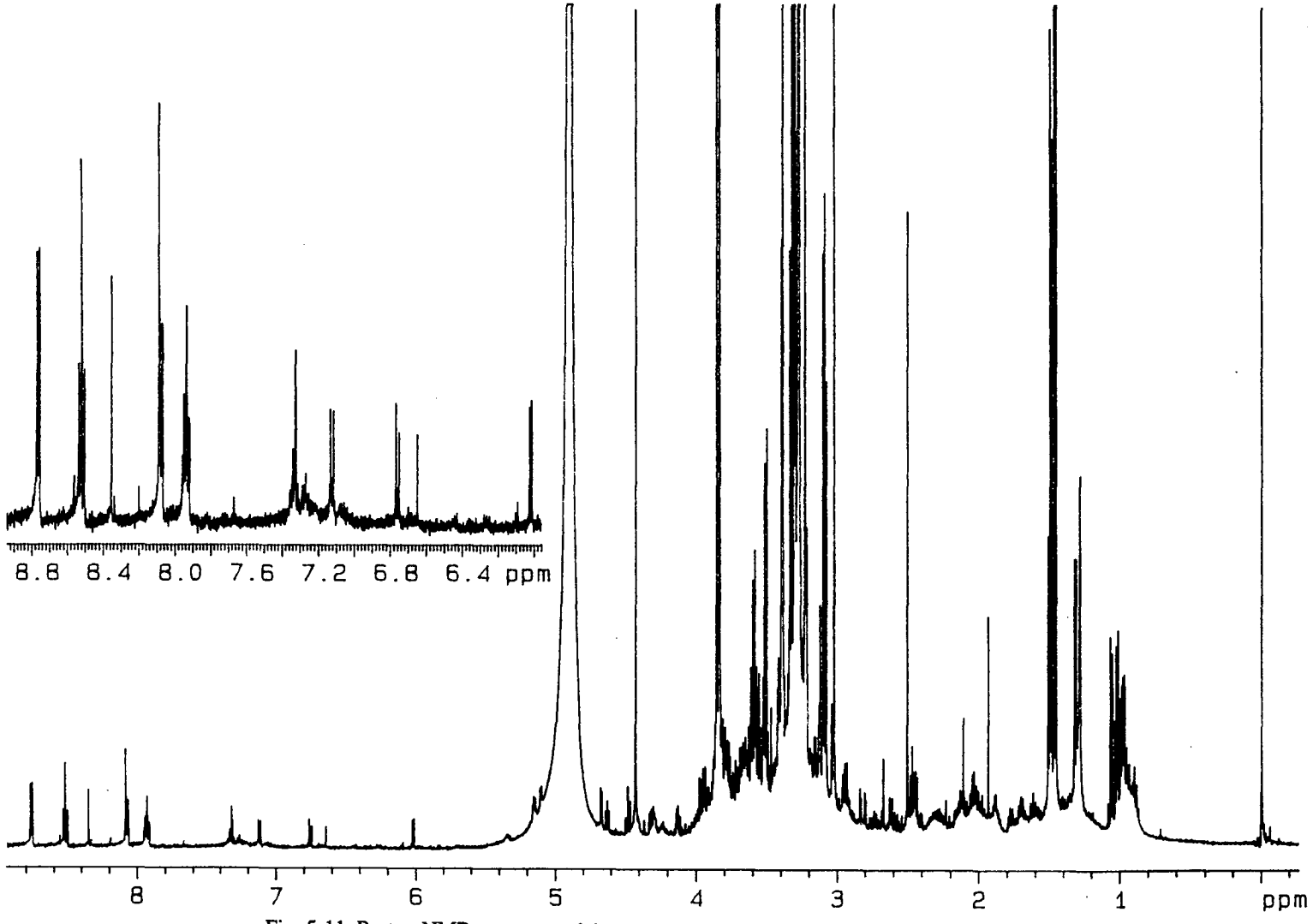


Fig. 5-11. Proton NMR spectrum of the residue obtained from aqueous layer of sample P94-4

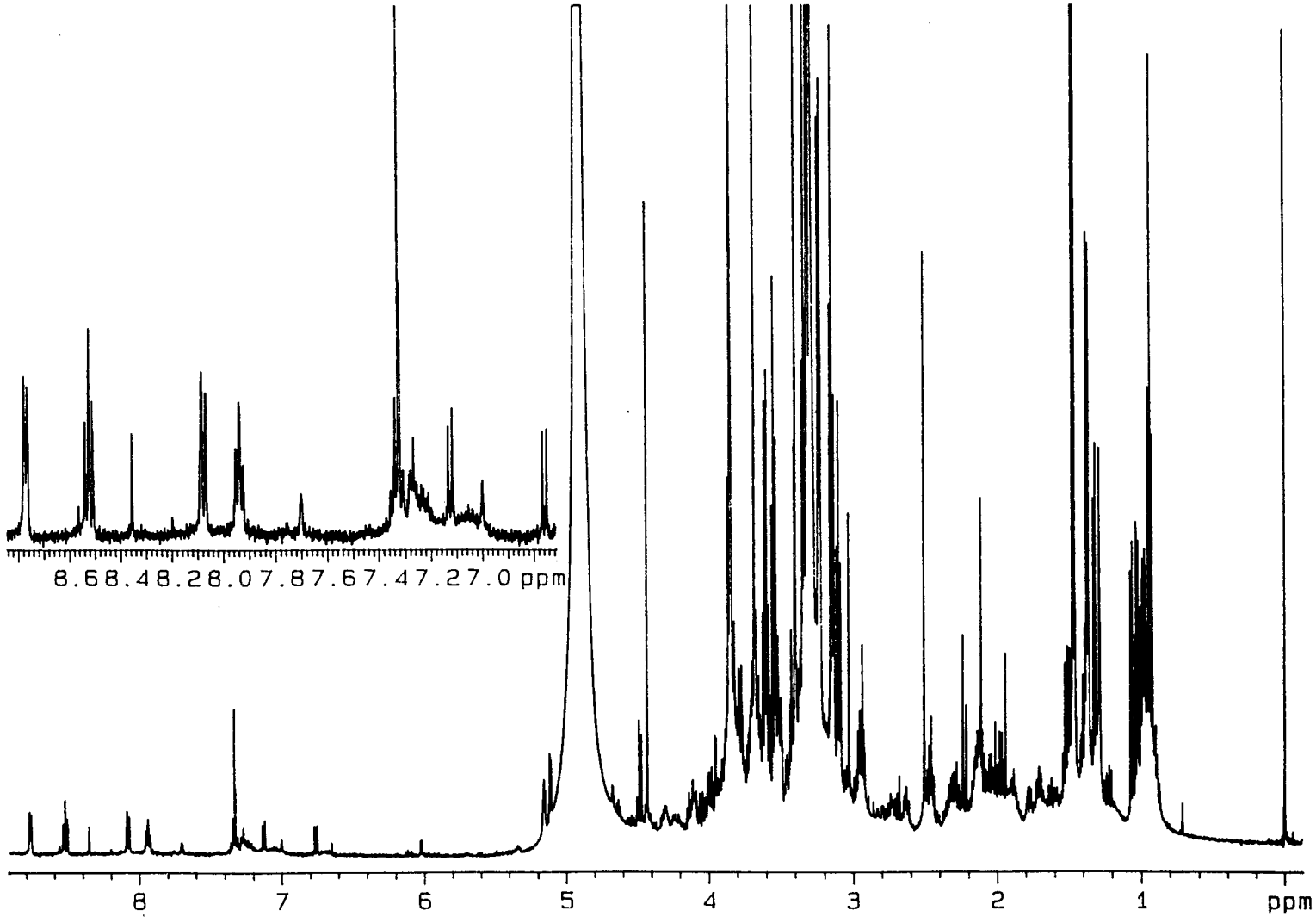


Fig. 5-12. Proton NMR spectrum of the residue obtained from aqueous layer of sample P94-5

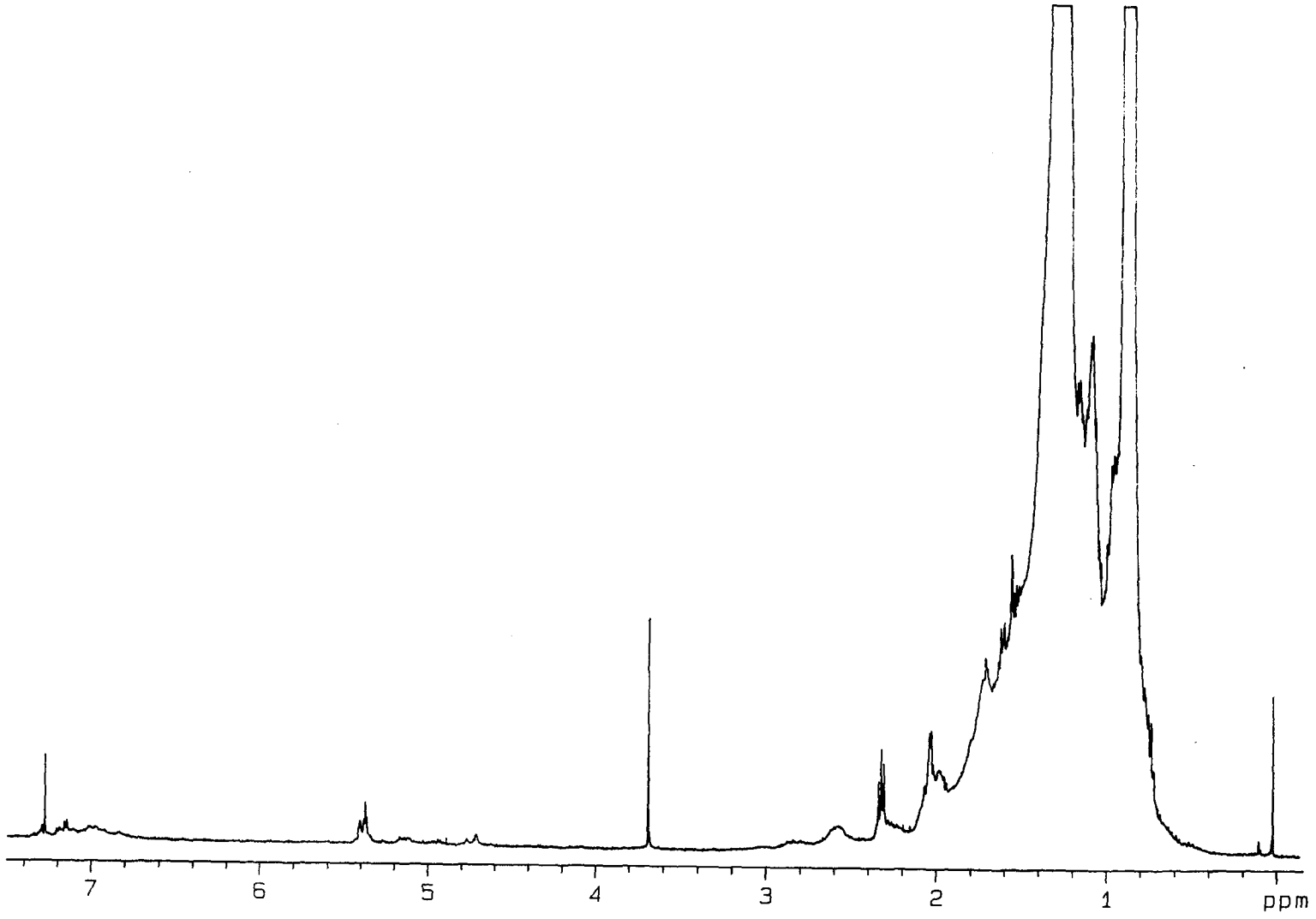


Fig. 5-13. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #1 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

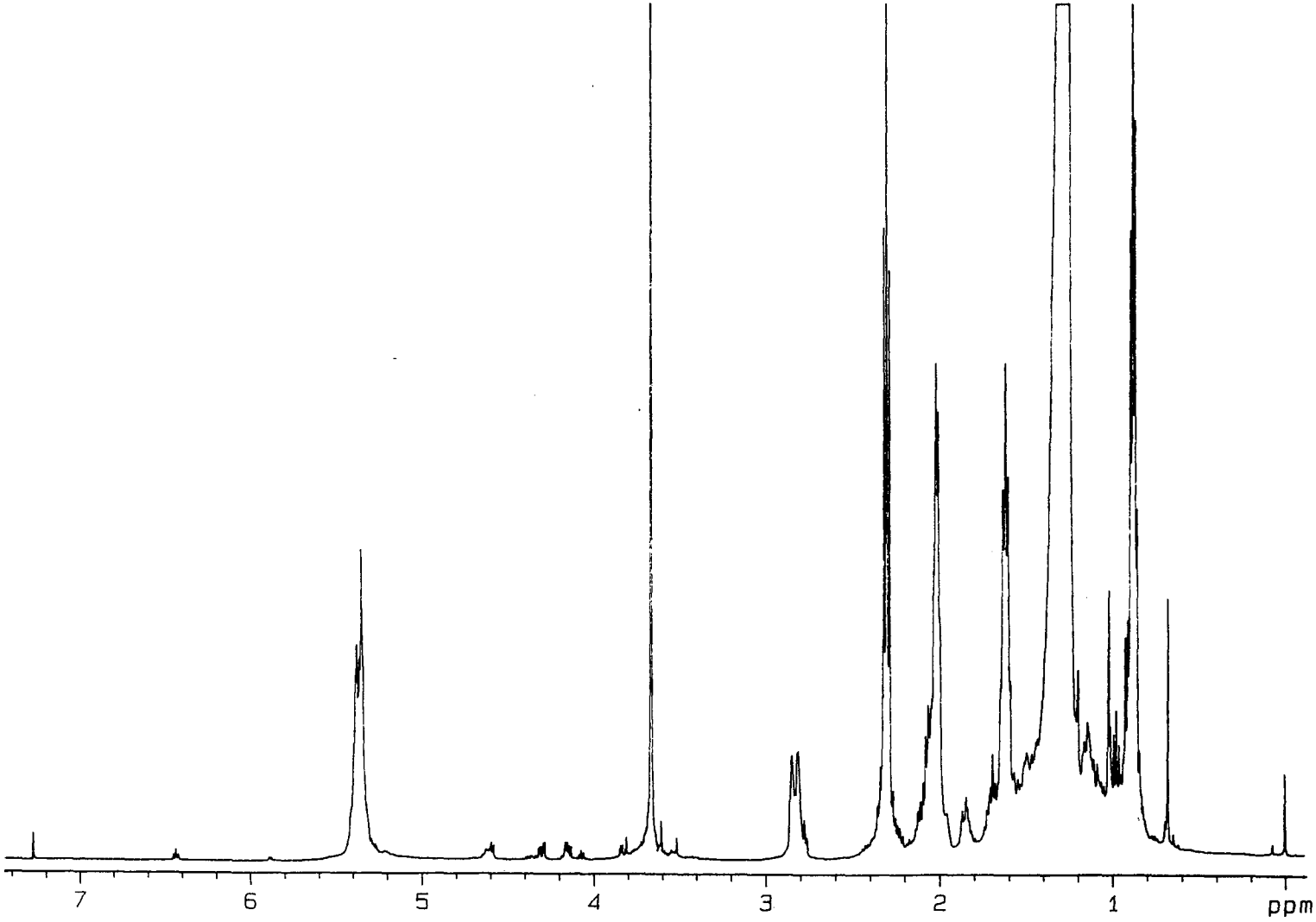


Fig. 5-14. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #2 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

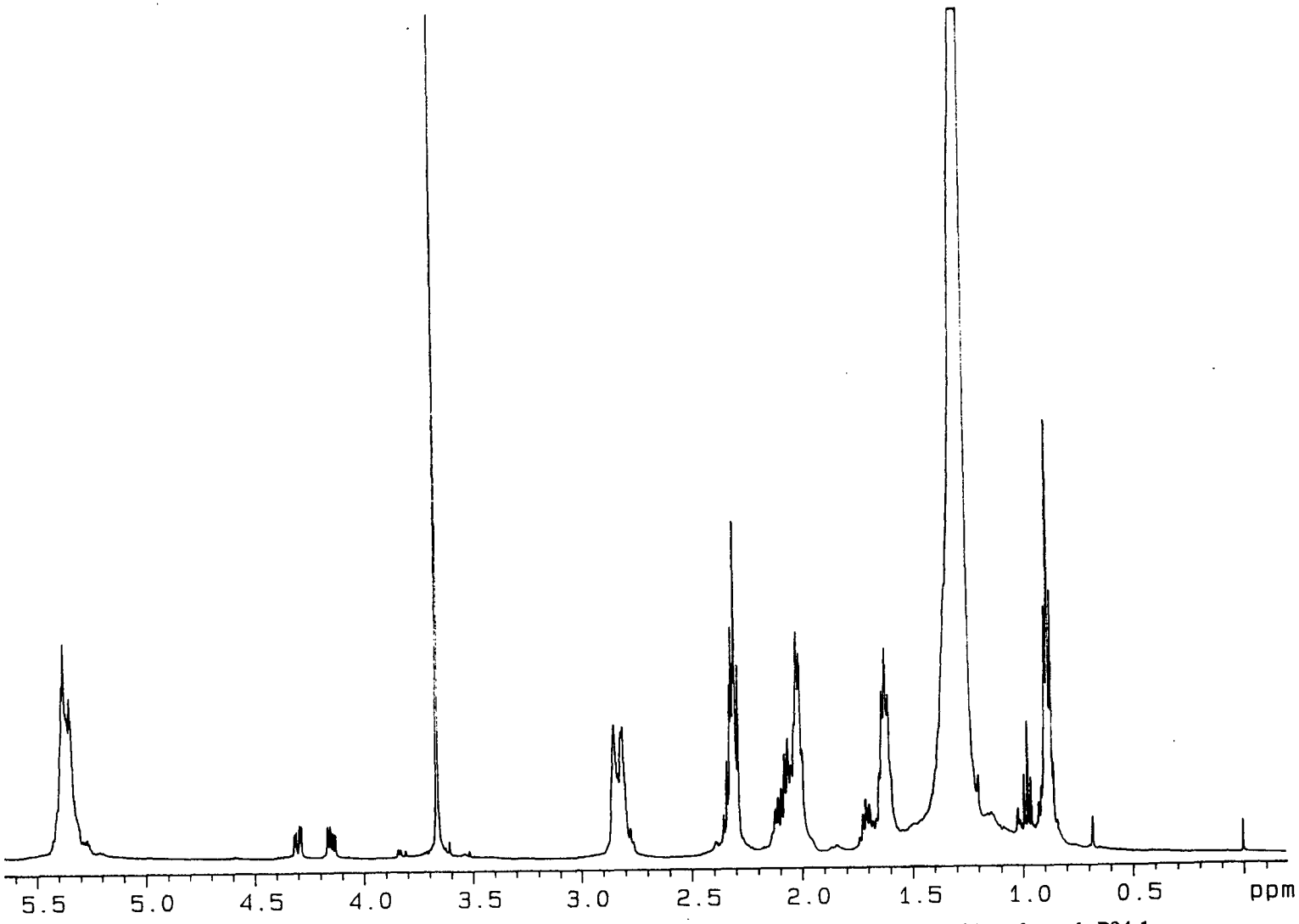


Fig. 5-15. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #3 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

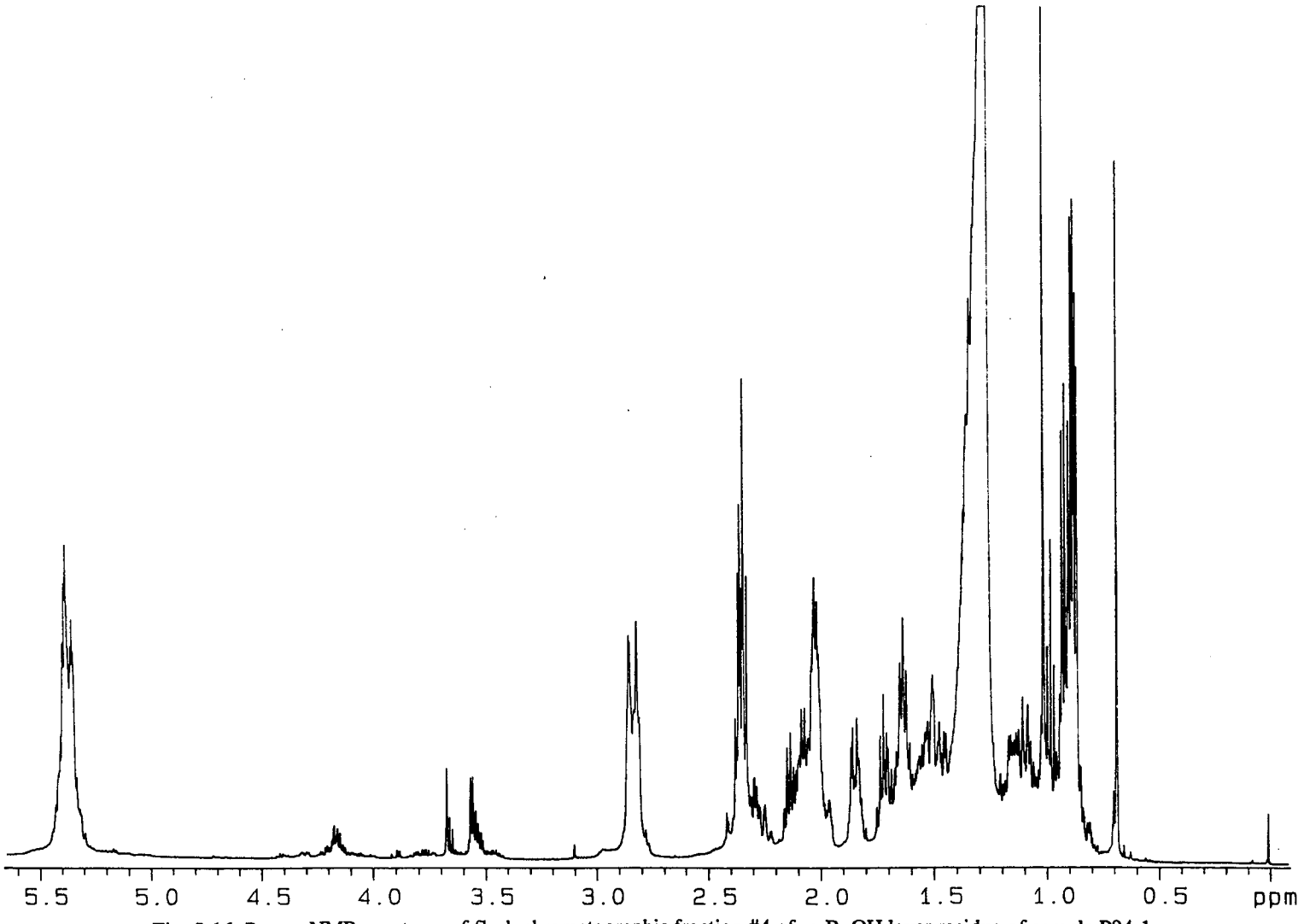


Fig. 5-16. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #4 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

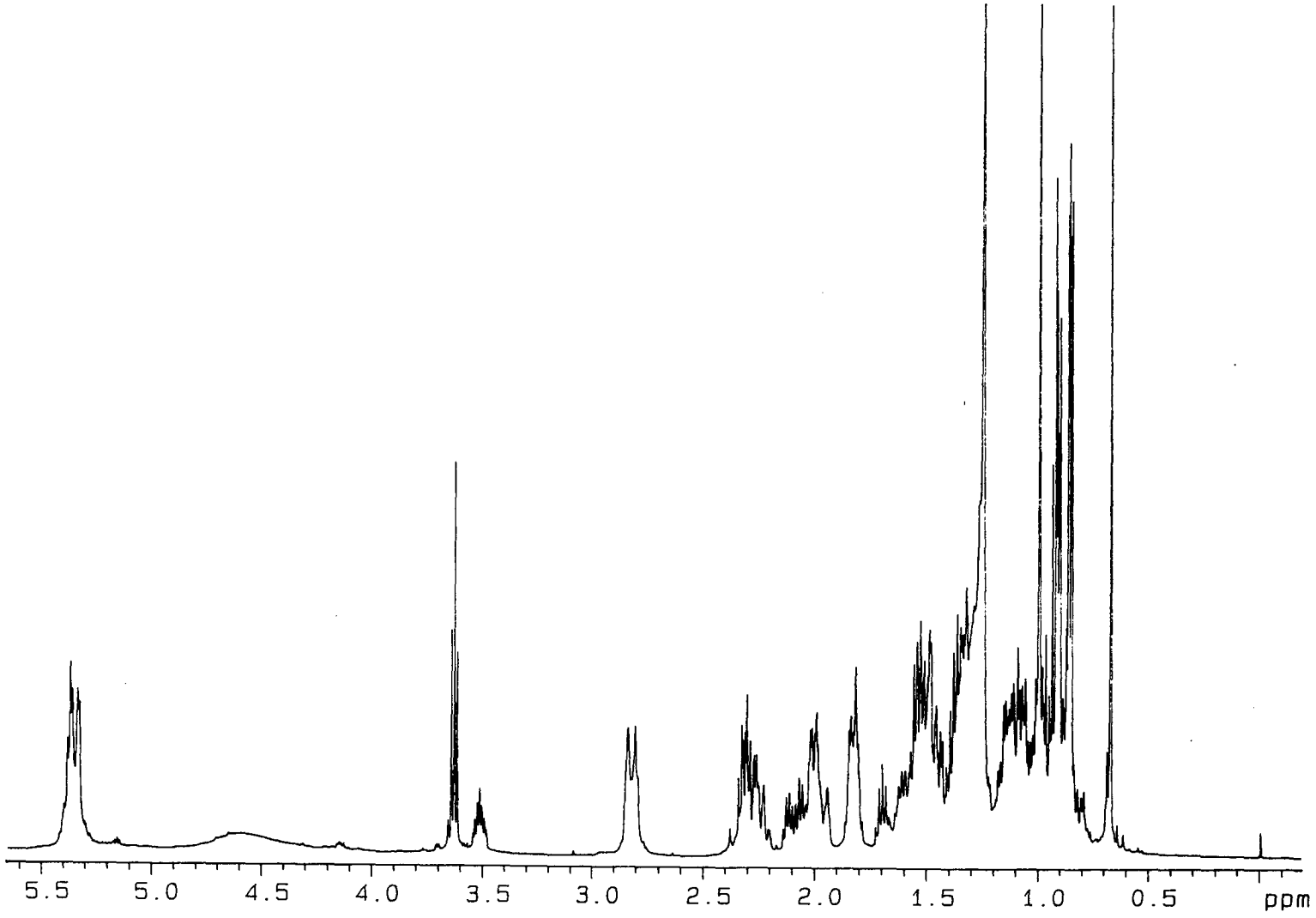


Fig. 5-17. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #5 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

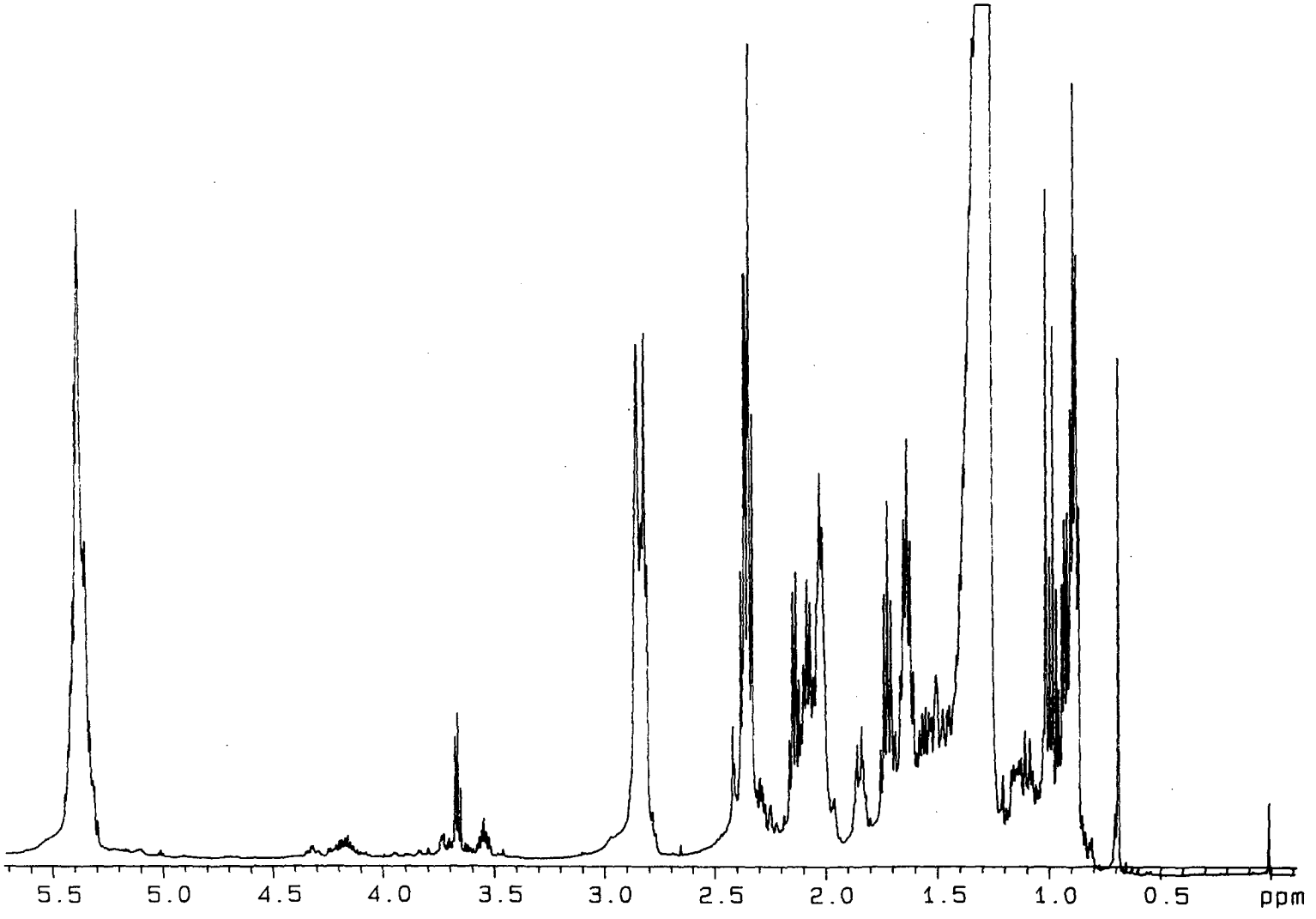


Fig. 5-18. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #6 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

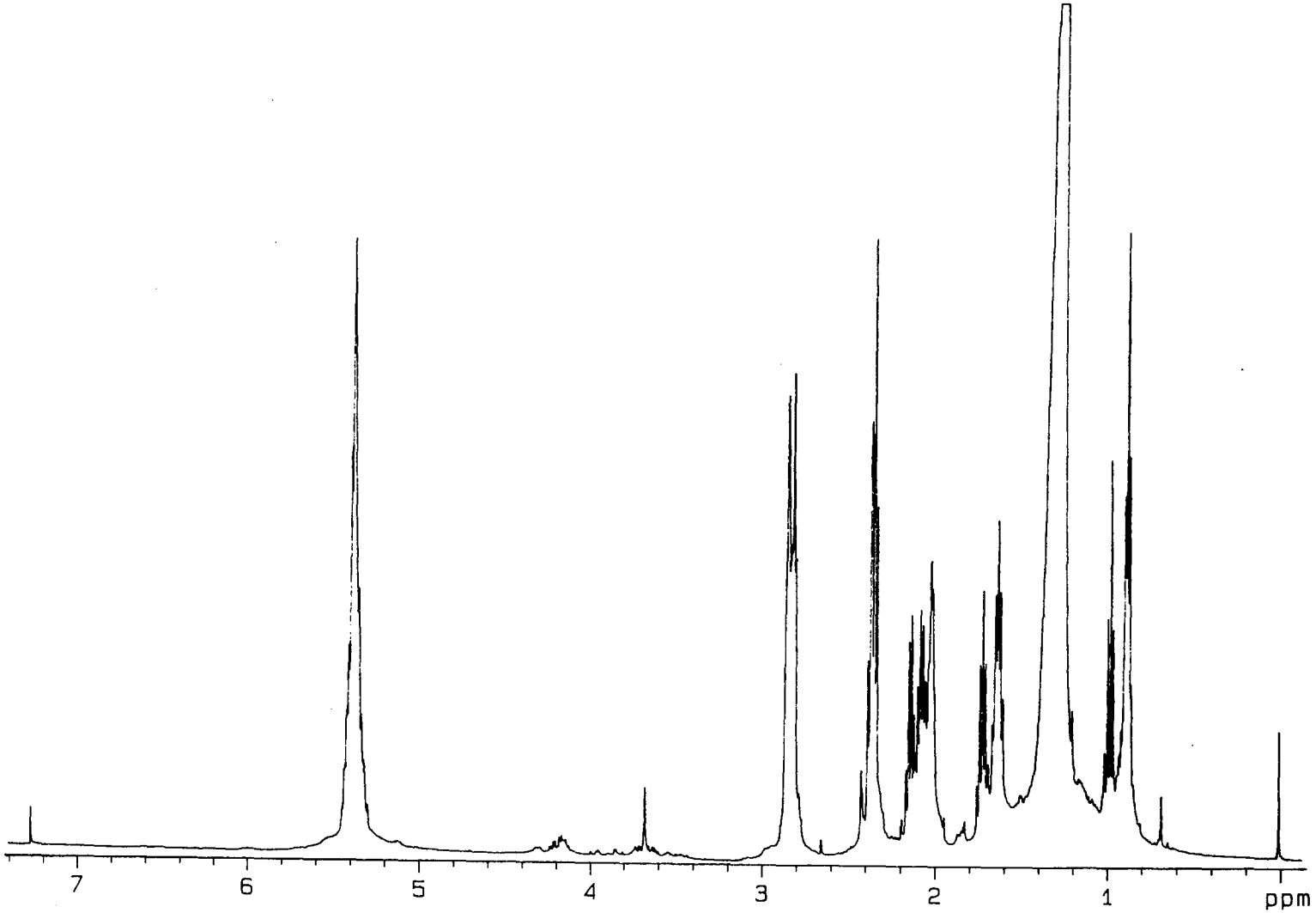


Fig. 5-19. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #7 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

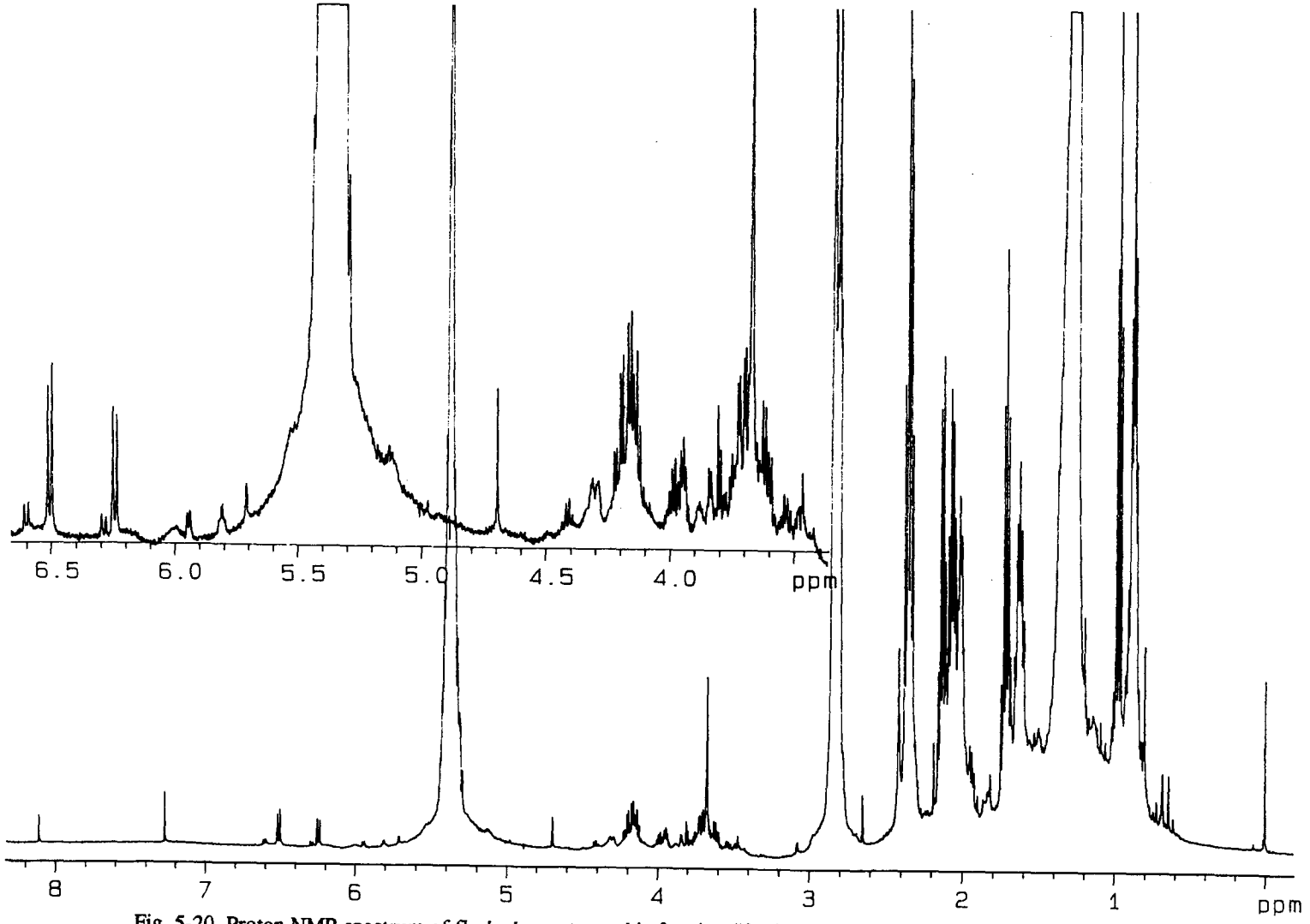


Fig. 5-20. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #8 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

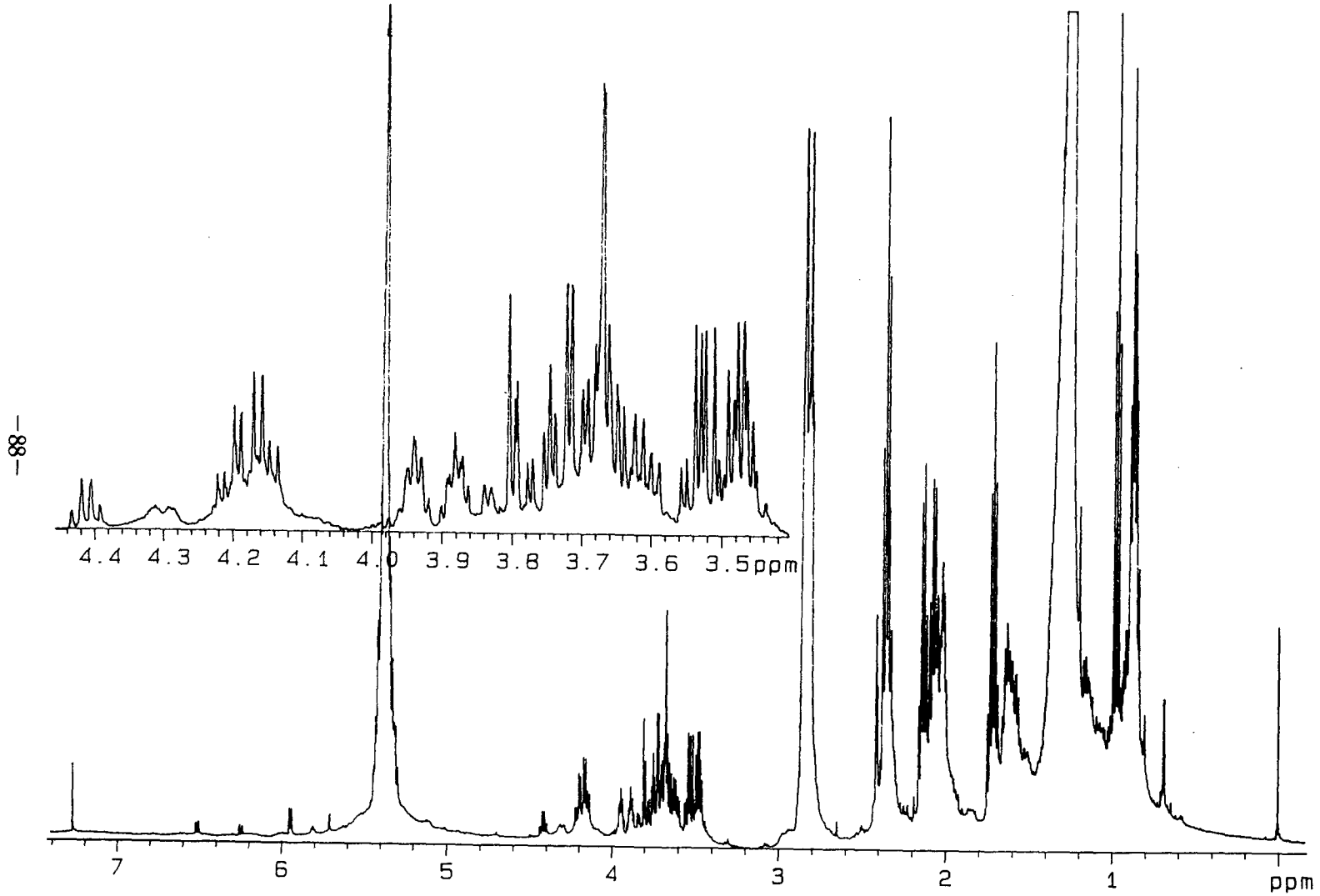


Fig. 5-21. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #9 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

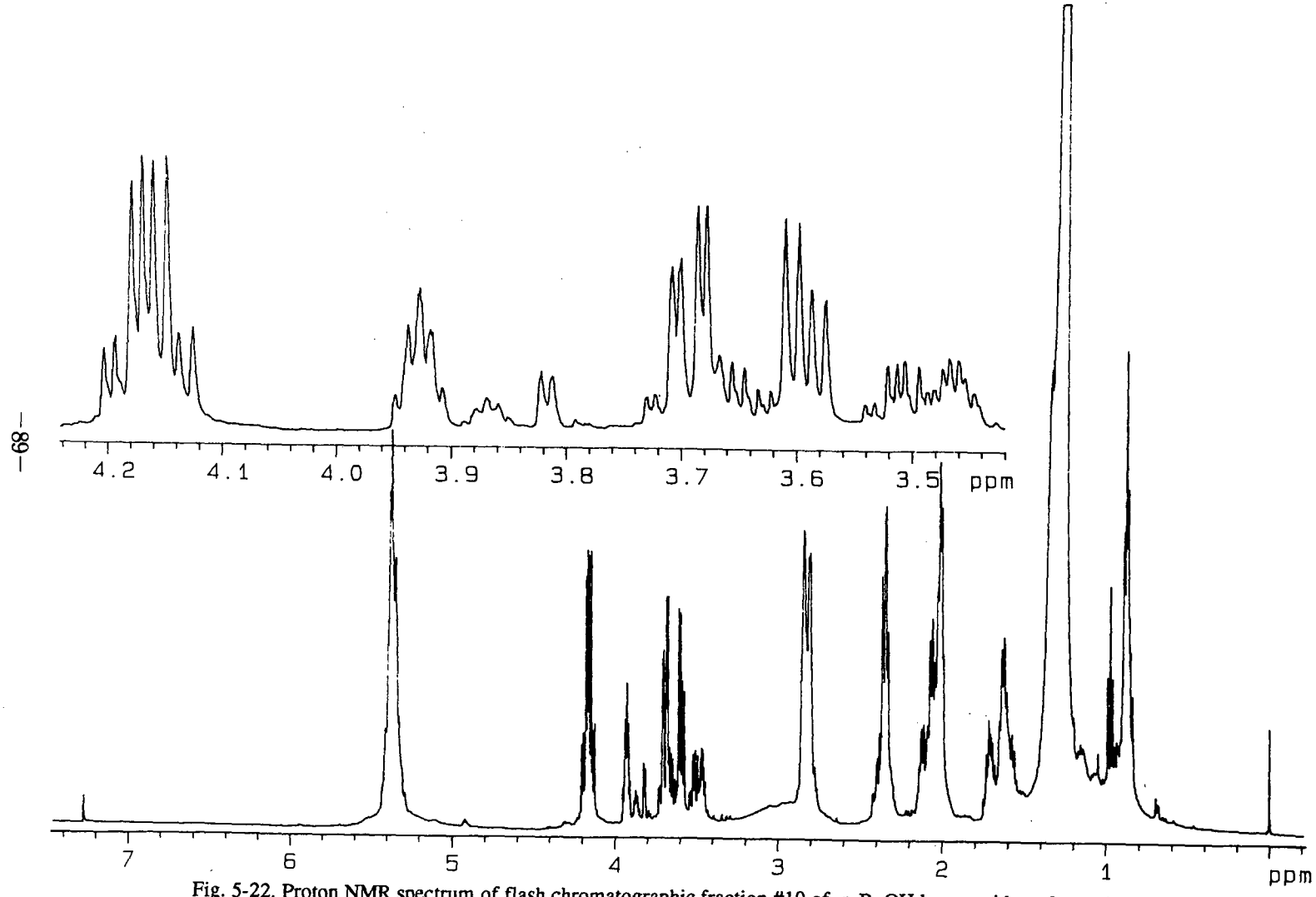


Fig. 5-22. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #10 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

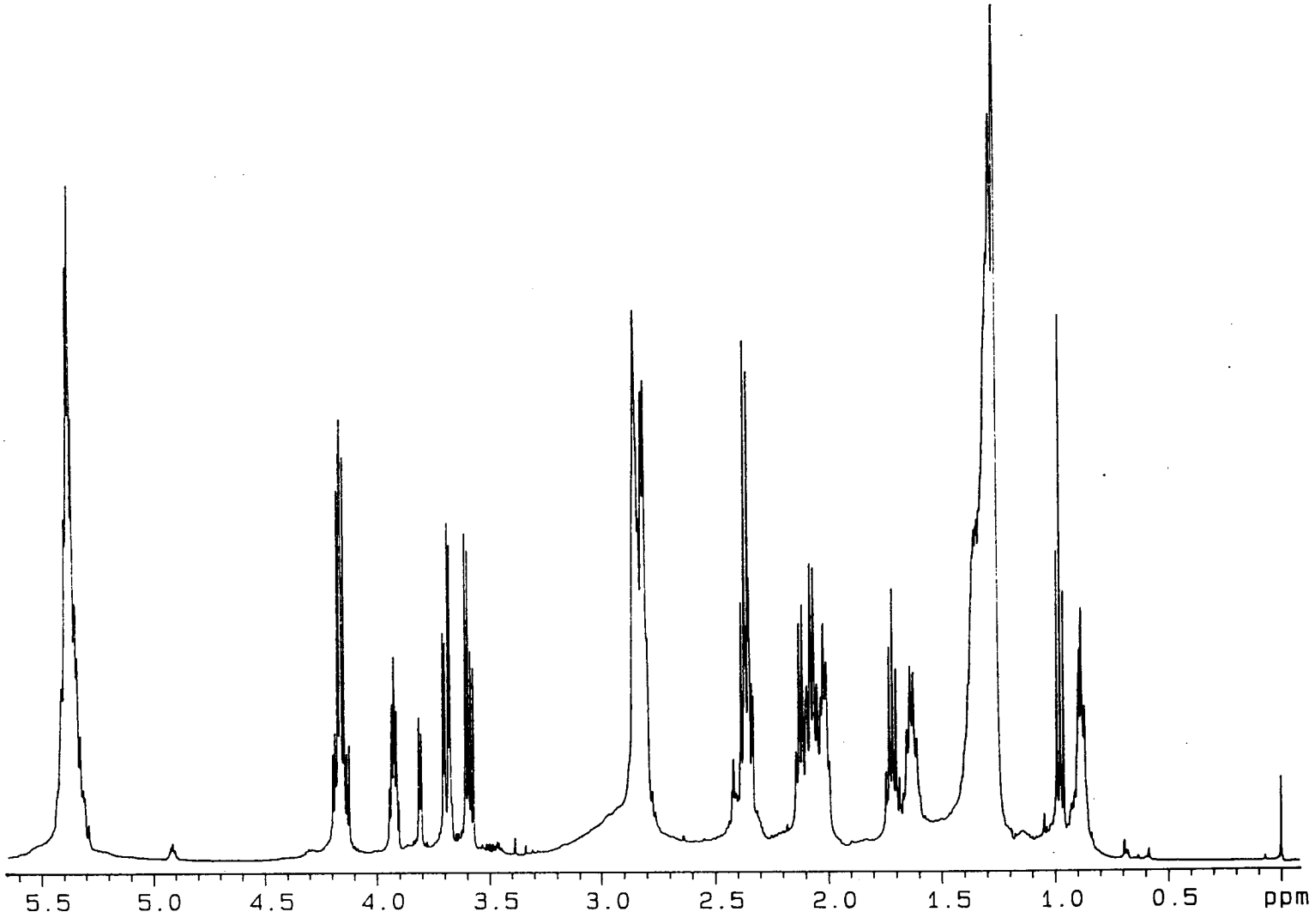


Fig. 5-23. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #11 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

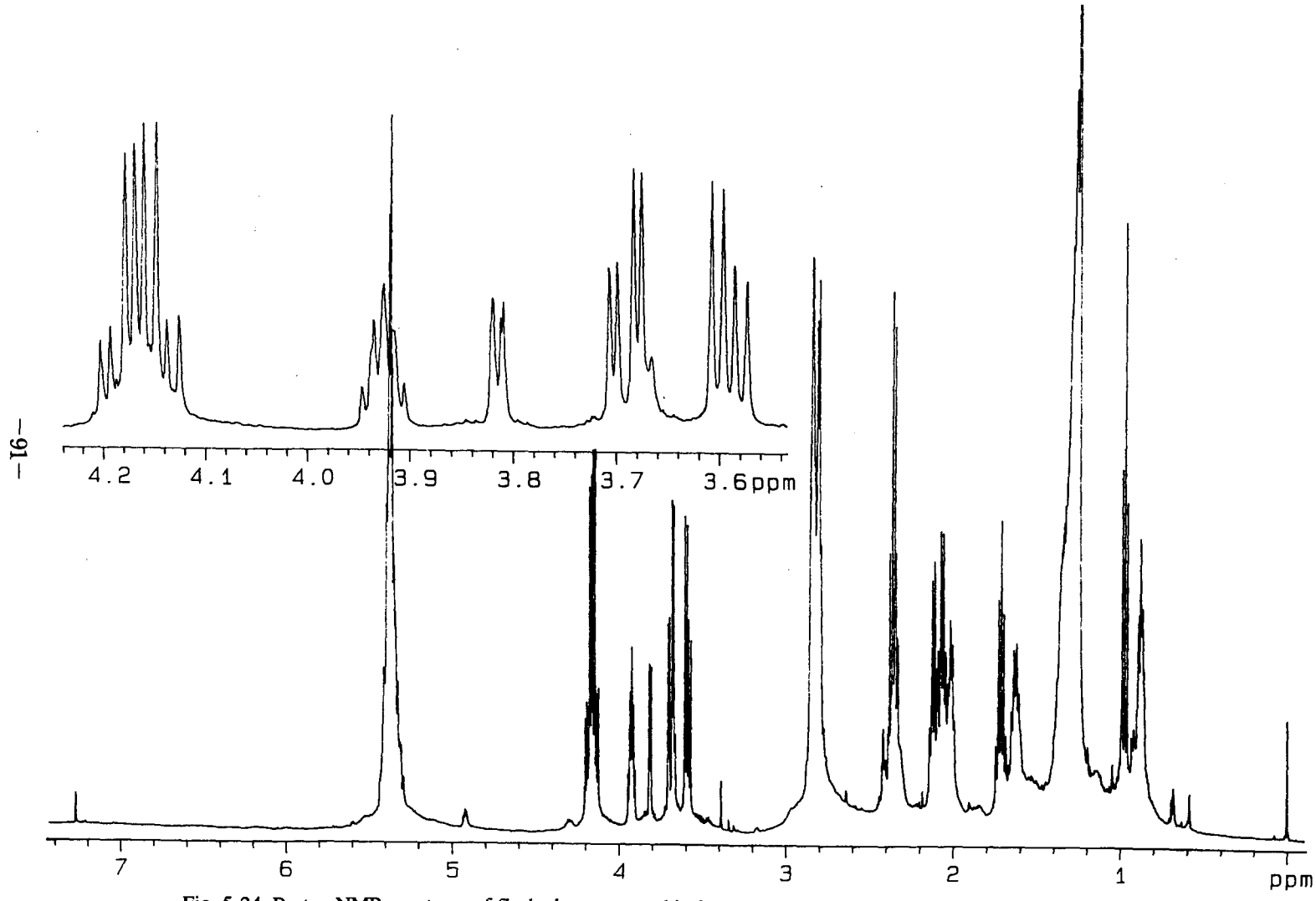


Fig. 5-24. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #12 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

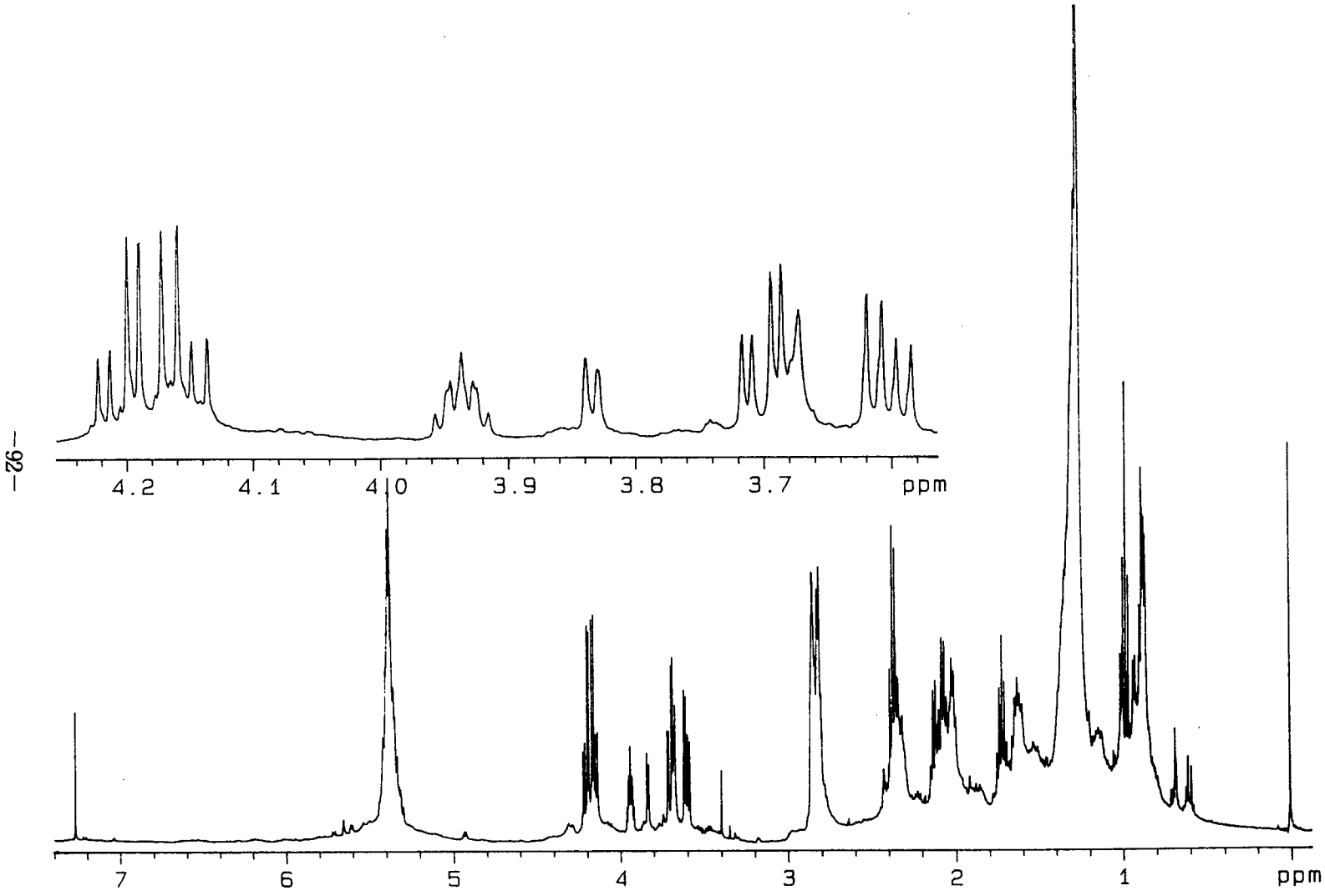


Fig. 5-25. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #13 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

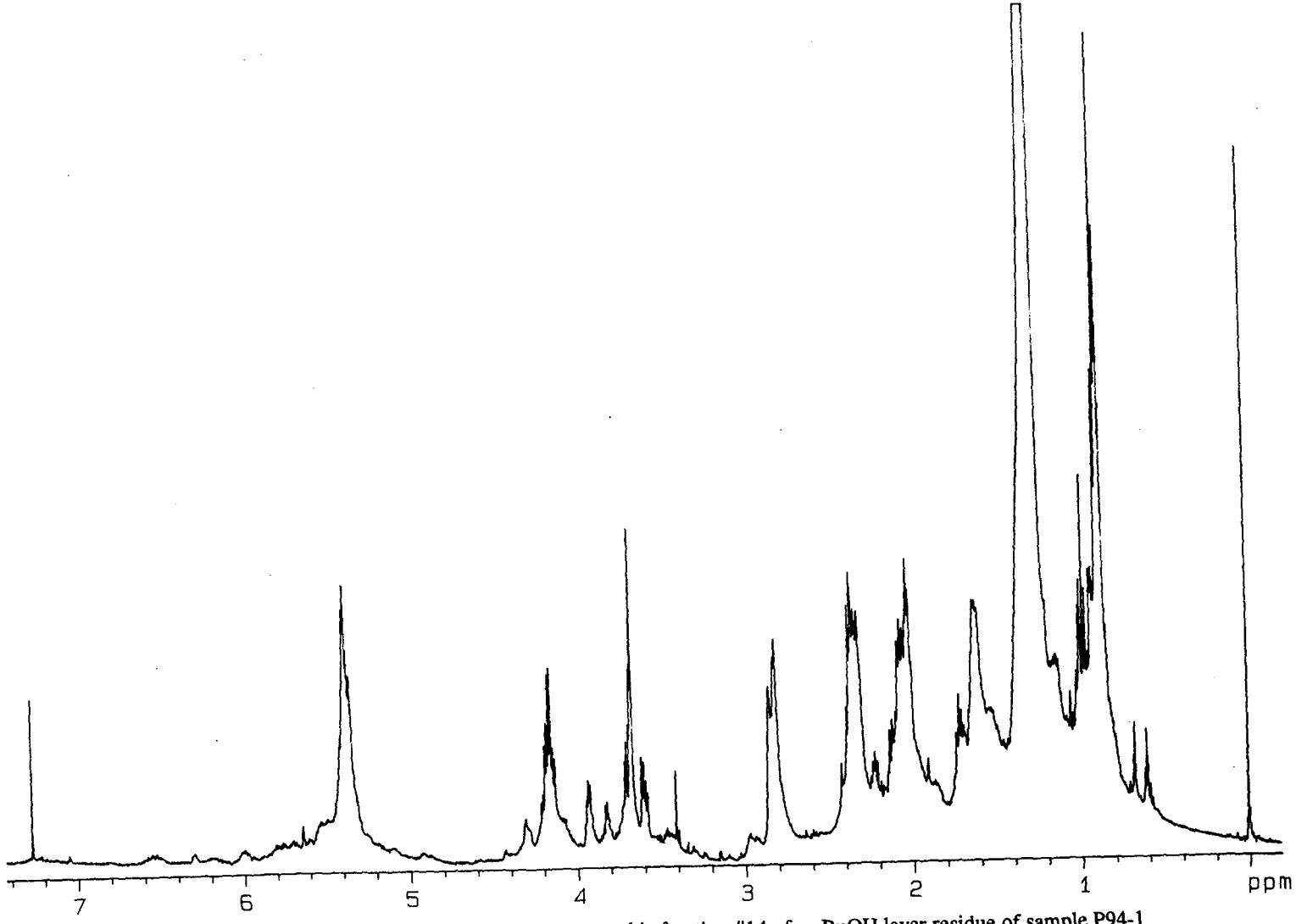


Fig. 5-26. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #14 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

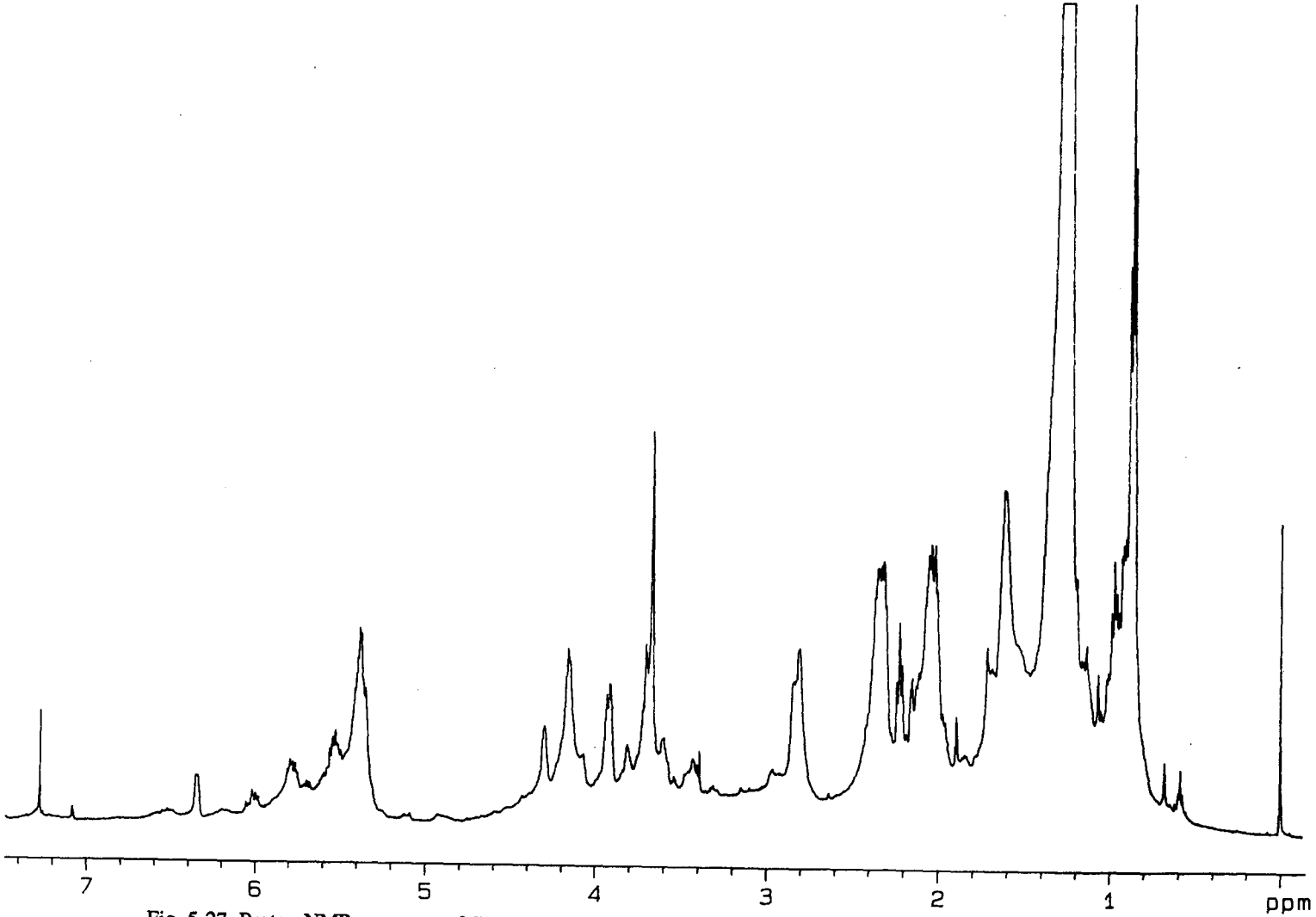


Fig. 5-27. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #15 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

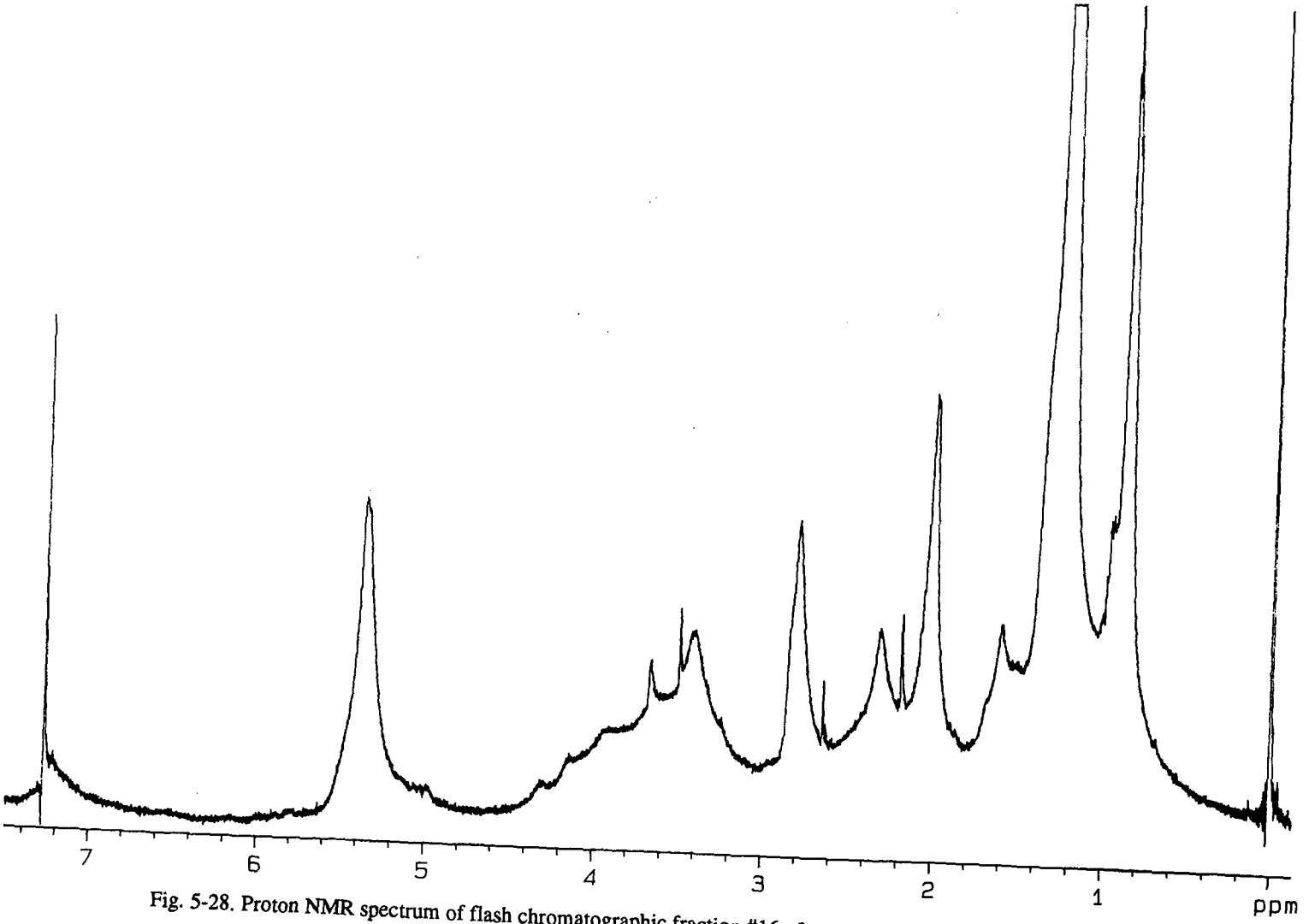


Fig. 5-28. Proton NMR spectrum of flash chromatographic fraction #16 of n-BuOH layer residue of sample P94-1

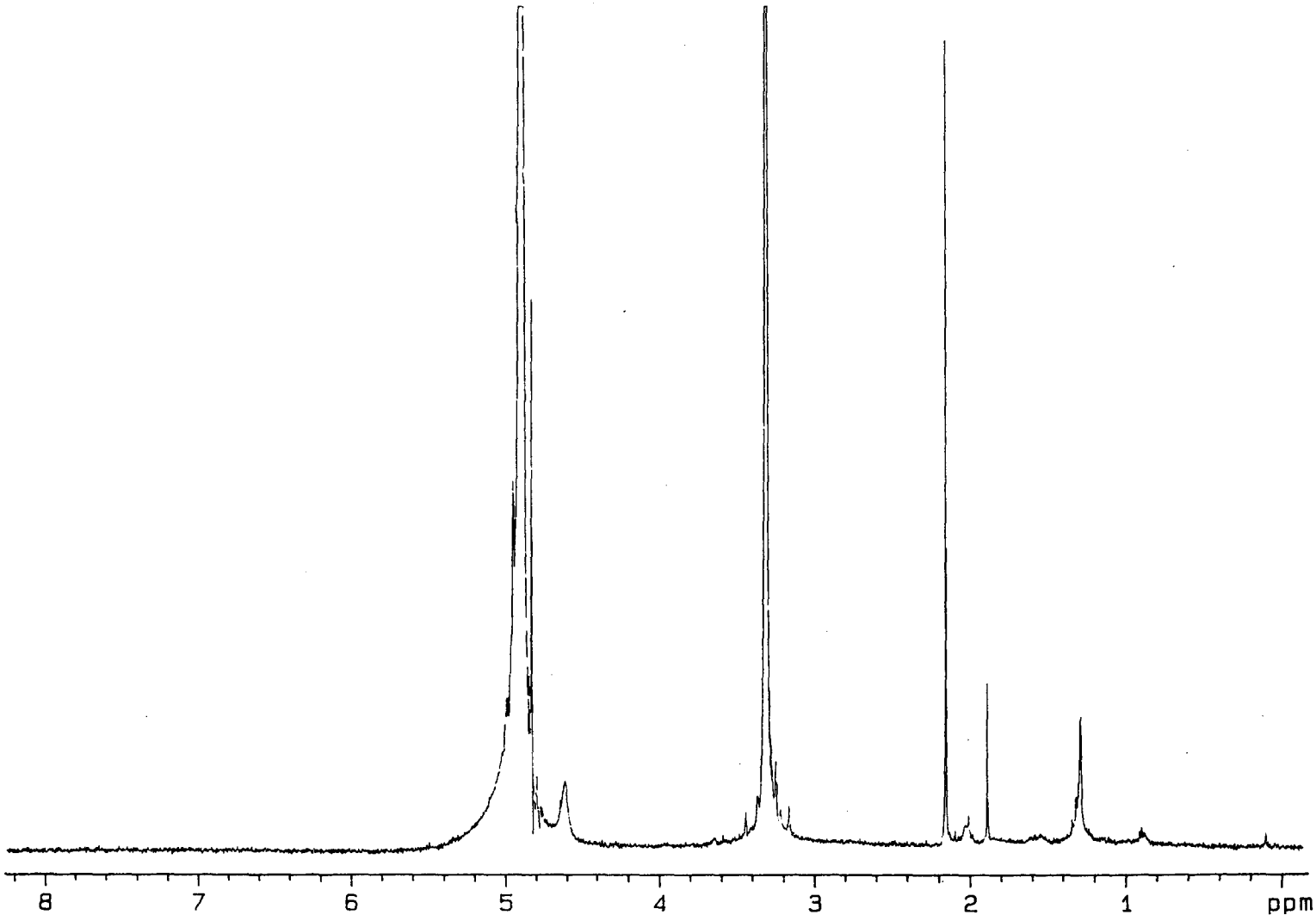


Fig. 5-29. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #1 of aqueous layer residue of sample P94-1

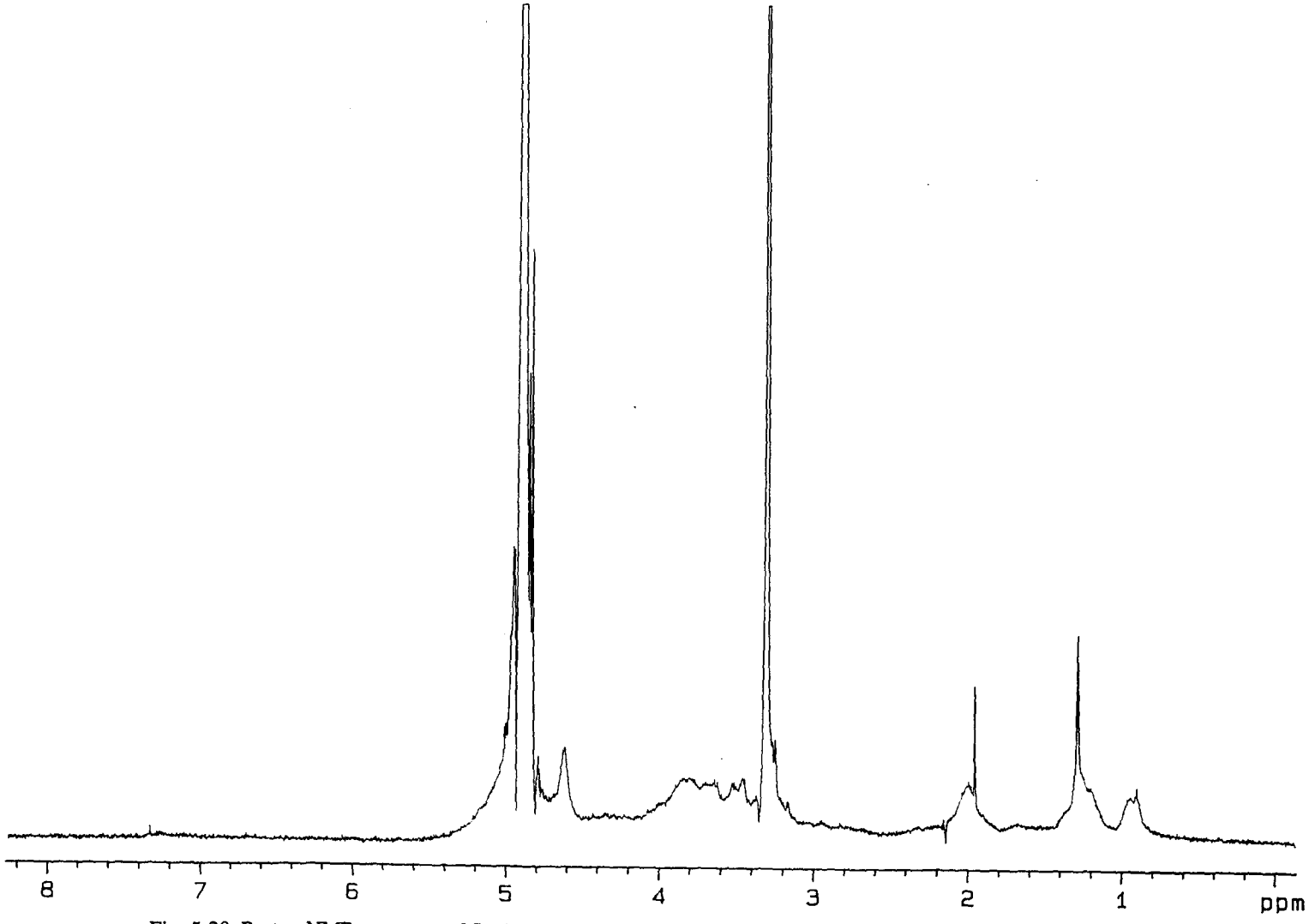


Fig. 5-30. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #2 of aqueous layer residue of sample P94-1

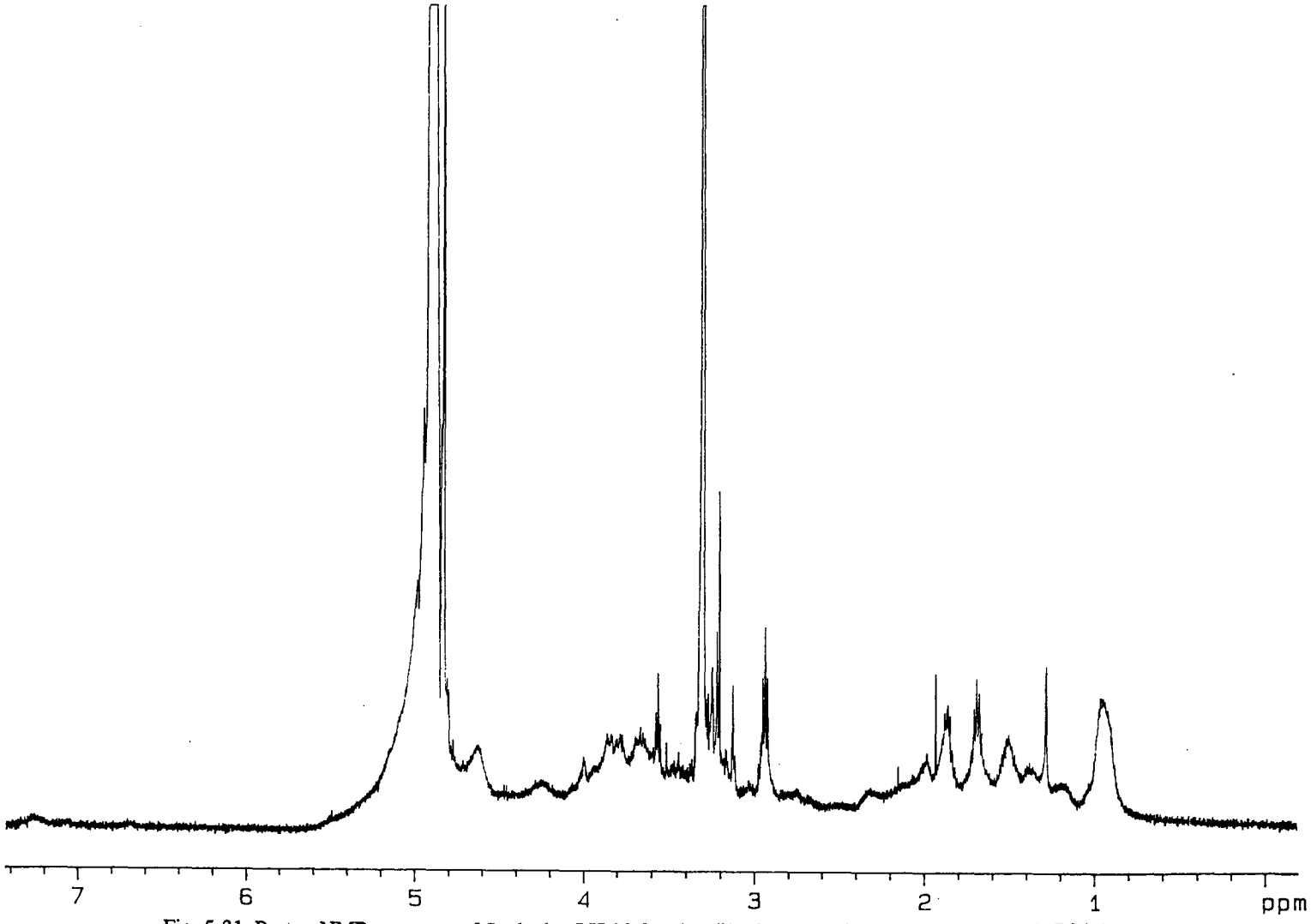


Fig. 5-31. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #3 of aqueous layer residue of sample P94-1

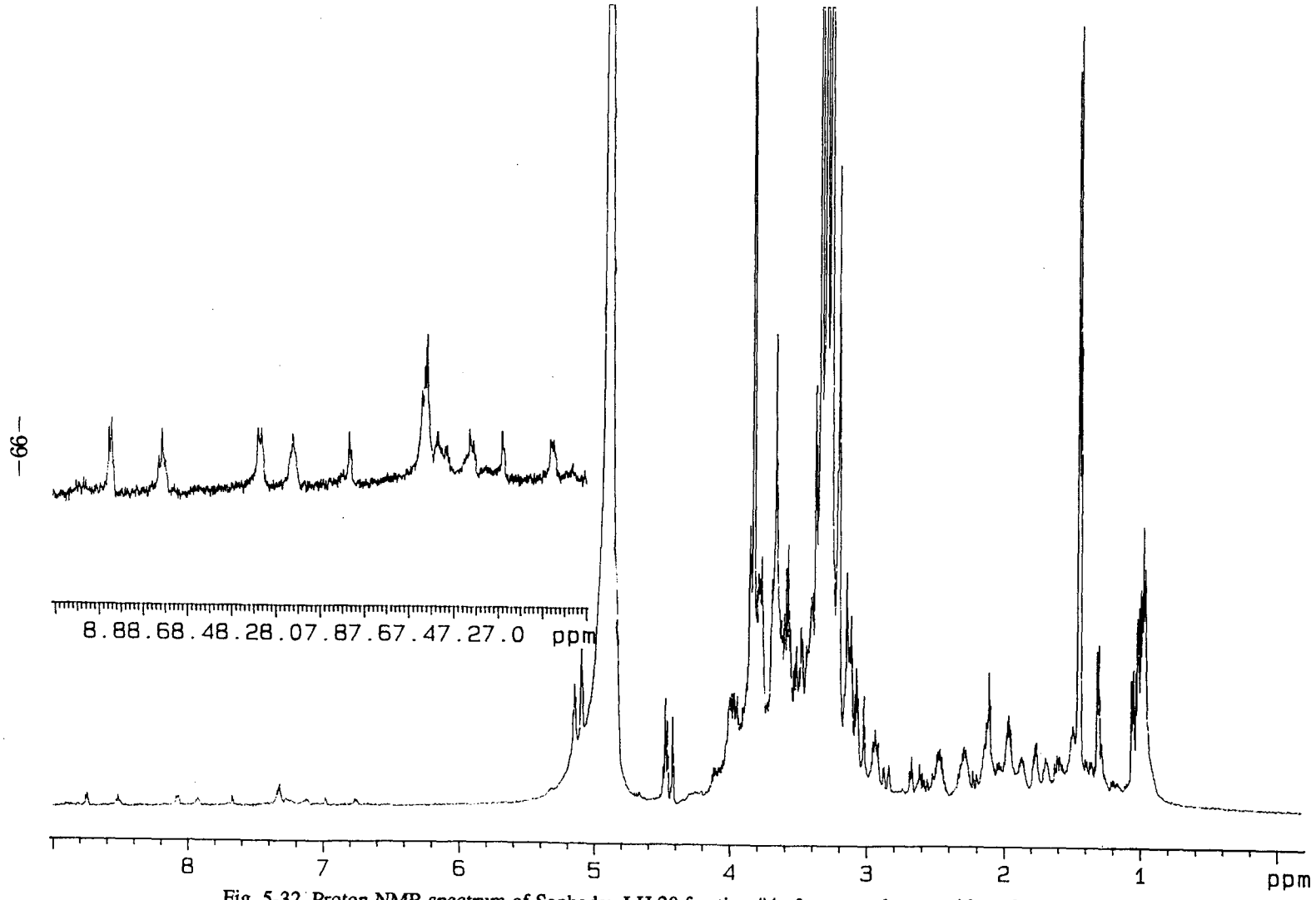


Fig. 5-32. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #4 of aqueous layer residue of sample P94-1

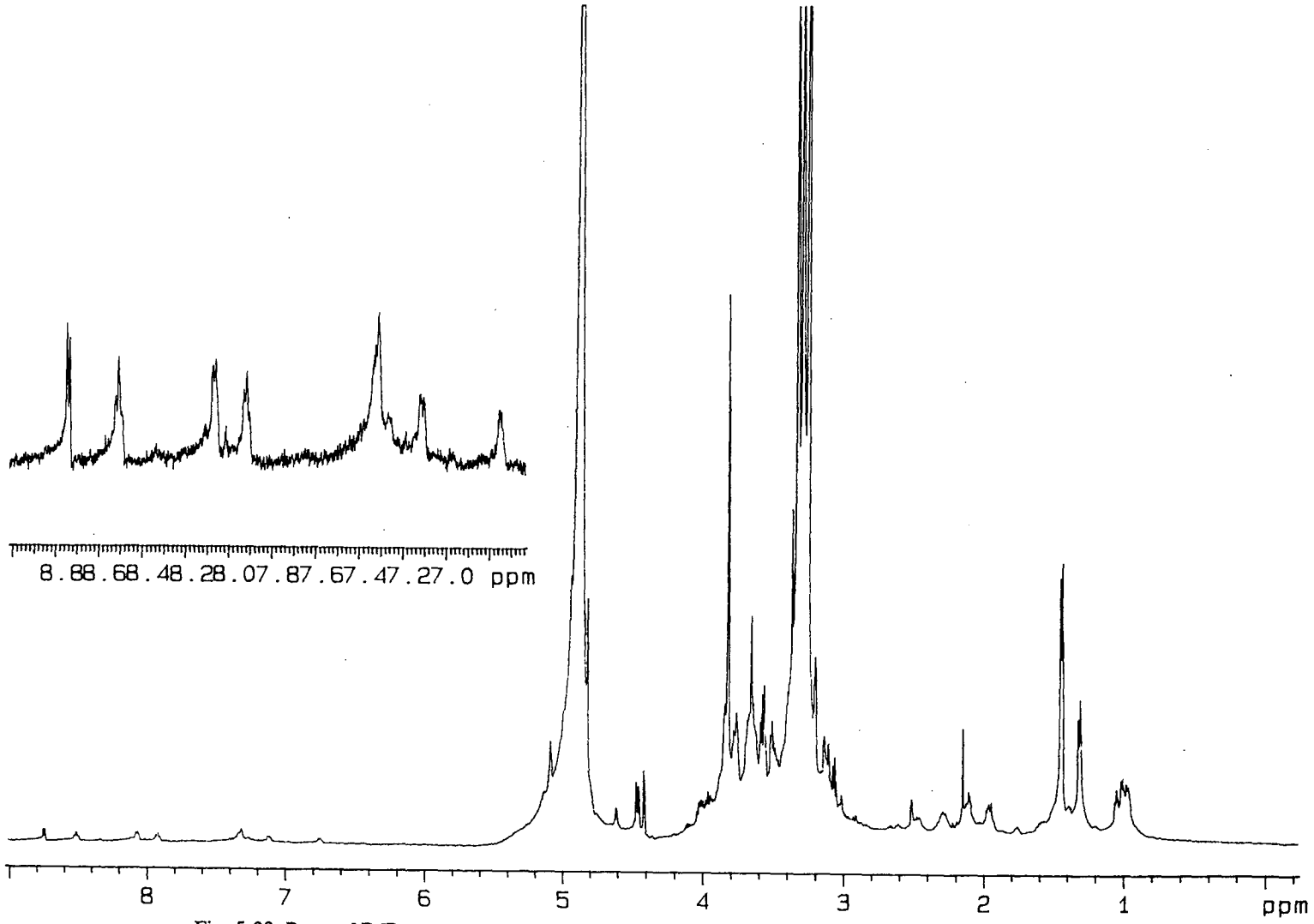


Fig. 5-33. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #5 of aqueous layer residue of sample P94-1

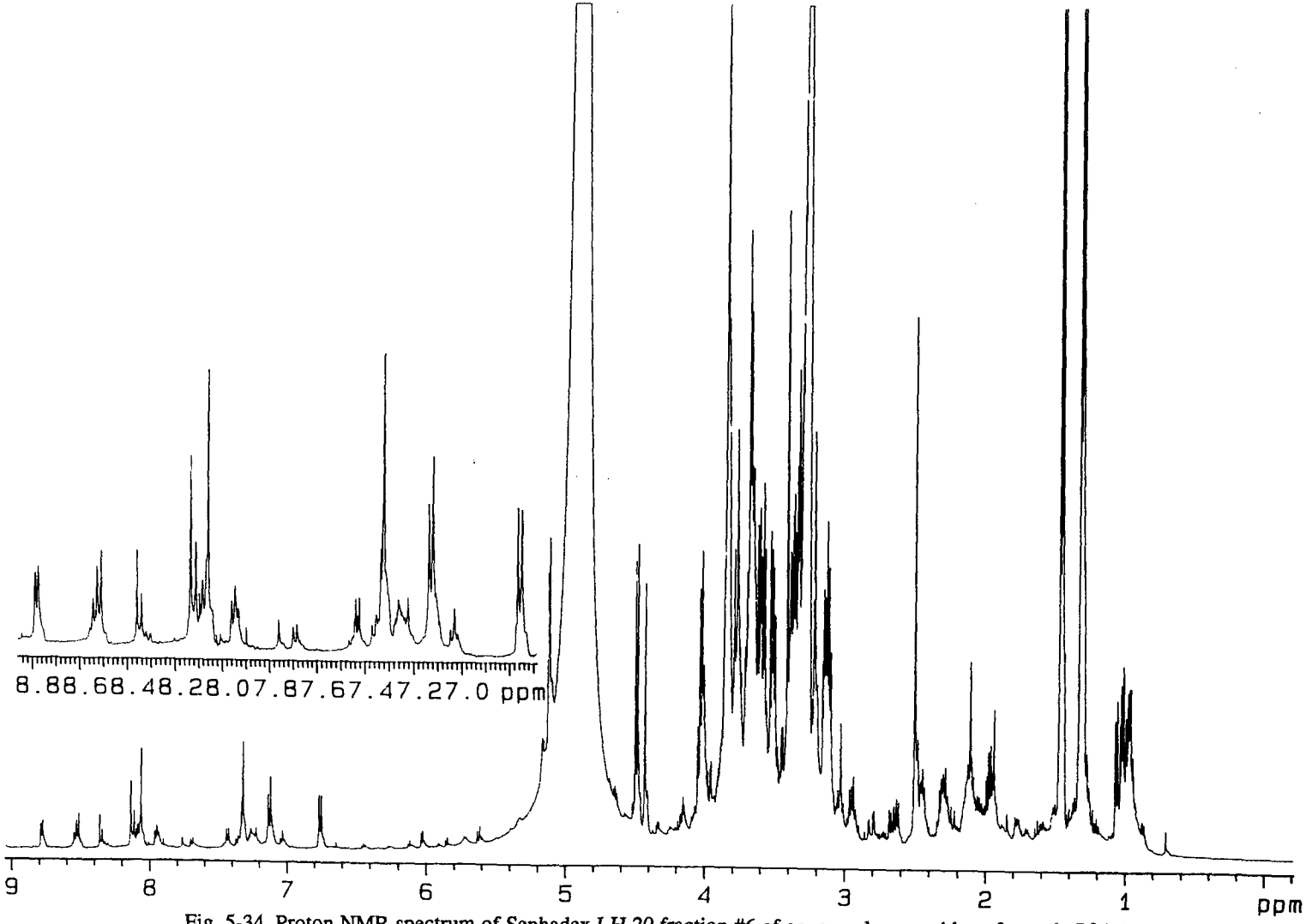


Fig. 5-34. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #6 of aqueous layer residue of sample P94-1

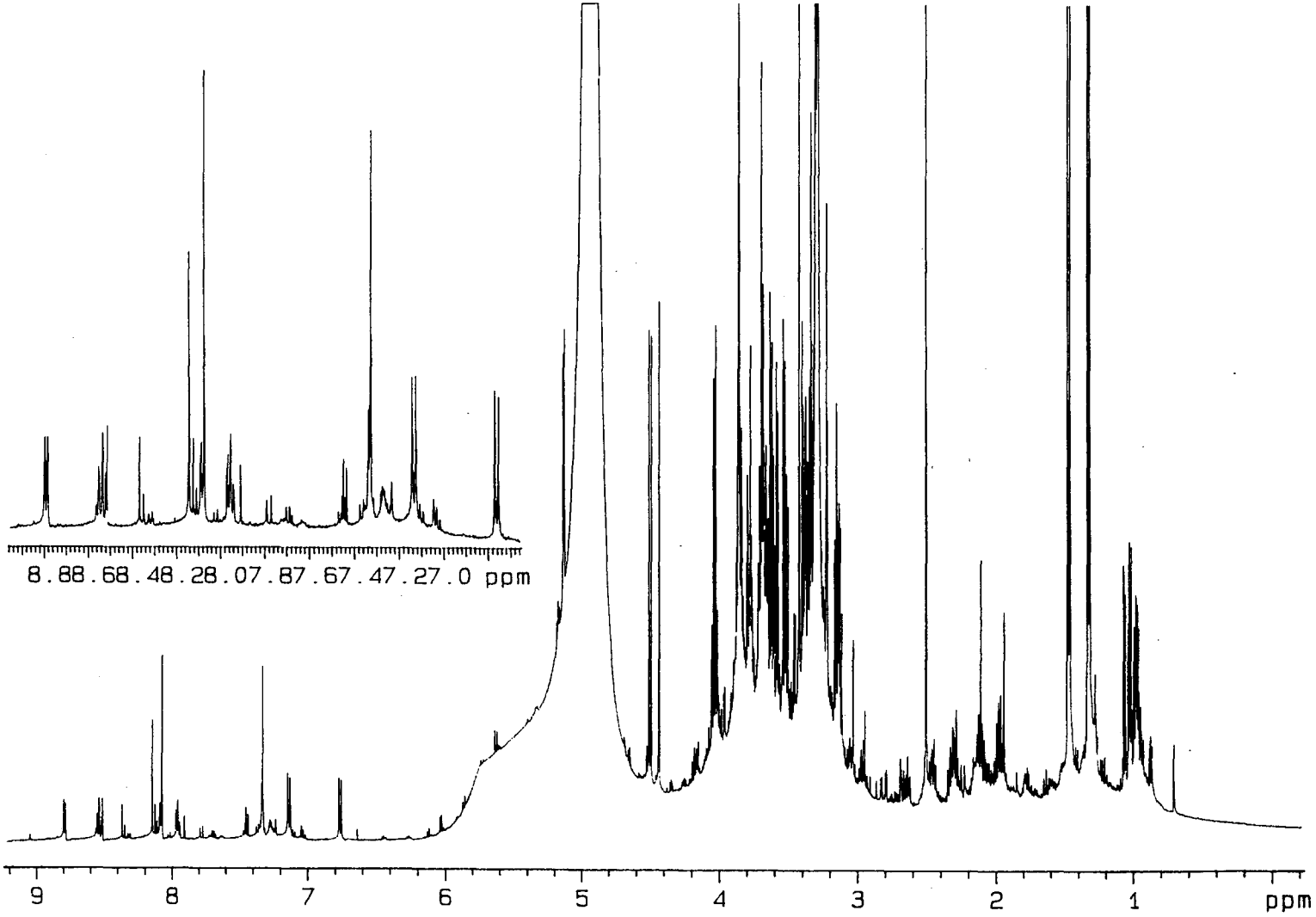


Fig. 5-35. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #7 of aqueous layer residue of sample P94-1

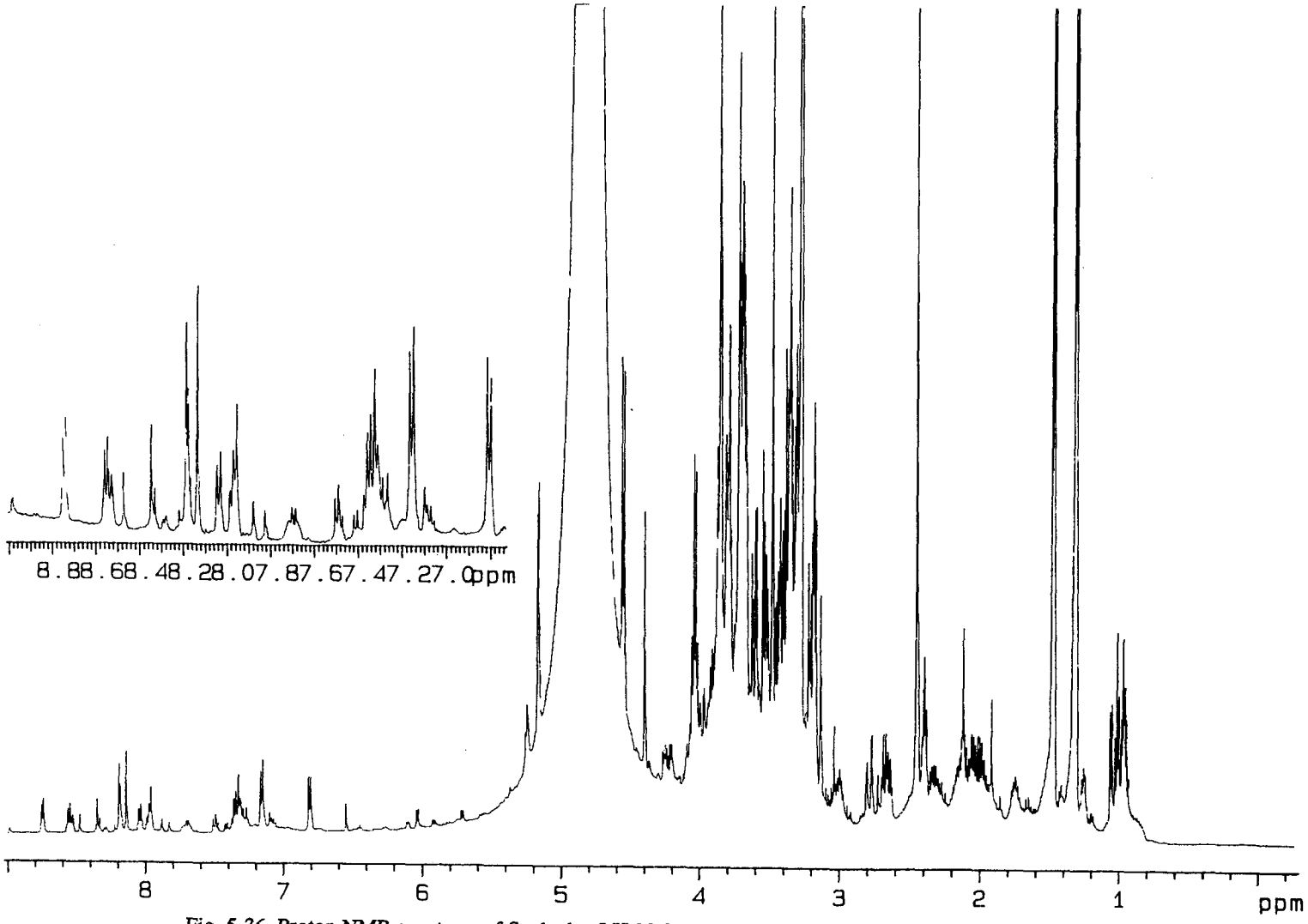


Fig. 5-36. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #8 of aqueous layer residue of sample P94-1

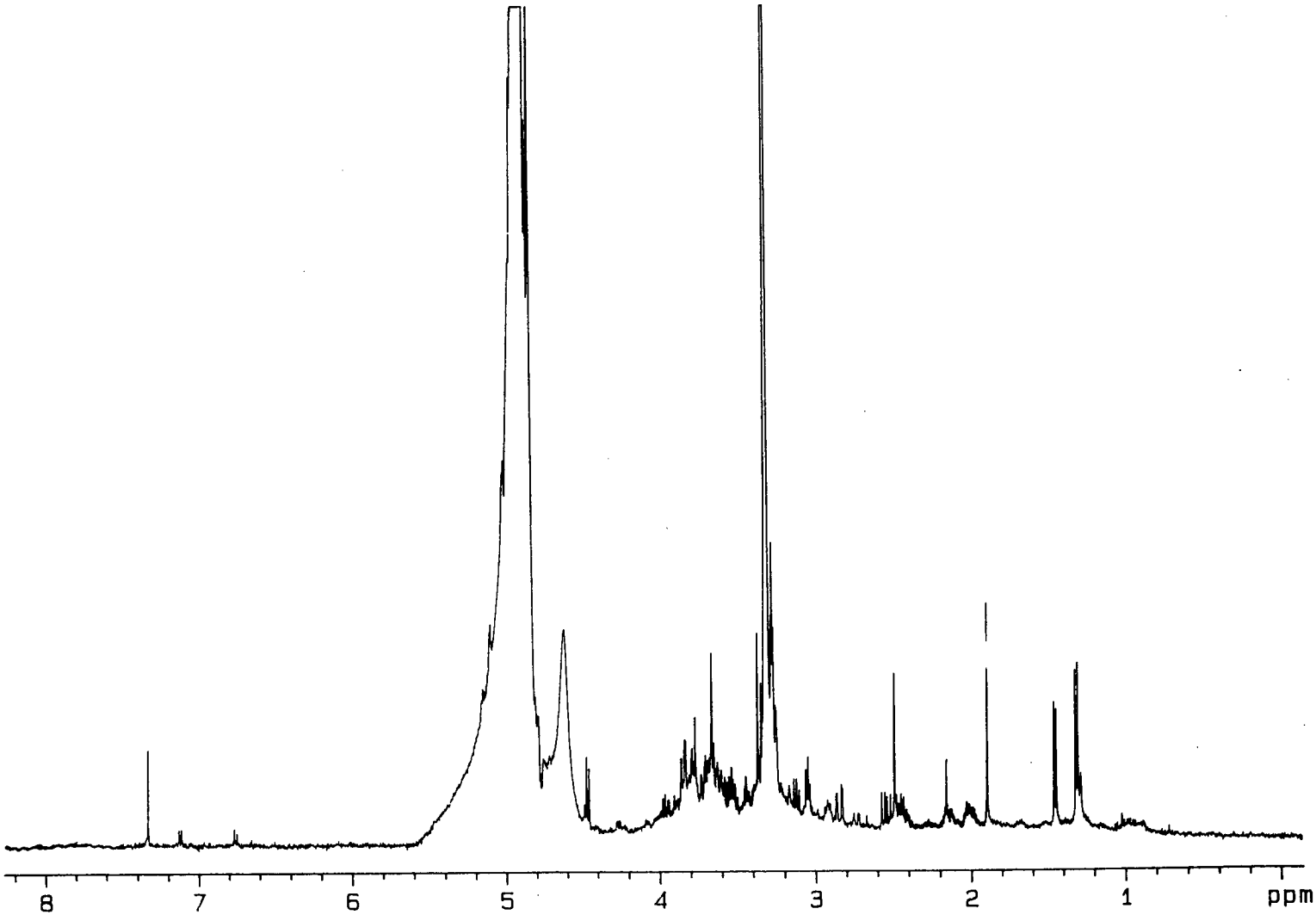


Fig. 5-37. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #9 of aqueous layer residue of sample P94-1

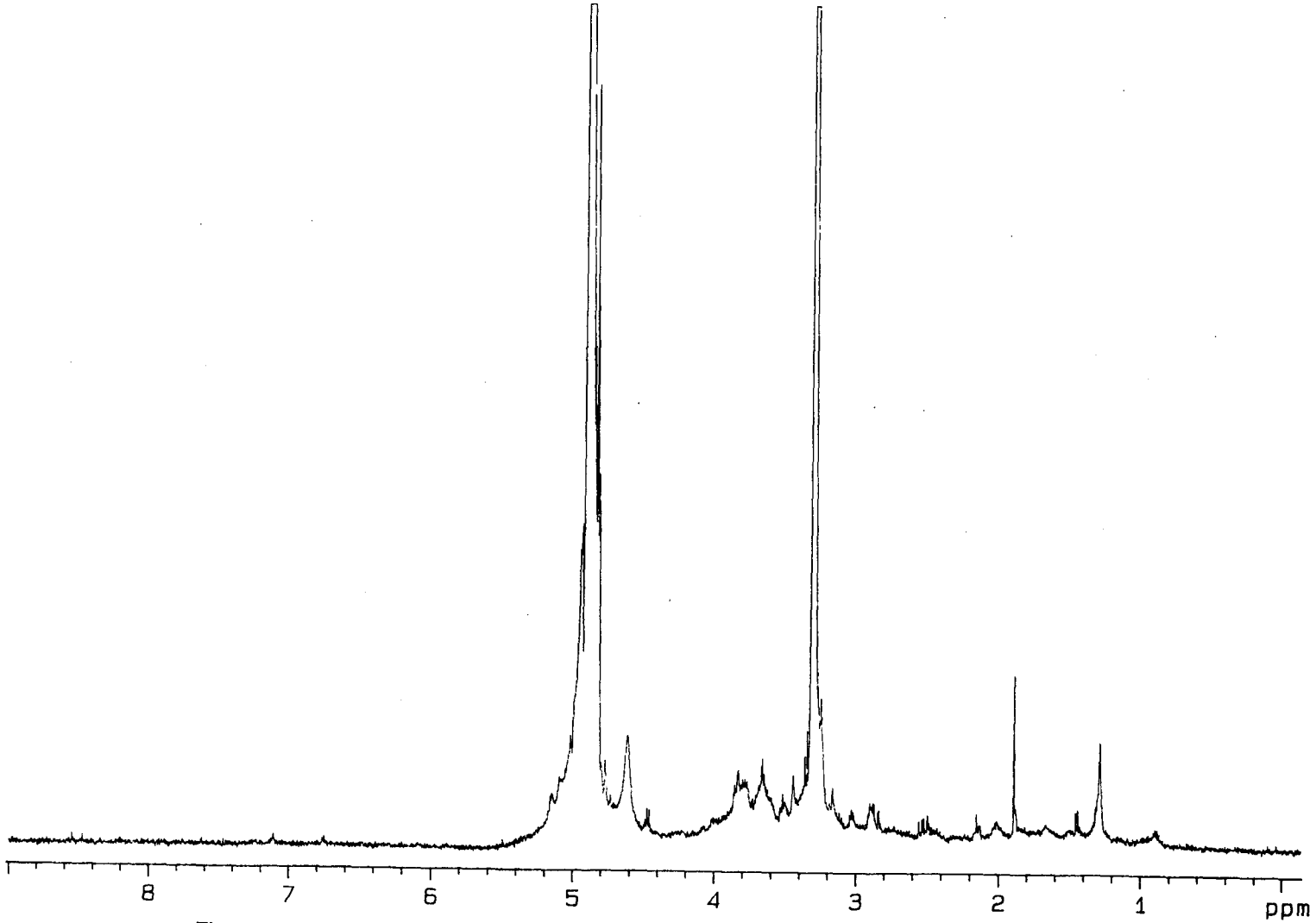


Fig. 5-38. Proton NMR spectrum of Sephadex LH 20 fraction #10 of aqueous layer residue of sample P94-1

도 피이크가 나타나 어떤 특이한 새로운 천연물의 존재 가능성을 제시해 주었다.

P94-1의 물층에 대한 Sephadex LH 20 chromatography 결과 얻어진 10개의 분획에 대해서도 마찬가지로 수소 NMR 스펙트럼 분석이 시도되었다. 이 분획들의 NMR 스펙트럼을 잘 살펴 보면 다른 분획들과는 달리 6, 7, 8 분획의 6.6 - 8.9 ppm 영역에 특이한 peak들이 나타나 새로운 2차 대사물질이 존재할 가능성이 보였다(Fig. 54-29 ~ -38).

5. 1. 3. 생리활성도 측정

조추출물을 물층과 n-butanol층으로 나눈 후에 얻어진 10개의 시료들에 대해서 여러 가지 생리활성도를 측정하였다. 항미생물 및 항진균 효과가 3종의 bacteria(*Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*)와 1종의 pathogenic fungi(*Candida albicans*)에 대하여 disk diffusion method를 이용하여 측정되었으며 brine shrimp lethality 테스트와 DNA cleavage assay(Fig. 5-40)가 역시 실시되었다. 하지만 측정결과는 이 시료들이 이들 생리활성도에 대해서 거의 효가가 없음을 나타내었다.

또 이 시료들에 대해서 P388과 DLD-1 cell line 및 lymphocyte에 대한 세포독성능 검사와 haemolytic activity 검사를 실시하였다. n-BuOH 층에서 얻어진 시료들은 Table 5-1에서 보여진 것처럼 P388과 DLD-1에 대해서 약간의 활성도를 보였다. Lymphocyte에 대한 세포독성능 과 haemolytic activity 검사결과는 n-BuOH 층 시료에 대해서는 모두 활성도를 가지고 있었으며 그 중에서도 P94-5의 n-BuOH층 시료가 상당한 활성도를 보여 주었다. 물층에서 얻어진 시료들은 거의 활성도를 나타내지 않았으며 P94-3에서 얻어진 시료만이 약간의 활성도를 보여 주었다.

1. DNA control 10㎕
2. DNA 5 ㎕ + bleomycin (1000 ppm, 5㎕)
3. " + P94-1-water (1000 ppm, 5㎕)
4. " + P94-1-BuOH (1000 ppm, 5㎕)
5. " + P94-2-water (1000 ppm, 5㎕)
6. " + P94-2-BuOH (1000 ppm, 5㎕)
7. " + P94-3-water (1000 ppm, 5㎕)
8. " + P94-3-BuOH (1000 ppm, 5㎕)

condition : 0.7% agarose gel
60 mA, 100 V
incubation time : 6 hrs.
temperature : 36.4℃
gel running time : 1 hrs.

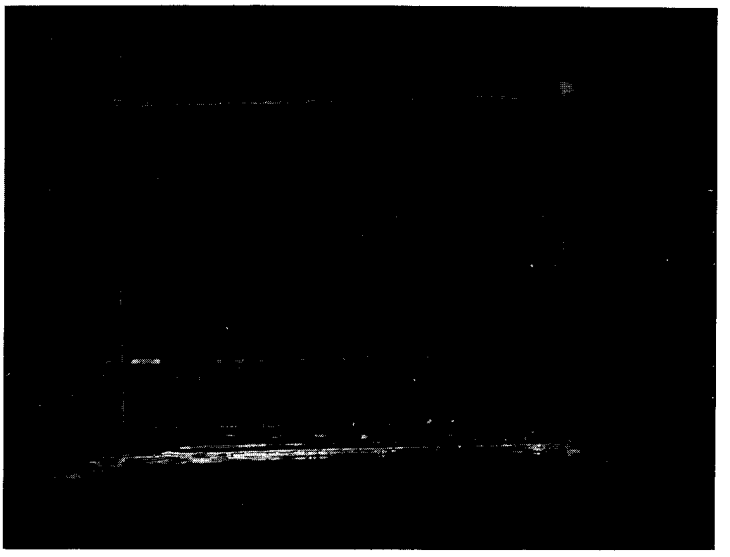


Fig. 5-39. DNA cleavage assay on crude extracts of polychaete worms.

1. DNA 10㎕
2. DNA 5 ㎕ + bleomycin (1000 ppm, 5㎕)
3. " + P94-4-water (1000 ppm, 5㎕)
4. " + P94-4-BuOH (1000 ppm, 5㎕)
5. " + P94-5-water (1000 ppm, 5㎕)
6. " + P94-5-BuOH (1000 ppm, 5㎕)

condition : 0.7% agarose gel
60 mA, 100 V
incubation time : 6 hrs.
temperature : 36.4℃
gel running time : 1 hrs.

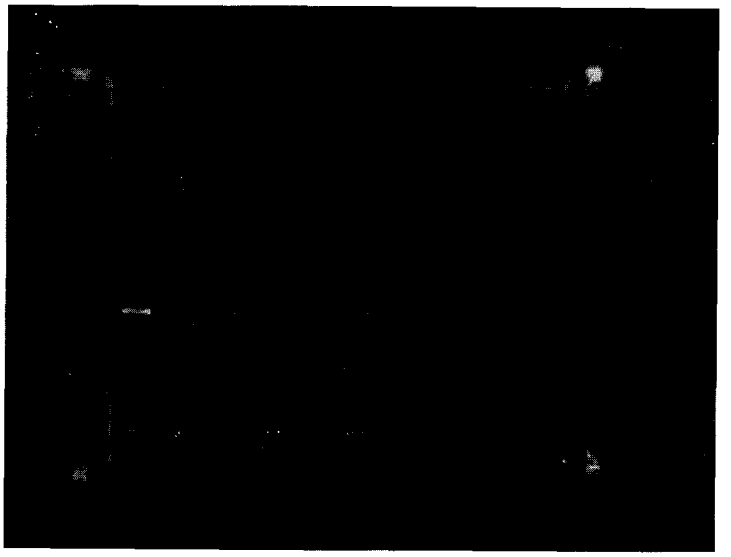


Fig. 5-39. continued.

Table 5-1. Bioassay results on the polychaete samples

code	Extract	B.S.(a)	DNA-clea.(b)	Antibiotic(c)	P388DI(d)	DLD-1(e)	Haemolytic(f)	Lymphocyte(g)
P94-1	water	1000 <	1000 <	10,000 <	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	n-BuOH	〃	〃	〃	127	127	127(80%)	127(52%)
P94-2	water	〃	〃	〃	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	n-BuOH	〃	〃	〃	147	147	147(59%)	147(68%)
P94-3	water	〃	〃	〃	n.t.	n.t.	133(91%)	133(86%)
	n-BuOH	〃	〃	〃	120	120	120(86%)	120(23%)
P94-4	water	〃	〃	〃	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	n-BuOH	〃	〃	〃	125	125	n.t.	n.t.
P94-5	water	〃	〃	〃	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	n-BuOH	〃	〃	〃	125	125	13(80%)	13(73%)

* All bioassay data are expressed as the concentration(ppm) at which 50% activity is observed excect haemolytic and lymphocyte assays

(a) : General toxicity against brine shrimp larvae

(b) : Cleavage assay on supercoiled DNA($\Phi \times 174$ RFI DNA)

(c) : Antimicrobial assays against bacteria and fungi

(d) : Mouse lympoid neoplasm cell culture assay

(e) : Human adenocarcinoma cell culture assay

(f),(g) : Percent in the parenthesis shows a ratio of erythrocyte and lymphocyte which were destroyed

5. 2. 토 의

본 연구는 지금까지 천연물 연구가 집중되지 않은 생물들에서도 강력한 생리활성도를 가진신물질을 분리할 가능성을 타진하기 위한 일종의 탐색작업적인 성격을 띄고 있다. 따라서 비교적 시료채집이 용이하여 생리활성 신물질이 존재할 경우 물질의 대량생산이 가능할 해산 갯지렁이를 연구대상생물로 선정하였으며 TLC, proton NMR 그리고 기초적인 생리활성도등을 이용하여 해산 갯지렁이에서 흥미있는 천연물을 분리할 가능성을 분석하였다. 위에서 언급한 TLC와 수소 핵자기 공명 데이타 분석결과에 의하면 모든 생물에 거의 동일하게 존재하는 지방산과 스테로이드외에도 흥미 있는 2차 대사물질이 존재할 가능성을 분명하게 보여 주고 있다. 본 연구에서 나타난 바와 같이 해산 갯지렁이의 조추출물에 대한 기초적인 생리활성도 측정결과는 공통적으로 이 시료들에 세포독성이 거의 없음을 나타내 주고 있다. 이것은 넓은 의미에서의 항암이나 항종양 효과가 거의 존재하지 않을 가능성보다는 오히려 선택성과 특이성이 크면서 생체내에서 독성이 적은 새로운 생리활성물질이 존재할 가능성을 제시해 주고 있다고 말할 수 있다. 따라서 HPLC나 다른 여러 가지 분리기법을 사용하여 순수한 물질을 분리한 후에 여러 가지 다른 정밀 생리활성도를 측정해 그 가능성을 타진해 보아야 할 것이다.

결론적으로 본 연구는 해산 갯지렁이에서도 흥미 있는 천연물이 존재하며 이것은 지금까지 연구가 집중되지 않은 생물들에서도 강력한 신규생리활성물질을 추출할 가능성이 있음을 확인해 준다. 그러므로 앞으로 이러한 생물들에도 눈을 돌려 본격적인 연구를 시도하면 신물질의 구조결정과 생리활성도 측정 뿐만 아니라 신물질의 대량생산과 산업화에까지 이르는 등 학문적, 산업적 측면에 걸쳐 모두 우수한 결과들을 양산할 것으로 전망된다.

References

한국해양연구소, 해산 갯지렁이 자원조사 및 사육기법 개발, BSPG 00122-366-3, **1991**, 267pp.

한국해양연구소, 해양동물로부터 추출된 천연물에 관한 연구(문헌중심), BSPE 00308-512-4, **1993**, 417pp.

한국해양연구소, 항암효과 검색을 위한 DNA cleavage assay에 관한 연구, BSPE 00376-662-4, **1994**, 84pp.

한국해양연구소, 한국근해 저서 군체생물로부터 신물질 추출 연구(Ⅲ), BSPN 00229-734-4, **1994**, 340pp.

Ames, B. N.; McCann, E.; Yamasaki, E., *Mut. Res.*, **1975**, 31, 347.

Areekul, S.; Harwood, R. F., *Agric J. Food Chem.*, **1960**, 8, 32.

Ashworth, R. B.; Cormier, M., *J. Science,* **1967**, 155, 1588.

Ballantine, A.; Psaila, A. F.; Peter, A.; Murray-Rust, P.; Ferrito, V.; Schembri, P.; Jaccarini, V., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I,* **1980**, 1080.

Barr, J. R.; Murty, V. S.; Yamaguchi, K.; Singh, S.; Smith, D. H.; Hecht, S. M., *Chem Res. Toxicol.*, **1988**, 204.

Baumgartner, B.; Erdelmeler, C. A. J.; Wright, A. D.; Rall, T.; Sticher, O., *Phytochemistry*, **1990**, 29, 3327.

Brown, R. F., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1969**, 46, 119.

Brown, R. F.; Wildman, J. D.; Eppley, R. M.; *Assoc. J. Off Anal. Chem.*, **1968**, 51,

905.

Burres, N. S.; Hunter, J. E.; Wright, A. E., *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 522.

Cariello, L.; De Nicola, G. M.; Zanetti, L.; Prota, G., *Experentia,* **1978**, 34, 1427.

Cassady, J. M.; Baird, W. M.; Chanf, C. J., *J. Nat. Prod.,* **1990**, 53, 23.

Chrisey, L. A.; Shahidi Bonjar, G. H.; Hecht, S. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 644.

Cimino, G.; de Rosa, S.; de Stefano, S.; Sodano, G., *J. Nat. Prod.,* **1985**, 48, 828.

D'Agostino, M.; Crescenzi, S.; Prota, G.; de Rosa, S.; Sodano, G., *J. Nat. Prod.*, **1986**, 49, 145.

Dunlop, L. A.; Simon, A.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti E. L., *J. Nat. Prod.,* **1989**, 52, 67.

Dutton, C. J.; Fookes, C. J. R.; Battersby, A. R., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**, 1237.

Edmonds, J. S.; Francesconi, K. A.; Cannon, J. R.; Raston, C. L.; Skelton, B. W.; White, A. H., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 1543.

Eng-Wilmot, D.; Martin, D. F., *J. Pharm. Sci.,* **1979**, 68, 963.

Eppley, R. M., *J. Assoc. Off Anal. Chem.,* **1974**, 57, 618.

Grande, H. R.; Chenf, P. C.; Doorenbos, N. J., *J. Pharm. Sci.,* **1976**, 65, 1414.

Grosch, D. S., *Science,* **1967**, 155, 592.

Hambuger, M.; Marston, A.; Hostettmann, K., *Adv. Drug. Res.*, **1991**, 20, 167.

Hamburger, M. O.; Cordell, G. A., *J. Nat. Prod.*, **1987**. 50 19.

Higa, T.; Fujiyama, T.; Scheuer, P. J., *Comp. Biochem. Physiol., B*, **1980**, 65, 525.

Higa, T.; Ichiba, T.; Okuda, R. IK., *Experientia*, **1985**, 41, 1487.

Higa, T.; Okuda, R. K.; Severns, R. M.; Scheuer, P. J.; He, C.-H.; Xu, C.-F.; Clardy, J., *Tetrahedron*, **1987**, 43, 1063.

Higa, T.; Scheuer, P. J., *Tetrahedron*, **1975**, 31, 2379.

Hood, D. W.; Duke, T. W.; Stevenson, B., Water Pollut, J., *Control Fed.*, **1960**, 32, 984.

Iguchi, M.; Nishiyama, A.; Etoh, H.; Okamoto, K.; Yamamura, S.; Kato, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 4910.

Jayasurlya, H.; McChesney, J. D.; Swanson, S. M.; Pezzuto, J. M., *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 325.

Jong, S. C.; Donovick, R., *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 34, Neidleman, S. J., Ed., Academic Press, London, **1982**, chap. 8.

Kinghorn, A. D.; Harjes, K. K.; Doorenbos, N. J., *J. Pharm. Sci.*, **1967**, 66, 1363.

Korpinen, E. L., *Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. B*, **1974**, 82, 465.

Laufer, H.; Borst, D.; Baker, F. C.; Carrasco, C.; Sinkus, M.; Reuter, C. C.; Tsai, S. W.; Schoolery, D. A., *Science*, **1987**, 235, 202.

Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin J. L., *Planta media*, **1982**, 45, 31.

Michael, A. S.; Thompson, C. G.; Abramovitz, M., *Science*, **1956**, 123, 464.

Mitscher, L. A.; Drake, S.; Gollapudi, S. R.; Okwute, S. K., *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50 1025.

Monaghan, R. I.; Tkaez, J. S., *Ann. Rev. Microbiol.*, **1990**, 44, 271.

Munro, M. H. G.; Blunt, J. W.; Barns, G.; Battersbill, C. N.; Lake, R. J.; Perry, N. B., *Pure Appl. Chem.*, **1989**, 61, 529.

Munro, M. H. G.; Luibrand, R. T.; Blunt, J. W., *Bioorganic Marine Chemistry*, Vol. 1, Scheuer, P. J., Ed., Springer-Verlag, Berlin, **1987**, 93.

Mynderse, J. S.; Crandall, L. W.; Cardellina, J. H. H., Natural Products Isolation: separation Methods for Antimicrobials, antiviral and Enzyme Inhibitors, in *Journal of Chromatography Library,* Vol. 43, Wagman G. H.; Cooper R., Eds., Elsevier, Amsterdam, **1989**, chap 10.

Nakamura, H.; Musicki, B.; Kishi, Y; Shimomura, O., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2683.

Pawlik, J. R., *Mar. Biol. (Berlin)*, **1986**, 91, 59.

Peter, A.; Abela-Medici, A.; Ballantine, J. A.; Ferrito, V.; Ford, S.; Jaccarini, V.; Psaila, A. F., *Tetrahedron Lett.* **1978**, 2017.

Peter, A.; Ballantine, J. A.; Ferrito, V.; Psaila, A. F.; Schembri, P. J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1976**, 999.

Peter, A.; Ballantine, J. A.; Murray-Rust, P.; Ferrito, V.; Pasila, A. F., *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1884.

Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Dufresne, C.; Christie, N. D.; Niven, M. L.; Herald, D. L., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 865.

Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Dufresne, C.; Christie, N. D.; Niven, M. L.; Herald, D. L., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 865.

Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Dufresne, C.; Christie, N. D.; Niven, M. L.; Herald, D. L., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 865.

Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Herald, D. L.; Arm, C.; Dufresne, C.; Christie, N. D.; Schmidt, J. M.; Doubek, D. L.; Krupa, T. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2006.

Prota, G.; D'Agostino, M.; Misuraca, G., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1972**, 1614.

Richter, J. A.; Goldstein, A., *Psychopharmacologia*, **1970**, 17, 327.

Robinson, A. B.; Manly, K. F.; Anthony, M. P.; Catchpool, J. F.; Pauling, L., *Science*, **1965**, 149, 1255.

Sachs, L., *Cancer Surveys*, **1982**, 1, 321.

Scannell, R. T.; Barr, J. R.; Murty, V. S.; Reddy, K. S.; Hecht, S. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 3650.

Sheikh, Y. M.; Djerassi, C., *Experientia*, **1975**, 31, 265.

Simon, A.; Dunlop, R. W.; Ghisalberti, E. L.; Sivasithamparam, K., *Soil. Biol. Biochem.*, **1988**, 20, 263.

Suffness, M., Biologically Active natural Products, Hostettmann K.; Lea, P. J., Eds., Clarendon Press, Oxford, **1987**, 85.

Suffness, M.; Douros, J., *J. Nat. Prod.*, **1982**, 45, 1.

Sugiyama, H.; Ehrenfeld, G. M.; Shiply, J. B.; Kilkuskie, R. E.; Chang, L. H.; Hecht, S. M., *J. Nat Prod.*, **1985**, 48, 869.

Tarpley, W. A., *J. Econ. Entomol.*, **1958**, 51, 781.

Tsuge, O.; Watanabe, H.; Kanemasa, S., *Chem. Lett.*, **1984**, 1415.

Vanhaecke, P.; Persone, G.; Claus, C.; Sorgeloos, P., *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **1981**, 5, 382.

Wagner, *A.-F. Drug. Res.* **1988**, 38, 273.

Wall, M. F.; Wani, M. C.; Hughes, T. J.; Taylor, H., *J. Nat. Prod.*, **1988**, 51, 866.

Weisman, N.; Leyhansen, G.; Maidhof, A.; Tanaka, W.; Unegawa, H.; Muller, E. G., *J. Antibiotics*, **1985**, 38, 772.

Woodin, S. A.; Walla, M. D.; Lincoln, D. E., *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **1987**, 107, 209.