

BSPE 00490-785-3

## 칼슘채널작용 생리활성물질 탐색기술 연구

A study on the screening method for bio-active  
compounds acting at the calcium channel

1995. 3.

한국해양연구소

## 제출문

한국해양연구소장 귀하

본 보고서를 “갈슘채널작용 생리활성물질 탐색기술 연구” 과제의 최종  
보고서로 제출합니다.

1995년 3 월

연구책임자: 김상진(해양생물공학연구그룹, 책임연구원)

연구원: 이홍금(해양생물공학연구그룹, 선임연구원)

박은희(해양생물공학연구그룹, 연구원)

정상운(해양생물공학연구그룹, 연구원)

윤태미(해양생물공학연구그룹, 연구원)

권기경(해양생물공학연구그룹, 연구원)

# 요약문

## I. 제목

칼슘채널작용 생리활성물질 탐색기술 연구

## II. 연구의 목적 및 중요성

본 연구는 인체 Fibroblast 세포의 칼슘조절 기작에 관여하는 물질검색 시스템을 확립하고 이를 활용하여 해양미생물로부터 신규활성물질 개발을 위한 기초방법 연구에 목표를 두었다.

최근 선진국에서는 해양생물로 부터 산업적으로 유용한 물질을 탐색, 개발하려는 시도가 많이 이루어 지고 있다. 이와 같은 경향은 한국에서도 그 필요성을 인식하여 선도기술 개발사업에서 이 분야의 연구를 시작하였다.

그러나 이 분야의 연구에는 무엇보다 새롭고, 신속하고, 정확한 생리활성 물질 검색방법이 개발되어야 한다. 이와 같은 종류의 생리활성물질 중 세포의 칼슘채널 조절기작에 관여하는 물질은 염증, 고혈압, 심장질환, thrombosis, 독성물질 쇼크와 같은 질병에도 중요할 뿐 아니라 세포분열, 세포증식, 면역계 등에 활용범위가 넓다. 따라서 본 연구에서는 신규 칼슘채널 조절물질 개발을 위해 검색시스템을 확립하고 이를 이용하여 해양 미생물로 부터 생리활성물질을 탐색한다.

### III. 연구내용 및 범위

1. LuMA 및 3T6 세포주 배양방법 확립.
2. 방사선 표지된 칼슘을 이용하여 세포내 칼슘유입 측정방법 적정화 및 표준화
3. 해양미생물 시료의 배양 및 추출과 적혈구 용혈능, lymphocyte 및 암세포에 대한 세포독성능 검증을 통한 선별
4. 해양미생물로 부터 칼슘채널 조절물질 탐색

### IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. Human embryo lung 세포인 LuMA세포주와 mouse collagen secreting fibroblast 세포인 3T6 세포주의 배양방법을 확립하여 실험에 사용하였다.

#### 2. 세포 칼슘채널 조절물질 탐색방법

탐색방법의 적정화 및 표준화를 통해 민감하고 재현성있는 방법을 확립하기 위하여 다음과 같은 결과를 관찰하였다.

세포의 칼슘농도는 약 1.08 mM로 유지하기 위하여 MEM배지를 PBS로 6:4 희석하여 사용하고, 방사선 동위원소인  $^{45}\text{Ca}^{++}$  의 농도는 2.5  $\mu\text{Ci/ml}$ 를 유지하였고 배양시간은 최소 10 분으로 결정하였다. 실험시 비교 대조구로 칼슘채널 유

입 증가물질인 경우 ionomycin을 사용하였고 칼슘채널 유입 억제물질로는 verapamil을 사용하였으며 각 농도는 공히 5  $\mu$ M로 하였다.

### 3. 해양미생물로 부터 칼슘채널 조절물질 탐색

해양으로 부터 분리된 세균 3,000 균주, 방선균 5,000 균주 중 먼저 세포독성능 및 용혈능이 없는 세균 검정배양액 1,414 개와 방선균 검정배양액 2,124개를 선별하였다. 이중 세균 검정배양액 139개(수층 91개, folch soln 추출액 48개), 방선균 검정배양액 595개(균체 추출액 305개, 수층 237개, ethylacetate 추출액 53개)를 세포내 칼슘유입 조절물질 탐색실험을 하였고 이들 중 대조구의 세포내 칼슘유입양과 비교하여 칼슘유입이 60 %이상 촉진되거나, 30 %이상 저해하는 미생물 검정배양액을 선별하였다. 그 결과 방선균 균주번호 224의 수층시료, 100의 수층시료, 267의 균체 추출액, 8405의 균체 추출액은 칼슘수송을 촉진하고, 세균 균주번호 17BS15의 folch층과 17BS16의 수층, 방선균 균주번호 5792-2의 균체 추출액, 282의 ethylacetate 추출액은 칼슘유입을 저해하는 것으로 나타났다.

### 4. 결론

본 연구에서 확립한 칼슘채널 조절물질 탐색방법을 활용하여 해양미생물로 부터 칼슘채널 조절물질 탐색을 시도한 결과 우수한 칼슘유입 활성물질 생산균주 4 주 및 억제물질 생산균주 4 주를 선별하였다. 향후 선별된 균주로 부터 물질의 분리정제 및 구조분석을 통한 신규성을 확인한 후 약제개발에 활용할 예정이다.



## Summary

In order to screen the compounds affecting calcium transport from marine microorganisms the assay system using LuMA cell line (Human embryo lung cell) and 3T6 cell line (Mouse collagen secreting fibroblast cell) was optimized. From these experiments we found that several parameters as followings played an important role for the establishment of the assay system for screening of bio-compounds enhancing or inhibiting calcium transport;

The up-take rate of calcium into the LuMA cell showed the highest value when the extracellular concentration of cold calcium ion in the reaction mixture was maintained at the ca. 1.08 mM. It could be also concluded from the results that hot calcium ion ( $^{45}\text{Ca}^{++}$ ) at the concentration of 2.5  $\mu\text{Ci/ml}$  was effective for the measurement of calcium uptake and the incubation time within 10 mins were sufficient for the reaction. As a comparative control for the enhancement and inhibition of calcium transport, ionomycin and verapamil were added with 5  $\mu\text{M}$  into the reaction mixture. At this concentration the calcium transport was enhanced about 2.4 folds by ionomycin and was inhibited about 28 % by verapamil comparing with the control value.

To screen the calcium transport enhancing or inhibiting reagents

3,000 strains of bacteria and 5,000 strains of actinomycetes were isolated from marine environments. The microorganisms showing cytotoxicological effects on the DLD-1 human adenocarcinoma cell, P388D1 mouse lymphoid neoplasma cell and lymphocytes isolated from mouse spleen, and haemolytic activity against the mouse erythrocyte were excluded through the prescreening steps. 1,414 samples from bacterial culture and 2,124 samples from actinomycetes culture were selected as candidate for screening of the calcium transport modifying compound without showing side effects such as the cytotoxicological and haemolytic activities.

Among the extracts having the strong activities 4 extracts which showed 60 % higher calcium uptake rate to compare that of control were selected as followings: water layer from actinomycetes strain number 224, water layer from actinomycetes strain number 100, mycelium extract from actinomycetes strain number 267 and mycelium extract from actinomycetes strain number 8405. On the other hand, 4 extracts showing 30 % inhibition to compare with the calcium uptake rate of control were founded as followings: water layer from actinomycetes strain number 224, water layer from actinomycetes strain number 100, mycelium extract from actinomycetes strain number 267 and mycelium extract from actinomycetes strain number 8405. These compounds are now under the purification and analysis of chemical structure to check whether these are novel bio-compounds showing the calcium transport modifying activities or not.



## 목차

I. 서론	13
II. 실험재료 및 연구방법	20
1. Calcium uptake 측정방법	20
1. 1. 사용 세포주 및 세포 배양방법	20
1. 2. Assay system of calcium uptake	21
2. 해양미생물로 부터 칼슘수송 조절물질 탐색	23
2. 1. 시료채취 및 미생물분리.	23
2. 2. 미생물 배양액 추출 방법	23
2. 3. 시료의 세포 독성능 검사	26
2. 3. 1. 적혈구에 대한 용혈능 검사	26
2. 3. 2. Lymphocyte에 대한 세포 독성능 검사	27
2. 3. 3. 암세포에 대한 세포 독성능	28
III. 결과 및 고찰	30
1. 세포의 칼슘농도가 세포막 ion channel을 통한 calcium uptake에 미치는 영향	30
2. 세포막 ion channel을 통한 calcium uptake실험시 방사능 동위원소의 적정농도 결정	32
3. 세포막 ion channel을 통한 $^{45}\text{Ca}^{++}$ uptake의 시간별 비교	33
4. 비교대조구의 적정농도 탐색	37
5. 해양미생물로 부터 칼슘수송 조절물질 탐색	41
IV. 참고문헌	44



# Contents

I. Introduction	13
II. Materials and Methods	20
1. Method of calcium uptake measurement	20
1. 1. Cell line and culture method	20
1. 2. Assay system of calcium uptake	21
2. Screening of calcium transport control compound from marine microorganisms	23
2. 1. Collection of sample and isolation of microorganism	23
2. 2. Extraction method of microorganism culture	23
2. 3. Method of cytotoxicological test	26
2. 3. 1. Haemolytic assay using erythrocyte	26
2. 3. 2. Cytotoxicological assay using lymphocyte	27
2. 3. 3. Cytotoxicological assay using cancer cells	28

III. Results and Discussion	30
1. The effect of the extracellular concentration of calcium on the calcium uptake through the cell membrane ion channel	30
2. The determination of the optimal concentration of radio isotope $^{45}\text{Ca}^{++}$ for the calcium uptake through the cell membrane ion channel	32
3. Comparison of reaction time of $^{45}\text{Ca}^{++}$ uptake through the cell membrane ion channel	33
4. Optimal concentration of enhancer and inhibitor of $^{45}\text{Ca}^{++}$ uptake as comparative control	37
5. Screening of calcium transport control compound from marine microorganisms	41
IV. References	44

# I. 서 론

미생물은 인간의 생활과 밀접한 관련을 가지고 있다. 미생물 특히 방선균으로부터 항생물질이 발견된 이후 인류는 미생물의 자원적 가치에 대해 주목하기 시작했으며 현재까지 많은 연구를 수행하여 왔다. 그 결과로 미생물로부터 현재 인류에게 중요한 항생제를 비롯하여 항암제등을 포함한 생리활성물질들을 발견하게 되었다. 또한 과거의 미생물 연구가 토양 및 온화한 환경에 존재하는 것들에 집중된 반면, 최근에는 해양환경을 비롯한 다양한 서식처에 대해서도 관심을 갖고 연구가 시작되었다. 해양으로 부터 유래된 많은 생물들은 육상과는 다른 환경인 극한 생태계에 적응하는 동안 육상생물과는 다른 독특한 대사과정을 지니고 있으며 이에 따라 새로운 종류의 생리활성물질을 생성할 수 있을 것이라고 추정되고 있다.

가장 잘 알려진 예로는 복어의 내장으로 부터 추출된 Tetrodotoxin로 이는 sodium channel을 저해한다고 보고되었으며, 이 외에도 많은 해양생물 유래 물질들이 항염성을 갖거나 특정 이온수송에 관여하여 면역반응에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(1). 특히 해양으로 부터 분리된 미생물들은 항생물질이나 식품 자원으로써 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 대량배양이 가능한 장점으로 산업적인 용도로서도 용이하다 할 수 있으므로 앞으로의 농업이나 의학발전에 많은 영향을 미칠 것으로 예상된다.

본 연구에서는 미생물이 생성하는 많은 생리활성물질 중에서도 특히 칼슘수

숨에 영향을 미칠 수 있는 물질들을 한국 근해의 해수 및 해변토양, 해양 생물로부터 분리한 세균과 방선균을 대상으로 검색하고자 하였다.

칼슘은 생체내의 무기물중 가장 많은 성분으로 대부분은 동물의 골격이나 치아를 구성하거나, 혈액에 존재하며 아주 적은 양이 세포내에 존재하면서 세포내의 여러 물질대사를 조절하는 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 세포내에서 낮은 농도로 유지되고 있는 칼슘농도의 변화는 신경계 전달물질과 같은 전달물질과 호르몬등의 분비를 촉진 시키거나 potassium channel을 조절함으로써 세포막의 재분극을 초래한다(2). 또한 골격근의 경우, 세포막표면의 탈분극은 tubular membrane을 통해 근소포체(sarcoplasmic reticulum,SR)에 저장되어 있던 칼슘을 빠르게 방출시켜 troponin과 결합함으로써 actin과 myosin의 활주에 의해 근수축을 야기한다(3). 또한, 세포내 전달계에서의 calmodulin과 같은 조절단백질과 결합해서 여러가지 인산화 효소를 활성화 시키고, 혈액응고시 prothrombin을 thrombin으로 활성화 시키는데 중요한 역할을 한다. 이 외에도 세포분열시 여러세포에서 DNA 합성개시, 핵막소실, anaphase onset 등을 조절하는 것을 볼 수 있으며(4, 5, 6), 세포 사이의 gap junction 또한 세포내 칼슘농도 증가에 의해 폐쇄됨으로 투과성을 조절하기도 하는 등 실로 다양한 활성을 나타내는 세포내 중요 조절인자중에 하나이다. 이러한 세포내 칼슘의 기작은 세포 안과 밖의 칼슘농도의 차이에 기인한다. 세포외 칼슘농도는 mM단위인데 비해, 세포내의 칼슘농도는  $10^{-7}$ M정도로 매우 낮게 유지되는데 이는 세포막의 탈분극과 같은 전기적인 자극이나 세포외의 화학적인 자극에 의해 calcium channel을 통해 지속적인 세포외 칼슘 유입이 초래되나 이것은 세포막에 존재하는  $Ca^{++}$  - ATPase와 endoplasmic reticulum 과 mitochondria와 같은 세포 소기관의 막에 존재하는

Ca<sup>++</sup> pump에 의해 일정하게 유지된다. 즉, 세포내 칼슘농도의 조절은 세포막, mitochondria, endoplasmic reticulum(ER) 또는 sarcoplasmic reticulum(SR)이 각각 담당한다. Mitochondria와 ER, SR은 세포내 칼슘 변화에 민감하게 반응하여 세포내 소기관내로 칼슘을 축적하거나, 다시 세포질 쪽으로 방출하는 반면, 세포막의 ion channel은 세포내외의 칼슘농도의 차이에 의해 칼슘을 유입시키는 역할을 한다. 현재 세포내 칼슘의 측정은 Quin-2나 Fura-2와 같은 fluorescent Ca<sup>++</sup> indicator를 사용하여 세포질내의 유리 칼슘농도를 측정하는 방법, electrode를 사용하는 전기적 방법 또는, 방사성 동위원소를 사용하는 방법으로 세포막을 통과하는 칼슘의 이동을 측정하는 방법이 가장 많이 사용되고 있다(7). 또한, 이외에도 patch clamp방법으로 Ca<sup>++</sup> channel을 분리 할 수 있게 되었고 channel의 개폐 및 전도성 까지 밝혀졌다(8). 이러한 전기적 혹은 화학적인 연구방법은 calcium channel이 Voltage-sensitive calcium channel(VSCC)로 T, N, L 3 type과 ligand-sensitive calcium channel이 존재하며 skeletal muscle L-type Ca<sup>++</sup> channel/dihidropyridine (DHP) receptor는 최소한 5개의 단량체 -  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2\delta$  - 로 구성됨이 알려졌다(7, 9, 10).

지금까지 알려진 해양유래의 ion channel을 통한 칼슘의 수송기작을 조절하는 물질들은 다음과 같다(Table 1). 그 중 산호종류인 Goniopora로 부터 발견된 Gonioporatoxin은 calcium channel 촉진물질로(11), w-conatoxin은 N-type calcium channel을 저해하는것으로 밝혀진 바 있다(12, 13). 한편 sponge *Luffariella variabilis*로 부터 분리된 Monoalide(이는 sponge 와 공생하는 미생물에 의해 생성되는 것으로 여겨짐) 또한 호르몬에 의해 작동되어지는 세포막의 칼슘경로, 세포내로의 칼슘방출 경로와 전기적으로 작동되는 세포막 칼슘경로등을

차단하는 기작으로  $Ca^{++}$  signaling을 조절함으로써 anti-inflammation과 anti-proliferation활성을 갖는다고 보고되었다(1).

이와 같은 칼슘조절 물질은 약제로서 개발 전망은 매우 밝고 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 칼슘 길항물질의 종류와 응용범위에 대해 1989년 9월 『월간 약국』의 특집 내용인 “칼슘과 칼슘길항제” 중 일부를 발췌하여 소개하고자 한다.

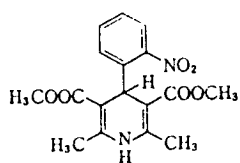
이미 칼슘 길항물질로 잘 알려진 칼슘채널 차단물질인 verapamil, diltiazem 등은 주로 slow channel을 억제하는 물질로 심근 및 혈관평활근에 작용하여 심근 장애 및 부정맥발생을 방지하며, nifedipine, nitrendipine과 같은 dihydropyridine (DHP)계 물질은 주로 혈관계에 작용하여 혈관확장을 하는 것으로 보고되며, 이외에도 많은 칼슘 길항물질들이 순환계질환 등에서 여러가지 약리작용을 나타낸다. 칼슘길항물질은 주로 협심증, 부정맥, 고혈압등에 임상적으로 응용되어 왔으며 점차 그 적용영역은 순환기질환까지 확대되고 있으며 이미 전세계적으로 순환기약물 시장의 20 %를 칼슘길항제가 차지하고 있다. 한편 칼슘 수송촉진 물질은 반대로 심장의 운동성을 높이거나, 조직이식시 세포분열 속도를 높이는 등 세포내 칼슘농도를 높임으로써 발생할 수 있는 많은 작용들에 영향을 주는 약제으로써 개발가능하다. 칼슘 channel blocker로 칼슘 길항작용을 갖는 대표적인 길항물질의 화학구조는 (Fig 1)과 같다.



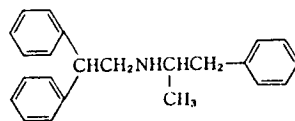
Table 1. Bio-active compounds having effects on inflammation and calcium channel derived from marine organisms.

Compound	Activity	Reference
Manoalide	Anti-inflammatory PLC, PLA <sub>2</sub> inhibitor	Jacobs <i>et al.</i> 1985; Glaser and Jacobs 1986 Bennett <i>et al.</i> 1987
Pseudoterrosins	Analgesic, anti-inflammatory	Look <i>et al.</i> 1986
Lufferollide	Anti-inflammatory	Albizati <i>et al.</i> 1987
Hyrtrial	Anti-inflammatory	Crews <i>et al.</i> 1985
Foliaspongin	Anti-inflammatory	Kikuchi <i>et al.</i> 1983
6-n-tridecyl salicylic acid	Anti-inflammatory	Buckle <i>et al.</i> 1980
Flexibilide	Anti-inflammatory	Buckle <i>et al.</i> 1980
Dendolare	Anti-inflammatory	Buckle <i>et al.</i> 1980
Maitotoxin	Activates VOC-lacrima glands	Takahashi <i>et al.</i> 1983
Gonioporatoxin	Ca <sup>++</sup> channel activator	Qur <i>et al.</i> 1986
Bromo-eudistomin tunicate	Anti-viral activity Ca <sup>++</sup> release SR	Nakamura <i>et al.</i> 1986
w-conatoxin(s)	Blocks N-type Ca <sup>++</sup> channel	Rivier <i>et al.</i> 1987 Olivera <i>et al.</i> 1985
Bryostatins	Anti-neoplastic agent Protein Kinase C	Ramsdell <i>et al.</i> 1986 Smith <i>et al.</i> 1985

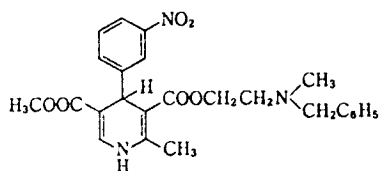
따라서 본 연구에서는 세포막 칼슘채널을 통한 칼슘유입의 증가와 억제에 관여하는 물질을 탐색하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 먼저 칼슘유입의 증가와 억제를 측정하는 방법을 구축하기 위하여 human fibroblast cell(LuMA: human embryo lung) 조직배양을 확립하였고 이를 이용한 방사능 동위원소( $^{45}\text{Ca}^{++}$ )방법을 탐색기법으로 적정화시켰다. 또한 확립된 방법을 활용하여 분리보존된 해양미생물로 부터 칼슘유입에 영향을 주는 생리활성물질을 탐색하였다.



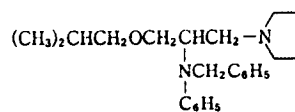
nifedipine



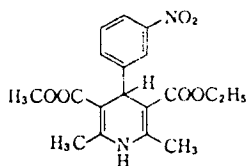
prenylamine



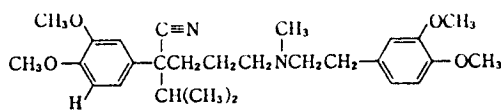
nicardipine



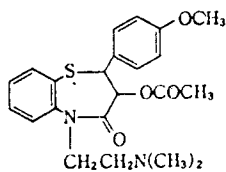
bepridil



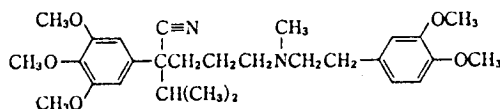
nitrendipine



verapamil



diltiazem



D-600 (gallopamil)

Figure 1. The chemical structure of calcium antagonists

## II. 실험재료 및 연구방법

### 1. Calcium uptake 측정방법

#### 1. 1. 사용 세포주 및 세포 배양방법

본 실험 목적상 Human embryo lung cell인 LuMA 세포를 사용하여 세포배양법 및 calcium uptake assay를 확립하였고 일부 Mouse collagenase secreting fibroblast인 3T6세포로 비교 실험하였다. 이 세포주는 목암 생명공학연구소에서 분양받았다. LuMA세포는 10 % Fetal bovine serum (FBS)와 gentamycin 20  $\mu$ g/ml가 들어간 Minimum essential medium(MEM)(GibcoBRL Cat. No.41500-016 contains Earle's salts, L-glutamine, nonessential amino acids) 배지를 사용하여 75 cm<sup>2</sup>와 175 cm<sup>2</sup> 조직배양병에서 배양하였다. 이때 배양조건은 37 °C이고 이산화탄소 농도 5 %를 유지시킨 세포배양기(Revco)에서 4-5 일간 배양하였다. 대수기의 세포를 PBS(Phosphate buffered saline)로 1 회 세척후, 0.05 % trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 cell을 부유시키고 새로운 배지로 채워서 1:2 로 희석하여 계대배양하였다. calcium uptake 실험시에는 이와 같이 배양한 LuMA 세포를 계대배양시  $1 \times 10^5$  cells/ml 농도로 24 well culture microplate에 분주하여 이들 배양하여 monolayer형성을 확인 한 후 실험에 사용하였다. 3T6세포는 10 % FBS와 gentamycin 20  $\mu$ g/ml가 들어간 Dulbecco's Modified Eagle Medium(D-MEM)(Gibco BRL Cat. No. 23700-040 contains 4,500mg/l L-glucose, 25 mM HEPES buffer, no sodium pyruvate or sodium bicarbonate) 배지를 사용하고 계대배양방법은 LuMA세포와 동일하게 시행하였다.

## 1. 2. Assay system of calcium uptake

Calcium uptake assay의 적합한 실험 조건을 구축하기 위하여  $^{45}\text{Ca}^{++}$  농도에 따른 적정 실험조건 및 세포의 칼슘농도의 영향, 배양시간 그리고 칼슘 유입의 증가 혹은 억제를 하는 ionomycin(sigma chemical co.), verapamil(sigma chemical co.)의 농도가 칼슘유입에 미치는 영향 등을 알아보기 위한 각각의 실험을 선행하였다. 한편 위의 결과에 의해 얻은 적정실험조건 하에서 해양미생물 배양시료로 부터 칼슘유입 조절물질 탐색시에는 cell monolayer를 형성한 24 well microplate로 부터 배지를 제거하고,혈청이 첨가 되지 않은 새로운 배지를 0.5 ml씩 각 well에 넣은 후, 준비된 미생물배양 검정액(100  $\mu\text{l}/\text{ml}$ )을 넣었다. 이때 미생물배양 검정액의 유기용매가 세포에 독성을 나타내므로 세균의 folch층과 방선균의 균체와 ethylacetate층은 배지로 2배 희석하여 사용하였다. 각 well에 미생물 검정 배양액을 넣은 후 곧  $^{45}\text{CaCl}_2$  (5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )(Dupont NEN 10Ci(370Bq)/g)를 포함하는 배지 0.5 ml를 넣고 10 분 반응시켰다. ( $^{45}\text{Ca}^{++}$ 의 최종농도 2.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) 반응 후 상등액을 제거하고 500  $\mu\text{l}$   $\text{LaCl}_3$  soln(1 mM  $\text{LaCl}_3$  in PBS) 으로 1-2분 처리하여 calcium channel을 통한 더 이상의 calcium influx를 막아준다. 2 회 PBS로 세척한 후 500  $\mu\text{l}$  warm lysing soln (0.25 % SDS, 0.125 M NaOH)으로 세포를 lysis시킨 후 pipetting하여 400  $\mu\text{l}$ 를 scintillation vial에 옮기고, scintillation cocktail인 Lumagel (Lumac-LSC) 4 ml를 넣고 충분히 흔들여 준 후 liquid scintillation counter(PACKARD, TRI-CARB 4000series)을 이용하여 cpm을 측정하여 quenching을 보정하여 주었다. 칼슘유입 증가대조구로는 5  $\mu\text{M}$  ionomycin (1 mM stock soln. in EtOH)을, 칼슘유입 억제대조구로는 5  $\mu\text{M}$  verapamil (1 mM stock soln. in EtOH)을 사용하였다.



< 방사성 동위원소를 이용한 calcium uptake assay >

LuMA를 24well microplate에 분주( $1 \times 10^5$  cells /  $\text{cm}^2$ )하여 배양

↓ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

세포가 단일층을 형성하면 상등액을 버린다 .

↓

혈청 없는 배지 0.5ml를 각well에 넣는다.

↓

각 well에 검색하고자 하는 미생물 검정액 100 $\mu$ l을 넣는다.

↓

<sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> (5 $\mu$ Ci/ml)를 포함하는 혈청없는 배지 0.5ml를 각 well에 넣고 반응시킨다.

↓ 10분

상등액을 버리고 1mM LaCl<sub>3</sub> 용액 0.5ml를 넣고 1-2분 반응시킨다.

↓

상등액을 버리고 2회 PBS로 세척한다.

↓

Lysing solution 0.5ml을 각 well에 넣고 pipetting한 후 0.4ml을 취해 scintillation vial에 담는다.

↓

scintillation cocktail 4ml를 각 vial에 담고 잘 섞은 후 liquid scintillation counter를 이용하여 측정

## 2. 해양미생물로 부터 칼슘수송 조절물질 탐색

한국 연근해역 및 남극환경의 해수, 해변토양, 해양동물 시료 등에서 분리한 세균 3000 주와 해양방선균 5000주를 분리 보존한 것을 배양하고 검색에 용이하게 추출하여 각각 암세포와 정상세포에 대한 미생물 검정추출액의 독성능을 실험한 후, 세포에 독성을 전혀 나타내지 않는 세균 검정추출액과 방선균 검정추출액을 선별하였으며, 이 추출액들에 한하여 human fibroblast cell(LuMA: human embryo lung)의 세포막 calcium channel을 통한 칼슘수송에 현저한 영향을 주는 물질을 탐색하였다.

### 2. 1 시료채취 및 미생물분리.

우수한 생리활성 균주를 분리하기 위하여 한국 근해 및 남극과 러시아의 해수 및 해변토양, 해양동물을 시료로 채취하였다. 채취된 시료는 현장에서 즉시 처리하거나, 멸균된 시료 채취병에 넣어 실험실까지 저온 운반하였다. 세균을 분리하기 위해서는 PYG 한천배지(Table 2.)를 사용하였고 방선균을 분리하기 위해서는 ISP4 한천배지(Table 3.)를 사용하였다. 배양시간과 온도는 각각 세균은 25℃에서 5-6일간, 그리고 방선균은 30℃에서 6-7일간으로 하였다. 배양 후 형성된 균체를 형태적 특징으로 구분하여 한천배지에 접종, 단일균체로 판단될때까지 순수 분리하였다. 분리된 세균 및 방선균 균주는 20% glycerol 용액에 현탁하여 -70℃에서 보관하였다.

### 2. 2. 미생물 배양액 추출 방법

일반세균은 PYG액체배지 4ml에 접종하여 정치배양 ( 25℃, 5-6일 ) 한 후, 균체와 배양액의 분리하지 않고 3.5ml folch soln (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 2:1)을 첨가한 후 원심분리 하여, 하층의 folch solution layer와 상층의 water phase 시료로 각각 나누었다. 방선균은 변형된 Zobell 배지 (SZ배지)(Table 4.) 10 ml에 포자접종하여 진탕배양(30 ℃, 6 - 8 일)한 후, 원심분리하여 균체와 배양액을 나누고 균체는 methanol 5ml로 추출, 배양액은 ethylacetate 7 ml를 첨가하여 ethylacetate 와 water phase로 분리하였다. 각 추출액은 eppendorf tube에 1ml씩 담아 4℃에서 보관 하였으며, 일반세균의 folch solution layer와 방선균의 ethylacetate soluble phase는 speed vac 으로 농축하여 보관, 검색전 각각 200 μl의 methanol을 넣어 사용하였다.

Table 2. Composition of PYG medium

peptone	10 g
yeast extract	5 g
glucose	20 g
aged sea water	500 ml
distilled water	500 ml
pH	7.2



Table 3. Composition of ISP4 medium (inorganic salts-starch agar medium)

soluble starch	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
NaCl	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g
trace salts solution	1 ml
agar	15 g
aged sea water	750 ml
distilled water	250 ml
pH	7.2

\* trace salts solution

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
distilled water	100.0 ml

Table 4. Composition of SZ medium

glucose	20 g
bacto-peptone	5 g
yeast extract	1 g
iron phosphate	0.1 g
aged sea water	750 ml
distilled water	250 ml
pH 7.4	

### 2. 3. 시료의 세포 독성능 검사

추출된 미생물 검정추출액은 본실험인 칼슘유입 탐색실험에 앞서 세포에 미치는 영향을 먼저 검사하였다. 이는 미생물의 대사산물 중에서 세포의 독성을 나타내는 경우가 많으며 이러한 경우 본 실험에 적합치 않으므로 세포에 영향을 미치지 않는 추출액을 먼저 선별하기 위함이었다. 정상세포인 쥐의 적혈구에 대한 용혈능 검사와 쥐의 lymphocyte와 암세포(DLD-1, P388D1)에 대한 세포 독성능 검사를 거쳐 모두 독성을 나타내지 않는 미생물 검정 추출액을 1차로 선별하였다.

#### 2. 3. 1. 적혈구에 대한 용혈능 검사

물질의 적혈구 용해정도를 측정하기 위한 방법으로 후에 활성 물질을 얻게될

경우 약제로 개발될 때를 대비하여 실험하였다.

사용된 세포는 쥐의 적혈구로 살아있는 쥐의 혈액으로부터 분리하여 미생물 검정 배양액의 적혈구 용해도를 측정하였다. PBS(phosphate buffered saline) 5 ml를 담은 비이커에 살아있는 쥐의 목을 따서 혈액을 떨어뜨린다. 채취된 혈액은 원심분리 ( 2000rpm, 4min, 4-10℃ )하여 세포를 회수하고 이를 PBS로 3 회 세척한다. 용혈능 검사시에는 적혈구 침전물(50%)은 최종농도 1 %가 되도록 PBS로 희석하여 사용하였다.

96 well microplate의 각 well에 실험하고자 하는 미생물 검정 배양액을 20 µl 씩 넣은 후 각 well에 1 % 적혈구 현탁액 200 µl를 첨가하여 37 ℃, 1 시간 동안 반응시킨 후 육안 관찰하였다. 시료가 용혈을 나타내면 적혈구가 용해되므로 투명한 상태가 되고, 용혈을 나타내지 않는 경우에는 적혈구가 well 바닥에 침전되어 불투명하게 보인다. Microplate reader(Molecular Devices, THERMOmax)를 사용할 때는 540nm에서 O.D값을 측정하였고 이 때, 용혈양성대조구로서 강한 용혈 활성을 보이는 멧게에서 분리한 toxin (방선균 630-1 균체의 methanol 추출액)을, 용혈음성대조구로는 PBS를 각 20 µl 씩 처리하였다.

### 2. 3. 2. Lymphocyte에 대한 세포 독성능 검사

세포독성능 측정은 Carmichea 등의 MTT assay를 변형하여 사용하였다. MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]는 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 환원되어 청색의 formazan결정이 생성되는데 이에 용해제(dimethyl sulfoxide)를 넣고 분광 분석기로 흡광도를 측정하여 간접적인 세포수를 측정하는 방법이다.

쥐의 지라로부터 분리한 lymphocytes를 사용하여 정상세포에 대한 미생물 검정배양액의 세포 독성능을 조사하였다. 이러한 조사방법은 쥐의 지라를 채취하여 homogenization하여 gauze로 거른 다음 그 액을 원심분리(2000 rpm, 4 min, 4 - 10 °C)하여 그 침전물을 PBS로 3 회 세척하였다. 최종 세포농도는 한 개의 지라당  $10-15 \times 10^7$  cells이며 세포 독성능 실험에는  $2-5 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 RPMI배지로 희석하여 사용하였다.

분리된 lymphocyte 를 96 well microplate의 각 well에  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 실험하고자 하는 미생물 검정 배양액  $10 \mu\text{l}$ 를 넣고  $37^\circ\text{C}$ 에서 2 시간 동안 반응시킨 후 각각의 well에  $50 \mu\text{l}$  MTT용액을 넣고  $37^\circ\text{C}$ 에서 4 시간 동안 처리하였다. 상등액을 제거하고, formazan결정을 dimethylsulfoxide (DMSO)를 넣고 용해시킨 후 ELISA microplate reader로 540 nm에서 O.D 값을 측정하였다. 이때 세포독성양성대조구는 강한 세포독성을 나타내는 방선균 630-A균체의 methanol추출액을 사용하였으며 음성대조구로는 PBS를 사용하였다.

### 2. 3. 3. 암세포에 대한 세포 독성능

사용된 세포는 Human adenocarcinoma인 DLD-1과 Mouse lymphoid neoplasm인 P388D1이며 한국 세포주 은행에서 분양받았다. DLD-1과 P388D1은 10 % FBS (Fetal bovine serum)와 Kanamycin  $20 \mu\text{g/ml}$ 가 들어간 RPMI배지(GibcoBRL Cat. No. 31800-022. contains L-glutamine but no bicarbonate)를 사용하여  $25 \text{ cm}^2$  flask에 넣어 일주일 간격으로 계대배양하였다.

세포 독성능 측정시, P388D1은 대수기의 세포를 원심분리(1500rpm, 5min)한 후 PBS로 1회 세척 후 새로운 배지로  $1 \times 10^5$  cells/ml로 부유시켜 사용하였고,

DLD1의 경우는 monolayer형성후, PBS로 1회 세척 0.05 % trypsin-EDTA 용액으로 세포를 부유시키고 원심분리(1500 rpm, 5 min)한 후 새로운 RPMI배지로  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>로 부유시켜 사용하였다.

$1 \times 10^5$  cells/ml DLD-1이나 P388D1 세포 현탁액을 96well microplate well에 분주한 후, 실험하고자 하는 미생물 검정배양액을 최종농도 5  $\mu$ l/ml와 0.5  $\mu$ l/ml가 되도록 희석하여 100  $\mu$ l씩 넣고, 4 일 동안 배양한 후 50  $\mu$ l MTT 용액을 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 4 시간 동안 반응시켰다. 상등액을 제거하고 formazan 결정을 DMSO를 넣고 용해시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 측정하였다. 육안 판별시, 대조구 즉 세포만 배양한 well은 진한 보라색을 나타내며, 세포 호흡을 억제할 경우에는 well은 옅은 투명한 보라색을 나타냄으로써 그 발색정도에 따라 세포 독성능 정도를 판별할 수 있다.

### Ⅲ 결 과

미생물검정 추출액으로 부터 calcium uptake 조절물질을 탐색하기 이전에 탐색실험 방법을 구축하기 위하여 몇가지 실험을 선행하였다. 이 실험은 주로 대조구의 설정 및 반응시간 그리고 사용되는 방사능 동위원소( $^{45}\text{Ca}^{++}$ )의 농도와 세포 외부에 주어지는 배지 성분내의 칼슘 농도 등을 정하여 측정방법의 민감도와 편의성, 재현성을 높이고 표준화된 측정방법을 구축하기 위한 것이다.

#### 1. 세포의 칼슘농도가 세포막 ion channel을 통한 calcium uptake에 미치는 영향

세포막 ion channel을 통해 칼슘이 세포내로 수송될 때 세포외에 존재하는 칼슘농도는 유입속도에 많은 영향을 미치는 중요한 인자 중 하나이다. 따라서 본 실험에서는 세포막 ion channel을 통해 칼슘이 세포내로 수송될 때 적절한 세포외 칼슘농도를 알기 위해 calcium uptake 반응실험시 약 1.8 mM의 칼슘이온이 존재하는 MEM 배지를 PBS로 각각 그 농도비(MEM:PBS)가 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10이 되도록 희석하여 실험하였다. 따라서 각실험구의 최종 칼슘농도는 1.8, 1.44, 1.08, 0.72, 0.36, 0 mM이고 이때  $^{45}\text{Ca}^{++}$ 의 농도는 항상 일정하게 5  $\mu\text{Ci/ml}$ 로 유지했으며 이 양은 방사능이 표지되지 않은 칼슘농도에 비해 무시될 정도로 적은 양이다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 칼슘농도 MEM:PBS가 6:4 비율일때 즉 약 1.08 mM의 칼슘이 첨가된 실험구에서 cpm값이 가장 높음을 알 수 있었다. 한편

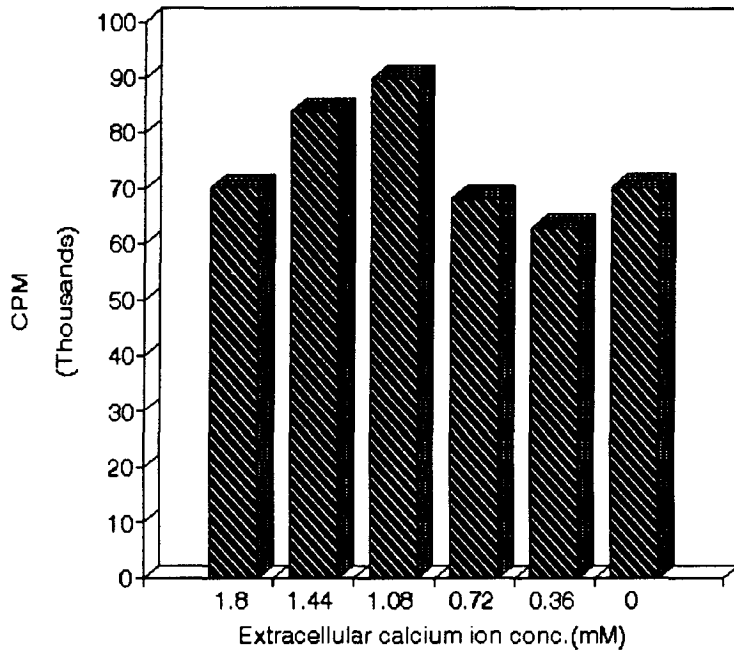


Figure 2. The effect of extracellular calcium concentration on calcium influx

1.08 mM 이상의 칼슘이온농도를 첨가했을시에는 오히려 cpm값이 감소하는데 이는 방사능 표지된 칼슘이 표지않된 칼슘농도의 증가로 인하여 희석효과가 나타난 것으로 사료된다. 그러나 1.08 mM 이하의 칼슘이온 농도에서는 방사능 표지된 칼슘농도/방사능 표지되지 않은 칼슘농도 의 비는 상대적으로 높으나 적절한 칼슘 총농도가 유지되지 않아 cpm값이 상대적으로 낮은 것으로 사료된다. 즉 Michaelis-Menten 공식에 의하면 기질의 농도가 포화농도로 존재하지 않을 경우 기질유입 속도가 상대적으로 낮아져 결과적으로 기질의 유입량은 적게된다. 그러므로 이 후 모든 실험의 조건은 세포의 칼슘농도를 약 1.08 mM로 유지하기 위하여 MEM배지를 PBS로 6:4 희석하여 사용하였다.

## 2. 세포막 ion channel을 통한 calcium uptake실험시 방사능 동위원소의

### 적정농도 결정

세포내로 유입된 칼슘의 양은 결국 방사능 표지된 칼슘의 유입량으로 추정할 수 있다. 따라서 최적조건에서 가장 높은 cpm 값을 얻어 실험방법의 민감성을 높이기위해 실험에 적절한 방사능 동위원소  $^{45}\text{CaCl}_2$ 의 농도를 결정하였다.  $^{45}\text{CaCl}_2$  최종농도가 1, 2.5, 5  $\mu\text{Ci/ml}$ 되도록 MEM배지로 희석한 후 LuMA세포에 유입된 cpm값을 측정하였다. 이 때 방사능 표지가 않된 칼슘의 농도는 약 1.08 mM이며, 반응시간은 10, 17, 24 분으로 하였다.  $^{45}\text{CaCl}_2$  5  $\mu\text{Ci/ml}$ 의 총 cpm값은 약 5,000,000 cpm 으로 나타났다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 LuMA 세포막 ion channel을 통해 유입되는  $^{45}\text{Ca}^{++}$ 은 총 cpm값에 비교했을때 매우 적음을 알 수 있었으며, 1 - 5  $\mu\text{Ci/ml}$  사이의  $^{45}\text{Ca}^{++}$ 의 농도에서는 유입된 칼슘양을 나타내는 cpm값이 대동소이하여 방



사능 동위원소로 표지된  $^{45}\text{Ca}^{++}$  농도에 따라 많은 차이가 없음을 알 수 있다. 그러나 3T6 세포의 경우 LuMA 세포와는 달리  $^{45}\text{Ca}^{++}$  농도 5  $\mu\text{Ci/ml}$  첨가시 가장 높은 값을 나타내고 농도가 감소함에 따라 cpm 값이 다소 감소하는 경향을 살펴 볼 수 있었다(Fig. 4). 한편 배양시간에 따른 각 농도별 유입량은 LuMA 세포의 경우 두드러진 차이를 발견할 수 없었으나 3T6 세포의 경우 5  $\mu\text{Ci/ml}$  농도에서 배양 17 분 후 매우 높은 cpm값이 확인되었으나 그 원인은 확실하지 않다. 그러나 배양시간에 따른 칼슘 유입에 미치는 영향은 다음항에서 재실험하여 비교 검토하였다.

따라서 LuMA 세포를 이용한 칼슘유입 조절물질 탐색실험시에는 2.5  $\mu\text{Ci/ml}$  농도의  $^{45}\text{Ca}^{++}$  을 사용하기로 결정하였다.

### 3. 세포막 ion channel을 통한 $^{45}\text{Ca}^{++}$ uptake의 시간별 비교

칼슘이 세포내로 유입되는 반응시간을 알기 위하여 2.5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{45}\text{CaCl}_2$ 를 첨가하여 세포와 반응시킬때 그 시간을 각각 10분으로 부터 7분 간격으로 배양한 후 분석 비교하였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 세포막 ion channel을 통한  $^{45}\text{Ca}^{++}$  uptake는 10 분 이내에 모두 유입되는 것으로 관찰되었으며 배양시간을 지연시켜도 칼슘유입이 상승하지 않는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 앞의 실험결과인 Fig. 3과 4에서도 확인되었다. 이를 근거로 반응시간을 10 분으로 결정하였다.

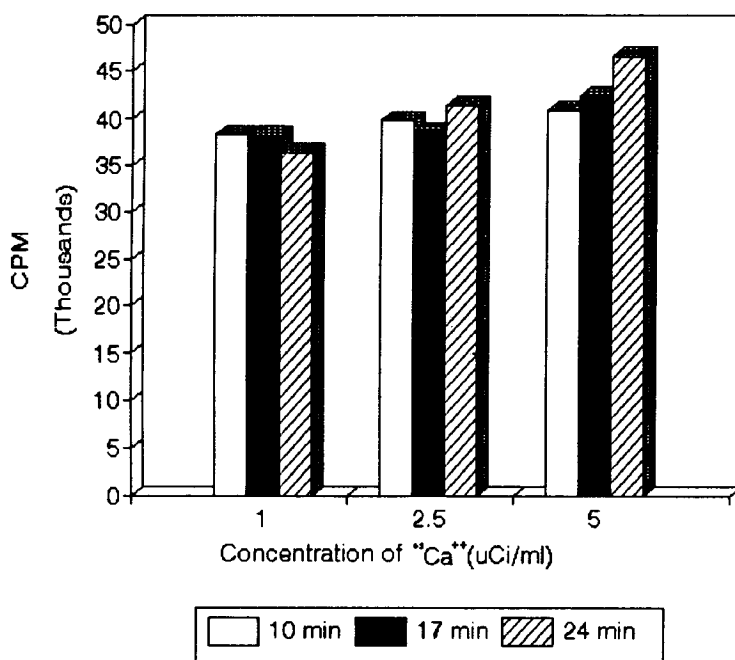


Figure 3. The effects of  $^{45}\text{Ca}^{++}$  concentration and incubation time on the  $^{45}\text{Ca}^{++}$  uptake rate of LuMA cell line.

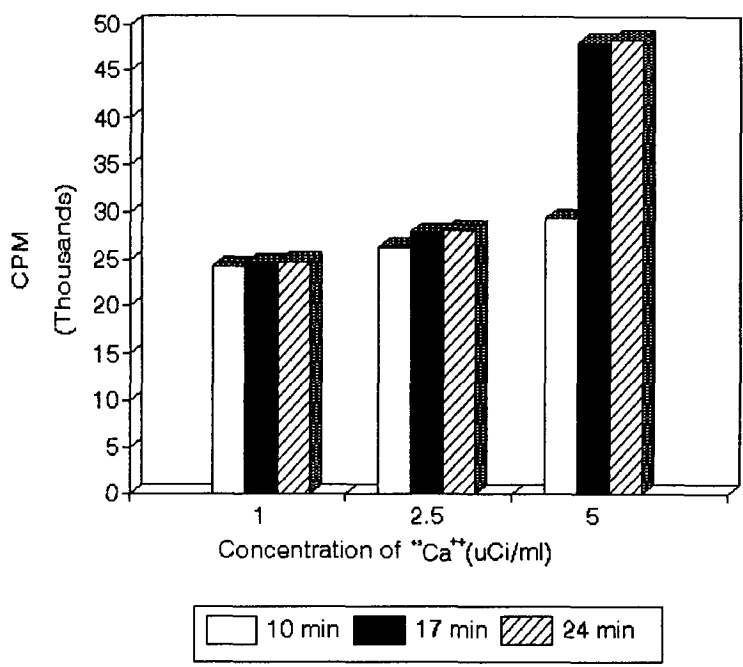


Figure. 4. The effects of <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> concentration and incubation time on the <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> uptake rate of 3T6 cell line.

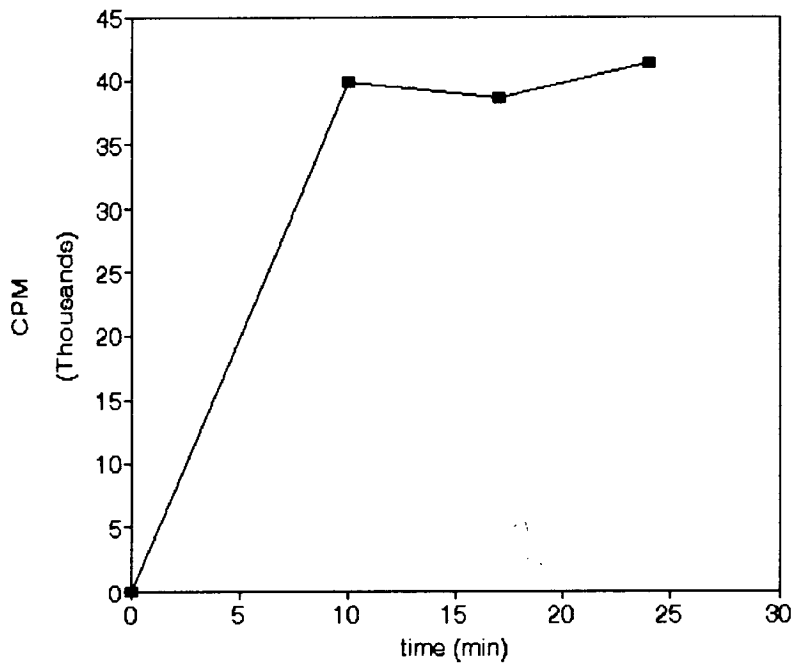


Figure 5. The fluctuations of calcium influx amount by the incubation time.

#### 4. 비교대조구의 적정농도 탐색

본실험을 수행하면서 세포주의 건강상태와 기타 실험조건의 정상적인 작동 여부를 파악하기 위하여 매 실험시 비교대조구를 병행실험해야 한다. 이때 칼슘 유입을 촉진하는 비교대조구로서는 ionophore인 ionomycin과 A23187이 주로 사용되나 A23187은 자체 형광성이 있는 것으로 밝혀져 실험에서는 ionomycin(7)을 사용하였으며, 칼슘유입을 억제하는 비교대조구로서 calcium channel의  $\alpha$ -subunit를 antagonize하여 channel을 차단하는 것으로 알려진 verapamil(14)을 사용하였다. 두 약제는 모두 ethanol로 용해시킨 1 mM 농도의 원액을 MEM배지로 희석하여 실험에 사용하였다.

Fig 6에서 보는 바와 같이 ionomycin은 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M에서 대조구에 비해 각각 2.4 배, 2.6 배로 칼슘유입이 증가하는 현상을 관찰 할 수 있었다. 그러나 농도가 15  $\mu$ M 일때는 오히려 그 측정값이 낮아짐을 볼수 있었는데 이는 ionomycin이 세포에 독성을 나타내는 것으로 사료된다. Verapamil을 첨가할 시에는 예상한대로 세포의 칼슘유입을 억제하는 것으로 나타났으며 1  $\mu$ M에서 15  $\mu$ M까지 농도가 증가됨에 따라 대조구에 비해 16 %, 28 %, 34 %, 47 % 정도 칼슘유입이 억제되었다. 이 결과로 부터 Verapamil 첨가농도와 칼슘유입 억제활성이 상관관계를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

한편 위의 두 약제 ionomycin과 verapamil의 LuMA세포에 대한 독성능을 비교 검토한 결과 Fig 7과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 먼저 세포만을 배양했을시 O.D. 값은 약 0.35로 나타났으나 용매인 ethanol을 1 % 첨가할 시 O.D. 값은 약 0.28로 약 20 % 정도의 세포독성을 나타냈다. ethanol 용매농도 1 %는

ionomycin, verapamil 10  $\mu\text{M}$ 을 용해시 필요한 최대농도로 그림에서 보는 바와 같이 세포성장에 다소 영향을 미치나 다른 실험구의 세포성장 억제가 ethanol 만 에 의한 것이 아님을 알 수 있어 참고자료로 표시하였다. Ionomycin의 경우 0.1  $\mu\text{M}$ 에서 1  $\mu\text{M}$ 로 농도가 증가하여도 세포성장에 아무 영향을 나타내지 않았으나 5  $\mu\text{M}$ 에서는 약 63 %의 LuMA세포 성장을 저해시키고 10  $\mu\text{M}$  농도에서도 약 81 % 정도의 현저한 세포성장 억제현상을 관찰할 수 있었다. Verapamil의 세포에 대한 독성능은 0.1  $\mu\text{M}$  에서 5  $\mu\text{M}$ 까지는 대조구와 유사한 세포농도를 관찰할 수 있었으나 10  $\mu\text{M}$ 에서는 약 63 % 정도 세포감소를 관찰할 수 있었다.

따라서 본 실험에서는 ionomycin의 경우 세포 독성능을 나타내기는 하나 칼슘유입을 촉진하는 농도 5  $\mu\text{M}$ 를 적정농도로 결정하였고 verapamil의 경우 세포에 독성을 나타내지 않는 농도 중 가장 높은 억제활성을 보이는 5  $\mu\text{M}$ 을 적정농도로 결정하여 탐색실험에 적용하였다.

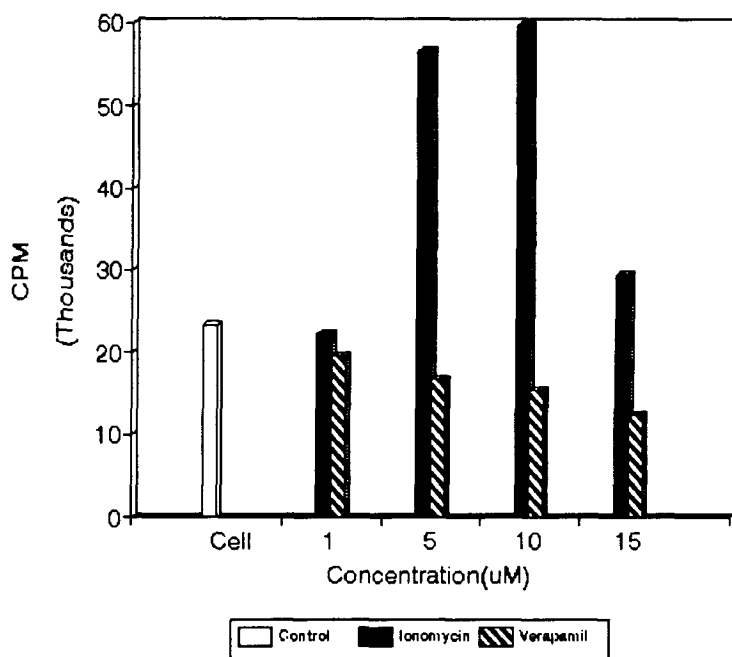


Figure 6. The effects of the concentrations of ionomycin and verapamil on the calcium uptake rate of the LuMA cell.

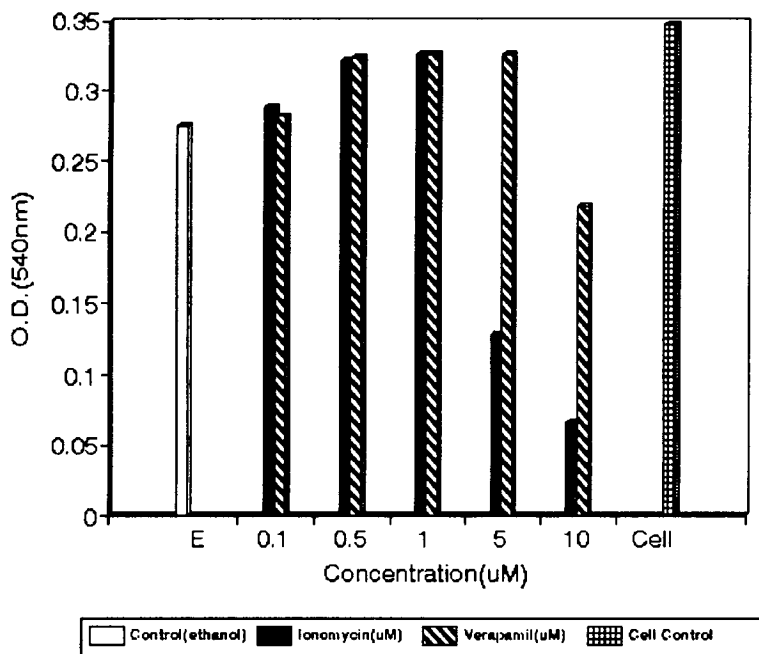


Figure 7. The effects of the concentrations of ionomycin and verapamil on the LuMA cell growth.



## 5. 해양미생물로 부터 칼슘수송 조절물질 탐색

분리보존된 해양유래 세균 3000 주와 방선균 5000 주를 배양하고, 각각 검정 배양액을 추출하여 먼저 세포 독성능 및 용혈능이 없는 세균 검정배양액 1,414 개와 방선균 검정배양액 2,124개를 먼저 선별하였다. 이중 세균 검정배양액 139 개(수층 91개, folch soln 추출액 48개), 방선균 검정배양액 595개(균체 추출액 305개, 수층 237개, ethylacetate 추출액 53개)의 세포내로의 칼슘유입 조절물질 탐색실험을 하였고 이들 중 대조구의 세포내 칼슘유입양과 비교하여 칼슘유입이 60 %이상 촉진되거나, 30 %이상 저해하는 미생물 검정배양액을 선발하였다. 그 결과 방선균 균주번호 224의 수층시료, 100의 수층시료, 267의 균체 추출액, 8405의 균체 추출액은 칼슘수송을 촉진하고, 세균 균주번호 17BS15의 folch층과 17BS16의 수층, 방선균 균주번호 5792-2의 균체 추출액, 282의 ethylacetate 추출액은 칼슘유입을 저해하는 것으로 나타났다. Table 5와 Table 6은 칼슘 유입에 현저한 영향을 준다고 여겨지는 세균 및 방선균의 검정배양액들의 세포독성능, 용혈능 그리고 칼슘유입정도를 대조구에 비한 백분율로 나타낸 것이며 암세포에 대한 세포독성능은 거의 나타나지 않으므로 표에서 제외하였다. 이들은 대량배양, 분리정제, 구조분석을 거쳐 칼슘 수송에 영향을 주는 새로운 물질인지를 확인하게 될 것 이며, 높은 활성의 새로운 물질로 판명될 경우, 임상 실험을 거쳐 순환계 및 심장질환에 좋은 약제개발 후보물질이 될 수 있을 것이다. 향후 실험 계획은 확립된 실험방법을 이용하여 아직 실험되지 않은 선발된 미생물 검정배양액의 세포막 ion channel을 통한 칼슘유입 조절물질의 탐색을 계속 수행하고 이미 1차년도에서 얻은 결과 중 가능성이 높은 물질의 분리정제 및 구조분석을 통한 신규성을 확인할 예정이다.

Table 5. Transportation rate of Ca ion and cytotoxicological datas estimated from culture extracts of the selected actinomycetes.

균주번호	lymphocyte에 대한			용혈능			Ca <sup>++</sup> 유입		
	세포 독성능(%)			(%)			(%)		
	M	E	W	M	E	W	M	E	W
224	0	0	0	37.4	0	0	-	-	160
100	95.6	0	0	94.0	0	0	-	125	155
267	0	23.7	0	0	0	1.5	171	-	-
5792-2	0	0	0	0	0	0	62	94	83
8405	0	0	0	0	4.4	0	162	-	103
282	3.9	0	2.7	21.6	0	0	-	62	-

M : 균체를 추출한 methanol 층

E : 배양액으로부터 추출한 ethylacetate 층

W : 배양액으로 부터 ethylacetate추출후 남은 수층

\* Ca<sup>++</sup>유입의 측정값은 아무 처리하지 않은 세포를 100%로 두었을때를 기준으로 <100 는 저해, > 100는 촉진을 의미.

\* - : not determined

Table 6. Transportation rate of Ca ion and cytotoxicological datas estimated from culture extracts of the selected bacteria strains.

균주번호	Lymphocyte에 대한 세포 독성능(%)		용혈능 검사 (%)		Ca <sup>++</sup> 유입 (%)	
	W	F	W	F	W	F
17BS15	0	0	0	0	93	43
17BS16	0	0	0	0	188	99

W : 균체 및 배양액으로 부터 folch sol. 으로 추출하고 남은 수층

F : 균체 및 배양액으로 부터 추출한 folch 층

#### IV. 참고 문헌

1. Wheeler, L. A., G. Sachs, D. Goodrum, L. Amdahl, N. Horowitz, and G. W. De Vries. 1988. Importance of marine natural products in the study of inflammation and calcium channels. In: Biomedical importance of marine organisms. Ed. by Fautin D.G. California Academy of Science, San Francisco. p.125-132.
2. Augustine, G. J., M. P. Chalton, and R. Horn. 1988. Role of calcium activated potassium channels in transmitter release at the squid giant synapse. *J. Physiol.* 398 : 149-164.
3. Fleischer, S. and M. Inui. 1989. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 18 : 333-364.
4. Poenie, M. J. Alderton, R. Y. Tsien, and R.A. Steinhardt. 1985. Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle. *Nature.* 315 : 147-149.
5. Steinhardt, R. A. and J. Alderton. 1988 . Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. *Nature.* 332 : 364-366.

6. Kao, J. P. Y., J. M. Alderton, R. Y. Tsien, and R. A. Steinhardt . 1990. Active involvement of  $Ca^{++}$  in mitotic progression of swiss 3T3 fibroblast. J. Cell. Biol. 111 : 183-196.

7. Thomas, A. P. and F. Delaville. 1991. The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration incell populations and single cells. in: Cellular calcium. Ed by J. G. McCormack and P. H. Cobbold. IRL press. p.1-54.

8. Neher, E. and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. Scientific America. march. p.28-35.

9 McPherson, P. S. and K. P. Campbell. 1993. The Ryanodine Receptor/ $Ca^{++}$ Release Channel. J. Biol. Chem. 268 : 13765-13768.

10. Gordon. D. 1990. Ion channels in nerve and muscle cells. Current opinion in cell biology. 2 : 695-707.

11. Qur, J., H. Schweitz, A. Schmid, and M. Lazdunski. 1986. A polypeptide toxin from the coral *Goniopora*. FEBES. 202 : 331-335.

12. Rivier, J., R. Galyean, W. Gray, A. Azimi-Zonooz, J. M. McIntosh, L. J. Cruz, and B. M. Olivera. 1987. Neuronal calcium channel inhibitors. *J. Biol. Chem.* 262 : 1194-1198.

13. Olivera, B. M., W. R. Gray, R. Zeikus, J. M. McIntosh, J. Varga, J. Riviera, V. De santos, and L. J. Cruz. 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *science.* 230 : 1338-1343.

14. Barry, W. H., J. D. Horowitz, and T. W. Smith. 1985. Comparison of negative inotropic potency, reversibility, and effects on calcium influx of six calcium channel antagonists in cultured myocardial cells. *Br. J. Pharmac.* 85 : 51-59.