해면의 공생미생물의 생리활성 성분연구

A study on the bioactive compounds from the symbiotic microorganisms of sponges

1996. 6.

한국해양연구소

제출문

한국해양연구소장 귀하

본 보고서를 "해면의 공생미생물의 생리활성 성분연구" 과제의 보고서로 제출합니다.

1996년 6월

연구책임자: 이홍금(해양생물공학연구그룹, 책임연구원)
정지형(천연물동위원소화학연구그룹, 선임연구원)
연 구 원: 김상진(해양생물공학연구그룹, 책임연구원)
이득수(해양생물공학연구그룹, 연구원)
조한윤(해양생물공학연구그룹, 연구원)
임정현(천연물동위원소화학연구그룹, 연구원)
김영림(천연물동위원소화학연구그룹, 연구원)
송지영(천연물동위원소화학연구그룹, 연구원)
박은희(해양생물공학연구그룹, 연구원)
권개경(해양생물공학연구그룹, 연구원)

요 약 문

I. 제목

해면의 공생미생물의 생리활성 성분연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라 근해에서 채집되는 해면으로부터 미생물을 분리 배양하여 이들 균주에 대한 항암효과 검색을 실시한다. 이렇게 검색된 균주 중에서 집중연구 대상을 선정하여 항암성분을 규명한다.

세계 의약시장의 2%인 30억불 이상의 시장을 점유하고 있는 항암제 시장은 매년 20%이상의 증가추세를 보이고 있다. 해양생물은 새로운 생리활성물질의 제공자로서 여러 제약기업의 주목을 받아오고있다. 현재까지 해양생물에서 약 6,000여종의 신물질이 발견되었는데 해양동물 중에서도 특히 해면은 생리활성성분이 가장 많이 발견되고 있다. 해면에서 발견되는 많은 생리활성물질이 실제로는 공생미생물에 의해 생산되어진다고 새로이 보고되고 있다. 해양 공생미생물은 새로운 생리활성물질의 제공자 뿐만 아니라 생리활성물질의 대량생산을 위한 의약품의 자원으로서도 중요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 공생미생물의 분리, 보전

우리나라 근해 (거문도 해역) 에서 SCUBA 다이빙에 의하여 다양한 종의 해면

을 채집하여 공생미생물을 분리하고 -80°C에 보존한다. 이를 배양하여 조 추출물을 조제하여 항암효과 검색에 사용한다.

2. 항암효과 검색

공생미생물 시료에 대한 다양한 생리활성 검색방법을 확립하며, 1차적인 항암효과 검색은 *in vitro*에서 P388D1 (murine leukemia), DLD-1 (human colon cancer)을 이용하여 세포독성물질 생산균주를 선별한다. 선별균주에 대하여는 topoisomerase I 의 저해효과를 조사한다.

3. 생리활성물질의 분리 정제

후보물질의 구조분석을 위하여 중점연구대상균주의 균체 및 배양액에서 활성성분을 분리 정제한다.

4. 후보균주의 동정 및 최적배양조건 조사

후보균주를 동정하고 온도, pH, 영양원 등에 따른 미생물의 성장속도 등의 생리학적 특성 및 생화학적 특성을 조사한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 균주 분리, 보전, 배양 및 시료조제

거문도해역에서 1994년 10월에 채취한 다양한 해면으로부터 해양세균과 방선균을 분리하여 glycerol 20% 용액에 넣어 영하 80 °C에 보존하여 생리활성물질 검색에 이용하였다. 해양세균은 PYG배지에 정치배양시키고 Folch용액으로 추출하여 Folch 층과 수층시료를 각각 분리 조제하였다. 방선균은 숙성된 해수가 첨가된 변형 ZoBell 배지에서 진탕배양 시킨 후 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 수층과 ethylacetate 층으로 분리하여 시료를 조제하였다.

2. 생리활성 검색방법 확립 및 후보균주 선정

항종양물질 탐색을 위하여 해양세균시료 600 여개와 해양방선균시료 24 여개에 대하여 Human adenocarcinoma 인 DLD-1 및 Mouse lymphoide neoplasm 인 P388D1에 대한 세포 독성능을 MTT(methyl tetrazolium bromide) 측정법을 변형하여 조사하였다. 1차 후보균주인 KM46-A1균주는 P388D1 암세포에 대한 ED_{50}값이 4.8 μg/ml로 나타났으며 topoisomerase I 저해효과를 나타냈다.

3. 생체활성물질 정제 및 구조분석

항암효과를 나타내는 균주를 선별하여 이의 균체 및 배양액에서 생리활성물질의 이화학적 특성을 조사하고자 현재 순수분리 및 구조분석중인 시료는 방선균 KM46-A1으로 actinomycin계열의 물질은 아니라고 분석되었다.

4. KM46-A1의 동정

세포독성물질을 생산하는 해면공생 방선균 KM46-A1의 형태학적, 생리학적 특성을 조사하고 세포벽 분석을 한 결과 *Streptomyces* sp.로 동정되었다. 여러 가지 배지에서의 성장특성을 관찰한 결과 KM46-A1균주는 nutrient agar medium, potato dextrose agar medium, yeast extract malt extract agar medium, inorganic salts starch agar medium, starch casein agar medium 및 glycerol asparagine agar medium에서는 좋은 생육상태를 보였으며 tryptone yeast extract agar medium과 peptone yeast extract iron agar medium에서는 빈약하게 성장을 하였다.

Summary

I. Title

A study on the bioactive compounds from the symbiotic microorganisms of sponges

II. Objectives and Significance

This study is aimed to develop anticancer lead compounds from marine symbiotic microorganisms, especially of sponges.

The global market for anticancer agents was estimated to be about 2% of the world drug market and increased by 20% yearly. During last decades, marine organisms have caught great interest from pharmaceutical companies as sources for noble compounds, and over 6,000 novel secondary metabolites have been found from marine organisms. Sponges are one of the most important sources for bioactive compounds, many of which have been found to be produced by their symbiotic microorganisms. Moreover, symbiotic microroganisms are important for mass production of bioactive substances.

III. Contents and Scope

The project was performed with the scope and area as follows.

1. Isolation and preservation of marine microorganisms from various marine

sponges.

2. Screening of cytotoxic activity and topoisomerase I inhibition activity.

3. Isolation of bioactive compounds.

4. Identification of bioactive compounds producing strains.

IV. Results and Suggestions

1. Marine bacteria and actinomycetes were isolated from sponges collected from Keo-Mun-Do in 1994. The strains were stalked with 20% glycerol solution at -80°C. Marine bacteria were cultivated with PGY broth and extracted with Folch solution. Actinomycete were cultivated with modified ZoBell medium. The mycelia were extracted with methanol and the broth was partitioned between ethylacetate phase and water phase.

2. Cytotoxic activities of 600 samples prepared from bacteria and 24 samples from actinomycetes were measured against P388D1 and DLD-1 cell lines by MTT assay. Actinomycete strain KM46-A1 revealed ED_{50} of 4.8 μg/ml against P388D1, and inhibited topoisomerase I activity.

3. To isolate active compounds with anticancer activity, fermentation broth from strain KM46-A1 was fractionated and its antitumor activities were investigated. The partially purified compounds from strain KM46-A1 were proved as non-actinomycin.

4. Strain KM46-A1 was identified as *Streptomyces* sp. Its physiological and biochemical characteristics were examined. The strain KM46-A1 grew well on nutrient agar medium, potato dextrose agar medium, yeast extract malt extract agar medium, inorganic salts starch agar medium, starch casein agar medium, and glycerol asparagine agar medium. It showed poor growth on tryptone yeast extract agar medium and peptone yeast extract iron agar medium.

목 차

요약문 3

표목차 11

그림목차 13

제 1 장 서 론 15

제 2 장 실험재료 및 방법 18

2.1. 균주분리, 배양 및 시료조제 18

2.2. 세포독성능 검사 21

2.3. Topoisomerase I 저해능 검사 22

2.4. 생리활성물질의 추출 및 분리 23

2.5. 선별균주의 동정 및 생리학적 특성조사 24

제 3 장 연구결과 및 고찰 30

3.1. 해양공생미생물의 생리활성물질(문헌중심) 30

3.2. 항암활성물질 생산균주 선별 41

3.3. KM46-A1의 항암활성물질 성분연구 45

3.4. 선별균주 KM46-A1의 동정 및 생화학적 특성 55

제 4 장 결론 70

제 5 장 참고문헌 72

Contents

Summary 3

List of Tables 11

List of Figures 13

Chapter 1. Introduction 15

Chapter 2. Materials and methods 18

2.1. Isolation and cultivation of microorganisms, and preparation of culture extracts 18

2.2. Cytotoxicity test against tumor cell lines 21

2.3. Topoisomerase I inhibition assay 22

2.4. Isolation of anticancer compounds 23

2.5. Identification and physiological tests of selected strain 24

Chapter 3. Results and discussion 30

3.1. Bioactive sustances from symbiotic marine microorganisms (review) 30

3.2. Selection of microorganisms possessing anticancer activity 41

3.3. Isolation and structure analysis of anticancer compound produced by KM46-A1 45

3.4. Identification and physiological characteristics of strain KM46-A1 55

Chapter 4. Conclusions 70

Chapter 5. References 72

표 목 차

표 1. 분리한 해양 공생미생물의 세포독성 ····· 42
표 2. KM46-A1 추출물의 항암활성도 ····· 44
표 3. KM46-A1균체 분획의 생리활성도 ····· 48
표 4. 지방산 및 지방산 메틸에스터가 topoisomerse I 활성에 미치는 영향 ····· 54
표 5. 여러 배지상에서의 KM46-A1의 배양학적 특성 ····· 60
표 6. KM46-A1의 당이용능 ····· 61
표 7. KM46-A1의 아미노산 이용능 ····· 62
표 8. KM46-A1의 생리 생화학적 특성 ····· 63
표 9. KM46-A1의 항생물질 내성 ····· 64
표 10. KM46-A1의 지방산 조성 ····· 68
표 11. KM46-A1의 화학분류학적 특성 ····· 69

List of Tables

Table 1. Strains with cytotoxic activity 42

Table 2. Anticancer activities of the fractions from KM46-A1 44

Table 3. Biological activities of the fractions from KM46-A1 48

Table 4. Effects of free fatty acids and fatty acid methylesters on topoisomerase I activity 54

Table 5. Culture characteristics of KM46-A1 on various culture media 60

Table 6. Utilization of carbon sources by KM46-A1 61

Table 7. Utilization of DL-amino acids as sole nitrogen source by KM46-A1 62

Table 8. Physiological and biochemical characteristics of KM46-A1 63

Table 9. Antibiotic resistances of KM46-A1 64

Table 10. Fatty acid composition of KM46-A1 68

Table 11. Chemotaxonomic characteristics of KM46-A1 69

그 림 목 차

그림 1. 배양액으로부터 시료조제 방법 20
그림 2. 조제시료의 relaxation assay에 의한 Topoisomerase I 저해 43
그림 3. KM46-A1 균체분획의 topoisomerase I 저해능 47
그림 4. KM46-A1의 flash column chromatography분획의 proton NMR spectra 50
그림 4. 계속 51
그림 4. 계속 52
그림 5. KM46-A1의 콜로니 형태 56
그림 6. KM46-A1의 포자사슬의 SEM 사진 57
그림 7. KM46-A1의 TLC 상의 DAP분석 66
그림 8. KM46-A1의 TLC 상의 당분분석 67

List of Figures

Fig. 1. Schemes for sample preparation from culture broth 20

Fig. 2. Inhibition of topoisomerase I by microbial samples tested by relaxation assay 43

Fig. 3. Inhibition of topoisomerase I by the fractions from KM46-A1 47

Fig. 4. Proton NMR spectra of flash column chromatography fractions of KM46-A1 50

Fig. 4. Continued 51

Fig. 4. Continued 52

Fig. 5. Morphology of colonies of KM46-A1 56

Fig. 6. SEM photograph of spore chains of KM46-A1 57

Fig. 7. TLC analysis of DAP isomer of KM46-A1 66

Fig. 8. TLC analysis of sugar from whole cell hydrolysate of KM46-A1 67

제 1 장 서 론

세계 의약품의 시장규모는 연간 1천5백억불 이상에 달하며 국내의약품 시장도 매출액기준 4조2천억원 이상에 달한다. 현재까지 세계의약품 산업은 특히 항생제 개발에 눈부신 발전을 보여 세균감염에 의한 질병의 퇴치에는 큰 기여를 하였으나 각종 암질환이나 AIDS 등 새로운 질병에 대하여는 치료제 개발이 시급한 실정이다.

해양생물은 해양이란 특이한 생태계를 이루는 환경때문에 육상생물과는 다른 대사산물을 생산하며 생리활성물질을 생산한다. 최근 G-7 선진국의 천연물 개발 동향은 해양생물을 신물실과 유용물질의 새롭고 중요한 원천으로 인식하여 육상환경에서 해양환경으로 범위가 확대되면서 집중적인 투자 및 연구개발 결과 6,000종 이상의 신물질이 해양에서 발견되었다. 생리활성도 측정 결과 이들 중 다수가 항암, 항바이러스, 항미생물, 효소저해, 면역억제등 다양한 생리활성효과를 갖고 있음이 밝혀졌다(Rinehart, 1988; Schmitz, 1993).

해양생물자원 중 생리활성물질의 원천으로 흥미를 끄는 대상 중의 하나는 해면이다. 해면은 다른 해양생물에 비해 sterols, alkaloids, halogenated acetogenins, phenolic compounds, terpenoids 등 여러 구조의 다양한 화학성분과 항생, 항바이러스, 항암활성 분야에서 다양한 생리활성을 갖는 물질을 생산한다고 보고되었다. 항암활성성분 중 해면에서 발견된 대표적인 종류로는 다음과 같은 것들이 있다(김영철 외, 1995; Schmitz, 1993). Aeroplysinin-1은 bromotyrosine 유도체로 *Aplysina aerophoba, A. cavenicola, A. archeri, Pseudoceratina crassa, Verongula rigida, Psammaphysilla purpurea* 등에서 분리되었다. Aplysinopsin은 tryptophan 유도체로 *Aplysinopsis* sp.와 *Smenospongia echia*에서 발견되었다. Acanthifolicin 은 카리브해역에서 채집된 해면 *Pandaros acanthifolium*에서 발견된 episulfide기를 함유한 polyether antibiotics구조를 가졌다. Okadaic acid는 일

본해역에 서식하는 *Halichondria okadai*와 카리브해역의 *H. melandocia*에서 분리되었다. Tedanolide는 *Tedania ignis*로 부터 분리된 macrolide로 lactone ring이 탄소골격 중간에서 형성하고 있는 구조를 갖고 있다. Discorhabdin은 *Latruncula* sp. 에서 발견된 bromotyrosine의 유도체로 Verongida 목에서 발견된 bromotyrosine 유도체와 달리 복잡한 구조를 갖고 있다. Calyculin A는 *Discodermia calyx*에서 분리되었다. Halicondrin 은 *Halichondria okadai*에서 발견되었으며 8개의 유도체 중 halicondrin B의 활성이 가장 강하며 특히 B16 melanoma에 대하여 효과가 아주 강하였다. Spongistatins는 *Spongia* sp.에서 분리된 macrolide로 NCI에서는 spongistatin I에 대하여 인체암세포를 athymic mouse에 이식하여 *in vivo* 항암효과를 검색하고 있다. 이외에도 *Theonella sp.*에서 분리된 misakinolide A, *Phakellia carteri*에서 분리된 halistatin 등이 있다.

해면의 생리활성성분은 해면의 공생미생물에 의해서 생산될 것이라고 가정되어 왔다. Stierle 그룹이나 Colwell 그룹들은 해면과 그 공생미생물과의 화학적 연관성을 밝히고 생리활성 물질이 공생미생물에 의해 생산됨을 발견한 선도적 그룹들이다(김영철 외, 1995). Stierle(1988)는 해면 *Tedanis ignis* 의 생리활성물질은 공생세균 *Micrococcus* sp. 에 의해 생성된다고 보고함으로써 이 가설을 증명하였다. Colwell등(1989)은 카리브해역에서 *Ceratoporella nicholsoni, Dysidea herbacea, Aplysina fistualris* 등의 해면을 채취하여 세균을 분리하고, 분리된 세균을 수리분류하고 암세포에 대한 세포독성을 조사하였다. 조사결과 특정한 해면에는 특정한 세균이 서식함이 발견되었는데, 즉 해면이 서식하는 수층에서 분리한 세균과는 다른 종류가 해면에서 분리되었다. 2 종의 *Vibrio* sp., 1 종의 *Aeromonas*, 1 종의 Actinomycetes유사 세균이 공생미생물로 분류되었다. 이러한 연구결과를 통하여 해면과 공생세균과의 관계는 chemical ecology의 한 모델로 유용약물이 미생물에 의해 생산되고 고등숙주생물이 이를 이용하여 다른 생물과의 화학방어작용에 사용할 수 있다는 생태계의 상호화학작용을 규명할 수 있었다. 또한 일본 MBI 에서는 해면으로부터 okadaic acid, halichondrin, calyculin등의 물질을 분리

하였는데 이러한 물질들이 해면자체에 의해서 생산되는 것이 아니라 해면공생미생물에 의해 생산된다고 밝혔으며, okadaxanthin, zeaxanthin, halixanthin을 해면 *Halichondria okadai* 의 공생세균에서 분리하였다(이, 1995).

장기적인 안목으로 해양 유래 생리활성물질 연구의 대상생물을 전망할 때 가장 중요한 생물로 지목되는 것은 해양미생물이다. 해양생물자원에서 발견된 다수의 유용한 생리활성 물질들이 해양미생물에서 기원하며 해양, 동식물에서 처음 발견되었던 많은 생리활성 물질들도 그 후 동식물에 공생하는 미생물에 의해 생산된다는 사실이 밝혀졌다(김영철 외, 1995). 또한 해양미생물의 장점은, 일단 대량배양조건이 확립되면 바로 생리활성 물질의 대량생산에 진입할 수 있다는 점이다. 해양천연물은 특성상 생리활성 물질의 대량생산 단계에 들어가면 자원확보의 문제점에 봉착하게 되는데 최근에는 양식 (aquaculture), 배양 (fermentation), 유전공학적인 방법, 및 화학합성 등의 방법으로 이의 해결을 활발히 시도하고 있다. 공생미생물의 대량배양을 통하여 생리활성물질의 대량생산의 문제점도 손쉽게 해결할 수 있는 차원에서도 해양미생물의 중요성은 더욱 크게 부각되고 있다.

본 연구에서는 우리나라 근해에서 채집되는 해면으로부터 미생물을 분리 배양하여 이들 균주에 대한 항암효과 검색을 실시하고 이렇게 검색된 균주 중에서 집중연구 대상을 선정하여 항암성분을 규명한다.

제 2 장 실험재료 및 방법

연구내용은 우리나라 근해 거문도 해역에서 SCUBA 다이빙에 의하여 다양한 종의 해면을 채집하여 공생미생물을 분리하였다. 이를 배양하여 조 추출물을 조제하여 항암효과 검색에 사용하였다. 공생미생물 시료에 대한 1차적인 항암효과 검색은 *in vitro* 에서 암세포주 P388D1 (murine leukemia), DLD-1 (human colon cancer)에 대한 세포독성능을 조사하였다. 세포독성물질 생산균주에 대하여 topoisomerase I 저해효과를 조사하여 항암물질 생산균주를 선별하였다. 선별균주가 생산하는 항암성분을 추출 분리하였다. 선별 공생미생물의 최적배양조건 조사를 위하여 온도, pH, 영양원 등에 따른 공생미생물의 성장속도 및 생화학적 특성을 조사하고 균주를 동정하였다.

2. 1. 균주분리, 배양 및 시료조제

거문도해역에서 1994년 10월에 채취한 해면으로부터 해양세균과 방선균을 분리하였다. 분리용 배지로 Marine agar 2216(Difco), 10분의 1로 희석한 Marine agar 2216(Difco), ISP 4 medium(Difco), Bransfield agar, Starch-casein agar를 사용하였다. 한천배지에 접종하여 30℃에서 14일에서 28일동안 배양하여 형성된 단일 colony를 순수 분리하였다.

분리된 균주는 glycerol 20% 용액에 넣어 영하 80 °C에 보존하여 생리활성물질 검색에 이용하였다.

세포독성 및 효소저해능 실험을 위한 시료제작과 모균주 보존 및 계대배양을 위해서 세균은 PYG배지를, 방선균은 변형된 Zobell 배지(SZ medium)를 사용하였다. 숙성된 해수를 넣어 사용된 PYG 배지와 SZ 배지의 조성은 아래와 같다.

* PYG medium

peptone	10.0 g
yeast extract	5.0 g
glucose	20.0 g
aged sea water	500 ml
dest.water	500 ml
pH 7.4	

* SZ medium

glucose	20.0 g
polypeptone	5.0 g
yeast extract	1.0 g
ferric phosphate	0.1 g
aged sea water	750 ml
dest. water	250 ml
pH 7.4	

해양세균을 PYG배지에 각각 접종하여 20℃에서 5일 내지 6일간 정치배양시키고 Folch용액($CHCl_3$:MeOH=2:1)으로 추출하여 Folch 층과 수층시료로 각각 분리 조제하였다(그림 1). 방선균은 숙성된 해수가 첨가된 변형 ZoBell배지(SZ배지)에서 30℃에서 7일간 150 rpm으로 진탕배양을 한 후 8,000 rpm에서 원심분리하여 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 ethylacetate 층과 수층으로 분리하였다. Folch 층과 ethylacetate 층은 진공농축기로 감압농축하였으며 각 시료는 eppendorf tube에 넣어 4℃에서 보관하였다. Folch 층 및 ethylacetate 층의 농축된 시료는 검색전 methanol을 넣어 사용하였다.

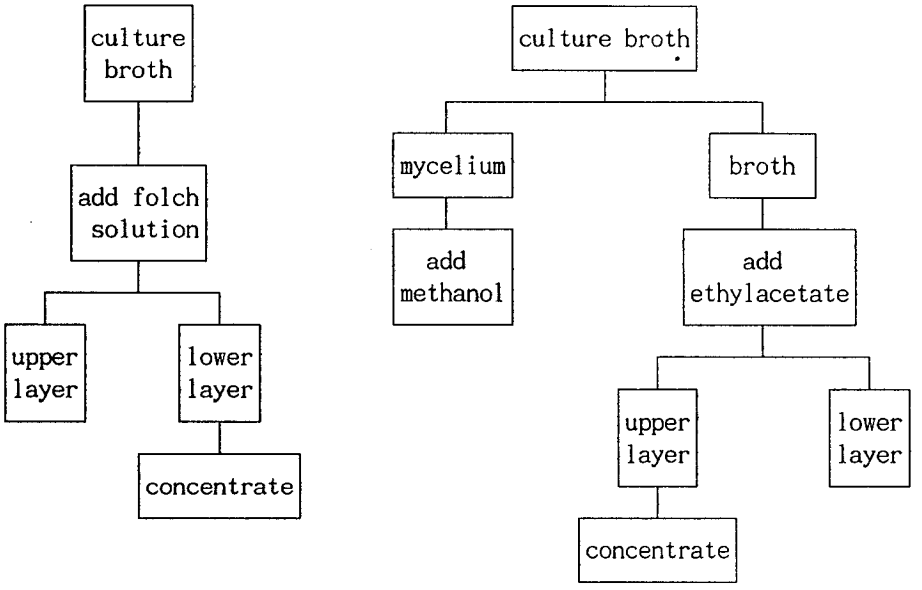


Fig. 1. Schemes for sample preparation from culture broth: (a) bacteria, (b) actinomycetes.

2. 2. 세포독성능 검사

실험에 사용한 세포는 한국 세포주 은행에서 분양받은 Human adenocarcinoma 인 DLD-1와 Mouse lymphoid neoplasm 인 P388D1을 사용했다.
실험에 사용된 배지와 혈청 그리고 항생제는 Gibco 제품을, 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma 제품을, culture flask는 Falcon 제품, 96 well plate는 Nunc제품을 사용하였으며, 세포 배양기는 Revco사의 CO_2 incubator를 사용하였다. 세포수 측정은 hemacytometer를 사용하였다. Microplate reader는 Molecular Device의 Thermo max제품을 사용하였다.

세포배양을 위해서는 실험에 사용된 세포인 DLD-1, P388D1은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 kanamycin이 20 μg/ml 들어 있는 RPMI 1640 배양액을 사용하여 25cm^2 flask에 넣어 37°C, 5% CO_2가 유지되는 항온기에서 배양하였다. 세포독성능 측정시 P388D1은 대수기의 세포를 1,500 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, PBS로 한번 세척한 후에 새로운 배양액에 $2x10^4$ cells/ml로 부유시켜 사용하였으며 DLD-1의 경우는 대수기에 monolayer를 이루도록 배양 시키다가 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 세포를 부유시키고 1,500 rpm으로 5분 동안 원심시킨 후 RPMI 1640 배지로 한번 세척한 후에 $4x10^4$ cells/ml로 부유시켜 사용하였다.

세포독성능의 측정은 Carmichael등의 MTT(methyl tetrazolium bromide) 측정법을 변형하여 사용하였다(Carmichael et al., 1987; Pauweis et al., 1988). 시료의 암세포독성능을 측정하기 위하여 96 well plate에 대수기에 도달한 P388D1 cell ($2x10^4$ cells/ml)과 DLD-1 ($4x10^4$ cells/ml)을 100 μl씩 접종하고 조추출물 시료를 각각 10배 연속희석하여 100 μl씩 접종하여 최종 volume이 200 μl가 되게 한 후 37°C에서 5% CO_2농도의 항온기에 5일간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 증류수에 녹인 MTT용액 (1.1 mg/ml)을 50 μl씩 각각의 well에 넣어준 후 37°C의 CO_2항온기에 4시간 동안 더 배양시켰다. 그 후 상등액을 버리고 150 μl의 dimethyl

sulfoxide를 넣고 5분동안 흔들어 formazon crystal을 잘 용해시킨 뒤 발색정도를 관찰하여 세포독성능을 판단하였다. 이 때 약품을 첨가하지 않은 배양원액의 발색을 대조군으로 비교하였다. 아무것도 처리하자않고 세포만 넣어서 배양한 well에서는 진한 보라색이 나타나며 세포가 모두 죽은 well에서는 투명에 가까운 옅은 보라색이 나타나는 것으로 세포독성능을 판정하였다. 0.5 μl/ml농도에서 세포독성능을 나타내는 시료들은 최종농도 0.05 μl/ml과 0.005 μl/ml까지 희석하여 세포독성능을 1차 검사하였다. 2차 세포독성능을 검사할 경우와 분획시료의 ED_{50} 값을 구할 경우는 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 OD를 측정하고 아래와 같은 방법으로 CRF(Cellular Response Function)값을 구하였다.

$$CRF = 100 \times \frac{T - Tz}{C - Tz} \qquad (T > Tz)$$

$$CRF = 100 \times \frac{T - Tz}{Tz} \qquad (T < Tz)$$

배양을 시작하는 시간에 수확된 cell에 MTT시약을 첨가한 well의 OD값을 Time Zero(Tz)로 하였다. 4일 배양 후 시료를 처리한 well의 OD값을 drug-treated test value(T)라 하였으며 시료를 처리하지 않고 cell만 있던 well의 OD값을 Control Value(C)라 하였다. Tz, T, C로 부터 여러 농도의 시료첨가에 따른 CRF 값을 구하고 이를 바탕으로 하여 ED_{50} 값을 구하였다.

2. 3. Topoisomerase I 저해능 검사

세포독성능을 나타낸 시료에 대해서 topoisomerase I 저해능이 있는지의 여부를 조사하기 위해 DNA relaxation assay를 실시하였다. Topoisomerase I 활성 측정 반응계의 조성은 아래와 같다.

* Topoisomerase I reaction mixture for DNA relaxation assay

2 X stock solution (100 mM Tris- HCl pH 7.9, 0.06 mg/ml of BSA, 200 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA)	10 μl
pBR 322 supercoiled DNA(100 ug/ml)	2 μl
Enzyme solution purified from Hela S_3 cell line(1 unit)	6 μl
Test sample	2 μl
Total	20 μl

반응 buffer 에 시료 2 μl와 topoisomerase I 조정제액 6 μl를 넣어 최종 volume 이 20 μl가 되도록 조정한 후 37℃에서 30분간 반응시킨후 5 x stop solution(5% SDS, 0.25% xylene cyanole FF, 0.25% BPB, 25% sucrose) 4 μl을 첨가하여 반응을 중지 시킨 후 1% agarose gel에 loading하여 100 volt로 한 시간 가량 전기영동 하였다. Ethidium bromide solution(1 μg/ml)에서 30분간 염색한 후 314 nm의 UV transiluminator에서 DNA band를 관찰하였다. 효소활성의 1 unit는 초나선형의 0.2 μg의 DNA를 30분동안 반응하여 완전히 이완된 형태로 전환시키는 효소량으로 정하였다.

2. 4. 생리활성물질의 추출 및 분리

NMR측정은 Varian Unity-500을 이용하였다. Proton NMR은 500 MHz에서 측정하였고 Varian사에서 공급한 software를 이용하였다. 천연물의 추출 및 분리에 사용한 용매와 시약은 모두 GR급을 그대로 사용하거나 EP급을 재증류하여 사용하였다.

실온에서 7 일간 배양한 방선균 균주 KM46-A1 배양액 2.5 liter를 원심분리하여 supernatant와 균체로 분리하였다. Supernatant는 ethyacetae로 추출한 후 감압증류하여 ethyacetae를 제거하였다. 균체는 methanol로 추출하였다.

C-18 reversed phase column chromatography 를 실시하여 총 9 개의 분획을 얻었으며 각 fraction별로 NMR을 사용하여 분석하였으며 그 생리활성도도 조사하였다. 기존에 알려져 있던 항암물질인 actinomycin D 유무 판정을 위해 silica gel $60F_{254}$ TLC plate(Merck 1.05715)를 이용하여 판정하였다. 각 균주들로부터 준비된 시료들과 메탄올에 녹인 1 mg/ml 농도의 actinomycin D를 TLC plate 에 점적한 후 ethylacetate-isopropyl alcohol-water(5:2:2) 전개용매를 이용하여 전개하였다. Actinomycin D 유무는 hand UV light(254 nm)에서 판정하였다(Gerald and Marvin, 1984).

2. 5. 선별균주의 동정 및 생리학적 특성조사

동정을 위한 화학분류학적 특성 조사는 세포벽의 DAP (diaminopimelic acid)의 이성질체와 균주 가수분해액의 당성분을 분석하였다. 생리 생화학적 특성 비교를 위한 시험항목은 Cross(1989) 및 Lechevalier 등이(1989) 사용한 Actinomycetes 동정 방법을 참조로 선별하였다. 멜라닌 색소형성, 탄소원 이용능, 유기산 이용능, 아미노산 이용능, 고분자 물질 분해능을 조사하였다. Catalase 존재여부 및 질산염 환원능, H_2S 생성능도 조사하였다. Penicillin등의 항생제에 대한 감수성도 조사하였다.

2. 5. 1. 형태학적 특성

선별균주 방선균 KM46-A1의 동정 및 생리 생화학적 특성을 조사하기 위하여 우선 형태적 특성을 관찰하였다. 군집형태와 색깔은 ISP 2 배지에서 30°C로 7일간

배양한 후 관찰하였으며 색소는 기균사, 기층균사 및 soluble pigment 색의 변화를 관찰하였다. ISP 2 배지에서 2주간 배양한 균은 8%의 glutaraldehyde용액으로 1일간 예비고정하였다. P_2O_5가 들어있는 밀폐용기에 agar block을 넣어 1일 이상 동결 건조한 후 Bio-Rad E5550 SEM coating system을 사용하여 gold coating한 후 주사전자현미경(Philips model 515)을 사용하여 포자의 표면구조, 포자사슬의 형태를 관찰하였다.

2. 5. 2. 성장을 위한 최적조건의 확립

KM46-A1 균주의 성장에 대한 pH, 온도, NaCl농도 등의 영향을 조사하기 위하여 SZ agar plate 배지를 사용하였다. pH는 5.0, 7.4, 10.0에서, 온도는 4℃, 20℃, 30℃, 45℃에서 검사하였다. NaCl 농도에 따른 성장특성은 각각 3%, 7%, 10%, 13%에서 실시하였으며 7일간 배양한 후 한천배지상에서의 성장상태를 관찰하였다. 여러가지 배지에서의 성장특성 및 최적배지를 조사하기 위하여 SZ 배지를 비롯하여 Shirling과 Gottlieb(1966)의 tryptone yeast extract agar medium, yeast extract malt extract agar medium, peptone yeast extract iron agar medium, tyrosine agar medium, inorganic salts starch agar medium, glycerol asparagine agar medium, starch casein agar medium(Atlas, 1993), 그리고 nutrient agar medium(Difco), potato dextrose agar medium(Difco)에 접종하여 30℃에서 배양하면서 7일, 14일 간격으로 생육정도, 기균사 및 배면색깔을 관찰하였다.

2. 5. 3. 생화학적 특성

여러가지의 당을 유일한 탄소원으로서 이용하는지의 여부를 실험하였다. 사용된 당의 종류는 glucose, D(-)-fructose, inulin, D(+)-xylose, D(+)-cellobiose, D(+)-arabinose, L-rhamnose, myo-inositol, D-mannitol, dulcitol, D(+)-melezitose, D(+)-mannose, D(+)-raffinose, lactose, maltose, dextrin,

D-galactose, D(+)-melibiose, salicin, adonitol 등이며 당을 포함하지않은 기본배지 [ammonium sulfate 1 g, potassium phosphate(dibasic) 7 g, potassium phosphate(monobasic) 2 g, magnesium sulfate 0.1 g, agar 20 g, pH 6.8-7.0, distilled water 1 L]에 10%의 당 용액을 최종농도가 1% 되도록 첨가하였다. 각 당의 용액은 121℃에서 3분간 멸균하였으며 30℃에서 7일간 배양한 후 당이 포함되어 있지 않은 것을 음성 대조군으로, 그리고 glucose가 포함된 것을 양성 대조군으로 하여 결과를 비교하였다(Lechevalier and Lechevalier, 1981).

유일한 질소원으로서 아미노산을 이용할 수 있는지의 여부를 검사하였다. 사용된 아미노산의 종류는 DL-tyrosine, DL-serine, DL-alanine, DL-histidine, DL-cystein, DL-valine, DL-phenylalanine, DL-proline, DL-leucine, DL-isoleucine, DL-threonine, DL-methionine, DL-aspartic acid, DL-asparagine, DL-glutamic acid, DL-glutamine, glycine, DL-arginine, DL-lysine, DL-cystine 이며 기본배지 [glucose 10 g, potassium phosphate(dibasic) 7 g, potassium phosphate(monobasic) 2 g, magnesium sulfate 0.1 g, agar 20 g, pH 7.4, aged sea water 750 ml, distilled water 250ml] 에 121℃에서 3분간 멸균한 1%의 아미노산용액을 최종농도가 0.1% 되도록 첨가하였다. 30℃에서 7일간 배양한후 아미노산이 포함되어있지 않은 것을 음성 대조군으로 하였으며, DL-asparagine이 포함된 것을 양성 대조군으로하여 결과를 관찰하였다(Locci, 1989).

유기산을 유일한 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는지를 검사 하였다. 사용된 유기산은 D-malate, citrate, pyruvate, benzoate, lactate, malonate이며 기본배지 [ammonium sulfate 1 g, potassium phosphate(dibasic) 7 g, potassium phosphate(monobasic) 2 g, magnesium sulfate 0.1 g, agar 20 g, pH 7.4, aged sea water 750 mL, distilled water 1 L]에 121℃에서 3분간 멸균한 10%의 유기산 용액을 최종농도가 1% 되도록 첨가하였다. 30℃에서 7일간 배양한 후 유기산이 포함되어 있지 않은 것을 대조군으로 하여 결과를 관찰 하였다(Locci, 1989).

고분자물질인 starch, gelatin, casein, urea, esculin 등의 분해능조사는 Jean(1980)에 의한 분석방법을 이용하였다. Casein은 nutrient medium에 첨가하였고 gelatin 분해능 관찰은 nutrient gelatin medium(Difco)을 사용하였다. Casein은 최종농도가 1% 되도록 첨가 하였으며 starch는 SZ 배지에 0.2%가 되도록 첨가 하였다. 30℃에서 7일간 배양한 후 gelatin은 저온에서 방치하여 기울여 보았을때 응고되지 않은것을 양성반응으로 하였으며 casein은 균체주위에 투명지대가 형성된 것을 양성반응으로 하였다. Starch는 iodine 용액을 떨어뜨린 후 투명지대가 형성되는 것을 양성반응으로 하였다. Urea 가수분해능을 관찰하기위해 Urea broth(Difco) medium에 균을 접종하여 30℃에서 7일간 배양한 후 배지의 색깔이 적색으로 변하면 양성으로 판정하였다. Esculin 가수분해능 조사를 위하여 Bile esculin agar배지(Difco)에 균을 접종하여 37℃에서 7일간 배양한 후 균체가 검은색으로 변하면 양성반응으로 하였다.

Phenol, potassium tellurite, sodium azide, crystal violet 등의 화학 저해제에 대한 성장특성을 조사하였다. SZ medium에 phenol 0.1%(v/v), sodium azide 0.01%(w/v), 0.02%(w/v), crystal violet 과 potassium tellurite는 0.01%(w/v), 0.001%(w/v)로 각각 첨가하여 30℃에서 7일간 배양한 후 성장상태를 관찰하였다 (Locci, 1989). Penicillin G, rifampicin, nalidixic acid, tetracyclin, vancomycin, streptomycin sulfate, novobiocin, neomycin, gentamycin, polymyxin B, 등의 항생제에 대한 저항성을 관찰하기 위하여 SZ medium에 위의 각 항생제들을 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml의 농도가 되도록 disk에 첨가하였고 penicillin G는 10 I.U, 100 I.U 농도가 되도록 첨가하여 37℃에서 7일간 배양한 후 disk 주위의 clear zone 형성 유무를 관찰 하였다(Locci, 1989).

효소 활성은 H_2S 생성능, nitrate 환원능, catalase생성능, lecithinase활성, lipase활성을 관찰하였다. H_2S 생성능은 triple sugar iron agar medium(Difco)에서 실시하였고, 30℃에서 7일간 배양한 후 균체가 검은색으로 변하면 양성반응으로 하였

다. Nitrate 환원능은 nitrate broth배지(Difco)에 agar를 2% 되도록 첨가하여 배양한 후 Griess-Ilosvay 시약을 첨가하여 붉은색의 색깔변화가 관찰되면 양성반응으로 하였다. 또한 catalase는 SZ medium에서 배양한 균체 주위에 3%의 H_2O_2를 떨어뜨린 후 기포의 형성이 관찰되면 양성반응으로 하였다. Lecithinase활성과 lipase활성은 0.5% egg yolk가 포함된 egg yolk medium 에서 30℃, 14일간 배양하여 관찰하였다. Colony 주위에 불투명대가 형성되면 lecithinase 양성으로 판정하였고 petri dish cover를 제거 한 후 간접조명하에서 colony주위와 주위 agar표면이 oily.진주빛 광택이나면 lipase양성으로 판정하였다(Robert and Noel, 1994).

2. 5. 4. 화학 분류학적 특성

세포벽의 peptidoglycan에 존재하는 diaminopimelic acid(DAP)와 전균체가수분해액의 당 분석을 위한 시료의 준비는 Staneck와 Roberts(1974)의 방법을 사용하였으며 TLC를 이용한 분석방법은 Schaal(1985)에 의한 방법을 이용하였다.

DAP의 분석을 위해 cap tube에 건조균체 약 0.5 g을 넣고 6 N HCl 2 ml을 넣은 다음 밀봉하여 100℃에서 18시간동안 반응시켰다. 그리고 Whatman No. 1 paper로 여과한 다음 vacuum evaporator로 80℃에서 감압건조 하였다. 여기에 1 ml의 증류수를 섞은 다음 다시 감압건조 하였다. 그리고 0.5 ml의 증류수에 녹인다음 cellulose F TLC plate(Merck 5565)에 점적하였다. 전개용매는 methanol-pyridine -10 N HCl-water (80:10:12.5:17.5)를 사용하였으며 발색은 0.2% ninhydrin (용매 acetone)을 분무하여 100℃에서 2분간 가열하였다. DAP의 판정은 표준시료(Sigma)와의 전개거리를 비교하여 나타내었다.

당분석을 위해 cap tube에 건조균체 약 0.5g을 넣고 2 ml의 2 N H_2SO_4을 넣은 다음 밀봉하고 100℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 centrifuge tube에 옮긴 다음 포화된 barium hydroxide 용액을 이용하여 pH가 5.0-5.5가 되도록 조정하였

다. 6,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 버리고 상등액은 vacuum evaporator로 80℃에서 감압건조하였다. 여기에 0.5 ml의 증류수를 넣어 녹인다음 cellulose F_{254S} HPLC plate (Merck 15036)에 점적하였다. 전개방법은 먼저 n-butanol-water-acetic acid (60:20:20)용액으로 6 cm 정도 전개한 후 건조하고 ethylacetate-pyridine-water- acetic acid (100:35:25:5)로 12 cm정도 전개한 후 건조하고 다시 2번째 전개용매로 2회 반복하여 전개하였다. 당의 발색은 aniline-phthalate시약(aniline 2 ml, phthalic acid 3.3 g, water saturated butanol 100 ml)을 분무한 후 건조하고 100℃에서 5분간 가열하였다. 당의 판정은 각각 1% 용액으로 만든 표준당과의 전개거리와 발색된 색을 비교하여 나타내었다.

지방산의 methylation에 사용된 methanolic HCl의 제조는 acetylchloride 30 ml 을 4℃로 식힌 메틸알콜 300 ml 에 천천히 부으면서 섞어 형성된 HCl이 메틸알콜에 용해된 용액을 제조하여 사용하였다. Folch의 방법에 의해 추출된 lipid용액 1 ml 에 methanolic HCl 2 ml 을 넣어 80°C 에서 2시간동안 반응 시켰다. 여기에 5 ml 의 5% NaCl 용액과 5 ml 의 hexane 을 넣고 혼합한 후 hexane층을 분리한 다음 nitrogen gas하에서 300 μl 까지 건조하여 농축시키고 TLC plate에 점적하였다. Hexane-diethyl ether가 9:1로 섞인 전개용매로 전개하고 fatty acid 부분을 긁어내어 chloroform 1 ml 로 다시 추출하여 시료로 사용하였다(Christie, 1982a). 지방산은 gas chromatography (oven temperature 195 °C, detector temperature 260 °C, injector temperature 250 °C, head pressure 5 psi, carrier gas N_2)로 분석하였으며 각 지방산의 peak는 표준시료와의 retention time과 ECL 값을 비교하여 동정하였다(Christie, 1982b, 1988).

제 3 장 연구결과 및 고찰

3. 1. 해양공생미생물의 생리활성물질 (문헌중심)

해양미생물은 생리활성물질의 새로운 제공자로 관심을 받고 있다. 해양미생물은 화학적으로 다양하며 생물학적으로 중요한 이차 대사산물을 생산하는데, 그 중 몇몇은 제약개발의 선도물질이나 생물과학의 기초연구를 위한 도구로 사용될 수 있다고 기대된다. 또한 해면, 강장동물, 연체동물 등의 해양무척추동물에서 분리된 생리활성물질 중 일부분은 실제로는 세균, 진균류, blue green algae, 조류, 편모조류 등의 공생미생물에 의해 생산된다고 보고되었다(Faulkner, 1992).

예로 홍조류, xantid crab, 복어에서 발견되는 tetrodotoxin의 실제 생산자는 해양미생물이라는 사실은 관심을 끌고 있다. 갑각류의 마비성 독인 saxitoxin은 편모조류인 *Gonyaulax*와 blue green algae *Aphanizomenon flos-aquae*에 의해 생산된다. 그람 양성 세균인 *Aalxll*은 일본 패류인 *Babylonia japonica*에 서식하는데 식중독의 원인인 surugatoxin의 실제 생산자이다. 단백질 인산화효소의 저해제인 okadaic acid는 해면 *Halichondria okadai*에서 분리되었는데 실제로는 편모조류인 *Prorocentrum lima*에 의해 생산됨이 밝혀졌다.

생리활성물질을 분리하기 위하여 무한정의 해양동물이나 해양식물을 채집하기란 불가능하다. 따라서 공생미생물의 분리 및 배양은 생리활성물질을 충분히 지속적으로 공급할 수 있는 방법으로서 매우 중요하다. 본 장에서는 지금까지 해양동물이나 식물의 공생미생물에서 분리된 대표적인 생리활성물질의 연구결과를 문헌중심으로 공생해양세균 및 진균류 그룹별로 정리하고자 하였다.

주로 인용한 논문은 1993년 Chemical Review에 실린 Kobayashi와 Ishibashi의 총설(Kobayashi and Ishibashi, 1993), Faukner의 해양천연물에 대한 총설(Faukner, 1992), Ireland 등(1993), Newman 등(1989) 및 Okami(1986)의 총설들을 참조로 해양공생미생물이 생산하는 생리활성물질을 요약하였다.

3. 1. 1. 세균

해양천연물학자들은 해면에서 생성된 생리활성성분에 대하여 집중적으로 연구해 왔다. 구조적으로 유사한 물질들이 다른 종의 해면에서도 발견되고 같은 종의 해면에서도 여러가지 다른 대사산물이 발견되었다. 이러한 현상뿐만 아니라 물질의 구조를 보면 해면에 서식하는 미생물들이 여러 생리활성물질 생산에 관여할 수도 있음을 시사하였다. 최근에는 해면에서 추출한 몇 종류의 이차대사산물이 해면에서 분리한 미생물의 배양액에서도 분리되었다. 버뮤다해에서 채집된 해면 *Tedania ignis*로부터 밝은 오렌지 빛깔을 띤 그람 양성균인 *Micrococcus*가 Cardellina 그룹에 의해 분리되었다(Stierle, 1988). *Micrococcus* sp.의 배양액에서 세종류의 **diketopiperazines(1-3)**가 분리되었는데 이 물질들은 이전에 *Tedania ignis*의 추출액에서 분리된 것과 같은 물질임이 밝혀졌다. *Micrococcus* sp.의 배양액에서 또한 네종류의 **benzothiazoles(4-7)**가 분리되었는데 benzothiazoles은 넌출월귤 cranberry의 휘발성 성분이며 차잎의 향내성분이다. Elyakov 그룹은 동사모아해에서 채집한 *Dysidea* sp.로부터 분리된 *Vibrio* sp.가 brominated diphenyl ethers를 생합성한다고 밝혔는데, **3,5-dibromo-2-(3′,5′-dibromo-2′-methoxyphenoxy)phenol(8)**은 이전에 *Dysidea* sp.의 추출물에서 발견된 물질이었다. Kobayashi 그룹은 일본해면 *Halichondria okadai*에서 *Alteromonas*를 분리하였는데 이 세균의 균체에서 macrocyclic lactam계열의 물질 **alteramide A(9)**를 분리하였다. 이 물질은 세포독성을 나타내는 물질로 P388, L1210, KB 세포에 대한 IC_{50} 값은 각각 0.1, 1.7, 5.0 μg/mL였다. Alteramide A를 화학반응시키면 작은 fragment가 생산되기도 하였는데 오존처리한 후 $NaBH_4$ reduction 및 acetylation 과정을 거쳐 **bicyclo[3.3.0]octane derivative(10)**가 생산되었으며 오존처리 및 H_2O_2 산화반응을 통하여 **β-hydroxyornithine(11)**가 획득되었다. 또한 Alteramide A내의 두개의 diene 그룹에 photochemical [4+4] cycloaddition결과 **hexacyclic compound (12)**이 생성되었다. Alteramide A는 육상 *Streptomyces* sp. 가 생성하는 항생제 **ikarugamycin(13)**이나 카리브해에서 채취된 해면

*Discodermia dissoluta*에서 분리한 항진균효과와 세포독성능을 나타낸 물질 **discodermide(14)**과 그 생합성경로가 유전적으로 연관되었다고 볼 수 있다. 아울러 Alteramide A가 해면에서 분리된 세균에서 분리되었다는 사실로 미루어 discodermide도 그 유래가 미생물에 기인한다고 추정된다.

해면 이외의 공생미생물로부터 분리된 생리활성물질들을 보면 열대지역에 서식하는 산호 *Pacifigorgia* 표면에서 분리한 방선균 *Streptomyces* sp.(strain PG-19)가 생산하는 **octalactin A(15), octalactin B(16)**를 들 수 있다. Fenical 그룹에서 발견한 이 물질들은 육상세균에서는 분리된 적이 없는 특이한 saturated eight-membered lactone function 그룹을 갖고 있는데 lactone ring은 solid 상태에서 *cis* lactone의 boat-chair 구조를 갖고 있다. Octalactin A는 강한 항암효과를 나타내는데 세포독성능 조사 결과 B-16-F10 murine melanoma 및 HCT-116 human colon tumor cell lines에 대한 IC_{50}가 각각 0.0072, 0.5 μg/ml로 나타났다. 반면 octalactin B는 세포독성능 검색결과 전혀 활성을 나타내지 않는다고 보고되었다. Fenical 그룹은 또한 새우 *Palaemon macrodactylus*의 embryo로부터 세균 *Alteromonas* sp.를 분리배양하여 **2,3-indolinedione 즉 isatin(17)**이란 물질을 분리하였다. 이 물질은 *P. macrodactylus*에 질병을 일으키는 lower fungus인 *Lagenidium callinectes*에 대하여 탁월한 항진균 효과를 갖고 있으나 숙주인 *P. macrodactylus*에 대해서는 무해함이 밝혀졌다(Gil-Turnes et al., 1989). Lower fungi에 의하여 알이나 유충에 주로 발생하는 이 질병은 치사율이 매우 높아 무척추동물 수산양식에 큰 피해를 가져오는 경우가 많은데, 유충에 이 *Alteromonas* sp. 를 접종하거나 2,3-indplinedione을 투여할 경우 곰팡이에 감염되지 않고 생존율이 높은 것으로 나타났다. *Alteromonas* sp.와 *P. macrodactylus*간에는 정밀한 생태학적 실험에 의하여 공생관계가 있다고 규명되었다. 이외에도 독소로는 연체동물 *Babylonia japonica*의 소화선에서 분리된 Coryneform 세균으로부터 surugatoxins가 분리되었으며, Palytoxin은 Zoanthid *Palythoa toxica*에서 분리된 가장 치명적인 비단백질성 marine toxin으로 *P. tuberculosa, P. mammilosa*와 같

은 다른 종에서도 발견되는데 이 독소는 공생세균에 의해 생산되기 때문에 계절적으로 그 농도가 변화된다고 보고되었다.

3. 1. 2. 진균류

해양 진균류는 성장속도가 느리고 배양이 어렵기 때문에 일반 세균이나 방선균에 비해 생리활성성분연구가 상대적으로 적게 진척되었다. 그러나 새로운 탄소골격과 생리활성도를 지닌 phomactin이 발견되면서 생리활성물질의 주요한 자원으로 관심을 끌고 있다. Sankyo 그룹의 연구자들은 일본 Fukui현 해안에 서식하는 게 *Chionoecetes opilio* 껍질에서 deuteromycetes류 *Phoma* sp.를 분리하였는데 이 불완전진균류의 배양액에서 **Phomactins A(18), B(19), B_1(20), B_2(21)**가 분리되었다. Phomactin은 3중고리의 diterpenoids로 platelet-activating factor(PAF) antagonist로 PAF-induced platelet aggregation을 억제한다. Phomactins A는 adenosine diphosphate-, arachidonic acid-, collagen-induced platelet aggregation에는 효과가 없는 것으로 나타나 새로운 형태의 PAF antagonist로 여겨진다. 일본 Kanahawa현에서 수집한 어류 *Apogon endekataenia*의 내장에서 *Penicillium fellutanum*가 분리되었는데 이 진균류의 균사로부터 **Fellutamides A(22), B(23)**가 분리되었다. Fellutamides A와 B는 lipophilic tripeptides로 세포독성능이 강한 물질로 murine leukemia P388에 대한 IC_{50}는 0.2 및 0.1 μg/ml이고 L1210에 대하여는 IC_{50} 0.8, 0.7 μg/ml, 그리고 human epidermoid carcinoma KB에 대하여는 IC_{50} 0.5, 0.7 μg/ml을 나타냈다. 또한 Fellutamides A와 B는 구조적으로 nerve growth factor(NGF) 합성을 자극하는 활성을 가진 leupeptines와 구조적으로 관련이 있다. Numata 그룹은 어류 *Pseudolabrus japonicus*의 장에서 *Aspergillus fumigatus*을 분리하였다. 이 진류의 균사에서 분리된 **Fumiquinazolines A(24), B(25), C(26)**는 quinazoline유도체로 P388 lymphocytic leukemia cells에 대하여 세포독성능을 나타내었다. 해조류에 공생하는 진균류로는 Salt marsh grass *Spartina alterniflora*로부터 Gloer그룹에 의해 분리된 *Leptosphaeria obiones*로 호

염성 ascomycete이다. 아 균주는 매우 강한 brine shrimp toxicity를 보였는데 배양액에서 polyketide 구조의 물질인 **Obionin A(27)**이 분리되었다. Obionin A는 dopamine D-1 selective ligand ^{3}H-SCH 23390가 bovine corpus striatum membrane에 결합하는 것을 저해하는 활성을 갖고 있다고 보고되었다. Gloer 그룹은 또한 Hawaiian mangrove에서 ascomycete인 *Helicascus kanaloanus*를 분리하였는데, 이 진균으로부터 isomeric δ-lactones에 속하는 **Helicascolides A(28), B(29)**가 분리되었다. 이러한 구조의 대사물질은 육상유래의 균류에서는 발견된 적이 없는 물질인데 이러한 사실은 해양 진균류가 육상유래의 물질과는 전혀 다른 물질의 공급원으로 매우 중요한다는 것을 증명해주고 있다. 해양동식물과 공생관계인 세균, 방선균, 진균류에 의해 생산되는 생리활성물질 중 본문에 있는 물질 **(1)**부터 **(29)**의 구조식을 표시하였다.

3. 1. 3. 쌍편모조류 및 미세조류

쌍편모조류, 부유성 남조류, 규조류 등의 식물플랑크톤은 실험실에서 배양하기 어려운 종이 많고 이차대사물질의 생성율이 낮기 때문에 연구가 별로 이루어지지 않았다. 쌍편모조류가 수산업분야에서 막대한 피해를 초래하는 적조현상을 유발하기 때문에 이에 대한 연구가 중점적으로 이루어져서 상대적으로 다른 미세조류에 대한 연구의 진전이 느린 편이었다. 그러나 식물플랑크톤의 대사물질이 구조가 특이하며 다양하고 강력한 생리활성도를 나타낸다고 밝혀짐으로써 이들 미세조류가 차지하는 중요성이 높아졌다.

공생조류에 의해 생산되는 것으로 밝혀진 물질로는 편충 flatworm *Amphiscolops*의 공생 dinoflagellate인 *Amphidinium* 가 생산하는 **Amphidinolides A, B, C, D, E, F, G, H**인데 이들은 macrolide계열의 물질로서 세포독성능을 지니고 있다. Nakamura그룹은 오키나와해역에 서식하는 flatworm *Amphiscolops*에서 공생하는 *Symbiodinium*를 분리하였는데 이 zooxanthella 배양액에서 분리된 **Zooxanthellatoxins A, B**는 고불포화 polyol의 sulfate ester로 혈관의 수축반응

을 유도하는(vasoconstrictive)활성을 갖고 있다고 보고되었다. 이러한 contractile response은 sodium channel blockerdls tetrodotoxin, histamine antagonists, serotonin antagonists에 의해 영향을 받지 않으나 verapamil, magnesium chloride 와 같은 calcium antagonists에 의해 두드러지게 억제된다고 보고되었는데 이러한 vasoconstrictive activity는 막을 통한 calcium permeability의 증가에 의한 결과라고 추정되었다. 오키나와해역에 분포하는 쌍각류의 조개인 *Fragum* sp.에서 분리한 *Symbiodinium*로부터 **symbioramide**가 분리되었다. 이 sphingosine 유도체는 L1210에 대하여는 약한 세포독성능을 보인 반면 sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+}- ATPase activator의 효능이 있다고 보고되었다. SR 막의 Ca^{2+}- ATPase는 Ca^{2+}을 cytoplasm에서 SR의 lumen으로 pumping하는 것을 촉진함으로써 근육의 이완작용의 중요한 역할을 한다. Symbioramide는 해양에서 유래된 최초의 SR Ca^{2+}- ATPase activator인데 SR Ca^{2+}- pumping systems의 조절기작연구를 위한 화학적 도구로서도 아주 중요하다. Symbioramide의 α-hydroxy-β,γ-dehydro fatty acid는 천연물에서 드물게 발견되는데, 해면 Dysidea etheria로부터 α -hydroxy fatty acid의 ceramides가 분리된 적이 있다. 해면은 공생미생물을 보유하는 것으로 알려졌는데 따라서 이 해면에서 분리된 ceramides는 미생물 기원이라고 추정되었다. Soft coral도 공생미세조류를 많이 포함하고 있다. 오키나와해역에 서식하는 *Sarcophyton* sp.에서 diterpene계의 **16- deoxysarcophine**이 분리되었다. 이 물질은 해양에서 발견된 최초의 nonalkaloid compound 이며 Ca^{2+} antagonistic activity를 갖고 있는데, 실제의 생산자는 공생 쌍편모조류인 *Symbiodinium* sp.로 밝혀졌다.

Haptophyceae는 현미경으로나 관찰될 수 있는 단세포 조류로 해양 식물플랑크톤의 주요 구성원이다. 오키나와해역에 서식하는 cylindrical stony coral에서 Haptophyte인 *Hymenomonas* sp.를 분리하여 *Amphidinium* spp.와 동일한 방법으로 배양시켰다. 그 결과 해양미세조류에서 처음으로 sterol sulfate이 발견되었는데 이 **Hymenosulfate**은 강력한 SR Ca^{2+}- releasing activity를 지니고 있는데 예로

Ca^{2+} releaser로 알려진 caffeine보다 10배 이상 강하게 작용한다고 밝혀졌다. 이 Haptophyte를 톨루엔으로 추출할 경우 그 주성분은 glycolipids로서 **monogalacto syldiacylglycerols, digalactosyldiacylglycerols**로 나타났다. 클로로포름으로 추출할 경우에는 주성분은 **octadecatetraenoic acid**이며 소량의 **monogalactosyl monoacylglycerols**이 검출되었다. 이 세가지의 glycolipids는 Na^+, K^+-ATPase의 활성을 억제한다고 밝혀졌다. **Debromaplysiatixdin**은 sea hare *Stylocheilus longicauda*의 소화관에서 발견되었으나 이 물질의 원래의 생산자는 sea hare의 먹이인 남조류 *Lyngbia majuscula*로 밝혀졌다.

3. 1. 4. 공생미생물유래라고 추정되는 해양천연물

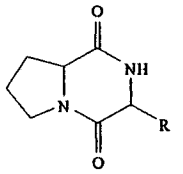
다양한 해양생물로부터 최근에는 tetra-, pentacyclic aromatic alkaloids들이 많이 분리되고있다. 해면의 경우 **amphimedine**(*Amphimedon* sp), **dercitin**(*Dercitus* sp.), **petrosamine**(*Petrosia* sp.)가, tunicates로부터는 **ascididemin**(*Didemnum* sp.), **cystodytins**(*Cystodytes* sp.), **segolines**(*Eudistoma* sp.)등이 발견되었으며, sea anemone으로부터는 **calliactine**(*Calliactis* sp.)이 분리되었다. 이들 alkaloids는 여러 해양생물에서 분리되었지만 공통적으로 **tetracyclic ring system** (pyrido[4,3,2-*mn*]acridine skeleton 또는 benzo-3,6-diazaphenanthroline ring)을 갖고 있기 때문에 공생미생물에 의해 생산되는 물질이 아닌가 추정된다.

Fiji의 Wakaya섬에 서식하는 tunicate *Clavelina* sp.에서 분리된 pyrroloimino quinone alkaloid인 **wakayin**은 세포독성능, 항세균작용, topoisomerase II 저해능 및 DNA를 손상시키는 활성을 가지고 있다고 보고되었다. Wakayin의 구조는 해면 *Latrunculia* sp.에서 분리된 **discorhabdin C**나 *Prianos melanos*에서 분리된 **prianosin A**와 밀접하게 관련되어 보인다. 생합성과정에서 wakayin는 두 분자의 tryptophane에서 유래되는 반면에 discorhabdin과 prianosin A는 tyrosine과 tryptophan에서 생합성되는데, 이렇게 유사한 biogenetic origin을 가진 물질들은 공생미생물에 의해 생성된다고 추정된다.

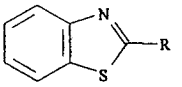
해면 *Reniera*와 *Xestospongia*로부터 isoquinoline quinone alkaloids인 **renierone, mimosamycin, renieramycine E, renierol**가 분리되었다. Tunicate에 속하는 *Ecteinascidia turbinata*로부터는 이와 유사한 tetrahydroisoquinoline alkaloids인 **ecteinacidins**이 분리되었다. Mimosamycin은 방선균 *Streptomyces lavendulae* no.314에서 처음 분리되었다. 이 토양방선균은 **saframycin B**를 생산하기도 하는데 saframycin b는 renieramycin과 ecteinacidins과 유사한 구조를 갖고 있다. 따라서 이러한 alkaloids는 공생미생물에 의해 생합성될될 수 있다고 여겨진다.

해면과 tunicate에서 분리된 많은 이차 대사산물이 공생하고 있는 미생물에 의해 생산된다고 여겨지는데 대표적인 예가 macrolide와 peptide계열의 물질이다. 해면 *Theonella*에서 분리된 세포독성능이 강한 macrolides인 **swinholide A**와 **bistheonelide A** 및 해면 *Halichondria* sp.에서 분리된 **halichondramide** 같은 macrolides도 공생하는 남조류에 의해 생합성된다고 추정되고 있다. Tunicate *Eudistoma* cf. *rigida*에서 분리된 **iejimalides A-D**는 24-membered macrocyclic lactone ring을 가진 macrolides로 그 유래가 미생물이라고 추정된다. *Theonella*는 다양한 구조의 생리활성물질을 생산하는데 cyclic peptides나 peptide lactone 계열의 물질도 생산된다. 이러한 물질은 구조적 특성으로 특이한 아미노산이나 D형의 아미노산을 가지고 있기 때문에 공생미생물들에서 유래되었다고 유추된다. 이러한 예로 *Theonella*에서 분리된 **Theonellapeptolide Id**는 메틸기와 D형의 아미노산을 많이 포함하고 있는 peptide lactone으로 Na^+, K^+-ATPase를 저해한다. 이외에도 calmodulin antagonist인 **Konbamide**와 SR Ca^{2+}ATPase 저해제인 **Keramamide A**는 ureido bond를 가진 cyclic peptide로, ureido bond를 가진 펩타이드는 이전에 육상미생물에서 분리된 적이 있다. **Keramamides B-D**와 **Keramamide F**의 경우도 cyclic peptides인데 halogen화 된 tryptophan 유도체나 α-oxo-β-amino acids와 같은 특이한 아미노산을 포함하고 있다.

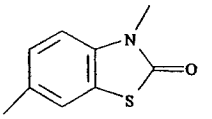
이상과 같이 해양공생미생물은 다양한 생리활성물질의 생산자로 밝혀졌으며 의약품 개발에 있어서 신물질 탐색의 중점적인 대상으로서 그 가치가 높다.



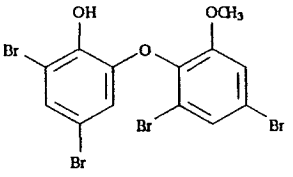
1 R=CH2CH(CH3)2
2 R=CH(CH3)2
3 R=CH3



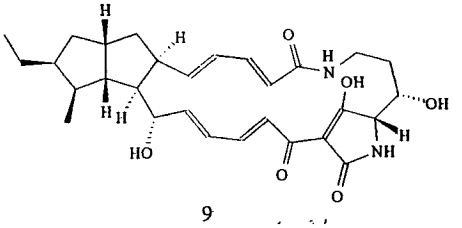
4 R=SH
5 R=CH3
6 R=OH



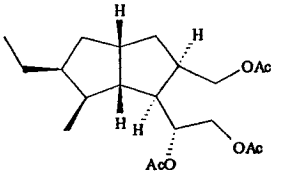
7



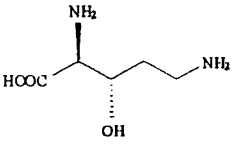
8



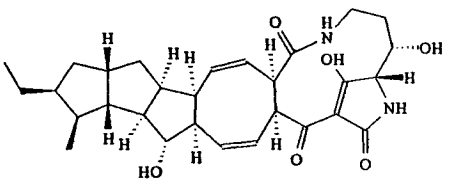
9



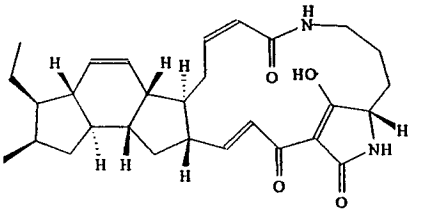
10



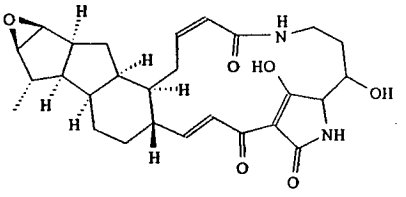
11



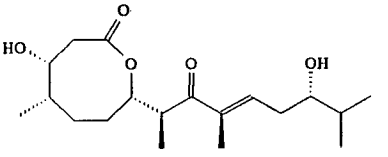
12



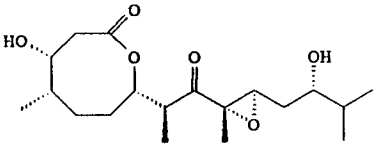
13



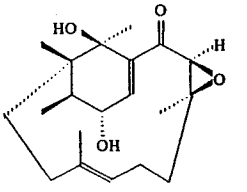
14



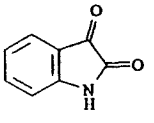
16



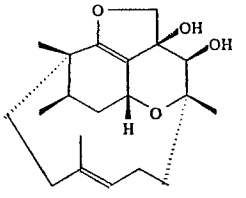
15



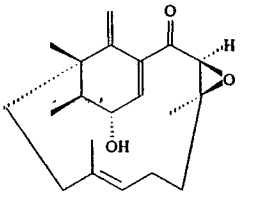
19



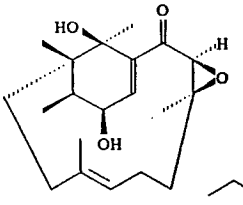
17



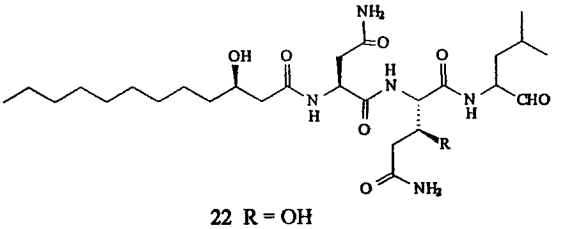
18



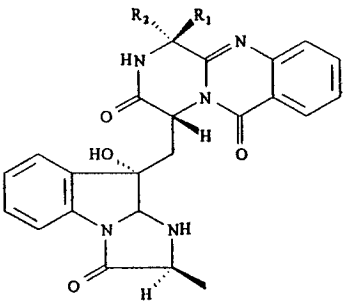
21



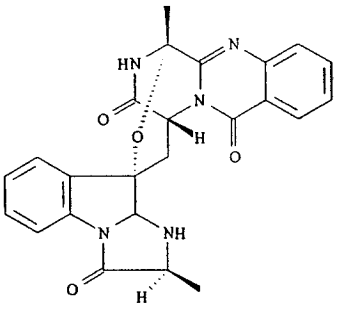
20



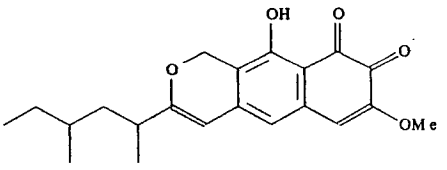
22 R = OH
23 R = H



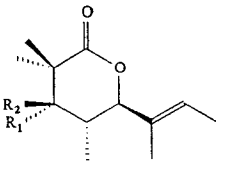
24 R1 = Me, R2 = H
25 R1 = H, R2 = Me



26



27



28 R1 = OH, R2 = H
29 R1 = H, R2 = OH

3. 2. 항암활성물질 생산균주 선별

종양세포 Human adenocarcinoma 인 DLD-1와 Mouse Lympoide neoplasm 인 P388D_1을 사용하고 시료는 방선균의 농축된 ethylacetate 층은 200 ㎕의 methanol에 용해시키고 세균의 농축된 Folch solution 층은 100 ㎕의 methanol에 용해시켜 세포독성검사에 사용하였다.

해양세균시료와 방선균시료에 대하여 DLD-1과 P388D_1에 대한 MTT assay를 실시한 결과 표 1과 같은 균주들이 세포독성물질을 생산하는 균주로 선별되었다.
선별균주 중 TLC상 Actinomycin D와 같은 spot의 물질을 생산하는 균주는 선별대상에서 제외하였다. 예비실험에서 방선균의 배양액을 균체와 media로 분리하여 균체는 acetone으로 추출하고 media는 ethylacetate로 추출하였다. 균체의 acetone 추출액, media의 ethylacetate 추출액, 그리고 나머지 media의 수층에 대해서 P388D_1, DLD-1에 대한 암세포독성 및 topoisomerase I에 대한 저해활성을 검색하였다. 일반적으로 ED_{50}값이 20 μg/ml 미만인 경우 그 추출물은 활성이 있는 것으로 보고된 바(Dunn, 1994), 2차 세포독성능 측정 결과 KM86-9B와 KM46-A1균주는 각각 ED_{50} 값이 4.8 μg/ml로 나타나 세포독성능이 높은 것으로 나타났다. Topoisomerase I relaxation assay 결과 KM46-A1, KM86-9B, KMY 가 topoisomerase I 저해물질을 생산하는 균주로 판별되었다(Fig. 2.).
균주 KM46-A1는 균체와 배양액 중 수층에서 topoisomerase I 저해물질이 있으며 각 층의 항암활성도는 표 2에 요약하였다. 표 2와 그림 2에 나타난 결과를 미루어 KM46-A1을 대량배양하여 그 균체를 수집하여 물질 정제를 할 필요가 있는 균주로 판단되었다.

Table 1. Strains with cytotoxic activity.

	bacteria		actinomycete	
number of tested strains	294		8	
number of tested samples	588		24	
cell line	$P388D_1$	DLD-1	$P388D_1$	DLD-1
strains	KM-74-3	KM-74-3	KM-86-9B	KM-86-9B
	KM-41-6	KM-78-2	KM-46-A1	KM-46-A1
	KM-66-1	KM-58-2	KMY	KMY

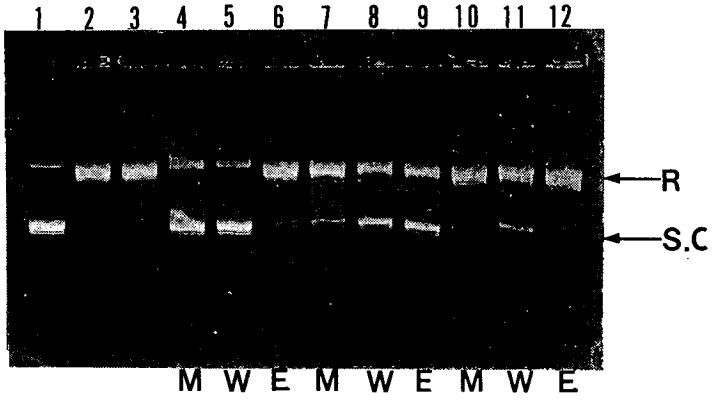


Fig. 2. Inhibition of topoisomerase I by microbial samples tested by relaxation assay.

Lane 1: pBR322 DNA(0,2 μg/ml) alone

Lane 2: pBR322 DNA(0,2 μg/ml) alone, topoisomerase I(1 unit)

Lane 3: pBR322 DNA(0,2 μg/ml) alone, topoisomerase I(1 unit), methanol

Lane 4, 5, 6: Strain KM46-A1

Lane 7, 8, 9: Strain KM86-9B

Lane 10, 11, 12: Strain KMY

M: methanol phase W: water phase E: ethylacetate phase

R: relaxed form S.C.: supercoiled form

Table 2. Anticancer activities of the fractions from KM46-A1.

samlpes	cytotoxicity*	topoisomerase I inhibiting activity	actinomycin
acetone extract of mycelium	$P388D_1$: 4.8 μg/ml DLD-1: >30 μg/ml	+	not detected.
ethylacetate extract of media	n.a.	-	not detected
water phase of media	n.a.	+	not detected

n.a.: not active

$P388D_1$: Mouse lymphoid neoplasm

DLD-1: Human colon adenocarcinoma

* Numbers refer to ED_{50}

(an extract was considered as active if the ED_{50} was <20)

3. 3. KM46-A1의 항암활성물질 성분연구

KM46-A1 균체의 acetone 추출액에서는 P388D$_1$ 암세포독성 및 topoisomerase I 저해효과가 관찰되었고 media 수층에서는 topoisomerase I 저해효과가 관찰되었다. 예비실험 결과에 근거하여 KM46-A1을 다량 배양하여 시료를 확보한 후에 균체의 acetone 추출액에 대하여 집중적으로 성분연구에 들어갔다.

KM46-A1의 배양액 2.5 liter 에서 균체(13.62 g)와 media를 따로 분리하여 균체를 acetone으로 추출하여 224.7 mg의 residue를 얻었다. Actinomycetes에서 흔히 발견되는 actinomycins는 항암물질로서 DNA의 deoxyguanosine에 결합하여 RNA합성을 방해하고 topoisomerases를 억제하는 것으로 보고되어 있다(Wingard et. al., 1991). 기존에 알려져 있는 Actinomycin 계통의 물질이 아닌 novel compound를 탐색하기 위하여 early screening 단계에서 silica gel 60F$_{254}$ TLC plate상에서 actinomycin의 존재유무를 검색하였다. 254 nm의 UV light에서 비교시 KM46-A1 균주의 모든 시료층에서 actinomycin과 동일한 spot이 검출되지 않았으므로(Table 2) actinomycin과는 다른 생리활성물질을 보유할 가능성이 큰 것으로 나타났다.

항암활성이 나타나는 균체의 추출물에 대하여 성분조사를 실시하기 위해 우선 C-18 reversed phase column chromatography 를 실시하여 총 9 개의 분획을 얻었으며 분리조건은 아래와 같다.

Fr.1	MeOH:H_2O (4:1)	25 mg
Fr.2	MeOH:H_2O (4:1)	14.7 mg
Fr.3	MeOH:H_2O (4:1)	6 mg
Fr.4	MeOH:H2O (10:1)	37.6 mg
Fr.5	MeOH	28.5 mg
Fr.6	EtOAc	86.6 mg
Fr.7	EtOAc	24.9 mg
Fr.8	CH_2Cl_2+hexane	0.9 mg
Fr.9	hexane	3.6 mg

각 분획에 대하여 암세포독성 및 topoisomerase I 저해활성시험을 한 결과는 Fig. 3 및 Table 3 와 같다. Positive control로는 doxorubicin과 camptothecin이 각각 사용되었다.

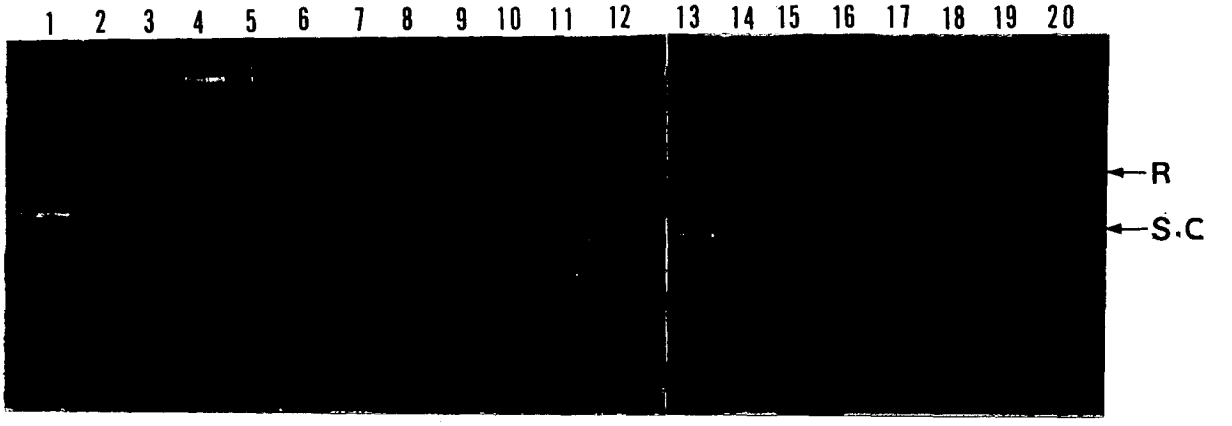


Figure. 3. Inhibition of topoisomerase I by the fractions from KM46-A1.

Lane 1: pBR322 DNA(0.2 μg/ml) alone
Lane 2: pBR322 DNA(0.2 μg/ml), topoisomerase I(1 unit)
Lane 3: pBR322 DNA(0.2 μg/ml), topoisomerase I(1 unit), methanol
Lane 4: pBR322 DNA(0.2 μg/ml), topoisomerase I(1 unit), camptothecin(350 μg/ml)
Lane 5; Fr.A(1000 μg/ml), Lane 6; Fr.A(10 μg/ml), Lane 7: Fr.1(1000 μg/ml)
Lane 8: Fr.1(10 μg/ml), Lane 9: Fr.2(1000 μg/ml), Lane 10: Fr.2(10 μg/ml)
Lane 11: Fr.3(1000 μg/ml), Lane 12: Fr.3(10 μg/ml), Lane 13: Fr.4(1000 μg/ml)
Lane 14: Fr.4(10 μg/ml), Lane 15: Fr.5(1000 μg/ml), Lane 16: Fr.5(10 μg/ml)
Lane 17: Fr.8(1000 μg/ml), Lane 18: Fr.8(10 μg/ml), Lane 19: Fr.9(1000 μg/ml)
Lane 20: Fr.9(10 μg/ml), R: Relaxed form DNA, S.C: Supercoiled form DNA

Table 3. Biological activities of the fractions from KM46-A1.

fractions	cytotoxicity against P388D$_1$*	topoisomerase I inhibition at 1000 μg/ml
Fr.1	n.a.	-
Fr.2	n.a.	-
Fr.3	10	+
Fr.4	n.a.	+
Fr.5	0.4	+
Fr.6	0.12	-
Fr.7	n.a.	-
Fr.8	n.a.	-
Fr.9	n.a.	-
doxorubicin	3	n.t.
camptothecin (350 μg/ml)	n. t.	+

* : ED_{50} (μg/ml).

n.a.: not active.

n.t.: not tested.

검색결과 분획 3-5에 걸쳐 유의성 있는 topoisomerase I 저해활성이 관찰되었으며 분획 5-6 에서 암세포독성이 관찰되었다. 각 분획에 대하여 대체적인 ^{1}H nmr spectral pattern을 측정하여 분석하였다 (Figure 4). Topoisomerase I 저해활성이 나타나는 분획 3-5는 모두 유사한 ^{1}H nmr spectral pattern 을 보여주었다. 이들 분획의 주성분은 모두 동일계열 물질로서 terminal dimethyl group을 가지고 있는 fatty acid류(iso series)로 추정되었다. 특징적으로 0.9 ppm 정도에 terminal dimethyl group이 doublet(**h**)으로 나타났으며 이와 coupling된 methine proton이 1.5 ppm 정도에서 septet(**e**)으로 나타났다. 1.5 ppm 의 septet과 coupling된 methylene proton은 1.16 ppm 정도에서 multiplet(**g**)으로 나타났다. 그리고 2.28 ppm 정도에서 carbonyl group에 이웃한 methylene proton이 triplet(**c**)으로 보였으며 이와 coupling 된 methylene proton이 1.6 ppm 정도에서 multiplet(**d**)으로 나타났다. 그리고 나머지 chain methylene proton 들이 1.3 ppm 부근에 겹쳐서 나타났다(**f**). 암세포독성이 검출된 분획 6의 ^{1}H nmr spectral pattern은 upfield 부분이 분획 3-5와 서로 유사하여 공통된 부분구조를 가진 물질이 주성분임을 알 수 있었다. 분획 3-5에서 나타났던 **c**, **d**, **e**, **f**, **g**, **h**의 signal들을 볼 수 있었으며 5.28 ppm, 4.26 ppm, 4.17 ppm 등에서 추가 signal 들이 관찰되었다. 분석 결과 4.26 ppm 과 4.17 ppm의 proron 은 서로 coupling 되어있으며 이들은 다시 5.28 ppm 의 signal과 각각 coupling 되어있음을 볼 수 있었다. 그러므로 분획 6의 주성분은 triglyceride로서 glycerol에 3 분자의 iso fatty acid가 ester 결합을 하고있는 구조임을 알 수 있었다. 그리고 5.35 ppm, 2.0 ppm에서 약하게 나타나는 signal 들로 미루어보아 chain 중간에 이중결합을 가지고 있는 fatty acid가 free acid 또는 glyceride의 형태로 미량 존재함을 알 수 있었다. 활성은 나타나지 않았지만 분획 7도 분획 6과 유사한 ^{1}H nmr spectral pattern을 보이는 것으로보아 triglyceride가 주성분으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

이들 활성분획에 대해서는 다시 활성성분을 순수분리하여 구조를 확인하는 작업을 진행중이다.

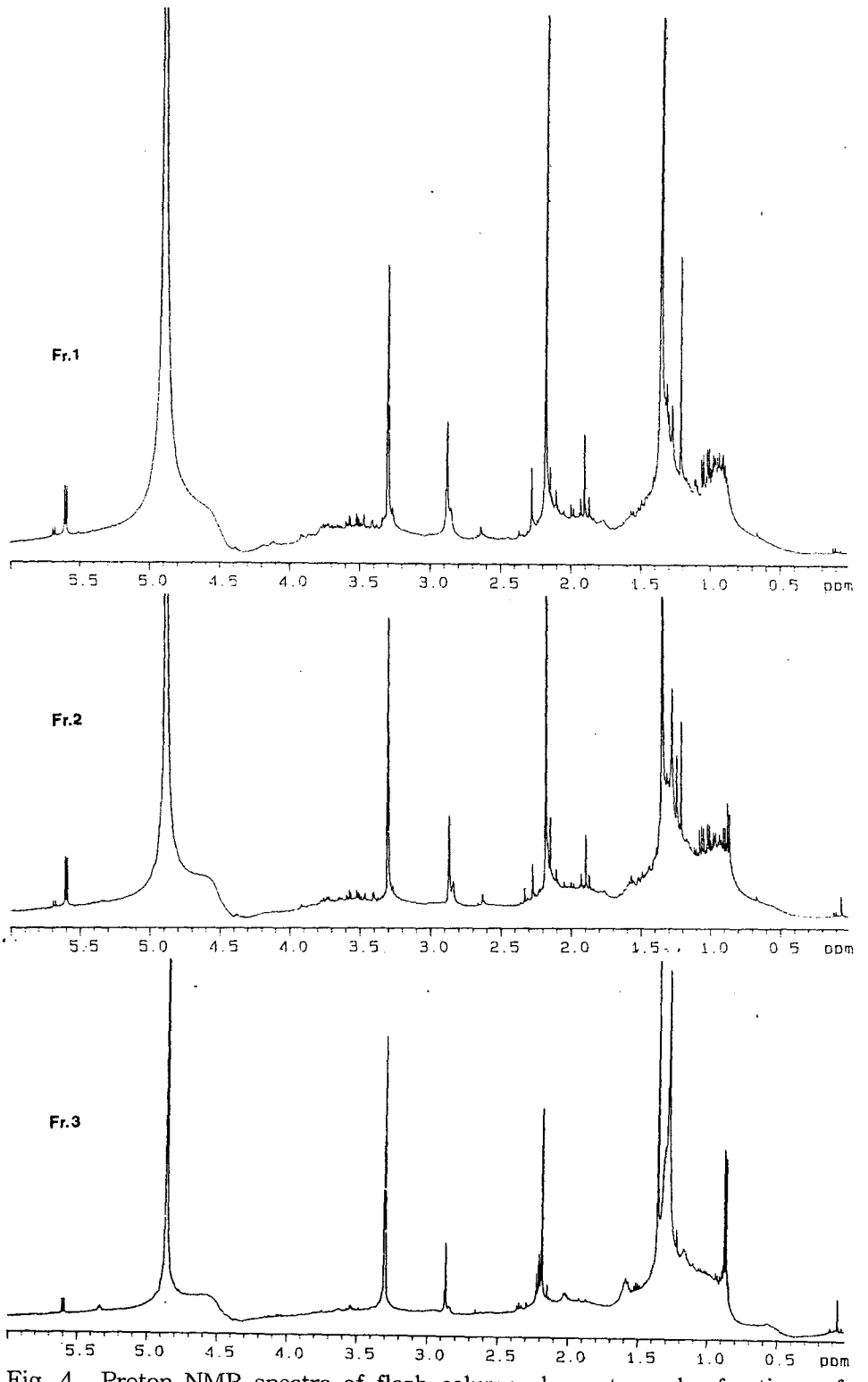


Fig. 4. Proton NMR spectra of flash column chromatography fractions of KM46-A1.

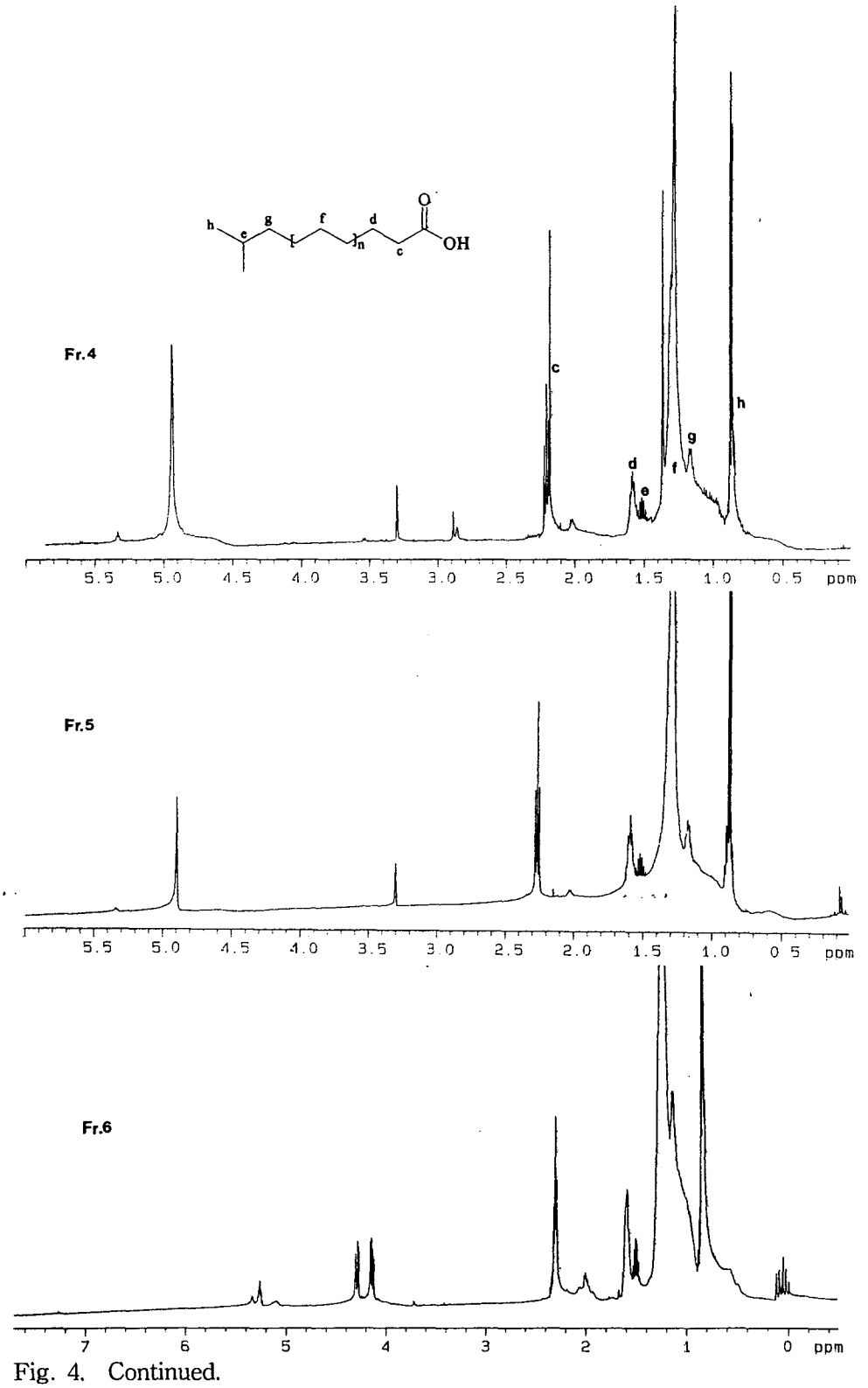


Fig. 4. Continued.

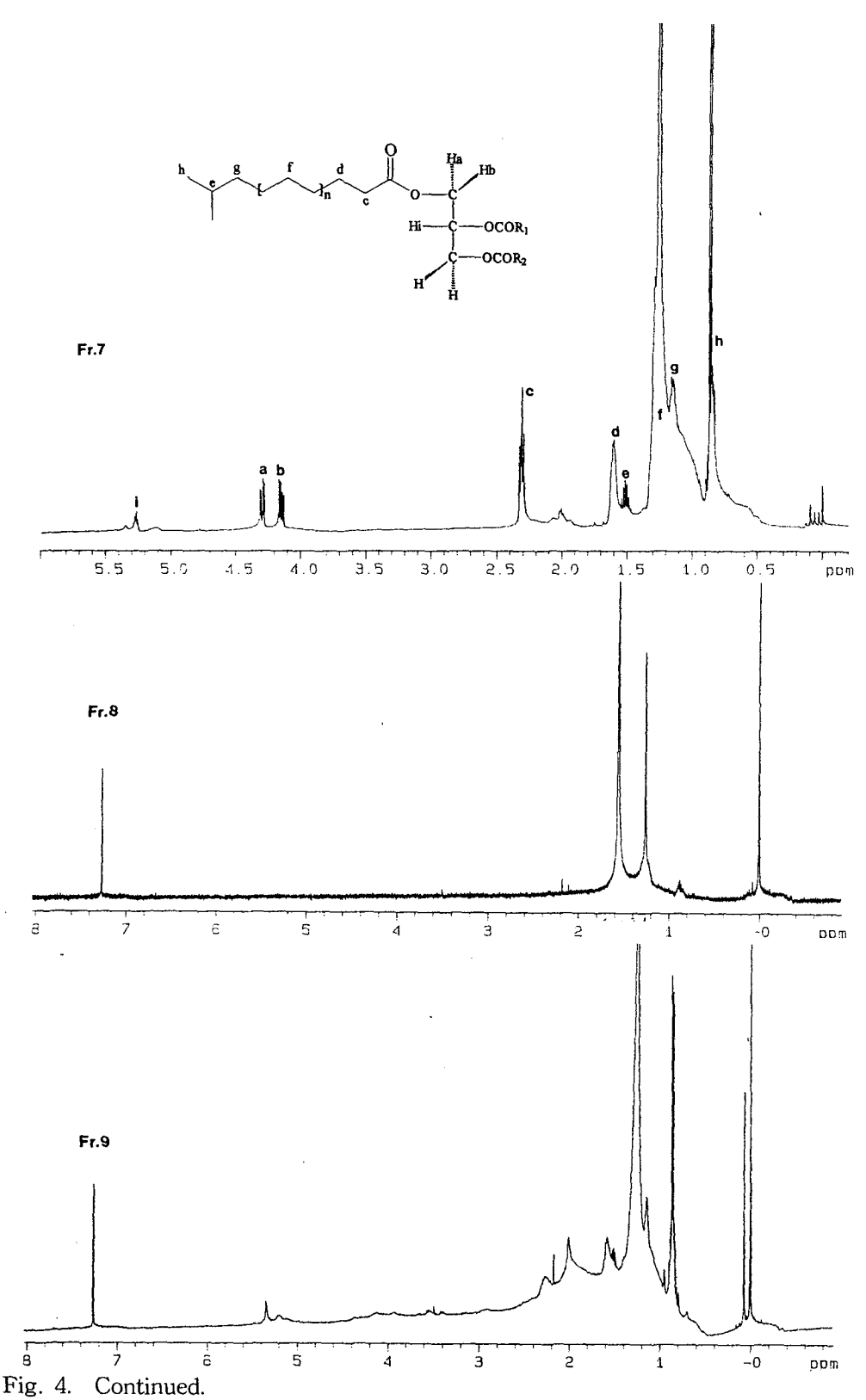


Fig. 4. Continued.

Fatty acid 류가 topoisomerase I 에 대해 저해효과를 나타낸다는 것은 쉽게 설명하기 어려운 현상이다. 그래서 fatty acid류가 일반적으로 topoisomerase I에 대해 저해활성을 나타내는지를 알아보기 위하여 자연계에서 흔히 발견되는 일반적인 포화지방산 및 불포화 지방산의 methylester에 대하여 topoisomerase 저해활성을 살펴보았다. 그 결과는 Table 4에 정리하였다.

활성검색 결과 일반 지방산 및 methylester에서는 topoisomerase I 저해활성이 나타나지 않았다. 앞으로 free 불포화지방산에 대해서도 좀 더 확인실험이 수행되어야 하겠지만 KM46-A1에서 발견되는 지방산과 Table 4의 일반 지방산과의 구조적인 차이점은 단지 terminal dimethyl group의 유무이므로 활성의 차이도 이에 기인하는 것으로 추정할 수 있을 것이다.

Table 4. Effects of free fatty acids and fatty acid methylesters on topoisomerase I activity.

Fatty acids	concentration(μg/ml)	
	500	200
caproic acid(6:0)	-	-
caprylic acid(8:0)	-	-
capric acid(10:0)	-	-
lauric acid(12:0)	-	-
myristic acid(14:0)	-	-
palmitic acid(16:0)	-	-
stearic acid(18:0)	-	-
arachidic acid(20:0)	-	-
behenic acid(22:0)	-	-
lignoceric acid(24:0)	-	-
oleic acid(18:1) methylester	-	-
α-linolenic acid(18:3) methylester	-	-
eicosapentaenoic(20:5) methylester	-	-
docosahexaenoic(22:6) methylester	-	-
camptothecin (350 μg/ml)	n.t.	+

+ : inhibited. - : not inhibited.
n.t. : not tested.

3. 4. 선별균주 KM46-A1의 동정 및 생화학적 특성

3. 4. 1. 형태학적 특성

ISP 2 medium(Yeast extract-Malt extract agar)에서 KM46-A1균주는 umbonate 형의 colony를 형성하며 기질균사(substrate mycelium)는 red-brown 색깔을 나타내고 그 위로 회색의 기중균사(aerial mycelium)를 형성하였다(Figure 5). 기중균사는 나선상의 spiral 형태를 보였으며 기질균사의 fragmentation은 발견되지 않았다. 기중균사는 포자로 발달하는데 포자의 형태는 10개 이상인 타원형의 포자들이 연쇄상으로 연결된 나선형이었다. 포자의 표면은 주사전자현미경으로 관찰한 결과 특이적인 돌출물을 갖고 있지 않는 smooth 형태였다(Figure 6).

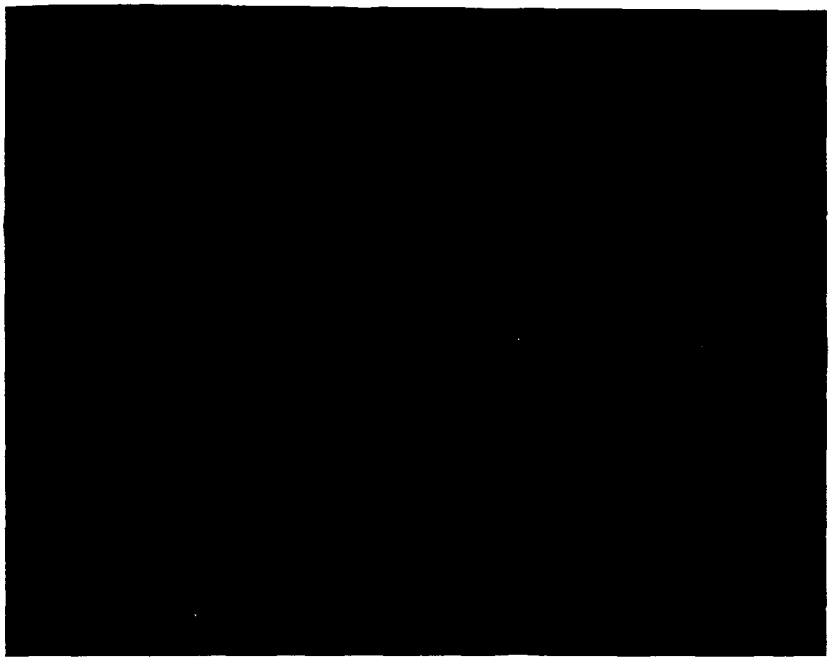


Figure 5. Morphology of colonies of KM46-A1.
Incubated for 7 days, at 30℃ on ISP 2 medium.

Figure 6. SEM photograph of spore chains of KM46-A1.
Incubated for 7 days, at 30℃ on ISP 2 medium.

3. 4. 2. 생리 생화학적 특성

KM46-A1균주는 배지 상에서 pH 5.0에서 pH 10.0에 이르는 pH 범위에서 성장할 수 있었다. 또한 4℃와 45℃에서 성장을 할 수 없었으나 20℃와 30℃에서는 성장을 하는 중온성 균주임을 알 수 있었다. 3%와 7%의 NaCl 농도에서는 성장을 하였고 10%와 13% 에서는 성장을 할 수 없는 것으로 볼때 호염성 균주는 아니었다. 여러가지 배지에서의 성장특성을 관찰한 결과 KM46-A1균주는 SZ medium를 비롯하여 yeast extract malt extract agar medium, inorganic salts starch agar medium, glycerol asparagine agar medium, tyrosine agar medium, nutrient agar medium, potato dextrose agar medium 및 starch casein agar medium에서는 좋은 생육상태를 보였으며, tryptone yeast extract agar medium과 peptone yeast extract iron agar medium에서는 빈약한 성장을 하였다(Table 5). 여러가지 배지들에서 배양시 수용성 색소는 생성하지 않았으며 형성된 기균사의 색깔은 대부분 회색이나 흰색이었으나 기질균사의 색깔은 다양하게 나타났다(Table 5). Shirling과 Gottlieb(1966)의 방법에 의하여 peptone-yeast extract iron agar medium 와 tyrosine agar medium에서 4 일, 7 일 관찰한 결과 melanin pigment는 생성하지 않았다(Table 8). 당 이용능을 실험한 결과 KM46-A1 균주는 glucose, D(-)-fructose, D-galactose, D-manitol, dextrin, lactose, maltose, D(+)-raffinose, D(+)-xylose, D(+)-mannose, D(+)-cellobiose, D(+)-arabinose, L-rhamnose, D(+)-melibiose, myo-inositol를 첨가한 배지에서는 생육상태가 양호하였고 inulin, salicin, D(+)-melezitose, dulcitol, adonitol등은 전혀 이용할 수 없었다(Table 6). 아미노산 이용능에 있어서는 대부분 이용하여 성장할 수 있었고 valine, glutamine, aspartic acid, glutamic acid, arginine의 이용능이 다소 약한 편이다(Table 7). 시험한 유기산 중에서 pyruvate, citrate, DL-lactate, malonate는 유일한 탄소원으로 이용될 수 있었고 benzoate, D(+)-malate등은 이용되지 못하였다(Table 8). 고분자물질의 분해능을 실험한 결과 casein, urea등은 분해할 수 있었고 gelatin, starch와 esculin은 가수분해하지 못하였다. 화학저해제에 대한 성

3. 4. 2. 생리 생화학적 특성

KM46-A1균주는 배지 상에서 pH 5.0에서 pH 10.0에 이르는 pH 범위에서 성장할 수 있었다. 또한 4℃와 45℃에서 성장을 할 수 없었으나 20℃와 30℃에서는 성장을 하는 중온성 균주임을 알 수 있었다. 3%와 7%의 NaCl 농도에서는 성장을 하였고 10%와 13% 에서는 성장을 할 수 없는 것으로 볼때 호염성 균주는 아니었다. 여러가지 배지에서의 성장특성을 관찰한 결과 KM46-A1균주는 SZ medium를 비롯하여 yeast extract malt extract agar medium, inorganic salts starch agar medium, glycerol asparagine agar medium, tyrosine agar medium, nutrient agar medium, potato dextrose agar medium 및 starch casein agar medium에서는 좋은 생육상태를 보였으며, tryptone yeast extract agar medium과 peptone yeast extract iron agar medium에서는 빈약한 성장을 하였다(Table 5). 여러가지 배지들에서 배양시 수용성 색소는 생성하지 않았으며 형성된 기균사의 색깔은 대부분 회색이나 흰색이었으나 기질균사의 색깔은 다양하게 나타났다(Table 5). Shirling과 Gottlieb(1966)의 방법에 의하여 peptone-yeast extract iron agar medium 와 tyrosine agar medium에서 4 일, 7 일 관찰한 결과 melanin pigment는 생성하지 않았다(Table 8). 당 이용능을 실험한 결과 KM46-A1 균주는 glucose, D(-)-fructose, D-galactose, D-manitol, dextrin, lactose, maltose, D(+)-raffinose, D(+)-xylose, D(+)-mannose, D(+)-cellobiose, D(+)-arabinose, L-rhamnose, D(+)-melibiose, myo-inositol를 첨가한 배지에서는 생육상태가 양호하였고 inulin, salicin, D(+)-melezitose, dulcitol, adonitol등은 전혀 이용할 수 없었다(Table 6). 아미노산 이용능에 있어서는 대부분 이용하여 성장할 수 있었고 valine, glutamine, aspartic acid, glutamic acid, arginine의 이용능이 다소 약한 편이다(Table 7). 시험한 유기산 중에서 pyruvate, citrate, DL-lactate, malonate는 유일한 탄소원으로 이용될 수 있었고 benzoate, D(+)-malate등은 이용되지 못하였다(Table 8). 고분자물질의 분해능을 실험한 결과 casein, urea등은 분해할 수 있었고 gelatin, starch와 esculin은 가수분해하지 못하였다. 화학저해제에 대한 성

Table 5. Culture characteristics of KM46-A1 on various culture media.

Medium	growth	color of aerial mycelium	color of substrate mycelium
Modified Zobell agar(SZ medium)	good	white, grey	brown
Tryptone-yeast extract agar	poor	white	ivory
Yeast extract-malt extract agar	good	grey	red, brown
Inorganic salts-starch agar	good	grey	purple
Glycerol-asparagine agar	good	grey	ivory, brown
Peptone- yeast extract iron agar	poor	white	yellow
Tyrosine agar	good	grey	brown
Nutrient agar	good	white	yellow
Potato-dextrose agar	good	grey	yellow, brown
Starch-casein agar	good	grey	brown

Table 6. Utilization of carbon sources by KM46-A1.

Carbon sources	Growth
Glucose	+
D(-)-fructose	+
D-galactose	+
D-mannitol	+
Lactose	+
Maltose	+
D(+)-raffinose	+
D(+)-xylose	+
D(+)-mannose	+
D(+)-arabinose	+
D(+)-melezitose	-
Salicin	-
Dulcitol	-
L-rhamnose	+
D(+)-melibiose	+
D(+)-cellobiose	+
Adonitol	-
Myo-inositol	+
Dextrin	+
Inulin	-

++: very good growth +: good growth
-: no growth

Table 7. Utilization of DL-amino acids as sole nitrogen source by KM46-A1.

Nitrogen sources	Growth
Asparagine	+
Cystine	+
Histidine	+
Threonine	+
Valine	(+)
Phenylalanine	+
Glutamine	(+)
Glycine	+
Aspartic acid	(+)
Leucine	+
Lysine	+
Serine	+
Glutamic acid	(+)
Arginine	(+)
Proline	+
Tyrosine	+
Alanine	+
Cysteine	+
Methionine	+
Isoleucine	+

++: very good growth +: good growth
(+): weak growth -: no growth

Table 8. Physiological and biochemical characteristics of KM46-A1.

Characteristics	results
Melanin formation	-
Degradation activity	
Starch	-
Gelatin	-
Casein	+
Esculin	-
Urea	+
Enzyme activity	
Catalase	+
Lecitinase	+
Lipase	+
Nitrate reduction	+
H_2S production	-
Utilization of organic acid	
Pyruvate	+
Citrate	+
DL-Lactate	+
Malonate	+
Benzoate	-
D(+)-Malate	-
Growth in the presence of inhibitory compounds	
Crystal violet(0.01%)	-
Phenol(0.1%)	+
Sodium azide(0.02%)	+
Potassium tellurite(0.01%)	-

+: positive -: negative

Table 9. Antibiotic resistances of KM46-A1.

Antibiotics	Concentration(μg/ml)		
	25	50	100
Gentamycin	+	+	+
Neomycin	+	-	-
Rifampicin	+	+	+
Streptomycin sulfate	+	+	-
Tetracyclin	+	+	+
Vancomycin	-	-	-
Polymyxin B	+	+	+
Novobiocin	-	-	-
Nalidixic acid	+	+	+
Penicillin G	100 I.U.: +		10 I.U.: +

+: growth -: no growth (+): weak growth

3. 4. 3. 화학 분류학적 특성

방선균의 세포벽을 조성하는 아미노산으로는 LL-DAP와 meso-DAP, lysine, ornithin등이 대표적이며 분류의 열쇠가 되는 당의 종류는 galactose, glucose, mannose, arabinose, xylose, fucose, madurose가 있다(Goodfellow, 1985). KM46-A1균주는 세포벽 분석 결과 LL-DAP을 갖고 있으며(Fig. 7) 균체 가수분해액의 당을 분석한 결과 당으로는 galactose를 갖고 있는 것으로(Fig. 8) 나타났다. 그러나 Lechevalier(1989)에 의하면 LL-form의 DAP를 갖고 있는 방선균은 당을 가지고 있다하더라도 방선균 동정을 위한 자료로서 적용 할 수 없다고 보고된 바 KM46-A1균주는 분류방식에 의해 I 형의 세포벽을 갖는 방선균으로 분류되었다. 지방산 조성 분석 결과 KM46-A1 방선균은 iso-15:0, ante-14:0 지방산이 주요구성 성분으로서 전형적인 *Streptomyces* sp.의 지방산 조성과 일치하였다(Table 10). 따라서 해면의 공생미생물로서 항암성분물질을 생산하는 방선균인 KM46-A1균주는 형태학적 및 생화학적 그리고 화학분류학적 실험결과들에 의하여 ***Streptomyces* sp.**로 동정되었다(Table 11).

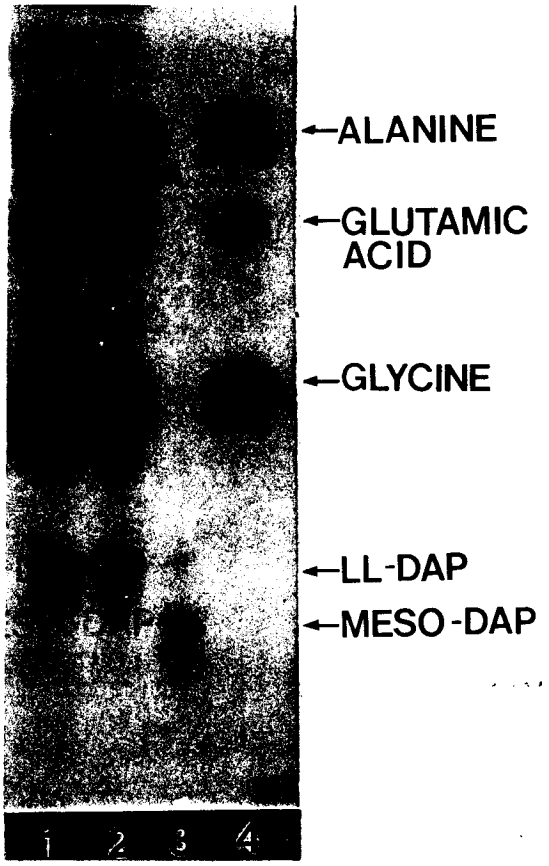


Figure 7. TLC analysis of DAP(diaminopimelic acid) isomer of KM46-A1.
1, 2: Strain KM46-A1
3: Standard DAP(LL-DAP, meso-DAP)
4: Standard (glycine, glutamic acid, alanine)

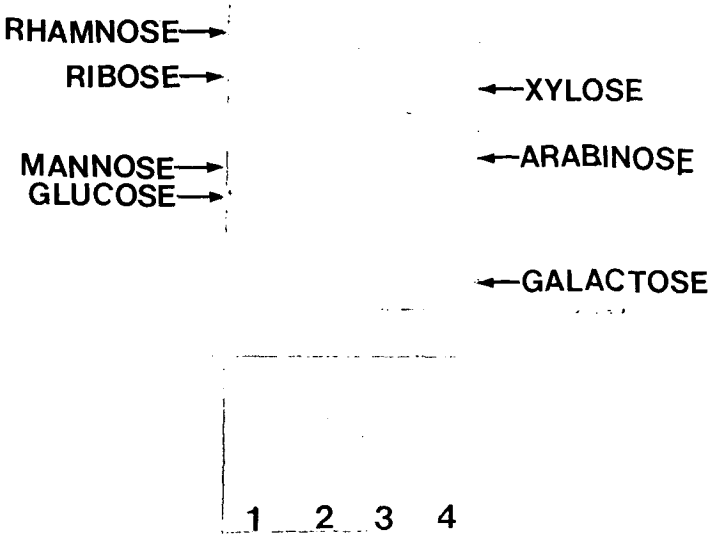


Figure 8. TLC analysis of sugar from whole cell hydrolysate of KM46-A1.

1: Standard(glucose, mannose, ribose, rhamnose)

2: Standard(galactose, arabinose, xylose)

3, 4: Strain KM46-A1

Table 10. Fatty acid composition of KM46-A1.

Retention time	E C L	Fatty acid	Relative percentage
2.571	10.15	?	2.51
2.866	11.58	iso-11:0	0.49
2.979	11.97	?	2.65
3.122	12.40	?	1.79
3.235	12.70	ante-12:0	0.89
3.678	13.62	iso-13:0	5.76
4.006	14.15	?	0.84
4.309	14.56	iso-14:0	1.17
4.370	14.64	iso-14:0	7.15
4.440	14.72	ante-14:0	10.63
4.680	14.99	15:0	1.26
5.123	15.43	?	1.10
5.368	15.64	iso-15:0	42.62
5.814	15.99	16:0	4.32
6.789	16.63	iso-16:0	4.43
6.936	16.72	ante-16:0	7.41

Table 11. Chemotaxonomic characteristics of KM46-A1.

Characteristics	KM46-A1
Cell wall type	I
DAP	LL-DAP
Sugar	NA*
Major fatty acid	iso-15:0
	ante-14:0

* NA: not applicable.

제 4 장 결 론

최근 보고된 해양생물의 생리활성 물질 중 상당수가 전혀 새로운 탄소골격과 강력한 생리활성도를 갖고 있음이 밝혀짐에따라 새로운 의약품의 자원으로서 해양생물의 중요성은 더욱 커지고 있으며 해양생물 자원을 이용한 신물질 개발이 시급히 요구되고 있다. 또한 생리활성 물질의 생산주체가 주로 공생미생물인 경우가 많으므로 공생미생물을 분리 배양하여 대량생산하는 방법이 확립되면 일반 항생제 생산의 경우와 마찬가지로 대량배양에 의해 공급이 가능할 것이다. 이를 위해 본 연구과제에서 해면으로부터 공생미생물을 분리하고 이를 대상으로 항종양 물질의 탐색작업을 수행하였다.

거문도해역에 분포하는 해면으로부터 세균 1,200주와 방선균 8주를 확보하여 -80 °C에 보존하였다. 해양세균 300여주와 방선균 8여주를 배양하여 그 배양액은 유기용매로 추출하여 시료를 조제하여 항암약효를 조사하였다.

항암약효 검색방법으로는 DLD-1(human colon)와 P388D_1 세포를 대상으로 세포독성능을 1차적으로 조사하였다. 세포독성물질을 생산하는 균주에 대하여는 항암치료의 주요 타겟이 되는 효소인 topoisomerse I 저해능을 검색하였다. 항종양 검색체계를 이용하여 600여 시료를 처리한 결과 KM46-A1을 선별하였다. KM46-A1의 세포독성능은 P388D_1 암세포에 대한 ED_{50}값이 4.8 μg/ml로 나타났으며 topoisomerse I를 저해하는 물질을 생산하는 방선균으로 *Streptomyces* sp.로 동정되었다. 항암활성물질 성분을 분석하고자 KM46-A1를 대량배양하여 균체를 추출 분획한 결과 topoisomerase I 저해활성이 나타나는 분획의 주성분은 모두 동일계열 물질로서 terminal dimethyl group을 가지고 있는 fatty acid류로 나타났다. 이들 활성분획에 대해서는 다시 활성성분을 순수분리하여 구조를 확인하는 작업을 진행중이다.

해양미생물은 천연물화학적인 관점에서 매우 중요한 위치를 차지하는데 그 주된

이유는 유용한 생리활성 물질의 발견 빈도가 높을 뿐더러 선도물질이 발견될 경우 산업화가 쉽게 될 수 있다는 장점 때문이다. 해양미생물로부터 생리활성선도물질을 발견하기 위해서는 위의 선별 균주의 생산물질의 분리 정제 및 구조분석 작업이 계속 이루어져야 하며 분리한 다른 균주에 대하여도 지속적인 탐색작업이 요구된다. 본 과제에서의 기초연구결과 유용한 신규항암선도물질의 발견 가능성 내지는 선도물질이 발견되는 경우 곧바로 물질특허, 제법특허 및 균주특허를 출원할 수 있으며 이를 바탕으로 좀 더 심도있는 산업화 연구를 수행할 수 있을 것이다.

제 5 장 참 고 문 헌

김영철, 정지형, 이홍금. 1995. 해면 및 공생미생물로 부터 항암선도물질 도출. '95 보건의료기술여구개발사업 연차연구결과 보고서. 보건복지부

이홍금. 1995. 해양생물의 공생미생물로부터 생리활성물질의 탐색. 생물화공 9:25-30.

Atlas, R. 1993. Handbook of microbiological media. CRC Press. Boca Raton.

Carmichael, J., W. G. Degraff, A. F. Gazdar and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, assement of radiosensitivity. *Cancer Res.* 47:936-942.

Christie, W. W. 1982a. Lipid analysis. Pergamon Press, Oxford. pp. 51-92.

Christie, W. W. 1982b. Lipid analysis. Pergamon Press, Oxford. pp. 107-121.

Christie, W. W. 1988. Equivalent chain-lengths of methylester derivatives of fatty acids on gas chromatography. *J. Chromatogr.* 447:305-314.

Colwell, R. D. Santavy, F. Singleton, T. Breschel, and T. Davidson. 1989. Marine bioactive metabolites. *In*:S. Miyachi, I. Karube and Y. Ishida (eds.), Current topics in marine biotechnology. The Japanese Society for Marine Biotechnology, Tokyo. pp. 37-40.

Cross, T. 1989. Growth and examination of Actinomycetes-some guidelines. *In* S. J. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.), Bergey's Manual for Systematic Bacteriology vol. 4. eds. pp. 2340-2343.

Dunn, C.D.R. 1994. Scrips 1994 review of cancer chemotherapy. chap. 4. New hopes in cancer chemotheraphy. PJB Publications Ltd. pp. 129-209.

Faukner, D. J. 1992. Nat. Prod. Rep. 9:323-364.

Gerald H.W. and J. W. Marvin. 1984. Chromatographic data section. *In* chromatography of antibiotics. 26:26-31.

Gil-Turnes, M. S., M. E. Hay, W. Fenical. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus, *Science,* 240:116-118.

Goodfellow, M. and D. E. Minnikin. 1985. Chemical Method in Bacterial Systematics. Academic. Press. London. pp. 131-143.

Ireland, C. M., B. R. Copp, M. P. Foster, L. A. McDonald, D. C. Radisky, and J. C. Swersey. 1993. Biomedical potential of marine natural products. *In*: D. H. Attaway and O. R. Zaborsky (ed.), Marine Biotechnology vol. I. pharmaceutical and bioactive natural products. Plenum Press. New York. pp. 1-44.

Jean, F. M. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2 eds. Williams and Wilkins Press, Baltimore. pp. 4-11, 51-58, 128-137, 162-173,

236-245, 286-297, 298-307.

Kobayashi, J. and M. Ishibashi. 1993. Bioactive Metabolites of Symbiotic Marine Microorganisms. *Chem. Rev.* 93:1753-1969.

Lechevalier, H. A. 1989. A practical guide to generic identification of Actinomycetes. *In* S. J. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt(eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol 4. Williams and Wilkins Press, Baltimore. pp. 2344-2347.

Lechevalier, H. A., M. P. Lechevalier. 1981. Introduction to the order Actinomycetales. *In* Procaryotes. Chap.142. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp. 1915-1922.

Locci, R. 1989. Streptomyces and related genera. *In* S. J. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology. vol 4. Williams and Wilkins Press, Baltimore. pp. 2451-2492.

Newman, D. J., P. R. Jensen, J. J. Clement, C. Acebal. 1989. Novel activities from marine derived microorganisms. *In*: A. L. Demain. G. A. Somkuti, J. C. Hunter-Cevera, H. W. Rossmoore (eds.), Novel microbial products for medicine and agriculture, Elsevier. pp. 239-251.

Okami, Y. 1986. Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microb. Ecol.*, 12:65-78.

Pauweis, R., J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijin, J.

Desmyster, E. De Clercq. 1988. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti HIV compounds. *J. Virol. Methods*, 20:309-321.

Rinehart, K. L. 1988. Screening to detect biological activity. *In*: D. G. Fautin (ed.), Biomedical importance of marine organisms, California Academy of Sciences. pp. 13-22.

Robert, M. S., R. K. Noel. 1994. Phenotypic characterization. *In* Philipp, G., R. G. E. Murray, A. W. Willis, R. K. Noel(eds.), Methods for General and Molecular Bacteriology. Chap 25. ASM. Washington. pp. 622.

Schaal. 1985. Identification of clinically signaficant actinomycetes and related bacteria using chemical techniques. *In* Goodfellow, M. and D. E. Minnikin(eds.), Chemical Methods in Bacterial Systematics. Academic Press, New York. pp. 359-381.

Schmitz, F. J., B. F. Bowden, and S. I. Toch. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. *In*: D. H. Attaway and O. R. Zaborsky (ed.), Marine Biotechnology vol. I. parmaceutical and bioactive natural products. Plenum Press. New York. pp. 197-308.

Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Syst. Bact.* 16:313-340.

Staneck, J. I. and G. D. Roberts. 1974. Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. *Appl. Microbiol.*

119:226-231.

Stierle, A. C. , J. H. Cardellina, and F. L. Singleton, 1988. A marine *Micrococcus* produce metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experimenia*. 44:1021.

Wingard, L. B., T. M. Brody, J. Larner and A. Schwartz. 1991. Individual antineoplastic drugs. *In* Human Pharmacology. Chap 43. Wolfe Publishing Ltd. London. pp. 598-600.