

해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구

A Study on the Development of Novel and Biomedically
Available Substances from Marine Organisms

1995. 5.

연 구 기 관
한 국 해 양 연 구 소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구”의 보고서로 제출합니다.

1995년 5월

연구기관 : 한국해양연구소

연구책임자 : 신 종 현

연구원 : 서영완, 이흥금, 조기웅
노정래, 이상훈, 정호성
흥기훈, 이동섭, 김석현
정창수, 강동진, 박선규
김상진, 전중균, 권개경
유신재, 최진우, 강영철
강성호, 백은주, 이근영
윤종배, 모상준, 윤상선
정상운, 윤태미, 이득수
박은희

연구조원 : 김보연

위탁연구기관 : 한국화학연구소

연구원 : 이종교, 홍승경, 김지현
김해수, 피미경

요 약 문

I. 제 목

해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양천연물 화학은 그 역사는 짧으나 급속히 성장하는 분야이다. 이미 6000 이상의 신물질의 구조가 결정되었으며 의·약학, 화학, 생물학 등 여러 관련분야의 연구에 필수적인 정보와 연구수단을 제공하여 이들의 발전에 크게 기여하고 있다. 해양천연물의 학문적, 산업적 중요성을 인식한 선진국에서는 이 분야를 21세기 생명공학의 핵심분야의 하나로 간주하고 막대한 연구노력을 기울인 결과 무수한 생리활성 신물질을 발견하였으며 이미 50여 물질특허를 획득하였다. 유용효소와 고분자 물질을 포함한 수종의 선도물질은 가까운 시일내에 시판될 것으로 예측되고 있다. 그러나 국내에서는 생명공학적 관심이 육상식물과 방선균등 미생물에만 국한되어 있으며 해양생물은 주목을 받지 못하고 있다. 해양천연물이 보유하고 있는 막대한 중요성과 유용자원에 대한 국가간의 경쟁이 점증하는 현실을 고려할 때 이 분야의 연구는 대단히 시급하다.

본 연구진에 의하여 기 수행된 탐색 연구의 결과를 기초로하여 이 과제의 최종 연구목표는 해양생물로부터 생리활성 신물질, 유용효소 및 유용고분자 물질의 개발에 있다. 또한 이 과정에서 생리활성 검색방법, 해양미생물의 분리, 배양 등 연구기술의 개발도 함께 추구될 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 우리나라 연안의 다양한 지역으로부터 저서군체 동물을 채집하여 분류하였다. 문헌조사, 조추출물에 대한 생리활성도 검색과 화학적 분석의 결과를 종합하여 중점연구대상 시료를 선정하였다.

2. 다양한 크로마토그래피 기술을 이용하여 2차 대사물질을 분리하였으며 분광자료의 해석과 화학반응의 결과를 종합하여 구조를 결정하였다. 신물질의 경우 생리활성도를 측정하였다.

3. 항종양 효과에 대한 검색방법과 해양천연물에 관한 기존의 연구결과를 수집, 분석하였으며 이를 기초로 체계적인 항종양 검색체계를 수립하였다. 또한 항미생물 효과와 활성에 대한 새로운 측정방법을 개발하였다.

4. 다양한 해양환경으로부터 미생물 균주를 분리하였으며 생리활성 효과가 우수한 균주를 선정, 대량 배양하였다.

5. 생화학적 분석에 의하여 고분자 물질과 유용효소를 생산하는 균주를 선정, 배양하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 남해안의 거문도와 거제도 해역으로부터 260kg 이상의 저서군체 동물 시료를 채집하였으며 11종의 강장동물, 43종의 해면동물, 4종의 원색동물 등 58종으로 동정되었다. 또한 남해, 동해, 중부 태평양, 남극등에서 채집한 퇴적음, 해양 동·식물, 해수 등 다양한 해양 환경으로부터 150여 방선균을 비롯한 1600여 미생물 균주를 채집하였다.

2. 조추출물에 대한 생리활성 측정과 화학적 분석의 결과를 종합하여 6종의 강장동물과 3종의 해면동물을 중점연구대상으로 선정하였으며 다양한 크로마토그래피 기술을 이용하여 10종의 신물질을 포함한 18종의 천연물을 분리하였다. 유기반

응과 분광자료 해석에 의하여 이들 sesquiterpenoids, diterpenoids, secosteroids, polyhydroxy steroids, pyridinium carboxylates 등으로 구조가 결정되었으며 다수의 물질이 항박테리아, 항바이러스, 세포독성등의 생리활성 효과를 갖고 있음을 확인하였다.

3. 기존의 생리활성 검색방법을 개선하기 위하여 해양 발광세균을 이용한 항미생물과 phospholipase A₂ 활성에 대한 새로운 검색방법이 개발되었다. 또한 lipase, superoxide dismutase, haloperoxidase 등 유용효소에 대한 활성검색 방법이 확립되었다.

4. 채집한 미생물 균주에 대한 항균과 항진균 활성검색결과가 우수한 8종의 세균과 17종의 방선균 균주를 선정하였다. 또한 체외 다당류(1종의 균주), lipase(12종), phospholipase(1종), superoxide dismutase(30종), agar 분해효소(5종) 등을 생산하는 균주도 선정하였다. 대량배양과 해당 대사물질의 분리가 진행중이다.

5. 해양생물로부터 항종양 신물질을 개발하기 위한 노력의 일환으로 검색방법과 생리활성 물질에 대한 기존의 연구결과를 수집, 체계적으로 분석하였다. 기 설치 중인 세포독성 측정체계를 개선하기 위하여 type I topoisomerase와 type IV collagenase 등 암세포 증식과 전이에 관계하는 효소에 대한 저해활성 검색방법을 확립하였으며 세포독성(20종의 균주)과 collagenase 저해활성(3종)이 우수한 방선균 균주를 선정하여 활성물질을 연구중이다.

요약하여 본 1차년도에는 해양생물로부터 신물질과 유용물질의 개발에 대한 장기연구를 위한 기초를 확립하였다. 당해년도의 연구결과는 국내에서도 해양생물에 대한 화학적 연구와 이용의 성공 가능성이 높은 것을 입증하였다.

SUMMARY

I. Title

A Study on the Development of Novel and Biomedically Available Substances from Marine Organisms

II. Objectives and Significances

Marine natural products chemistry is among the fastest developing fields of sciences. Despite its relatively short history, structures of more than 6000 novel secondary metabolites have been determined, and marine natural products chemistry has greatly contributed to the progress of many related fields including medicinal sciences, chemistry, and biology by providing essential informations and research means.

Acknowledging the great academic and industrial potentials of marine natural products, leading countries have considered this field as an important part of biotechnology for the 21st century, and have put tremendous efforts which have resulted in the isolation of numerous biologically active and structurally unique compounds culminating in more than 50 patents. Some lead compounds including novel enzymes and macromolecules have been expected to appear in the market in near future. However, biotechnological concern in Korea has been mainly focused on the metabolites of terrestrial plants and microorganisms, and marine organisms have attracted only very limited attention. Considering the tremendous potential of marine organisms and

increasing international competition for valuable substances, research in this field is a matter of urgency.

Based on the results of previous exploratory studies by this group, the ultimate goal of this long-term research is the development of novel natural products possessing the biomedical potentials from marine organisms. Developments of novel enzymes and macromolecules will be also pursued. In addition, chemical and biological techniques including screening methods and isolation and cultivation of marine microorganisms will be developed.

III. Contents and Scope

1. Benthic colonial animals have been collected from various sites of domestic waters and taxonomically classified. Target organisms have been selected by a combination of literature survey, bioactivity tests, and chemical analysis of organic crude extracts.

2. Secondary metabolites have been isolated by utilizing various chromatographic techniques. Structures have been determined by combined chemical and spectral analysis. Novel natural products have been tested for bioactivity.

3. Previous results on antitumor screening systems and active natural products have been collected and analyzed. Based upon the results of this analysis, a systematic screening system including enzyme inhibition tests for antitumor activity has been installed. In addition, new screening methods for antimicrobial and phospholipase A₂ activities have been developed.

4. Strains of microorganisms have been isolated from various marine environments. Based upon the results of bioactivity tests, strains possessing

significant activity have been selected and cultivated in large-scale.

5. Based upon the results of biochemical tests, strains producing macromolecules and enzymes have been selected and cultivated.

IV. Results and Suggestions

1. More than 260 kg of benthic colonial animals have been collected from the Geomundo and Geojaedo area. These specimens have been classified to total 58 species of coelenterates(11 species), sponges(43), and tunicates(4). In addition, more than 1600 microbial strains including 150 actinomycetes have been isolated from diverse marine environments such as sediments, algae, animals, and sea water of the South and East Sea, mid-Pacific, and the Antarctic.

2. Based upon the results of bioactivity tests and chemical analyses, 6 species of coelenterates and 3 species of sponges have been selected for chemical investigation. Eighteen metabolites including ten novel compounds have been isolated by utilizing various chromatographic techniques. By combined chemical and spectral methods, the structures of these compounds have been determined as sesquiterpenoids, diterpenoids, secosteroids, polyhydroxy steroids, and pyridinium carboxylates. Several compounds have exhibited antimicrobial, antiviral, and cytotoxic activities.

3. As a part of efforts to improve screening system, new methods of antimicrobial and phospholipase A₂ activity tests have been developed by using marine luminescent bacteria. Assay systems for enzymes including lipase, superoxide dismutase, and haloperoxidase have been also installed.

4. Based upon the results of antibacterial and antifungal activity tests, 8 strains of bacteria and 17 strains of actinomycetes have been selected for

chemical investigation. In addition, strains producing extracellular polysaccharides (1 strain), lipase(12), phospholipase A₂(1), superoxide dismutase (30), and agar digesting enzyme (5) have been selected from the corresponding assays. Large-scale cultivation and isolation of metabolites have been currently pursued.

5. As a part of efforts to develop novel antitumor compounds from marine organisms, previous results on screening systems and active compounds have been collected and analyzed. To improve the efficiency of cytotoxicity screening system, methods of measuring type I topoisomerase and type IV collagenase inhibitory activities have been installed. Based upon the results of these tests, strains of actinomycetes exhibiting potent cytotoxicity (20 strains) and collagenase inhibitory activity (3 strains) have been selected and currently under investigation.

In summary, the first year's study has established foundations for a long-term research on the developments of novel and biomedically available substances from marine organisms. The results of this year's research have clearly demonstrated the possibility of successful chemical investigation and utilization of marine organisms in Korea.

목 차

요약문	3
그림목차	15
표목차	21
제 1 장. 서론	23
제 2 장. 강장동물의 대사물질	28
2.1. 연구의 배경	28
2.2. Plexauridae과에 속하는 미분류종의 대사물질	31
2.3. <i>Calicogorgia granulosa</i> 의 대사물질	56
2.4. <i>Acabaria undulata</i> 의 대사물질	66
2.5. 실험방법	77
제 3 장. 해면동물의 대사물질	200
3.1. 연구의 배경	200
3.2. <i>Cliona celata</i> 의 대사물질	204
3.4. 실험방법	208
제 4 장. 해양생물로부터 유용물질의 개발	225
4.1. 연구의 배경	225
4.2. 균주의 수집 및 배양	231
4.3. 유용고분자물질 생산 검색	232
4.4. 유용효소 생산 검색	233
4.5. 해양발광세균의 발광반응의 이용법 개발	236
4.6. 실험방법	239
제 5 장. 생리활성물질 검색기술의 개발	250

5.1. 연구의 배경	250
5.2. 해양미생물의 분리, 배양 및 유기물질의 추출	258
5.3. Prescreening assay	262
5.4. Topoisomerase 저해물질의 탐색	264
5.5. Type IV coolagenase 저해물질의 탐색	274
5.6. 연구의 결과	284
제 6 장. 결론	286
참고문헌	289
위탁과제 - 항바이러스 약효검색	299

Contents

Summary	3
List of Figures	15
List of Tables	21
Chapter 1. Introduction	23
Chapter 2. Metabolites of coelenterates	28
2.1. Background	28
2.2. Metabolites of an unidentified species of the family Plexauridae	31
2.3. Metabolites of <i>Calicogorgia granulosa</i>	56
2.4. Metabolites of <i>Acabaria undulata</i>	66
2.5. Experimental	77
Chapter 3. Metabolites of sponges	200
3.1. Background	200
3.2. Metabolites of <i>Cliona celata</i>	204
3.3. Experimental	208
Chapter 4. Development of enzymes and macromolecules from marine organisms	225
4.1. Background	225
4.2. Collection and cultivation of marine microorganisms	231
4.3. Screening for bacterial production of macromolecules	232
4.4. Screening for bacterial production of enzymes	233
4.5. Development of new assay systems using luminescence of marine bacteria	236

4.6. Experimental	239
Chapter 5. Development of screening system for bioactive substances	250
5.1. Background	250
5.2. Isolation, cultivation, and extraction of marine microorganisms	258
5.3. Prescreening assay	262
5.4. Screening for topoisomerase inhibitors	264
5.5. Screening for type IV collagenase inhibitors	274
5.6. Results	284
Chapter 6. Conclusion	286
References	289
Assigned study - antiviral activity test	289

List of Figures

Fig. 2-1. Potential drugs isolated from gorgonians	30
Fig. 2-2. 9,10-Secosteroids isolated from an unidentified gorgonian of the family Plexauridae	33
Fig. 2-3. Biosynthetic pathway for origin of 9,10-secosteroids	40
Fig. 2-4. Secosteroids isolated from marine organisms	42
Fig. 2-5. Cladiellin derivatives isolated from an unidentified gorgonian of the family Plexauridae	45
Fig. 2-6. Partial structures for compound 92J-18-5	47
Fig. 2-7. Guaiazulenoid pigments isolated from <i>Calicogorgia granulosa</i>	58
Fig. 2-8. The most stable conformation of 91-12-3 obtained from molecular modeling	60
Fig. 2-9. Guaiazulenoids pigments isolated from marine organisms	61
Fig. 2-10. Polyhydroxysteroids isolated from gorgonian <i>Acabaria undulata</i>	67
Fig. 2-11. 3-Dimensional structure of polyhydroxysteroid 91K-1-1	76
Fig. 2-12. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-1	97
Fig. 2-13. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-1	98
Fig. 2-14. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-1	99
Fig. 2-15. HMQC spectrum of compound 92J-18-1	100
Fig. 2-16. IR spectrum of compound 92J-18-1	101
Fig. 2-17. UV spectrum of compound 92J-18-1	102
Fig. 2-18. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-1	103
Fig. 2-19. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-2	104

Fig. 2-20. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-2	105
Fig. 2-21. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-2	106
Fig. 2-22. TOCSY spectrum of compound 92J-18-2	107
Fig. 2-23. HMQC spectrum of compound 92J-18-2	108
Fig. 2-24. HMBC spectrum of compound 92J-18-2	109
Fig. 2-25. IR spectrum of compound 92J-18-2	110
Fig. 2-26. UV spectrum of compound 92J-18-2	111
Fig. 2-27. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-2	112
Fig. 2-28. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-3	113
Fig. 2-29. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-3	114
Fig. 2-30. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-3	115
Fig. 2-31. TOCSY spectrum of compound 92J-18-3	116
Fig. 2-32. HMQC spectrum of compound 92J-18-3	117
Fig. 2-33. HMBC spectrum of compound 92J-18-3	118
Fig. 2-34. IR spectrum of compound 92J-18-3	119
Fig. 2-35. UV spectrum of compound 92J-18-3	120
Fig. 2-36. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-3	121
Fig. 2-37. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-4	122
Fig. 2-38. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-4	123
Fig. 2-39. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-4	124
Fig. 2-40. HMQC spectrum of compound 92J-18-4	125
Fig. 2-41. IR spectrum of compound 92J-18-4	126
Fig. 2-42. UV spectrum of compound 92J-18-4	127
Fig. 2-43. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-4	128
Fig. 2-44. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-5	129

Fig. 2-45. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-5	130
Fig. 2-46. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-5	131
Fig. 2-47. HMQC spectrum of compound 92J-18-5	132
Fig. 2-48. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-5	133
Fig. 2-49. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-6	134
Fig. 2-50. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-6	135
Fig. 2-51. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-6	136
Fig. 2-52. HMQC spectrum of compound 92J-18-6	137
Fig. 2-53. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-6	138
Fig. 2-54. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-7	139
Fig. 2-55. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-7	140
Fig. 2-56. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-7	141
Fig. 2-57. HMQC spectrum of compound 92J-18-7	142
Fig. 2-58. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-7	143
Fig. 2-59. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-8	144
Fig. 2-60. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-8	145
Fig. 2-61. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-8	146
Fig. 2-62. TOCSY spectrum of compound 92J-18-8	147
Fig. 2-63. HMQC spectrum of compound 92J-18-8	148
Fig. 2-64. HMBC spectrum of compound 92J-18-8	149
Fig. 2-65. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-8	150
Fig. 2-66. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-9	151
Fig. 2-67. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-9	152
Fig. 2-68. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-9	153
Fig. 2-69. HMQC spectrum of compound 92J-18-9	154

Fig. 2-70. HMBC spectrum of compound 92J-18-9	155
Fig. 2-71. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-10	156
Fig. 2-72. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-10	157
Fig. 2-73. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-10	158
Fig. 2-74. HMQC spectrum of compound 92J-18-10	159
Fig. 2-75. Proton NMR spectrum of compound 91-12-1	160
Fig. 2-76. Carbon NMR spectrum of compound 91-12-1	161
Fig. 2-77. Proton NMR spectrum of compound 91-12-2	162
Fig. 2-78. Carbon NMR spectrum of compound 91-12-2	163
Fig. 2-79. Proton COSY spectrum of compound 91-12-2	164
Fig. 2-80. HMQC spectrum of compound 91-12-2	165
Fig. 2-81. HMBC spectrum of compound 91-12-2	166
Fig. 2-82. IR spectrum of compound 91-12-2	167
Fig. 2-83. UV spectrum of compound 91-12-2	168
Fig. 2-84. High-resolution EIMS spectrum of 91-12-2	169
Fig. 2-85. Proton NMR spectrum of compound 91-12-3	170
Fig. 2-86. Carbon NMR spectrum of compound 91-12-3	171
Fig. 2-87. Proton COSY spectrum of compound 91-12-3	172
Fig. 2-88. NOESY spectrum of compound 91-12-3	173
Fig. 2-89. HMQC spectrum of compound 91-12-3	174
Fig. 2-90. HMBC spectrum of compound 91-12-3	175
Fig. 2-91. IR spectrum of compound 91-12-3	176
Fig. 2-92. UV spectrum of compound 91-12-3	177
Fig. 2-93. High-resolution EIMS spectrum of 91-12-3	178
Fig. 2-94. Proton NMR spectrum of compound 94K-1-1	179

Fig. 2-95. Carbon NMR spectrum of compound 94K-1-1	180
Fig. 2-96. Proton COSY spectrum of compound 94K-1-1	181
Fig. 2-97. NOESY spectrum of compound 94K-1-1	182
Fig. 2-98. HMQC spectrum of compound 94K-1-1	183
Fig. 2-99. HMBC spectrum of compound 94K-1-1	184
Fig. 2-100. IR spectrum of compound 94K-1-1	185
Fig. 2-101. Proton NMR spectrum of compound 94K-1-2	186
Fig. 2-102. Carbon NMR spectrum of compound 94K-1-2	187
Fig. 2-103. Proton COSY spectrum of compound 94K-1-2	188
Fig. 2-104. HMQC spectrum of compound 94K-1-2	189
Fig. 2-105. HMBC spectrum of compound 94K-1-2	190
Fig. 2-106. IR spectrum of compound 94K-1-2	191
Fig. 2-107. Proton NMR spectrum of compound 94K-1-3	192
Fig. 2-108. Carbon NMR spectrum of compound 94K-1-3	193
Fig. 2-109. Proton COSY spectrum of compound 94K-1-3	194
Fig. 2-110. HMQC spectrum of compound 94K-1-3	195
Fig. 2-111. IR spectrum of compound 94K-1-3	196
Fig. 2-112. Proton NMR spectrum of compound 94K-1-4	197
Fig. 2-113. Carbon NMR spectrum of compound 94K-1-4	198
Fig. 2-114. Proton COSY spectrum of compound 94K-1-4	199
Fig. 3-1. Potential drugs isolated from sponges	203
Fig. 3-2. Pyridinium derivatives isolated from sponge <i>Cliona celata</i>	206
Fig. 3-3. Pyridium derivatives isolated from marine organisms	209
Fig. 3-4. Proton NMR spectrum of compound 94K-4-1	213
Fig. 3-5. Carbon NMR spectrum of compound 94K-4-1	214

Fig. 3-6. Proton COSY spectrum of compound 94K-4-1	215
Fig. 3-7. HMQC spectrum of compound 94K-4-1	216
Fig. 3-8. HMBC spectrum of compound 94K-4-1	217
Fig. 3-9. IR spectrum of compound 94K-4-1	218
Fig. 3-10. Proton NMR spectrum of compound 94K-4-2	219
Fig. 3-11. Carbon NMR spectrum of compound 94K-4-2	220
Fig. 3-12. Proton COSY spectrum of compound 94K-4-2	221
Fig. 3-13. HMQC spectrum of compound 94K-4-2	222
Fig. 3-14. HMBC spectrum of compound 94K-4-2	223
Fig. 3-15. IR spectrum of compound 94K-4-2	224
Fig. 5-1. Typical outline of screening process	251
Fig. 5-2. screening systems used to search for antitumor compounds of microbial origin	253
Fig. 5-3. Extraction and fractionation of marine bacteria culture	260
Fig. 5-4. The scheme of sample preparation from Actinomycetes	261
Fig. 5-5. The scheme for preparation of Topo I crude extract	268
Fig. 5-6. The scheme for isolation of plasmid pBR 322	271
Fig. 5-7. The screening procedure for inhibitor of 72-kDa type IV collagenase activating process	277
Fig. 5-8. Cell culture and sample preparation for the screening of inhibitor of type IV collagenase activating process	279
Fig. 5-9. The procedure of gelatin zymography	283

List of Tables

Table 2-1. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-1	34
Table 2-2. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-2	35
Table 2-3. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-3	37
Table 2-4. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-4	39
Table 2-5. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-5	48
Table 2-6. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-6	50
Table 2-7. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-7	51
Table 2-8. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-8	53
Table 2-9. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-9	54
Table 2-10. Proton and carbon NMR assignments for compound 92J-18-10	55
Table 2-11. Results of HMBC experiments with 91-12-1 , -2 , and -3	62
Table 2-13. Proton and carbon NMR assignments for compound 91-12-1	64
Table 2-14. Proton and carbon NMR assignments for compound 91-12-2	65
Table 2-15. Proton and carbon NMR assignments for compound 91-12-3	71
Table 2-16. Proton and carbon NMR assignments for compound 94K-1-1	72
Table 2-17. Proton and carbon NMR assignments for compound 94K-1-2	73
Table 2-18. Proton and carbon NMR assignments for compound 94K-1-3	74
Table 3-1. Proton and carbon NMR assignments for compounds 94K-4-1 and -2	207
Table 4-1. Isolation of marine bacterial strains	232
Table 4-2. Results of assays for production of enzymes	235



Table 5-1. Screening systems used to search for antitumor compounds

of microbial origin using tumor cells 254

제 1 장 서론

지구상에 서식하는 많은 생물은 생체내의 생화학적 반응의 결과로 생성된 다양한 대사물질을 체내에 함유하고 있다. 이들 천연 유기물질로부터 신물질 및 유용물질을 개발하는 연구는 정밀화학과 생명공학의 핵심분야로서 신의약품의 개발등 고부가가치 산업의 필수 기반 기술이다. 천연물질의 산업적 중요성은 현재 시판되고 있는 의약품의 1/3 이상이 천연물이거나 이에 기초한 유도체라는 점에서 단적으로 드러난다. 또한 생물이 생성하는 유기물질에 대한 연구는 유기화학, 생화학, 의·약학, 생물·생태학, 환경학 등 여러 관련 분야 필수적인 정보와 연구 수단을 제공하여 이들 분야의 기초 및 응용 연구에 미치는 영향이 지대하다.

선진국에서는 1960년대 초부터 해양생물을 신물질과 유용물질의 중요한 원천으로 인식하고 기초 및 응용 연구에 많은 노력을 기울여 왔다. 더욱이 1980년대에 들어서는 오랜 기간 유용물질의 보고 역할을 하여 왔던 육상생물로부터 천연물의 개발이 점차로 정제되어 가는 경향을 보임에 따라 해양생물의 중요성이 더욱 부각되어 집중적인 연구를 하고 있다. 그 결과 상대적으로 짧은 기간에도 불구하고 이미 6000 이상의 신물질이 발견되었다. 생리활성도 측정 결과 이들중 다수가 항암, 항바이러스, 항미생물, 효소저해, 면역억제 등 다양한 생리활성 효과를 갖고 있음이 밝혀져 50여 물질이 특허를 획득하여 현재 의약품, 건강식품, 화장품 등으로 개발중이다. 특히 didemnin B(원색동물에서 추출-항암, 항바이러스), manoalide(해면동물-소염), pseudopterosins(강장동물-소염), bryostatins(이끼벌레-항암), dolastatins(연체동물-항암) 등 현재 clinical trial이 성공적으로 진행중인 수종의 물질은 5년내에 시판될 것으로 예측되고 있다. 분자량 2000 이하의 소형 유기물질 이외에 거대물질과 유용효소에 대한 연구도 매우 활발하여 갑각류의 외피에 다량으로 존재하는 다당체 chitin을 변형시킨 chitosan은 다양한 활용 가능성으로 인하여 21세기의 플라

스틱으로 불리우며 기능성 당단백질과 고성능 접착제에 대해서도 많은 연구 결과가 발표되었다. 또한 홍조류를 비롯한 여러 해양생물에 존재하는 haloperoxidase는 장기간의 연구에 의하여 최근 그 실체가 규명되어 대량생산 방안이 연구중에 있다.

이와 같이 해양생물 유래 신물질과 유용물질에 대한 연구는 양적, 질적인 면에서 급속히 발전하고 있어서 해양생물이 가까운 시일에 육상생물에 버금가는 유용물질의 보고로 등장할 것으로 추측되고 있다. 연구대상 생물은 대형해조류와 저서군체 동물로부터 미생물에 이르기까지 거의 모든 해양생물을 망라하고 있으며 연구대상 지역은 열대에서 남, 북극등 극한지까지 전세계의 모든 해역을 포함하고 있다. 또한 연구대상 생물의 서식지도 조간대나 상부 조하대로부터 수천미터 깊이의 심해 퇴적층에 이르는 모든 해양 환경이 망라되어 있다.

전기한 바와 같이 선진국에서는 해양생물 유래 유용물질에 대한 연구가 이미 산업화의 초기단계에 진입하여 있으며 최근에는 중국, 인도, 파키스탄, 세네갈, 칠레 등 개도국에서도 상당한 연구결과가 보고되고 있다. 이와 같이 다수의 국가에서 해양생물을 단순한 식량자원으로 보지않고 유용물질의 원천으로 인식하여 공공연구기관이나 산·학·연 협동으로 집중적인 연구를 하고 있다. 그러나 국내에서는 다양한 해양 환경에 따른 무수한 해양생물이 근해에 서식함에도 불구하고 해양 천연물에 대한 연구가 대단히 미진한 상태이다. 국내의 천연물 연구의 전반적인 수준이 선진국에 비하여 상당한 격차를 나타낼 뿐만 아니라 관련 분야 연구진의 관심이 신동의약등 전통약용 식물과 토양미생물등 육상생물에 집중되어 있어서 해양생물은 거의 주목을 받지 못하고 있는 실정이다. 해양 천연물이 갖고 있는 막대한 학문적·산업적 중요성을 고려할 때 근년에 대두한 국가간의 생물자원 확보 경쟁과 더불어 국내에서 이 분야의 연구는 대단히 시급하다.

본 연구진에서는 지난 수 년간 장기적인 해양 신물질 및 유용물질 연구를 위한 기초 연구로서 천연물에 대한 데이터 베이스의 구축, 해양미생물의 분리 및 보존방법의 개발등 연구기반을 확충하였으며 해양우리나라 근해에 서식하는 저서군체 동물에 대한 연구를 수행하여 항바이러스, 세포독성, 효소저해 등 다양한 생리활성

효과를 가진 20여 천연물을 분리하여 구조를 결정한 바 있다. 또한 건강 보조 물질로 유명한 EPA를 생산하는 해양미생물 균주를 수종 분리하여 대량생산 방법을 개발하였다. 이와 같은 연구결과는 국내에서도 해양 천연물의 연구 가능성이 매우 높은 것을 의미하였다.

본 연구진에 의하여 이루어진 연구결과를 기초로 하여 본 장기 연구과제인 해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발연구에서는 해양 동식물과 미생물로부터 생리활성 신물질, 유용효소 및 유용 거대물질들을 분리하여 구조결정과 생화학적 분석을 완료하고 생리활성도 측정을 거쳐 산업적 이용 가능성이 큰 물질에 대한 대량생산 방안을 강구하는 것을 중요목표로 하였다. 또한 이 과정에서 해양미생물의 효과적 배양 및 보존 기술과 생리활성 검색 기술의 개발 연구를 함께 수행할 예정이다.

연구대상 천연물은 분자량 2000 이하의 소형 유기물질과 당단백질, 다당류 등 거대물질, 그리고 haloperoxidase, superoxide dismutase 등의 유용효소이며 생리활성도는 세포독성, 항바이러스, 효소저해, 항미생물 효과 등을 중점적으로 측정할 예정이다. 연구대상 생물은 해면, 강장, 원색 등 저서균체 동물과 방선균을 비롯한 해양미생물이 주요 대상이며 제3차년도부터 적조플랑크톤이 추가될 예정이다. 저서균체 동물은 지난 10여년간 해양 천연물을 주도하여 온 생물로서 현재 신물질의 70% 이상이 이들로부터 발견되고 있으며 향후에도 상당기간 해양천연물 연구에 있어서 중심생물의 역할을 할 것으로 예측된다. 본 연구진에서 수행한 기초 연구에서도 우리나라 근해에 저서균체 동물이 천연물 연구 가치가 매우 높은 것을 확인한 바 있다. 방선균등 해양 미생물은 현재까지 해양 천연물에서 차지하는 위치가 미미하나 향후의 연구 가능성이 매우 높은 생물로 예측된다. 토양 방선균, 진균 등 미생물이 생리활성 천연물의 보고라는 것은 육상의 경우에서 명백히 입증되었다. 해양 환경에서도 다양한 미생물이 서식하고 있으며 이들중 상당수가 고유한 해양미생물이거나 염분, 수압 등 해양환경에 생화학적으로 적응한 종들이므로 기존의 육상천연물과는 다른 신물질을 생산할 가능성이 매우 높다. 또한 해양 균체 동물에서 분리된

생리활성 물질의 상당수가 공생미생물이 생산한 것으로 추측되고 있어서 이들을 분리, 대량 배양할 경우 현재 해양 천연물의 산업화를 저해하는 가장 큰 요소인 물질의 대량 확보가 가능하게 될 것이다. 적조 플랑크톤은 생리활성 신물질 뿐만 아니라 환경학적인 측면에서도 연구가치가 큰 생물이나 효과적인 보존 및 대량배양 방법등 천연물 연구에 선행되어야 할 생물학적 문제점이 많아 제 3차년도 이후에 본격적으로 연구할 예정이다. 본 연구를 위한 생물의 채집 지역은 우리나라와 남극연안이 주된 연구대상 지역이며 국제 협력 체계의 수립에 의하여 열대 서부 태평양등 외국의 해역으로 확장할 계획이다.

제1차년도인 당해년도의 구체적인 연구목표는 외국의 기존 연구결과의 분석, 연구대상 생물시료의 확보, 생리활성탐색 방법의 확립등 체계적인 연구를 위한 기반을 확충하고 조추출물에 대한 생리활성도 측정에 의한 중점연구 대상 미생물 시료의 선정, 5종 이상의 신물질 분리 및 구조결정, 유용효소 생산 균주의 분리 및 물질의 분리 및 정제등이다.

먼저 본 연구에서 중점적으로 측정할 생리활성도중의 하나인 항암효과 측정 체계의 확립을 위하여 기존의 항암 및 암기작 관련 효소의 저해도 측정방법과 해당 생리활성 물질에 관한 자료를 수집, 분석하였다. 연구대상 생물 시료의 확보를 위하여 남해안의 거문도와 제주도 해역에서 11종의 강장동물, 43종의 해면동물, 4종의 원색동물 등 58종 260kg의 저서군체 동물 시료를 채집하였으며 현재 국내 전문가들에 의하여 분류 작업이 진행중이다. 이들 동물시료로부터 유기용매를 가하여 얻은 조추출물에 대한 생리활성도 측정과 화학적 분석의 결과를 종합하여 6종의 강장동물과 3종의 해면동물을 중점연구 대상으로 선정하여 천연물 연구를 수행중이다. 현재까지 10종의 신물질을 비롯한 18종의 천연물이 분리되어 구조결정 작업이 완료 혹은 진행중이며 이들중 다수가 생리활성을 갖고 있음을 확인하였다. 구체적인 연구결과는 본 보고서의 제2~3장에 정리되었다.

해양미생물로부터 신물질과 유용물질을 개발하기 위한 기초 연구로서 우리나라 근해, 동해와 태평양 심해, 남극연안 등지로부터 1500여 해양세균과 150여 방선

균 균주를 분리하였다. 이들에 대한 항균 및 항진균 검색결과 활성이 우수한 8종의 세균과 17종의 방선균을 선택하여 생리활성 물질이 연구중이다. 또한 거대물질과 신호소제의 개발을 위하여 lipase, haloperoxidase 등 4종의 유용효소에 대한 활성측정 방법을 개발하였으며 전기한 미생물을 대상으로 한 검색결과 6종의 균주를 선택하여 유용물질에 대한 분리작업이 진행중인바 구체적인 연구결과는 본 보고서의 제 4장에 요약되었다.

해양생물로부터 신물질 특히 항암물질을 개발하기 위하여 암세포 증식과 전이에 관여하는 수종의 효소에 대한 저해활성 탐색방법을 확립하였으며 기수행과제에서 분리 보존중인 균주와 본 연구에서 분리한 해양세균과 방선균 각 500여주에 대한 검색결과 20여종을 선택하여 현재 대량 배양과 생리활성 물질을 탐색중인바 구체적인 연구결과는 제5장에 요약되었다.

마지막으로 천연물의 항바이러스도 측정은 고도의 전문성이 요구되므로 국내 유수의 전문연구 기관인 화학연구소 스크리닝센터에 연구를 위탁하였으며 연구결과는 본 보고서의 말미에 수록되었다.

해양생물로부터 신물질과 유용물질을 개발하는 연구는 학문적, 산업적 가능성이 무한한 분야이나 국내에서는 인식의 부족으로 오랜 기간 활성이 되지못하였다. 그러나 본 1차년도에서 얻어진 결과는 국내에서도 이 분야의 연구가 충분한 가능성을 갖고 있음을 입증하였으며 체계적이고 지속적인 연구 노력에 의하여 우수한 결과가 양산될 것이다.

제 2 장 강장동물의 대사물질

2. 1. 연구의 배경

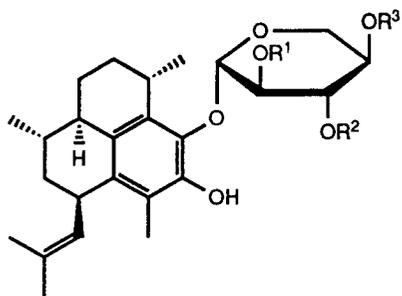
강장동물은 해양 천연물 연구에 있어서 해면동물과 함께 가장 중요한 생물로 불리운다. 현재까지 구조가 결정된 해양 천연물중 약 25%가 이들로부터 추출되었는데 이는 동식물을 망라한 전체 해양 천연물중 해면동물(약 30%)에 버금가는 추출빈도이다. 그러나 현재까지의 연구결과는 강장동물에 있어서의 2차 대사물질의 분포나 종류가 지극히 편중되어 있음을 보여 준다. 먼저 천연물의 분포에 대해서 살펴 보면 강장동물문에 속하는 3개의 아문(subphyla)중 Hydrozoa(hydroids)와 Scyphozoa(jelly fishes)에서는 2차 대사물질이 대단히 드물게 발견되고 Anthozoa아문의 Alcyonaria강(class)에 속하는 동물에서만 집중적으로 발견되고 있다.

Alcyonaria강은 Octacorallia강이라고도 하며 모두 6개의 목(order)으로 구성되어 있다. 이중에서 Alcyonacea(soft corals)와 Stolonifera목은 인도 태평양에서 많이 발견되며 Gorgonacea(gorgonians, sea whips and sea fans)와 Pennatulacea목은 카리브해에서 많이 발견된다. 천연물은 Alcyonaria강 에서도 Alcyonacea와 Gorgonacea등 두개의 목에 속하는 동물로부터 집중적으로 추출되었고(90% 이상) Zoanthida (zoanthid)목에서 일부의 천연물이 발견되었을 뿐, 이들을 제외한 나머지 목, 특히 sea anamones나 hard corals등으로부터는 단지 몇 개의 속에서만 천연물이 극히 드물게 추출되었을 뿐이다(Faulkner, 1984b).

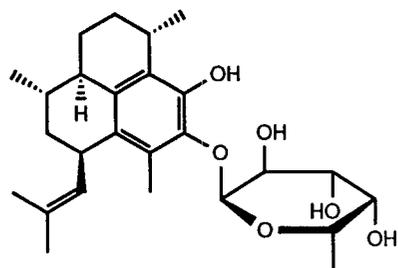
강장동물의 천연물은 위에서 언급한 바와 같이 그 생물학적 분포가 편중되어 있을 뿐만 아니라 생물의 종류에 따른 대사물질의 종류도 매우 편중되어 있다. Soft corals, gorgonians, sea pens(Pennatulacea목)의 천연물은 거의 대부분이 terpenoids 혹은 polyprenyl part를 가진 mixed biosynthetic products이다. 이들의

terpenoids, 특히 diterpenoids는 그 탄소골격이 지극히 다양하여 종래에 알려져 있던 terpenoid chemistry의 개념을 바꿀 정도에 이르렀다. Terpenoids 중에서는 diterpenoids가 압도적인 다수를 차지하며 diterpenoids에서는 cembrane 골격을 갖고 있는 물질이 다수(>65%)를 차지하고 있다(Ireland et al, 1988; Faulkner, 1984b). 또 soft corals와 gorgonians간에는 천연물의 구조와 추출빈도에 있어서 뚜렷한 구분이 없다. 거의 모든 terpenoids의 탄소 골격이나 작용기의 종류 및 위치에 있어서도 양분류군이 거의 일치하고 있다. 한 종류의 생물에서만 발견되는 특이한 골격을 가진 terpenoids도 소수있으나 이는 양분류군 간의 전체적인 차이보다는 해당 속(genus)이나 종(species)에 국한된 현상으로 이해된다. Terpenoids이외에는 특이한 작용기를 가진 steroids가 상당수 발견되었으며 prostanoids등 unusual polyketides나 lipid part를 가진 mixed biosynthetic products도 드물지 않게 얻어진다. 반면에 zoanthids와 stony corals에서 추출된 천연물은 거의 대부분이 alkaloids이며 이들중 zoanthid *Palythoa* spp.에서 추출된 palytoxins는 그 구조의 복잡함과 유례를 찾기 어려운 강력한 독성으로 유명하다(Faulkner, 1984b). 또한 hydroids에서는 polyketides가 그리고 stolonifer에서는 terpenoids와 함께 여러 prostaglandins가 추출되었다. Sea anemones에서도 최근 amino acids나 bases에서 기원한 물질들이 추출되고 있다.

전기한 바와 같이 gorgonians의 천연물은 독특한 구조와 강력한 생리활성도로 유명한 물질이 많으나 특히 잘 알려진 예를 들면 다음과 같다. 1969년에 Caribbean gorgonian *Plexaura homomalla*로부터 생체내에서 다양한 활성을 가진 prostaglandin A₂와 유도체를 발견한 것이 해양천연물의 중요성을 널리 인식시킨 계기가 된 것은 너무나 유명하다. 다른 Caribbean gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*에서 추출된 diterpene glycosides, pseudopterogens는 물질특허를 획득하여 소염제로의 개발중에 있다(Look et al, 1986; Fautin, 1988). 대서양 gorgonian인 *Lophogorgia* spp.에서 추출된 cembrane diterpenoid, lophotoxin 역시 신경세포의

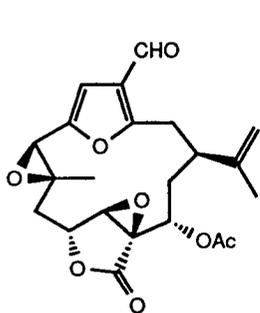


pseudopterosin A : $R^1 = R^2 = R^3 = H$
 B : $R^1 = Ac, R^2 = R^3 = H$
 C : $R^1 = R^3 = H, R^2 = Ac$
 D : $R^1 = R^2 = H, R^3 = Ac$

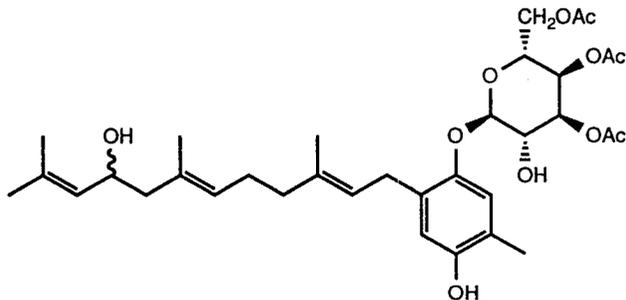


pseudopterosin E

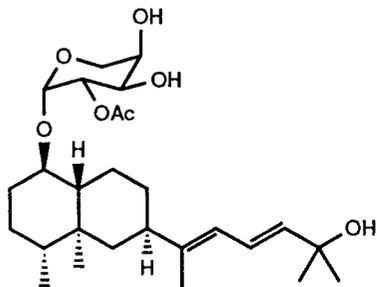
pseudopterosins - antiinflammatory, analgesic.
 (*Pseudopterogorgia elisabethae*)



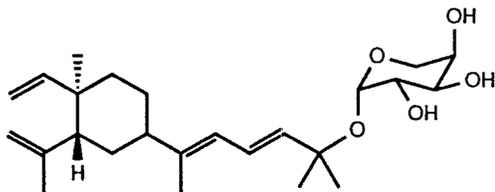
lophotoxin - binds to
 acetylcholine receptor
 (*Lophogorgia* spp.)



moritoside - cytotoxic
 (*Euplexaura* sp.)



fucoside A



fucoside B

fucosides - antiinflammatory, selective inhibitor of 5-lipoxygenase
 (*Eunicea fusca*)

Fig. 2-1. Potential drugs isolated from gorgonians.

acetylcholine receptor의 구조연구와 Alzheimer병의 연구용 시약으로 이용되고 있다(Culver et al, 1985).이들 이외에도 *Euplexaura* sp.로부터 분리된 강력한 항암물질 moritoside, *Eunicea fusca*로부터 얻어진 강력한 소염물질 fuscoidin 등이 유명하다(Fusetani et al, 1985; Shin & Fenical, 1991)(Fig. 2-1). 또한 순수한 천연물은 아니나 *Pseudopterogorgia elisabethae*의 조추출물은 화장품의 원료로 이용되고 있다.

2. 2. Plexauridae과에 속하는 어떤 종에서 추출된 대사물질

Gorgonians은 horny soft corals라고도 부르며 학명으로는 海楊目 (Gorgonacea)에 속한다. 우리 나라에서는 부산, 울릉도, 제주도등지에 많이 서식하며 회초리 모양, 깃모양, 부채모양, 나무모양등의 형태를 이룬다. 해양류 (gorgonians)는 골축이 있고 또 각질인 접에서 유사한 생물인 바다맨드라미류(soft corals)와 구별된다. 본 연구에서 천연물 화학적 분석이 시도된 gorgonians는 제주도의 서귀포 근해에서 채집된 Plexauridae과에 속하는 어떤 종(시료번호 92J-18)와 *Calicogorgia granulosa*(시료번호 91-12)이다. 이들은 채집된 시료의 양과 유기 조추출물에 대한 TLC분석, brine shrimp 치사율등의 생리활성도 측정결과가 다른 시료에 비하여 우수하였다.

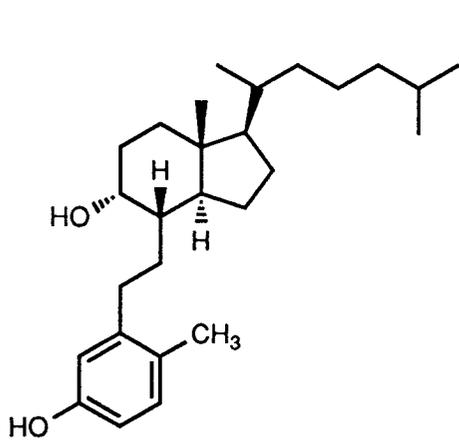
Plexauridae과에 속하는 어떤 종(92J-18)은 '93년 7월에 제주도 서귀포시 연안해역인 쇄섬 및 문섬 그리고 범섬 근처에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 군체의 색깔은 선명한 주홍색이었으며 main body의 굵기가 5 mm이하, 군체의 크기가 40-50 cm 정도로서 gorgonians에서는 비교적 소형에 속하였으며 calypse가 잘 발달되어 있다.

그늘에서 말린후 냉동보관한 5 kg의 시료를 dichloromethane으로 반복해서 추출한 후에 다시 메탄올로 반복하여 추출하였다. 먼저 메탄올에서 추출된 조추출물

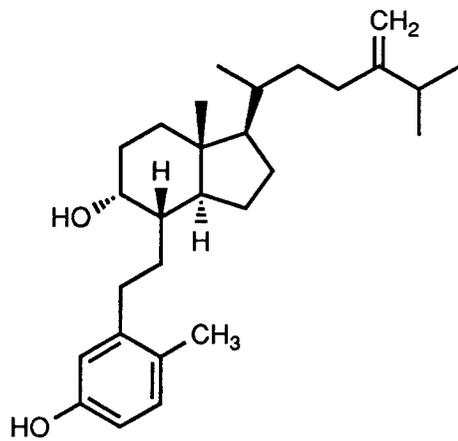
에 대해 silica vacuum flash chromatography를 실시하였다. 각각의 fraction에 대한 ^1H NMR 측정결과 비극성쪽에 가까운 분획(EtOAc/n-hexane = 1:9 - 2:8)에서 특이한 물질들이 포함되어 있는 것을 발견하였다. Silica normal phase 및 C_{18} reversed phase HPLC결과 4개의 물질(92J-18-1 ~ -4)이 분리되었다. 이들의 구조는 아래에서 설명한 바와 같이 NMR 자료해석과 질량분석에 의하여 9,10-secosteroids 유도체로 결정되었다(Fig. 2-2).

주대사물질인 92J-18-1은 무색의 끈적끈적한 액체로 얻어졌다. 이 물질의 분자식은 ^{13}C NMR과 고분별능 질량분석 측정결과에 의하여 $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_2$ 로 분석되었다(Fig. 2-13, -18). ^{13}C NMR에서 나타난 27개의 peaks와 ^1H NMR에서 나타난 5개의 methyl peaks는 이 물질이 steroid일 가능성을 강하게 제시해 주었다(Fig. 2-12, -13). ^{13}C NMR상의 δ 160 - 110 ppm 영역에 나타난 6개의 downfield peaks가 나타났으며 ^1H NMR에서도 이에 대응하는 peaks가 δ 6.5 - 7.0 ppm 사이에서 발견되었다. 이 결과는 aromatic ring의 존재를 증명해 주었으며 계속해서 proton decoupling과 ^1H COSY 실험에 의해 이 aromatic ring이 3-hydroxy-6-methylbenzyl group이라는 것이 확인되었다(Fig. 2-14). 이 부분구조와 함께 문헌조사결과 gorgonian *Astrogorgia* sp.에서 분리되었던 9,10-secosteroid 유도체인 astrogorgiadiol임이 밝혀졌다(N. Fusetani et al, 1989). 이 물질의 NMR 스펙트럼 데이터와 문헌에 발표된 데이터를 비교해 본 결과 대단히 잘 일치함을 알 수 있었다.

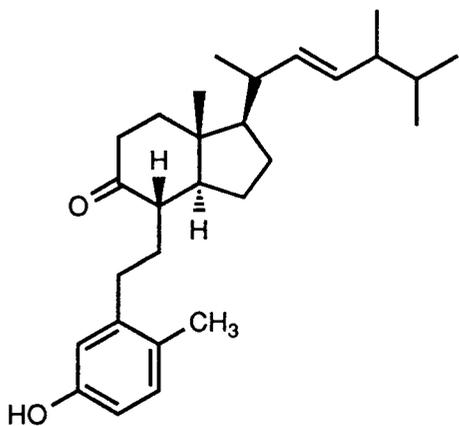
Calicoferol C(92J-18-2)는 oil 형태로 분리되었으며 이 물질의 분자식은 ^{13}C NMR 데이터와 고분별능 질량분석 데이터에 의해서 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_2$ 로 결정되었다(Fig. 2-20, -27). 이 물질의 NMR 분광 데이터는 92J-18-1 즉 astrogorgiadiol과 대단히 유사하였다. 유일한 차이점은 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 astrogorgiadiol(92J-18-1)에서 존재하지 않던 새로운 exo-methylene peak들이 δ 156.81과 105.94 ppm에서 발견되었으며 ^1H NMR에서도 이에 상응하는 olefinic proton peak들이 δ 4.71(1H, brs)과 4.65(1H, d, J=1.5 Hz)에서 나타났다(Fig. 2-19, -20). ^1H COSY와 HMQC 실험



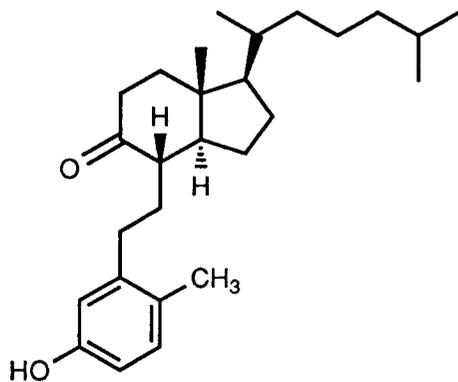
92J-18-1



92J-18-2



92J-18-3



92J-18-4

Fig. 2-2. 9,10-Secosteroids isolated from an unidentified gorgonian of the family Plexauridae.

Table 2-1. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-1

#	^1H	^{13}C
1	6.98(1H, d, 7.8)	130.99 d
2	6.57(1H, dd, 7.8, 2.9)	112.44 d
3		153.72 s
4	6.65(1H, d, 2.9)	115.47 d
5		142.61 s
6	2.69(1H, ddd, 13.7, 11.2, 5.4) 2.42(1H, ddd, 13.7, 10.7, 5.4)	30.80 t
7	1.55(2H, m)	30.22 t
8	1.53(1H, m)	40.87 d
9	4.05(1H, m)	67.31 d
10		127.74 s
11	1.75(2H, m)	30.02 t
12	1.77(1H, m), 1.48(1H, m)	34.09 t
13		42.83 s
14	1.51(1H, m)	47.74 d
15	1.12(1H, m), 1.60(1H, m)	24.41 t
16	1.81(1H, m), 1.23(1H, m)	27.71 t
17	1.19(1H, m)	56.13 d
18	0.69(3H, s)	10.99 q
19	2.22(3H, s)	18.35 q
20	1.36(1H, m)	35.74 d
21	0.92(3H, d, 6.8)	18.65 q
22	0.99(1H, m), 1.34(1H, m)	36.10 t
23	1.15(1H, m), 1.35(1H, m)	23.75 t
24	1.30(2H, m)	39.47 t
25	1.51(1H, m)	27.99 d
26	0.87(3H, d, 6.8)	22.80 q
27	0.86(3H, d, 6.8)	22.55 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl_3 at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY and HMQC experiments.

Table 2-2. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-2

#	^1H	^{13}C
1	6.98(1H, d, 7.8)	131.01 d
2	6.57(1H, dd, 7.8, 2.4)	112.40 d
3		153.61 s
4	6.65(1H, d, 2.4)	115.47 d
5		141.70 s
6	2.71(1H, ddd, 13.8, 11.2, 5.4) 2.42(1H, ddd, 13.8, 13.8, 5.1)	30.85 t
7	1.51(2H, m)	30.26 t
8	1.50(1H, m)	40.89 d
9	4.05(1H, m)	67.17 d
10		127.91 s
11	1.75(2H, m)	30.13 t
12	1.75(1H, m), 1.51(1H, m)	34.12 t
13		42.91 s
14	1.50(1H, m)	47.73 d
15	1.60(1H, m), 1.11(1H, m)	24.43 t
16	1.85(1H, m), 1.26(1H, m)	27.71 t
17	1.30(1H, m)	55.99 d
18	0.70(3H, s)	11.01 q
19	2.22(3H, s)	18.35 q
20	1.43(1H, m)	35.71 d
21	0.96(3H, d, 6.8)	18.66 q
22	1.52(1H, m), 1.16(1H, m)	34.58 t
23	2.10(1H, ddd, 15.9, 11.5, 4.6) 1.88(1H, m)	30.85 t
24		156.81 s
25	2.22(1H, m)	33.79 d
26	1.03(3H, d, 6.8)	21.99 q
27	1.02(3H, d, 6.8)	21.85 q
28	4.71(1H, brs), 4.65(1H, d, 1.5)	105.94 t

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl_3 at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, TOCSY and HMQC experiments.

험에 의하여 이 *exo*-methylene의 위치는 C-24로 확인되었다(Fig. 2-21, -23). 이와 같이 하여 이 물질의 구조는 *astrogorgiadiol*과 유사한 9,10-secosteroid 유도체로 결정되었다.

유사한 유도체 *calicoferol D*(92J-18-3)가 흰색 고체의 형태로 얻어 졌다. 이 물질의 분자식 $C_{28}H_{44}O_2$ 은 ^{13}C NMR 데이터와 고분별능 질량분석 데이터에 의해서 결정되었다(Fig. 2-29, -36). 이 물질의 NMR 분광 데이터 역시 92J-18-1과 유사하였으나 중대한 차이점이 발견되었다. ^{13}C NMR 분광 스펙트럼에서 92J-18-1에서 나타났던 C-9의 peak(δ 67.31 ppm)가 carbonyl peak(δ 213.00 ppm)로 바뀌었으며 새로운 double bond(δ 135.22, 132.50 ppm)와 methyl group(δ 18.00 ppm)의 signals가 나타났다(Fig. 2-29). 이에 상응하는 변화가 1H NMR 분광 스펙트럼상에도 나타나 δ 5.22(1H, dd, $J=15.1, 8.0$ Hz)와 δ 5.15(1H, dd, $J=15.1, 8.3$ Hz)에서 2개의 methine peaks와 δ 0.92(3H, d, $J=6.8$ Hz)에서 1개의 methyl peak가 나타났다(Fig. 2-28). 또 IR 스펙트럼에서도 carbonyl group이 ketone임을 증명하는 강한 흡수 peak가 1700 cm^{-1} 에서 발견되었다(Fig. 2-34). 이들 작용기 즉 ketone, 이중결합 및 새로운 methyl group의 정확한 위치는 1H COSY 실험에 의하여 각각 C-9, C-22, C-24로 결정되었다(Fig. 2-30). 이와 같이 하여 92J-18-3은 최근에 *gorgonian Calicogorgia sp.*에서 분리된 *calicoferol A*의 C-24 methyl 유도체로 확인되었다(M. Ochi et al, 1991). 이 구조결정은 TOCSY, HMQC 및 HMBC 실험결과와도 잘 일치한다(Fig. 2-31 ~ -33).

Calicoferol D(92J-18-3)는 여러 개의 비대칭탄소 중심(asymmetric carbon)을 가지고 있다. NOEDS 실험은 이 비대칭탄소들의 configuration이 *astrogorgiadiol*과 동일함을 보여 주었다. 하지만 *astrogorgiadiol*에 존재하지 않는 추가적인 비대칭탄소 C-24의 stereochemistry는 결정되지 않았다. 문헌조사에 의하여 C-24R과 C-24S configuration을 가지는 스테로이드들 화합물들과 이 물질의 NMR 데이터를 비교해 본 결과 이 비대칭탄소 중심에 대한 stereochemistry를 확실하게 결정할 수 있는

Table 2-3. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-3

#	¹ H	¹³ C
1	6.98(1H, d, 7.8)	130.99 d
2	6.57(1H, dd, 7.8, 2.9)	112.45 d
3		153.56 s
4	6.66(1H, d, 2.9)	115.65 d
5		142.53 s
6	2.65(1H, ddd, 13.0, 12.2, 4.9) 2.42(1H, ddd, 13.0, 11.5, 5.4)	31.00 t
7	1.75(1H, m), 1.59(1H, m)	27.62 t
8	2.37(1H, m)	50.43 d
9		213.00 s
10		128.07 s
11	2.50(1H, ddd, 14.2, 14.2, 6.8) 2.32(1H, ddd, 14.2, 5.1, 2.0)	38.28 t
12	2.14(1H, ddd, 13.2, 6.8, 2.0)	38.37 t
13	1.59(1H, m)	42.69 s
14	1.69(1H, m)	55.28 d
15	1.69(1H, m), 1.28(1H, m)	25.17 t
16	1.83(1H, m), 1.42(1H, m)	29.64 t
17	1.26(1H, m)	54.86 d
18	1.00(3H, s)	11.72 q
19	2.25(3H, s)	18.37 q
20	2.08(1H, m)	40.15 d
21	1.02(3H, d, 6.8)	20.94 q
22	5.15(1H, dd, 15.1, 8.3)	132.22 d
23	5.22(1H, dd, 15.1, 8.0)	135.50 d
24	1.83(1H, m)	43.05 d
25	1.47(1H, m)	33.18 d
26	0.84(3H, d, 6.6)	20.16 q
27	0.82(3H, d, 6.6)	19.66 q
28	0.92(3H, d, 6.8)	18.00 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, TOCSY, HMQC and HMBC experiments.

신티할 만한 결론을 내릴 수가 없었다. 일반적으로 스테로이드의 C-24 asymmetric center에 대한 configuration은 C-21 methyl peak의 chemical shift에 의하여 결정될 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. 하지만 이 방법은 양쪽 configuration을 가지는 stereoisomers가 분리되어야만 적용될 수 있다(A. Madaio et al, 1989; G. Notaro et al; 1992).

또 하나의 9,10-secosteroid인 calicoferol E(92J-18-4)가 분리되었다. 이 물질의 분자식 $C_{27}H_{42}O_2$ 은 ^{13}C NMR 데이터와 고분별능 질량분석 데이터에 의해서 결정되었다(Fig. 2-38, -43). Calicoferol E(92J-18-4)의 NMR 분광 데이터는 calicoferol D(92J-18-3)와 대단히 유사하며 유일한 차이점은 C-22의 이중결합과 C-24 methyl signal이 사라졌다는 것이다. 그러므로 calicoferol E(92J-18-4)는 astrogorgiadiol의 9-oxo 유도체로 결정되었다. 이 물질들의 생합성적 경로는 Fig. 2-3에 제시된 것과 같은 cholestane이나 ergostane 골격을 가진 steroid로부터 oxidative cleavage에 의해서 생성되는 것으로 여겨 진다.

Astrogorgiadiol과 calicoferols A와 B는 강력한 생리활성도를 가진 것으로 이미 보고 되었다(N. Fusetani et al, 1989; M. Ochi et al, 1991). 특히 calicoferols A와 B는 brine shrimp 유충에 대한 강력한 독성(LD_{50} 1.8와 2.3 ppm)을 나타냈다. 여기에서 분리된 secosteroid 유도체들중에 calicoferol D는 Herpes Simplex viruses I 과 II(EC_{50} 1.2 $\mu g/ml$) 그리고 polio virus(EC_{50} 0.4 $\mu g/ml$)에 대해 강한 활성도를 보였으며 brine shrimp 유충에 대해서도 상당한 독성(LD_{50} 37.0 ppm)을 나타내었다. 하지만 알려진 결과와는 대조적으로 astrogorgiadiol, calicoferol C 및 E는 별로 brine shrimp 유충에 대한 독성을 거의 나타내지 않았다(LD_{50} >100 ppm).

육상에서 흔히 발견되는 대표적인 secosteroids로는 9,10-secosteroid인 vitamin D(Fig. 2-4)를 들 수 있으며 이들은 물고기 간, 우유, 새알등에 많이 존재한다. 하지만 해양에서 발견되는 secosteroids의 예는 매우 드물며 단지 다음과 같은 몇 개의 예가 알려져 있다.

Table 2-4. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-4

#	¹ H	¹³ C
1	6.97(1H, d, 8.3)	130.99 d
2	6.57(1H, dd, 8.3, 2.9)	112.47 d
3		153.62 s
4	6.66(1H, d, 2.9)	115.66 d
5		142.53 s
6	2.66(1H, ddd, 13.2, 11.7, 4.9) 2.41(1H, ddd, 13.2, 11.7, 5.4)	31.02 t
7	1.75(1H, m), 1.59(1H, m)	27.65 t
8	2.36(1H, m)	50.43 d
9		213.20 s
10		128.04 s
11	2.50(1H, ddd, 14.7, 13.7, 6.8) 2.31(1H, ddd, 14.2, 5.4, 2.0)	38.29 t
12	2.17(1H, ddd, 12.9, 6.8, 2.3) 1.59(1H, m)	38.51 t
13		42.83 s
14	1.69(1H, m)	55.23 d
15	1.69(1H, m), 1.29(1H, m)	25.13 t
16	1.98(1H, m), 1.43(1H, m)	29.05 t
17	1.21(1H, m)	55.07 d
18	0.98(3H, s)	11.53 q
19	2.25(3H, s)	18.37 q
20	1.43(1H, m)	35.64 d
21	0.93(3H, d, 6.8)	18.56 q
22	1.34(1H, m), 1.01(1H, m)	35.88 t
23	1.34(1H, m), 1.16(1H, m)	23.79 t
24	1.13(2H, m)	39.45 t
25	1.54(1H, m)	28.01 d
26	0.88(3H, d, 6.8)	22.81 q
27	0.87(3H, d, 6.8)	22.55 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY and HMQC experiments.

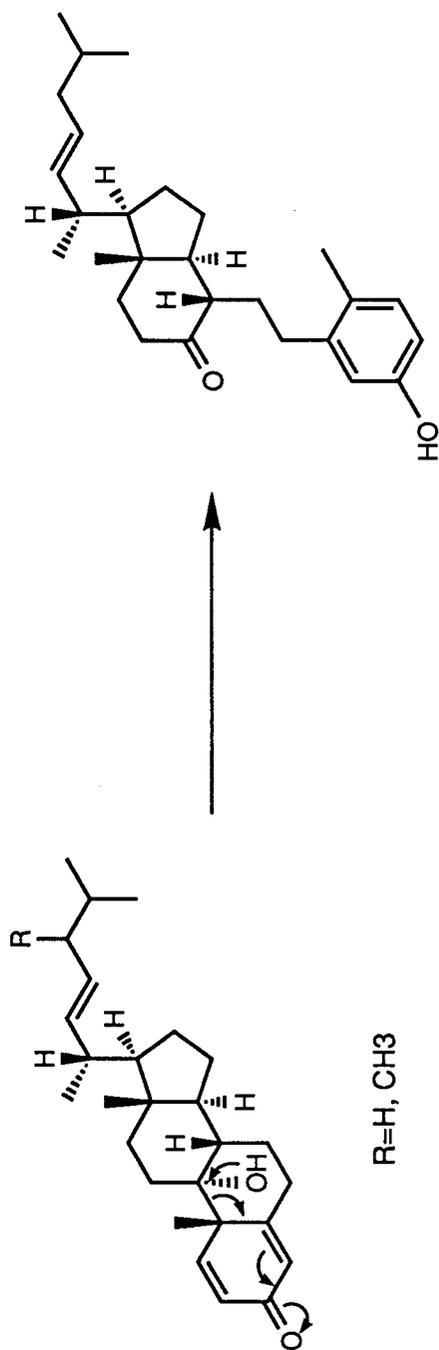
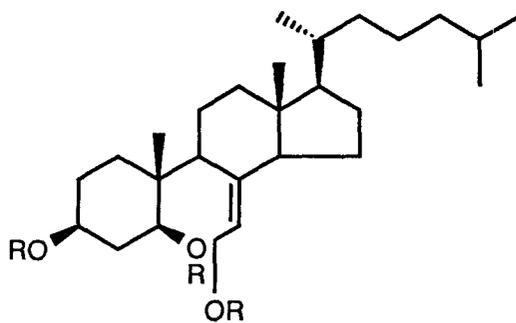


Fig. 2-3. Biosynthetic pathway for the origin of 9,10-secosteroids

Sponge *Hippospongia communis*로부터 5,6-secosteroid가 분리되었다. 이 물질은 해양에서 발견된 최초의 B ring이 끊어진 secosteroid이다(A. Madaio et al, 1988; 1990). Gorgonian *Astrogorgia* sp.와 *Calicorgorgia* sp.로부터 9,10-secosterols가 분리되었으며(N. Fusetani et al, 1989; M. Ochi et al, 1991) soft coral *Sclerophyllum* sp., *Sinularia* sp.와 gorgonian *Pseudopterogorgia americana* 그리고 sponge *Dysidea herbacea* 및 *Spongia officinalis*로부터 9,11-secosteroids가 분리되었다(M. Kobayashi et al, 1991; R. Kazlauskas et al, 1982; C. Bonini & C. B. Cooper, 1983; E. L. Enwall et al, 1972; R. J. Capon & D. J. Faulkner, 1985; A. Migliuolo et al, 1992; R. Adinolfi et al, 1994). 또 sponge *Jereicopsis graphidiophora*로부터 8,9 및 8,14-secosteroids인 jereisterols A와 B가 분리되었다(M. V. D'Auria et al, 1991)(Fig. 2-4).

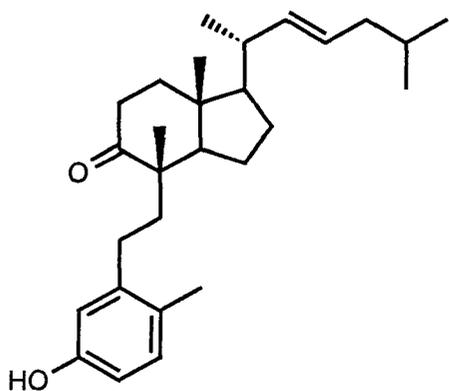
Dichloromethane에서 추출된 조추출물에 대해서도 silica vacuum flash chromatography를 실시하였으며 각각의 fraction에 대한 ¹H NMR 측정결과 이 또한 비극성쪽에 가까운 분획(EtOAc/n-hexane = 3:17 - 6:16)에서 특이한 물질들이 포함되어 있는 것을 발견하였다. Silica normal phase 및 C₁₈ reversed phase HPLC 결과 모두 5개의 물질(92J-18-5 ~ -9)가 분리되었다. 이들의 구조는 NMR 분광 자료해석과 질량분석에 의하여 cladiellin 계열의 물질들로 결정되었다(Fig. 2-5).

주대사물질 92J-18-5는 흰색의 고체로 얻어 졌으며 이 물질의 분자식은 ¹³C NMR 분광 데이터와 고분별능 질량분석 측정결과에 의하여 C₂₆H₃₈O₇으로 분석되었다(Fig. 2-45, -48). 이 물질의 ¹³C NMR 스펙트럼에서는 모두 26개의 carbons가 나타났다. 이들중 δ 169.91, 169.93, 170.39에 나타난 quaternary carbon은 esteric carbonyl group으로 해석되었으며 이중결합 영역인 δ 129.43과 120.58에 나타난 2개의 methine carbons 및 δ 139.62와 125.95에 나타난 2개의 quaternary carbons는 2개의 이중결합이 존재함을 증명하였다. 또한 5개의 oxygen-bearing carbons (90.10s, 87.18d, 83.70s, 80.28d, 66.31d)가 발견되었으며 methyl, methylene, methine,

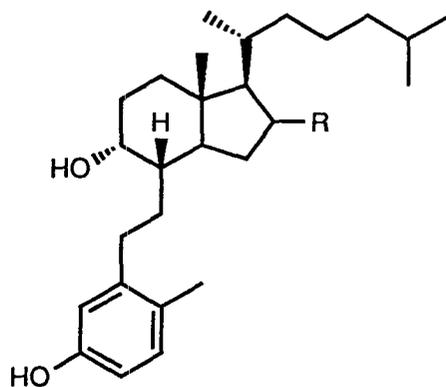


R=H, Ac

(sponge *Hippospongia communis*)

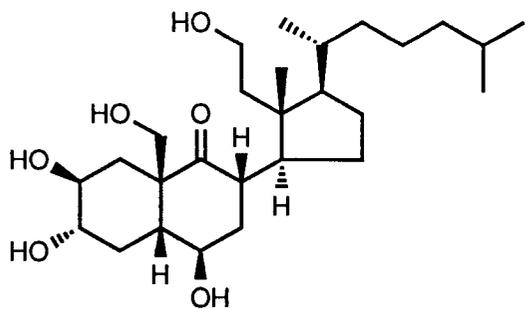


calicoferol A
(gorgonian *Calicogorgia* sp.)

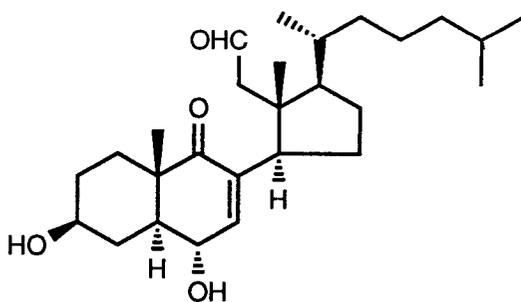


astrogorgiadiol (R=H)
and calicoferol B (R=OH)
(gorgonians *Astrogorgia* sp.
and *Calicogorgia* sp.)

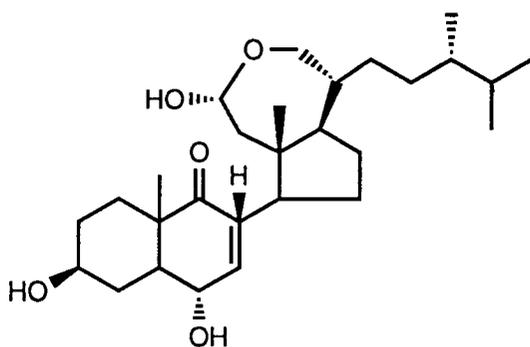
Fig. 2-4. Secosteroids isolated from marine organisms



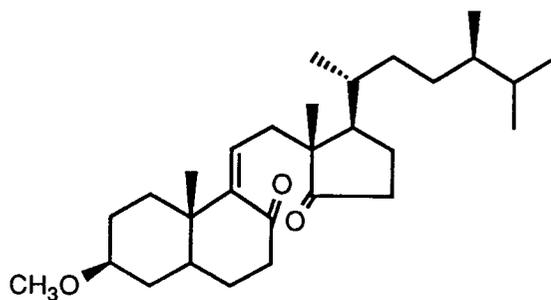
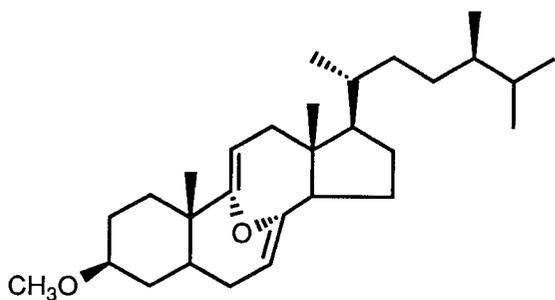
herbasterol
(sponge *Dysidea herbacea*)



(sponge *Spongia officinalis*)



nicobarsterol
(soft coral *Sclerophytum* sp.)



jereisterols A (left) and B (right)
(sponge *Jereicoposis graphidiophora*)

Fig. 2-4. Continued

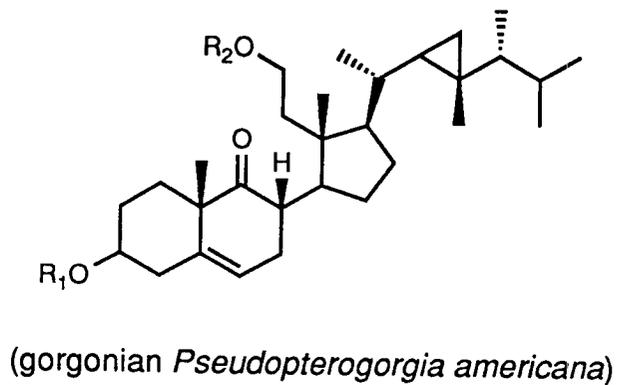
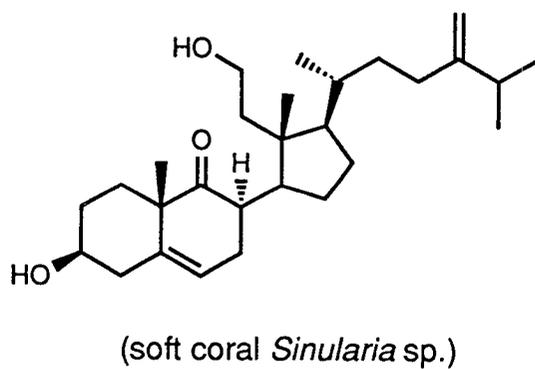
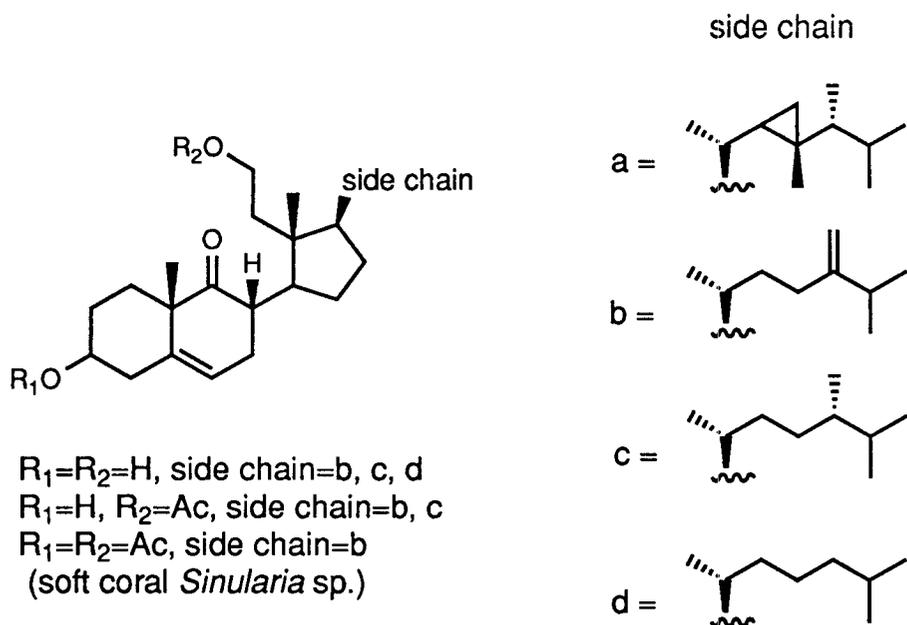
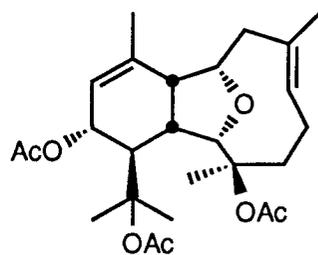
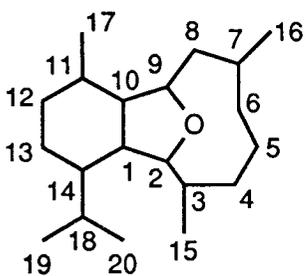
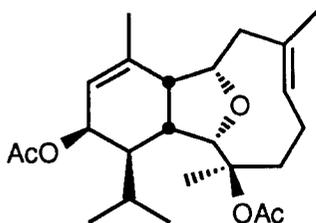


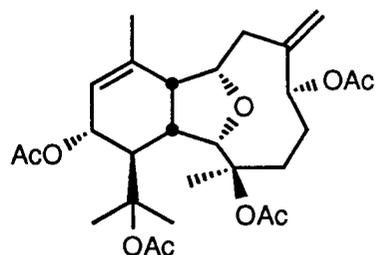
Fig. 2-4. Continued.



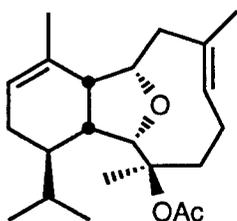
92J-18-5



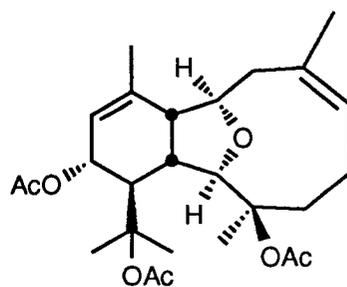
92J-18-6



92J-18-7



92J-18-8



92J-18-9

Fig. 2-5. Cladiellin derivatives isolated from an unidentified gorgonian of the family Plexauridae.

quaternary carbons가 각각 8, 3, 3, 2개가 추가적으로 DEPT 실험에 의하여 확인되었다(Fig. 2-45). ^1H NMR 스펙트럼에서도 이에 상응하는 peak들이 나타났다. δ 1.38, 1.56, 1.96에서 acetyl group에 해당하는 세 개의 methyl peaks와 또 다른 5개의 methyl singlet들이 δ 1.83, 1.80, 1.79, 1.56, 1.38에서 발견되었으며 downfield 영역에 다섯 개의 methine protons가 δ 5.66, 5.44, 5.38, 4.54, 4.38에서 나타나 이중결합과 산화된 탄소의 존재를 보여 주고 있다(Fig. 2-44). Proton decoupling, ^1H COSY 및 HMQC에 의하여 Fig. 2-6에 제시된 것과 같은 92J-18-5의 부분구조가 확인되었다(Fig. 2-46, -47).

IR 스펙트럼에서 hydroxyl group이 존재하지 않았기 때문에 이 물질의 산화된 carbon들중에 어느 것이 ester나 ether bond로 연결되는지를 확인하기 위하여 lithium aluminum hydride로 reduction을 시도하였다. 92J-18-5을 dry ether에 녹이고 lithium aluminum hydride를 넣은 후에 질소 대기하의 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 포화된 sodium sulfate 용액을 넣어 반응을 중단시킨 후에 ether로 추출하였다. 이렇게 얻어진 생성물을 reversed phase HPLC로 분리하여 deacetylated ophirin(92J-18-10)을 얻었다. 이 반응결과 얻어진 생성물의 ^1H 와 ^{13}C NMR 분광 데이터 및 ^1H COSY와 HMQC 실험결과는 ether bond로 연결된 carbon이 2개 존재한다는 것을 보여 주었다(Fig. 2-71 ~ -74). 이 실험결과를 근거로 부분구조 c와 d가 연결된 e 구조를 얻을 수 있다.

이 부분구조를 가지고 문헌조사를 실시하였으며 그 결과 홍해에서 채집한 *Muricella* sp.로부터 추출된 cladiellin계열의 diterpenoid ophirin과 동일한 물질이라는 것이 ^1H 및 ^{13}C NMR 분광 데이터를 비교한 결과 확인되었다(Y. Kashman, 1980). 이 물질이 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 불가사리(*Asterina pectinitera*) 수정란의 세포분열을 억제한다는 것이 알려져 있다(N. Fusetani et al, 1989).

유사한 물질 92J-18-6이 동일한 조건하에서 무색의 viscous oil로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 ^{13}C NMR 분광 데이터와 고분별능 질량분석 데이터에 의하

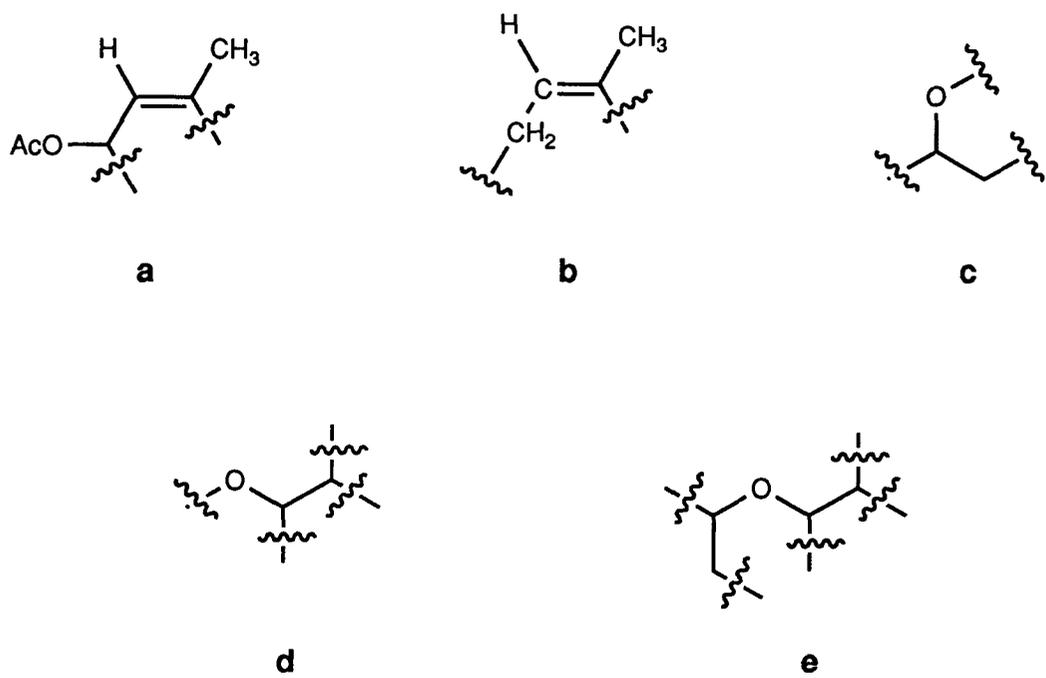


Fig. 2-6. Partial structures for compound 92J-18-5.

Table 2-5. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-5(ophirin)

#	^1H	^{13}C
1	2.66(1H, d, 9.3, 9.3)	35.85 d
2	4.54(1H, d, 9.8)	87.18 d
3		90.10 s
4	2.43(1H, m), 2.06(1H, m)	30.77 t
5	2.42(1H, m), 2.15(1H, m)	21.96 t
6	5.44(1H, brdd, 9.6, 7.9)	129.43 d
7		125.95 s
8	2.52(1H, dd, 13.7, 5.9) 2.00(1H, brd, 13.7)	45.04 t
9	4.38(1H, d, 6.4)	80.28 d
10	2.43(1H, m)	48.38 d
11		139.62 s
12	5.66(1H, d, 5.4)	120.58 d
13	5.38(1H, d, 5.9)	66.31 d
14	3.12(1H, brs)	43.11 d
15	1.83(3H, s)	21.85 q
16	1.79(3H, d, 1.0)	18.36 q
17	1.80(3H, d, 1.0)	21.34 q
18		83.70 s
19	1.56(3H, s)	25.41 q
20	1.38(3H, s)	25.07 q
-OAc	1.96(3H, s)	22.78 q
-OAc	2.02(3H, s)	21.28 q
-OAc	2.00(3H, s)	22.59 q
-CO-		179.39 s
-CO-		169.93 s
-CO-		169.91 s

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl_3 at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY and HMQC experiments.

여 $C_{24}H_{36}O_5$ 로 결정되었다(Fig. 2-50, -53). 이 물질의 분광 데이터는 92J-18-5와 대단히 유사한 형태를 보인다. 유일한 차이점은 92J-18-5의 경우에 ^{13}C NMR의 δ 83.70에 나타났던 quaternary carbon이 92J-18-6에서는 δ 30.87에 나타나는 methine carbon으로 바뀌었다는 것이다(Fig. 2-50). 상응하는 변화가 1H NMR에서도 발견되었다. 92J-18-5의 경우에 δ 1.56와 1.38에서 발견되는 methyl singlet가 92J-18-6에서는 δ 0.97과 0.98에 나타나는 doublet($J=6.6$ Hz)로 바뀌었다(Fig. 2-44). 이 모든 변화는 C-18에 존재하던 acetoxy group이 제거된 상태를 의미하였다. 그러므로 이 물질은 ophirin에서 acetoxy group이 하나 제거된 cladiellin 계열의 어떤 유도체로 생각되었다. 문헌조사 결과 gorgonian *Calicorgogia* sp.에서 분리되었던 calicophirin B와 동일한 물질로 확인되었다. Calicophirin B와 92J-18-6의 NMR 분광 데이터를 비교해 본 결과 peak가 발견되는 위치는 동일하였으나 assignment가 일부 잘못된 곳이 발견되어 1H COSY 및 HMQC 데이터에 의하여 수정하였다(Fig. 2-51, -52).

또 다른 유사한 물질인 92J-18-7이 viscous oil 형태로 비슷한 조건하에서 분리되었다. 이 물질의 분자식은 ^{13}C NMR과 고분별능 질량분석 데이터에 의하여 $C_{28}H_{40}O_9$ 로 결정되었다(Fig. 2-55, -58). 이 물질의 전체적인 구조는 ophirin (92J-18-5)과 NMR 분광 데이터를 비교함으로써 밝혀 졌다. ^{13}C NMR에서 ophirin보다 1나 더 많은 4개의 esteric carbonyl carbons(δ 170.31, 170.07, 169.96, 169.93)와 하나의 새로운 olefinic methylene carbon(δ 114.55) 및 oxygen-bearing carbon(δ 76.30)이 나타난 반면에 ophirin에서 발견되었던 olefinic methine carbon 하나(δ 129.43)와 methyl carbon 1개(δ 18.36)가 사라졌다(Fig. 2-55). 상응하는 변화가 1H NMR 스펙트럼에서도 나타났다. 5.25(1H, s)와 5.12(s, 1H)에 새로운 exo-methylene peak가 발견되었으며 ophirin(92J-18-5)의 경우에 δ 1.79에서 나타났던 methyl peak가 92J-18-6에서는 사라졌으며 또 ophirin에서 발견되었던 olefinic methine proton(δ 5.44, 1H, brdd, $J=9.6, 7.9$)이 없어진 대신에 5.33(1H, m)

Table 2-6. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-6(caliciphirin B)

#	^1H	^{13}C
1	2.02(1H, m)	41.94 d
2	4.48(1H, d, 8.3)	87.69 d
3		90.15 s
4	2.33(1H, ddd, 13.4, 5.9, 2.4) 2.02(1H, m)	31.30 t
5	2.41(1H, m), 2.14(1H, m)	22.80 t
6	5.45(1H, ddt, 10.7, 6.8, 1.5)	129.62 d
7		126.08 s
8	2.51(1H, m) 2.02(1H, m)	44.60 t
9	4.29(1H, dd, 5.6, 2.7)	81.09 d
10	2.46(1H, m)	47.45 d
11		139.59 s
12	5.59(1H, d, 5.4)	120.13 d
13	5.19(1H, d, 4.4)	70.16 d
14	2.54(1H, m)	38.53 d
15	1.78(3H, s)	21.77 q
16	1.81(3H, s)	18.71 q
17	1.78(3H, d, 1.5)	22.10 q
18	1.67(1H, m)	30.87 d
19	0.98(3H, d, 6.6)	21.00 q
20	0.97(3H, d, 6.6)	21.31 q
-COCH ₃	1.90(3H, s)	22.80 q
-COCH ₃	2.02(3H, s)	21.55 q
-CO-		169.55 s
-CO-		170.62 s

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY and HMQC experiments.

Table 2-7. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-7(astrogorgin)

#	^1H	^{13}C
1	2.95(1H, brdd, 8.8, 8.8)	36.23 d
2	4.39(1H, d, 9.8)	86.62 d
3		85.32 s
4	2.39(1H, m), 1.91(1H, m)	24.18 t
5	2.38(1H, m), 1.91(1H, m)	24.78 t
6	5.33(1H, m)	76.30 d
7		143.81 s
8	2.47(1H, dd, 14.4, 4.2) 2.28(1H, dd, 14.4, 2.7)	45.37 t
9	4.41(1H, m)	81.18 d
10	2.67(1H, d, 7.8)	46.03 d
11		139.73 s
12	5.70(1H, d, 5.6)	121.34 d
13	5.42(1H, d, 5.6)	66.55 d
14	2.94(1H, brs)	44.83 d
15	1.70(3H, s)	22.82 q
16	5.25(1H, s), 5.12(1H, s)	114.55 t
17	1.81(3H, s)	21.91 q
18		83.55 s
19	1.58(3H, s)	25.49 q
20	1.38(3H, s)	25.45 q
-OAc	2.00(3H, s)	22.54 q
-OAc	2.00(3H, s)	22.51 q
-OAc	2.01(3H, s)	21.30 q
-OAc	2.10(3H, s)	21.18 q
-CO-		170.31 s
-CO-		170.07 s
-CO-		169.96 s
-CO-		169.93 s

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl_3 at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY and HMQC experiments.

에 새로운 oxygen-bearing methine proton이 확인되었다(Fig. 2-54). 이 새로운 exo-methylene과 oxygen-bearing methine의 위치는 ^1H COSY와 HMQC에 의하여 C-16과 C-6으로 결정되었다(Fig. 2-56, -57). 이와 같이 하여 이 물질은 ophirin에서 acetoxyl group이 하나 늘어난 cladiellin 유도체로 결정되었다. 문헌조사 결과 gorgonian *Astrogorgia* sp.에서 분리된 astrogorgin으로 확인되었다(N. Fusetani et al, 1989).

유사물질 92J-18-8이 흰색의 고체로 분리되었으며 이 물질의 분자식 $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$ 은 ^{13}C NMR과 고분별능 질량분석 데이터에 의하여 결정되었다(Fig. 2-60, -65). 이 물질의 분광 데이터는 약간의 차이를 제외하고는 calicophirin B (92J-18-6)와 매우 유사하였다. 먼저 ^{13}C NMR에서 1개의 esteric carbonyl carbon이 δ 169.81에서 발견되었으며 calicophirin B(92J-18-6)의 경우에 δ 70.16와 21.55에서 나타났던 methine 및 methyl carbons가 92J-18-8에서는 사라졌다(Fig. 2-60). 이와 일치하는 변화가 ^1H NMR 에서도 나타나 92J-18-6의 methine(δ 5.19) 및 methyl(δ 2.02) protons가 사라졌다(Fig. 2-59). 이 모든 변화는 calicophirin B의 C-13위치가 deacetylation 되어 환원이 일어났을 경우에만 만족되어 지며 ^1H COSY와 HMQC 실험결과와도 잘 일치한다(Fig. 2-61, -63). 문헌조사 결과 이 물질이 알려진 것은 아니지만 soft coral의 어떤 미확인된 종으로부터 분리되었던 cladiellin 유도체의 acetate로 확인되었다(J. E. Hochlowski & D. J. Faulkner, 1980).

마지막으로 92J-18-9가 분리되었다. 이 물질의 NMR 분광데이터는 92J-18-5와 매우 유사하였기 때문에 역시 cladiellin 계열의 물질로 생각되었다. ^1H 및 ^{13}C NMR의 분광 데이터와 DEPT 실험결과를 분석해 본 결과 carbon의 종류에 있어서는 92J-18-5와 동일하였으며 단지 chemical shifts에 있어서 약간의 변화를 보였다(Fig. 2-66, -67). 이중에서 가장 큰 변화는 92J-18-5의 C-16의 carbon chemical shift가 δ 18.36 ppm에서 δ 28.87 ppm으로 변하였다는 것이다. 이 모든

Table 2-8. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-8

#	¹ H	¹³ C
1	2.40(1H, m)	40.53 d
2	4.06(1H, d, 6.8)	87.69 d
3		89.31 s
4	2.28(1H, ddd, 13.2, 5.4, 3.4) 2.00(1H, ddd, 13.2, 11.2, 4.9)	32.43 t
5	2.37(1H, m), 2.14(1H, m)	22.90 t
6	5.48(1H, ddt, 10.5, 7.1, 1.5)	129.51 d
7		126.41 s
8	2.50(1H, dd, 13.7, 5.4) 2.05(1H, brd, 13.7)	43.78 t
9	4.08(1H, dd, 5.4, 3.4)	80.94 d
10	2.41(1H, m)	46.50 d
11		132.54 s
12	5.42(1H, m)	121.40 d
13	2.08(1H, m), 1.93(1H, m)	22.90 t
14	1.43(1H, m)	38.26 d
15	1.74(3H, s)	21.97 q
16	1.81(3H, d, 1.0)	19.21 q
17	1.70(3H, d, 1.5)	22.25 q
18	1.65(1H, m)	28.56 d
19	0.97(3H, d, 6.8)	21.70 q
20	0.84(3H, d, 6.8)	20.18 q
-OAc	1.93(3H, s)	22.86 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-9. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-9

#	^1H	^{13}C
1	2.97(1H, dd, 9.3, 9.3)	38.34 d
2	4.42(1H, d, 10.3)	84.31 d
3		85.95 s
4	2.68(1H, dd, 12.9, 12.9)	33.60 t
	1.69(1H, m)	
5	2.59(1H, m)	22.48 t
	1.99(1H, m)	
6	5.53(1H, dd, 10.7, 5.9)	130.37 d
7		130.43 s
8	2.82(1H, d, 14.2)	39.05 t
	1.85(1H, dd, 14.2, 4.4)	
9	4.39(1H, m)	79.85 d
10	2.45(1H, d, 7.8)	45.30 d
11		139.38 s
12	5.63(1H, d, 5.4)	120.81 d
13	5.37(1H, d, 5.4)	66.32 d
14	3.04(1H, m)	43.22 d
15	1.77(3H, s)	23.81 q
16	1.84(3H, s)	28.87 q
17	1.78(3H, s)	21.66 q
18		83.60 s
19	1.57(3H, s)	25.51 q
20	1.36(3H, s)	25.41 q
-OAc	2.01(3H, s)	21.33 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl_3 at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-10. Proton and carbon NMR assignments for 92J-18-10

#	¹ H	¹³ C
1	2.79(1H, dd, 9.3, 9.3)	37.57 d
2	4.39(1H, d, 9.8)	91.76 d
3		78.80 s
4	1.49(1H, dd, 13.7, 6.4) 2.27(1H, m)	36.42 t
5	2.41(1H, m), 2.03(1H, m)	23.23 t
6	5.44(1H, hrdd, 8.8, 8.8)	130.34 d
7		127.68 s
8	2.03(1H, d, 13.2) 2.41(1H, m)	45.99 t
9	4.34(1H, d, 6.4)	82.63 d
10	2.41(1H, m)	51.28 d
11		137.79 s
12	5.66(1H, d, 4.9)	125.73 d
13	4.24(1H, d, 5.4)	65.36 d
14	2.44(1H, m)	49.20 d
15	1.37(3H, s)	26.98 q
16	1.81(3H, s)	18.74 q
17	1.77(3H, s)	21.97 q
18		73.42 s
19	1.18(3H, s)	28.22 q
20	1.16(3H, s)	28.17 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in MeOH-d₄ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

변화는 92J-18-9가 92J-18-5의 6번 이중결합에 대한 geometric isomer라야만 만족되어 지며 탄소골격에 대한 정확한 assignment는 ^1H COSY, HMQC, 그리고 HMBC 실험에 의하여 이루어 졌다(Fig. 2-68 ~ -70). 이와 같이 하여 이 물질의 구조 역시 cladiellin 유도체로 결정되었다. 문헌조사 결과 92J-18-9는 새로운 물질로 확인되었으며 아직까지 C-6과 -7사이의 이중결합 geometry가 Z인 것은 알려지지 않았다.

지금까지 많은 cladiellin 계열의 물질들이 알려져 있으며 계속해서 새로운 유도체가 발견되고 있다. 이 계열의 최초 물질은 gorgonian *Eunicella stricta*로부터 분리된 eunicellin이며 이 물질의 구조는 브롬화 유도체에 대한 X선 결정구조분석에 의하여 이루어 졌다. 하지만 이 계열에 속하는 대사물질수에 비하여 생리활성도는 그렇게 많이 측정되지 않았다. 우리는 동일한 종으로부터 모두 5개의 유도체들을 분리했으며, 비교적 많이 분리된 물질 92J-18-5, -6, -7 및 -8에 대한 brine shrimp lethality를 측정하였다. 측정결과 ED₅₀ 값이 각각 8.70, 1.04, 1.8, 0.36 ppm으로 얻어 졌으며 acetoxy group이 하나 있는 92J-18-8이 가장 강한 활성도를 보이는 것이 흥미롭다.

2. 3. *Calicogorgia granulosa*에서 추출된 대사물질

Calicogorgia granulosa(91-12)는 '92년 2월에 제주도 서귀포시 연안해역인 섯섬 및 문섬 그리고 범섬 근처에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 군체의 색깔은 검은 갈색이었으며 main body의 굵기가 5 mm이하, 군체의 크기가 20-30 cm 정도로서 gorgonians에서는 소형에 속하였으며 calypse가 잘 발달되어 있어 전형적인 Plexauridae과의 특징을 나타낸다.

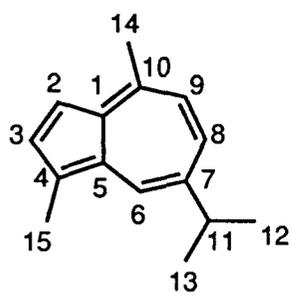
그늘에서 말린후 냉동보관했던 시료 2.5 kg을 dichloromethane을 이용하여 유기물질을 추출하고 용매는 진공증발기로 제거하였다. 용매를 제거한 후에 남는 잔

류물을 silica flash chromatography를 하여 몇 개의 분획으로 나누고 각각의 fraction에 대한 ^1H NMR 측정결과 비극성쪽 분획(100% hexane과 5% EtOAc in n-hexane)에서 2차 대사물질들이 포함되어 있는 것을 발견하였다. C_{18} reversed phase HPLC결과 3개의 물질(91-12-1 ~ -3)이 분리되었다. 이들의 구조는 아래에서 설명한 바와 같이 NMR 자료해석과 질량분석에 의하여 guaiazulene 유도체로 결정되었다(Fig. 2-7).

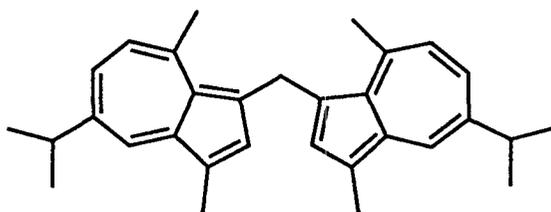
주대사물질 91-12-1은 푸른 색을 띤 고체로 얻어졌다. 이 물질의 구조는 ^1H 및 ^{13}C NMR 분광 데이터를 알려진 물질과 비교한 결과 이미 잘 알려진 guaiazulene과 동일한 것으로 확인되었다(Fig. 2-75, -76). Guaiazulene은 여러 개의 conjugated double bond에 의한 선명한 푸른 색으로 유명하며 이미 soft coral *Alcyonium* sp. 그리고 gorgonian *Euplexaura erecta* 및 *Acalycigorgia* sp.에서 분리되었다(N. Fusetani et al, 1981; S. Sakemi & T. Higa, 1987).

Guaiazulene dimer인 91-12-2가 역시 푸른 색의 고체로 분리되었다. 이 물질의 분자식은 ^{13}C NMR과 고분별능 질량분석 데이터에 의하여 $\text{C}_{31}\text{H}_{34}$ 로 결정되었다(Fig. 2-78, -84). 이 물질의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서는 모두 16개의 carbons가 나타났으며 DEPT 실험에 의하여 quaternary, methine, methylene 및 methyl carbons의 갯수가 각각 6, 5, 1, 4로 확인되었다. 이 탄소들의 chemical shifts를 잘 분석해 보면 methylene carbon을 제외하고는 모두 이중결합 영역에 나타나고 있음을 알 수 있다(Fig 2-78). 이 물질의 전체적인 구조는 ^1H COSY, HMQC, HMBC 실험 데이터 및 guaiazulene과의 분광데이터 비교분석에 의하여 결정되었다(Fig. 2-79 ~ -81). 문헌조사 결과 이 물질은 심해에 서식하는 *Pseudothesia* sp.로부터 분리된 bis-(2,2'-guaiazulenyl)methane과 동일하다는 것이 밝혀 졌다(R. K. Okuda et al, 1982).

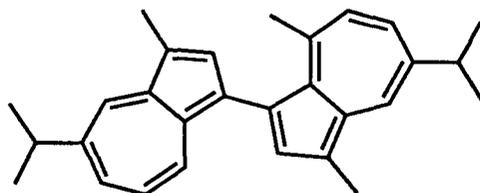
또 다른 guaiazulene dimer인 91-12-3이 녹색의 고체로 분리되었다. 이 물질의 분자식 $\text{C}_{30}\text{H}_{34}$ 은 ^{13}C NMR과 고분별능 질량분석 데이터에 의하여 결정되었다(Fig.



91-12-1



91-12-2



91-12-3

Fig. 2-7. Guaiazulenoid pigments isolated from *Calicogorgia granulosa*.

2-86, -93). 이 물질의 특징적인 색깔을 고려할 때 푸른 색을 띠는 91-12-1이나 -2에 비해서 conjugation이 많이 된 물질로 추측되었다. 이 물질의 분광 데이터는 91-12-2와 대단히 유사하였으며 단지 ^1H 및 ^{13}C NMR에서 한 개의 methylene peak가 사라진 것이 확인되었다(Fig. 2-85, -86). 이러한 점을 고려할 때 이 물질의 구조는 bis-(2,2'-guaiazulenyl)로 결정되었다. 이 구조결정은 HMBC 실험 데이터와도 잘 일치한다(Fig. 2-90). 하지만 이 사실을 좀 더 분명히 하기 위하여 NOED 실험을 실시하였다. H-3(-3')과 -14(-14')를 각각 irradiation하면 H-14와 -3에서 큰 nOe 효과가 발견되었으며 NOESY 실험에서도 H-3과 -14 사이에 분명한 correlation이 발견되었다(Fig. 2-88). 이 현상을 설명하기 위해서는 이 물질이 Fig. 2-8에서 제시된 것과 같은 conformation을 가져야만 가능하다. 따라서 이 물질은 $\text{sp}^2\text{-sp}^2$ 사이의 single bond에 대한 atropisomer로 존재해야 한다. 이것을 증명하기 위하여 optical rotation을 측정하였으며 측정한 결과 $[\alpha]_D^{25}$ 값이 -300° 를 나타내어 이 물질이 비대칭 탄소중심은 없으나 광학활성을 나타내는 atropisomer임을 증명하였다. 이상과 같이 하여 91-12-3 즉 bis-(2,2'-guaiazulenyl)의 입체화학적 구조가 분명하게 결정되었다.

지금까지 해양에서 발견된 guaiazulene 유도체들은 다음과 같다. Guaiazulene lactone인 linderazulene이 gorgonian *Paramuricea chamaeleon*로부터 얻어 졌으며 *Acalycigorgia* sp.로부터 2,3-dihydrolinderazulene이 분리되었다(S. Imre et al, 1981; S. Sakemi & T. Higa, 1987). 계속해서 같은 종으로부터 gorgiabisazulene과 gorgiagallyazulene이 얻어 졌다(M. Ochi et al, 1993). Paramuriceidae과에 속하는 어떤 종으로부터 3-chloroguaiazulene, 3-bromoguaiazulene, ehuzalene 및 N,N-dimethyl-amino(guaiazulen-3-yl)methane이 분리되었다(M. K. W. Li & P. J. Scheuer, 1984)(Fig. 2-9).

91-12-1, -2 및 -3의 proton과 carbon에 대한 assignments는 Table 2-11 ~ -13에 나타난 것과 같다. 이 물질에 대한 생리활성도 측정결과 *Escherichia coli*와

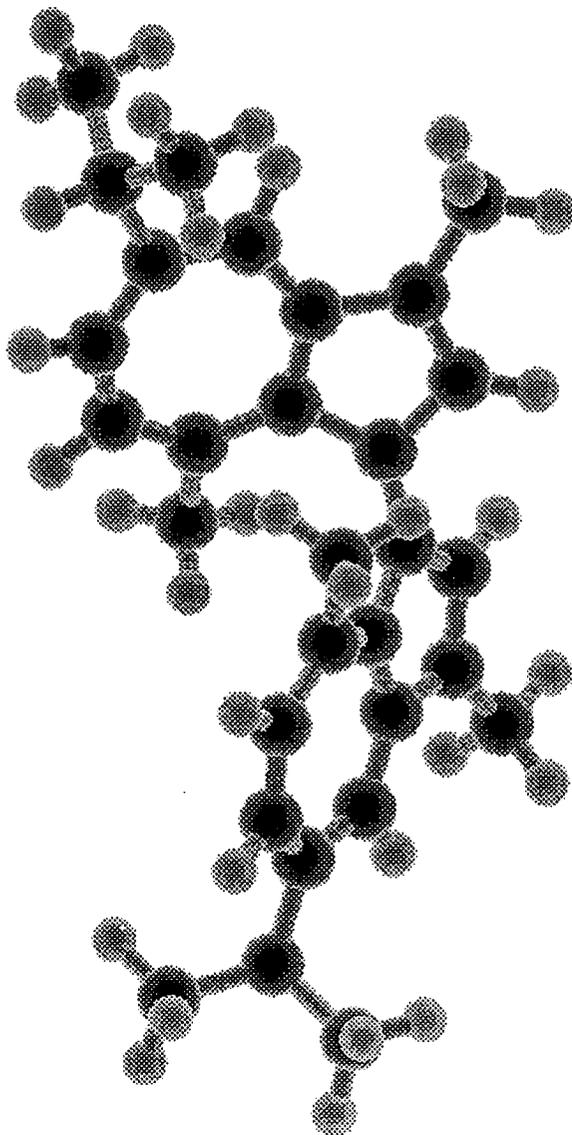
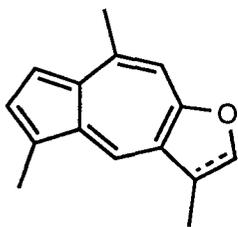
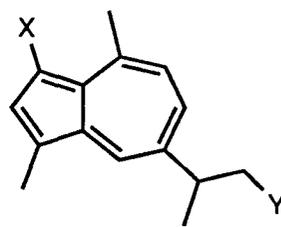


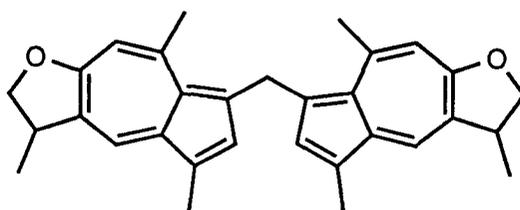
Fig. 2-8. The most stable conformation of 91-12-3 obtained from molecular modeling



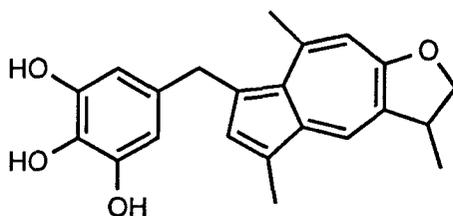
linderazulene
 (*Paramuricea chamaeleon*
 and *Acalycigorgia* sp.)
 dihydrolinderazulene
 (*Acalycigorgia* sp.)



X = Cl, Y = H
 X = Br, Y = H
 X = H, Y = B
 X = CH₂NMe₂, Y = H
 (family Paramuriceidae)



gorgiabisazulene
 (*Paramuricea chamaeleon*)



gorgiagallyazulene
 (*Paramuricea chamaeleon*)

Fig. 2-9. Guaiazulenoid pigments isolated from marine organisms.

Table 2-11. Proton and carbon NMR assignments for 91-12-1

#	^1H	^{13}C
1		138.05 s
2	7.24(1H, d, 3.7)	113.51 d
3	7.65(1H, d, 3.7)	136.72 d
4		137.18 s
5		125.42 s
6	8.18(1H, d, 1.5)	133.29 d
7		139.71 s
8	7.11(1H, dd, 10.7, 1.5)	134.61 d
9	6.69(1H, d, 10.7)	125.21 d
10		144.09 s
11	2.76(1H, m)	38.50 d
12	1.19(3H, d, 7.8)	24.85 q
13	1.19(3H, d, 7.8)	24.85 q
14	2.58(3H, s)	24.01 q
15	2.63(3H, s)	13.05 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in benzene- d_6 solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-12. Proton and carbon NMR assignments for 91-12-2

#	^1H	^{13}C
1, 1'		133.39 s
2, 2'		129.31 s
3, 3'	7.34(2H, s)	141.38 d
4, 4'		138.46 s
5, 5'		124.46 s
6, 6'	8.13(2H, d, 2.0)	133.52 d
7, 7'		138.57 s
8, 8'	7.10(2H, dd, 10.7, 2.0)	134.69 d
9, 9'	6.66(2H, d, 10.7)	126.40 d
10, 10'		145.55 s.
11, 11'	2.79(2H, m)	37.69 d
12, 12'	1.22(6H, d, 6.8)	24.69 q.
13, 13'	1.22(6H, d, 6.8)	24.69 q
14, 14'	2.82(6H, s)	26.98 q
15, 15'	2.46(6H, s)	13.00 q
16	5.25(2H, s)	35.01 t

Proton and carbon NMR spectra were recorded in benzene- d_6 solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-13. Proton and carbon NMR assignments for 91-12-3

#	¹ H	¹³ C
1, 1'		134.11 s
2, 2'		128.35 s
3, 3'	7.62(2H, s)	141.75 d
4, 4'		138.85 s
5, 5'		123.80 s
6, 6'	8.23(2H, d, 2.0)	133.92 d
7, 7'		139.08 s
8, 8'	7.13(2H, dd, 10.7, 2.0)	134.80 d
9, 9'	6.64(2H, d, 10.7)	126.54 d
10, 10'		146.75 s
11, 11'	2.81(2H, m)	38.11 d
12, 12'	1.23(6H, d, 6.8)	24.73 q
13, 13'	1.23(6H, d, 6.8)	24.72 q
14, 14'	2.28(6H, s)	26.67 q
15, 15'	2.63(6H, s)	13.05 q

Proton and carbon NMR spectra were recorded in benzene-d₆ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-14. Results of HMBC experiments with **91-12-1**(guaiazulene), **91-12-2^a** and **91-12-3**

¹ H ^b	¹³ C		
	91-12-1	91-12-2	91-12-3
2	1, 3, 5		
3	1, 2, 5		
6	1, 4		
8	11		
9	1, 14		
12	7	7, 11, 13	7, 11, 13
13	7	7, 11, 12	7, 11, 12
14	1, 9, 10	3, 4, 5	1, 9, 10
15	3	1, 9, 10	3, 4, 9
16		1, 2, 3	

^aExperiments were performed at 125 MHz in benzene-d₆ solutions. Parameters were optimized for couplings of 5 Hz. ^bNumbers are protons which exhibited H-C correlations. Other protons are omitted for clarity.

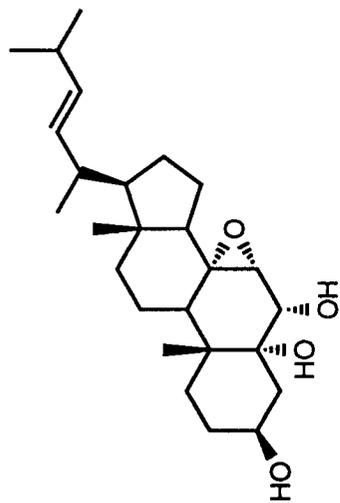
*Bacillus subtilis*에 대한 좋은 항미생물 효과를 보여 주었으며 또 *Candida albicans*에 대한 약간의 항진균 효과를 보였다.

2. 4. *Acabaria undulata*에서 추출된 대사물질

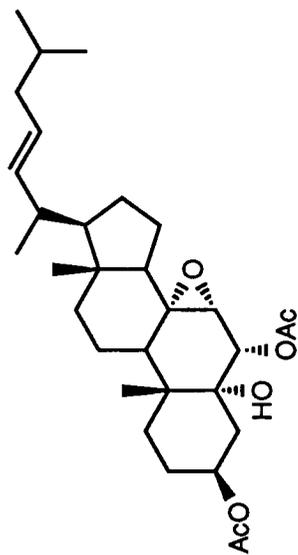
본 연구에서 사용된 시료 gorgonain은 94년 8월에 거문도 근해에서 채집된 *Acabaria undulata*(시료 번호 94K-1)이다. 군체의 색깔이 선명한 주홍색을 띄며 군체의 크기가 20 cm미만으로서의 소형 gorgonian에 속하는 이 시료는 육안으로 볼 때 군체의 줄기에 선명한 노란 색의 calyses를 가지고 있는 점이 뚜렷한 형태적 특징이었다.

그늘에서 말려 냉동 보관 중인 3 kg의 시료를 dichloromethane과 methanol로 반복 추출하여 이들로부터 나온 유기 조추출물을 reversed phase flash chromatography로 서로 다른 5개 분획으로 나누었다. 각각의 분획에 대한 ^1H NMR측정 결과 100% methanol에서 흥미있는 물질을 확인하였으며, 다시 이 층을 silica vacuum flash chromatography로 재 분리하였다. 이러한 과정을 거친 다음 각 분획에 대한 ^1H NMR측정 결과, 앞에서 보였던 물질이 ethyl acetate와 n-hexane이 6:4, 7:3으로 혼합된 유기 용매 분획에 함유되어 있음이 발견되었다. 이 분획들을 C_{18} reversed phase HPLC로 분리하여 크게 4 종류 이상으로 보이는 물질로 나누었으며 보다 더 순수한 물질을 위해 조건을 조금씩 달리하여 각 종류에 따라 3-4차례 HPLC를 거듭 실시하였다. 그러나 분리하고자 하는 물질들은 ^1H NMR측정 결과로 볼 때 아주 깨끗한 상태로 분리 되지 않았지만 10% 미만의 불순물을 내포하는 서로 다른 3종류의 물질들이 일차적으로 얻어졌다. 그리고 쉽게 분리가 되지 않았던 또 다른 HPLC의 한 분액에 대해서는 acetylation 반응을 통해 이미 분리된 물질들과 또 다른 물질을 분리하였다.

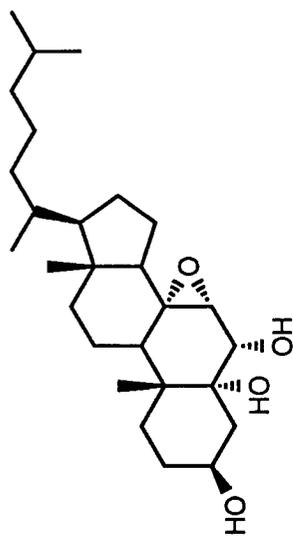
분리된 모든 물질들에 대한 ^1H NMR spectrum을 살펴보면 비교적 downfield



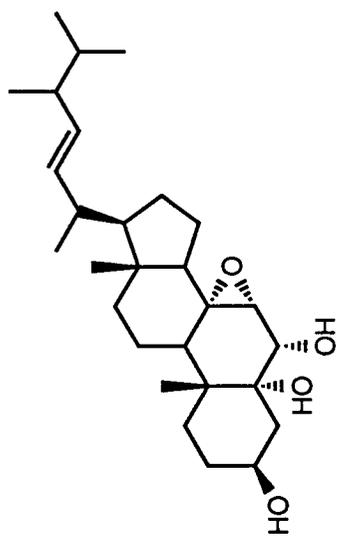
94K-1-2



94K-1-4



94K-1-1



94K-1-3

Fig. 2-10. Polyhydroxysteroids isolated from the gorgonian *Acabaria undulata*.

영역인 $\delta 5.0\sim 5.4$ ppm에서만 뚜렷한 차이를 드러낼 뿐 대부분의 영역에서는 아주 유사하였다. 공통적으로 이 물질들은 upfield $\delta 0.7$ ppm 부근에 한개의 methyl singlet 와 중간 영역 $\delta 4.0$ ppm 부근에 한 개의 oxygenated methine proton이 있다. 이 형태는 흔히 sterol 계열에서 전형적으로 볼 수 있으며 또한 upfield에 나타나는 methyl peak들의 형태를 함께 종합해 볼 때 steroid계열의 물질이라는 사실을 예측할 수 있었다. 그러므로 상기한 4종류의 물질들은 모두 steroid골격을 지닌 유도체들임을 추측할 수 있었다.

물질 94K-1-1의 ^1H NMR에서 모든 peak들이 $\delta 4.0$ ppm 이하의 upfield에서 나타났고 ^{13}C NMR에서도 27개에 해당되는 선들이 $\delta 80$ ppm이하의 upfield에서 모두 분포되어 있었다.(Fig. 2-94, -95). 이 물질은 C_{27} steroid형태를 나타내었다. ^{13}C NMR에서 $\delta 60\text{--}80$ ppm에 나타난 5개의 선들은 탄소 5개가 산화되어 있음을 보여주었고 이 5개의 탄소들은 DEPT 실험으로부터 3개의 methine과 2개의 quarternary carbon으로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2-94). 여기서 한가지 중요한 사실은 proton coupled ^{13}C NMR spectrum을 측정했을 때 $\delta 66.55$ 와 67.81 ppm에 나타난 두 methine 탄소에 대한 coupling constant는 일반적으로 흔히 볼 수 있는 143 Hz를 갖는 반면에 $\delta 65.52$ ppm에 나타난 methine은 one bond coupling constant가 상당히 큰 176.2 Hz를 나타냈다는 것이다. 일반적으로 이렇게 큰 coupling constant를 갖는 예는 hetero-atom을 포함하는 methine이나 작은 cyclic ring으로 심하게 일그러진 conformation에서나 볼 수 있다. 이와 같이 큰 one bond coupling constant와 chemical shift값을 고려해 볼 때 quarternary 탄소 하나와 methine 탄소 사이에 epoxide로 ring이 형성되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 산화된 5개의 탄소는 2개의 secondary 및 1개의 tertiary hydroxyl기와 함께 1개의 epoxide ring으로 밝혀졌다.

94K-1-1의 전체적인 구조는 ^1H COSY, HMQC 그리고 HMBC와 같은 2-D NMR 실험에 의해 결정되었다(Fig. 2-96, -98, -99). 먼저 $\delta 3.94$ ppm에 나타난 수소 선 모양은 상기한 바와 같이 steroid의 독특한 C-3의 methine이 분명하였으며 이 수

소 선을 기준으로 하여 COSY spectrum으로부터 C-2와 -4에 위치한 4개의 수소를 결정할 수 있었다. 더 나아가 대체적으로 선 분리가 뚜렷한 H-4 α 와 long-range coupling을 하는 4개의 탄소들을 HMBC에서 선명하게 찾을 수 있었는데 그 중에서 δ 77.89 ppm에 위치한 탄소가 산화된 탄소중에서 hydroxy기를 포함하는 C-5임을 알 수 있었고 이 탄소는 또한 H-6과도 long-range coupling을 하고 있었다. 계속해서 H-6에 직접 붙어 있는 탄소의 확인은 HMQC spectrum과 함께 분석한 결과, C-3와 마찬가지로 hydroxyl기를 갖는 산화된 것임을 알 수 있었다. 이 탄소에 붙은 H-6은 ^1H COSY spectrum에서 δ 3.60에 위치한 H-7과의 scalar coupling을 하고 있었으므로 H-7에 붙은 C-7도 ^{13}C spectrum의 chemical shift로 볼 때 산화된 탄소에 해당되었다. 그러나 이미 밝혀진 2개의 secondary 와 1 개의 tertiary hydroxyl기를 생각해 볼 때 이것은 C-8과 함께 epoxide을 이루고 있음을 확인할 수 있었다. 이 H-7과 H-8에 있는 두 수소간의 coupling constant(\sim 5.4Hz)가 cyclohexane ring에 있어서의 trans의 두 수소간의 coupling constant(8-12Hz)보다 적게 나타나고 있는 데 이는 epoxide ring으로 인해 두 수소간의 dihedral angle이 변화되었기 때문으로 볼 수 있다. 이와 같이 해서 steroid의 A와 B ring은 C-3 -5 그리고 -6번 위치에 hydroxyl기와 C-7, -8에 epoxide를 가진 형태임을 알 수 있었으며 C와D ring도 ^1H 및 ^{13}C spectrum에 나타난 peak들의 chemical shifts와 coupling constants로부터 가장 일반적인 6/5 bicyclic을 이루고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이상에서 제시되었던 polyhydroxysteroid 골격은 COSY, HMQC, HMBC spectrum에 나타난 추가적인 correlation들로 부터 분명하게 확인되었다(Fig. 2-96, -98, -99).

Steroid의 side chain 구조 역시 ^1H , ^{13}C 그리고 ^1H COSY spectrum에서 명백하게 결정되었다(Fig. 2-94 ~ -96). 91K-1-1은 중간 영역(δ 5.0 ppm)이후 downfield에서 두드러진 선들이 없어 이 물질의 side chain에서는 이중 결합이 존재하지 않는 것으로 추정되었고, δ 1.02에 나타난 doublet 선은 C-21에 존재하는 methyl proton들이 H-20의 영향으로 나누어졌으며 δ 0.82에 생긴 강한 doublet 선은 C-26과 -27에

있는 methyl peak들이 같은 chemical shift를 가지면서 각각 H-24와의 coupling으로 갈라졌다고 볼 수 있다. 구체적인 side chain의 연결 상태는 ^1H COSY의 correlations으로 확인되었으며 그 구조는 Fig. 2-10에 주어져 있다.

91K-1-1과 함께 분리된 두 물질 91K-1-2와 91K-1-3은 ^1H , ^{13}C , ^1H COSY spectrum으로 볼 때 methyl peak의 수 및 $\delta 5.0 - \delta 5.5$ ppm근방에서 나타나는 선들을 제외하고는 91K-1-1과 매우 유사하였다. 위 두 물질들도 같은 방법으로 분석한 결과 A, B rings의 산화된 형태는 완전 동일하였으며 C, D rings에 해당되는 선들도 거의 일치하였다.

물질 91K-1-2는 methyl기가 5개로 91K-1-1과는 동일하나 ^1H NMR의 $\delta 5.20$ ppm 영역에 나타난 signal들은 strong coupling으로 생기는 second order AB split pattern이 다시 weak coupling으로 인해 doublet가 중복된 선 모양을 주고 있다. ^1H COSY를 통해 분석한 결과 이 peak들은 steroid 골격의 side chain에 존재하는 이중 결합(C-22와 C-23)부터 온 것임을 알 수 있었다(Fig. 2-101 ~ -103). 물질 91K-1-3은 전반적으로 볼 때 91K-1-2와 흡사하나, methyl기가 하나 더 많은 형태이다. 이 methyl기는 ^1H COSY 실험 data를 분석한 결과 C-24위치에 붙은 것으로 확인되었다((Fig. 2-107 ~ -109).

마지막으로 acetylation을 통해 분리된 94K-1-4는 ^1H , ^{13}C NMR spectrum에서 각 선들의 chemical shift가 위래 분리된 물질과 비교할 때 많이 이동된 것을 볼 수 있었으며 NMR spectrum분석 결과 acetylation반응에서 3개의 hydroxyl기 중에서 2개만 acetoxyl로 변화되었다(Fig. 2-112 ~ -114). 이 물질도 위와 같은 방법으로 구조 결정을 하였으며 동일한 steroid 골격에 side chain만 약간 다른 구조를 하고 있는 것으로 판명되었다. 즉 ^1H NMR의 $\delta 5.2$ ppm영역에 나타난 second order AB pattern이 triplet와 doublet가 중복되어 있는 coupling pattern과 또 ^1H COSY 실험에서 나타난 correlation들을 볼 때 94K-1-4 구조는 C-24위치에 methyl기가 없는 구조임이 확실히 증명되었다.

Table 2-15. Proton and carbon NMR assignments for **94K-1-1**

#	¹ H	¹³ C
1	α 1.65 (1H, m) β 1.53 - 1.42 (1H, m)	32.21 t
2	α 1.82 (1H, m) β 1.35 - 1.29 (1H, m)	30.52 t
3	3.94 (1H, m)	66.55 d
4	α 2.25 (1H, ddd, 13.2, 5.0, 2.3) β 1.53 - 1.42 (1H, m)	38.85 t
5		77.89 s
6	3.70 (1H, dd, 5.4, 0.5)	67.81 d
7	3.60 (1H, brs)	65.52 d
8		67.58 s
9	1.99 (1H, dd, 11.4, 8.2)	40.10 d
10		40.83 s
11	α 1.82 (1H, m) β 1.72 (1H, m)	22.06 t
12	α 1.35 - 1.29 (1H, m) β 2.06 (1H, brd, 12.1)	38.11 t
13		42.50 s
14	1.87 (1H, dd, 12.8, 6.8)	53.80 d
15	1.20 - 1.10 (1H, m) 1.53 - 1.42 (1H, m)	21.23 t
16	1.24 (1H, m) 1.84 (1H, m)	27.25 t
17	1.24 (1H, m)	55.83 d
18	0.73 (3H, s)	12.42 q
19	1.02 (3H, s)	18.92 q
20	1.35 - 1.29 (1H, m)	35.94 d
21	0.93 (3H, d, 6.4)	18.78 q
22	0.97 (2H, m)	23.83 t
23	1.35 - 1.29 (2H, m)	35.89 t
24	1.20 - 1.10 (2H, m)	39.41 t
25	1.53 - 1.42 (1H, m)	27.97 d
26	0.86 (3H, d, 6.8)	22.79 q
27	0.87 (3H, d, 6.8)	22.79 q
5-OH	4.17 (1H, brd, 2.3)	.
6-OH	2.61 (1H, brd, 5.4)	

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-16. Proton and carbon NMR assignments for 94K-1-2

	^1H	^{13}C
1	α 1.63 (1H, m) β 1.51 (1H, ddd, 13.2, 3.4, 3.4)	32.25 t
2	α 1.82 (1H, m) β 1.36 (1H, m)	30.57 t
3	3.94 (1H, m)	66.55 d
4	α 2.25 (1H, ddd, 13.2, 4.9, 2.0) β 1.46 (1H, m)	38.92 t
5		77.91 s
6	3.69 (1H, brs)	67.84 d
7	3.59 (1H, brs)	65.52 d
8		67.54 s
9	2.00 (1H, dd, 11.0, 8.1)	40.18 d
10		40.90 s
11	α 1.82 (1H, m) β 1.71 (1H, m)	22.10 t
12	α 1.32 - 1.24 (1H, m) β 2.04 (1H, m)	38.07 t
13		42.44 s
14	1.89 (1H, dd, 12.7, 7.3)	53.90 d
15	1.16 (1H, m) 1.43 (1H, m)	21.17 t
16	1.32 - 1.24 (1H, m) 1.68 (1H, m)	27.21 t
17	1.32 - 1.24 (1H, m)	55.69 d
18	0.75 (3H, s)	12.66 q
19	1.02 (3H, d, 6.8)	18.90 q
20	2.02 (1H, m)	39.88 d
21	1.02 (3H, d, 6.8)	20.91 q
22	5.15 (1H, dd, 15.2, 8.3)	132.78 d
23	5.29 (1H, dd, 15.2, 6.8)	135.60 d
24	2.20 (1H, m)	30.91 d
25	0.95 (3H, d, 6.8)	22.70 q
26	0.95 (3H, d, 6.8)	22.69 q
5-OH	4.19 (1H, d, 2.0)	
6-OH	2.65 (1H, brs)	

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl_3 solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-17. Proton and carbon NMR assignments for **94K-1-3**

#	¹ H	¹³ C
1	α 1.66 (1H, ddd, 13.2, 13.2, 3.2) β 1.50 (1H, ddd, 13.2, 3.6, 3.6)	32.21 t
2	α 1.85 - 1.80 (1H, m) β 1.35 (1H, ddd, 13.2, 13.2, 4.6)	30.50 t
3	3.95 (1H, m)	66.53 d
4	α 2.25 (1H, ddd, 13.2, 5.0, 1.8) β 1.49 - 1.40 (1H, m)	38.85 t
5		77.90 s
6	3.70 (1H, brd, 2.5)	67.80 d
7	3.60 (1H, brs)	65.50 d
8		67.55 s
9	2.00 (1H, dd, 10.9, 8.1)	40.11 d
10		40.85 s
11	α 1.85 - 1.80 (1H, m) β 1.76 - 1.70 (1H, m)	22.07 t
12	α 1.32 (1H, m) β 2.04 (1H, m)	38.02 t
13		42.37 s
14	1.89 (1H, dd, 12.8, 7.3)	53.87 d
15	1.15 (1H, m) 1.49 - 1.40 (1H, brd)	21.09 t
16	1.30 - 1.26 (1H, m) 1.76 - 1.70 (1H, m)	27.64 t
17	1.30 - 1.26 (1H, m)	55.55 d
18	0.74 (3H, s)	12.60 q
19	1.03 (3H, s)	18.91 q
20	2.02 (1H, m)	40.32 d
21	1.02 (3H, d, 6.8)	21.24 q
22	5.14 (1H, dd, 15.5, 8.2)	132.55 d
23	5.21 (1H, dd, 15.5 7.7)	135.20 d
24	1.85 - 1.80 (1H, m)	43.03 d
25	1.49 - 1.40 (1H, m)	33.14 q
26	0.82 (3H, d, 6.8)	20.12 q
27	0.82 (3H, d, 6.9)	19.62 q
28	0.91 (3H, d, 6.8)	17.98 q
5-OH	4.18 (1H, d, 2.7)	
6-OH	2.62 (1H, brd, 2.5)	

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

Table 2-18. Proton and carbon NMR assignments for 94K-1-4

#	¹ H	¹³ C
1	α 1.46 (1H, m) β 1.76 (1H, ddd, 13.4, 3.4, 3.4)	31.83 t
2	α 1.95 (1H, m) β 1.39 (1H, m)	26.82 t
3	5.03 (1H, m)	69.64 d
4	α 2.06 - 1.98 (1H, m) β 1.51 (1H, ddd, 12.7, 2.5, 2.5)	35.34 t
5		76.52 s
6	5.11 (1H, d, 1.0)	70.10 d
7	3.56 (1H, brs)	62.32 d
8		66.62 s
9	2.11 (1H, dd, 11.2, 8.3)	39.94 d
10		41.54 s
11	α 1.72 (1H, m) β 1.79 (1H, m)	21.99 t
12	α 1.33 (1H, m) β 2.06 - 1.98 (1H, m)	37.96 t
13		42.40 s
14	1.91 (1H, dd, 12.7, 7.3)	53.75 d
15	1.12 (1H, m) 1.41 (1H, m)	21.18 t
16	1.72 (1H, m) 1.89 (1H, m)	27.42 t
17	1.25 (1H, m)	55.50 d
18	0.75 (3H, s)	12.68 q
19	1.10 (3H, s)	19.23 q
20	2.06 - 1.98 (1H, m)	40.18 d
21	1.03 (3H, d, 6.4)	20.97 q
22	5.19 (1H, dd, 15.1, 8.3)	137.21 t
23	5.31 (1H, dt, 15.1, 6.8)	127.01 t
24	1.82 (2H, m)	41.91 t
25	1.57 (1H, m)	28.50 d
26	0.86 (3H, d, 6.7)	22.31 q
27	0.86 (3H, d, 6.7)	22.29 q
5-OH	4.52 (1H, d, 2.5)	
OAc	2.00 (3H, s)	170.77, 21.37
OAc	2.20 (3H, s)	170.23, 21.37

Proton and carbon NMR spectra were recorded in CDCl₃ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

이상과 같이 하여 분리된 4개의 steroid 유도체(91K-1-1~4)의 2차원적인 구조가 밝혀졌다. 하지만 이 물질들의 3차원적인 stereochemistry문제를 해결하기 위해 대표적으로 91K-1-1에 대한 NOESY실험을 시행하였다(Fig. 2-101). 먼저 C-3에 위치한 hydroxyl기는 H-3과 vicinal protons과의 coupling constant로 보아 equatorial에 위치하며 C-6에 위치한 hydroxyl기는 NOESY spectrum에서 H-6의 수소와 H-4 β , -19와 강한 correlation들을 주는 것으로 보아 이것은 axial 위치에 있는 것으로 생각되었다. 뿐만 아니라 C-3, -5 그리고 -6에 위치한 hydroxyl기의 방향성은 pyridine-induced deshielding 효과에 의해서도 잘 설명될 수 있었다. Hydroxyl기와 1,3 diaxial 위치에 있는 수소는 pyridine용매에서 비정상적인 downfield 이동을 보여준다고 이미 알려져 있다. 이 알려진 사실에서 보면 C-5에 있는 hydroxyl기와 1,3 diaxial 위치에 있는 H-3, -4 α 의 수소는 이 효과로 약 0.85 ppm씩 downfield로 이동하였다. 그리고 C-7, -8에 있는 epoxide의 위 아래 방향성 문제는 H-7와 H-15 β , H-7과 H-6 사이에 강한 correlation들이 나타난 점으로 보아 epoxide가 아래로 향해 있다는 증거를 제공해 주고 있다. NOESY실험을 종합 분석한 결과 polyhydroxy steroids 94K-1-1~4의 3차원적인 입체구조는 Fig. 2-11에 나타난 바와 같다고 생각된다. 이 구조는 Alchemy III software에 의한 molecular modeling결과 NOESY 실험으로 부터 예상된 구조가 에너지가 가장 낮은 안정된 형태의 물질이라는 것을 보여주었다.

문헌 조사 결과 해양 천연물 중에서 polyhydroxy steroid는 여러 생물에 걸쳐 폭 넓게 분포하고 있으며 특히 해양 동물에서는 빈번히 발견되고 있으나 C-7, -8 위치에 epoxide를 갖는 형태의 steroid는 육상 및 해양 생물로부터 아직까지 발견된 예가 없다는 것을 확인하였다. 해양 동물에서 분리된 polyhydroxy steroids중에 많은 물질들이 항암, 항바이러스, 항미생물등 다양한 생리 활성 효과를 나타내어 큰 주목을 끌고 있다.



Fig. 2-11. 3-Dimensional structure of polyhydroxysteroid **9IK-1-1**

2. 5. 실험 방법

2. 5. 1. 기기 및 시약

NMR측정은 500 MHz Varian Unity-500을 이용하였다. Proton NMR은 500MHz에서 carbon NMR은 125 MHz에서 측정하였다. Chemical shifts는 internal standards인 TMS(tetramethyl silane)나 $CDCl_3$, benzene- d_6 , CD_3OD 를 이용하여 측정하였다. 모든 NMR실험은 Varian사에서 공급한 Vnmr software를 이용하였으며 각각의 실험에 이용된 pulse width, transmitter power, delay 및 evolution time들은 기 측정된 값을 이용하였다. IR spectrum은 Mattson GALAXY spectrophotometer로 기록되었으며 UV spectrum은 methanol 용매에서 Milton-Roy spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 질량분석은 California 대학교 화학과의 질량분석 장비를 이용하였다. 그리고 광회전도는 5 cm microcell을 이용하여 JASCO digital polarimeter로 측정하였다. HPLC는 spectra-physics제의 Isochrom isocratic pump를 모체로하여 본 실험실에서 조립한 제품을 사용하였다. 중요부품은 injector(Rheodyne 7825)와 detector(Shodex RI) Spectra-physics UV detector 및 Linear 2-pen recorder로 구성되었다. 물질분리에 사용한 HPLC column은 YMC silica semiprep column(1 cm x 25 cm), YMC 및 Sheido C_{18} reversed phase semiprep column(1 x 25 cm)와 각각의 guard column cartridge(Aldrich)이었다. Rotavapor는 Buchi RE-101과 121를 사용하였다. 녹는점 측정에는 Fisher-Jones Apparatus를 보정없이 사용하였다. 유기물질의추출 및 분리에 이용한 모든 용매와 시약은 GR등급을 사용하거나 EP급을 재증류하여 사용하였다.

2. 5. 2. 92J-18로부터 천연물 추출 및 분리

2. 5. 2. 1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

Plexauridae과에 속하는 어떤 종(92J-18)은 '92년 1월에 제주도 서귀포시 연안해역인 설섬 및 문섬 그리고 범섬 근처의 수심 25-30 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 응달에서 완전히 말려 냉동고에 보관되었다. 냉동보관중인 시료(건조무게량: 4 kg)를 잘게 잘라 methylene chloride 2 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복한 후에 얻어진 전체 유기추출물의 양은 11.5 g이 얻어 졌으며 또 methanol 3 L를 사용하여 같은 방법으로 두 번 추출한 후에 15.5 g을 얻었다.

먼저 methanol로 추출한 조추출물 7.7 g을 진공 flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane, n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(5-70% ethylacetate/n-hexane: 5%씩 증가하여 사용), ethylacetate 그리고 methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 17개의 분획(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ^1H NMR을 측정된 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-3(10% ethylacetate/n-hexane: 75 mg), fx-4(15% ethylacetate/n-hexane: 49 mg), fx-5(20% ethylacetate/n-hexane: 29 mg)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다. 기타의 fx에는 여러 해양생물에 흔히 존재하는 포화 및 불포화 지방, 지방산 및 steroids가 포함되었다.

Methylene chloride로 추출한 조추출물 5.4 g을 위와 유사한 방법으로 처리하였으며 ^1H NMR을 측정된 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-4(15% ethylacetate/n-hexane: 970 mg), fx-5(20% ethylacetate/n-hexane: 840 mg), fx-6(25% ethylacetate/n-hexane: 580 mg), fx-7(30% ethylacetate/n-hexane: 460 mg)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다.

2. 5. 2. 2. Astrogorgiadiol(92J-18-1)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-5(EtOAc/n-hexane = 1:4, 35 mg)을 20% ethylacetate/hexane에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 normal phase HPLC(YMC silica column, RI detector, 2.5 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 20분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C₁₈ HPLC로 분리한 결과 순수한 92J-18-1 (astrogorgiadiol)이 10.9 mg 얻어 졌다(YMC column, RI detector, acetonitrile, 3 ml/min, 21 min).

Astrogorgiadiol: colorless oil; $[\alpha]_D^{25}$ -6.8° (c 1.0 CHCl₃); HREIMS: m/z observed 400.3345, calculated 400.3341; LREIMS m/z 400(14), 382(6), 269(3), 247(5), 147(5), 134(100), 121(24), 84(11); IR(KBr) 3400(OH), 2950, 2860, 1610, 1590, 1500, 1370, 1230, 1160, 980, 810 cm⁻¹; UV(MeOH) λ_{max} 218.1 nm(ϵ 7100), 280.5 nm(ϵ 2300); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 6.98(1H, d, 7.8, H-1), 6.65(1H, d, 2.9, H-4), 6.57(1H, dd, 7.8, 2.9, H-2), 4.05(1H, m, H-9), 2.69(1H, ddd, 13.7, 11.2, 5.4, H-6), 2.42(1H, ddd, 13.7, 10.7, 5.4, H-6), 2.22(3H, s, H-19), 1.81(1H, m, H-16), 1.77(1H, m, H-12), 1.75(2H, m, H-11), 1.60(1H, m, H-15), 1.55(2H, m, H-7), 1.53(1H, m, H-8), 1.51(2H, m, H-14, H-25), 1.48(1H, m, H-12), 1.36(1H, m, H-20), 1.35(1H, m, H-23), 1.34(1H, m, H-22), 1.30(2H, m, H-24), 1.23(1H, m, H-16), 1.19(1H, m, H-17), 1.15(1H, m, H-23), 1.12(1H, m, H-15), 0.99(1H, m, H-22), 0.92(3H, d, 6.8, H-21), 0.87(3H, d, 6.8, H-26), 0.86(3H, d, 6.8, H-27), 0.69(3H, s, H-18); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 153.72(C, C-3), 142.61(C, C-5), 130.99(CH, C-1), 127.74(C, C-10), 115.47(CH, C-4), 112.44(CH, C-2), 67.31(CH, H-9), 56.13(CH, C-17), 47.74(CH, C-14), 42.83(C, C-13), 40.87(CH, C-8), 39.47(CH₂, C-24), 36.10(CH₂, C-22), 35.74(CH, C-20), 34.09(CH₂, C-12), 30.80(CH₂,

C-6), 30.22(CH₂, C-7), 30.02(CH₂, C-11), 27.99(CH, C-25), 27.71(CH₂, C-16), 24.41(CH₂, C-15), 23.75(CH₂, C-23), 22.80(CH₃, C-26), 22.55(CH₃, C-27), 18.65(CH₃, C-21), 18.35(CH₃, C-19), 10.99(CH₃, C-18).

2. 5. 2. 3. Calicoferol C(92J-18-2)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-5(EtOAc/n-hexane = 1:4, 35 mg)을 20% ethylacetate/n-hexane에 녹이고 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 같은 용액을 용출액으로 사용하여 normal phase HPLC(YMC silica column, UV detector, 254 nm, 2.5 ml/min)로 분리를 시도하였다. Retention time 22분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C₁₈ HPLC로 분리한 결과 순수한 calicoferol C(92J-18-2)가 3.4 mg 얻어 졌다(YMC column, UV detector, acetonitrile, 4 ml/min, 13 min).

Calicoferol: 무색의 기름; $[\alpha]_D^{25}$ -9.5⁰(c 0.3 CHCl₃); HREIMS: m/z observed 412.3362, calculated 412.3341; LREIMS m/z 412(21), 394(17), 310(18), 274(5), 174(13), 155(15), 134(100), 122(20), 88(14); IR(KBr) 3400(OH), 2950, 2870, 1610, 1590, 1500, 1460, 1380, 1290, 1250, 1160, 890, 810 cm⁻¹; UV(MeOH) λ_{max} 218.9 nm(ϵ 7800), 280.9 nm(ϵ 2500); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 6.98(1H, d, 7.8, H-1), 6.65(1H, d, 2.4, H-4), 6.57(1H, dd, 7.8, 2.4, H-2), 4.71(1H, brs, H-28), 4.65(1H, d, 1.5, H-28), 4.05(1H, m, H-9), 2.71(1H, ddd, 13.8, 11.2, 5.4, H-6), 2.42(1H, ddd, 13.8, 13.8, 5.1, H-6), 2.22(1H, m, H-25), 2.22(3H, s, H-19), 2.10(1H, ddd, 15.9, 11.5, 4.6, H-23), 1.88(1H, m, H-23), 1.85(1H, m, H-16), 1.75(2H, m, H-11), 1.60-1.50(7H, m, H-7, -8, -12, -14, -15, -22), 1.43(1H, m, H-20), 1.30(1H, m, H-17), 1.26(1H, m, H-16), 1.16(1H, m, H-22), 1.11(1H, m, H-15), 1.03(3H, d, 6.8, H-26), 1.02(3H, d, 6.8, H-27), 0.96(3H, d, 6.8, H-21),

0.70(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 156.81(C, C-24), 153.61(C, C-3), 141.70(C, C-5), 131.01(CH, C-1), 127.91(C, C-10), 115.47(CH, C-4), 112.40(CH, C-2), 105.94(CH_2 , C-28), 67.17(CH, H-9), 55.99(CH, C-17), 47.73(CH, C-14), 42.91(C, C-13), 40.89(CH, C-8), 34.58(CH_2 , C-22), 35.71(CH, C-20), 34.12(CH_2 , C-12), 33.79(CH, C-25), 30.85(CH_2 , C-6), 30.26(CH_2 , C-7), 30.13(CH_2 , C-11), 27.71(CH_2 , C-16), 24.43(CH_2 , C-15), 30.85(CH_2 , C-23), 21.99(CH_3 , C-26), 21.85(CH_3 , C-27), 18.66(CH_3 , C-21), 18.35(CH_3 , C-19), 11.01(CH_3 , C-18).

2. 5. 2. 4. Calicoferol D(92J-18-3)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-3(EtOAc/n-hexane = 1:9, 75 mg)과 fx-4(49 mg)을 각각 7% ethylacetate/hexane에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 normal phase HPLC(YMC silica column, RI detector, 2 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 68분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C_{18} HPLC로 분리한 결과 순수한 92J-18-3(calicoferol D)이 7.9 mg 얻어 졌다(YMC column, RI detector, acetonitrile, 2 ml/min, 27 min).

Calicoferol D: 무색의 기름; $[\alpha]_D^{25} +13.5^{\circ}$ (c 0.4 CHCl_3); HREIMS: m/z observed 410.3183, calculated 410.3185; LREIMS m/z 410(30), 276(65), 261(13), 205(10), 151(51), 134(100), 121(40), 109(16), 93(30), 83(19); IR(KBr) 3400(OH), 2960, 2870, 1700, 1610, 1590, 1500, 1370, 1300, 1230, 1160, 980, 810 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{max} 218.9 nm(ϵ 6900), 280.9 nm(ϵ 2200); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.98(1H, d, 7.8, H-1), 6.66(1H, d, 2.9, H-4), 6.57(1H, dd, 7.8, 2.9, H-2), 5.22(1H, dd, 15.1, 8.0, H-23), 5.15(1H, dd, 15.1, 8.3, H-22), 2.65(1H, ddd, 13.0, 12.2, 4.9, H-6), 2.50(1H, ddd, 14.2, 14.2, 6.8, H-11), 2.42(1H, ddd, 13.0, 11.5, 5.4,

H-6), 2.37(1H, m, H-8), 2.32(1H, ddd, 14.2, 5.1, 2.0, H-11), 2.25(3H, s, H-19), 2.14(1H, ddd, 13.2, 6.8, 2.0, H-12), 2.08(1H, m, H-20), 1.84(2H, m, H-16, -24), 1.75(1H, m, H-7), 1.69(2H, m, H-14, -15), 1.59(2H, m, H-7, -12), 1.47(1H, m, H-25), 1.42(1H, m, H-16), 1.28(1H, m, H-15), 1.26(1H, m, H-17), 1.02(3H, d, 6.8, H-21), 1.00(3H, s, H-18), 0.92(3H, d, 6.8, H-28), 0.84(3H, d, 6.6, H-26), 0.82(3H, d, 6.6, H-27); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 213.00(C, H-9), 153.56(C, C-3), 142.53(C, C-5), 135.22(CH, C-22), 132.50(CH, C-23), 130.99(CH, C-1), 128.07(C, C-10), 115.47(CH, C-4), 112.45(CH, C-2), 55.28(CH, C-14), 54.86(CH, C-17), 50.43(CH, C-8), 43.05(CH, C-24), 42.69(C, C-13), 40.15(CH, C-20), 38.37(CH_2 , C-12), 38.28(CH_2 , C-11), 33.18(CH, C-25), 31.00(CH_2 , C-6), 29.64(CH_2 , C-16), 27.62(CH_2 , C-7), 25.17(CH_2 , C-15), 20.16(CH_3 , C-26), 20.94(CH_3 , C-21), 19.66(CH_3 , C-27), 18.37(CH_3 , C-19), 18.00(CH_3 , C-28), 11.72(CH_3 , C-18).

2. 5. 2. 5. Calicoferol E(92J-18-4)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-3(EtOAc/n-hexane = 1:9, 75 mg)을 7% ethylacetate/hexane에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 normal phase HPLC(YMC silica column, RI detector, 2 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 60분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C_{18} HPLC로 분리한 결과 순수한 92J-18-4(calicoferol D)가 9.4 mg 얻어 졌다(YMC column, RI detector, acetonitrile, 2 ml/min, 27 min).

Calicoferol E: 흰색고체 mp 94-95 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{25}$ +21.4 $^{\circ}$ (c 0.6 CHCl_3); HREIMS: m/z observed 398.3188, calculated 398.3185; LREIMS m/z 398(40), 264(37), 249(14), 193(29), 180(12), 151(100), 134(94), 121(50), 109(27); IR(KBr) 3400(OH), 2950, 2870, 1700, 1610, 1590, 1500, 1460, 1230, 1160, 820 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{max}

218.4 nm(ϵ 7400), 282.0 nm(ϵ 2500); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 6.97(1H, d, 8.3, H-1), 6.66(1H, d, 2.9, H-4), 6.57(1H, dd, 8.3, 2.9, H-2), 2.66(1H, ddd, 13.2, 11.7, 4.9, H-6), 2.50(1H, ddd, 14.7, 13.7, 6.8, H-11), 2.41(1H, ddd, 13.2, 11.7, 5.4, H-6), 2.36(1H, m, H-8), 2.31(1H, ddd, 14.2, 5.4, 2.0, H-11), 2.25(3H, s, H-19), 2.17(1H, ddd, 12.9, 6.8, 2.3, H-12), 1.98(1H, m, H-16), 1.75(1H, m, H-7), 1.69(2H, m, H-14, -15), 1.59(2H, m, H-7, -12), 1.54(1H, m, H-25), 1.43(2H, m, H-16, -20), 1.34(2H, m, H-22, -23), 1.29(1H, m, H-15), 1.21(1H, m, H-17), 1.16(1H, m, H-23), 1.13(2H, m, H-24), 1.01(1H, m, H-22), 0.98(3H, s, H-18), 0.93(3H, d, 6.8, H-21), 0.88(3H, d, 6.8, H-26), 0.87(3H, d, 6.8, H-27); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 213.20(C, H-9), 153.62(C, C-3), 142.53(C, C-5), 130.99(CH, C-1), 128.04(C, C-10), 115.66(CH, C-4), 112.47(CH, C-2), 55.23(CH, C-14), 55.07(CH, C-17), 50.43(CH, C-8), 42.83(C, C-13), 39.45(CH_2 , C-24), 35.64(CH, C-20), 38.51(CH_2 , C-12), 38.29(CH_2 , C-11), 35.88(CH_2 , C-22), 31.02(CH_2 , C-6), 29.05(CH_2 , C-16), 28.01(CH, C-25), 27.65(CH_2 , C-7), 25.13(CH_2 , C-15), 23.79(CH_2 , C-23), 22.81(CH_3 , C-26), 22.55(CH_3 , C-27), 18.56(CH_3 , C-21), 18.37(CH_3 , C-19), 11.53(CH_3 , C-18).

2. 5. 2. 6. Ophirin(92J-18-5)의 분리

Methylene chloride로 추출한 조추출물에 대해서 고속감압 크로마토그래피로 분리한 결과 얻어진 fx-4, -5, -6(970, 840, 580 mg)을 12% ethylacetate/hexane에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 normal phase HPLC(YMC silica column, RI detector, 3 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 26분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C_{18} HPLC로 분리한 결과 순수한 92J-18-5(ophirin)가 200 mg 얻어 졌다(YMC column, RI detector, acetonitrile, 2 ml/min, 11 min).

Ophirin: 흰색고체 mp 94-95⁰; $[\alpha]_D^{25}$ -119.7⁰(c 1.0 CHCl₃); HREIMS: m/z observed 462.2596, calculated 462.2618; LREIMS m/z 402(10), 300(4), 214(5), 187(5), 161(5), 159(11), 147(12), 133(27), 121(11), 105(11), 93(13), 43(100); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.66(1H, d, 5.4, H-12), 5.44(1H, brdd, 9.6, 7.9, H-6), 5.38(1H, d, 5.9, H-2), 4.54(1H, d, 9.8, H-2), 4.38(1H, d, 6.4, H-9), 3.12(1H, brs, H-14), 2.66(1H, t, 9.3, H-1), 2.52(1H, dd, 13.7, 5.9, H-8), 2.43(2H, m, H-4, -10), 2.42(1H, m, H-5), 2.15(1H, m, H-5), 2.06(1H, m, H-4), 2.02(3H, s, -OAc), 2.00(3H, s, -OAc), 2.00(1H, brd, 13.7, H-8), 1.96(3H, s, -OAc), 1.83(3H, s, H-15), 1.80(3H, d, 1.0, H-17), 1.79(3H, d, 1.0, H-16), 1.56(3H, s, H-19), 1.38(3H, s, H-20); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 170.39(C, -CO-), 169.93(C, -CO-), 169.91(C, -CO-), 139.62(C, C-11), 129.43(CH, C-6), 125.95(C, C-7), 120.58(CH, C-12), 90.10(C, C-3), 87.18(CH, C-2), 83.70(C, C-18), 80.28(CH, C-9), 66.31(CH, C-13), 48.38(CH, C-10), 45.04(CH₂, C-8), 43.11(CH, C-14), 35.85(CH, C-1), 30.77(CH₂, C-4), 25.41(CH₃, C-19), 25.07(CH₃, C-20), 22.78(CH₃, -OAc), 22.59(CH₃, -OAc), 21.96(CH₂, C-5), 21.85(CH₃, C-15), 21.34(CH₃, C-17), 21.28(CH₃, -OAc), 18.36(CH₃, C-16).

2. 5. 2. 7. Calicophirin B(92J-18-6)의 분리

Methylene chloride로 추출한 조추출물에 대해서 고속감압 크로마토그래피로 분리한 결과 얻어진 fx-4, -5, -6(970, 840, 580 mg)을 12% ethylacetate/hexane에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 normal phase HPLC(YMC silica column, RI detector, 3 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 14분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C₁₈ HPLC로 분리한 결과 순수한 92J-18-6(calicophirin B)이 21.7 mg 얻어 졌다(YMC

column, RI detector, acetonitrile, 2 ml/min, 13 min).

Calicophirin B: 점액성 액체; $[\alpha]_D^{25}$ -90.0° (c 0.8 CHCl_3); HREIMS: m/z observed 404.2566, calculated 404.2563; LREIMS m/z 404(1), 344(7), 284(6), 241(13), 201(11), 173(15), 163(9), 147(30), 135(12), 119(14), 109(10), 105(15), 95(14), 93(44), 91(14), 81(12), 69(12), 49(11), 43(100); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 5.59(1H, d, 5.4, H-12), 5.45(1H, ddt, 10.7, 6.8, 1.5, H-6), 4.48(1H, d, 8.3, H-2), 4.29(1H, dd, 5.6, 2.7, H-9), 2.54(1H, m, H-14), 2.51(1H, m, H-8), 2.46(1H, m, H-10), 2.41(1H, m, H-5), 2.33(1H, ddd, 13.4, 5.9, 2.4), 2.14(1H, m, H-5), 2.02(3H, m, H-1, -4, -8), 2.02(3H, s, -OAc), 1.90(3H, s, -OAc), 1.81(3H, s, H-16), 1.78(3H, s, H-15), 1.78(3H, d, 1.5, H-17), 1.67(1H, m, H-18), 0.98(3H, d, 6.6, H-19), 0.97(3H, d, 6.6, H-20); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 170.62(C, -CO-), 169.55(C, -CO-), 139.59(C, C-11), 129.62(CH, C-6), 126.08(C, C-7), 120.13(CH, C-12), 90.15(C, C-3), 87.69(CH, C-2), 81.09(CH, C-9), 70.16(CH, C-13), 47.45(CH, C-10), 44.60(CH_2 , C-8), 41.94(CH, C-1), 38.53(CH, C-14), 31.30(CH_2 , C-4), 30.87(CH, C-18), 22.80(CH_2 , C-5), 22.80(CH_3 , -OAc), 22.10(CH_3 , C-17), 21.77(CH_3 , C-15), 21.55(CH_3 , -OAc), 21.31(CH_3 , C-20), 21.00(CH_3 , C-19), 18.71(CH_3 , C-16).

2. 5. 2. 8. Astrogorgin(92J-18-7)의 분리

Methylene chloride로 추출한 조추출물에 대해서 고속감압 크로마토그래피로 분리한 결과 얻어진 fx-6, -7(580, 460 mg)을 12% ethylacetate/hexane에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 normal phase HPLC(YMC silica column, RI detector, 3 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 46분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C_{18} HPLC로 분리한 결과 순수한 92J-18-7(astrogorgin)이 17.3 mg 얻어 졌다(YMC

column, RI detector, acetonitrile, 2 ml/min, 9.3 min).

Astrogorgin: 점액성 액체; $[\alpha]_{25}^D$ -100.3°(c 1.0 CHCl₃); HREIMS: m/z observed 520.6181, calculated 520.6186; LREIMS m/z 400(1), 358(24), 298(31), 269(19), 211(21), 197(21), 175(55), 161(30), 145(48), 133(85), 119(26), 105(50), 95(28), 43(100); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.70(1H, d, 5.6, H-12), 5.42(1H, d, 5.6, H-13), 5.33(1H, m, H-6), 5.25(1H, s, H-16), 5.12(1H, s, H-16), 4.41(1H, m, H-9), 4.39(1H, d, 9.8, H-2), 2.95(1H, brdd, 8.8, 8.8, H-1), 2.94(1H, brs, H-14), 2.67(1H, d, 7.8, H-10), 2.47(1H, dd, 14.4, 4.2, H-8), 2.39(1H, m, H-4), 2.38(1H, m, H-5), 2.28(1H, dd, 14.4, 2.7, H-8), 2.10(3H, s, -OAc), 2.01(3H, s, -OAc), 2.00(6H, s, -OAc x 2), 1.91(2H, m, H-4, -5), 1.81(3H, s, H-17), 1.70(3H, s, H-15), 1.58(3H, s, H-19), 1.38(3H, s, H-20); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 170.31(C, -CO-), 170.07(C, -CO-), 169.96(C, -CO-), 169.93(C, -CO-), 143.81(C, C-7), 139.73(C, C-11), 121.34(CH, C-12), 114.55(CH₂, C-16), 86.62(CH, C-2), 85.32(C, C-3), 83.55(C, C-18), 81.18(CH, C-9), 76.30(CH, C-6), 66.55(CH, C-13), 46.03(CH, C-10), 44.83(CH₂, C-8), 40.37(CH, C-1), 36.23(CH, C-1), 25.49(CH₃, C-19), 25.45(CH₃, C-19), 24.78(CH₂, C-5), 24.18(CH₂, C-4), 22.82(CH₃, C-15), 22.54(CH₃, -OAc), 22.51(CH₃, -OAc), 21.91(CH₃, C-17), 21.30(CH₃, -OAc), 21.18(CH₃, -OAc)

2. 5. 2. 9. 92J-18-8의 분리

Methylene chloride로 추출한 조추출물에 대해서 고속감압 크로마토그래피로 분리한 결과 얻어진 fx-4, -5(970, 840 mg)를 12% ethylacetate/hexane에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 normal phase HPLC(YMC silica column, RI detector, 3 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 6.5분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C₁₈

HPLC로 분리한 결과 순수한 92J-18-8이 63.0 mg 얻어 졌다(YMC column, RI detector, acetonitrile, 2 ml/min, 22 min).

92J-18-8: 흰색 고체 78-79 °C; $[\alpha]_{25}^D$ -34.7°(c 0.5 CHCl₃); HREIMS: m/z observed 346.2528, calculated 346.2508; LREIMS m/z 346(10), 287(12), 243(15), 218(19), 177(19), 159(12), 147(23), 133(11), 121(21), 109(14), 105(27), 93(43), 81(22), 43(100); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.48(1H, ddt, 10.5, 7.1, 1.5, H-6), 5.42(1H, m, H-12), 4.08(1H, dd, 5.4, 3.4, H-9), 4.06(1H, d, 6.8, H-2), 2.50(1H, dd, 13.7, 5.4, H-8), 2.41(1H, m, H-10), 2.40(1H, m, H-1), 2.37(1H, m, H-5), 2.28(1H, ddd, 13.2, 5.4, 3.4, H-4), 2.14(1H, m, H-5), 2.08(1H, m, H-13), 2.05(1H, brd, 13.7, H-8), 2.00(1H, ddd, 13.2, 11.2, 4.9, H-4), 1.93(1H, m, H-13), 1.93(3H, s, -OAc), 1.81(3H, d, 1.0, H-16), 1.74(3H, s, H-15), 1.70(3H, d, 1.5, H-17), 1.65(1H, m, H-18), 1.43(1H, m, H-14), 0.97(3H, s, 6.8, H-19), 0.84(3H, s, H-20); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 169.81(C, -CO-), 132.54(C, C-11), 129.51(CH, C-6), 126.41(CH, C-7), 121.40(CH, C-11), 89.31(C, C-3), 87.69(CH, C-2), 80.94(CH, C-9), 46.50(CH, C-10), 43.78(CH₂, C-8), 40.53(CH, C-1), 38.26(CH, C-14), 32.43(CH₂, C-4), 28.56(CH, C-18), 22.90(CH₂ C-5, -13) x 2, 22.86(CH₃, -OAc), 22.25(CH₃, C-17), 21.97(CH₃, C-15), 21.70(CH₂, C-19), 20.18(CH₃, C-20), 19.21(CH₃, C-16).

2. 5. 2. 10. 92J-18-9의 분리

Methylene chloride로 추출한 조추출물에 대해서 고속감압 크로마토그래피로 분리한 결과 얻어진 fx-4(970 mg)을 10% ethylacetate/hexane에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 normal phase HPLC(YMC silica column, RI detector, 3 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 31.6

분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 reversed phase C₁₈ HPLC로 분리한 결과 순수한 92J-18-9가 3 mg 얻어 졌다(YMC column, RI detector, acetonitrile, 2 ml/min, 12 min).

92J-18-9: 점액성 액체; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 5.63(1H, d, 5.4, H-12), 5.53(1H, dd, 10.7, 5.9, H-6), 5.37(1H, d, 5.4, H-2), 4.42(1H, d, 10.3, H-2), 4.39(1H, m, H-9), 3.04(1H, m, H-14), 2.97(1H, dd, 9.3, 9.3, H-1), 2.82(1H, d, 14.2, H-8), 2.68(1H, dd, 12.9, 12.9, H-4), 2.59(1H, m, H-5), 2.45(1H, d, 7.8, H-10), 2.01(3H, s, -OAc), 2.00(3H, s, -OAc), 1.99(1H, m, H-5), 1.97(3H, s, -OAc), 1.85(1H, dd, 14.2, 4.4, H-8), 1.84(3H, s, H-16), 1.78(3H, s, H-17), 1.77(3H, s, H-15), 1.69(1H, m, H-4), 1.57(3H, s, C-19), 1.36(3H, s, H-20); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 170.45(C, -CO-), 170.00(C, -CO-), 169.92(C, -CO-), 139.38(C, C-11), 130.43(C, C-7), 130.37(CH, C-6), 120.81(CH, C-12), 85.95(C, C-3), 84.31(CH, C-2), 83.60(C, C-18), 79.85(CH, C-9), 66.32(CH, C-13), 45.30(CH, C-10), 43.22(CH, C-14), 39.05(CH₂, C-8), 38.34(CH, C-1), 33.60(CH₂, C-4), 25.51(CH₃, C-19), 25.41(CH₃, C-20), 22.60(CH₃, -OAc), 22.48(CH₂, C-5), 22.42(CH₃, -OAc), 21.33(CH₃, -OAc).

2. 5. 2. 11. 92J-18-5의 환원

92J-18-5(23.4 mg, 0.05 mmol)을 dry ether 5 ml에 녹이고 lithium aluminum hydride(24.8 mg, 0.65 mmol)을 넣은 후에 질소 대기하의 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 포화된 sodium sulfate 용액을 5 ml를 넣어 반응을 중단시킨 후에 포화된 소금용액 15 ml를 넣고 분액 깔때기를 이용하여 30 ml의 ether로 세 번 추출하였다. 유기층을 모은 후에 magnesium sulfate로 건조하여 여과하였으며 얻어진 여과액을 진공증발기를 이용하여 용매를 제거하고 고체성 잔류물을 얻었다. 이 생성

물을 reversed phase HPLC(YMC C₁₈ column, 2 ml/min, acetonitrile)로 분리하여 retention time 10분에서 16 mg의 deacetylated ophirin(92J-18-10)을 얻었다. 수득율, 79%.

92J-18-10: 흰색 고체 mp 88-89 °C; ¹H NMR(CD₃OD, 500 MHz) δ 5.66(1H, d, 4.9, H-12), 5.44(1H, brdd, 8.8, 8.8, H-6), 4.39(1H, d, 9.8, H-2), 4.34(1H, d, 6.4, H-9), 4.24(1H, d, 5.4, H-13), 2.79(1H, dd, 9.3, 9.3, H-1), 2.47 - 2.39(4H, m, H-5, -8, -10, -14), 2.27(1H, m, H-4), 2.03(1H, d, 13.2, H-8), 2.03(1H, m, H-5), 1.81(3H, s, H-16), 1.77(3H, s, H-17), 1.49(1H, dd, 13.7, 6.4, H-4), 1.37(3H, s, H-15), 1.18(3H, s, H-19), 1.16(3H, s, H-20); ¹³C NMR(CD₃OD, 125 MHz) δ 137.79(C, C-11), 130.34(CH, C-6), 127.68(C, C-7), 125.73(CH, C-12), 91.76(CH, C-2), 82.63(CH, C-9), 78.80(C, C-3), 73.42(C, C-18), 65.36(CH, C-13), 51.28(CH, C-10), 49.20(CH, C-14), 45.99(CH₂, C-8), 37.57(CH, C-1), 36.42(CH₂, C-4), 28.22(CH₃, C-19), 28.17(CH₃, C-20), 26.98(CH₃, C-15), 23.23CH₂, C-5), 21.97(CH₃, C-17), 18.74(CH₃, C-16).

2. 5. 3. *Calicogorgia granulosa*(91-12)로부터 천연물 추출 및 분리

2. 5. 3. 1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

Calicogorgia granulosa(91-12)는 '92년 2월에 제주도 서귀포시 연안해역인 섯섬 및 문섬 그리고 범섬 근처에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 이 시료는 채집해 오는 즉시 웅달에서 완전히 말려 냉동고에 보관되었다.

냉동보관했던 시료(건조 무게량: 2.5 kg)를 methylene chloride 2 L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었으며 이 과정을 다시 반복한 후에 얻어진 전체 유기추출물의 양은 12.2 g이 얻어 졌다. 용매를 제거한 후에 남는 잔

류물을 silica flash chromatography를 하여 몇 개의 분획으로 나누고 각각의 fraction에 대한 ^1H NMR 측정결과 비극성쪽 분획(100% hexane과 5% EtOAc in n-hexane)에서 2차 대사물질들이 포함되어 있는 것을 발견하였다. C_{18} reversed phase HPLC결과 3개의 물질(91-12-1 ~ -3)이 분리되었다. 이들의 구조는 아래에서 설명한 바와 같이 NMR 자료해석과 질량분석에 의하여 guaiiazulene 유도체로 결정되었다(Fig.).

Methylene chloride로 추출한 조추출물 12.2 g을 진공 flash chromatography로 분리하기 위해 n-hexane, n-hexane과 ethylacetate의 혼합액(5-70% ethylacetate/n-hexane: 5%씩 증가하여 사용), ethylacetate 그리고 methanol을 순서대로 용출시켰다. 이렇게 얻어진 17개의 분액(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ^1H NMR을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-1(100% n-hexane: 480 mg)과 fx-2(5% ethylacetate/n-hexane: 500 mg)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다. 기타의 fx에는 여러 해양생물에 흔히 존재하는 포화 및 불포화 지방, 지방산 및 steroids가 포함되었다.

2. 5. 3. 2. Guaiiazulene 유도체들(91-12-1, -2, -3)의 분리

고속감압 크로마토그래피로 분리한 fx-1을 acetonitrile에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 reversed phase C_{18} HPLC로 분리한 결과 순수한 91-12-1(guaiiazulene)과 91-12-3 [bis-(2,2'-guaiaiazulenyl)]가 380 mg과 10 mg씩 각각 얻어 졌다(YMC column, RI detector, acetonitrile, 3 ml/min, $R_t=12.4$ 와 36.6 min). 분획 fx-2의 경우에는 먼저 3% EtOAc/hexane 용매를 이용해서 silica normal phase HPLC로 분리(RI detector, 2 ml/min)한 후에 9분에 나오는 peak를 모으고 다시 reversed phase HPLC(YMC column, RI detector, acetonitrile, 3 ml/min)로 분리하면 91-12-1(guaiiazulene), -3[bis-(2,2'- guaia-

zulenyl)], -2[bis-(2,2'-guaiazulenyl)methane]의 peak가 12.4, 36.6, 40 분에 나타났으며 각각 20, 5, 5 mg씩 얻어 졌다.

91-12-1(guaiazulene): 푸른 색의 고체 mp 31-32; UV(MeOH) λ_{\max} 218.1 nm(ϵ 7100), 280.5 nm(ϵ 2300); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.18(1H, d, 1.5, H-6), 7.65(1H, d, 3.7, H-2), 7.24(1H, d, 2.9, H-3), 7.11(1H, dd, 10.7, 1.5, H-8), 6.69(1H, d, 10.7, H-9), 2.76(1H, m, H-11), 2.63(3H, s, H-15), 2.58(3H, s, H-14), 1.19(3H, d, 7.8, H-19), 1.19(3H, d, 7.8, H-20); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 144.09(C, C-10), 139.71(C, C-7), 138.05(C, C-1), 137.18(C, C-4), 136.72(CH, C-3), 134.61(CH, C-8), 133.29(CH, C-6), 125.42(C, C-5), 125.21(CH, C-9), 113.51(CH, C-2), 38.50(CH, H-11), 24.85(CH_3 , C-12), 24.85(CH_3 , C-13), 24.01(CH_3 , C-14), 13.05(CH_3 , C-15).

91-12-2[bis-(2,2'-guaiazulenyl)methane]: 푸른 색의 고체 mp 187-189 °C; HREIMS: m/z observed 408.2825, calculated 408.2817; LREIMS m/z 408(39), 393(13), 332(6), 210(48), 198(100), 183(60), 167(12), 152(11); IR(KBr) 2960, 2920, 1540, 1445, 1385, 1200, 920, 810 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{\max} 248 nm(ϵ 44300), 294 nm (ϵ 71600), 309 nm(ϵ 48700), 355 nm(ϵ 16300), 372 nm(ϵ 16200), 629 nm(ϵ 2000); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 8.13(2H, d, 2.0, H-6, -6'), 7.34(2H, s, H-3, -3'), 7.10(2H, dd, 10.7, 2.0, H-8, -8'), 6.66(2H, d, 10.7, H-9, -9'), 5.25(2H, s, H-16), 2.82(6H, s, H-14, -14'), 2.79(2H, m, H-11, -11'), 2.46(6H, s, H-15, -15'), 1.22(6H, d, 6.8, H-12, -12'), 1.22(6H, d, 6.8, H-13, -13'); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 145.55(C, C-10, -10'), 141.38(CH, C-3, -3'), 138.57(C, C-7, -7'), 138.46(C, C-4, -4'), 134.69(CH, C-8, -8'), 133.52(CH, C-6, -6'), 133.39(C, C-1, -1'), 129.31(C, C-2, -2'), 126.40(C, C-9, -9'), 124.46(C, C-5, -5'), 37.69(CH, H-11, -11'), 35.01(CH_2 , C-16, -16'), 26.98(CH_3 , C-14, -14'), 24.69(CH_3 , C-12, -12'), 24.69(CH_3 , C-13, -13'), 13.05(CH_3 , C-15, -15').

91-12-3[bis-(2,2'-guaiazulenyl)]: 녹색의 고체 mp 88-90 °C; HREIMS: m/z observed 394.2638, calculated 394.2660; LREIMS m/z 394(100), 337(29), 311(9), 266(7), 197(8), 119(12), 80(18), 198(100), 183(60), 167(12), 152(11); IR(KBr) 2960, 2925, 1540, 1460, 1365, 1200, 1160, 1050, 940, 920, 860 cm⁻¹; UV(MeOH) λ_{max} 250 nm(ε 45400), 283 nm(ε 63000), 309 nm(ε 43500), 354 nm(ε 16400), 374 nm(ε 19700), 626 nm(ε 2500); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 8.23(2H, d, 2.0, H-6, -6'), 7.62(2H, s, H-3, -3'), 7.13(2H, dd, 10.7, 2.0, H-8, -8'), 6.64(2H, d, 10.7, H-9, -9'), 2.81(2H, m, H-11, -11'), 2.63(6H, s, H-15, -15'), 2.28(6H, s, H-14, -14'), 1.23(6H, d, 6.8, H-12, -12'), 1.23(6H, d, 6.8, H-13, -13'); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 146.75(C, C-10, -10'), 141.75(CH, C-3, -3'), 139.08(C, C-7, -7'), 138.85(C, C-4, -4'), 134.80(CH, C-8, -8'), 133.92(CH, C-6, -6'), 134.11(C, C-1, -1'), 128.35(C, C-2, -2'), 126.54(C, C-9, -9'), 123.80(C, C-5, -5'), 38.11(CH, H-11, -11'), 26.67(CH₃, C-14, -14'), 24.73(CH₃, C-12, -12'), 24.72(CH₃, C-13, -13'), 13.05(CH₃, C-15, -15').

2. 5. 4. *Acabaria undulata*(94K-1)로부터 천연물 추출 및 분리

2. 5. 4. 1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

본 연구에 사용된 산호 *Acabaria undulata*는 1994년 8월 거문도 연안 해역 수심 25-30 mm에서 SCUBA 다이빙에 의해 채집되었다. 이 시료는 변질을 막기 위해 추출할 때까지 건조 냉동 보관되었다.

건조 냉동 보관된 이 시료(건조 무게 3kg)는 효과적인 추출을 위해 2-3cm 정도 잘게 잘라 유기 용매 methylene chloride 1.5 L와 methanol 1.5 L를 순차적으로 가하여 실온에서 각 용매에서 48시간 후에 추출하였다. 이 과정을 두번 정도 거듭하여 얻

어진 각 유기 조추출물들을 다시 합쳐 이에 포함되어 있을 salt를 제거하기 위해 n-butanol과 H₂O로 n-butanol층은 다시 fatty acid와 같은 비극성 유기물을 제거하기 위해 10% aq. methanol과 hexane으로 각각 분배를 실시하였다. 10% aq. methanol층에서 얻어진 유기추출물의 양은 13g이었다.

이 조추출물의 분리를 계속하기 위해 다음과 같은 조건으로 reversed phase vacuum chromatography를 실행하였다: 70% methanol(500ml), 80% methanol(500ml), 90% methanol(500ml), 100% methanol(500ml), 100% ethyl acetate(500ml). 이렇게 얻어진 각 분액들을 ¹H NMR로 측정한 결과 100% methanol층에 흥미 있는 2차 대사 물질이 있음이 확인되어 다시 이 층을 n-hexane과 ethyl acetate의 혼합액 (10% ethyl acetate/n-hexane으로부터 100% ethyl acetate까지)으로 normal phase flash chromatography를 실시하여 10개의 분획으로 나눈 후에 ¹H NMR 측정을 하였다. 이 때 원하는 물질이 60%, 70% 그리고 80% ethyl acetate/hexane 분획에 존재하고 있음을 확인하고 HPLC 분리를 통해 순수하게 얻을 수 있었다.

2. 5. 4. 2. Polyhydroxylated steroids의 분리

위 normal phase flash chromatography로 분리된 10개 분획 중에서, 60%, 70%, 80%층들을 모두 합쳐 HPLC에서 사용될 혼합액 (60% acetonitrile : 40% methanol)에 녹이고 이 때 녹지 않은 결정체들은 spartan filter로 여과한 후 부유물이 없는 용액을 reversed phase column HPLC을 이용하여 관심의 대상이 된 물질들을 분리하였다. HPLC는 다음과 같은 조건으로 이루어졌다: YMC C18 reversed phase column, RI detector, eluent solvent: 60% acetonitrile/methanol, flow rate: 2 ml/min. HPLC로 얻어진 선 모양을 보면 뚜렷하게 분리된 형태는 아니지만 retention time이 16~24 분에 해당되는 영역에 6개의 분리된 선이 나타났다. 각각에 해당되는 분액들을 ¹H NMR로 분석한 결과 polyhydroxylated steroid의 유도체들로 구성되어 있는 것으로

알 수 있었다. 이 때 각 분액들은 순수한 한 종류의 물질이 아닌 다른 유도체가 어느 정도 섞인 형태지만 retention time에 따라 다음과 같이 우선 4종류의 물질로 분류할 수 있었다: 16.3 분(=94K-1-2), 18.8 분(=94K-1-4), 21.5 분 (=94K-1-3), 22.3 분 (=94K-1-1). 여기서 더 나은 순수 물질로 분리하기 위해 위와 같은 조건으로 각 분액에 대해서 HPLC를 한 번 더 반복하였다. 94K-1-3을 제외하고는 94K-1-1~4가 각각 10 mg, 8 mg, 12 mg 분리되었다. 하지만 94K-1-3은 반복적으로 HPLC를 거쳤지만 두개 이상으로 보이는 물질이 계속 섞여 있어 이들의 분리는 위와 동일한 방법으로는 불가능하다고 판단되어 acetic anhydride와 반응시켜 polyacetate를 합성한 뒤 분리를 시도하였다. 이러한 과정으로 94K-1-3을 5 mg을 분리할 수 있었다.

94K-1-1: mp. 149 - 150 °C; IR(KBr) 3400, 2960, 2870, 1470, 1380, 1330, 1050, 980, 830 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500MHz) δ 4.17(1H, brd, 2.3, H-5 OH), 3.94(1H, m, H-3), 3.70(1H, dd, 5.4, 0.5, H-6), 3.60(1H, brs, H-7), 2.61(1H, brd, 5.4, H-6 OH), 2.25(1H, ddd, 13.2, 5.0, 2.3, H-4 α), 2.06(1H, brd, 12.1, H-12 β), 1.99(1H, dd, 11.4, 8.2, H-9), 1.87(1H, dd, 12.8, 6.8, H-14), 1.84(1H, m, H-16), 1.82(2H, m, H-2 α , -11 α), 1.72(1H, m, H-11 β), 1.65(1H, m, H-1 α), 1.53-1.42(4H, m, H-1 β , -4 β , -15, -25), 1.35-1.29(5H, m, H-2 β , -12 α , -20, -23), 1.24(2H, m H-16, -17), 1.20-1.10(3H, m, H-15, -24), 1.02(3H, s, H-19), 0.97(2H, m, H-22), 0.93(3H, d, 6.4 H-21), 0.87(3H, d, 6.8, H-27), 0.86(3H, d, 6.8, H-26), 0.73(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125MHz) δ 77.89(C, C-5), 67.81(CH, C-6), 67.58(C, C-8), 66.55(CH, C-3), 65.52(CH, C-7), 55.83(CH, C-17), 53.80(CH, C-14), 42.50(C, C-13), 40.83(C, C-10), 40.10(CH, C-9), 39.41(CH_2 , C-24), 38.85(CH_2 , C-4), 38.11(CH_2 , C-12), 35.94(CH, C-20), 35.89(CH_2 , C-23), 32.21(CH_2 , C-1), 30.52(CH_2 , C-2), 27.97(CH, C-25), 27.25(CH_2 , C-16), 23.83(CH_2 , C-22), 22.79(CH_3 , C-26, -27), 22.06(CH_2 , C-11), 21.23(CH_2 , C-15), 18.92(CH_3 , C-19), 18.78(CH_3 , C-21), 12.42(CH_3 , C-18).

94K-1-2: mp. 184 - 185 °C; IR(KBr)3350, 2970, 2870, 1460, 1380, 1050, 970,

830 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500MHz) δ 5.29(1H, dd, 15.2, 6.8, H-23), 5.15(1H, dd, 15.2, 8.3, H-22), 4.19(1H, d, 2.0, H-5 OH), 3.94(1H, m, H-3), 3.69(1H, brs, H-6), 3.59(1H, brs, H-7), 2.65(1H, brs, H-6 OH), 2.25(1H, ddd, 13.2, 4.9, 2.0, H-4 α), 2.20(1H, m, H-24), 2.04(1H, m, H-12 β), 2.02(1H, m, H-20), 2.00(1H, dd, 11.0, 8.1, H-9), 1.89(1H, dd, 12.7, 7.3, H-14), 1.82(2H, m, H-2 α , -11 α), 1.71(1H, m, H-11 β), 1.68(1H, m, H-16), 1.63(1H, m, H-1 α), 1.51(1H, ddd, 13.2, 3.4, 3.4, H-1 β), 1.46(1H, m, H-4 β), 1.43(1H, m, H-15), 1.36(1H, m, H-2 β), 1.32-1.24(3H, m, H-12 α , -16, -17), 1.16(1H, m, H-15), 1.02(6H, d, 6.8, H-19, -21), 0.95(6H, d, 6.8, H-25, -26), 0.75(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125MHz) δ 135.60(CH, C-23), 132.78(CH, C-22), 77.91(C, C-5), 67.84(CH, C-6), 67.54(C, C-8), 66.55(CH, C-3), 65.52(CH, C-7), 55.69(CH, C-17), 53.90(CH, C-14), 42.44(C, C-13), 40.90(C, C-10), 40.18(CH, C-9), 39.88(CH, C-20), 38.92(CH_2 , C-4), 38.07(CH_2 , C-12), 32.25(CH_2 , C-1), 30.91(CH, C-24), 30.57(CH_2 , C-2), 27.21(CH_2 , C-16), 22.70(CH_3 , C-25), 22.69(CH_3 , C-26), 22.10(CH_2 , C-11), 21.17(CH_2 , C-15), 20.91(CH_3 , C-21), 18.90(CH_3 , C-19), 12.66(CH_3 , C-18).

94K-1-3: mp. 187 -188 $^\circ\text{C}$; IR(KBr) 3400, 2960, 2870, 1460, 1400, 1050, 980, 830 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500MHz) δ 5.21(1H, dd, 15.5, 7.7, H-23), 5.14(1H, dd, 15.5, 8.2, H-22), 4.18(1H, d, 2.7, H-5 OH), 3.95(1H, m, H-3), 3.70(1H, brd, 2.5, H-6), 3.60(1H, brs, H-7), 2.62(1H, brd, 2.5, H-6 OH), 2.25(1H, ddd, 13.2, 5.0, 1.8, H-4 α), 2.04(1H, m, H-12 β), 2.02(1H, m, H-20), 2.00(1H, dd, 10.9, 8.1, H-9), 1.89(1H, dd, 12.8, 7.3, H-14), 1.76-1.70(1H, m, H-16, -11 β), 1.85-1.80(3H, m, H-24, -2 α , -11 α), 1.66(1H, ddd, 13.2, 13.2, 3.2, H-1 α), 1.50(1H, ddd, 13.2, 3.6, 3.6, H-1 β), 1.49-1.40(3H, m, H-4 β , -15, -25), 1.35(1H, ddd, 13.2, 13.2, 4.6, H-2 β), 1.32(1H, m, H-12 α), 1.30-1.26(2H, m H-16, -17), 1.15(1H, m, H-15), 1.03(3H, s, H-19), 1.02(3H, d, 6.8, H-21), 0.91(3H, d, 6.8, H-28), 0.82(6H, d, 6.8, H-26, -27),

0.74(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125MHz) δ 135.20(CH, C-23), 132.55(CH, C-22), 77.90(C, C-5), 67.80(CH, C-6), 67.55(C, C-8), 66.53(CH, C-3), 65.50(CH, C-7), 55.55(CH, C-17), 53.87(CH, C-14), 43.03(CH, C-24), 42.37(C, C-13), 40.85(C, C-10), 40.32(CH, C-20), 40.11(CH, C-9), 38.85(CH_2 , C-4), 38.02(CH_2 , C-12), 33.14(CH_3 , C-25), 32.21(CH_2 , C-1), 30.50(CH_2 , C-2), 27.64(CH_2 , C-16), 22.07(CH_2 , C-11), 21.24(CH_3 , C-21), 21.09(CH_2 , C-15), 20.12(CH_3 , C-26), 19.62(CH_3 , C-27), 18.91(CH_3 , C-19), 17.98(CH_3 , H-28), 12.60(CH_3 , C-18).

94K-1-4: mp. 152 -153 $^\circ\text{C}$; IR(KBr) 3450, 2950, 2920, 2860, 1730, 1235, 1030, 970 cm^{-1} ; ^1H NMR(CDCl_3 , 500MHz) δ 5.31(1H, ddd, 15.1, 6.8, 6.8, H-23), 5.19(1H, dd, 15.1, 8.3, H-22), 5.11(1H, d, 1.0, H-6), 5.03(1H, m, H-3), 4.52(1H, d, 2.5, H-5 OH), 3.56(1H, brs, H-7), 2.20(3H, s, OAc), 2.11(1H, dd, 11.2, 8.3, H-9), 2.06-1.98(3H, m, H-4 α , -12 β , -20), 2.00(3H, s, OAc), 1.95(1H, m, H-2 α), 1.91(1H, dd, 12.7, 7.3, H-14), 1.89(1H, m, H-16), 1.82(2H, m, H-24), 1.72(2H, m, H-11 α , -16), 1.79(1H, m, H-11 β), 1.76(1H, ddd, 13.4, 3.4, 3.4, H-1 β), 1.57(1H, m, H-25), 1.51(1H, ddd, 12.7, 2.5, 2.5, H-4 β), 1.46(1H, m, H-1 α), 1.41(1H, m, H-15), 1.39(1H, m, H-2 β), 1.33(1H, m, H-12 α), 1.25(1H, m, H-17), 1.12(1H, m, H-15), 1.10(3H, s, H-19), 1.03(3H, d, 6.4, H-21), 0.86(6H, d, 6.7, H-26, -27), 0.75(3H, s, H-18); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125MHz) δ 170.77(C, OAc), 170.23(C, OAc), 137.21(CH_2 , C-22), 127.01(CH_2 , C-23), 76.52(C, C-5), 70.10(CH, C-6), 69.64(CH, C-3), 66.62(C, C-8), 62.32(CH, C-7), 55.50(CH, C-17), 53.75(CH, C-14), 42.40(C, C-13), 41.91(CH_2 , C-24), 41.54(C, C-10), 40.18(CH, C-20), 39.94(CH, C-9), 37.96(CH_2 , C-12), 35.34(CH_2 , C-4), 31.83(CH_2 , C-1), 28.50(CH, C-25), 27.42(CH_2 , C-16), 26.82(CH_2 , C-2), 22.31(CH_3 , C-26), 22.29(CH_3 , C-27), 21.99(CH_2 , C-11), 21.37(CH_3 , OAc), 21.18(CH_2 , C-15), 20.97(CH_3 , C-21), 19.23(CH_3 , C-19), 12.68(CH_3 , C-18).

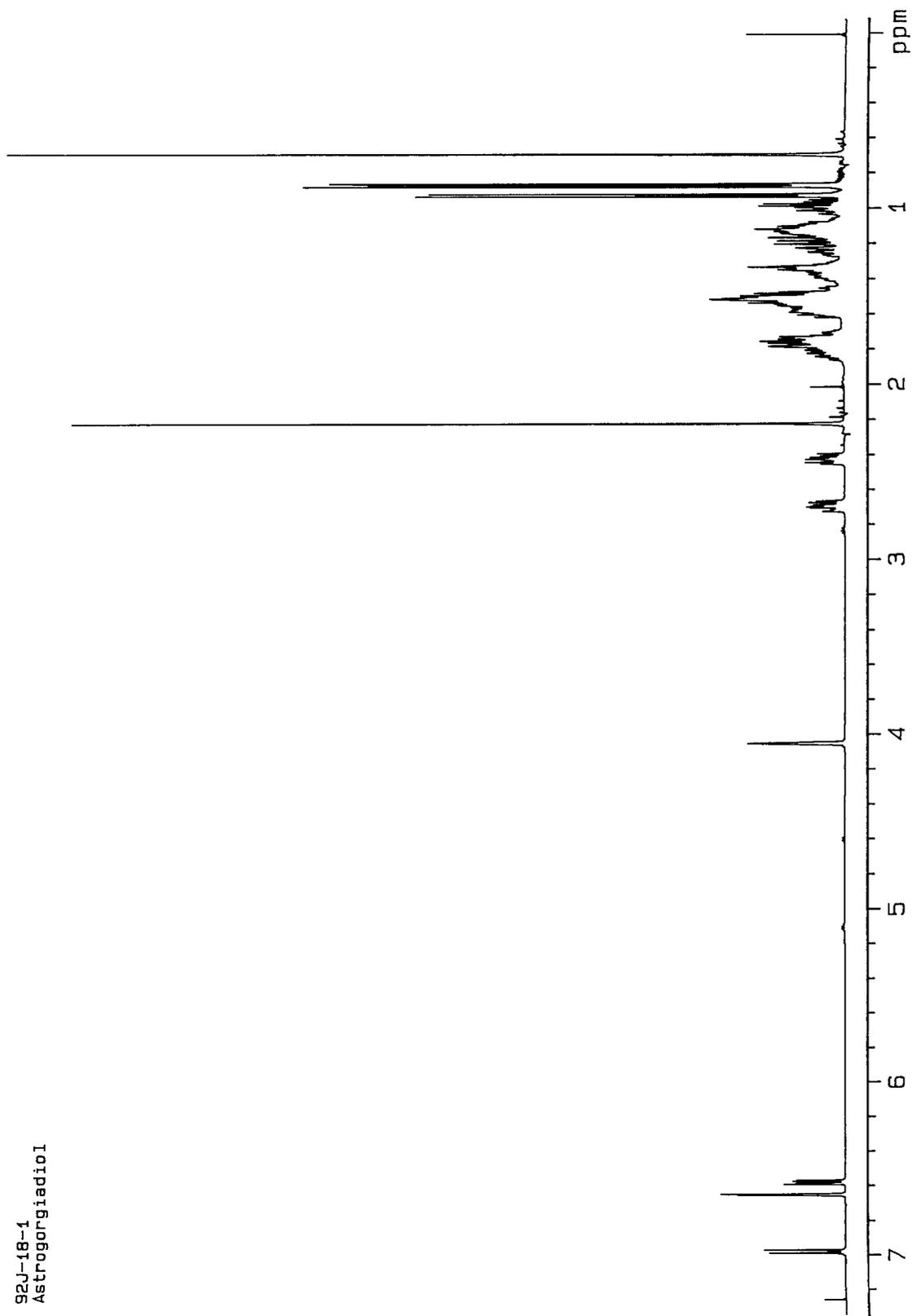


Fig. 2-12. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-1

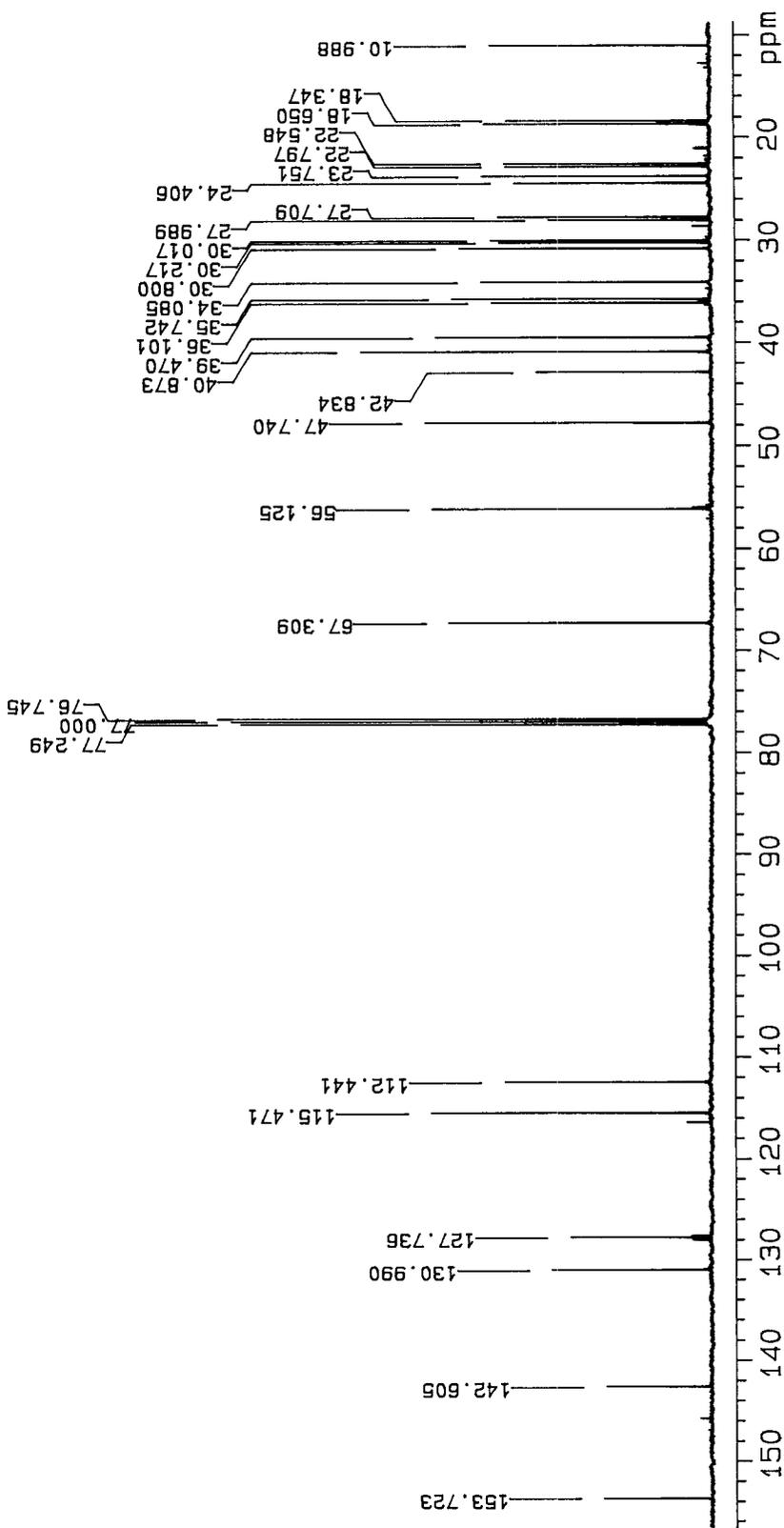


Fig. 2-13. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-1

92J-18-1
Astrogorgiadiol
Cosy45

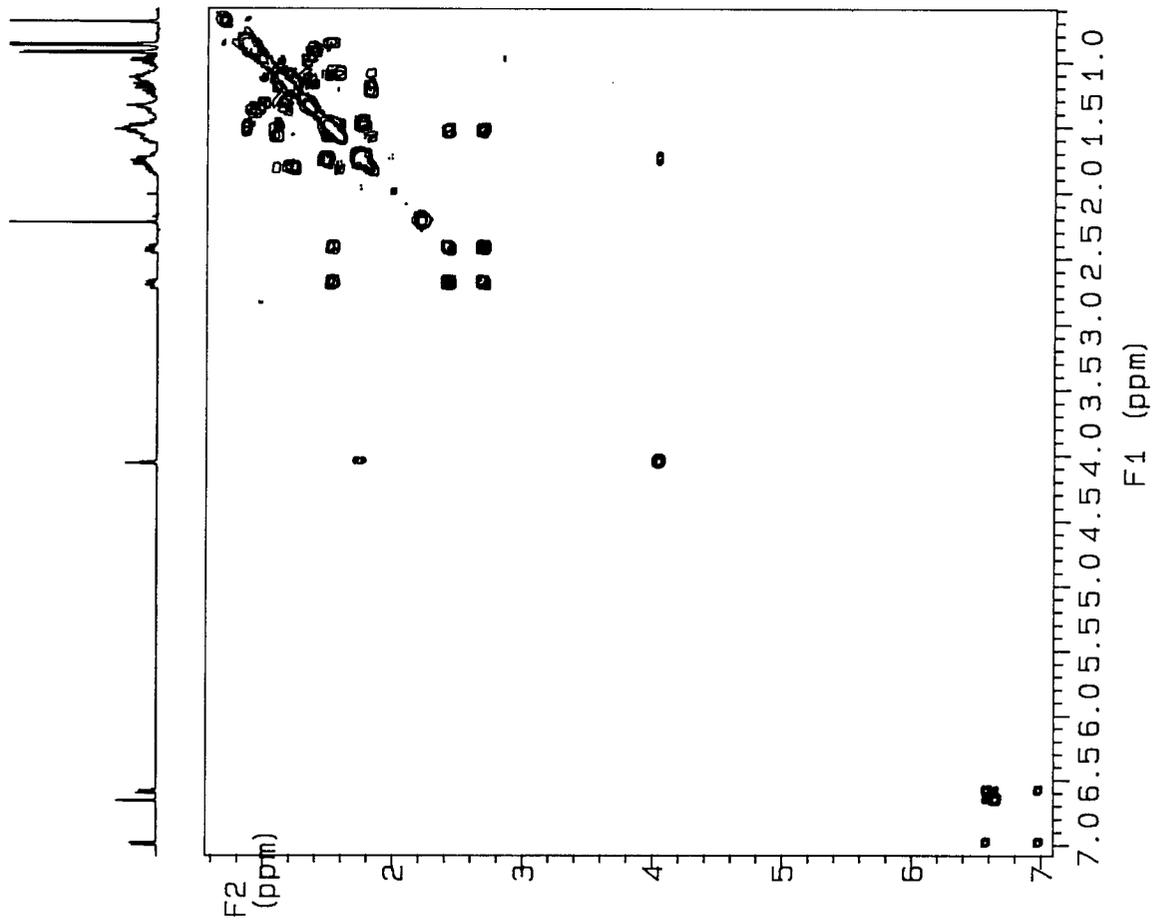


Fig. 2-14. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-1

92J-18-1
Astrogorgiadiol
HMQC

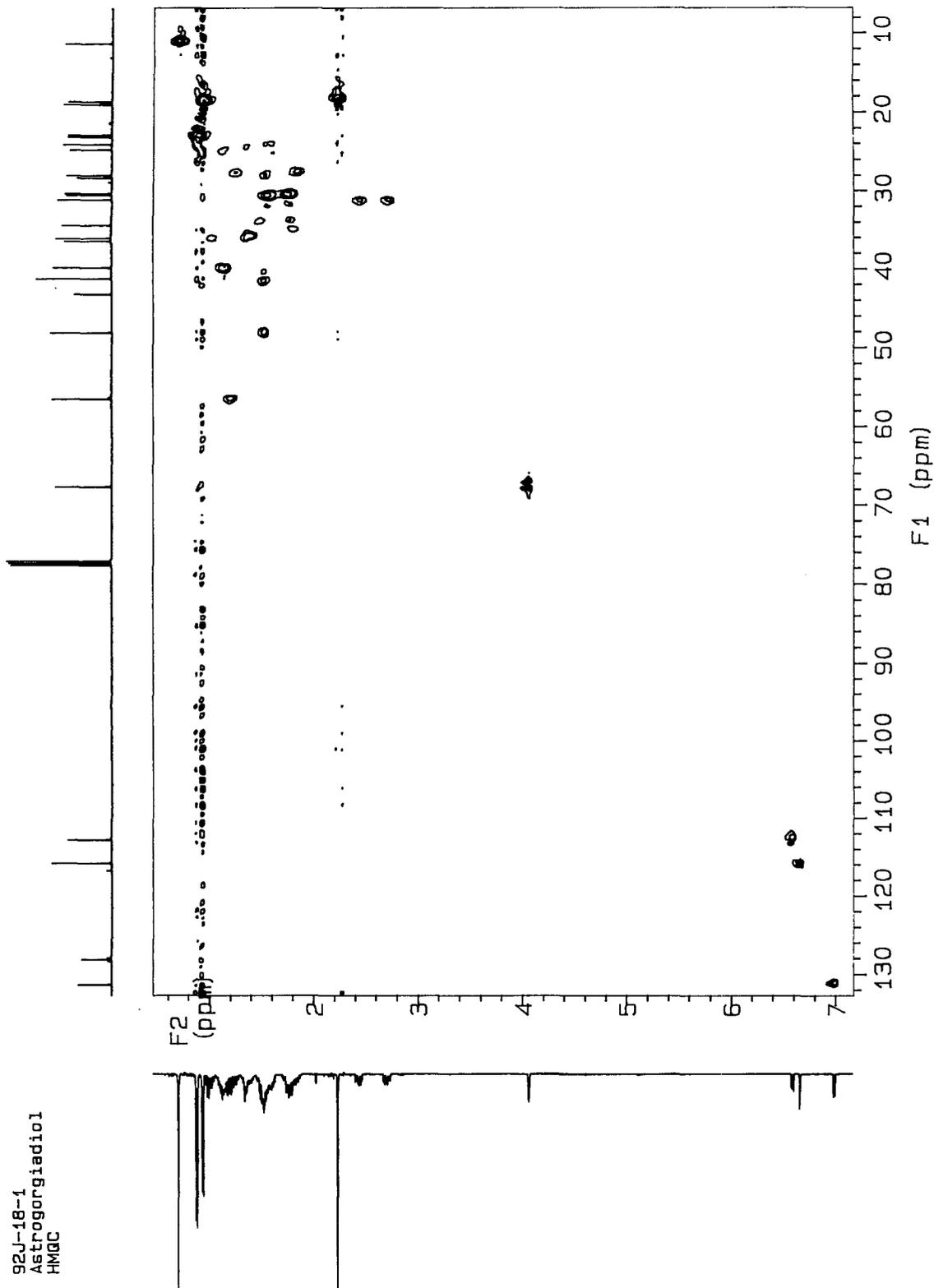
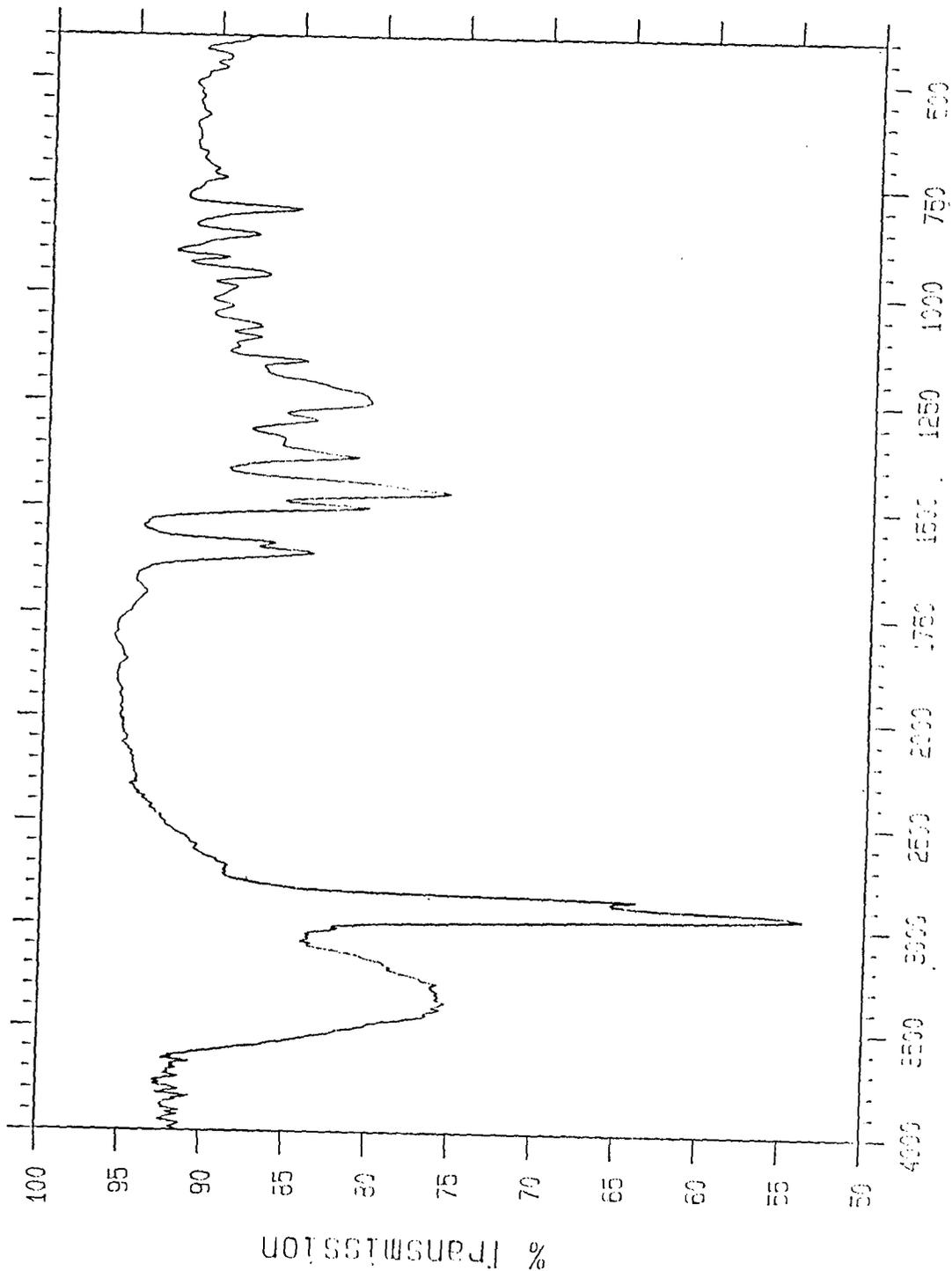


Fig. 2-15. HMQC spectrum of compound 92J-18-1

Mattson Instruments FTIR



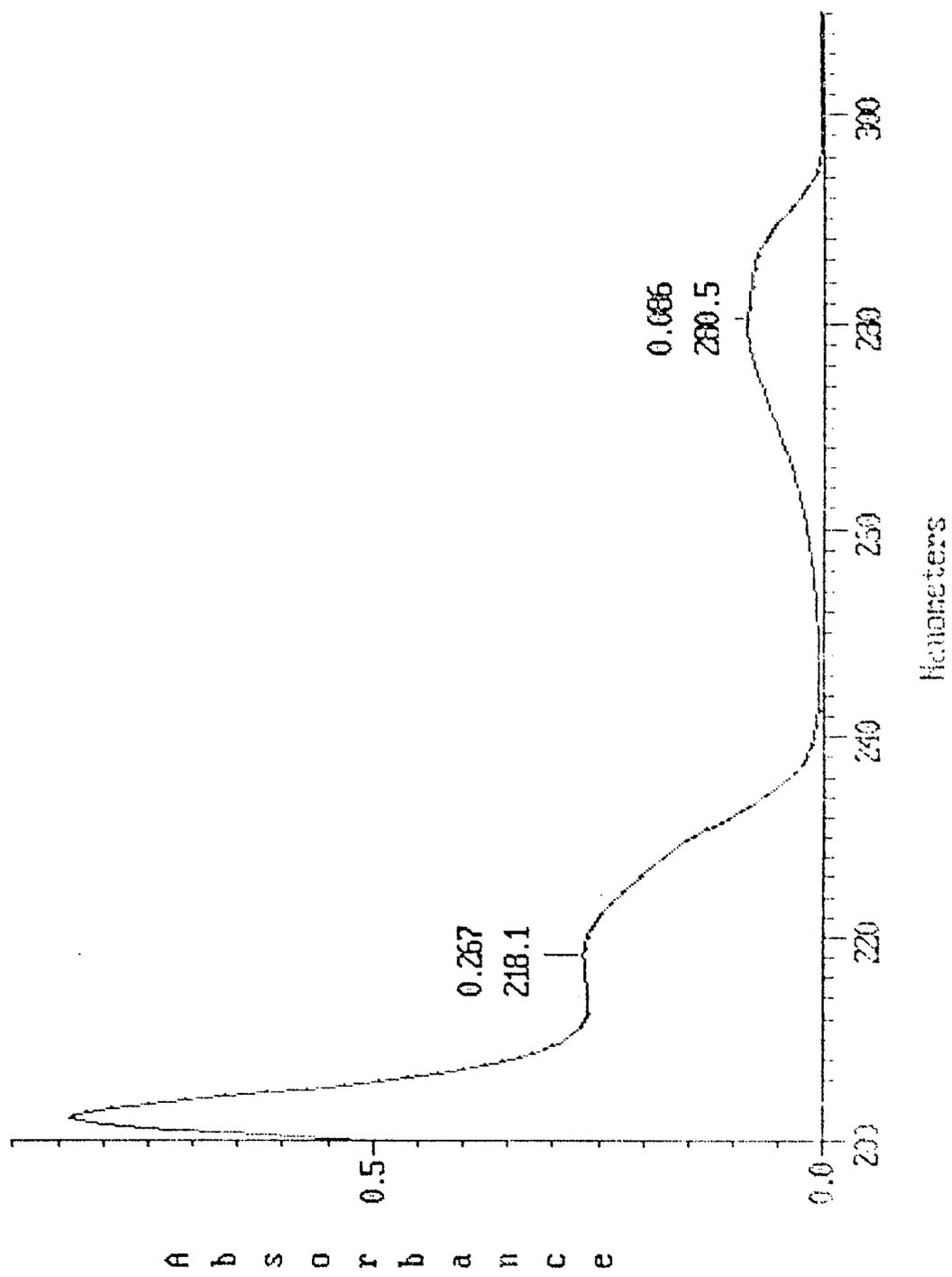


Fig. 2-17. UV spectrum of compound 92J-18-1

File: 12229405B Ident: 75 Mer Def 0.25 Acq: 22-DEC-1994 14:25:55 +3:47 Cal: 12229401B_1
 70S EI+ Magnet BpM: 134 BpI: 516353 TIC: 2604765 Flags: HALL
 File Text: SHIN (KORDI) 92J-18-C 50EV

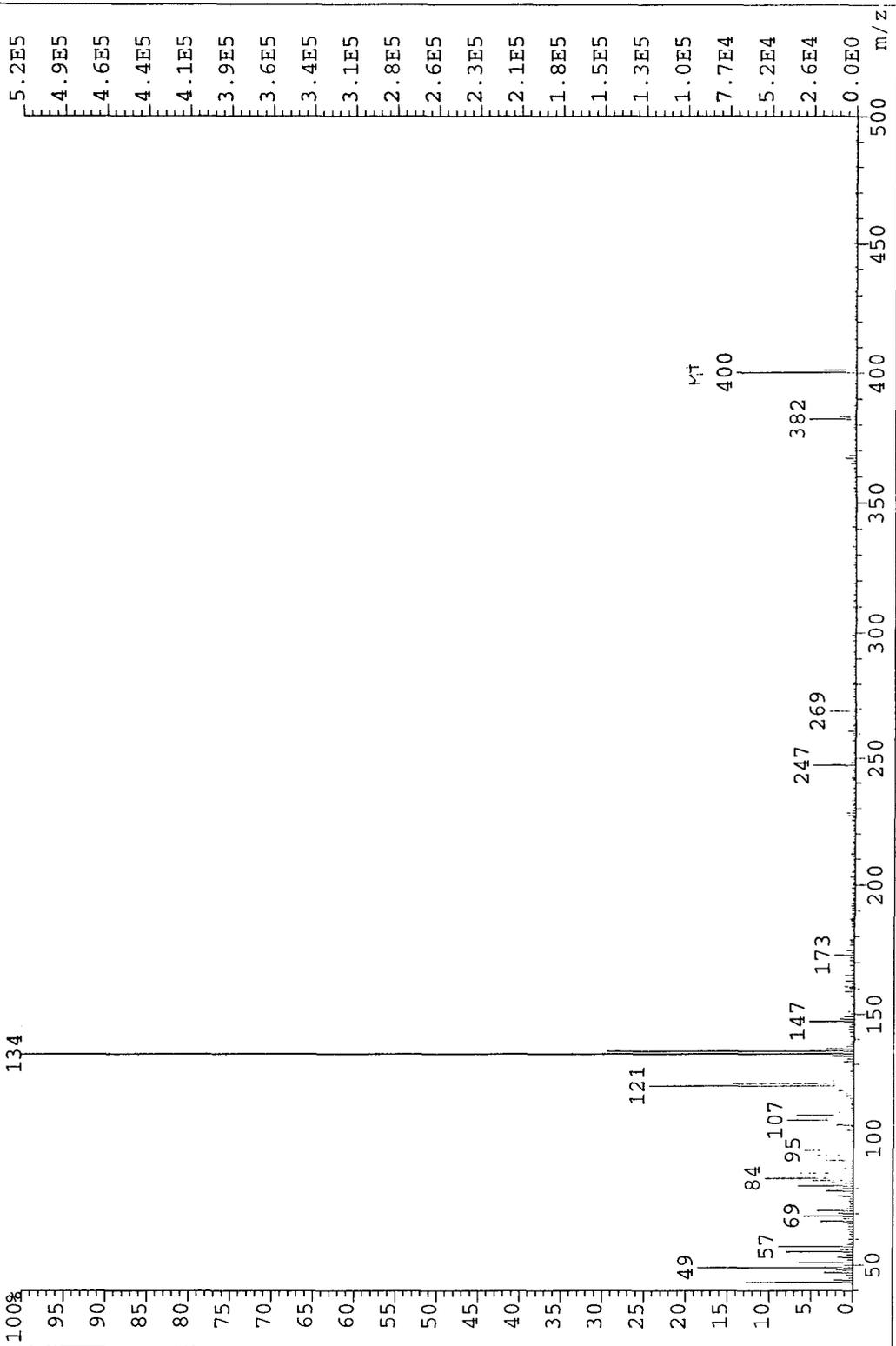


Fig. 2-18. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-1

92J-18-2
Calicoferol C

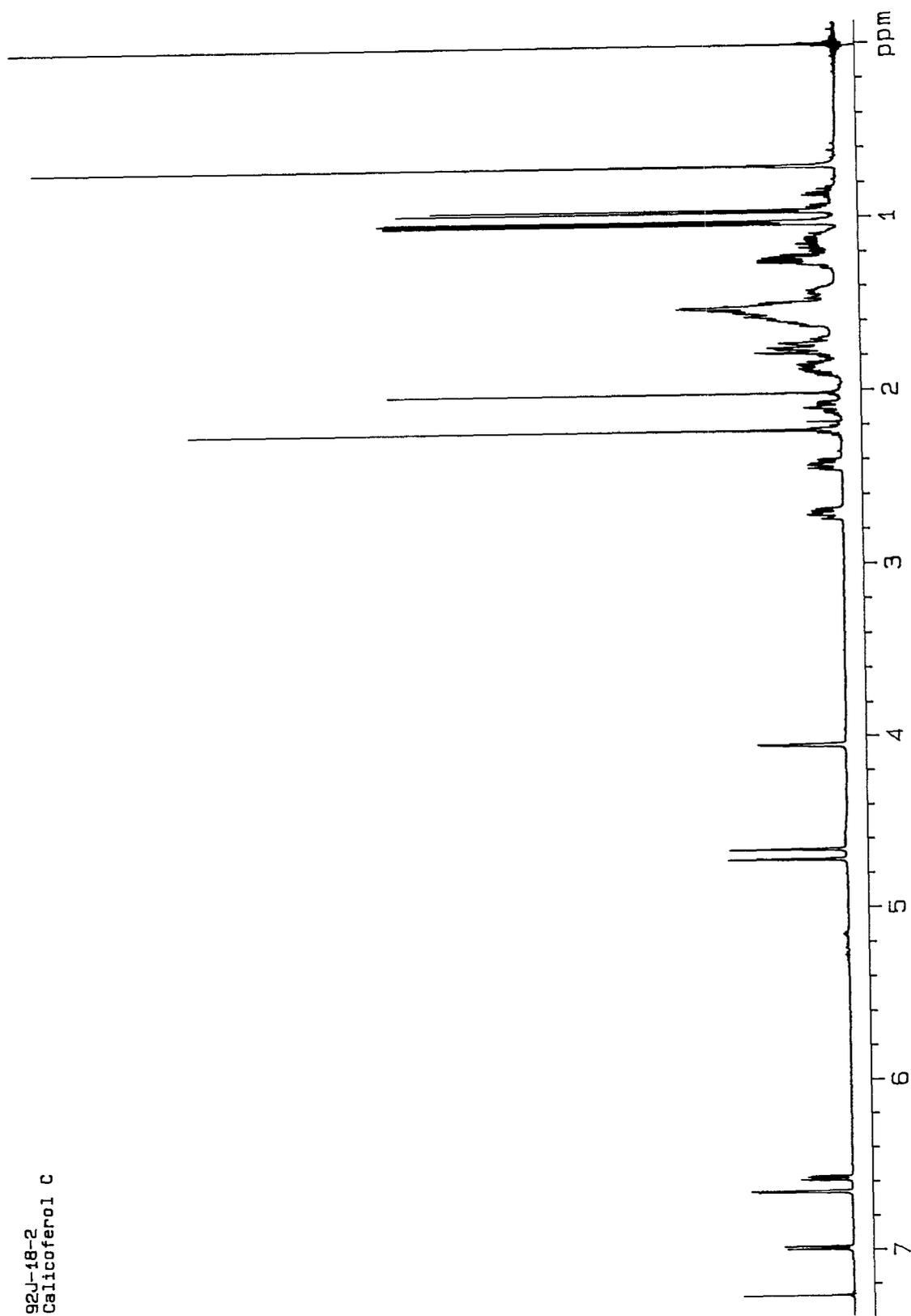


Fig. 2-19. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-2

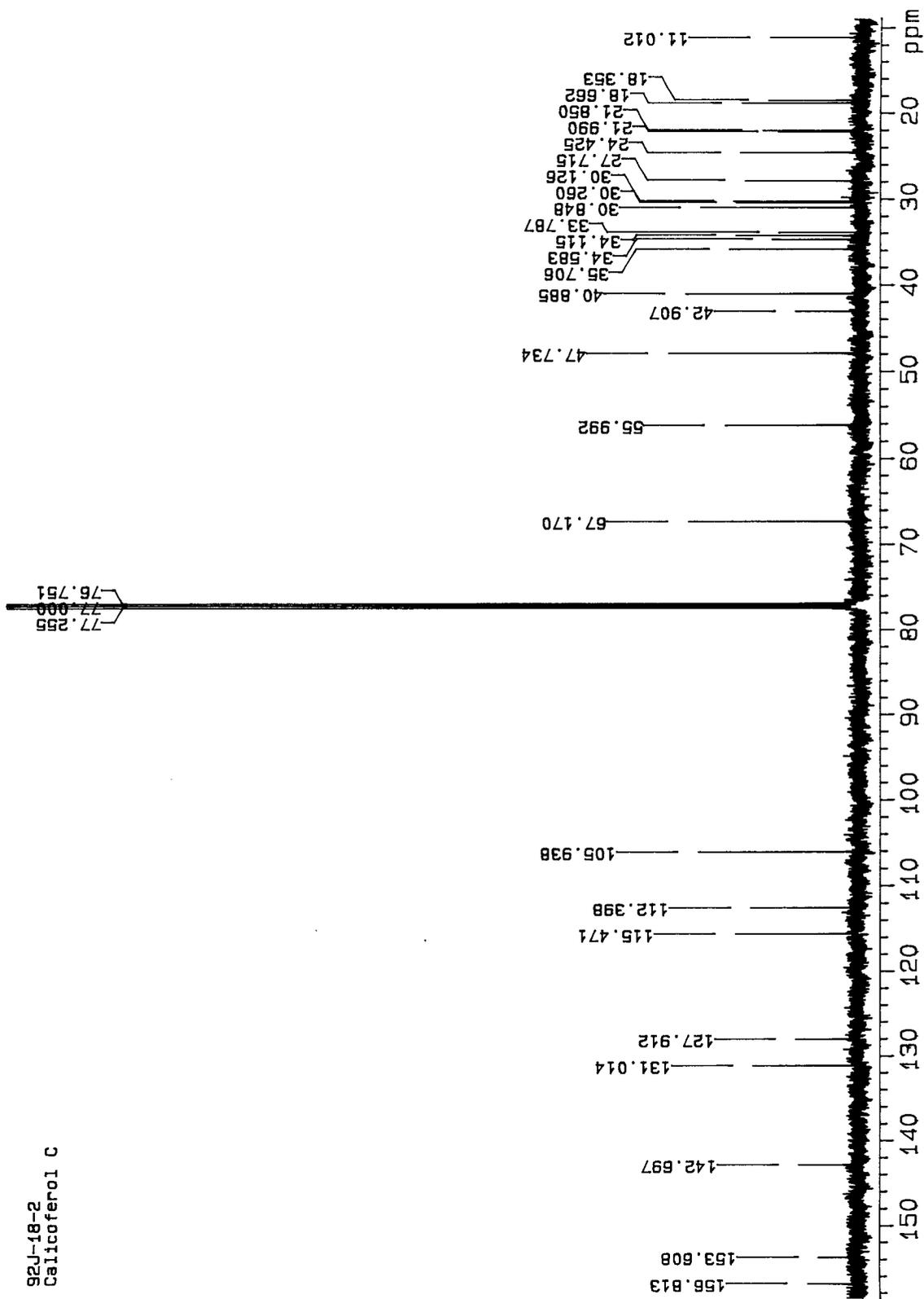
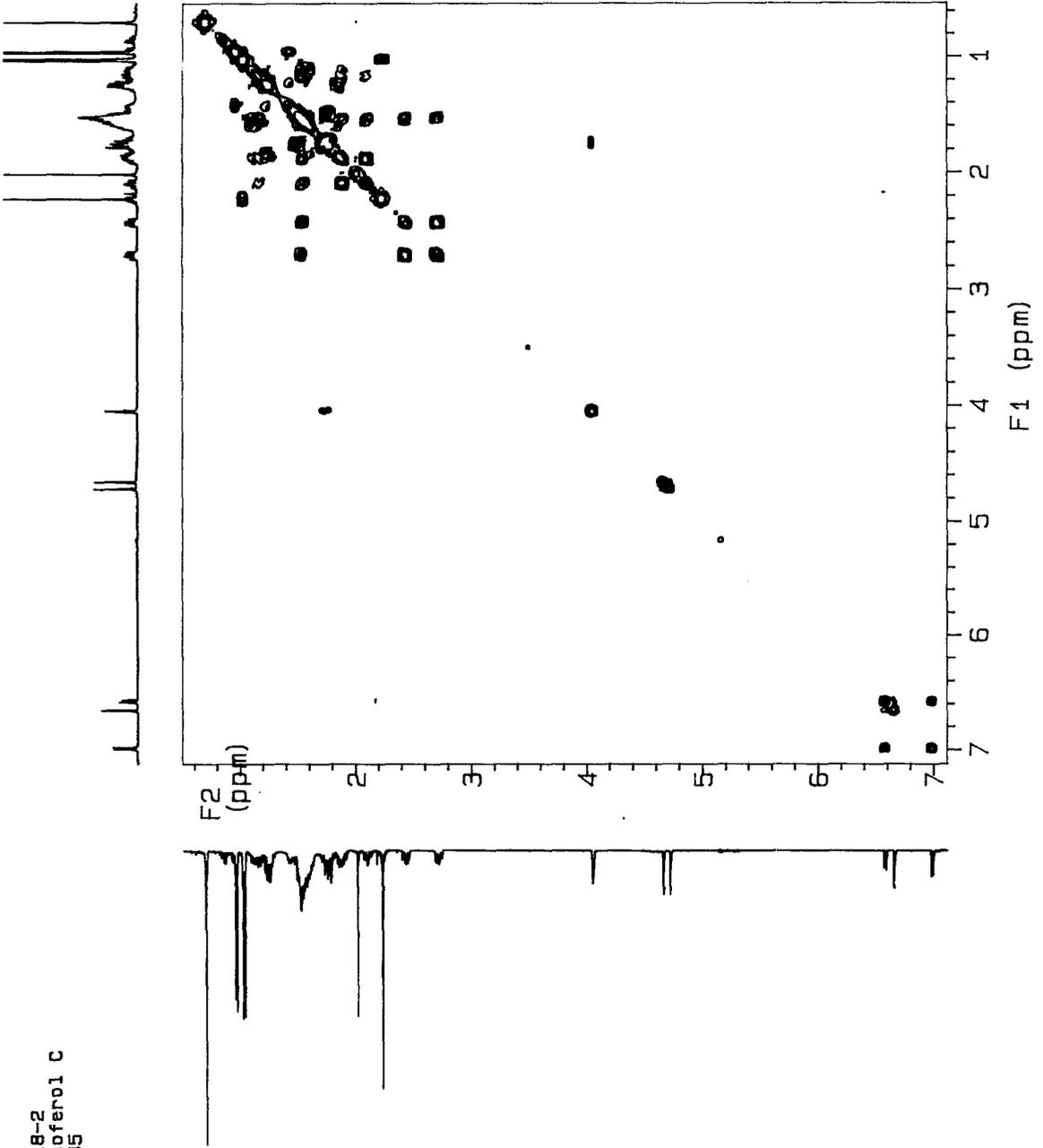


Fig. 2-20. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-2

92J-18-2
Calicoferol C
Cosy45



92J-18-2
Calicoferol C
TOCSY

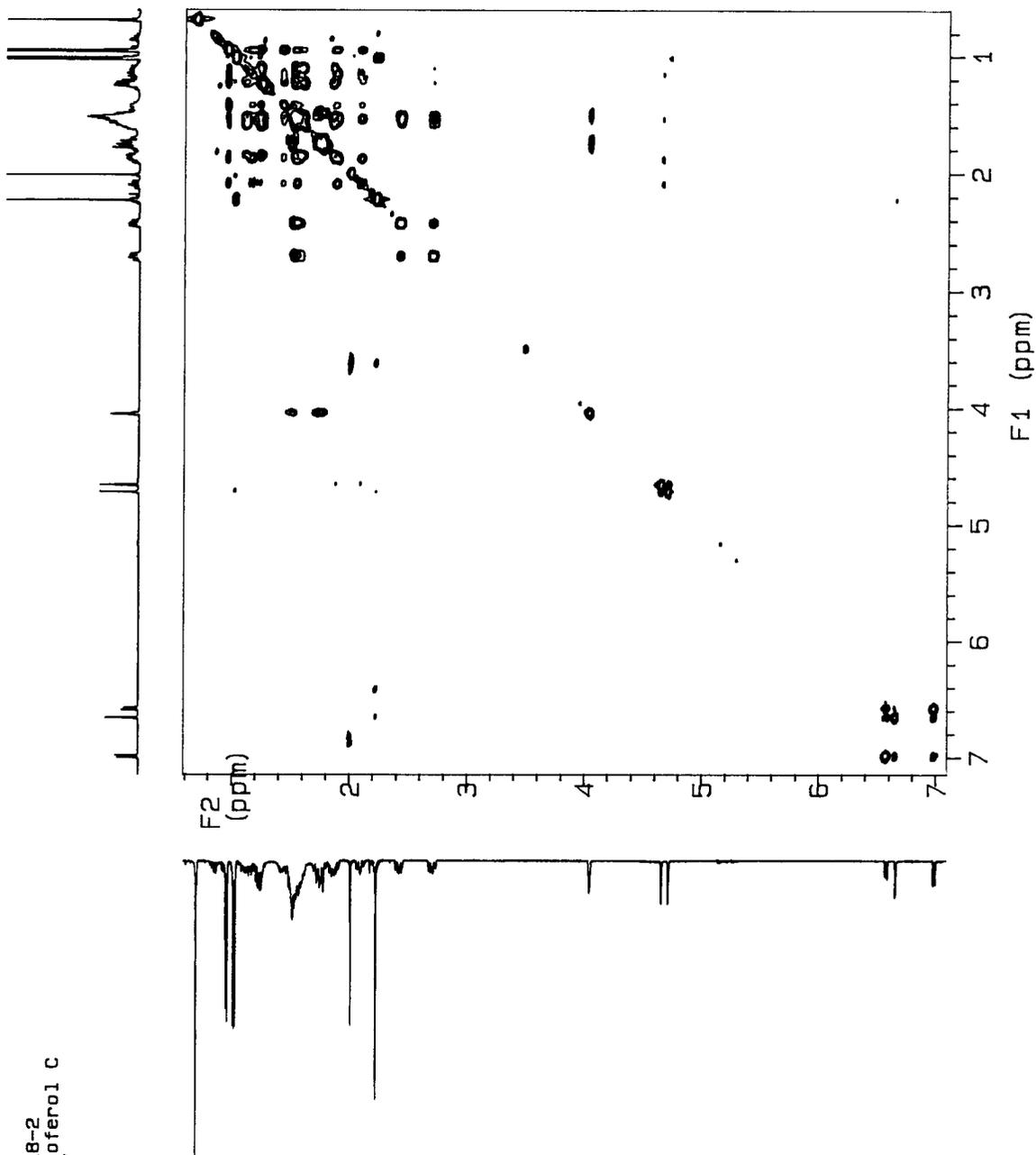


Fig. 2-22. TOCSY spectrum of compound 92J-18-2

92J-18-2
Calicoferol C
HMQC

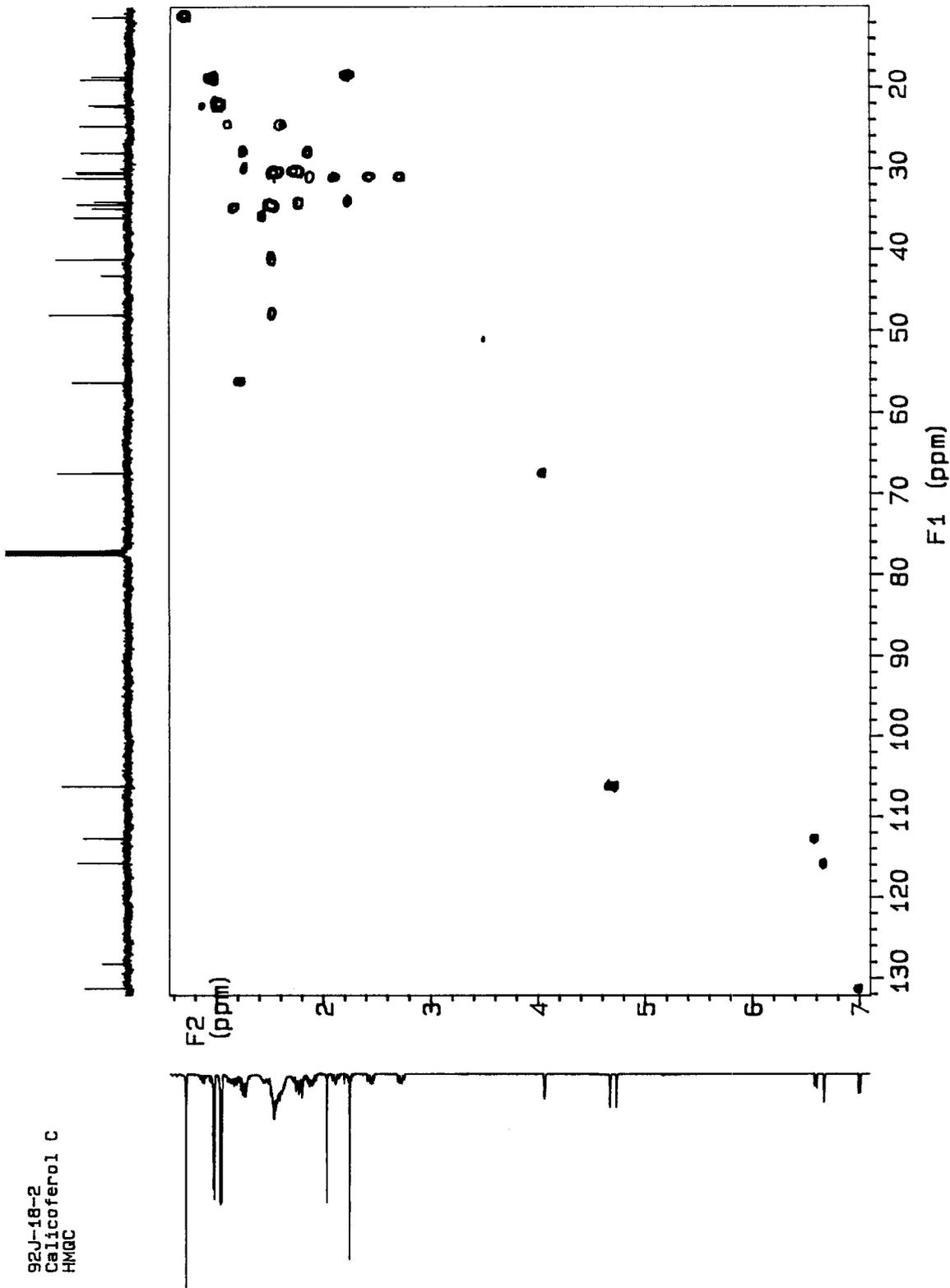


Fig. 2-23. HMQC spectrum of compound 92J-18-2

92J-18-2
Calicoferol C
HMBC
Upfield

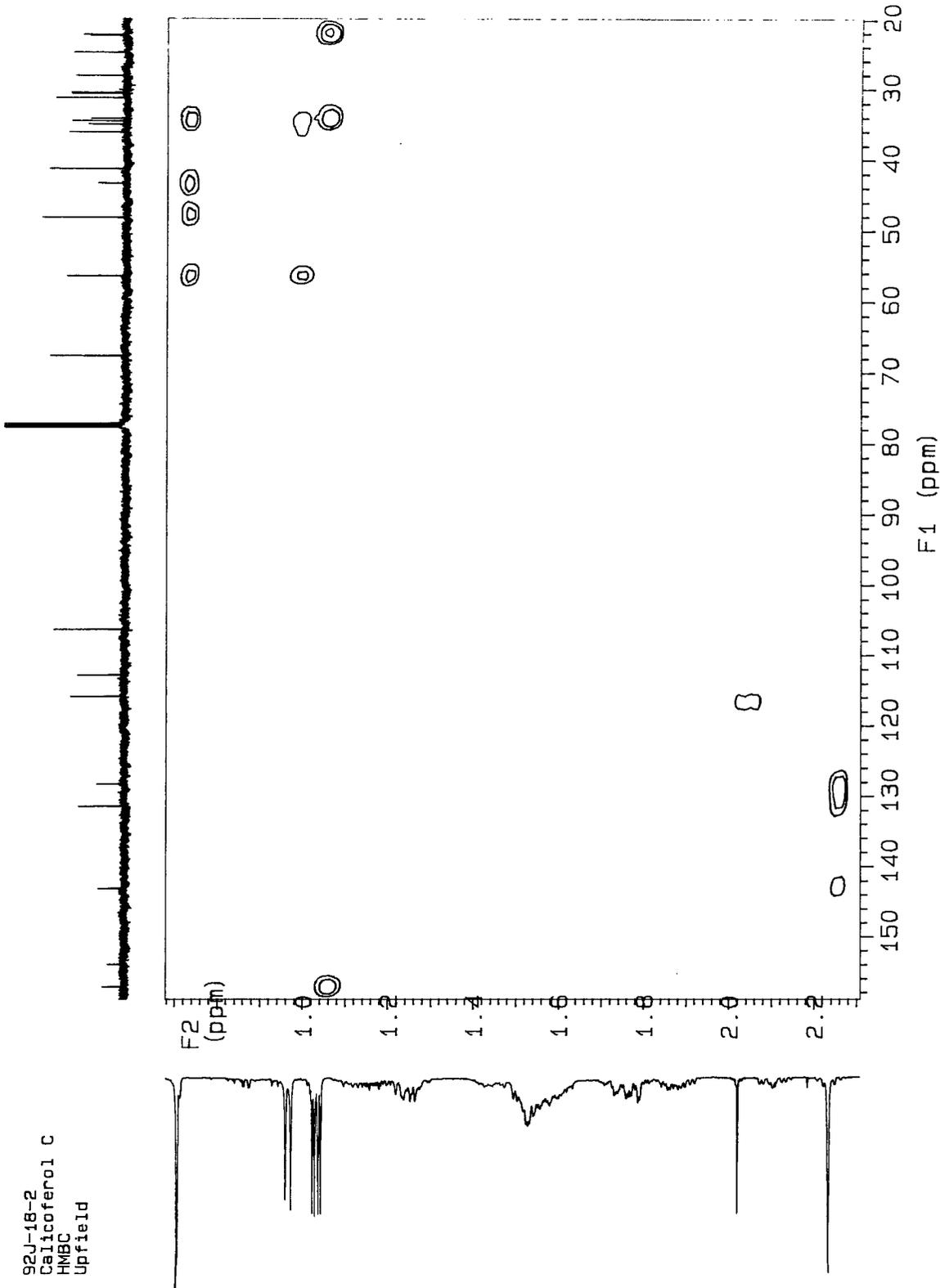
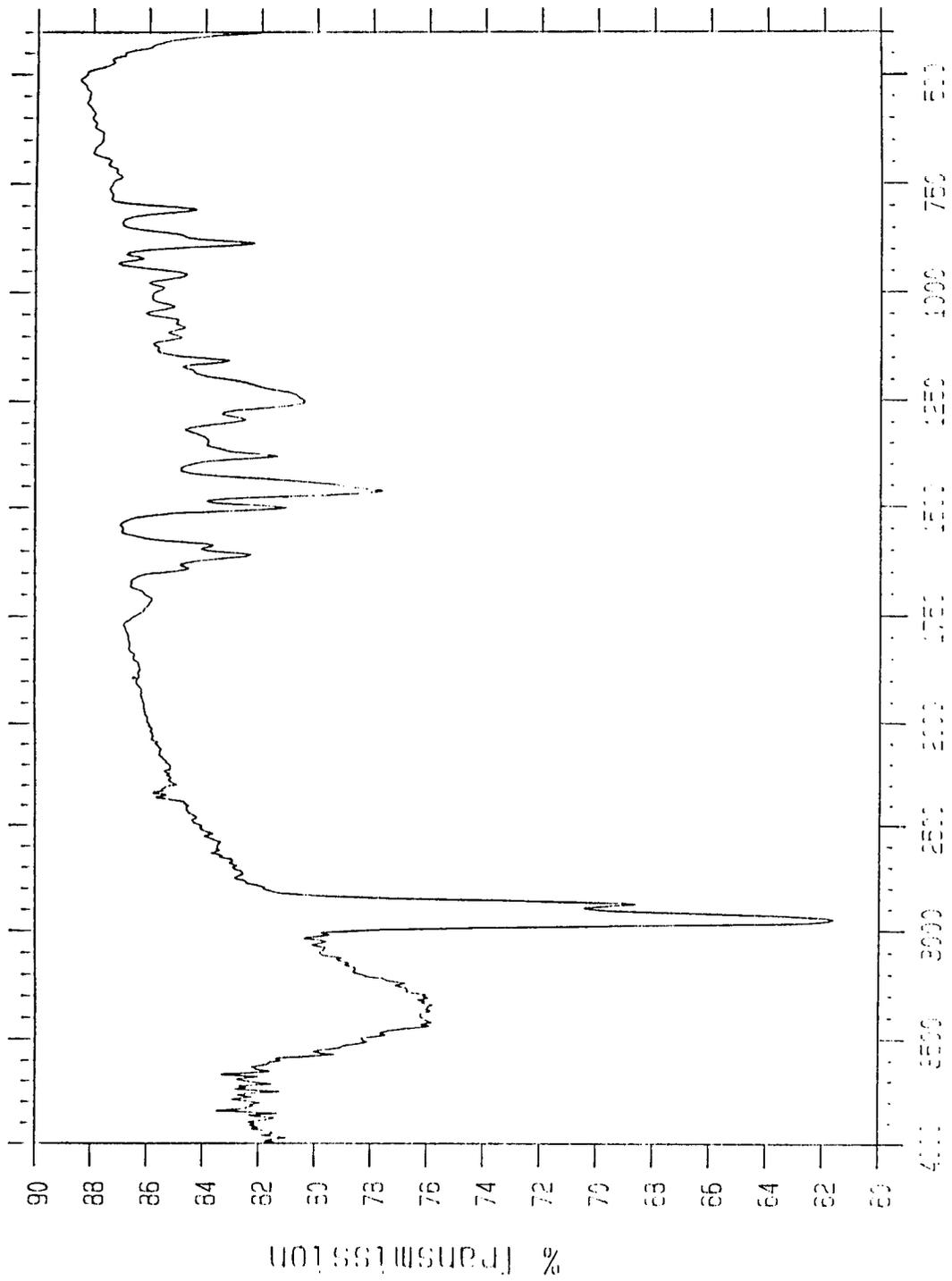


Fig. 2-24. HMBC spectrum of compound 92J-18-2



Wavenumber

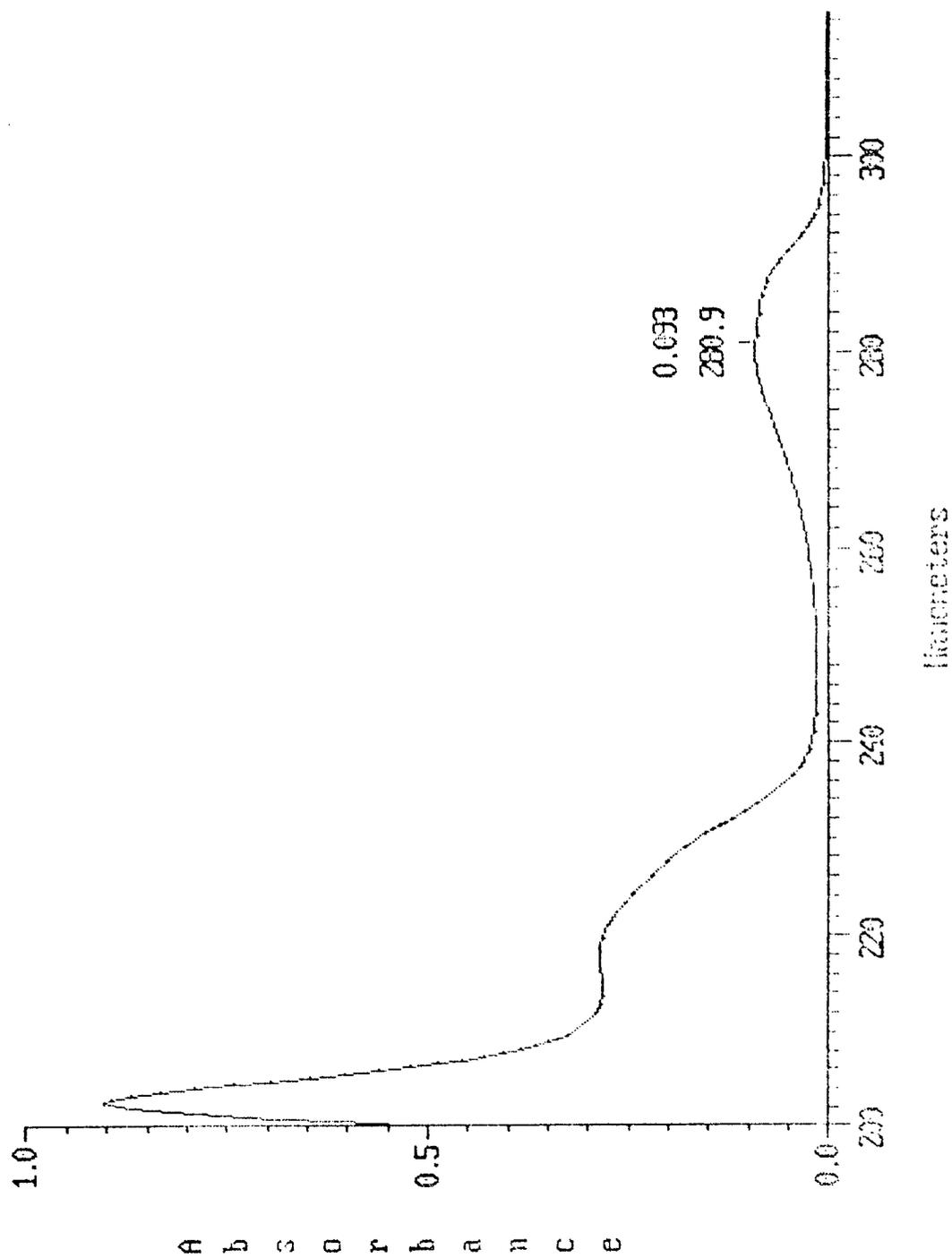


Fig. 2-26. UV spectrum of compound 92J-18-2

File:12219409B Ident:52 Mer Def 0.25 Acq:21-DEC-1994 10:55:41 +2:38 Cal:12219401B_1
 70S EI+ Magnet BpM:134 BpI:61691 TIC:724301 Flags:HALL
 File Text:Shin (KORDI) 92J-18-D 50EV
 100%

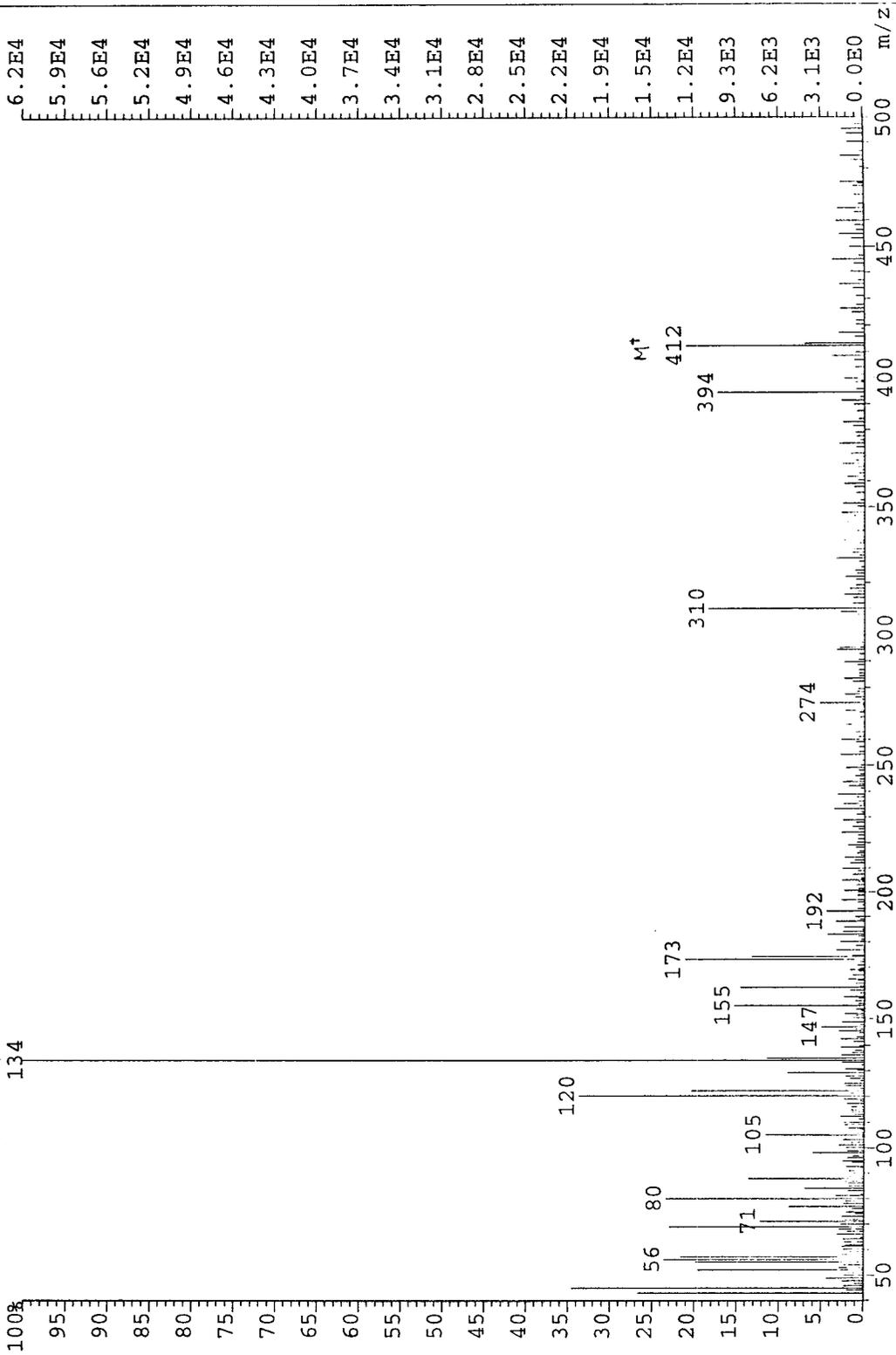


Fig. 2-27. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-2

92J-18-3
Calicoferol D

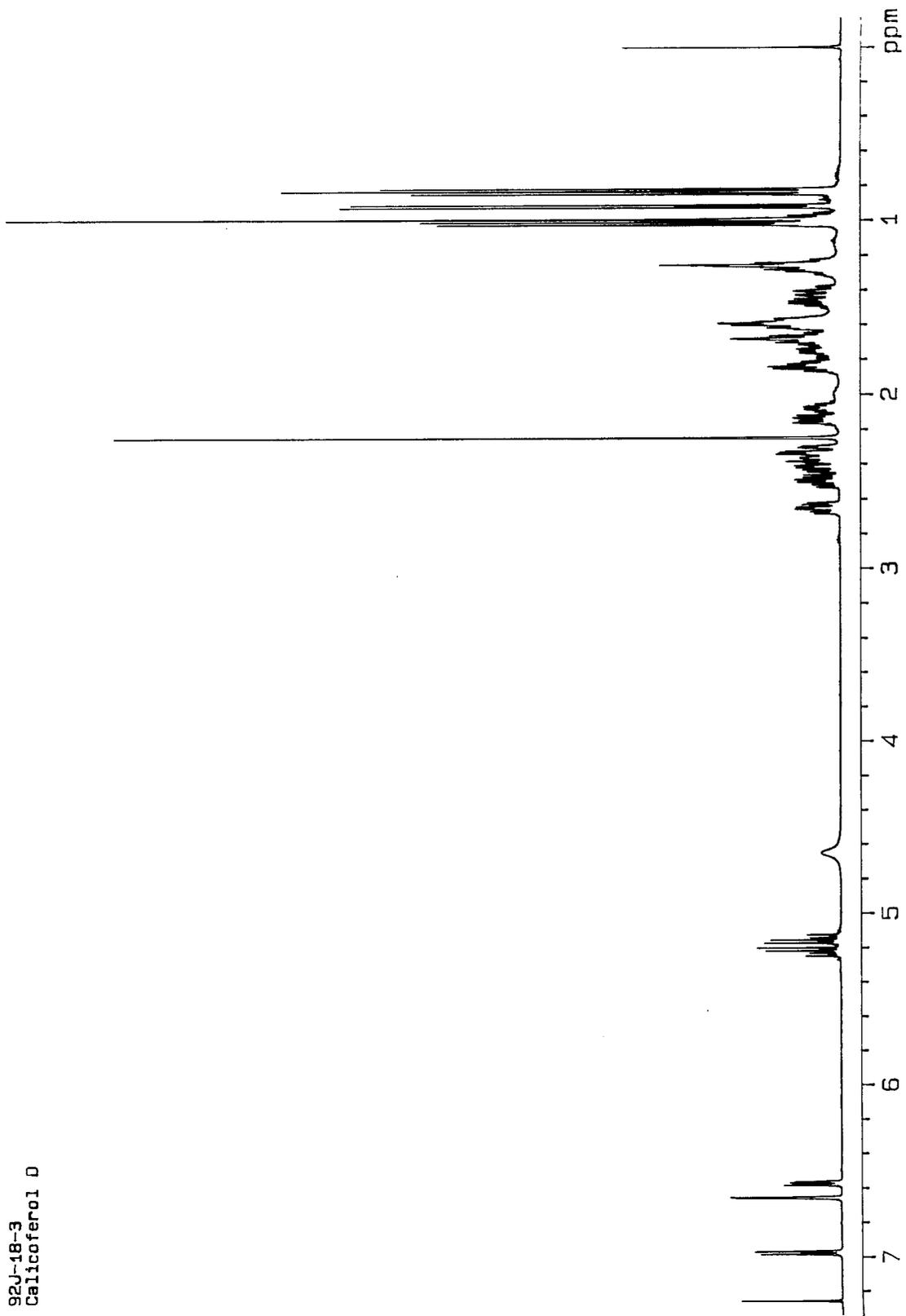


Fig. 2-28. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-3

92J-18-3
Calicoferol D

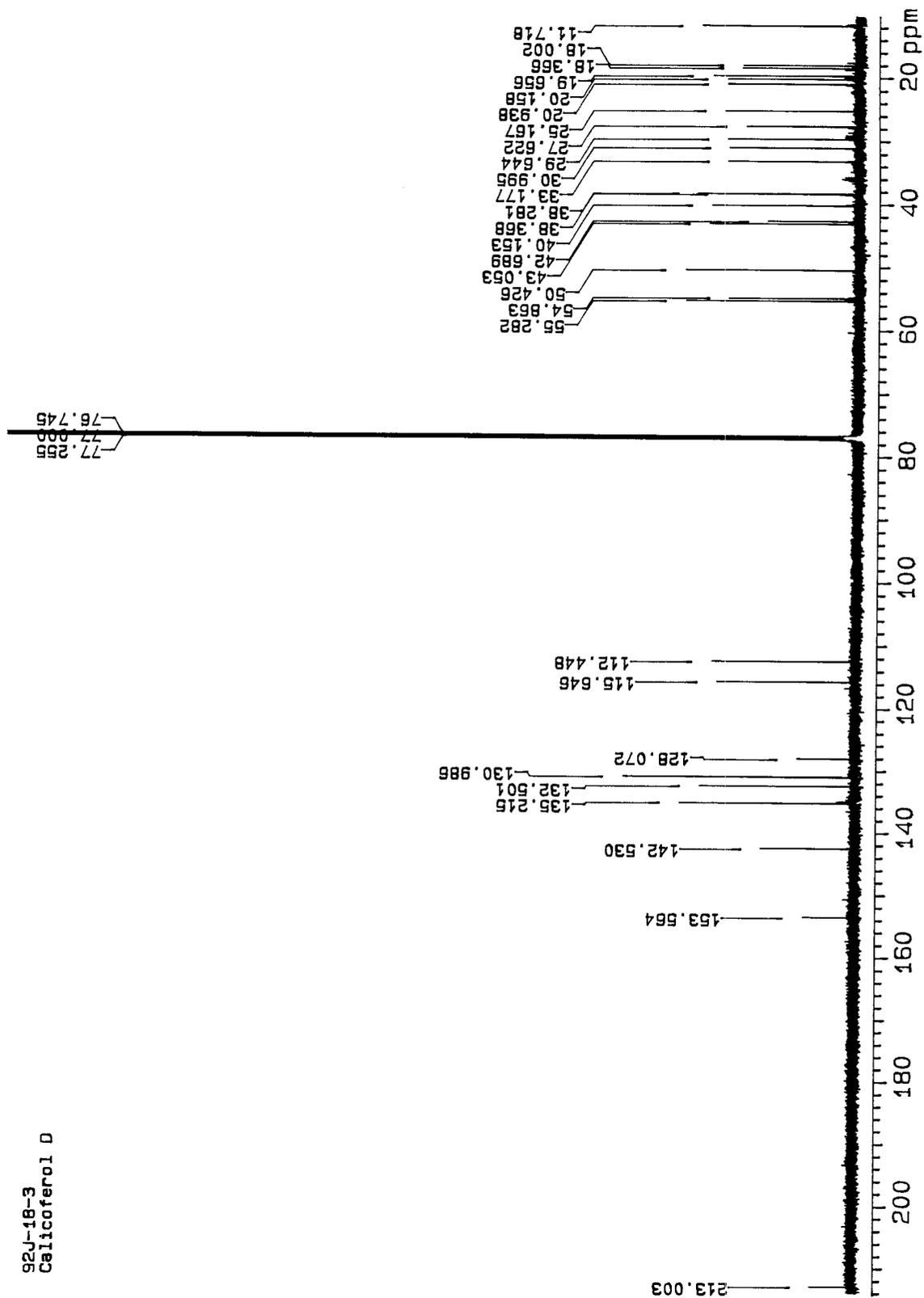


Fig. 2-29. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-3

92J-18-3
Calicoferol D
Cosy45

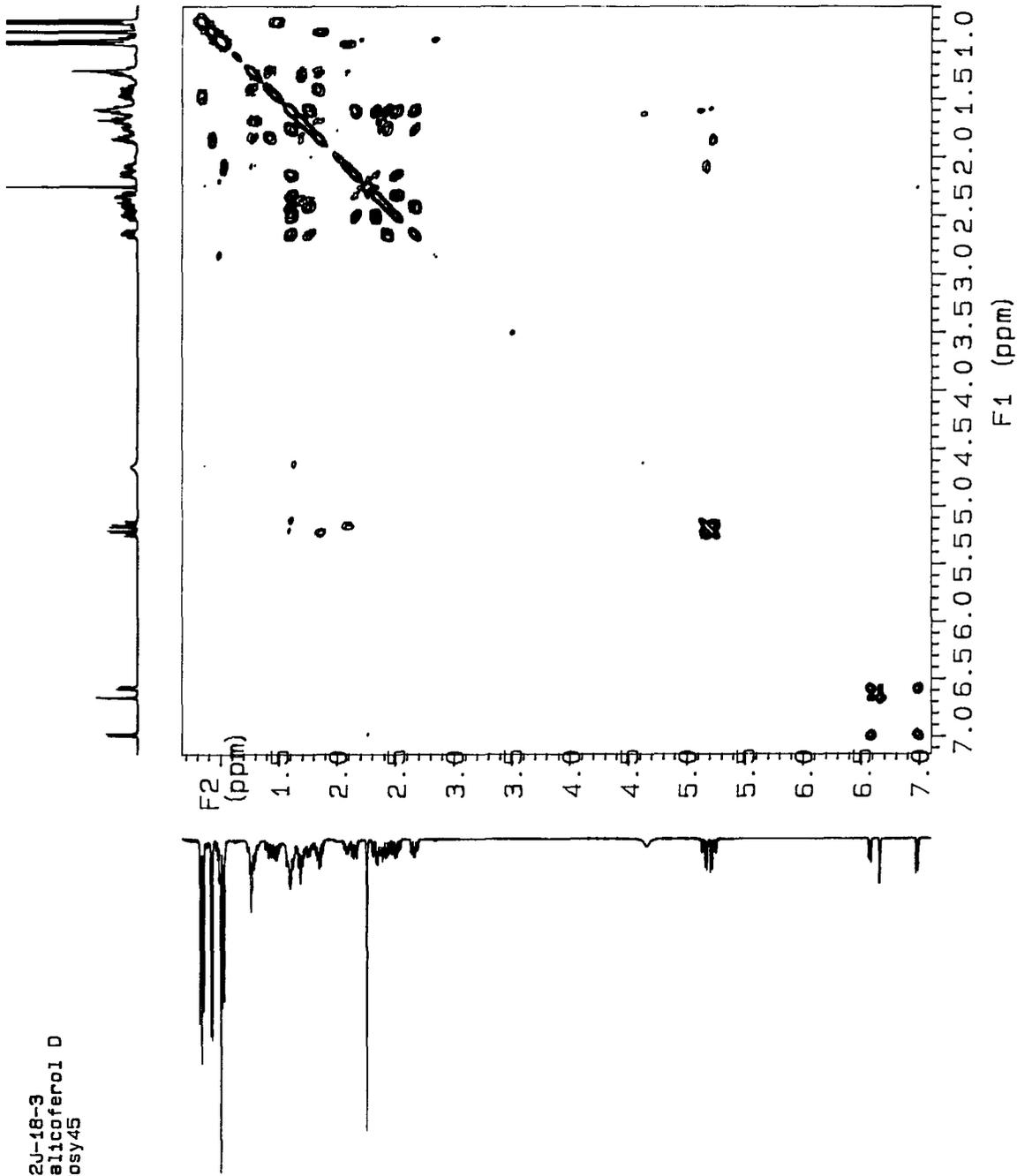


Fig. 2-30. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-3

92J-18-3
Cellicoferol D
TOCSY

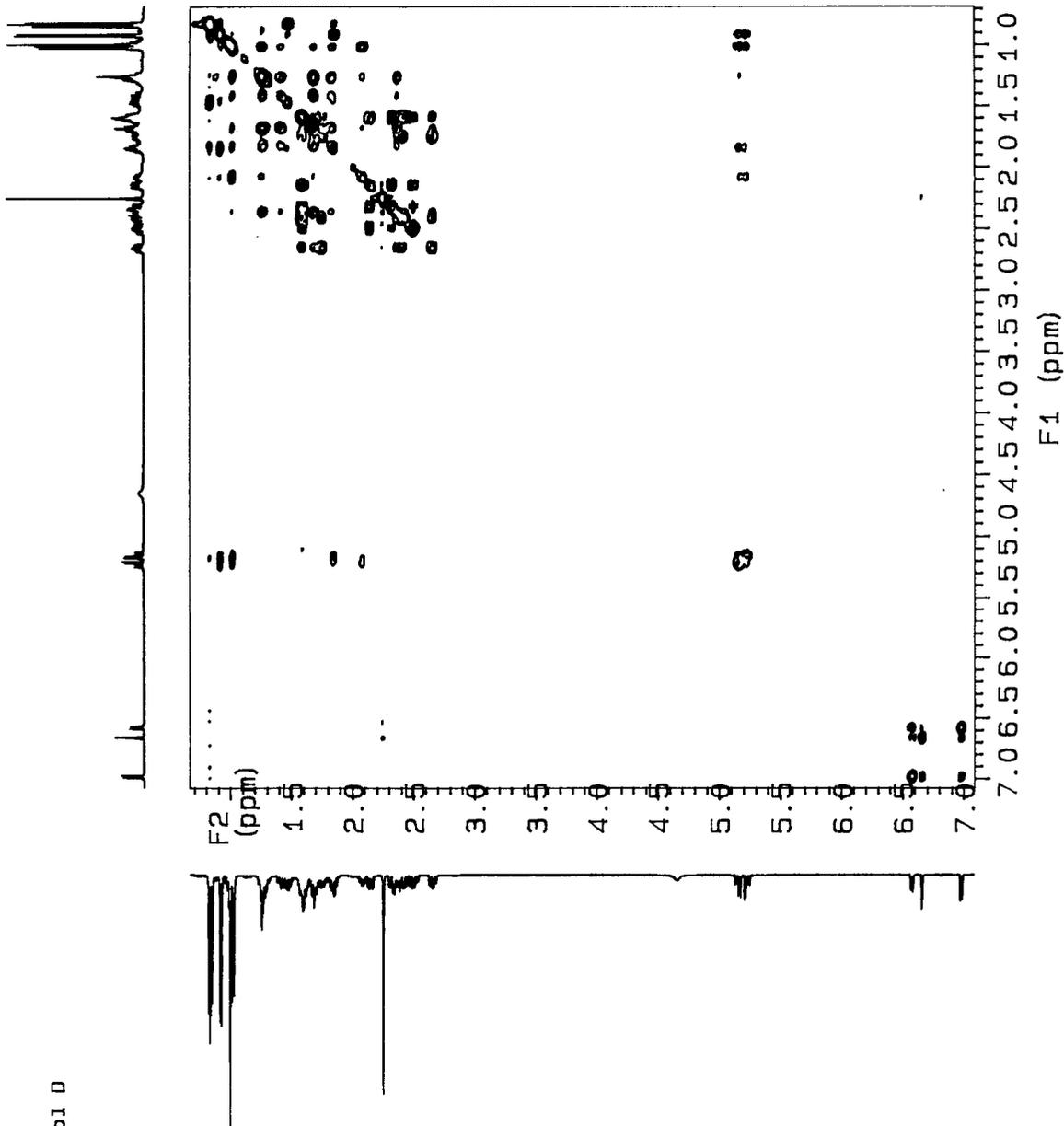


Fig. 2-31. TOCSY spectrum of compound 92J-18-3

92J-18-3
Calicoferol D
HMBC

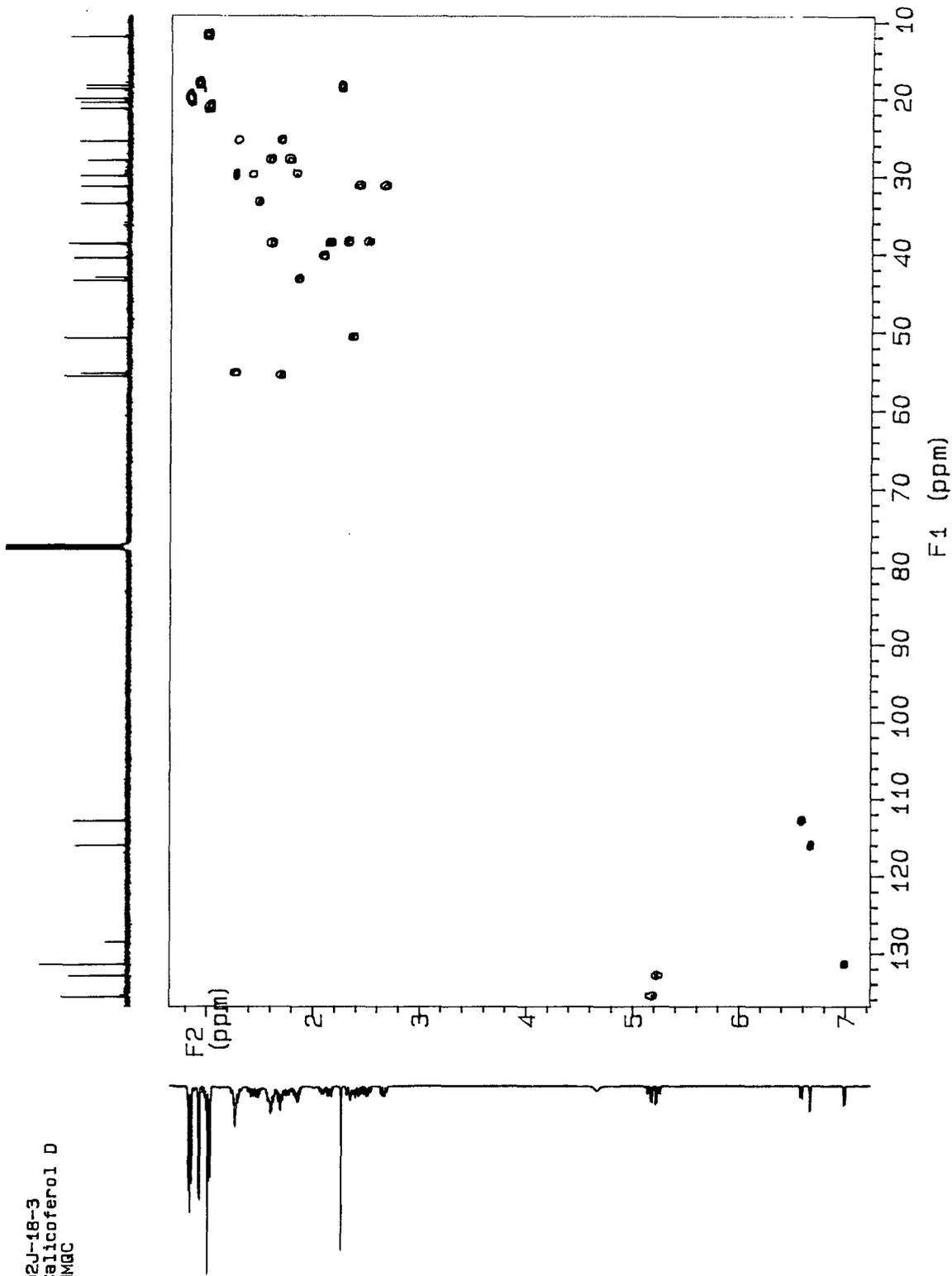


Fig. 2-32. HMBC spectrum of compound 92J-18-3

92J-18-3
Calicoferol D
HMBC
Upfield

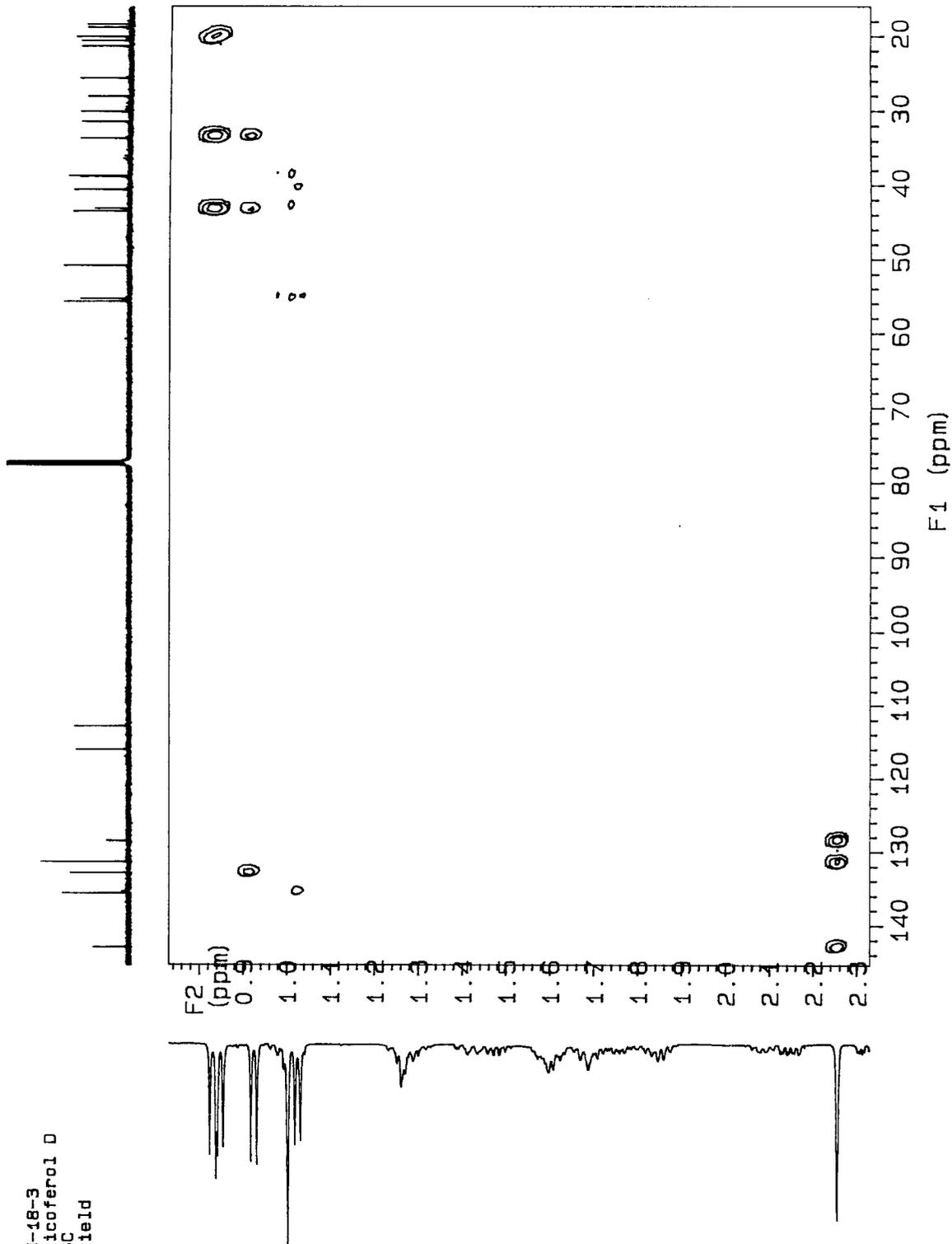
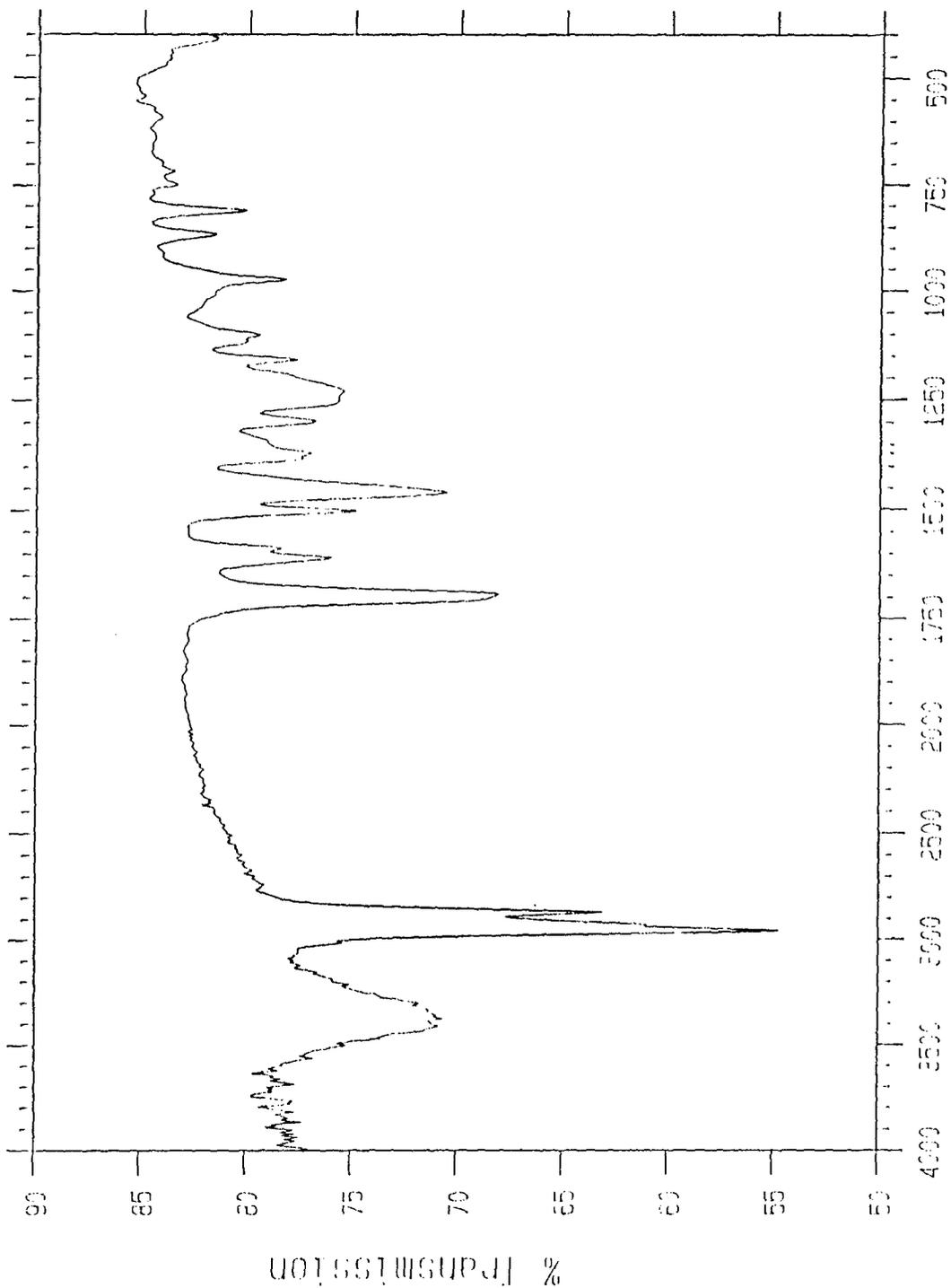


Fig. 2-33. HMBC spectrum of compound 92J-18-3

Mattson Instruments FTIR



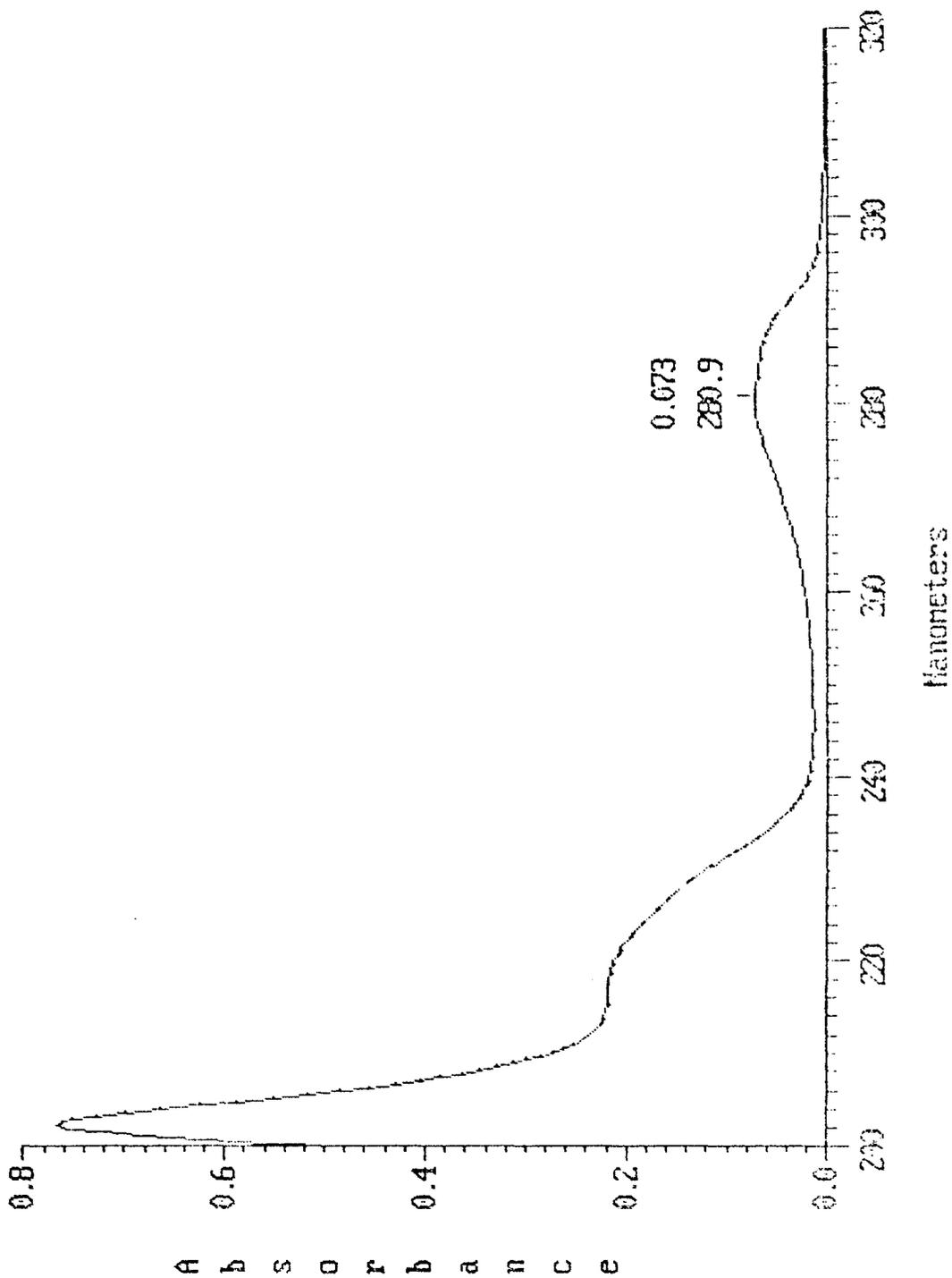


Fig. 2-35. UV spectrum of compound 92J-18-3

File: 12229407B Ident: 81 Mer Def 0.25 Acq: 22-DEC-1994 15:25:11 +4:03 Cal: 12229401B_1
 70S EI+ Magnet BpM: 134 BpI: 407626 TIC: 5303275 Flags: HALL
 File Text: Shin (KORDI) 92J-18-B 50EV

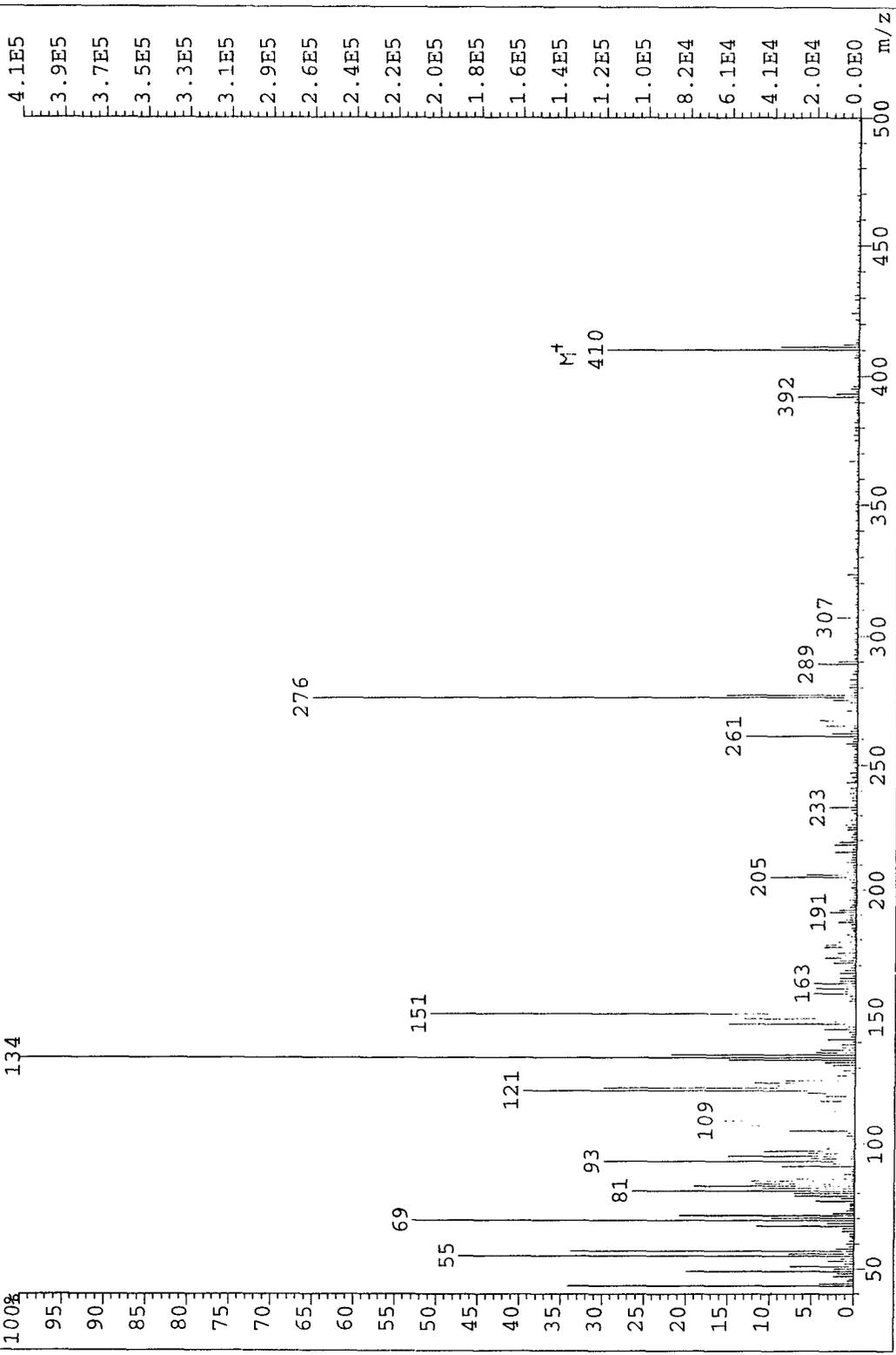


Fig. 2-36. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-3

92J-18-4
Calicoferol E

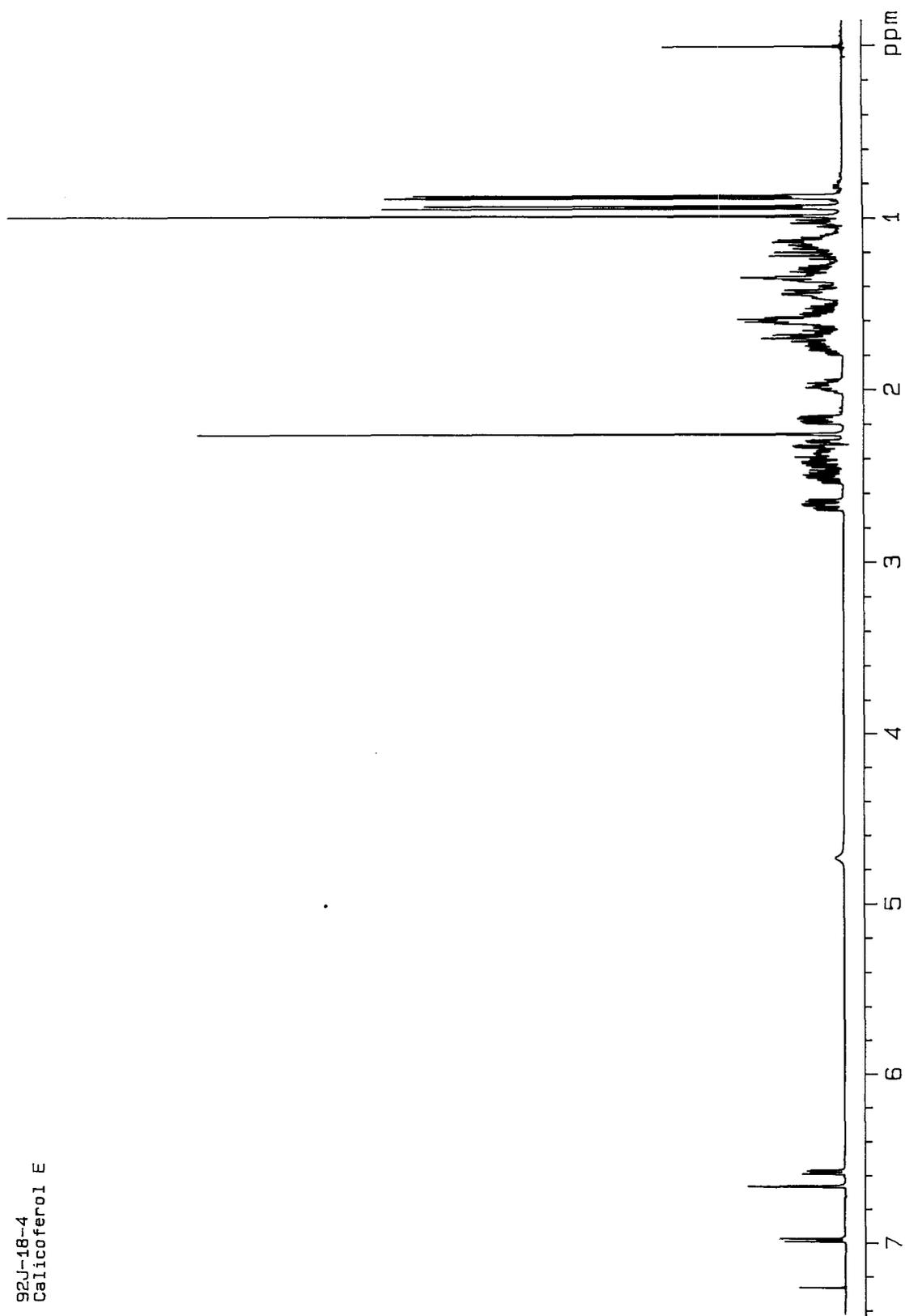


Fig. 2-37. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-4

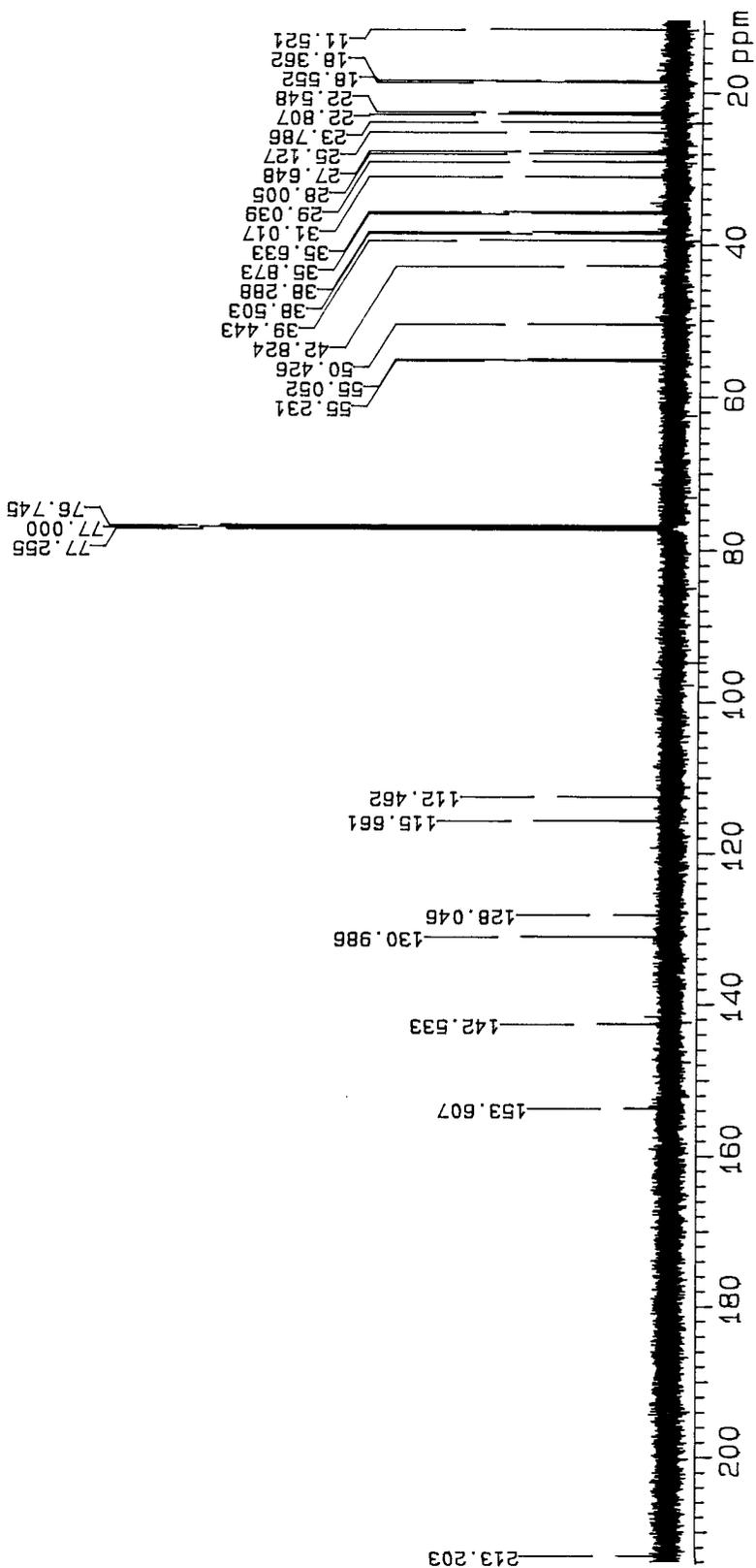


Fig. 2-38. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-4

92J-18-4
Calicoferol E
Cosy45

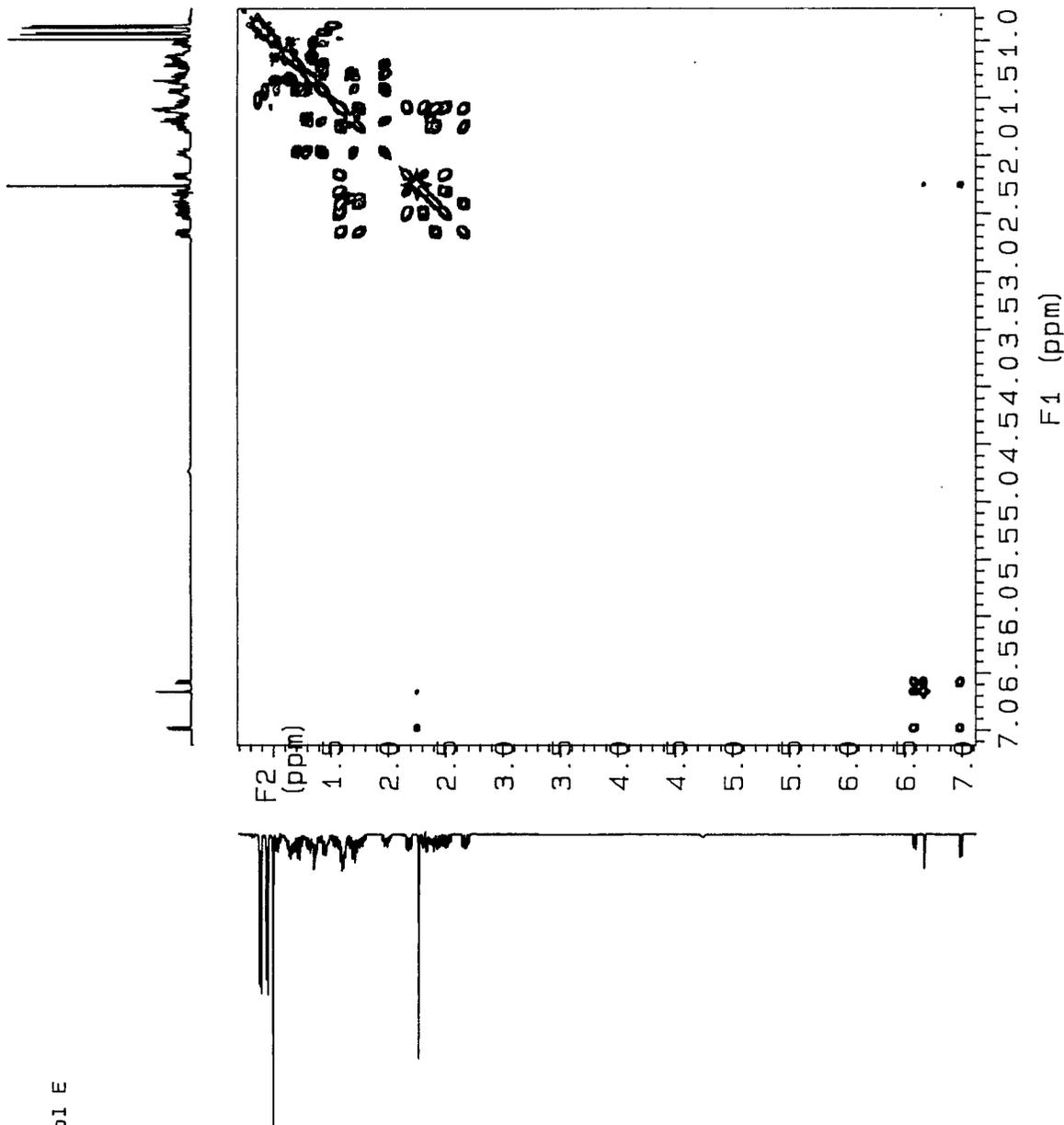


Fig. 2-39. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-4

92J-18-4
Calicoferol E
HMGC

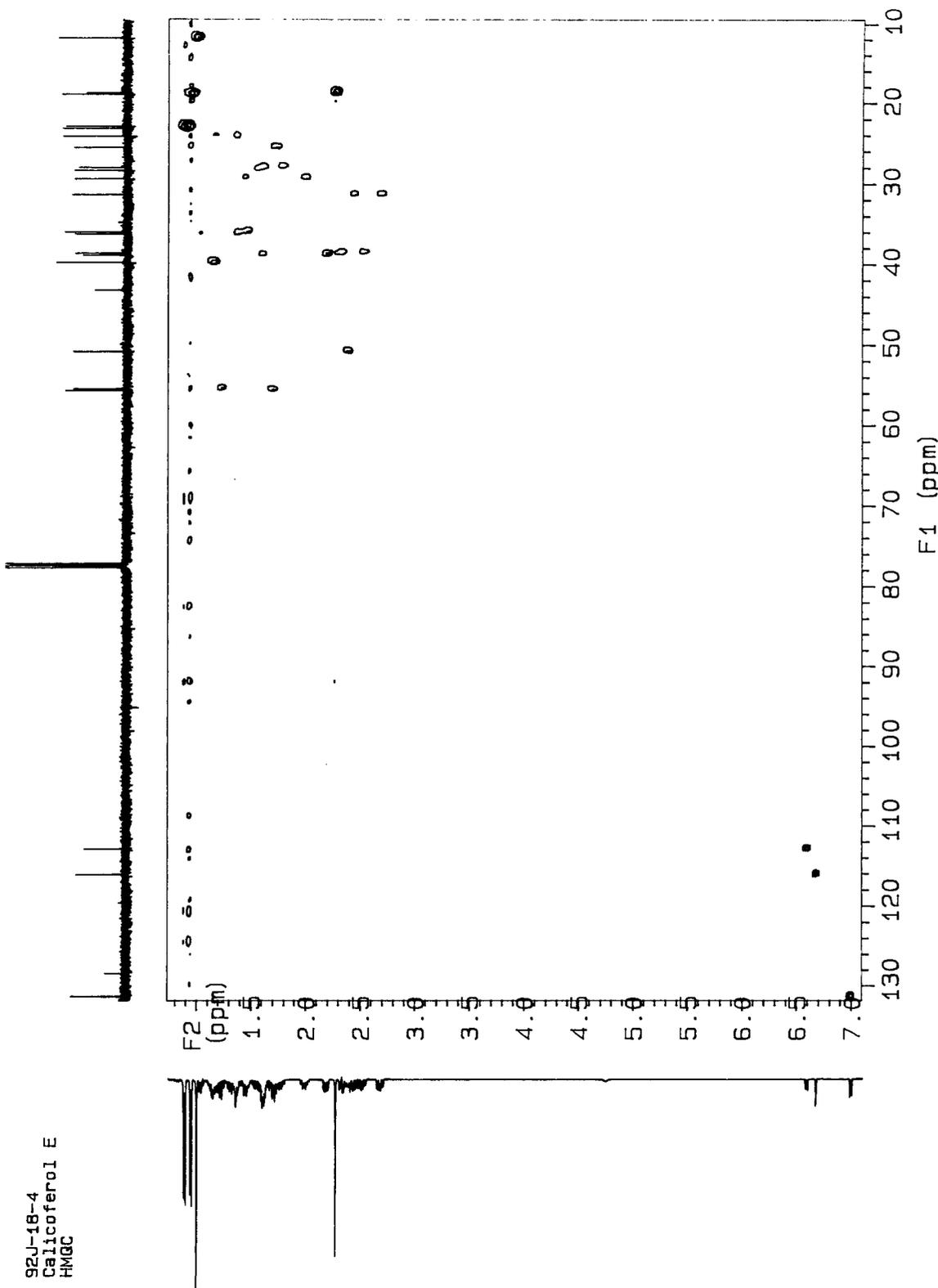
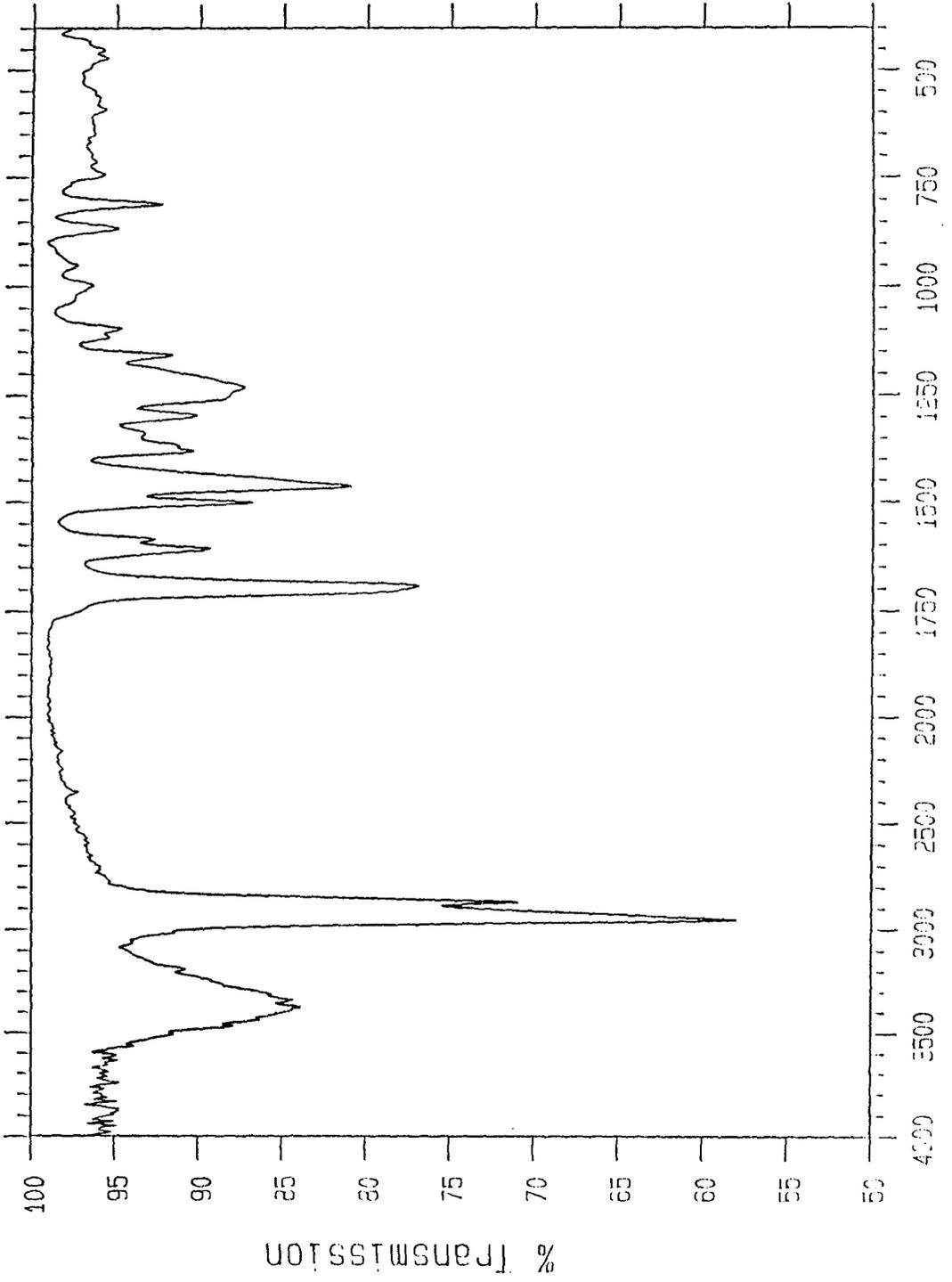


Fig. 2-40. HMQC spectrum of compound 92J-18-4

Mattson Instruments FTIR



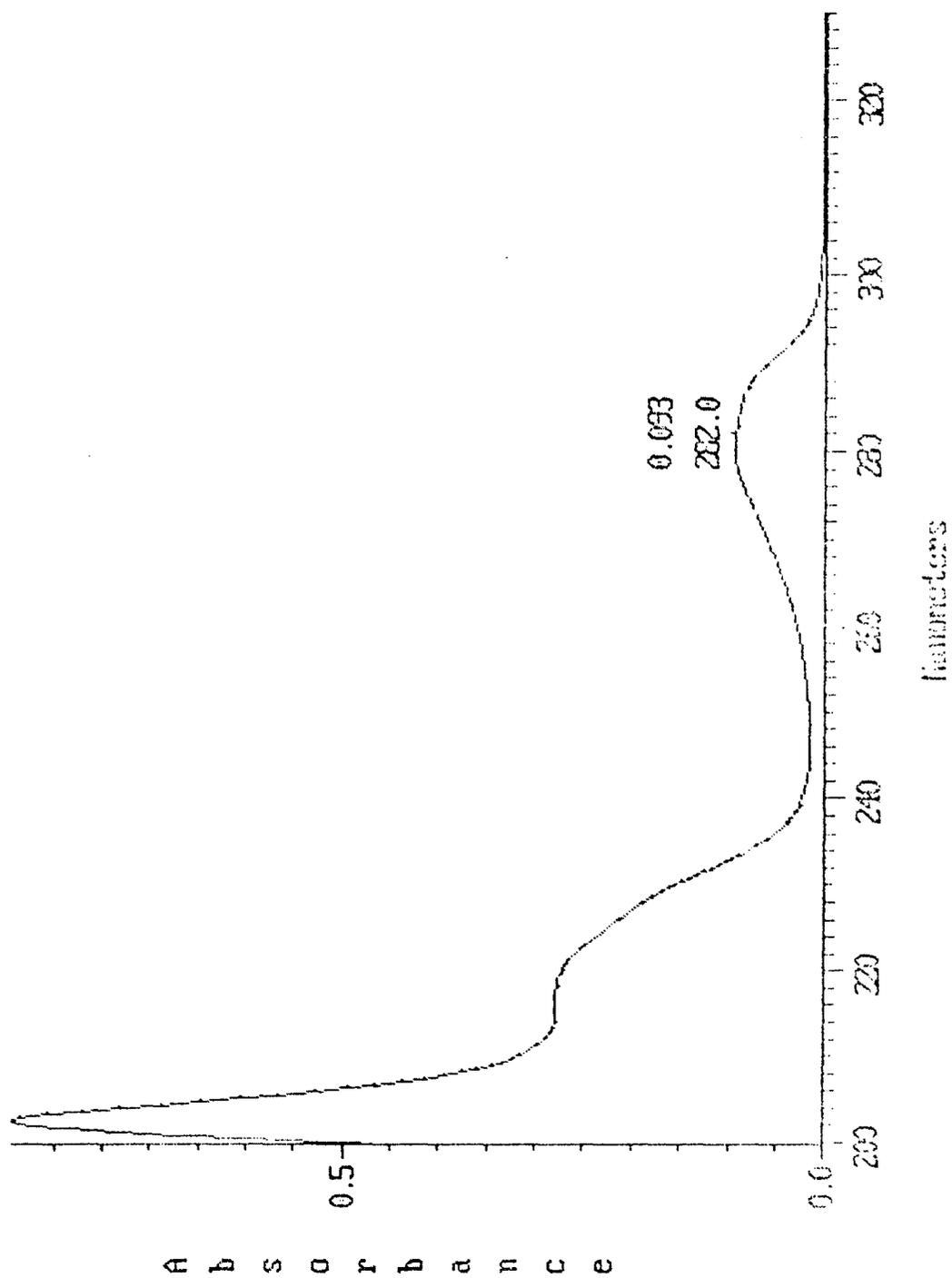


Fig. 2-42. UV spectrum of compound 92J-18-4

92J-18-5
Ophirin

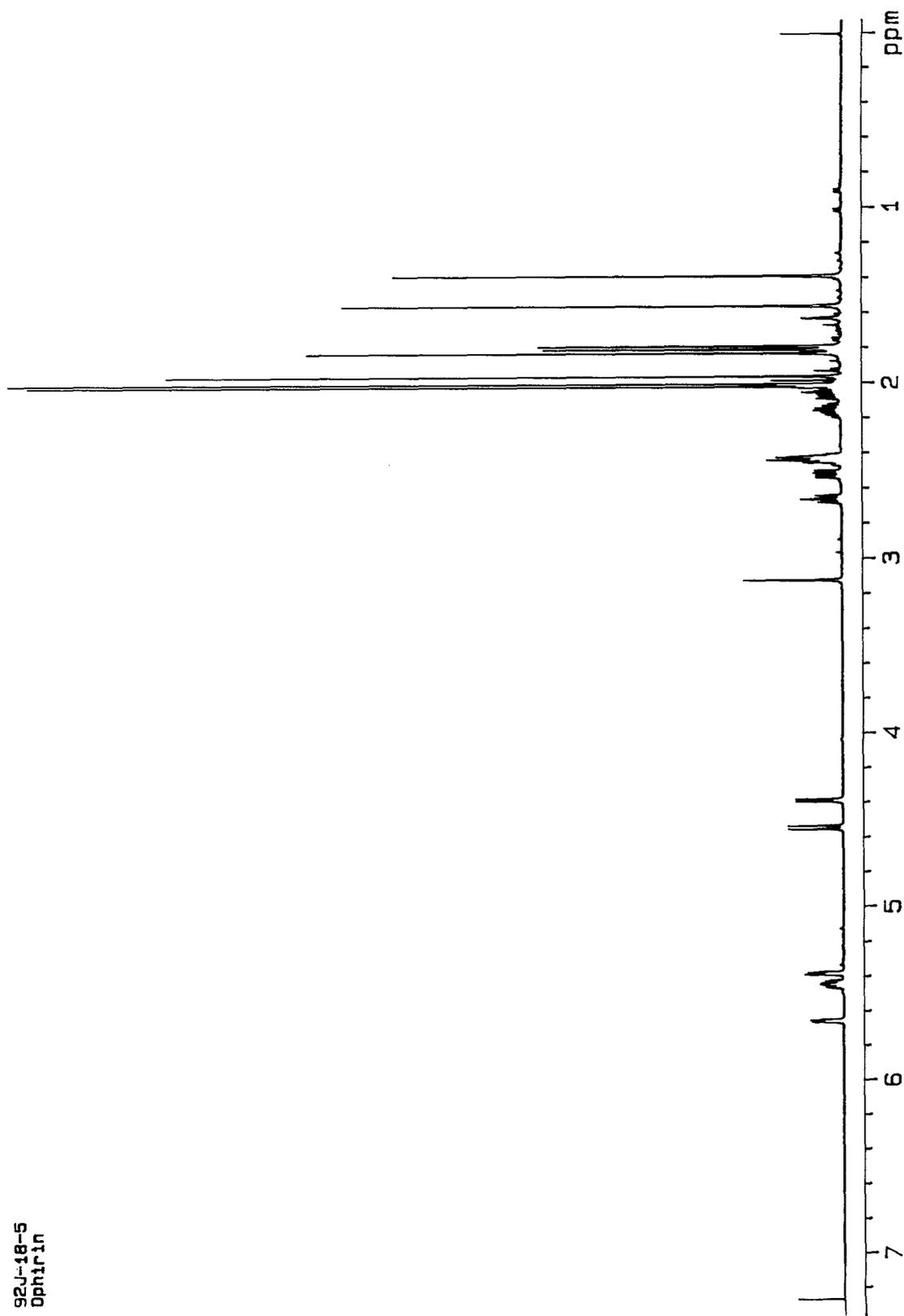


Fig. 2-44. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-5

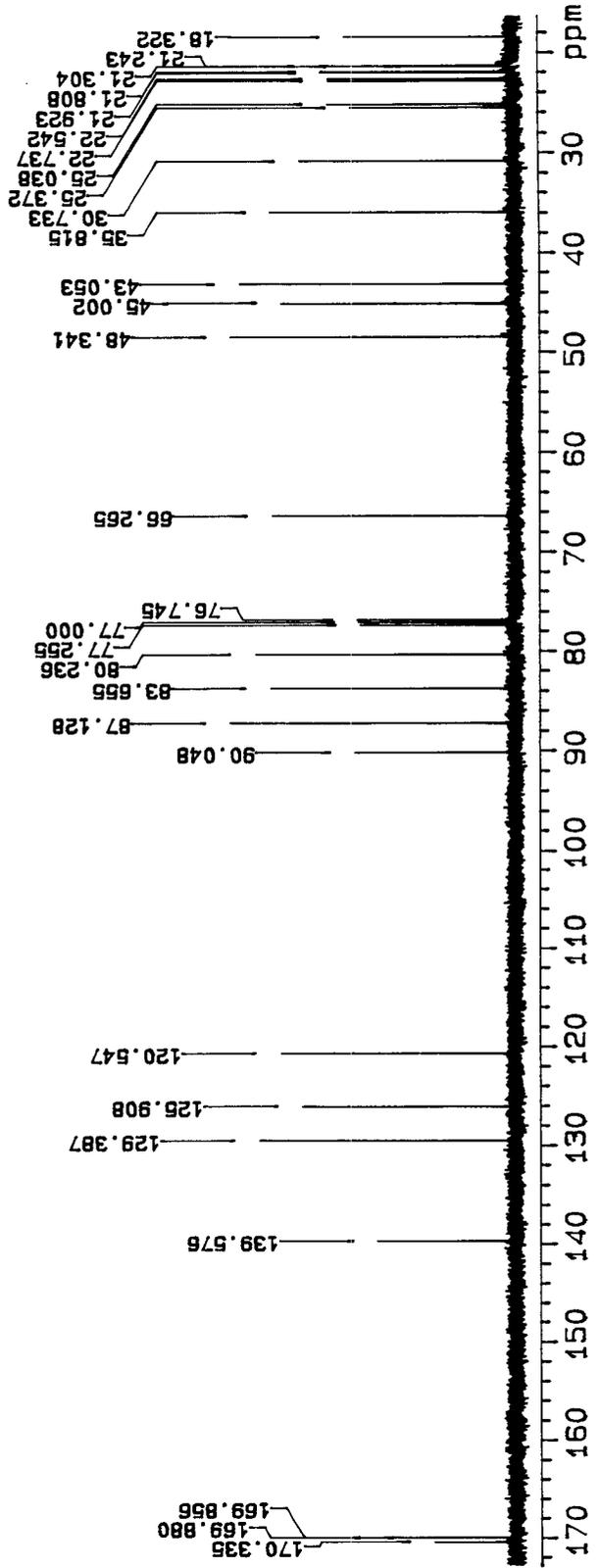


Fig. 2-45. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-5

92J-18-5
Ophirin
Cosy45

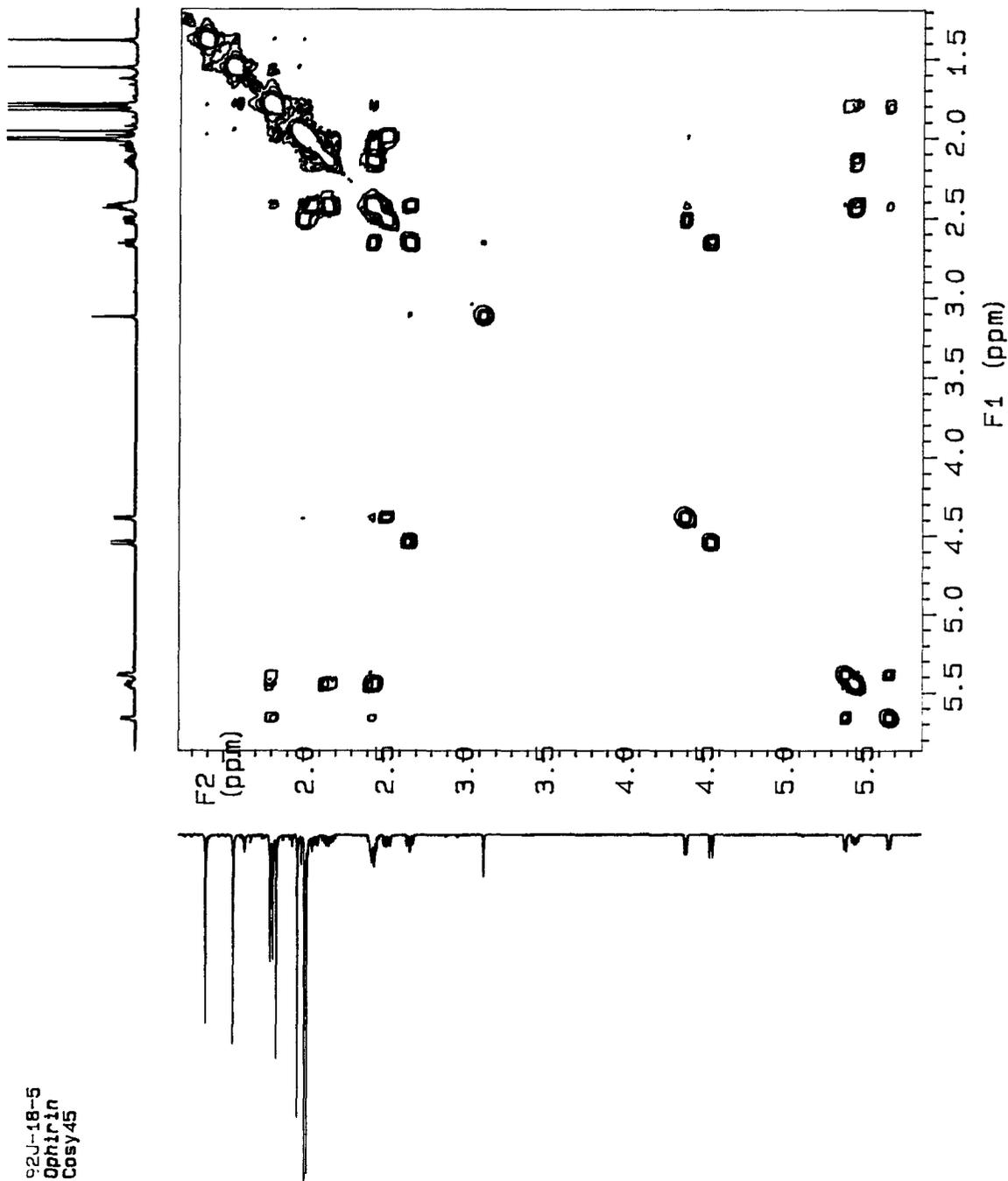


Fig: 2-46. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-5

92J-18-5
Ophirin
HMOC

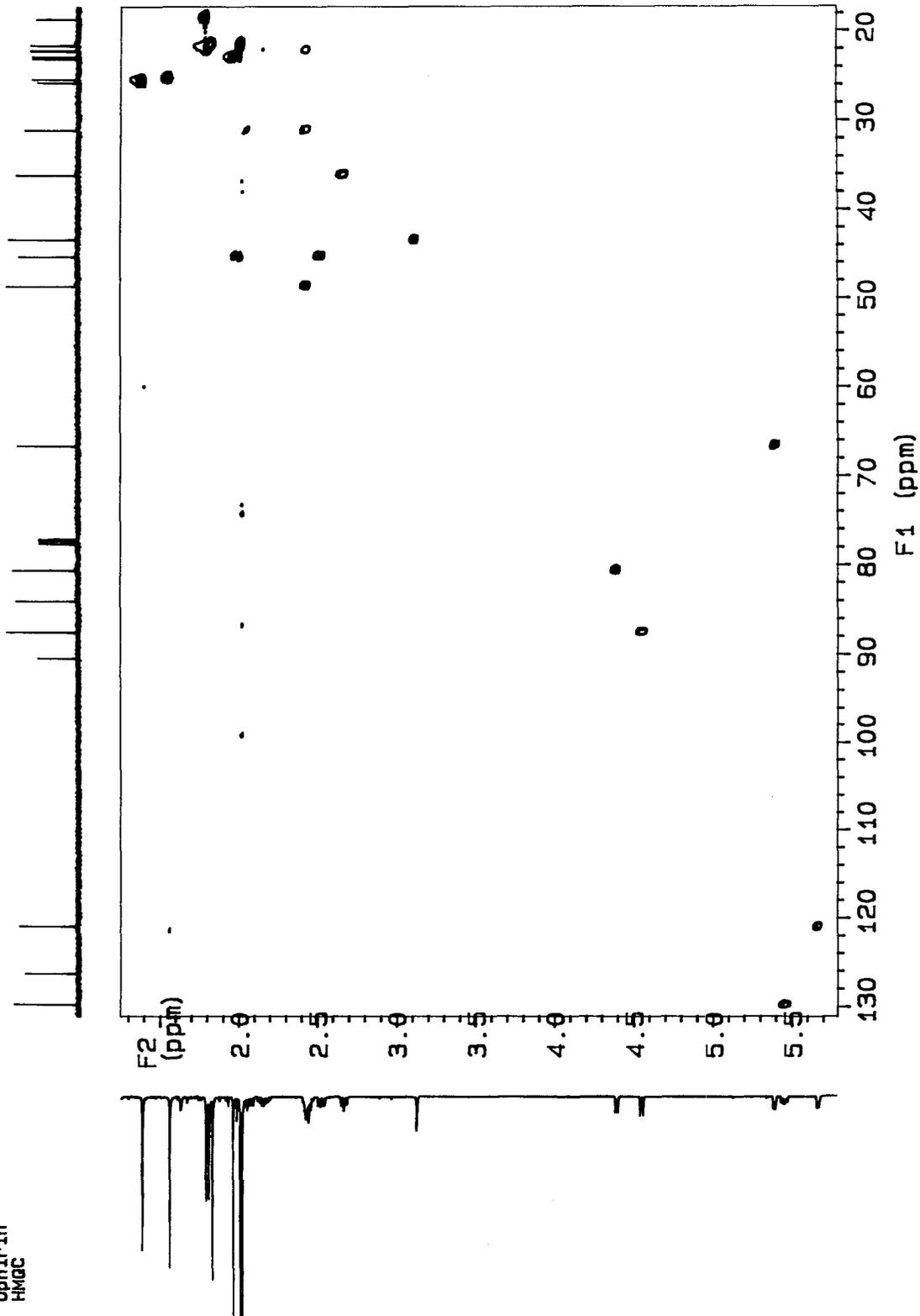


Fig. 2-47. HMOC spectrum of compound 92J-18-5

File:12219413B Ident:44 Mer Def 0.25 Acq:21-DEC-1994 14:13:17 +2:14 Cal:12219401B_1
 70S EI+ Magnet BpM:43 BpI:2886596 TIC:22883594 Flags:HALL
 File Text:Shin (KORDI) 92J-18-F 50EV/PPK

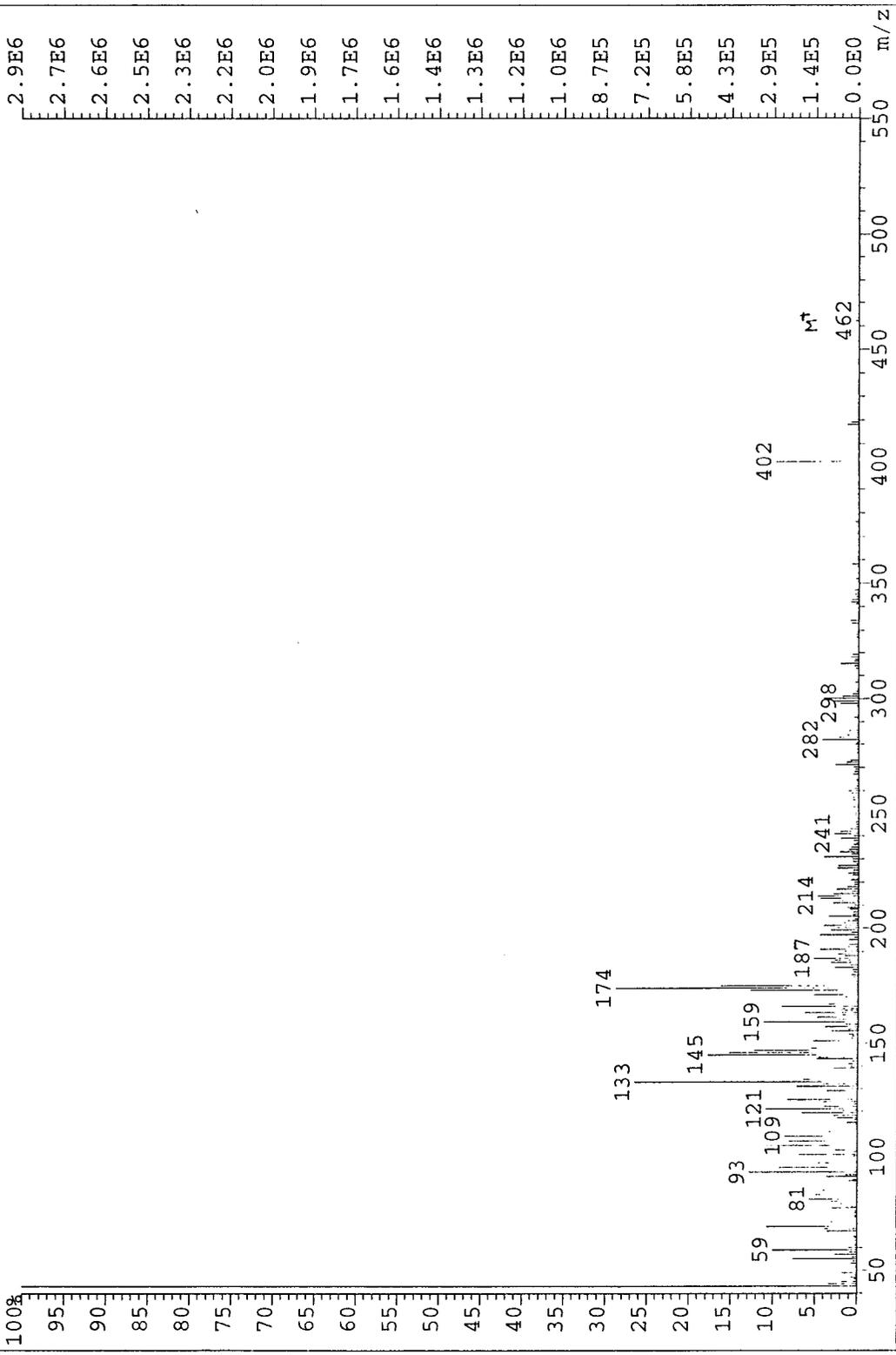


Fig. 2-48. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-5

92J-18-6
Cellicophirin B

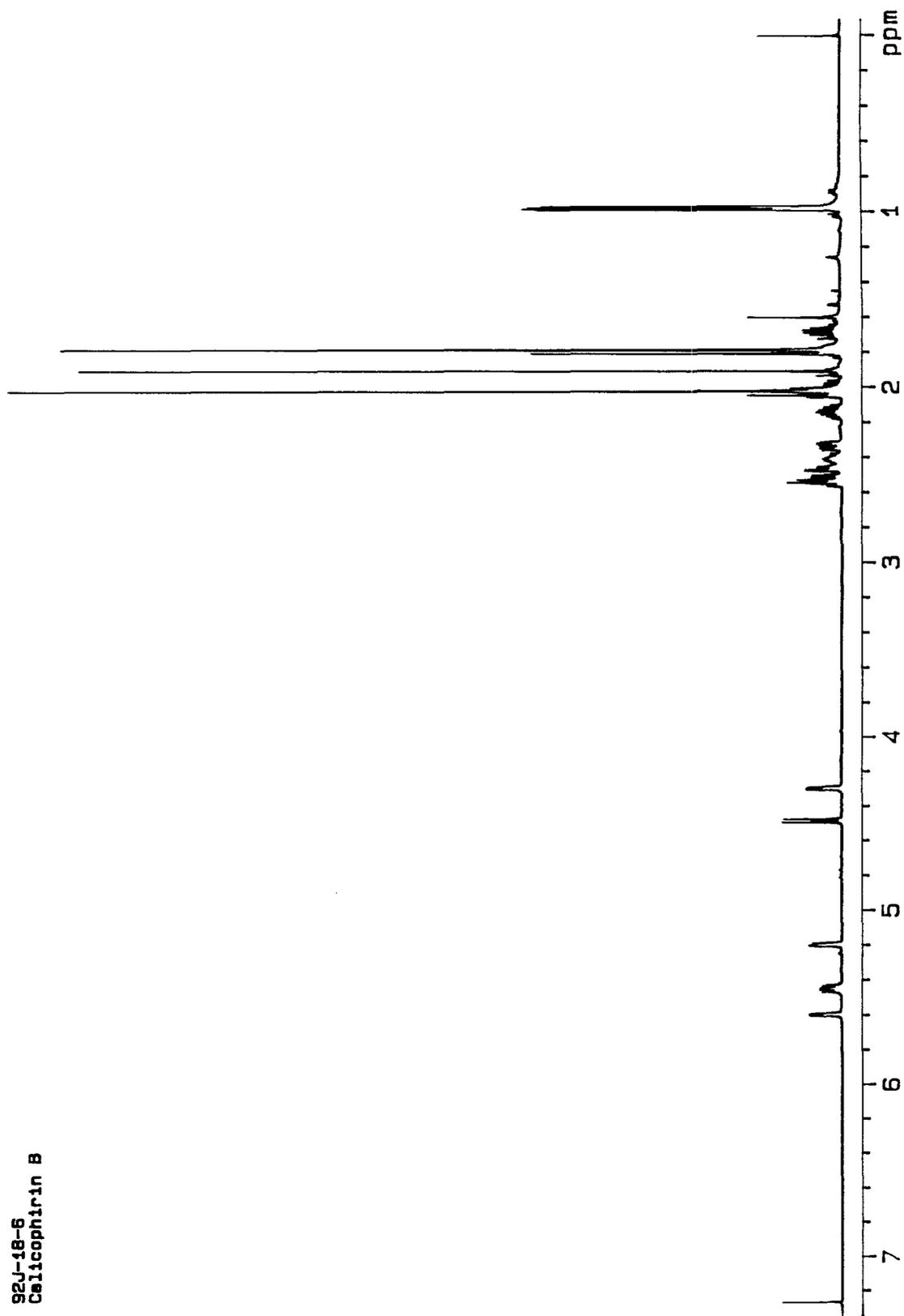


Fig. 2-49. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-6

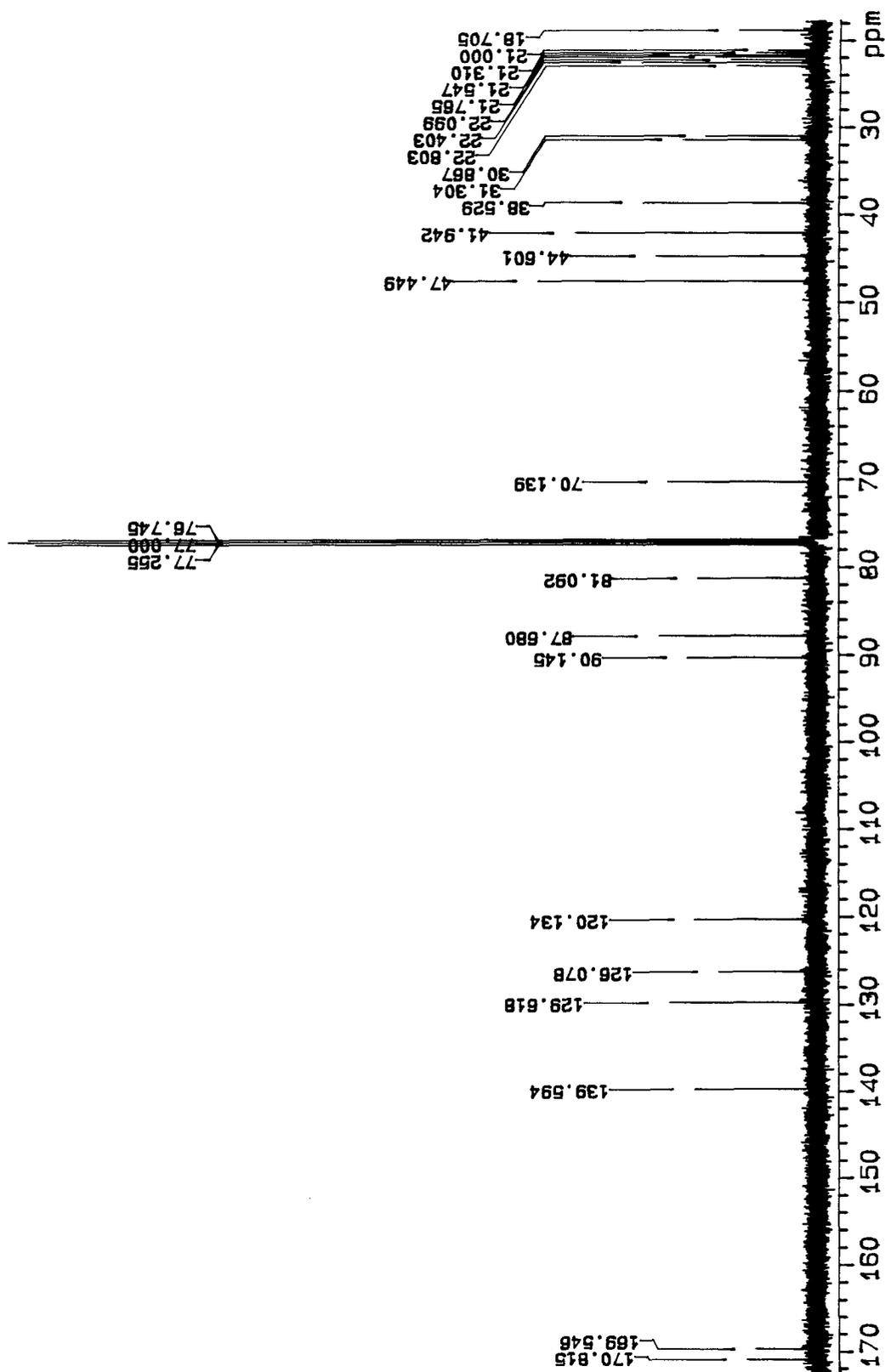


Fig. 2-50. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-6

92J-18-6
Cellicophirin B
Cosy45

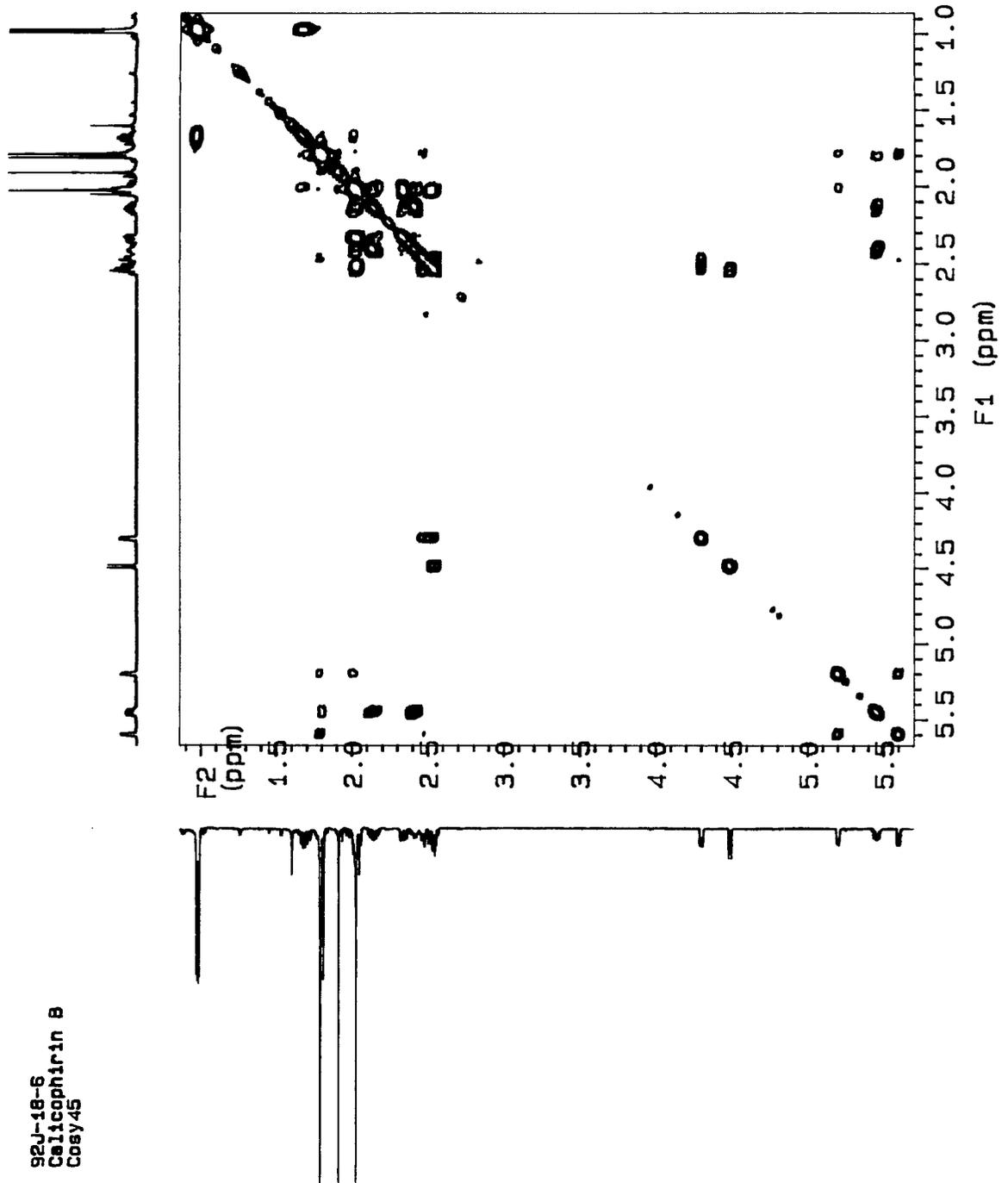


Fig. 2-51. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-6

92J-18-6
Callicophirin
HMGC

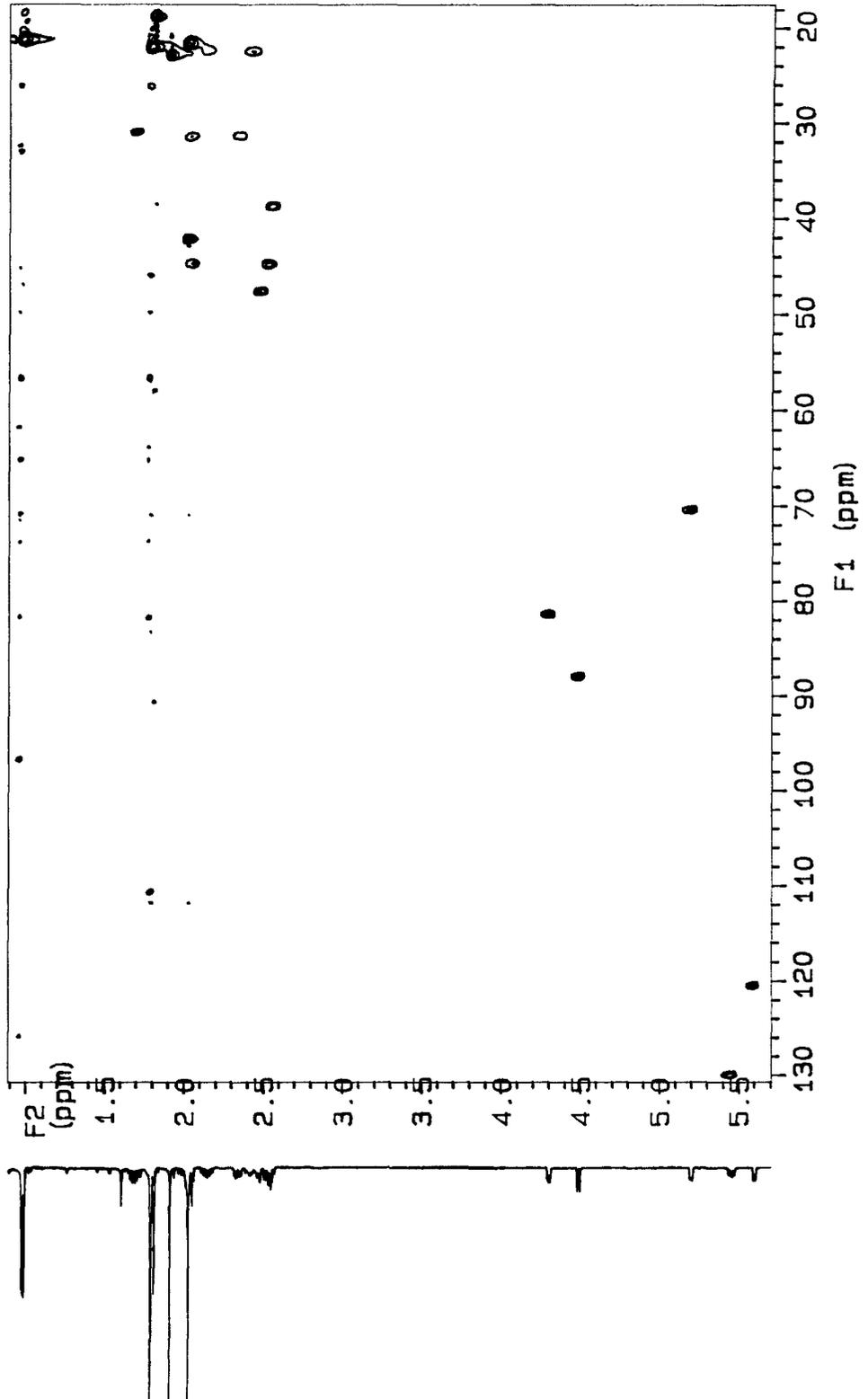


Fig. 2-52. HMQC spectrum of compound 92J-18-6

File:12219407B Ident:34 Mer Def 0.25 Acq:21-DEC-1994 10:19:32 +1:43 Cal:12219401B_1
 70S EI+ Magnet BpM:43 BpI:463680 TIC:3637314 Flags:HALL
 File Text:Shin (KORDI) 92J-18-E 50EV

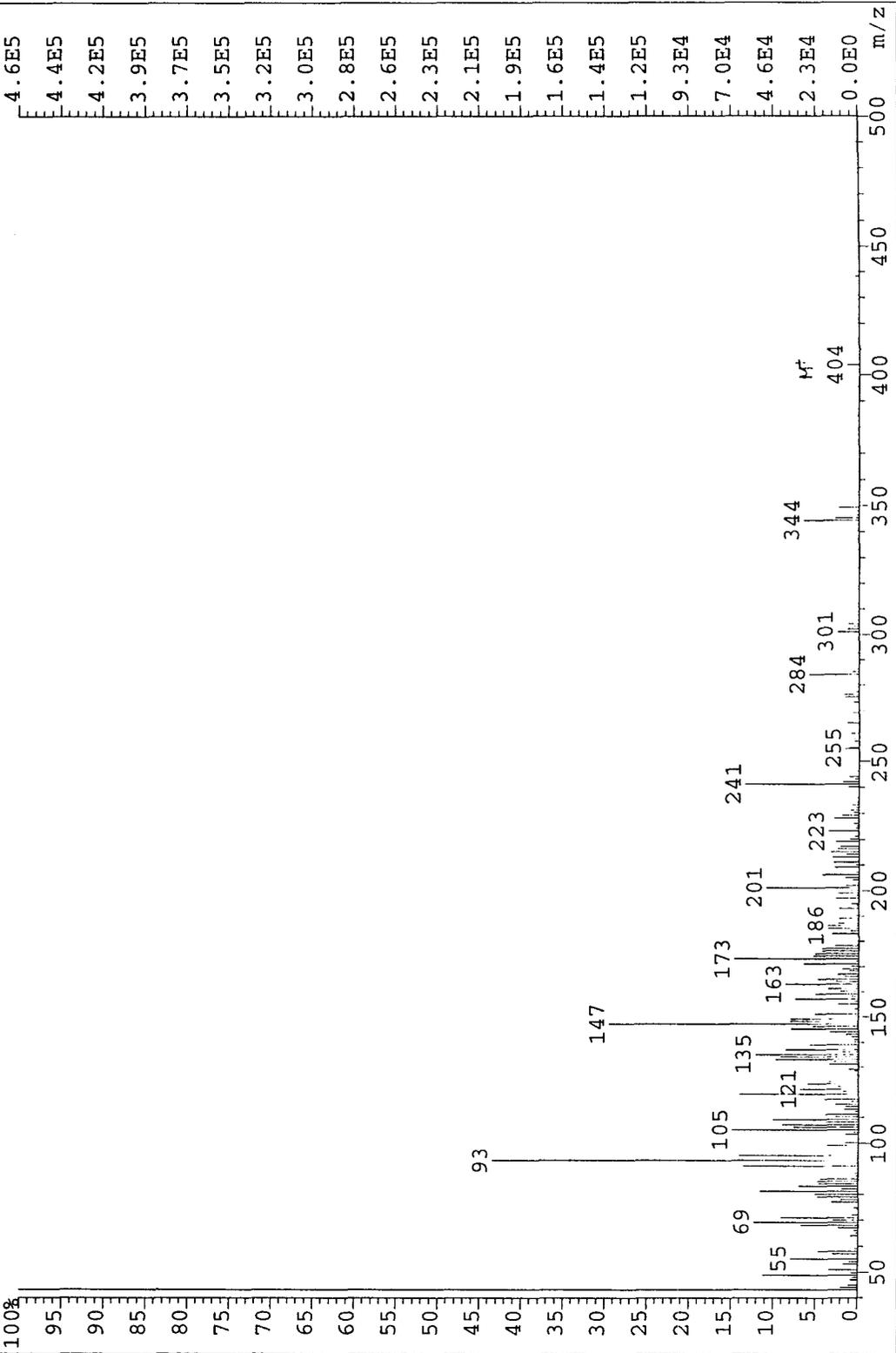


Fig. 2-53. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-6

92J-18-7
Astrogorgin

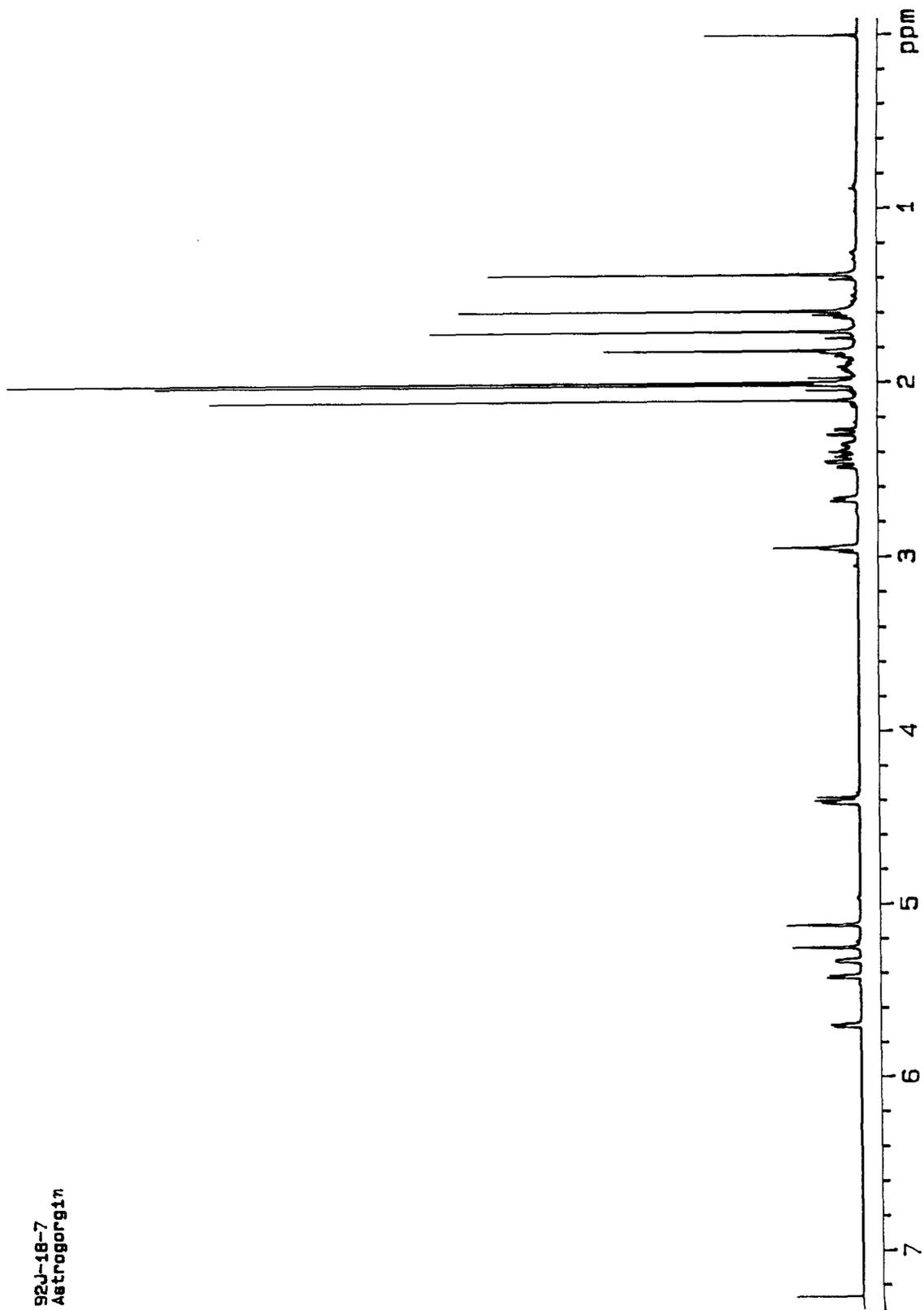


Fig. 2-54. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-7

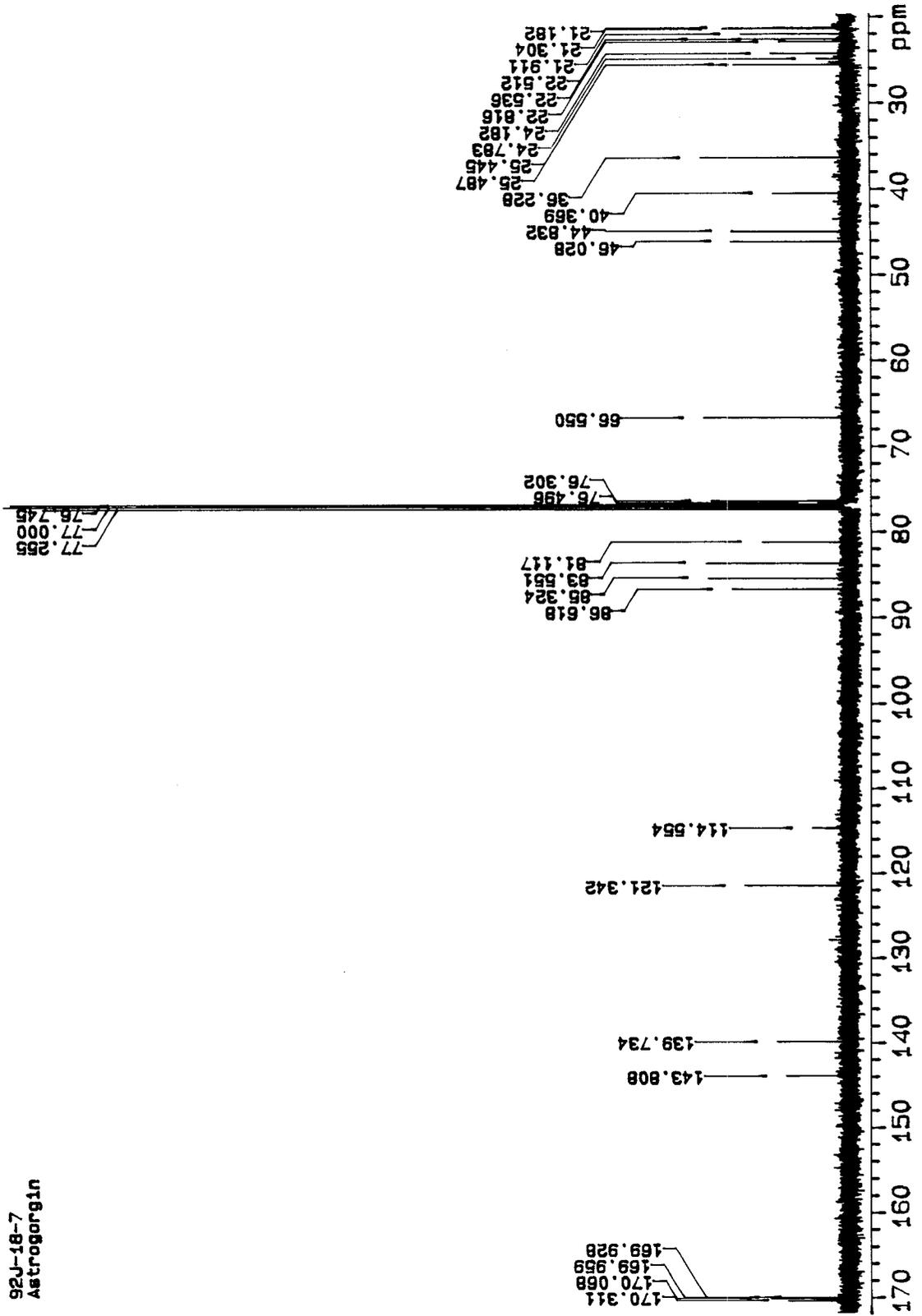


Fig. 2-55. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-7

92J-18-7
Astragorgin
Cosy45

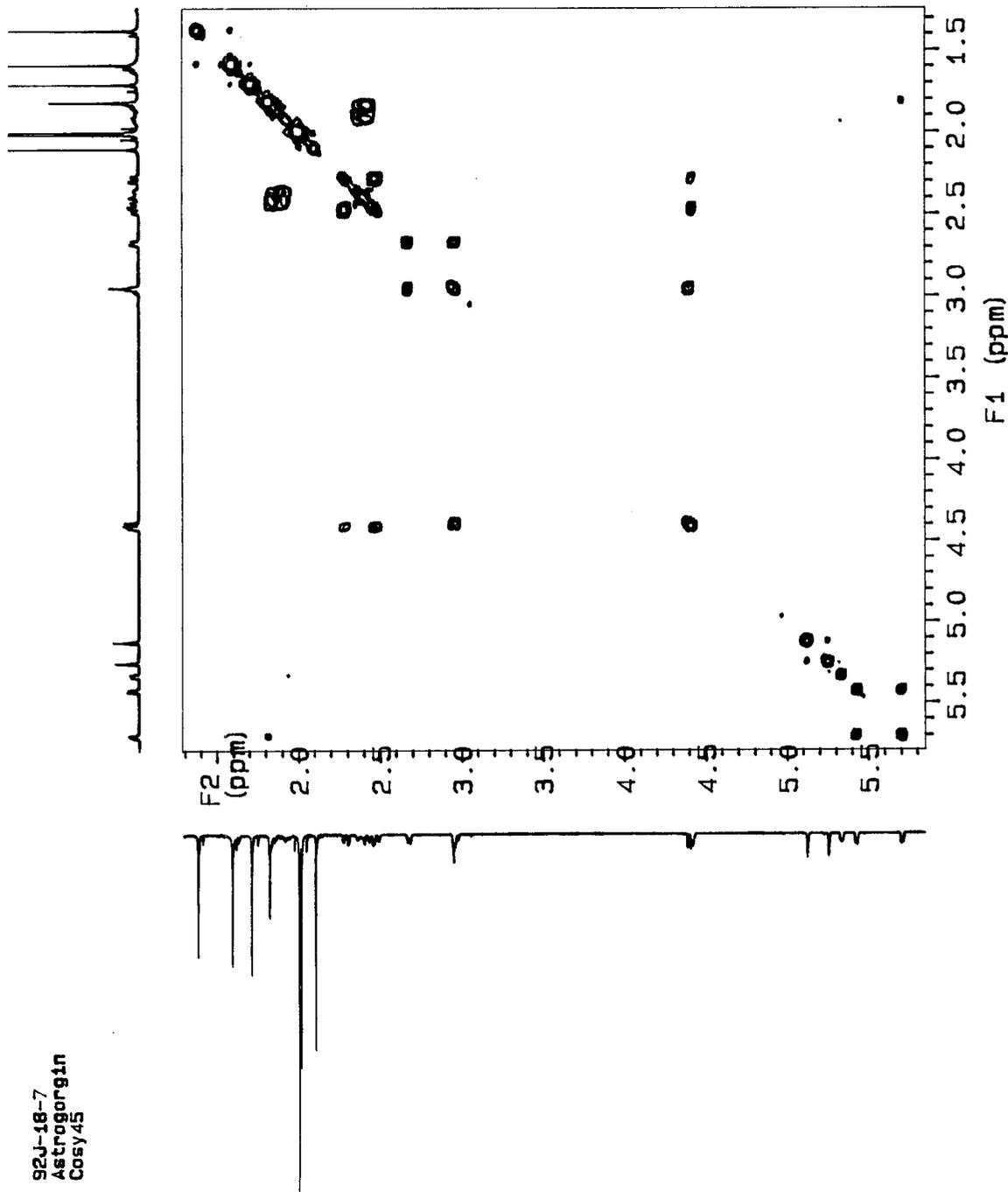


Fig. 2-56. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-7

92J-18-7
Astrogorgin
HMGC

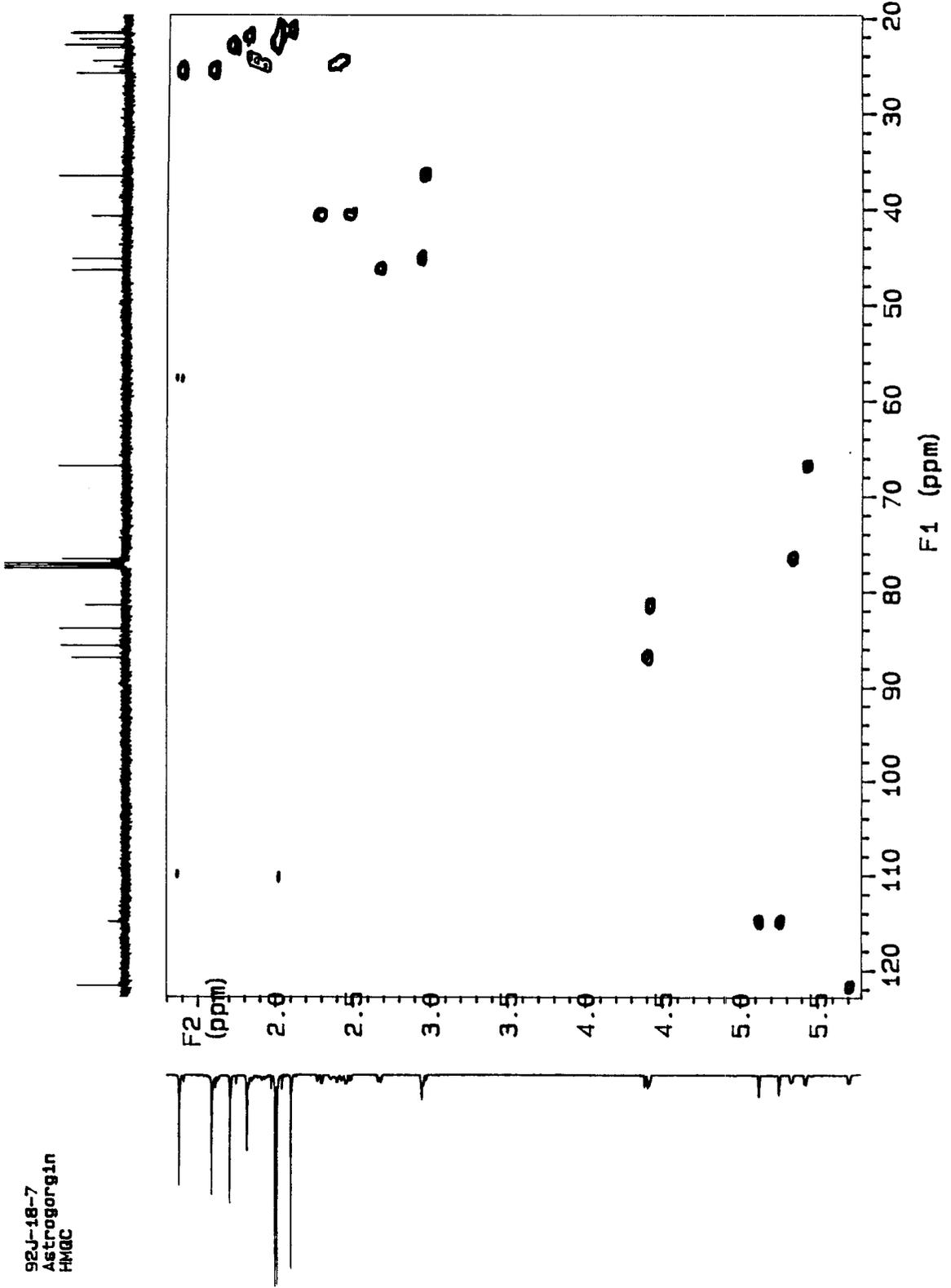


Fig. 2-57. HMQC spectrum of compound 92J-18-7

92J-18-I 30 Aug 94 11:34 am
run 92J18I0001 av scan 16-21 100%= 15529097

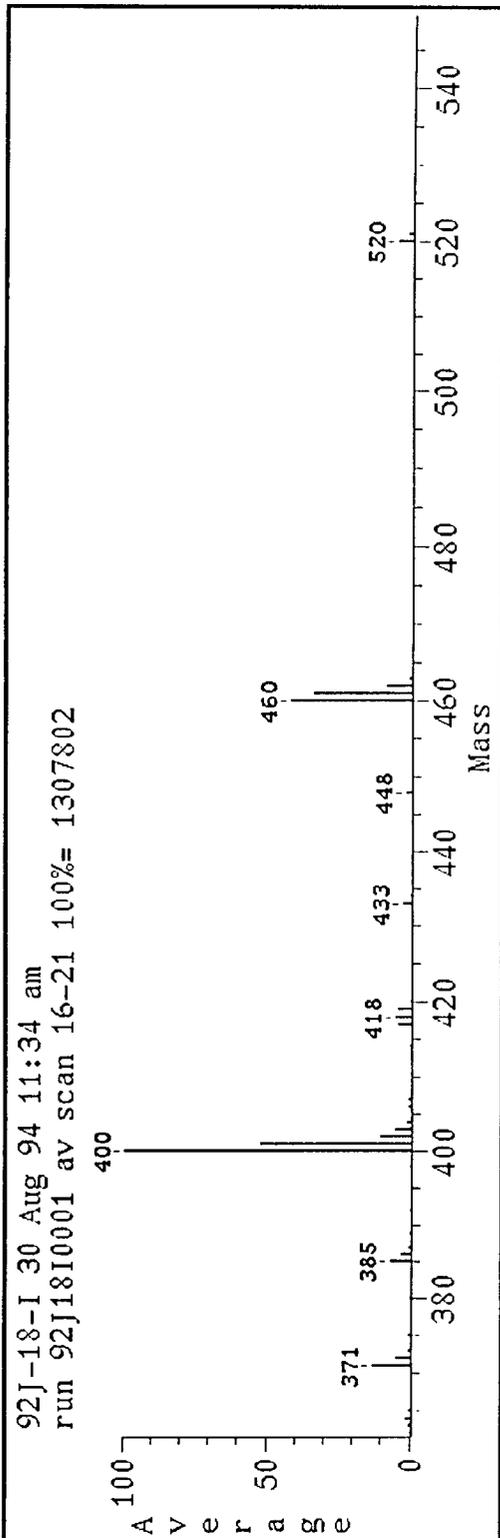
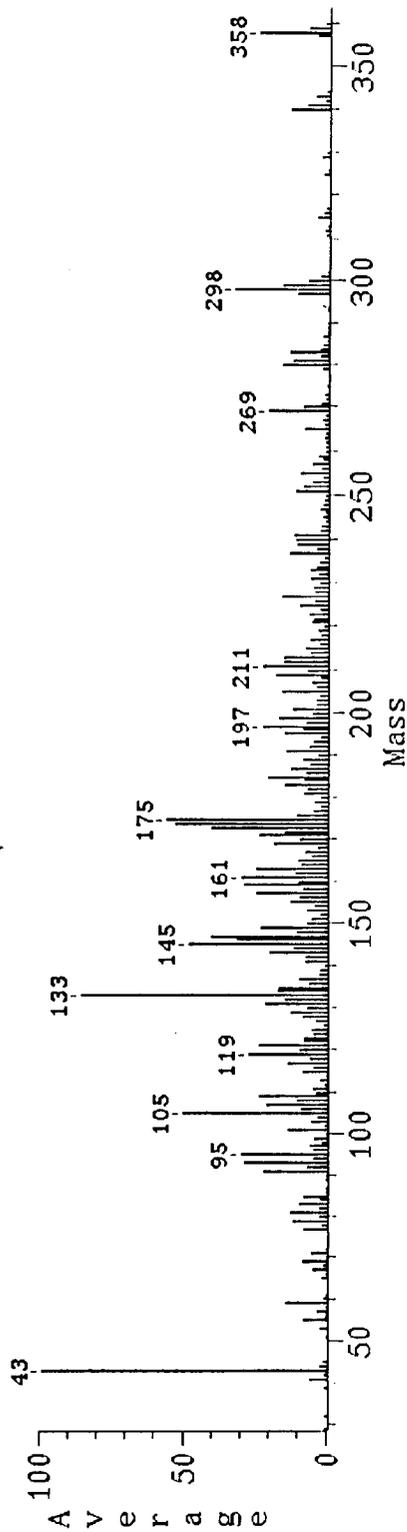


Fig. 2-58. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-7

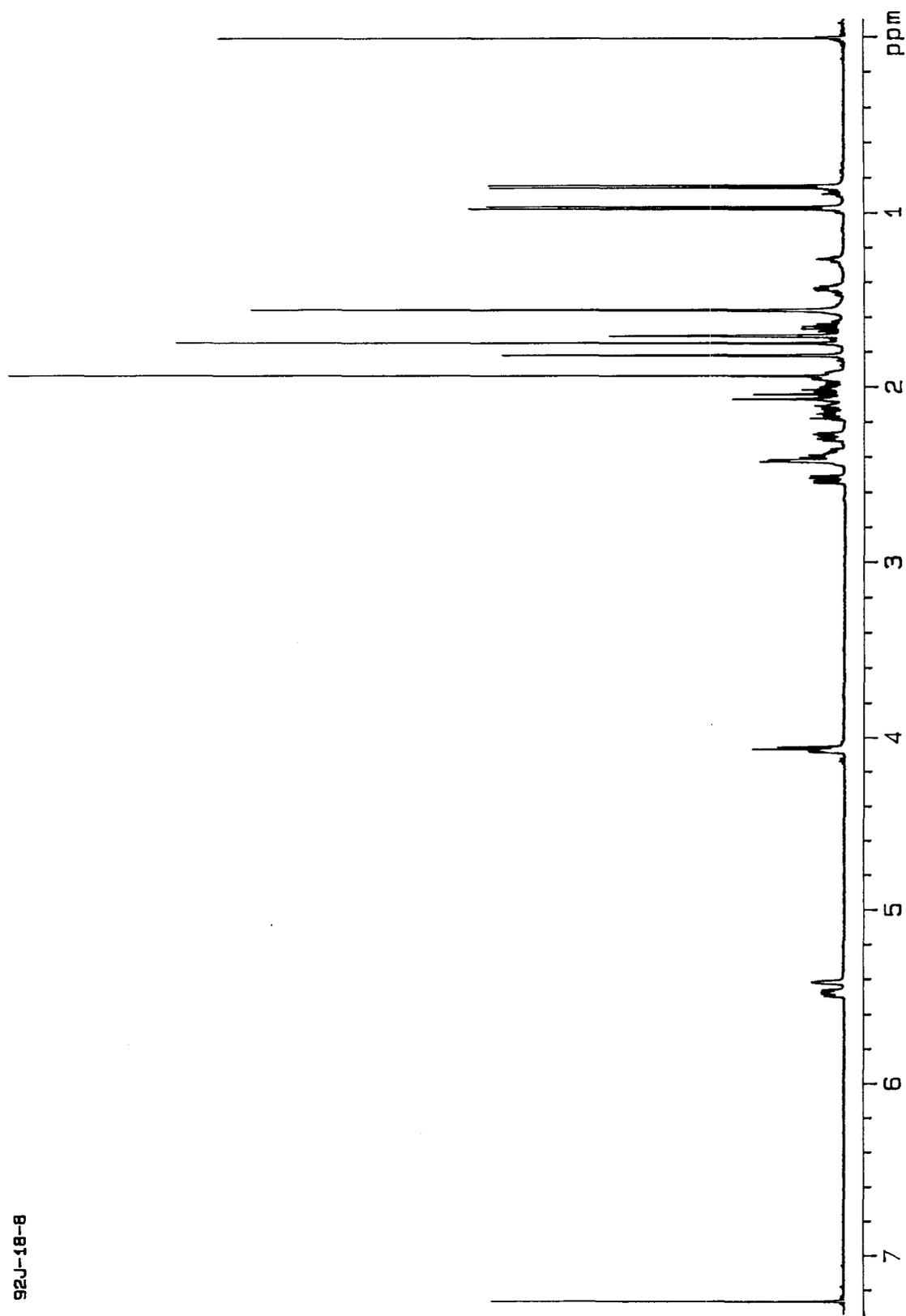


Fig. 2-59. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-8

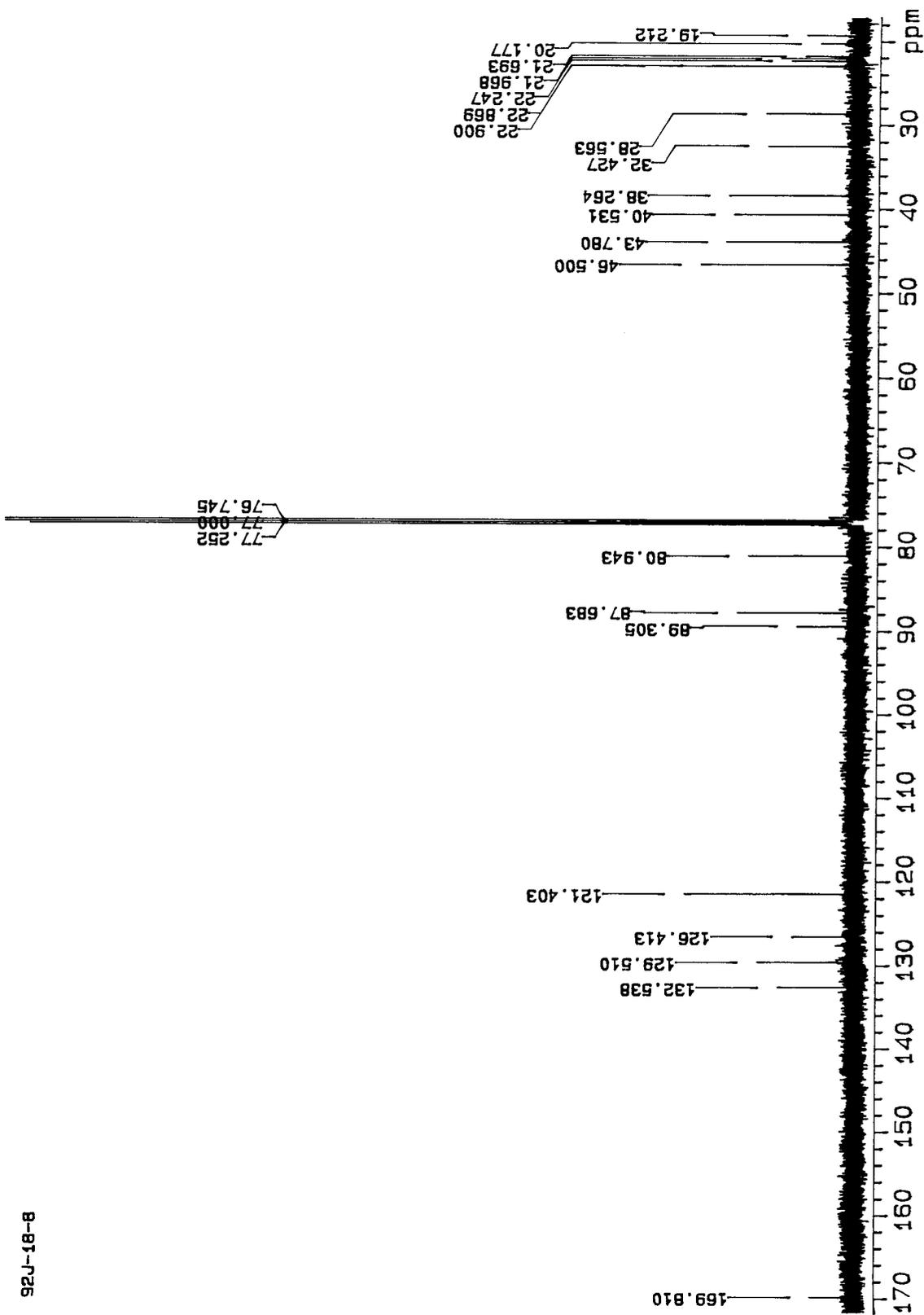


Fig. 2-60. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-8

92J-18-B
Cosy45

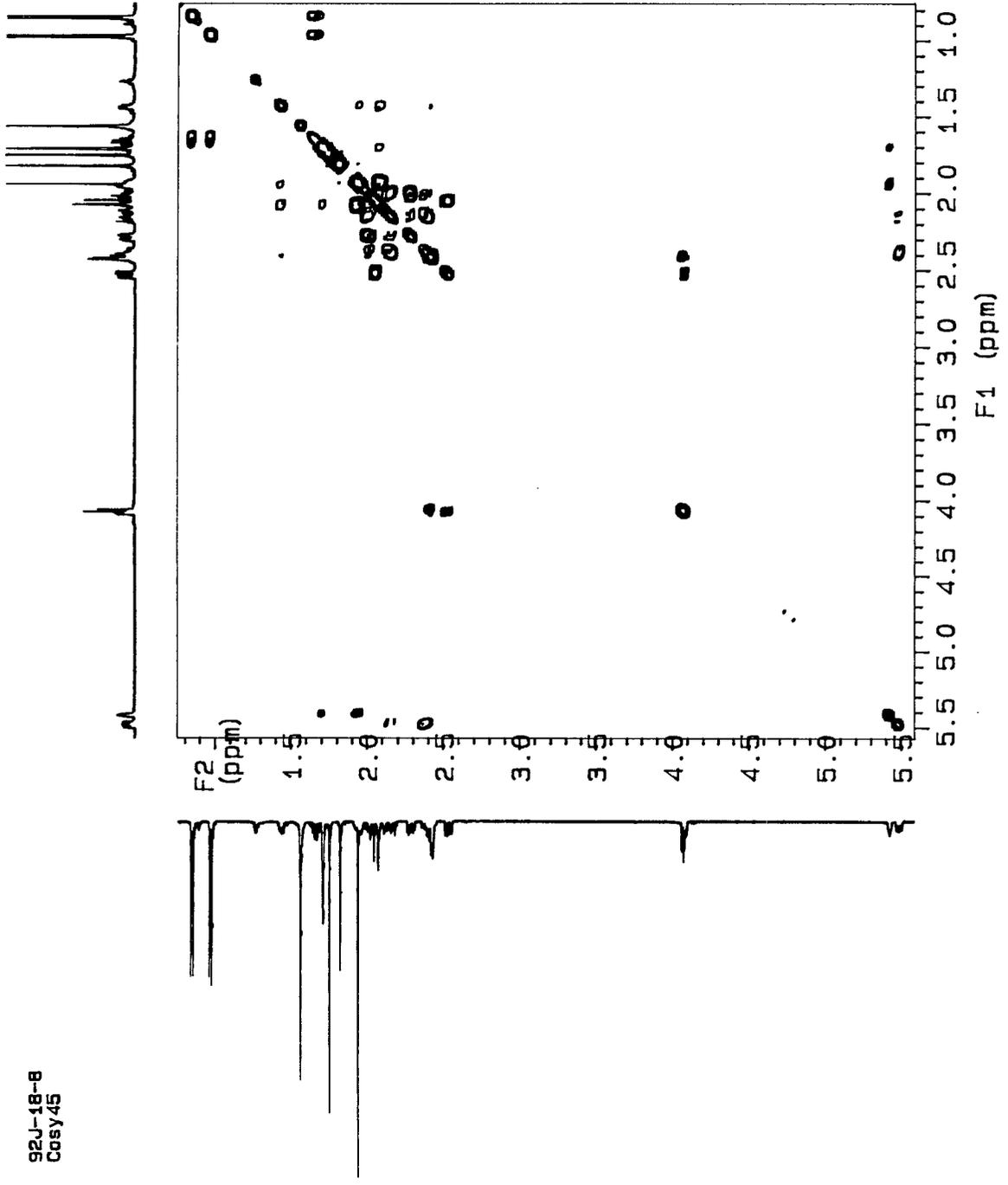


Fig. 2-61. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-8

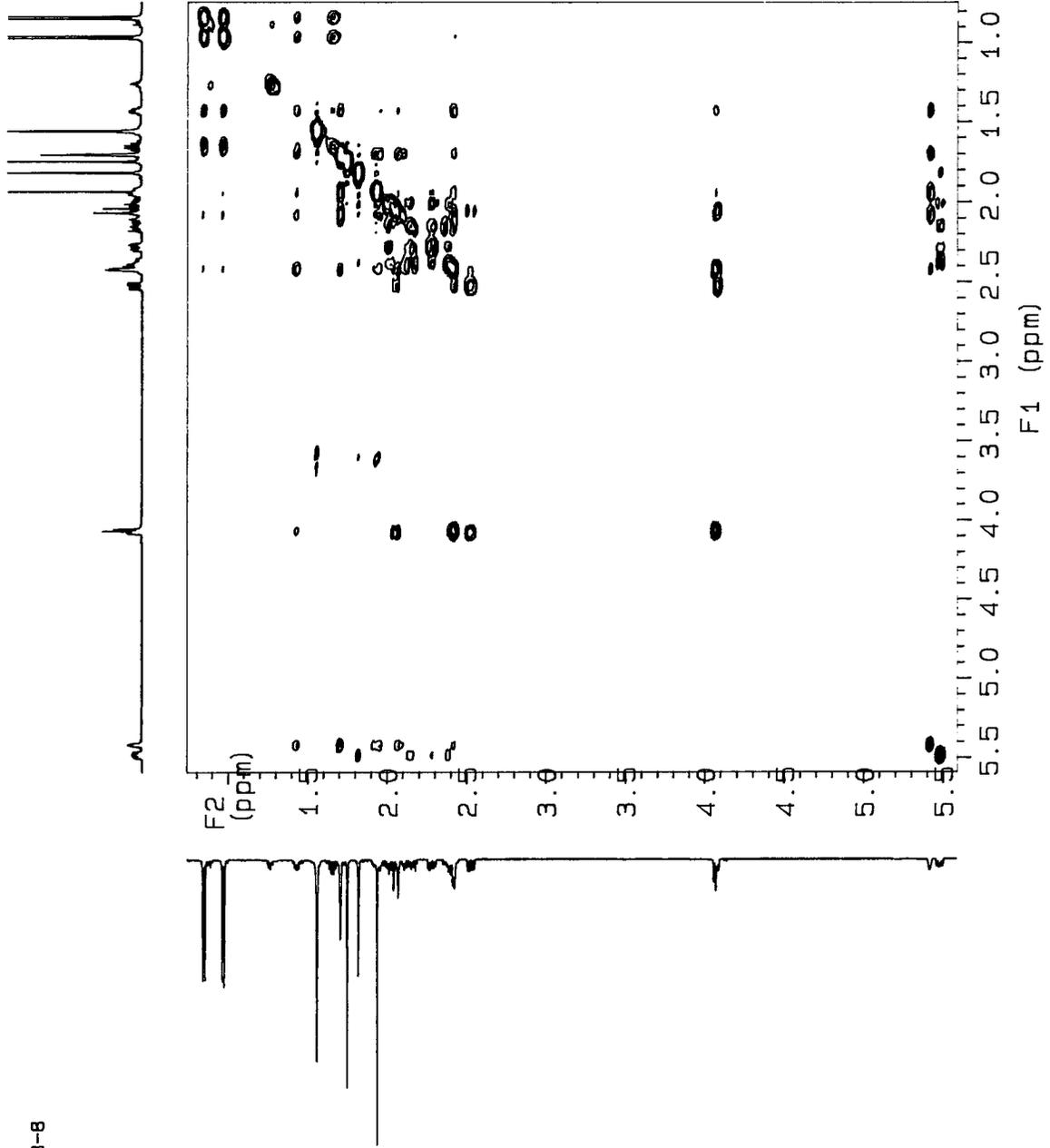


Fig. 2-62. TOCSY spectrum of compound 92J-18-8

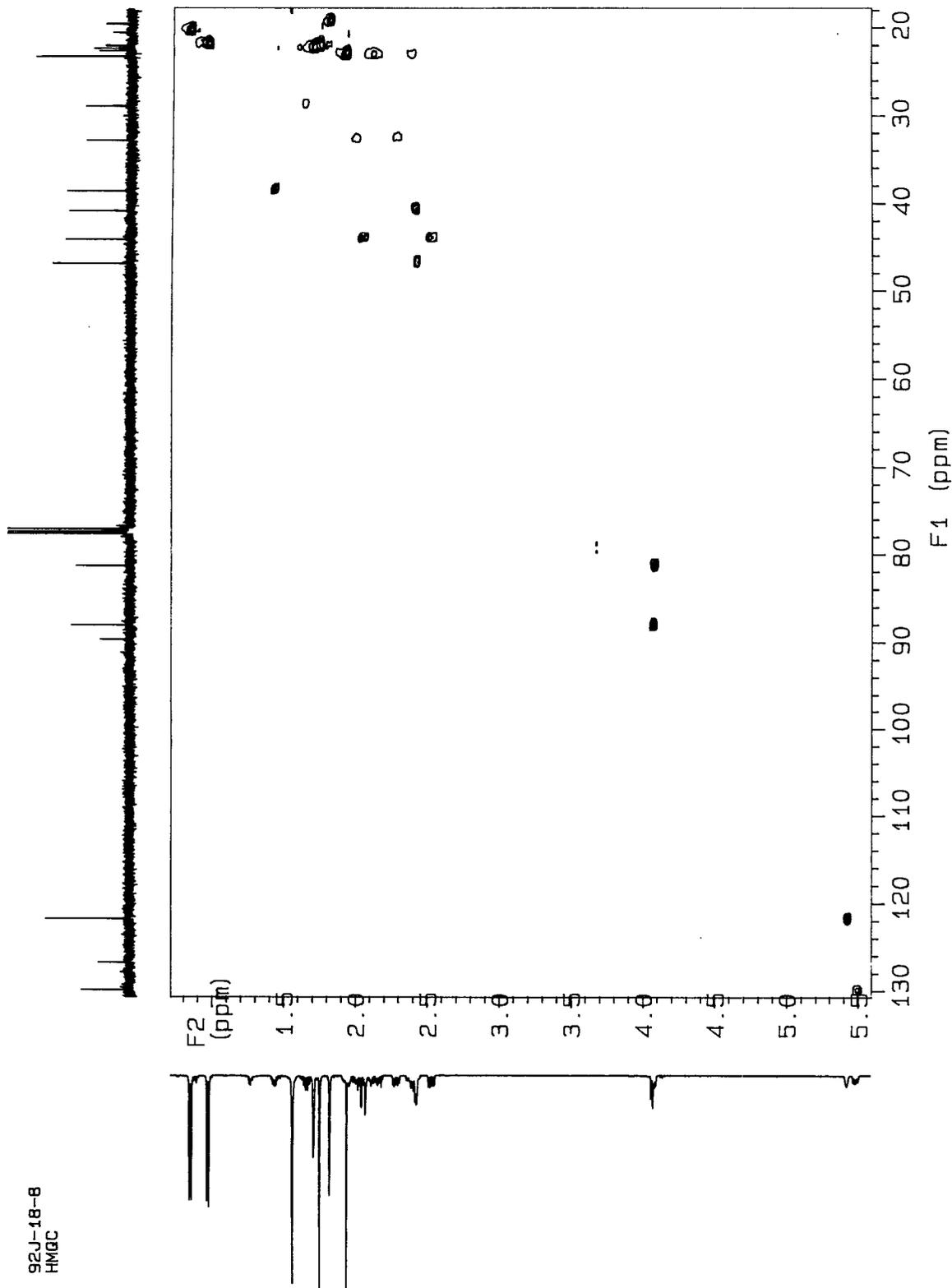


Fig. 2-63. HMQC spectrum of compound 92J-18-8

92J-18-8
HMBC
Upfield

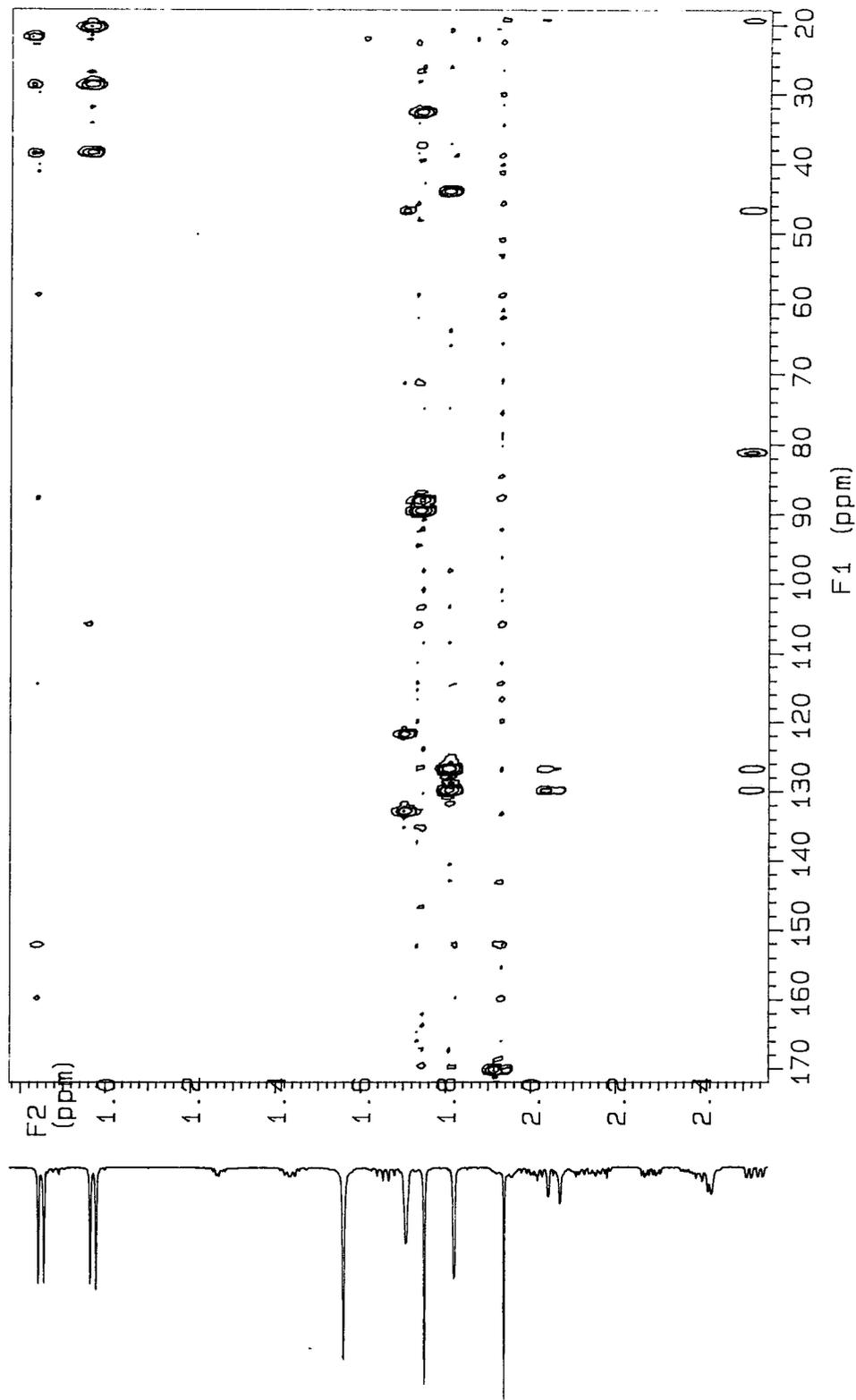


Fig. 2-64. HMBC spectrum of compound 92J-18-8

File:122194113 Ident:35_36 Mer Def 0.25 Acq:21-DEC-1994 11:46:58 +1:47 Cal:12219401B_1
 70S EI+ Magnet BpM:43 BpI:296988 TIC:3543640 Flags:HALL
 File Text:Shin (KORDI) 92J-18-G 50EV

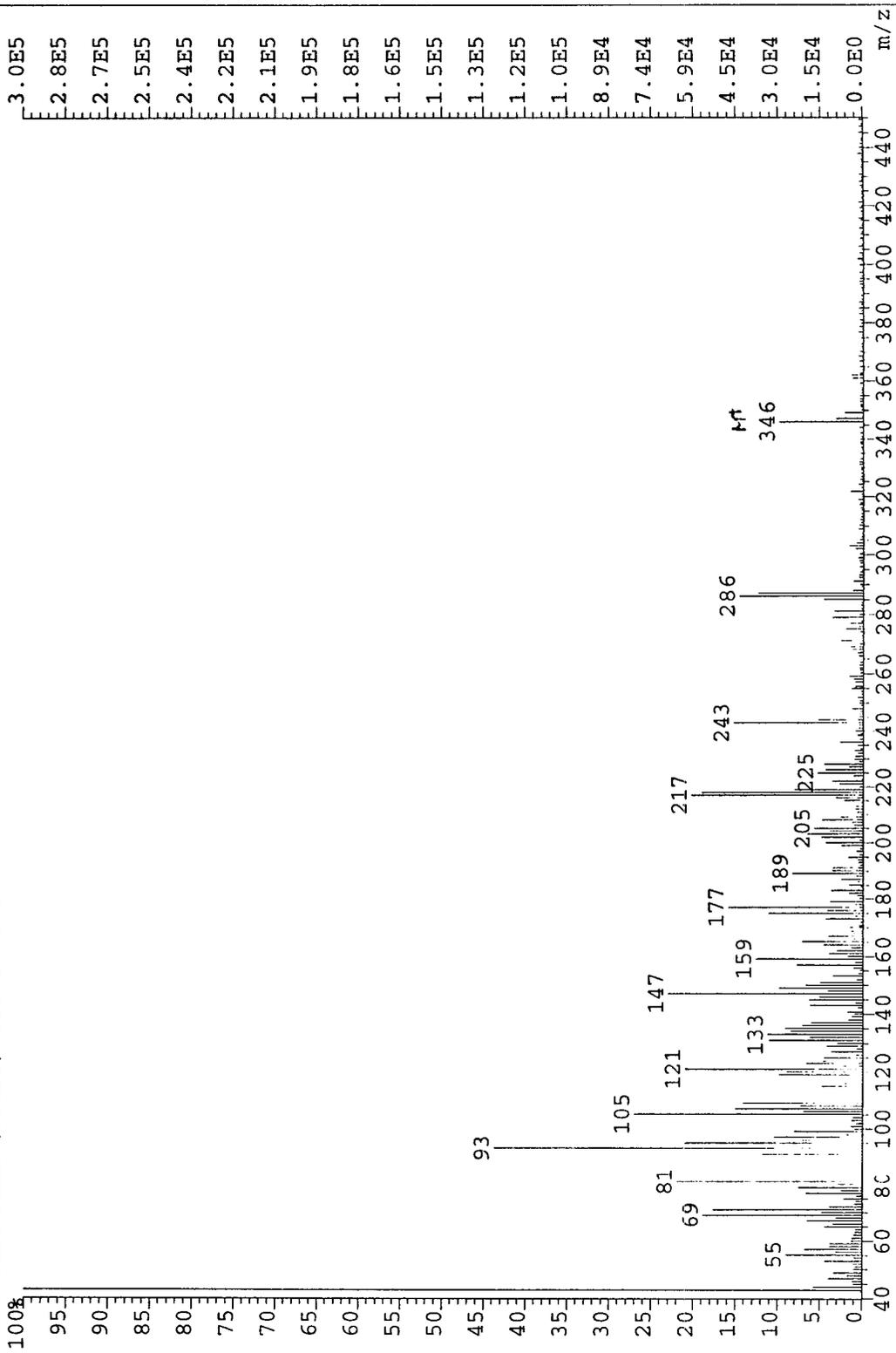


Fig. 2-65. High-resolution EIMS spectrum of 92J-18-8

92J-18-9

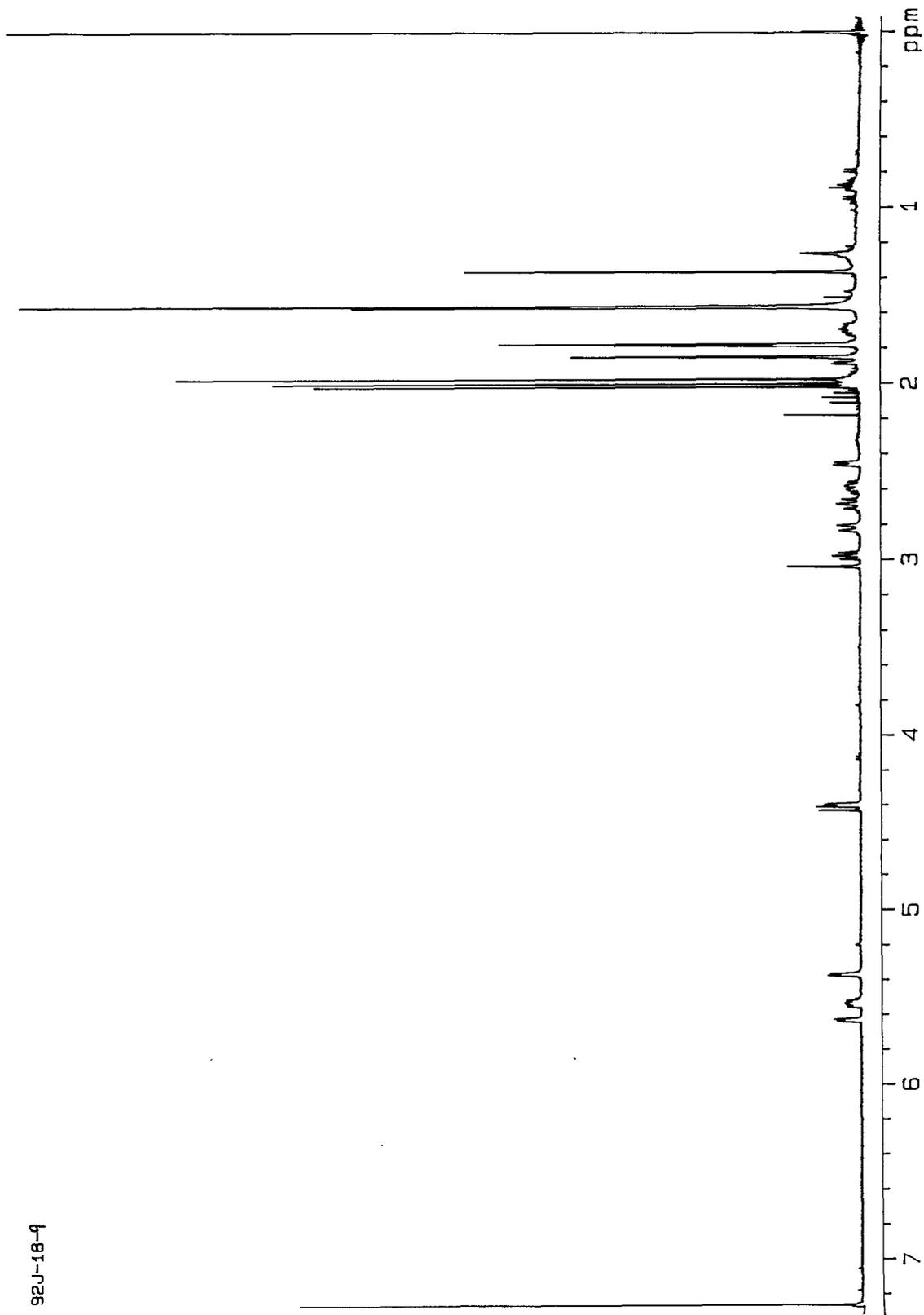


Fig. 2-66. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-9

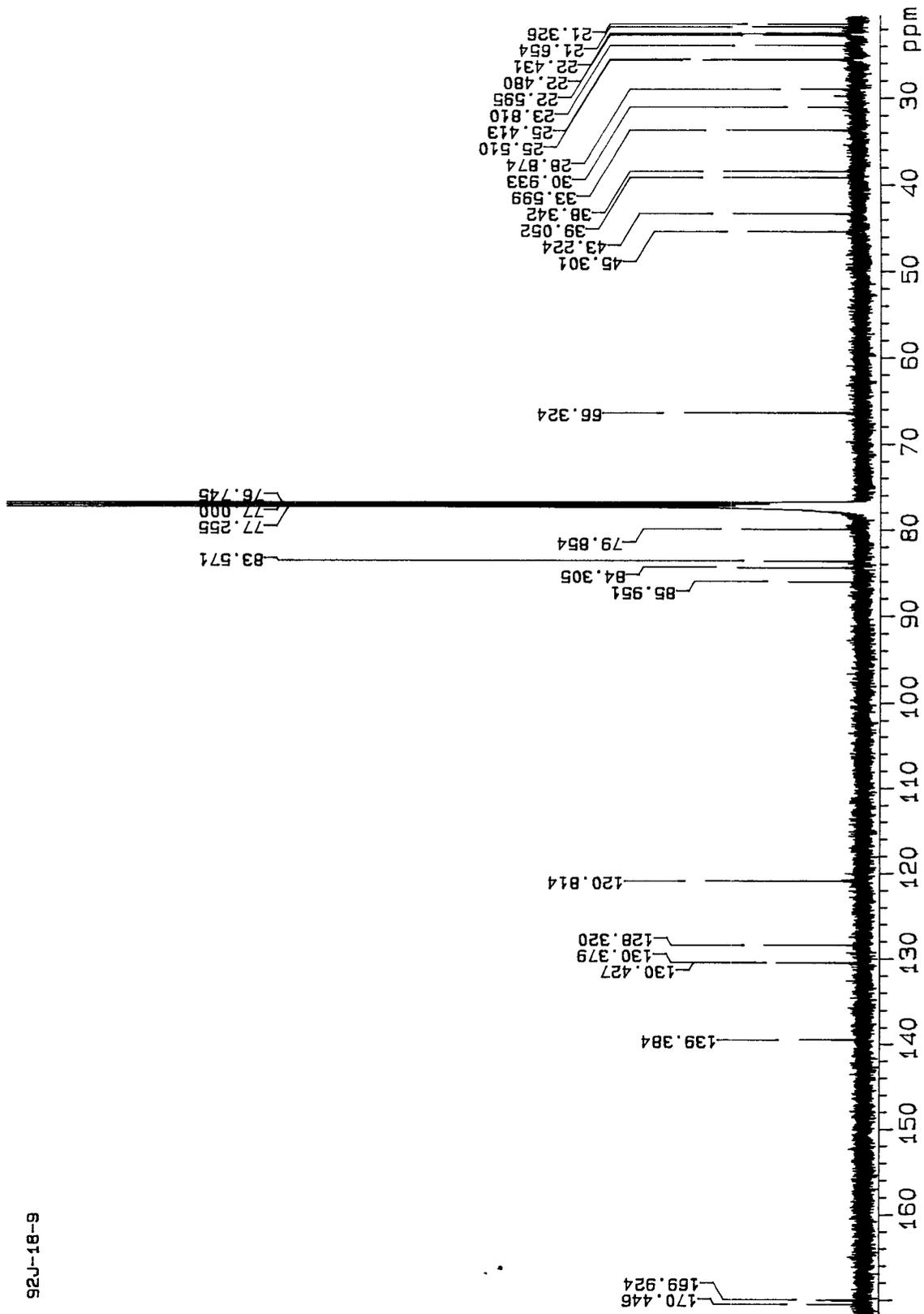


Fig. 2-67. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-9

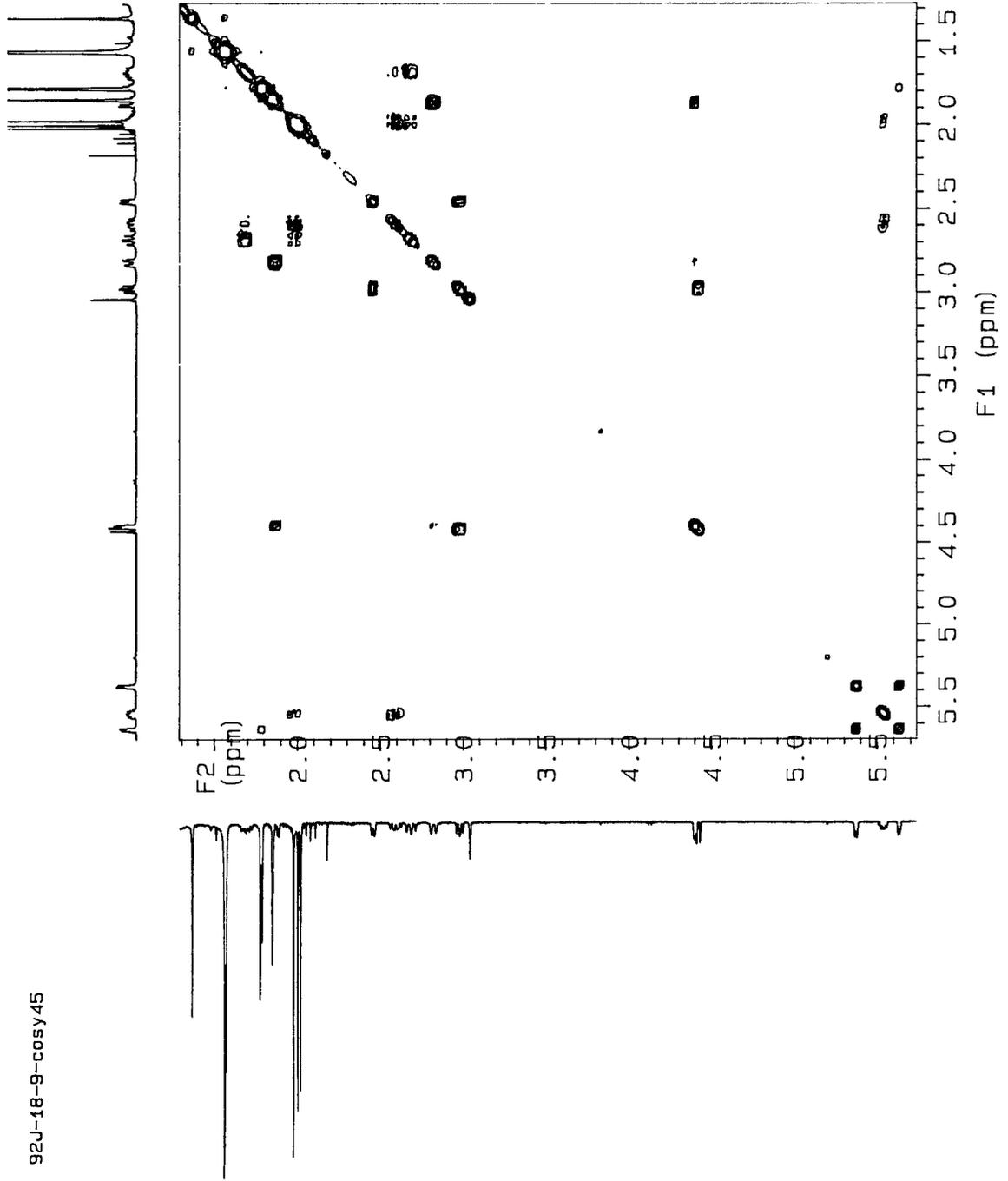


Fig. 2-68. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-9

92J-18-9
HMOC

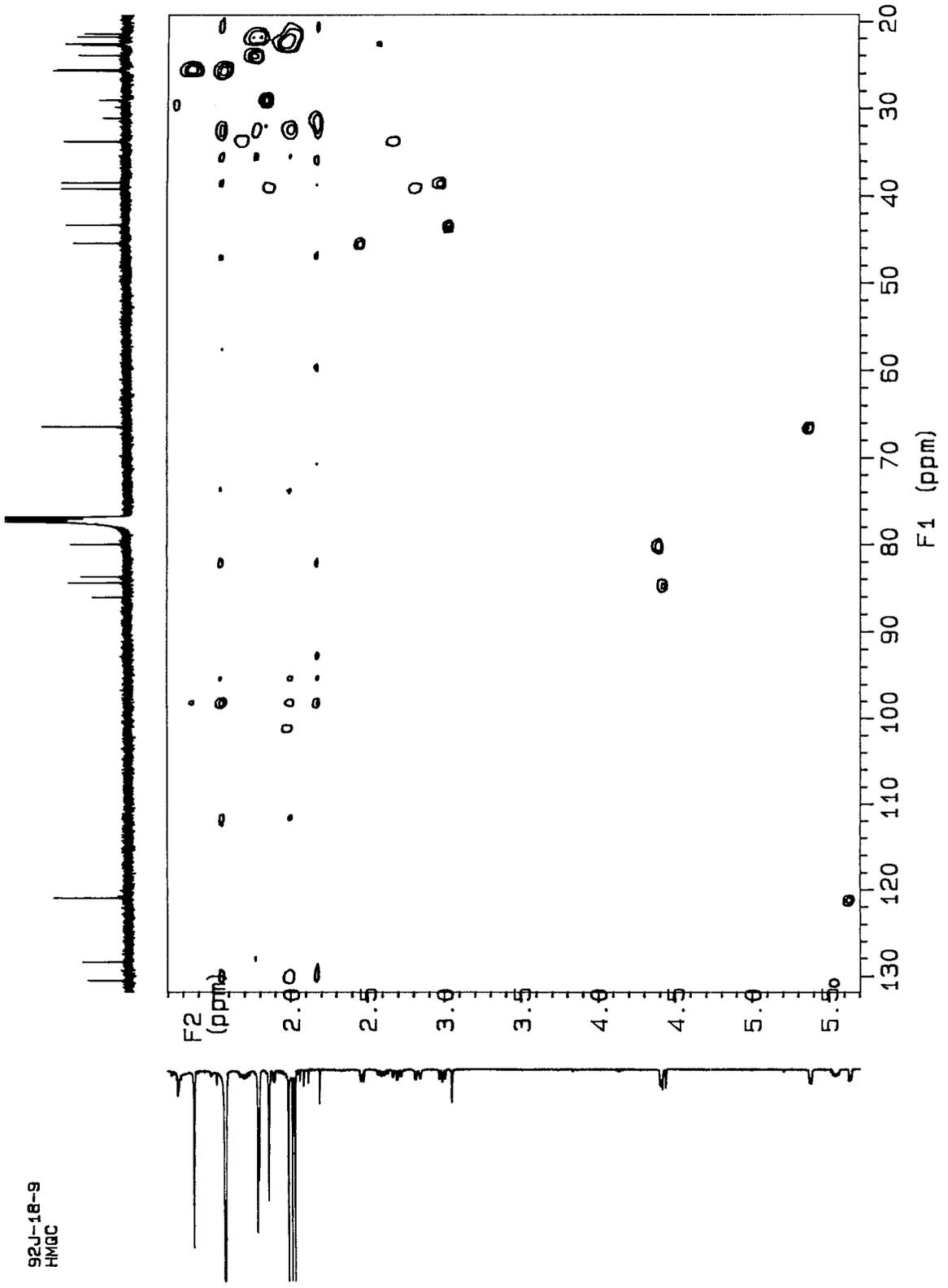


Fig. 2-69. HMQC spectrum of compound 92J-18-9

92J-18-9
HMBC
Upfield

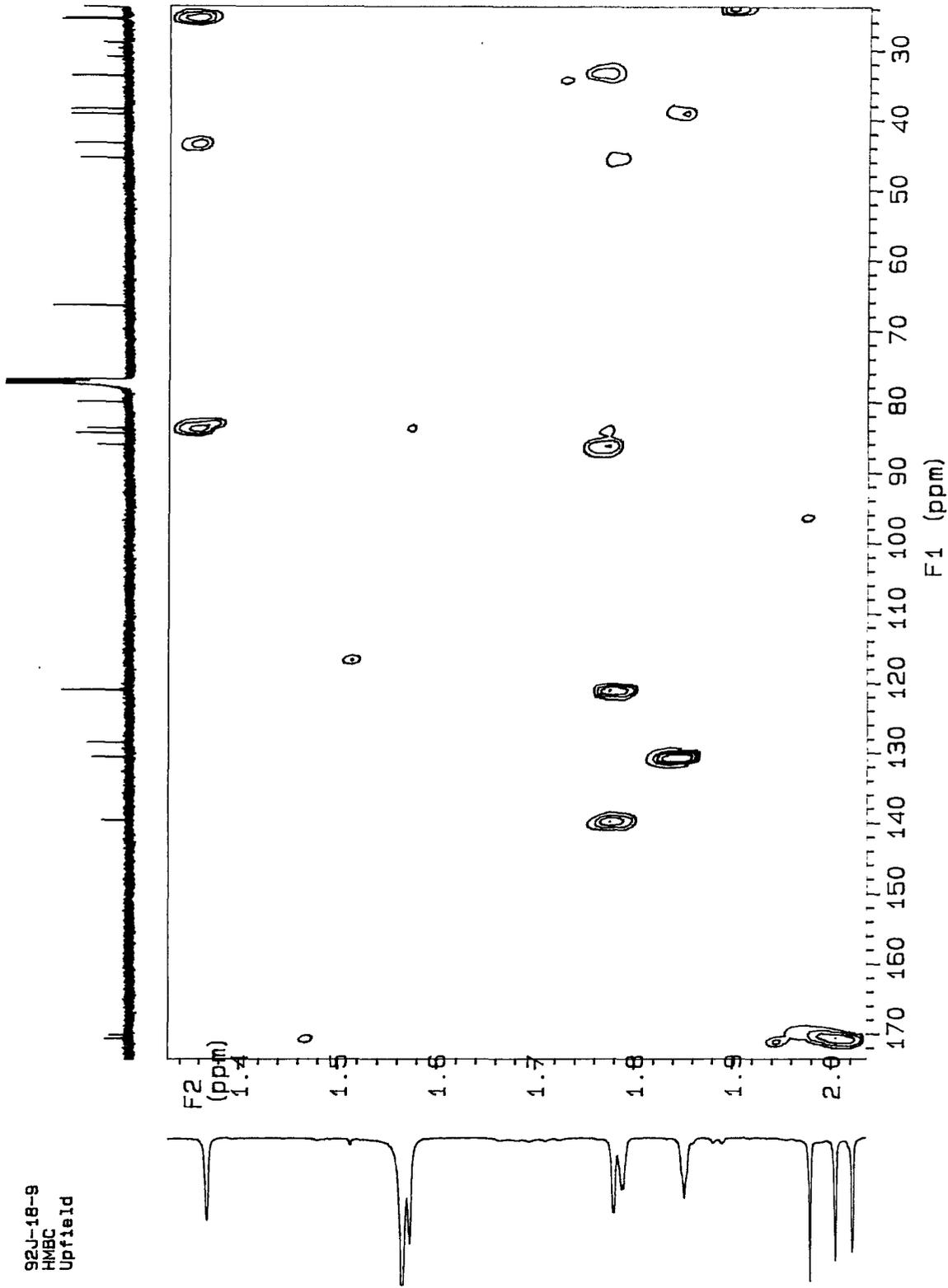


Fig. 2-70. HMBC spectrum of compound 92J-18-9

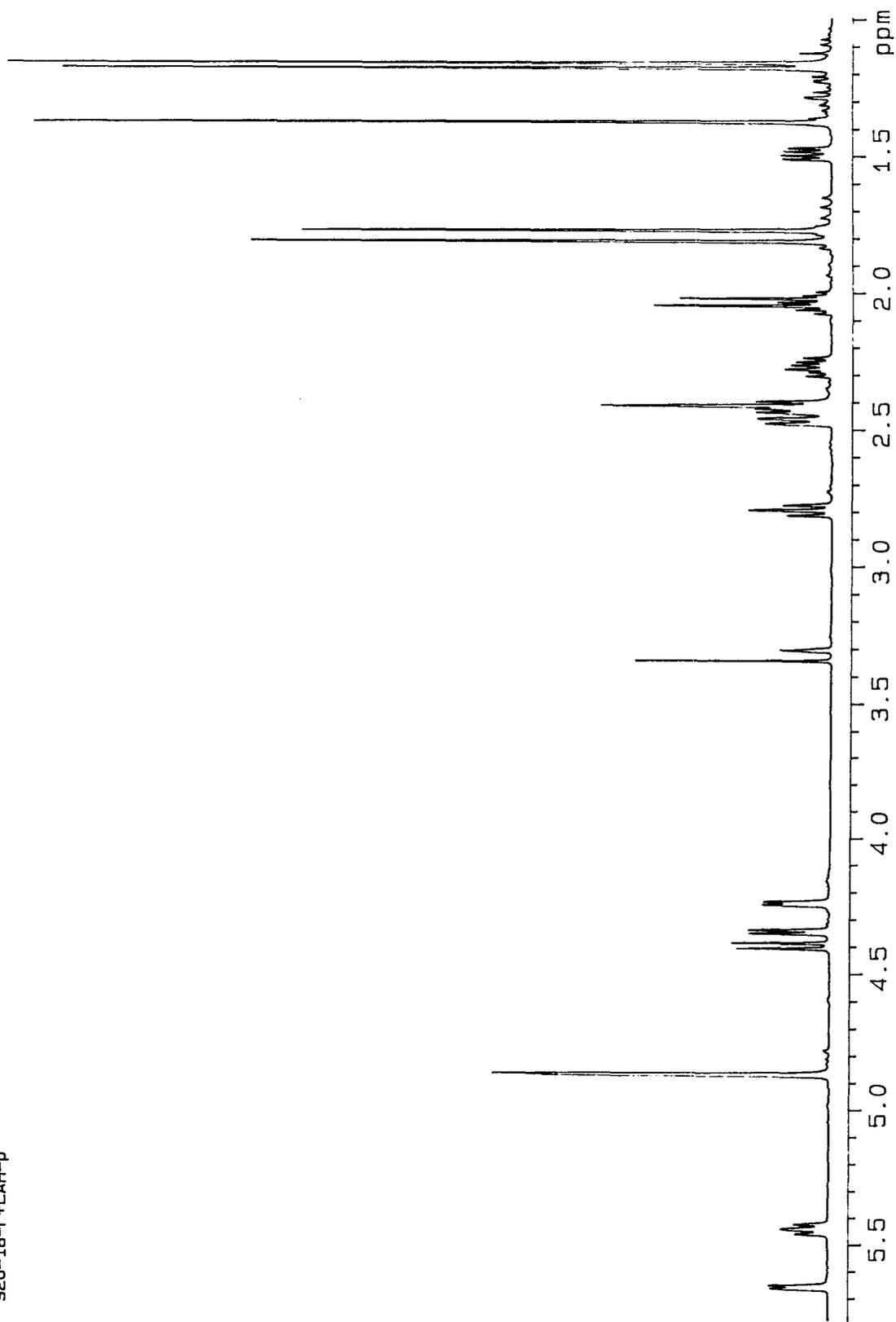


Fig. 2-71. Proton NMR spectrum of compound 92J-18-10

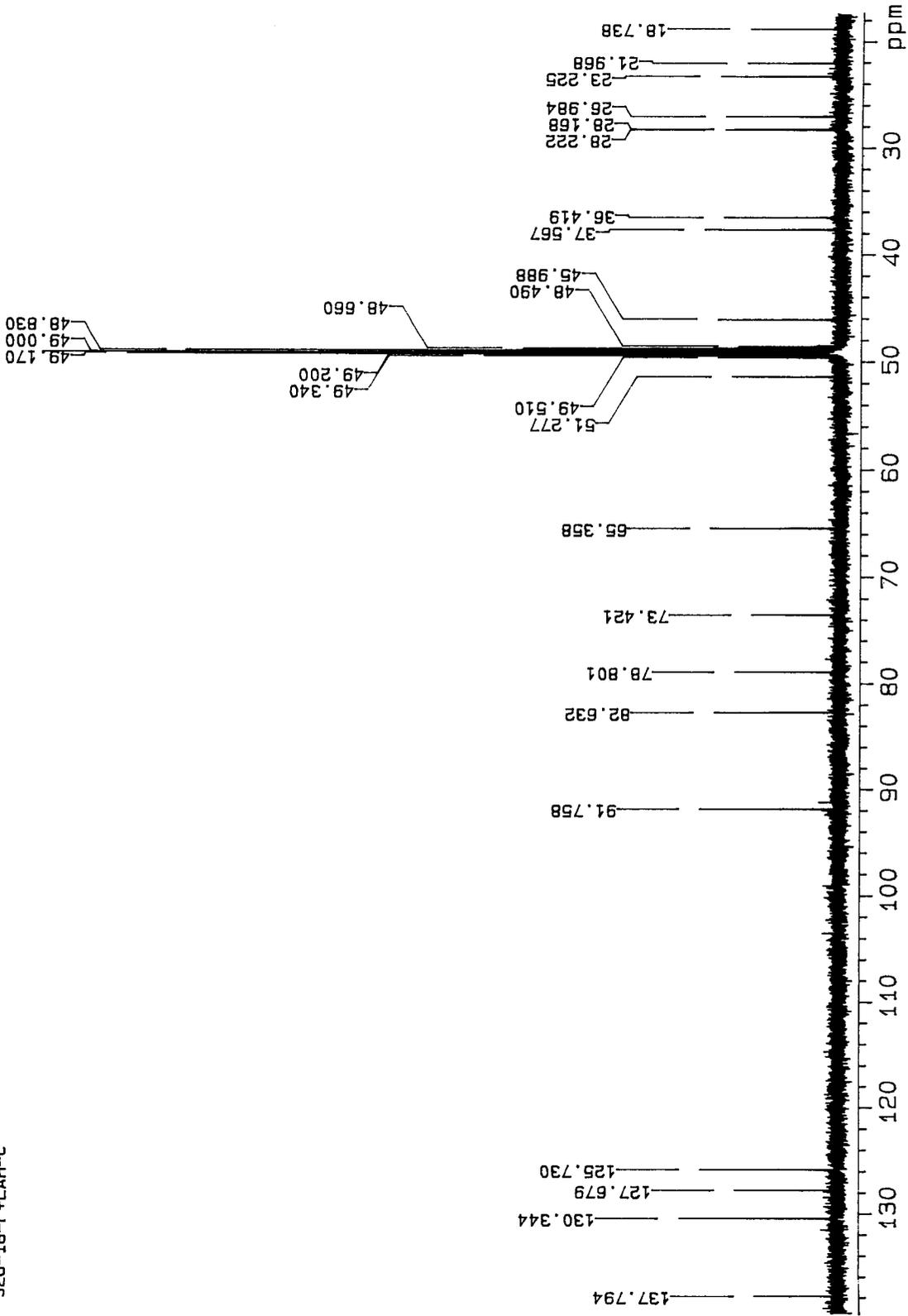


Fig. 2-72. Carbon NMR spectrum of compound 92J-18-10

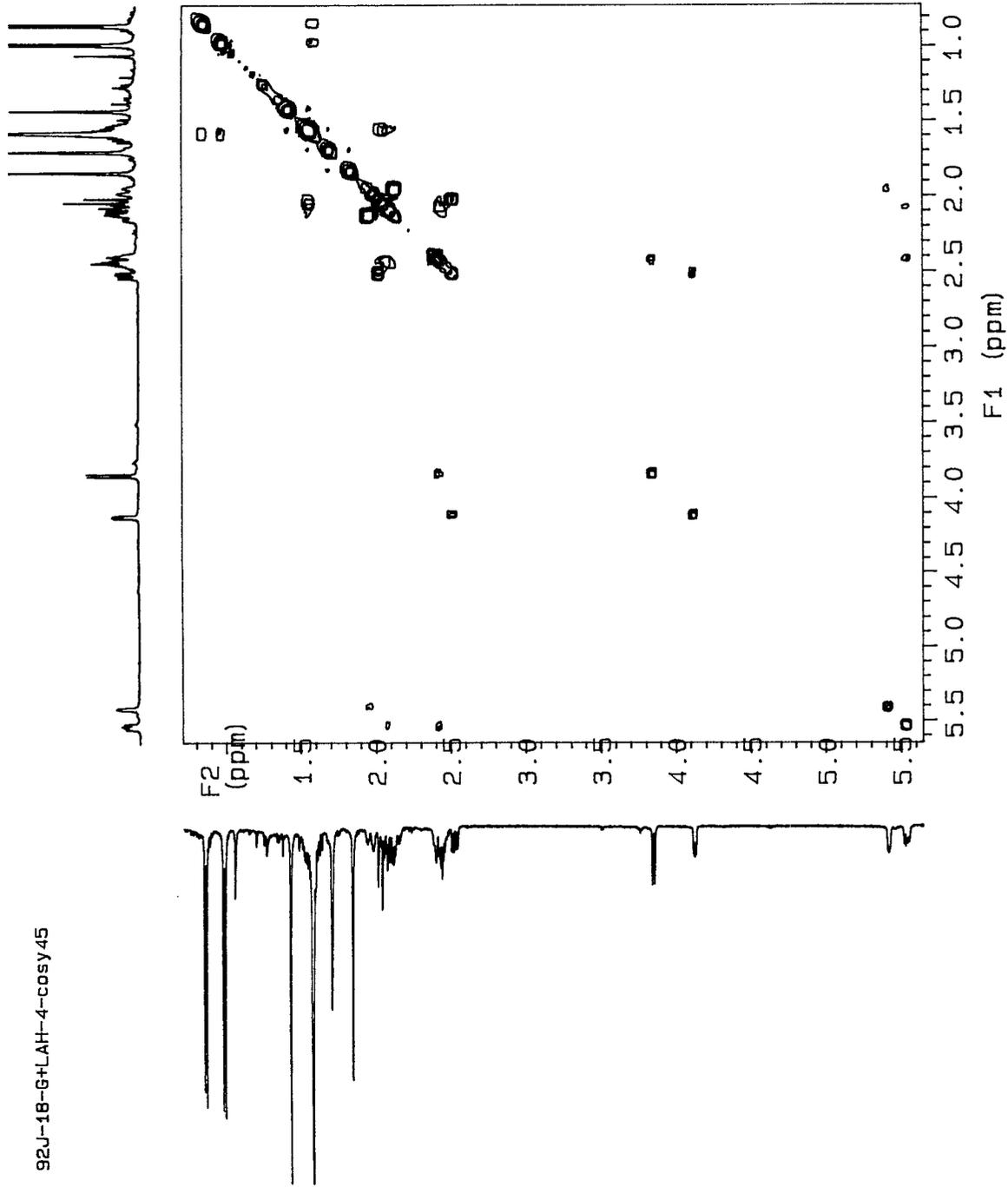


Fig. 2-73. Proton COSY spectrum of compound 92J-18-10

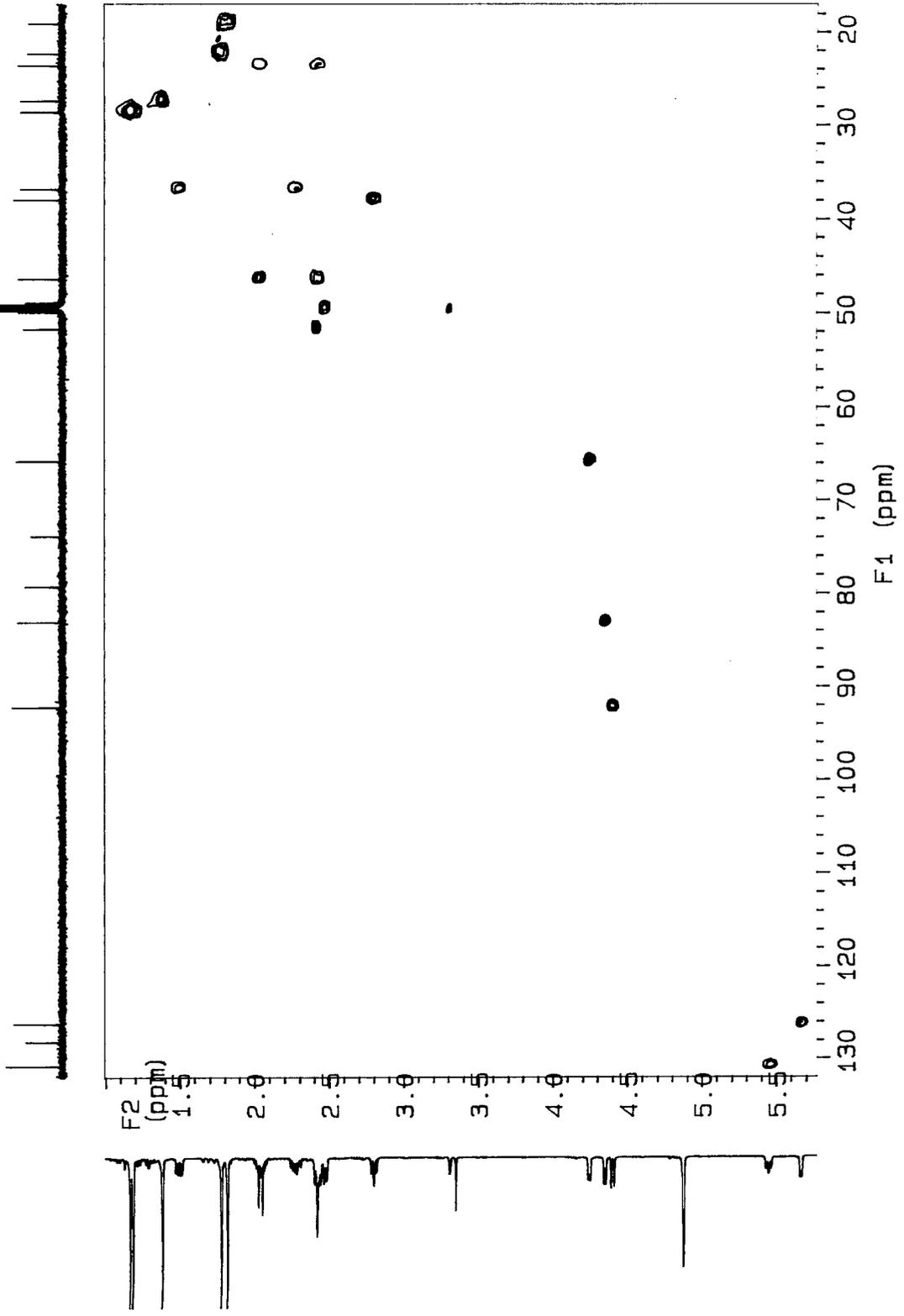


Fig. 2-74. HMQC spectrum of compound 92J-18-10

91-12-1
Guaiazulene

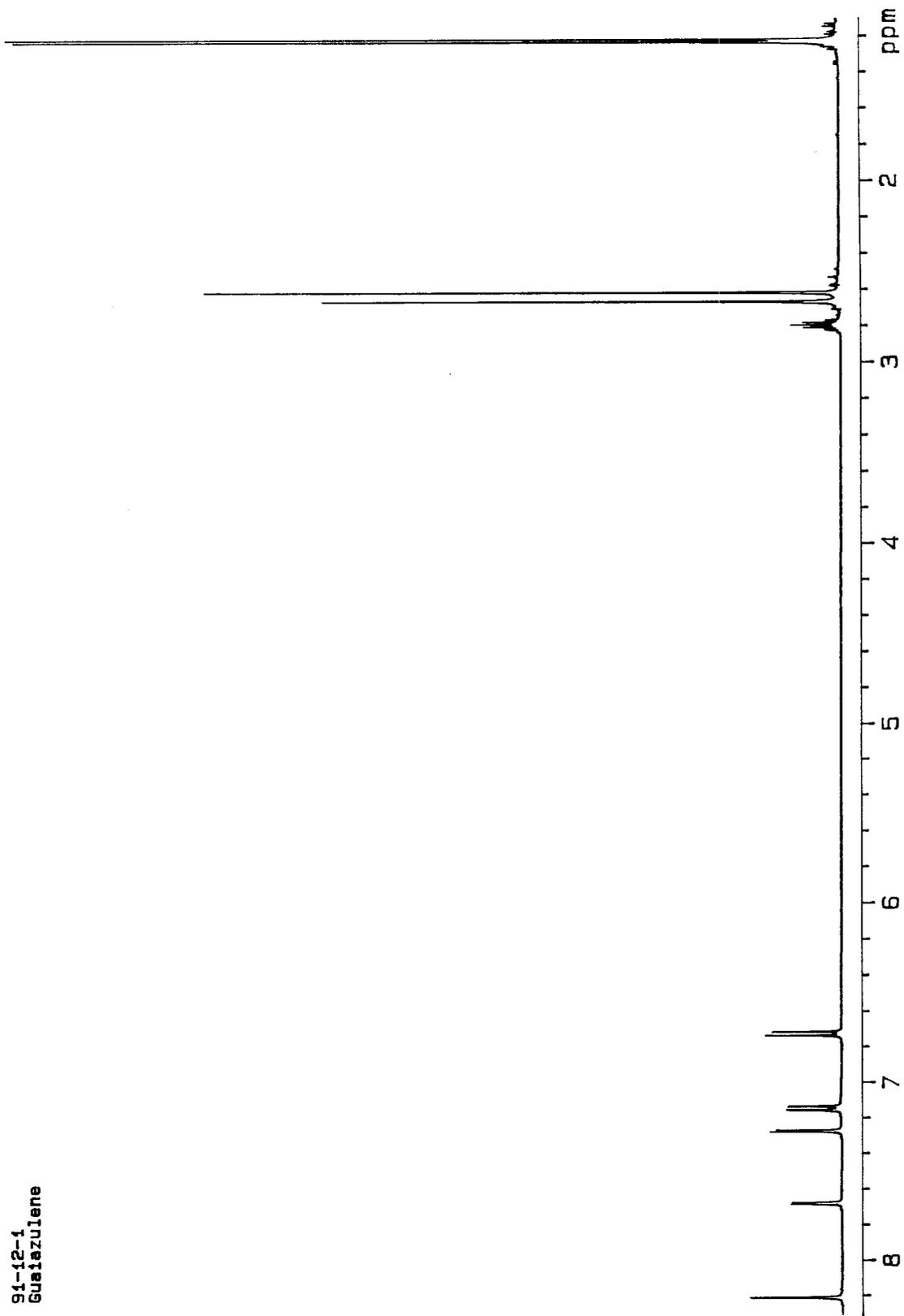


Fig. 2-75. Proton NMR spectrum of compound 91-12-1

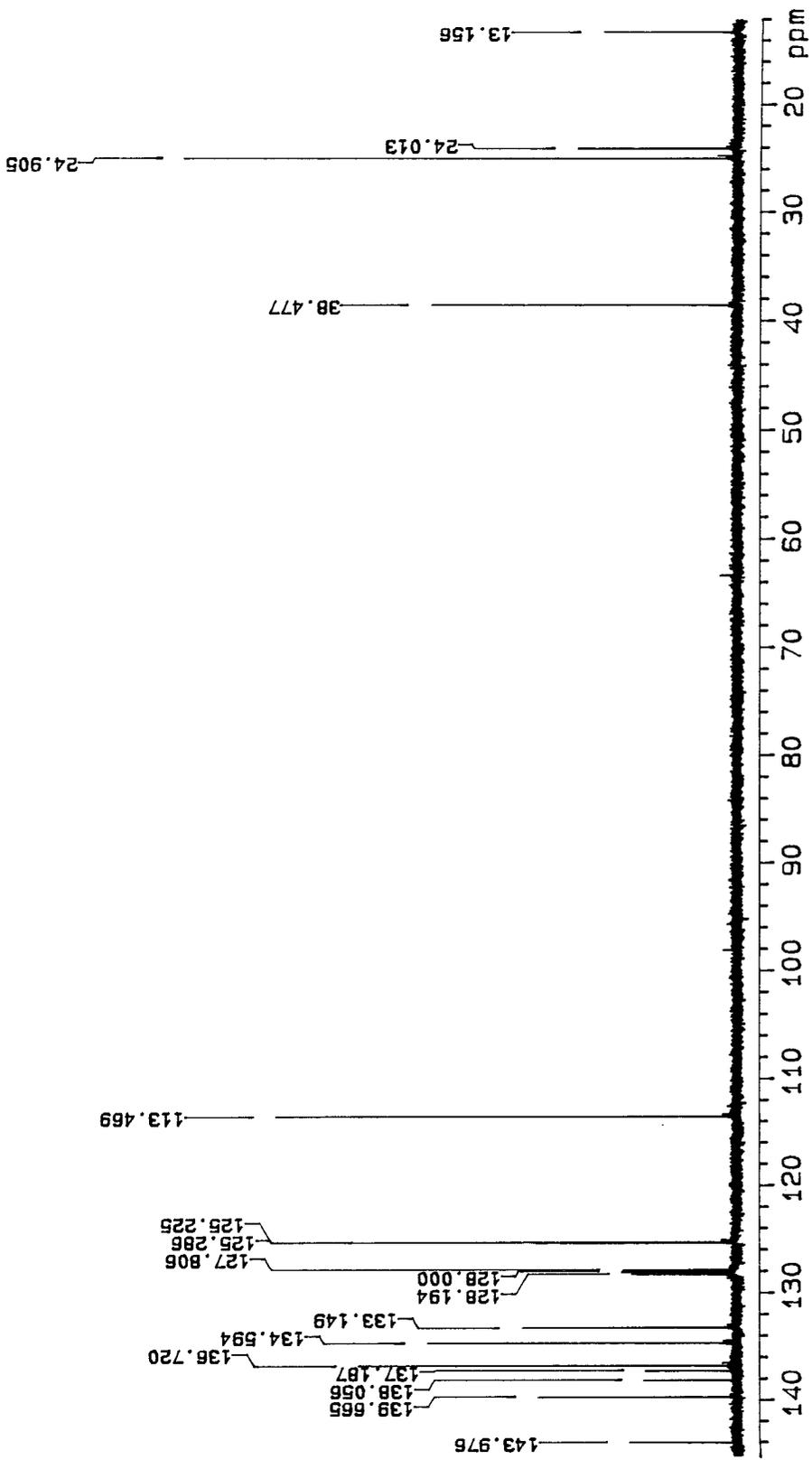


Fig. 2-76. Carbon NMR spectrum of compound 91-12-1

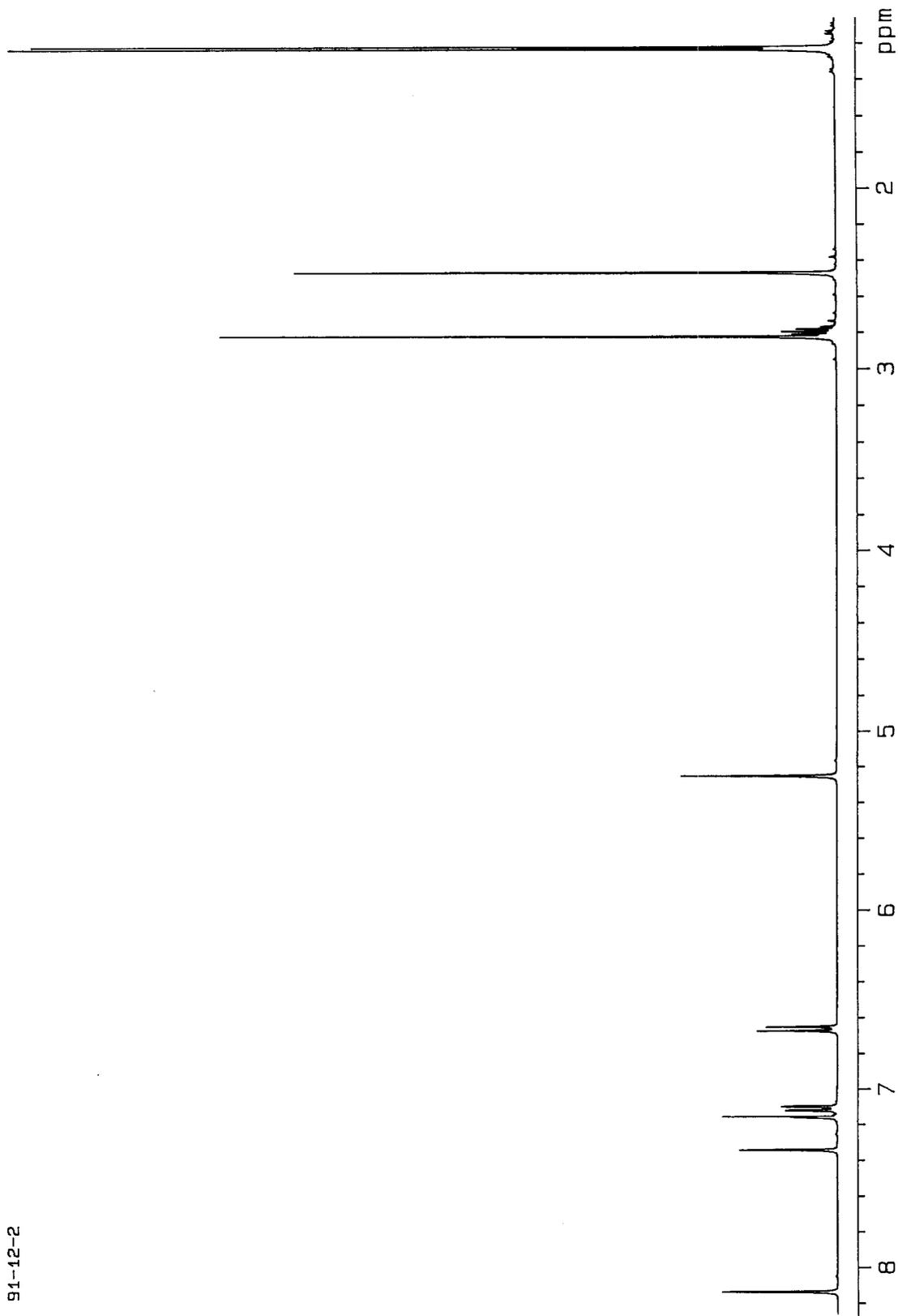


Fig. 2-77. Proton NMR spectrum of compound 91-12-2

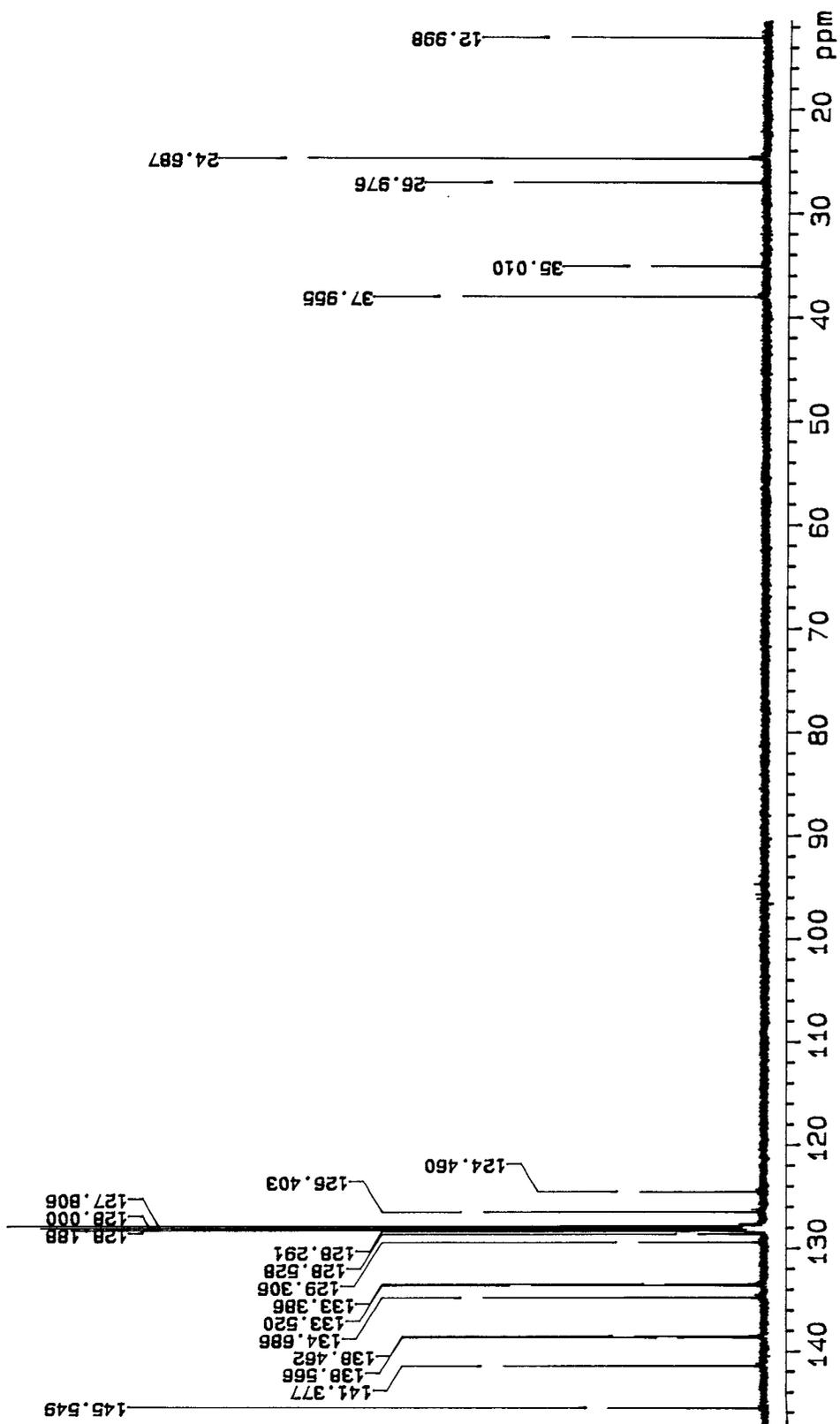


Fig. 2-78. Carbon NMR spectrum of compound 91-12-2

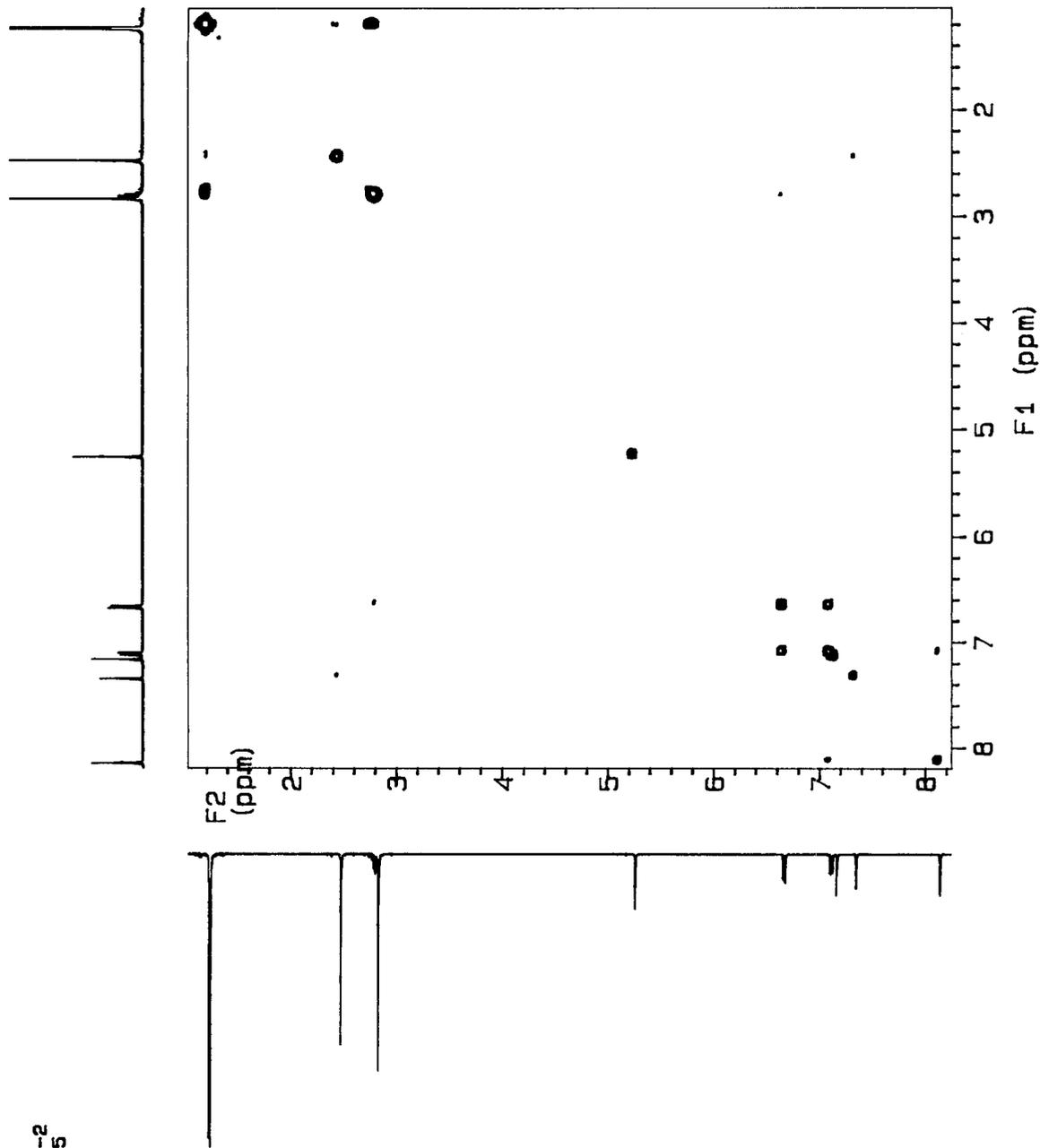


Fig. 2-79. Proton COSY spectrum of compound 91-12-2

91-12-2
HMOC

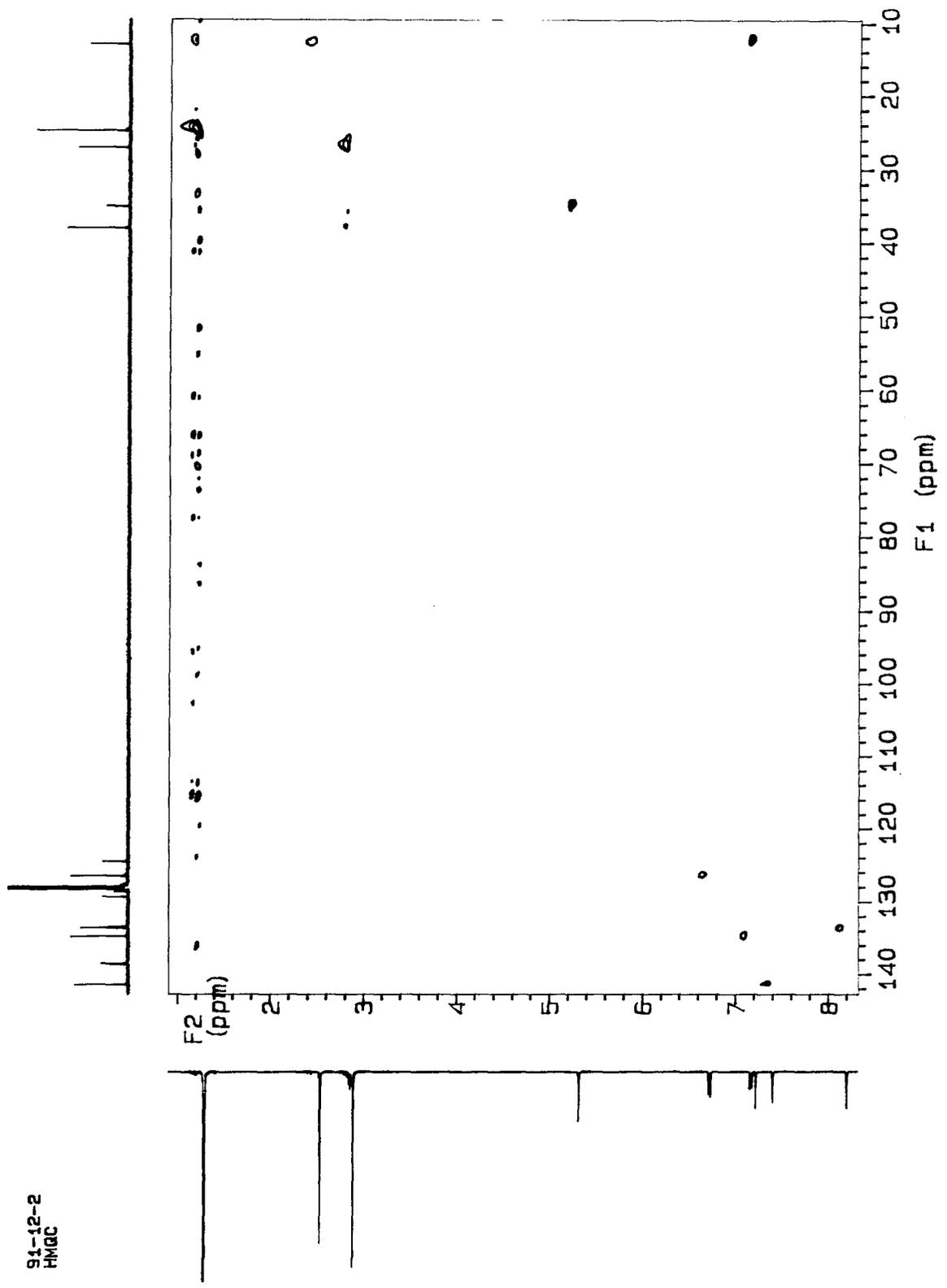


Fig. 2-80. HMOC spectrum of compound 91-12-2

91-12-2
HMBC
Upfield

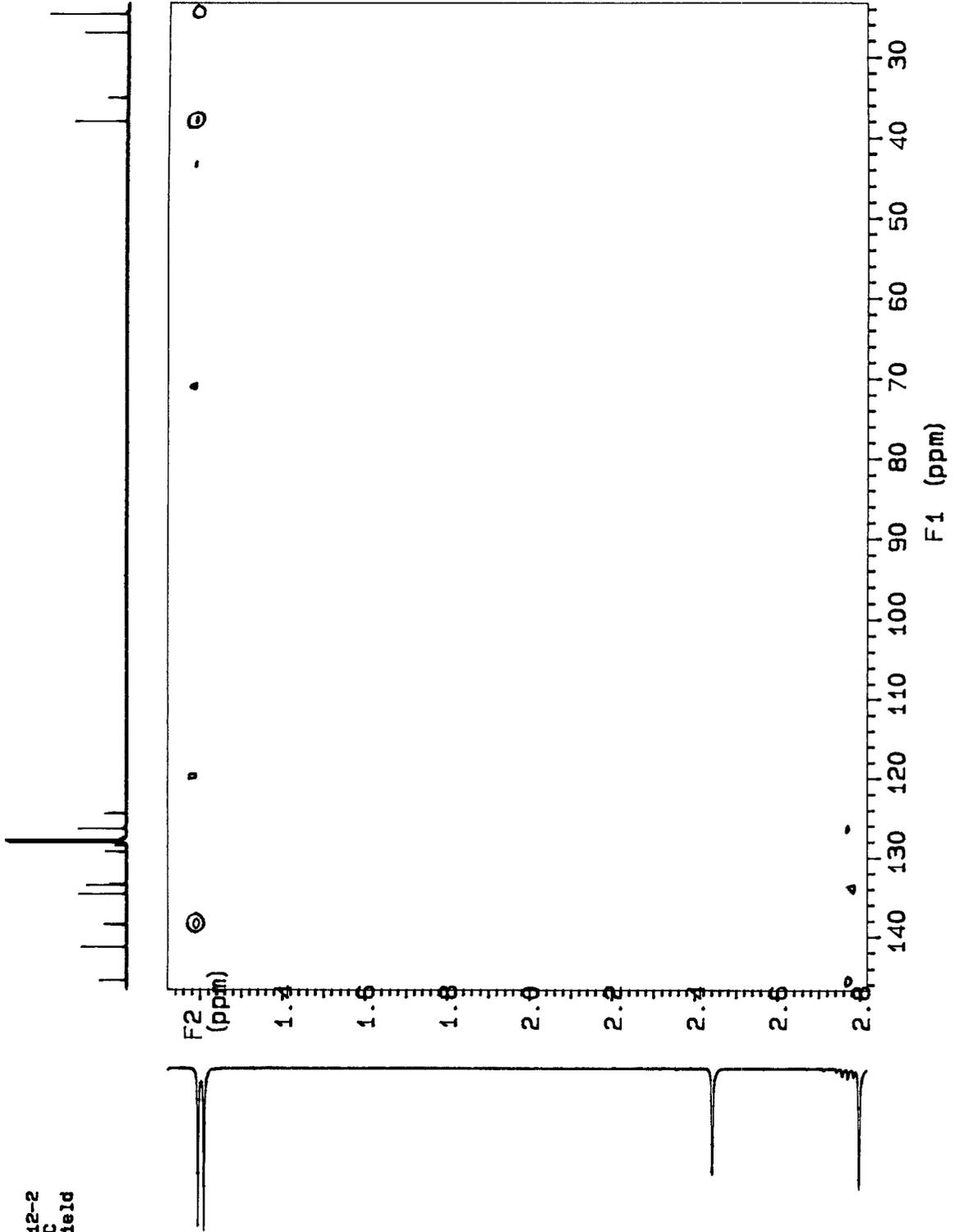


Fig. 2-81. HMBC spectrum of compound 91-12-2

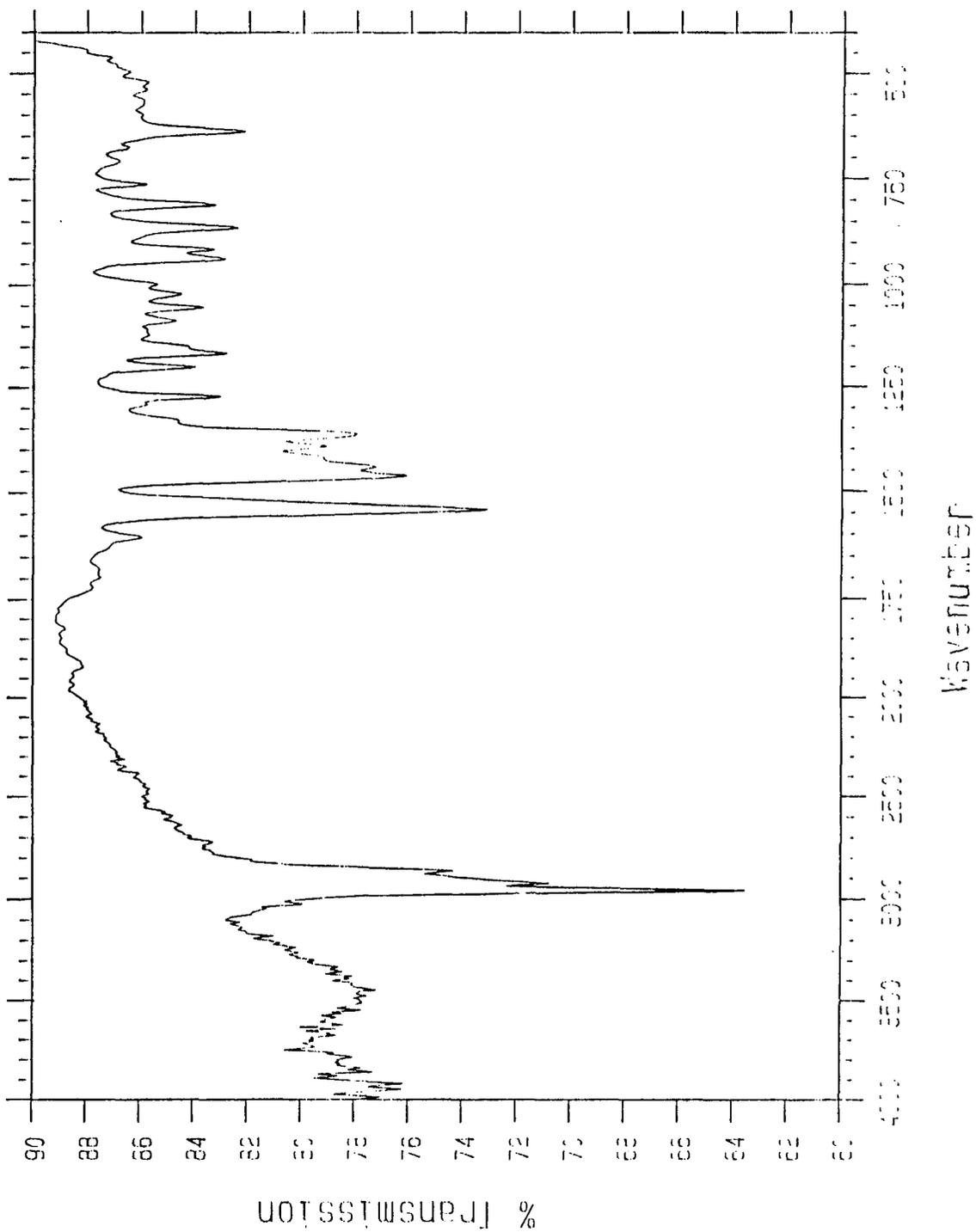


Fig. 2-82. IR spectrum of compound 91-12-2

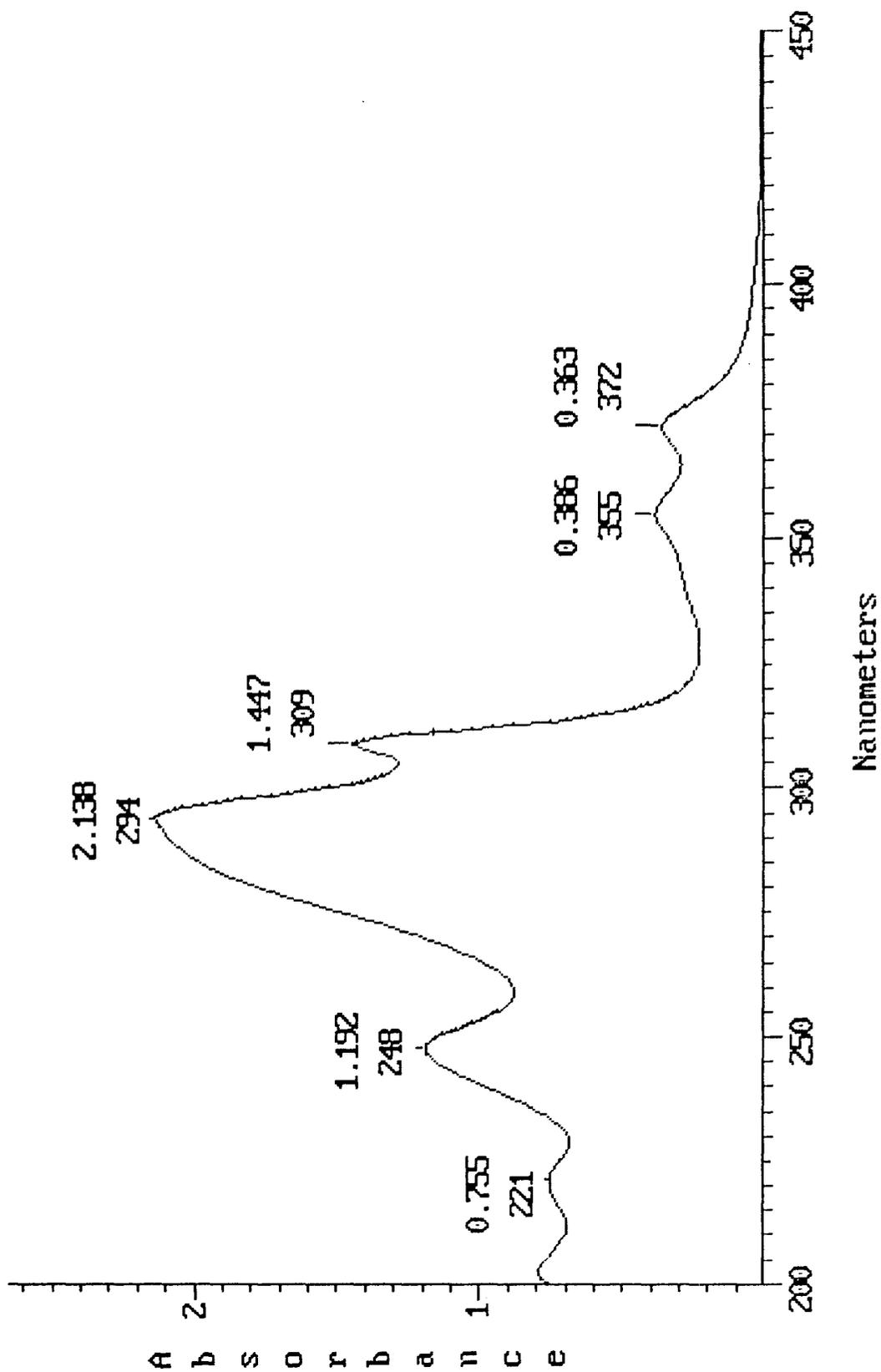


Fig. 2-83. UV spectrum of compound 91-12-2

File:12219405B Ident:71 Mer Def 0.25 Acq:21-DEC-1994 09:44:42 +3:35 Cal:12219401B_1
 70S EI+ Magnet BpM:198 BpI:526823 TIC:3736846 Flags:HALL
 File Text:Shin (KORDI) 91-12-C 50EV
 100%

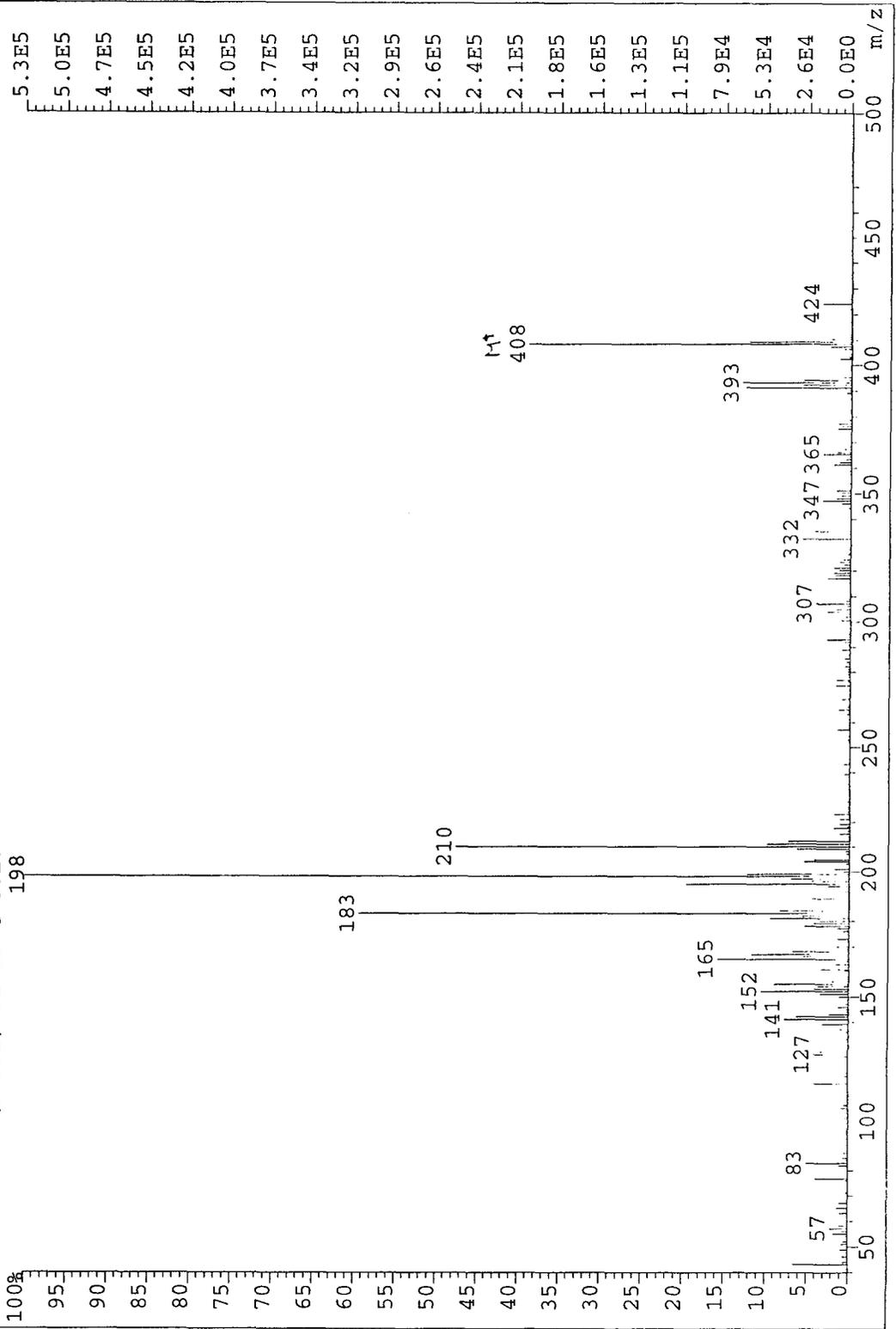


Fig. 2-84. High-resolution EIMS spectrum of 91-12-2

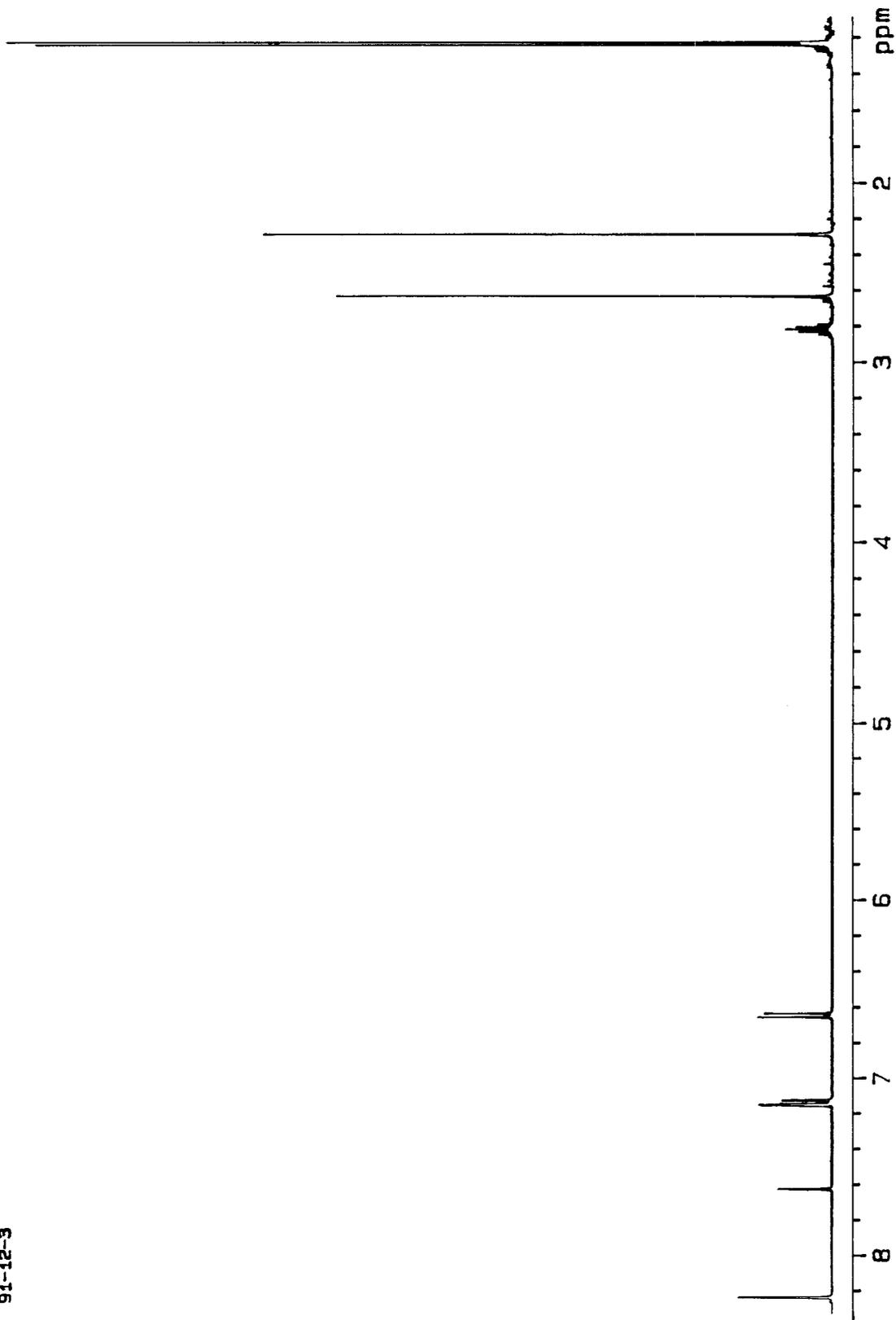


Fig. 2-85. Proton NMR spectrum of compound 91-12-3

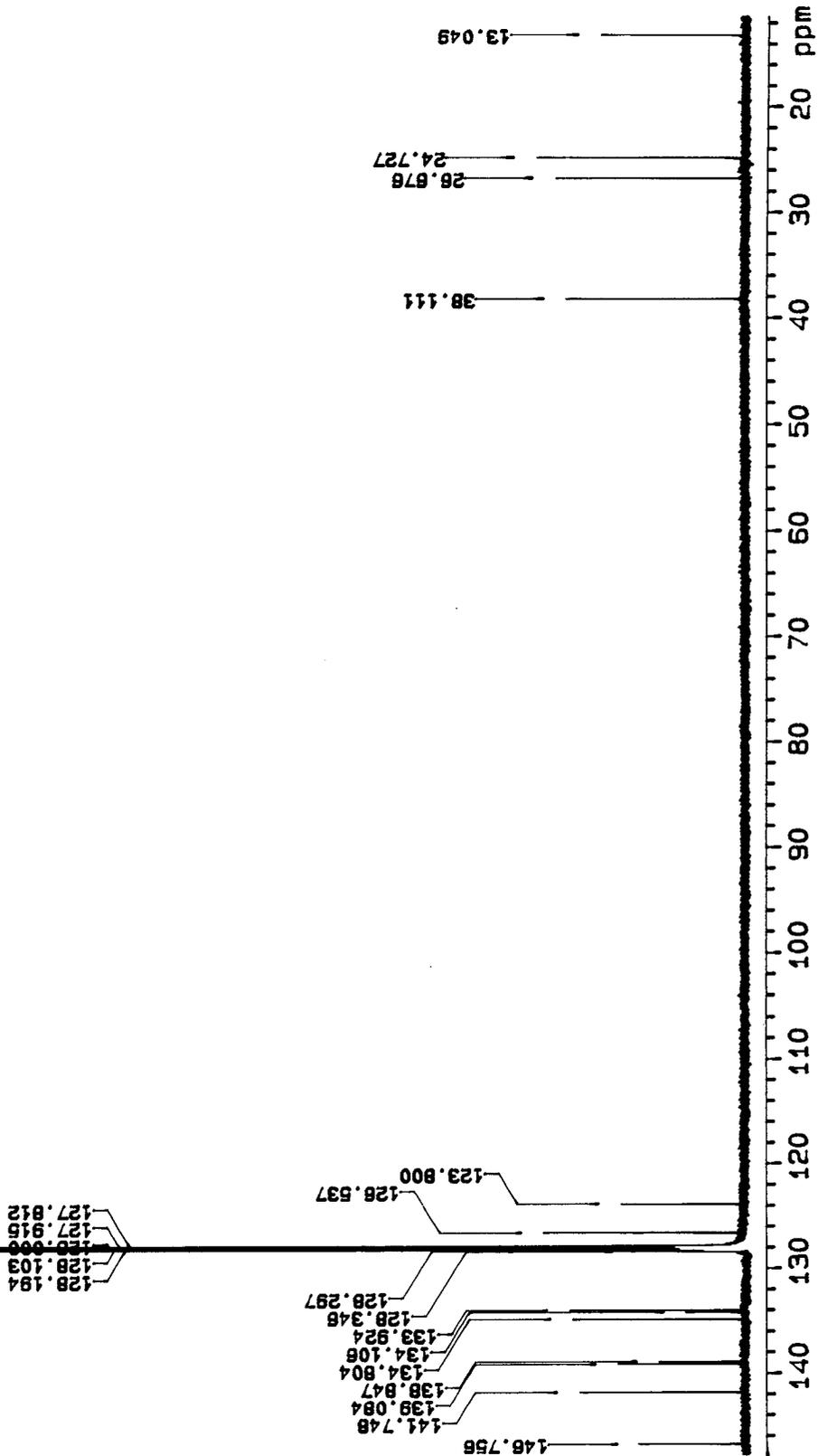


Fig. 2-86. Carbon NMR spectrum of compound 91-12-3

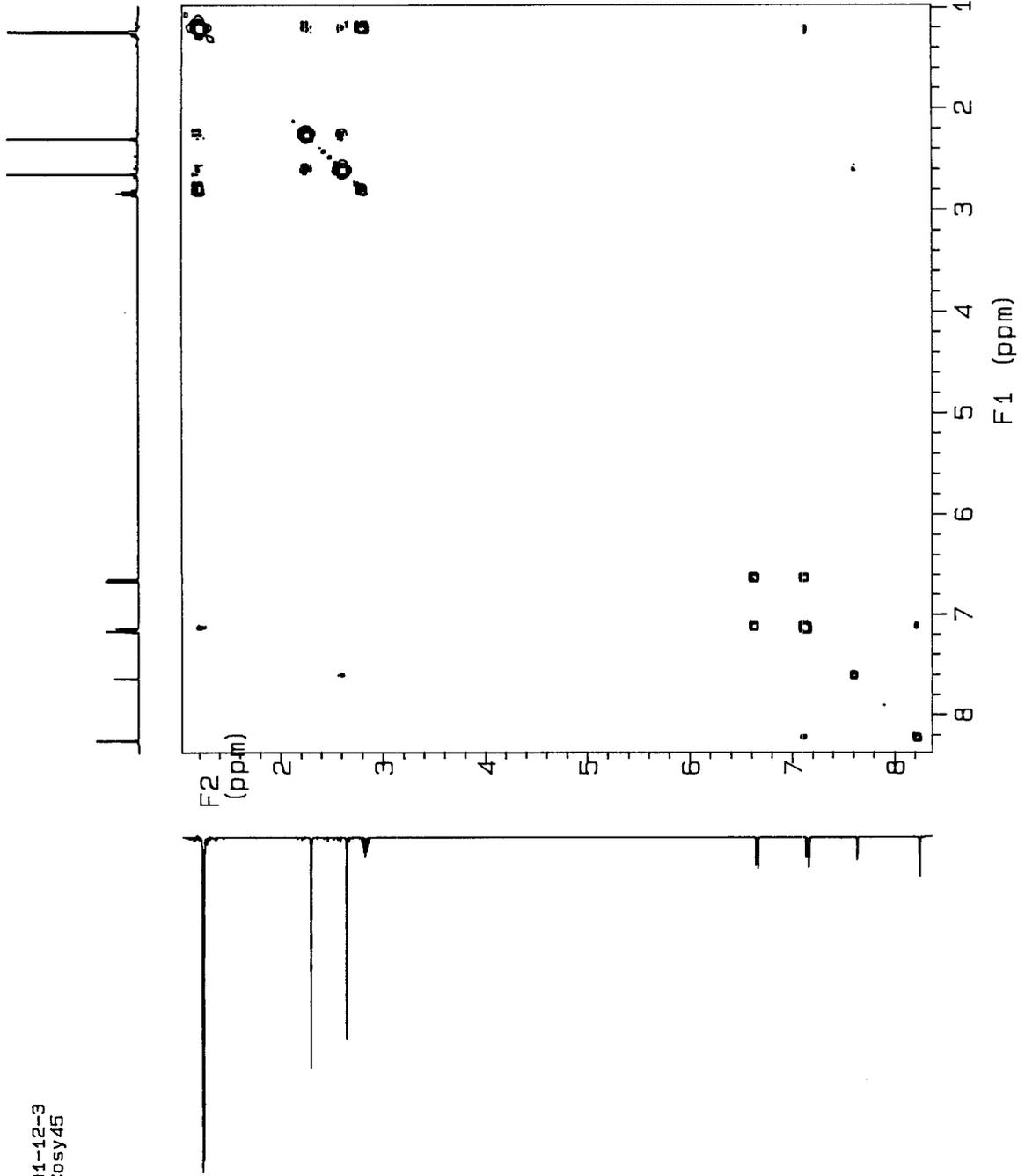


Fig. 2-87. Proton COSY spectrum of compound 91-12-3

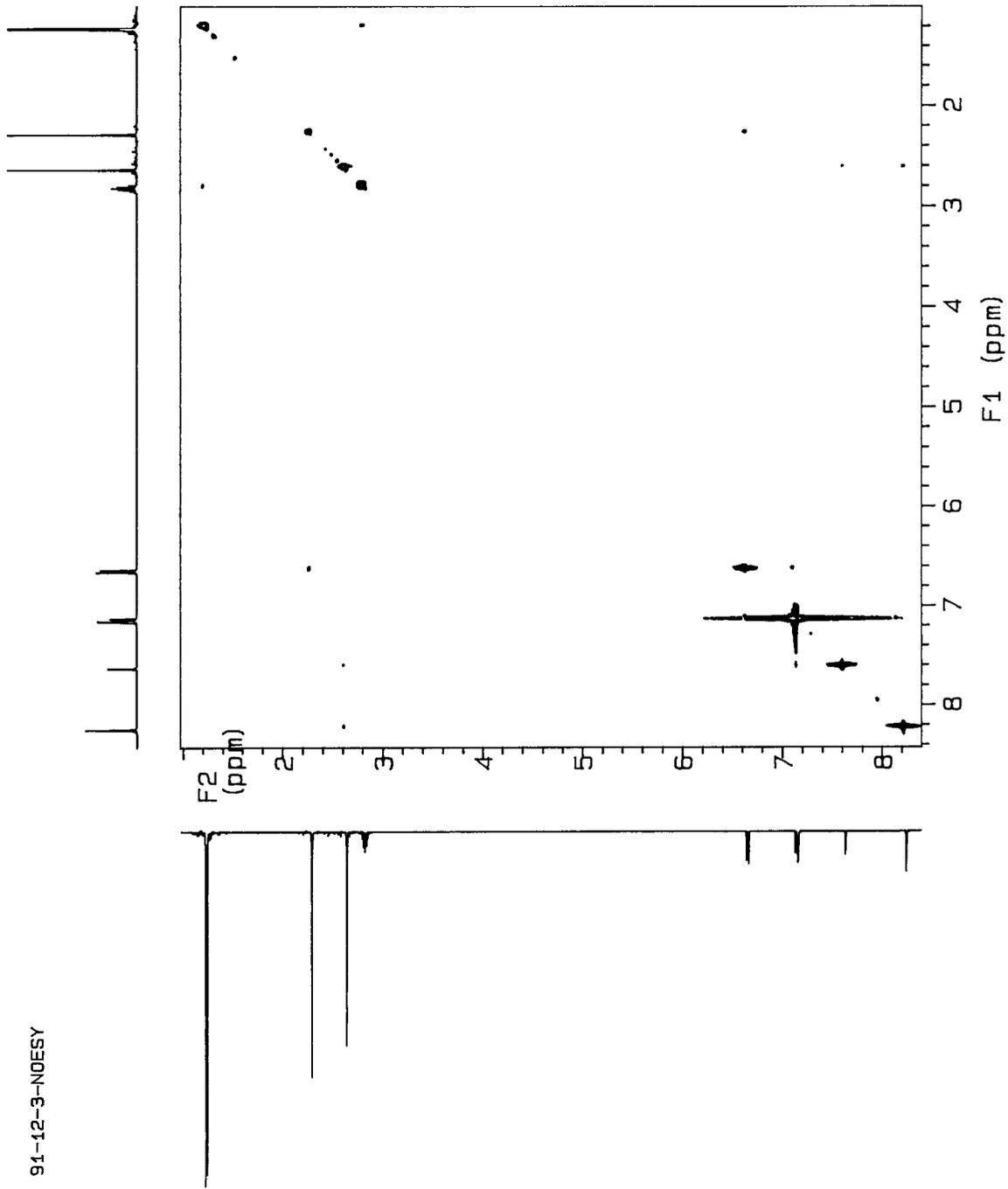


Fig. 2-88. NOESY spectrum of compound 91-12-3

91-12-3
HMQC

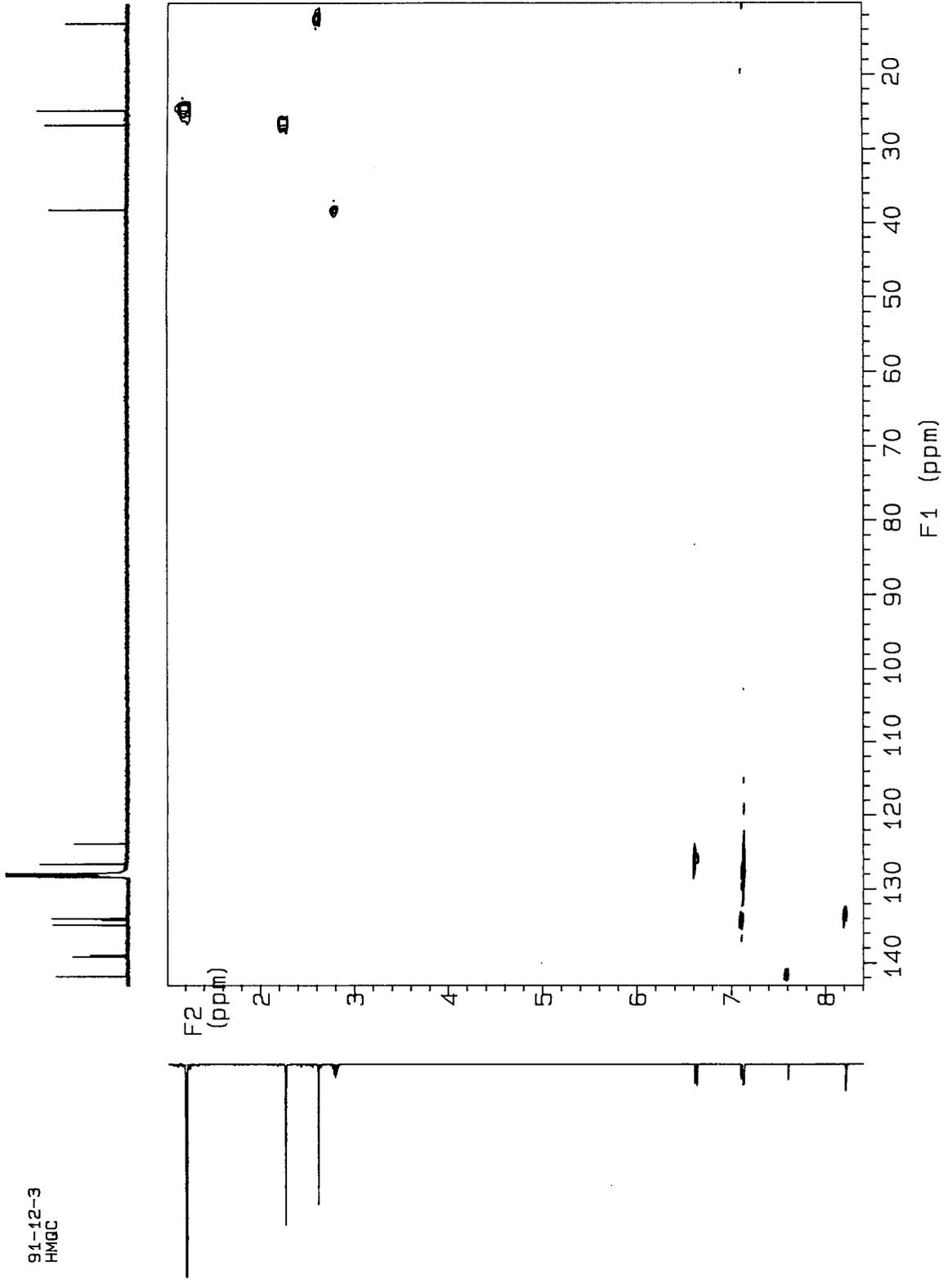


Fig. 2-89. HMQC spectrum of compound 91-12-3

91-12-3
HMBC
Upfield

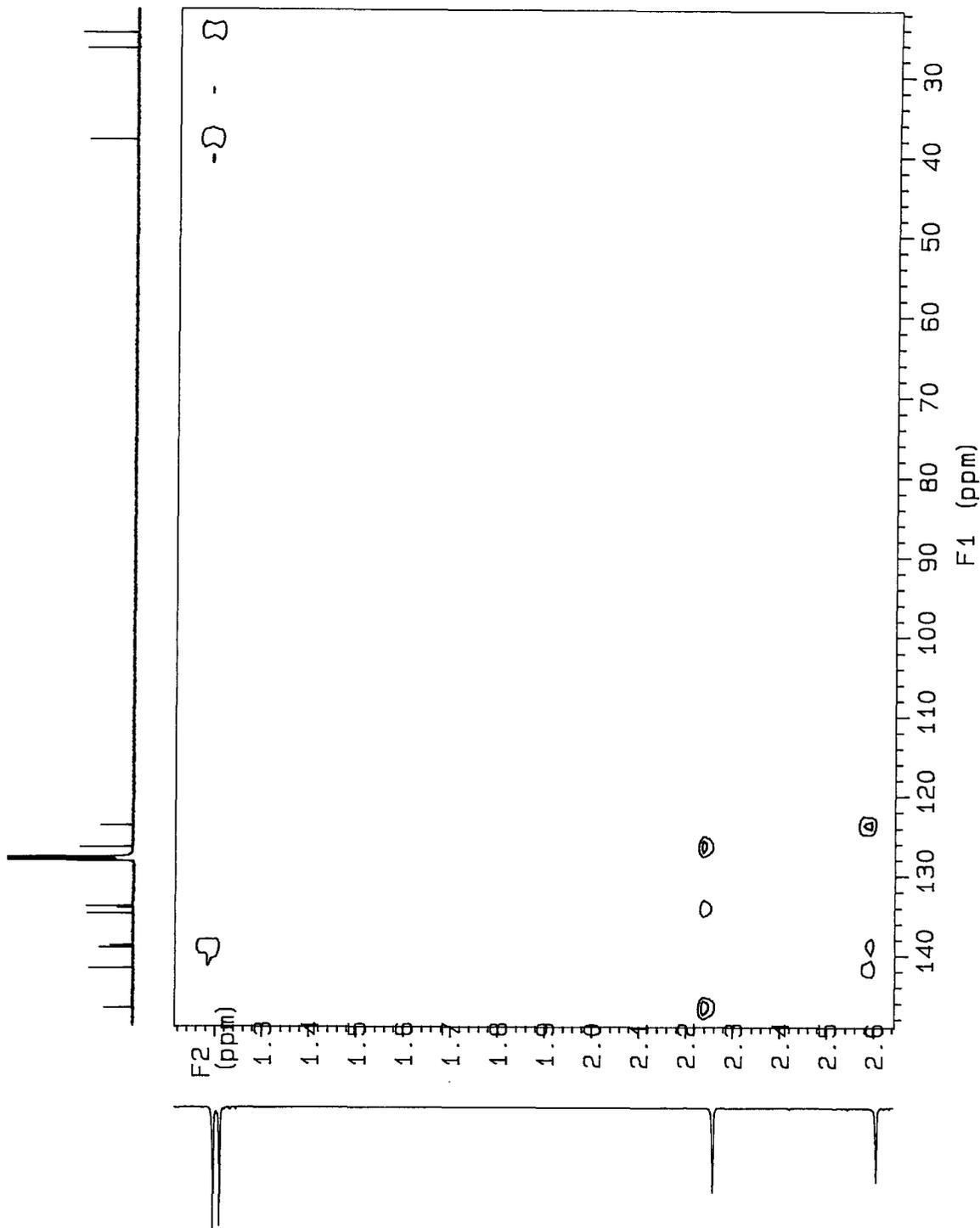
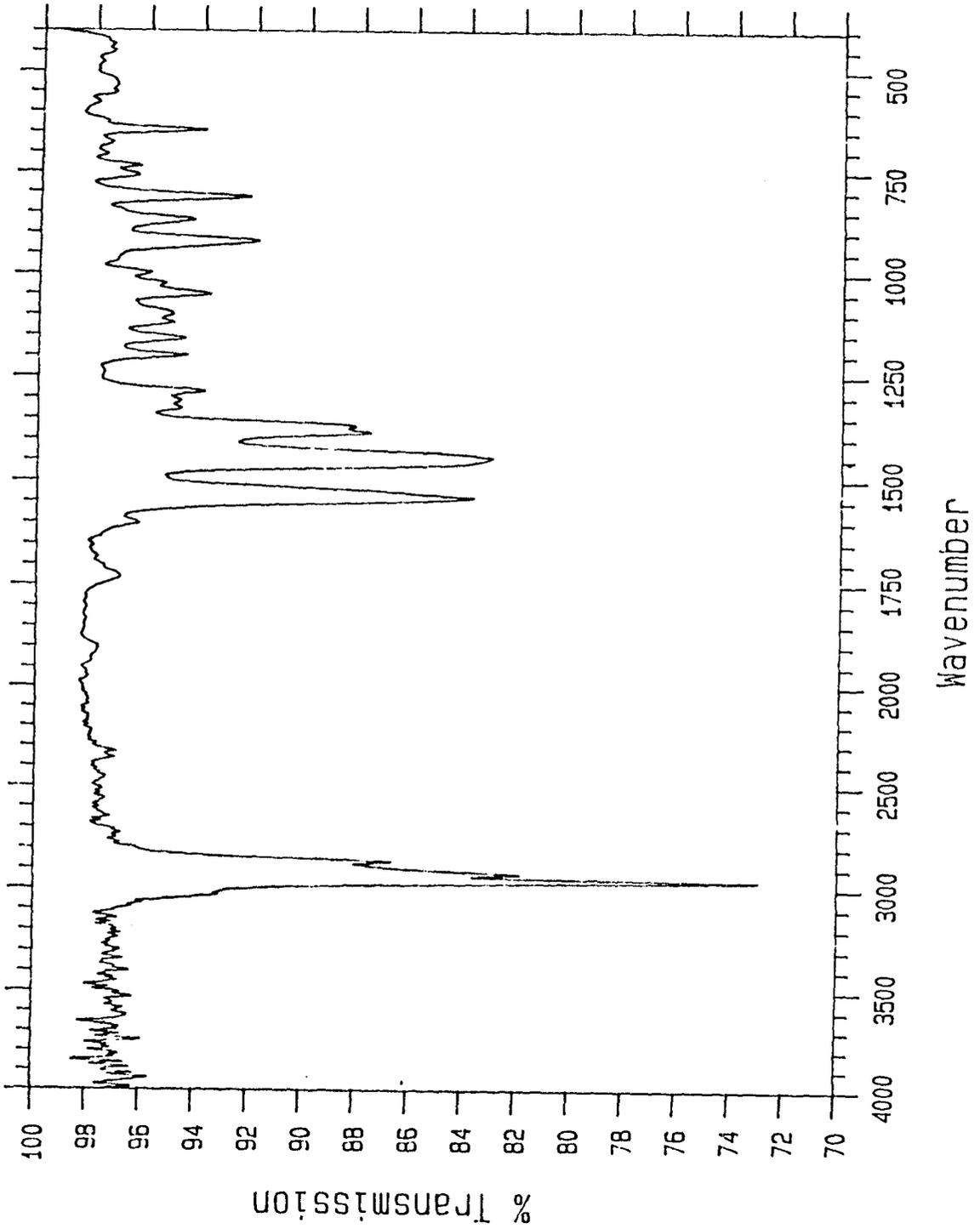


Fig. 2-90. HMBC spectrum of compound 91-12-3

Mattson Instruments FTIR



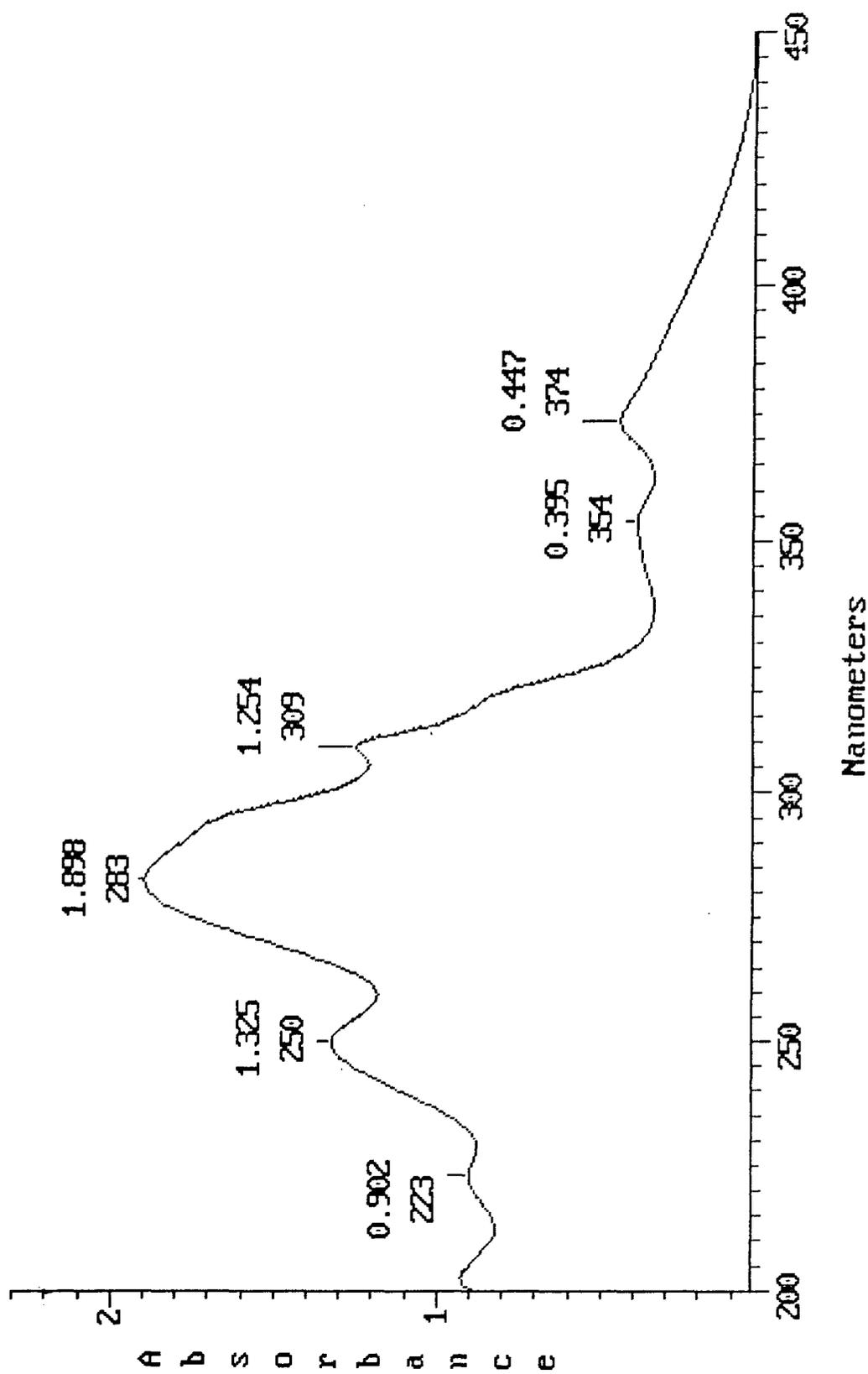


Fig. 2-92. UV spectrum of compound 91-12-3

File:12219403B Ident:43 Mer Def 0.25 Acq:21-DEC-1994 08:53:35 +2:10 Cal:12219401B_1
 70S EI+ Magnet BpM:394 BpI:38688 TIC:180266 Flags:HALL
 File Text:Shin (KORDI) 91-12-B 50EV

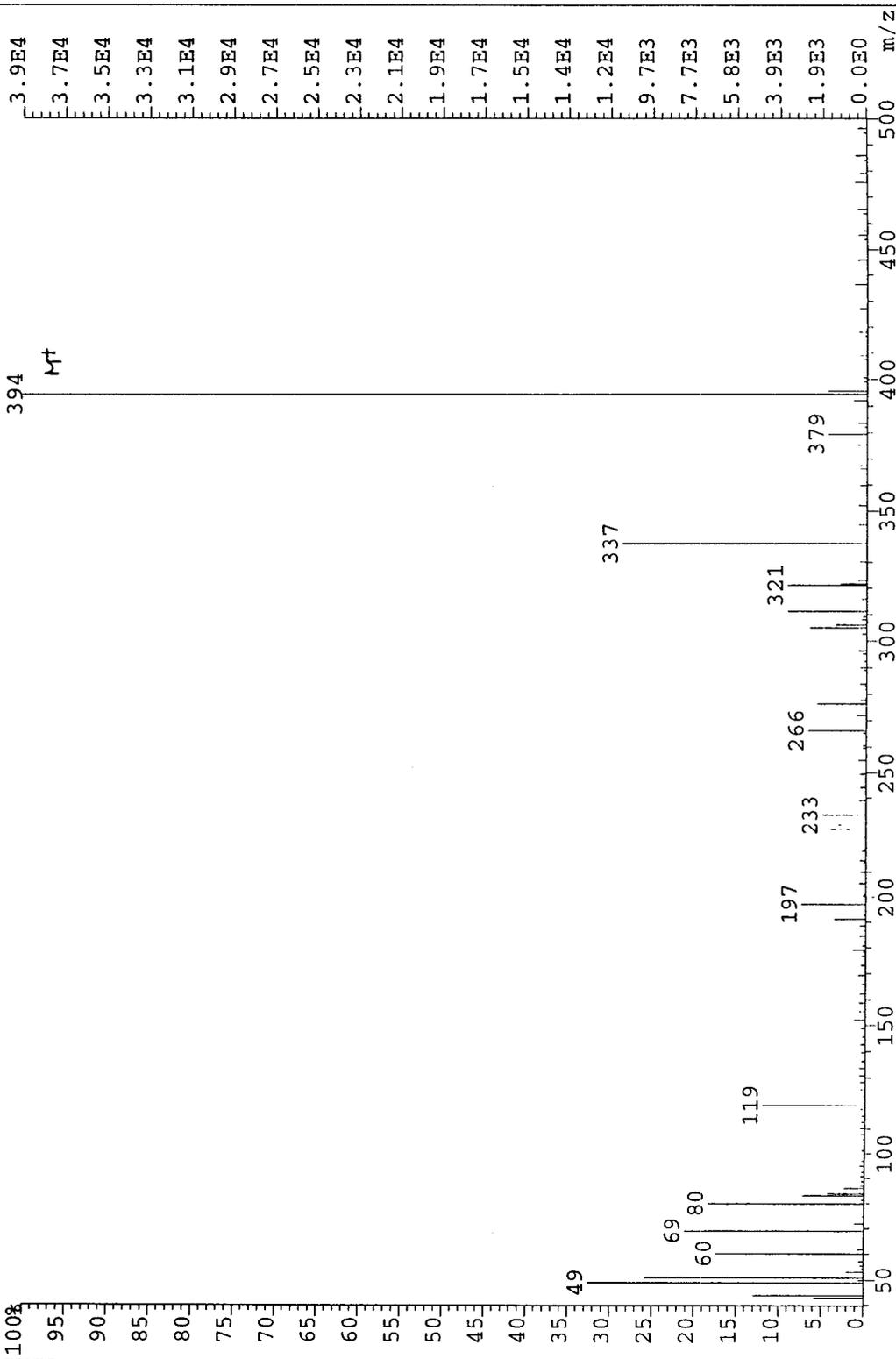


Fig. 2-93. High-resolution EIMS spectrum of 91-12-3

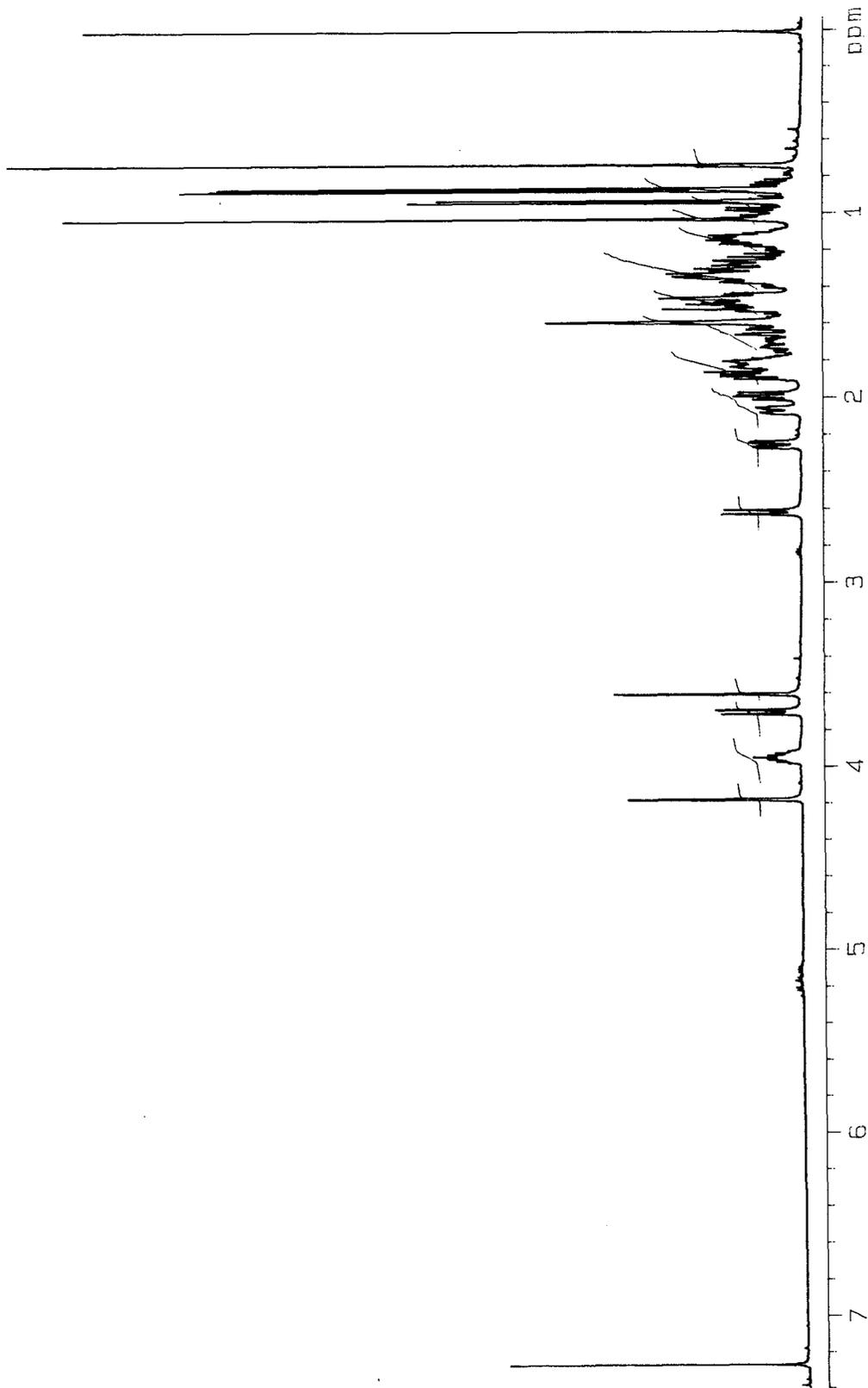


Fig. 2-94. Proton NMR spectrum of compound 94K-1-1

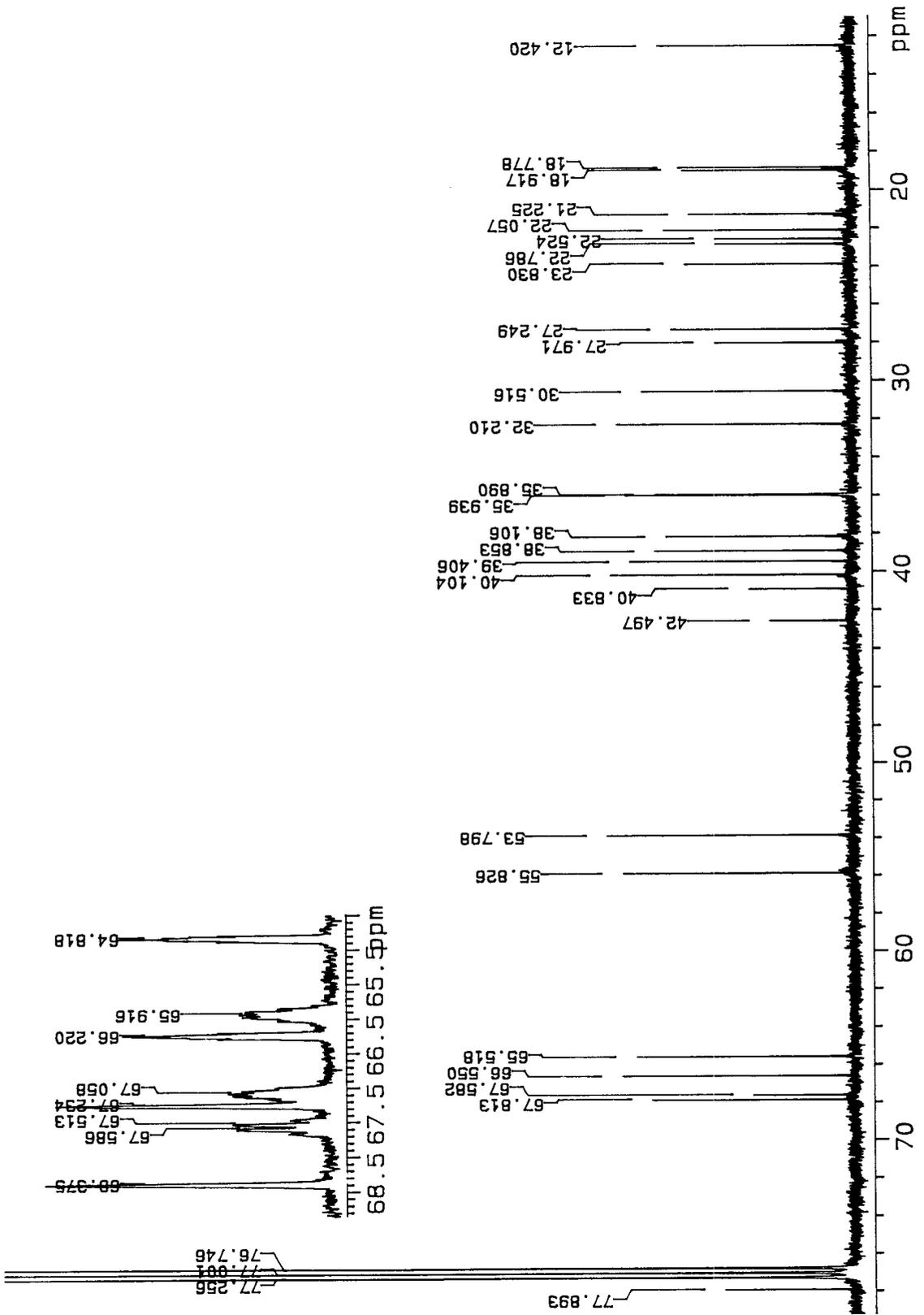


Fig. 2-95. Carbon NMR spectrum of compound 94K-1-1

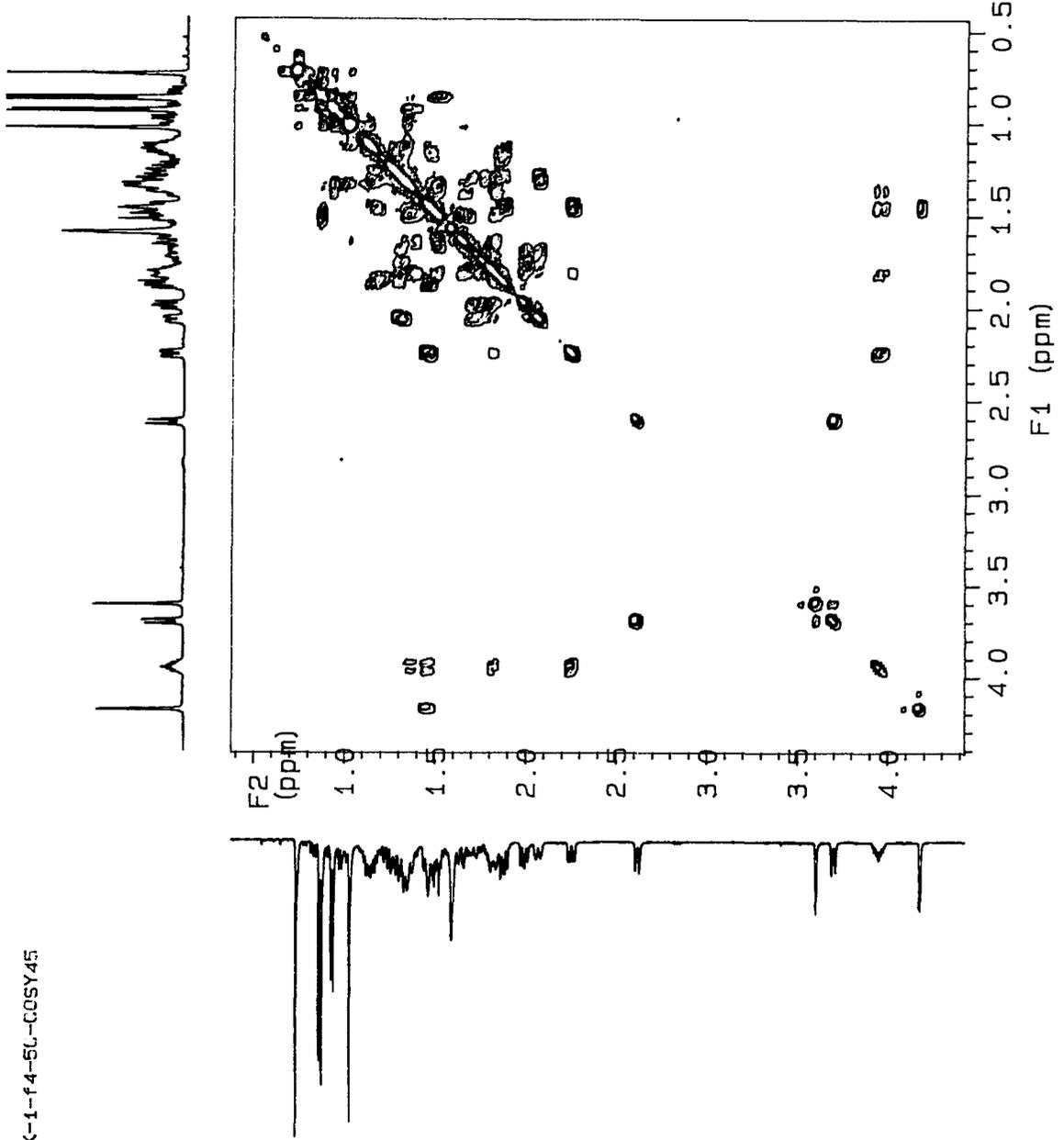


Fig. 2-96. Proton COSY spectrum of compound 94K-1-1

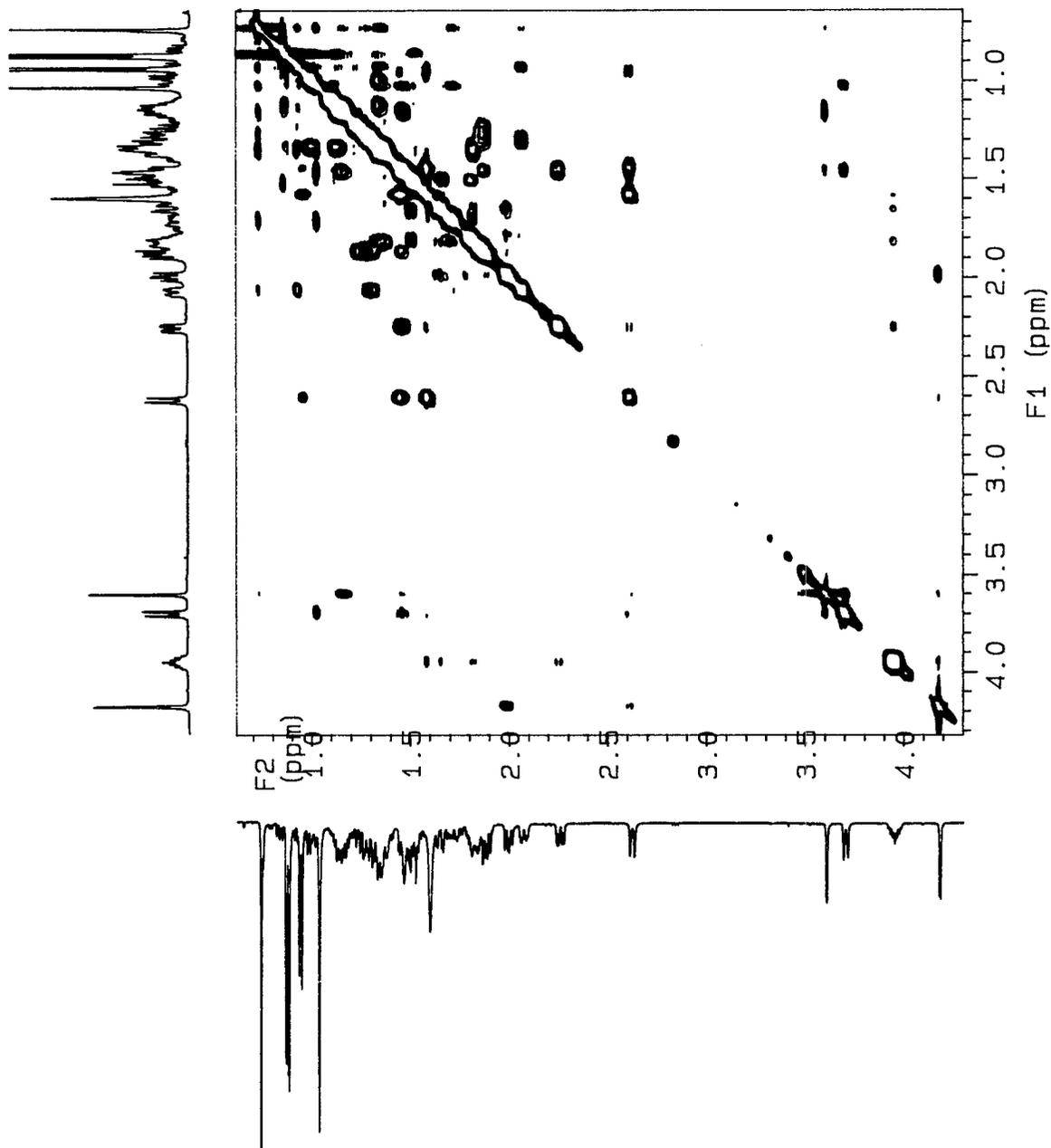


Fig. 2-97. NOESY spectrum of compound 94K-1-1

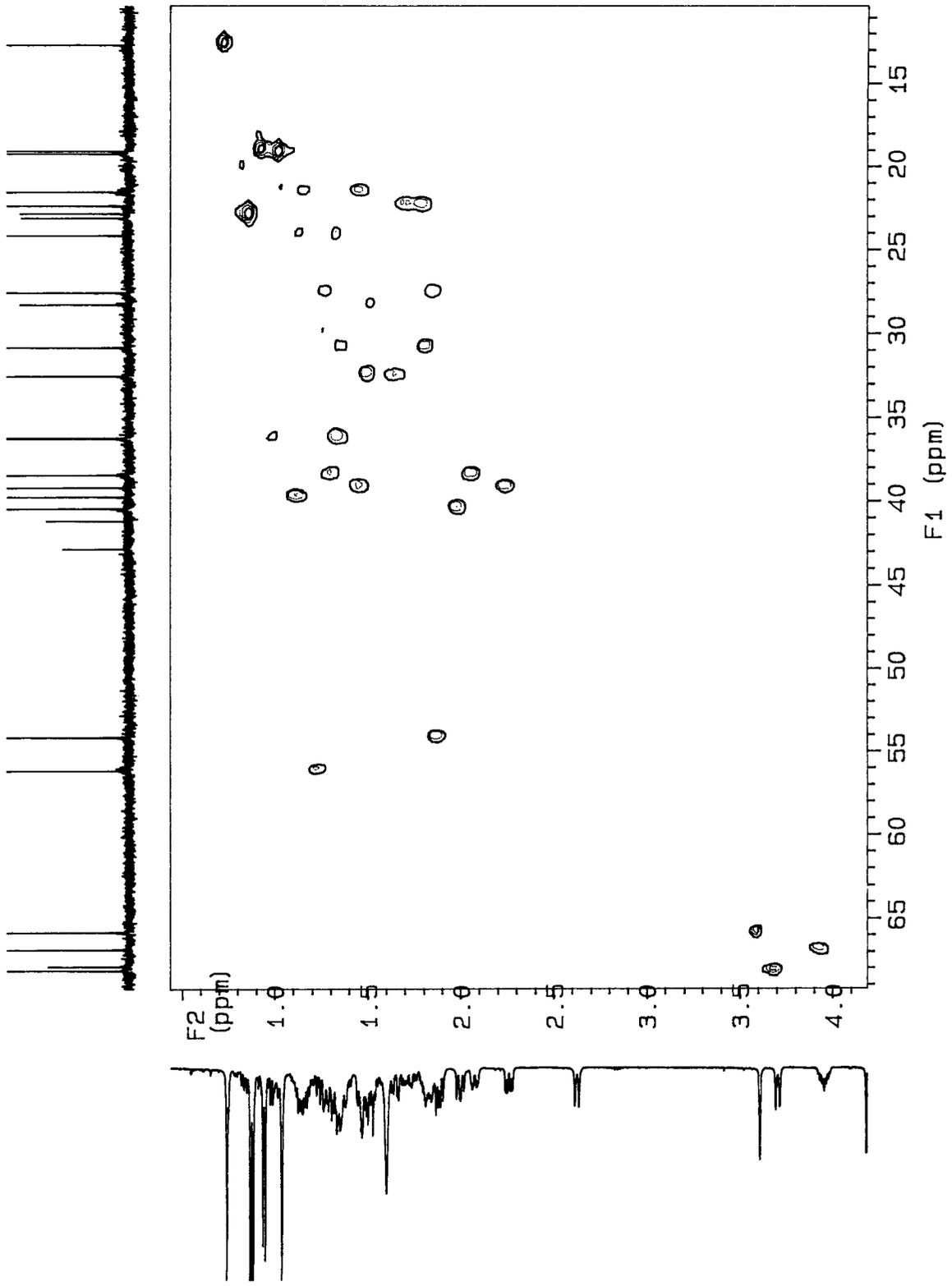


Fig. 2-98. HMQC spectrum of compound 94K-1-1

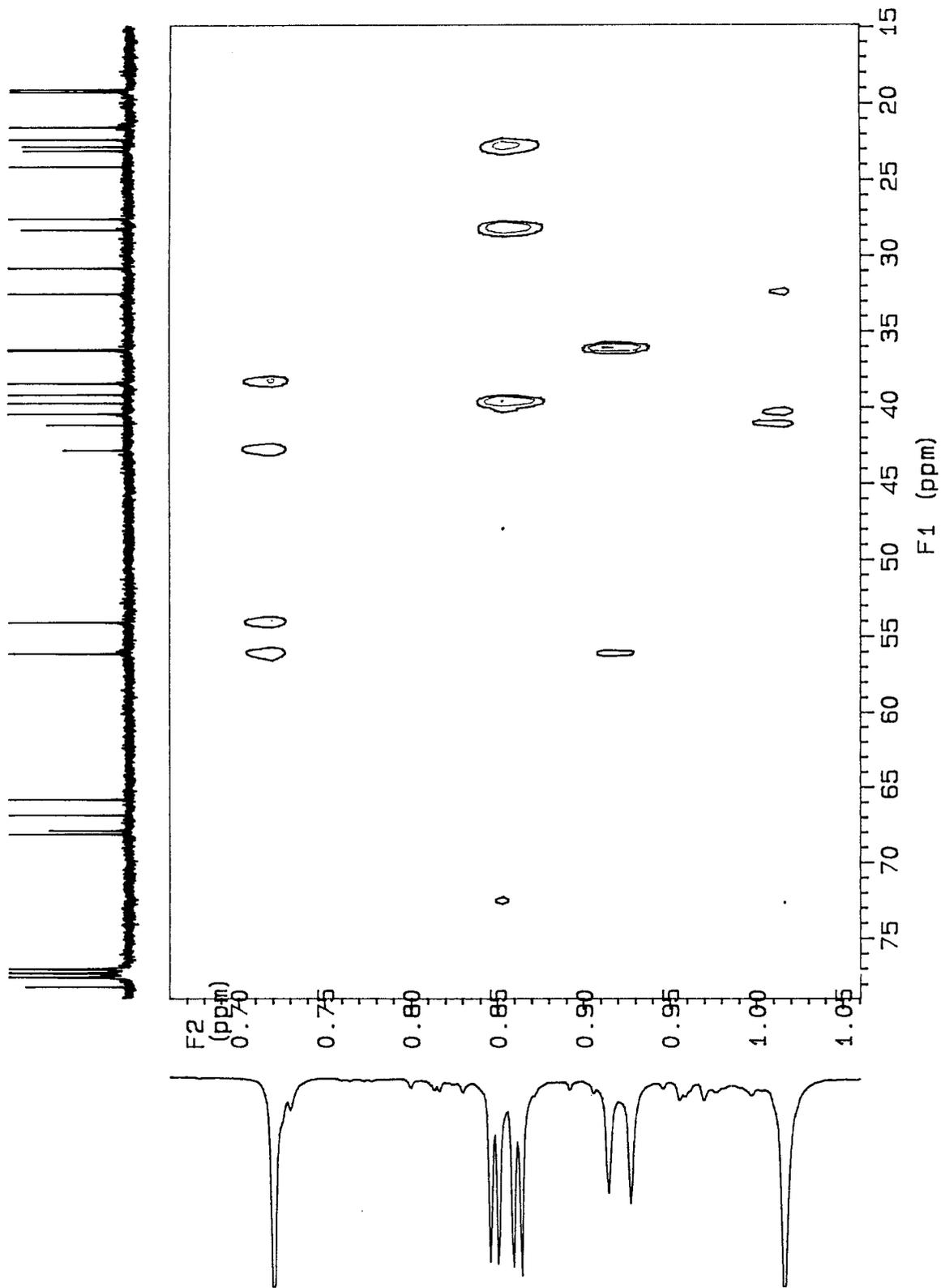


Fig. 2-99. HMBC spectrum of compound 94K-1-1

Mattson Instruments FTIR

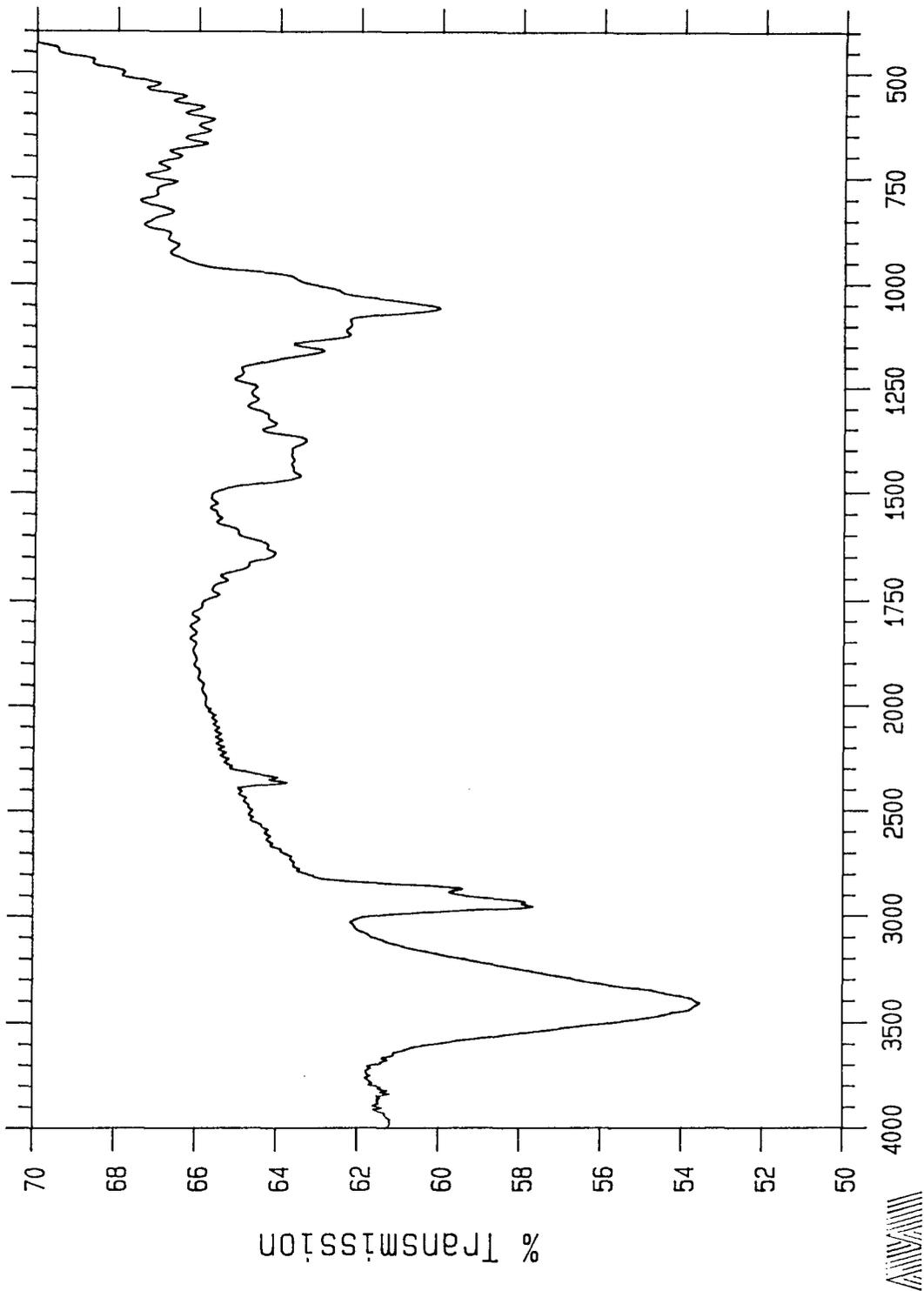


Fig. 2-100. IR spectrum of compound 94K-1-1

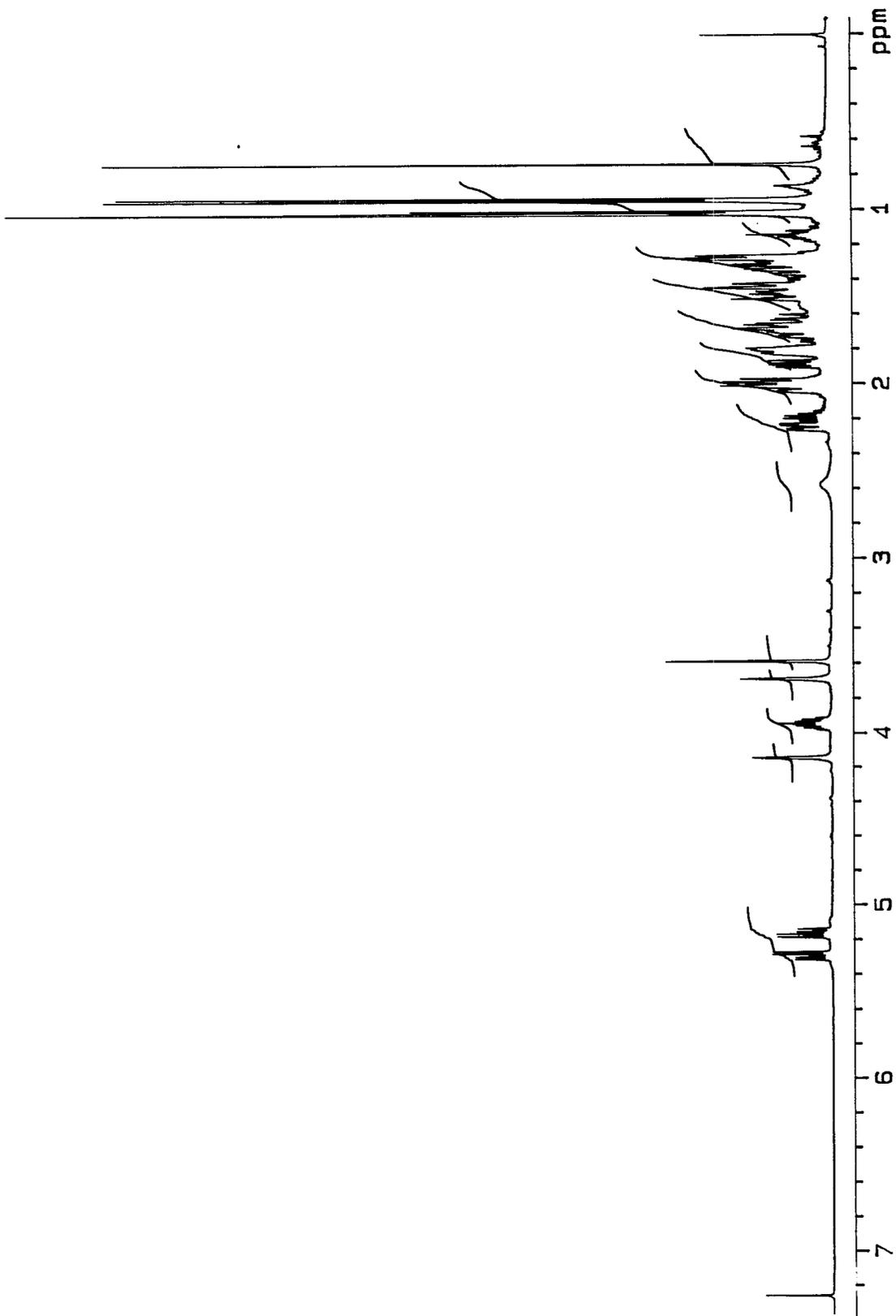


Fig. 2-101. Proton NMR spectrum of compound 94K-1-2

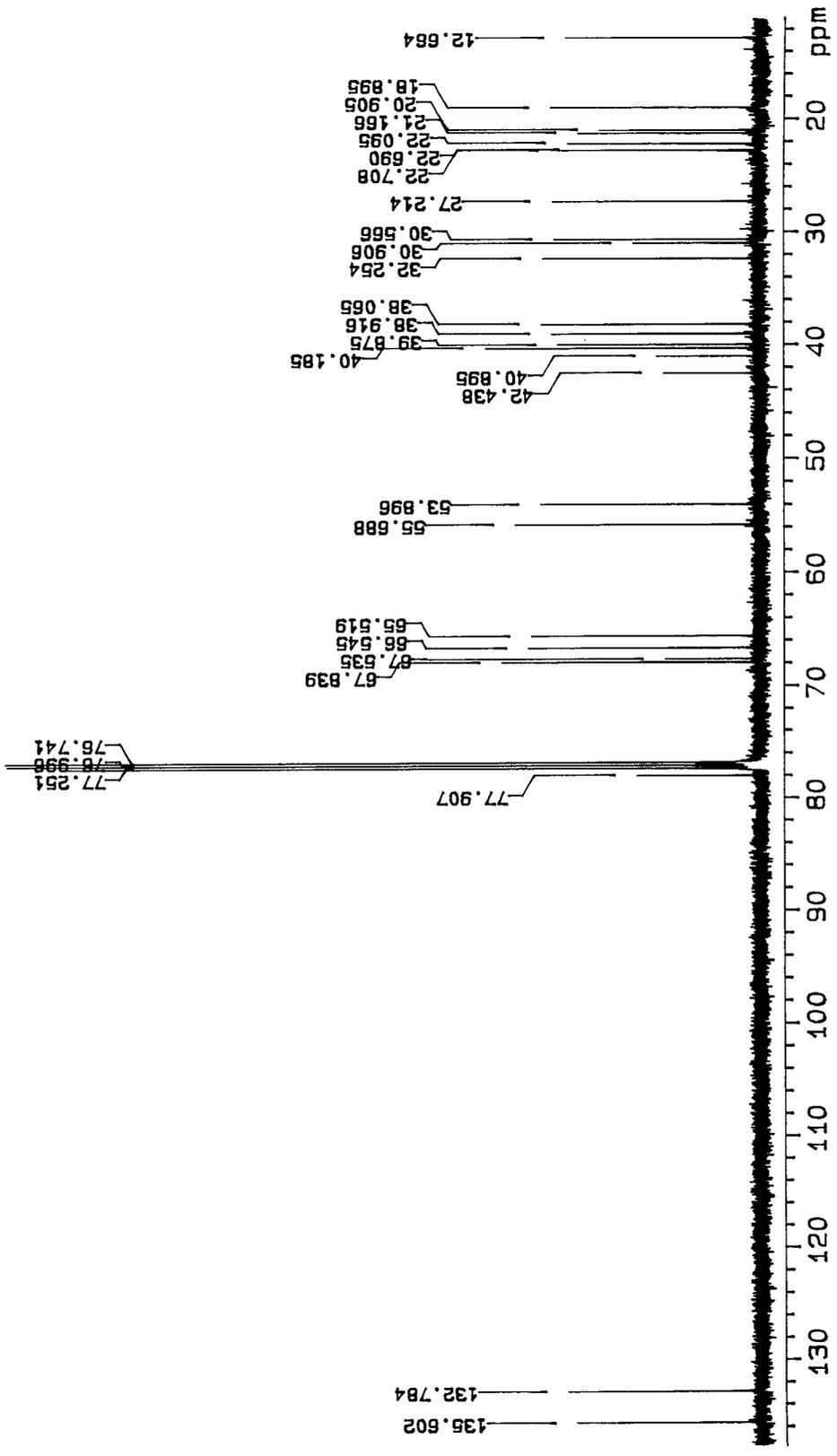


Fig. 2-102. Carbon NMR spectrum of compound 94K-1-2

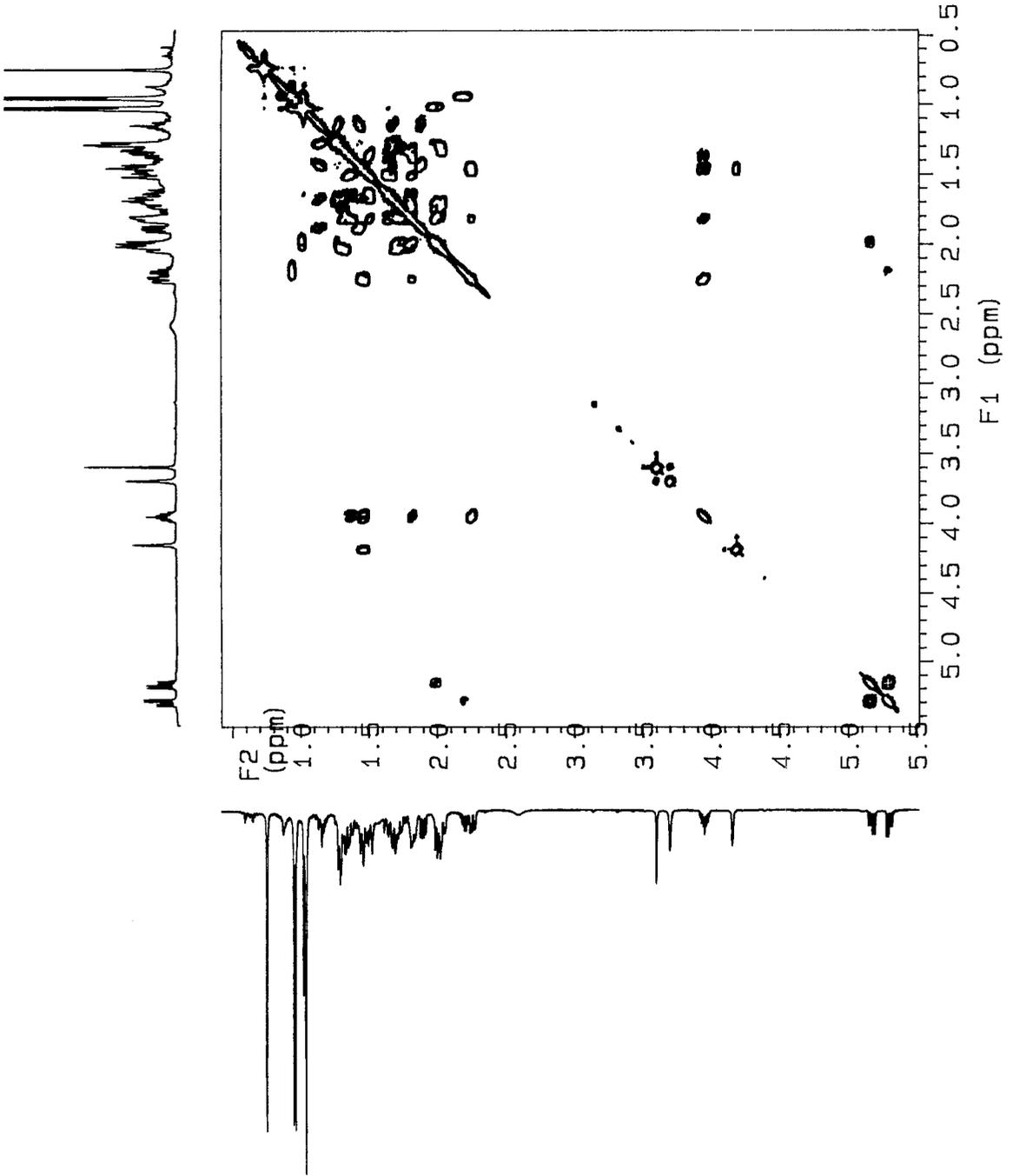


Fig. 2-103. Proton COSY spectrum of compound 94K-1-2

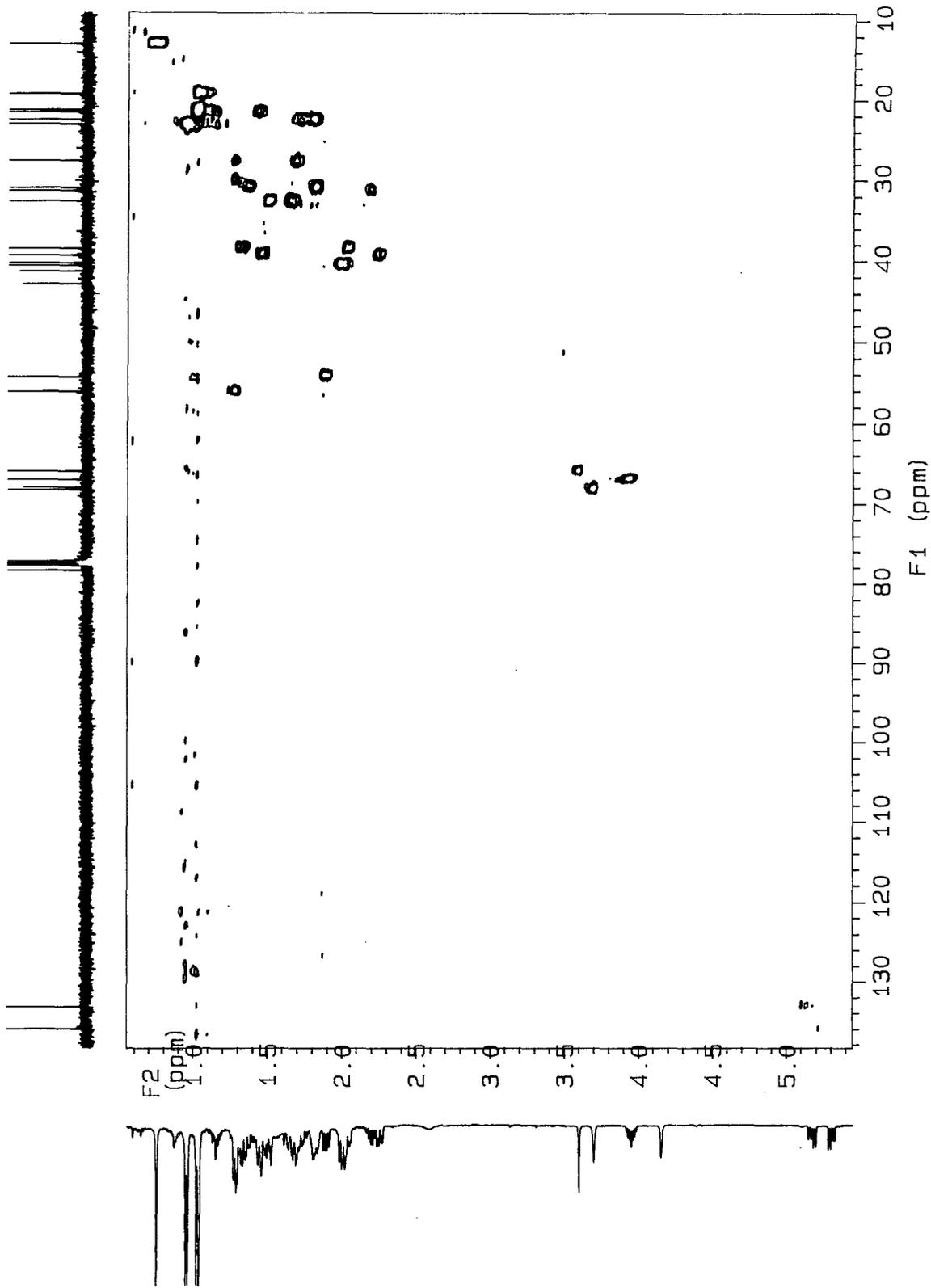


Fig. 2-104. HMQC spectrum of compound 94K-1-2

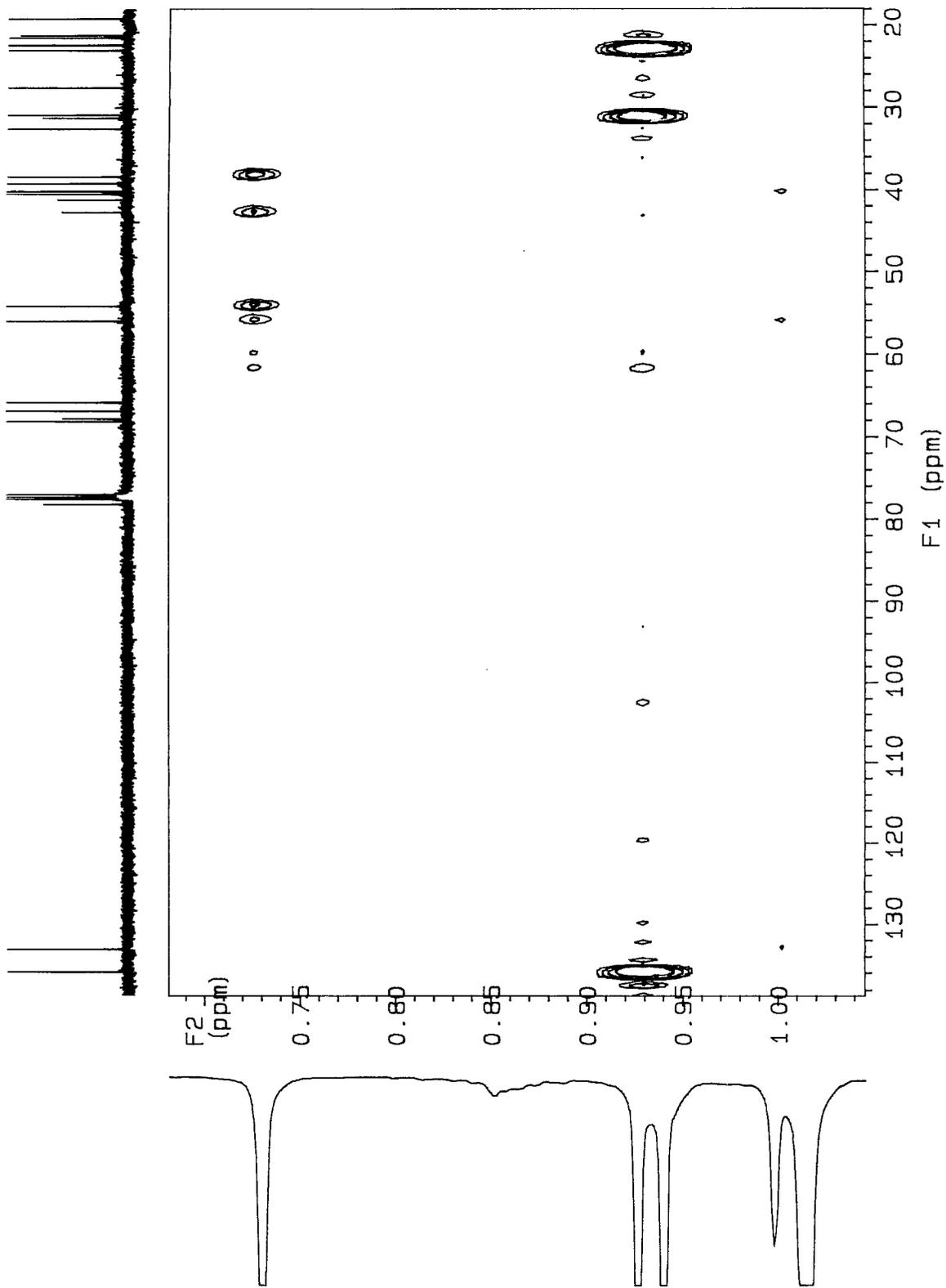


Fig. 2-105. HMBC spectrum of compound 94K-1-2

Mattson Instruments FTIR

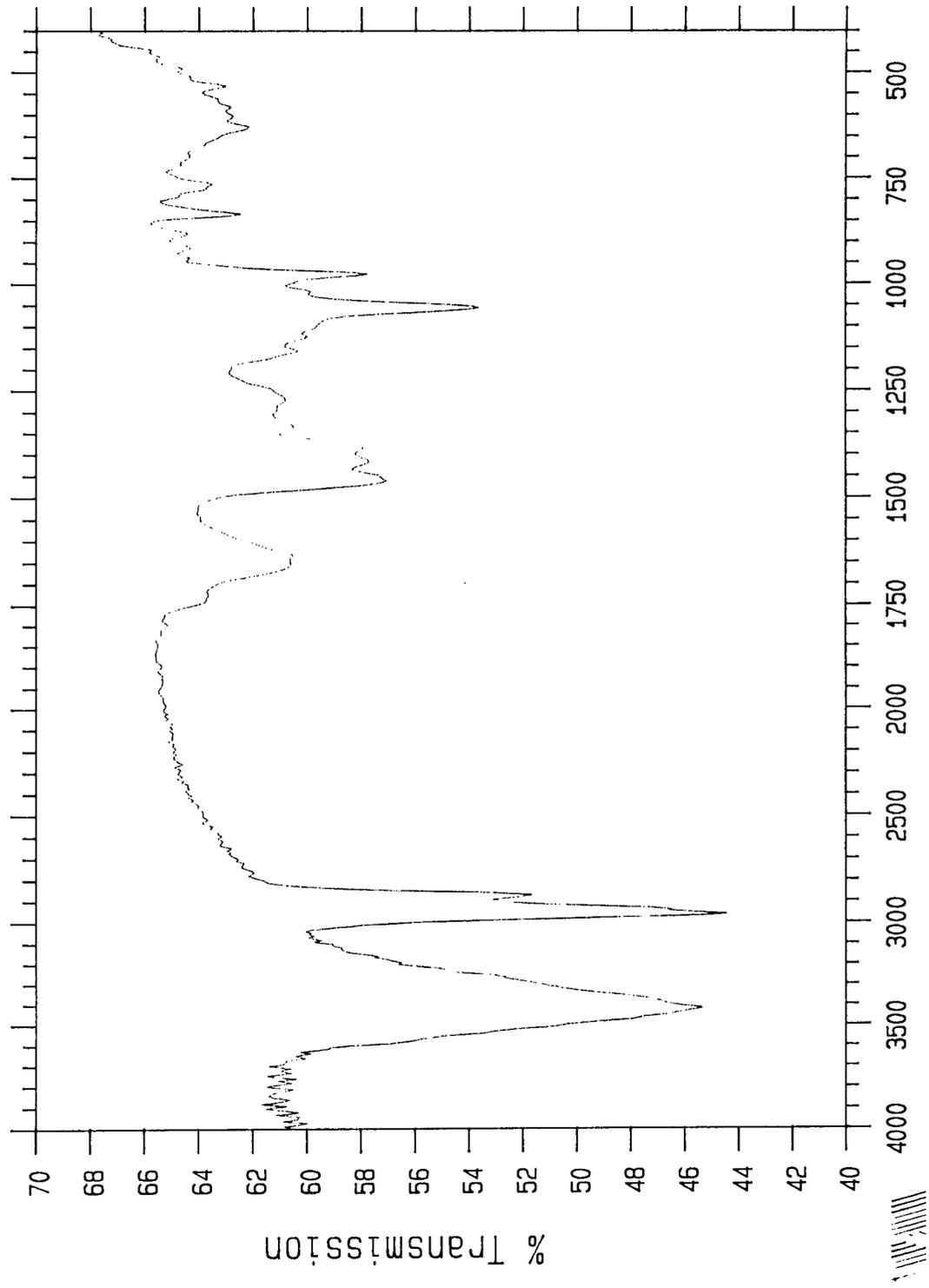


Fig. 2-106. IR spectrum of compound 94K-1-2

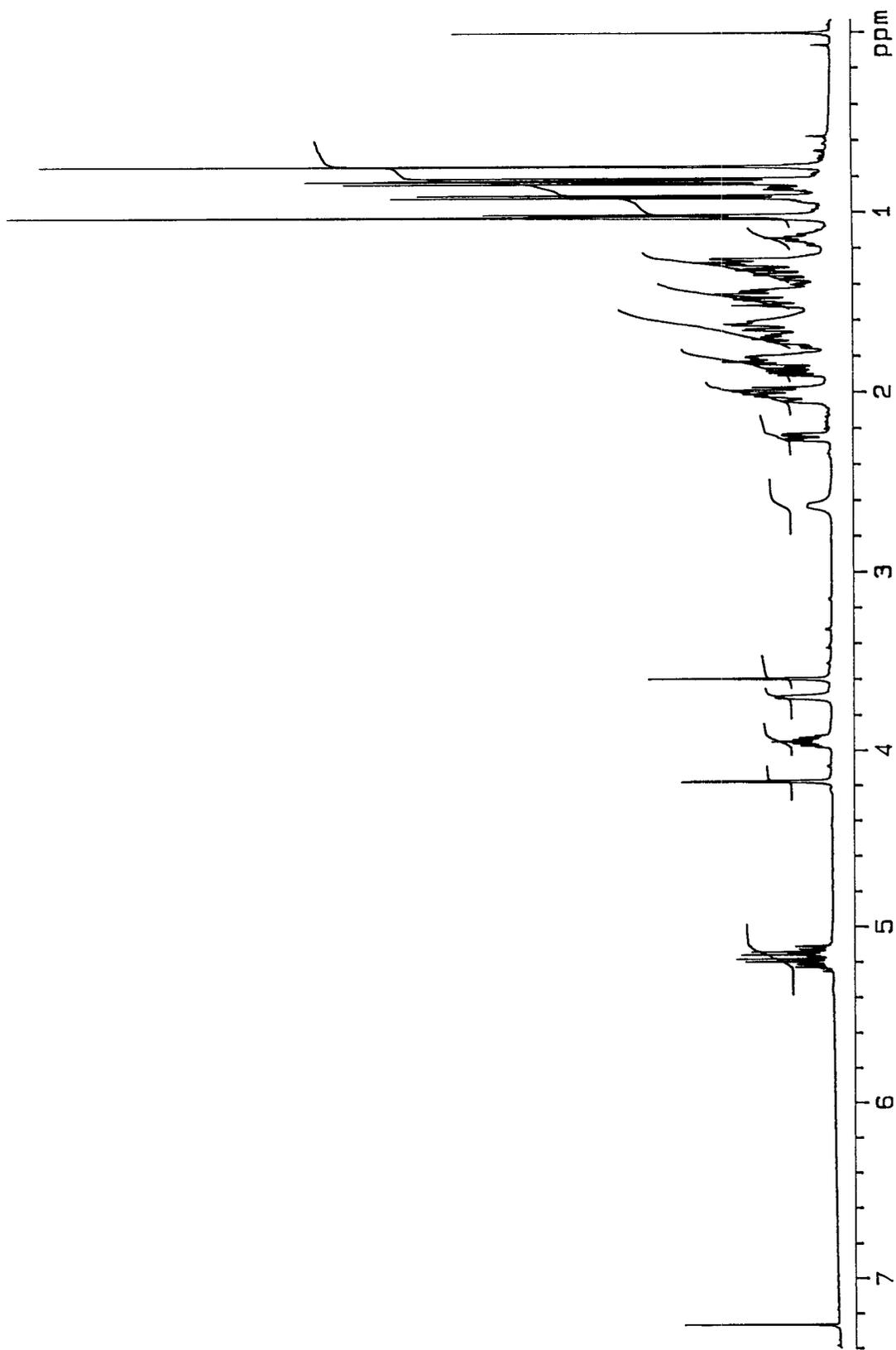


Fig. 2-107. Proton NMR spectrum of compound 94K-1-3

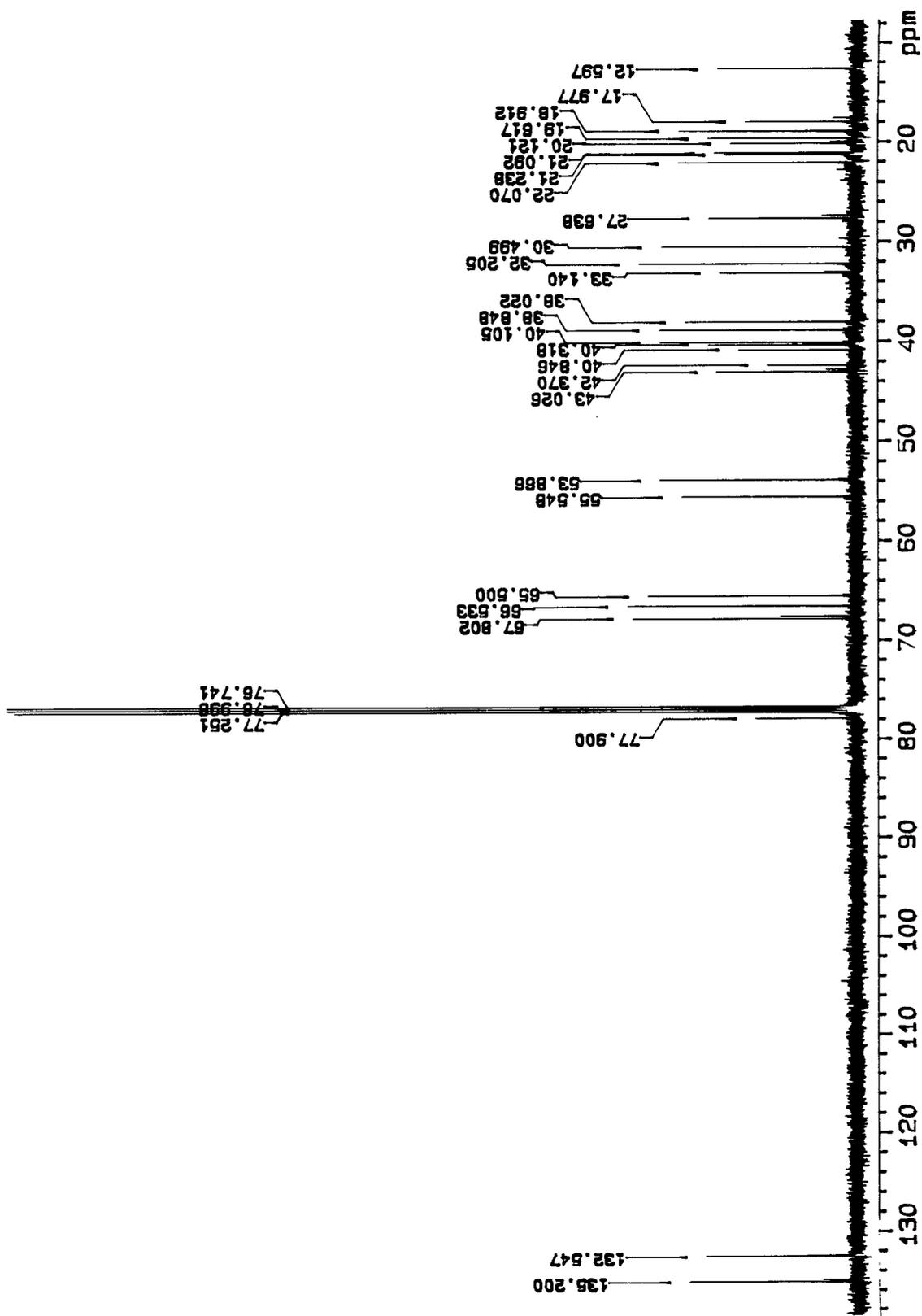


Fig. 2-108. Carbon NMR spectrum of compound 94K-1-3

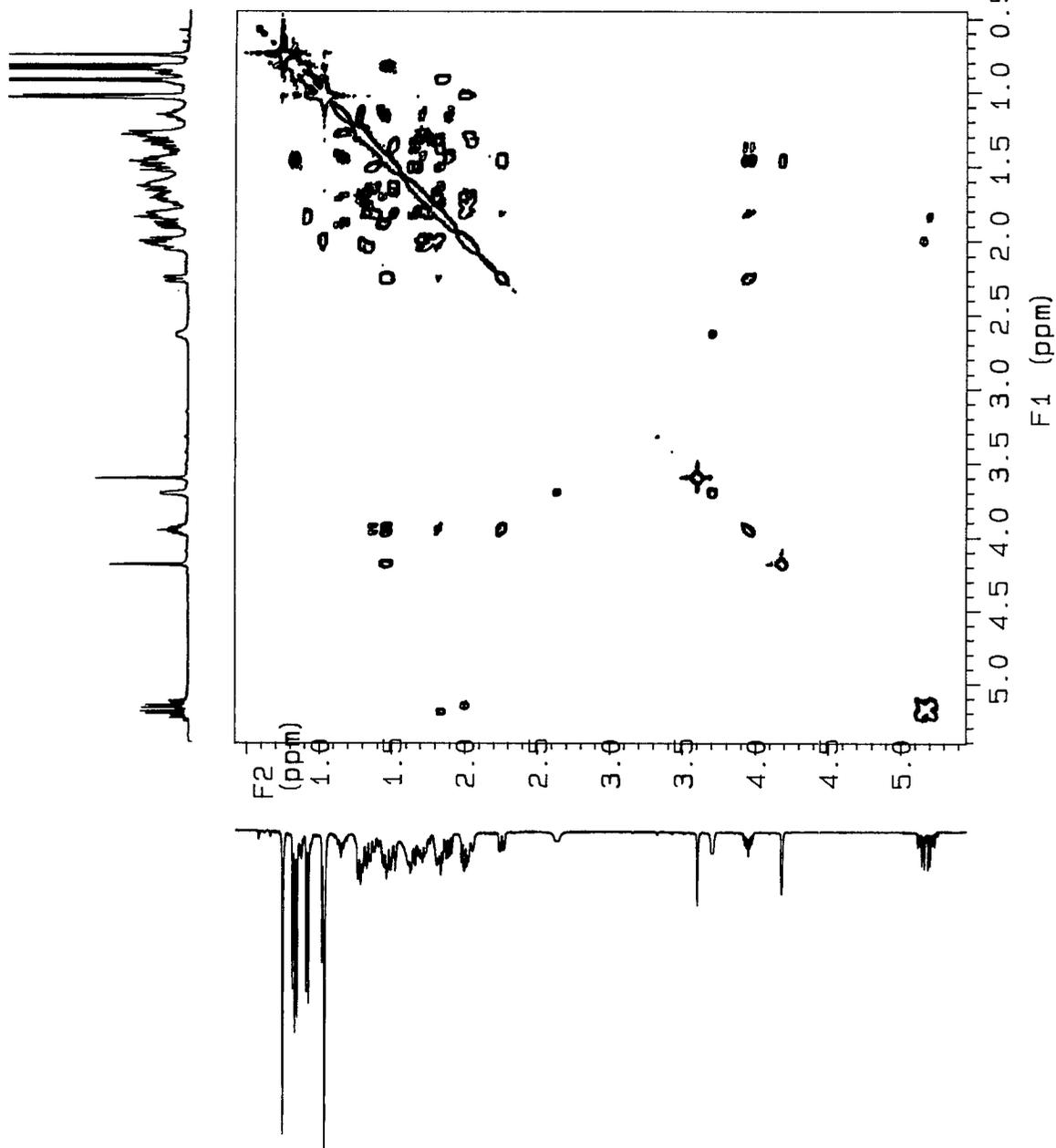


Fig. 2-109. Proton COSY spectrum of compound 94K-1-3

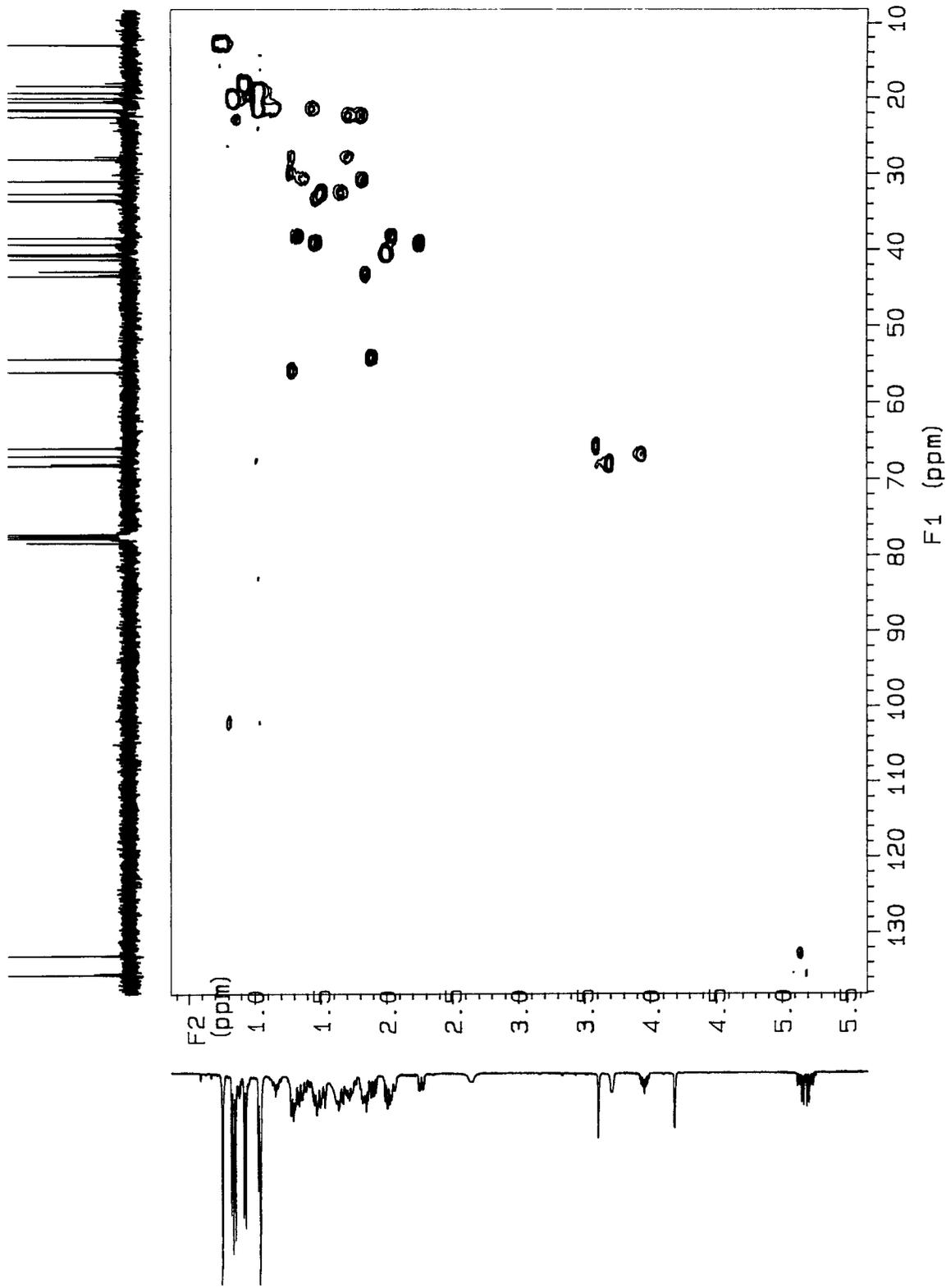


Fig. 2-110. HMQC spectrum of compound 94K-1-3 .

Mattson Instruments FTIR

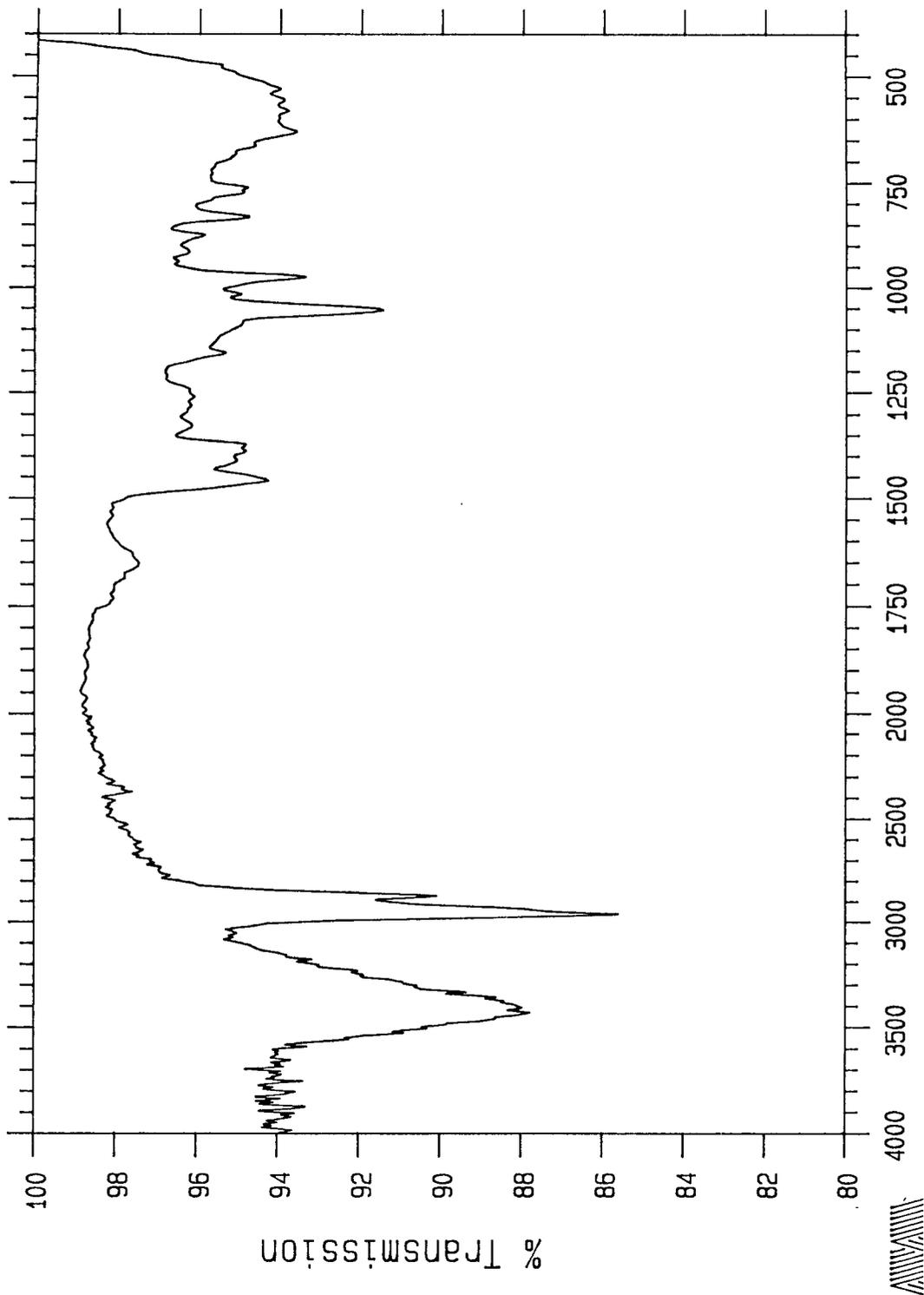


Fig. 2-111. IR spectrum of compound 94K-1-3

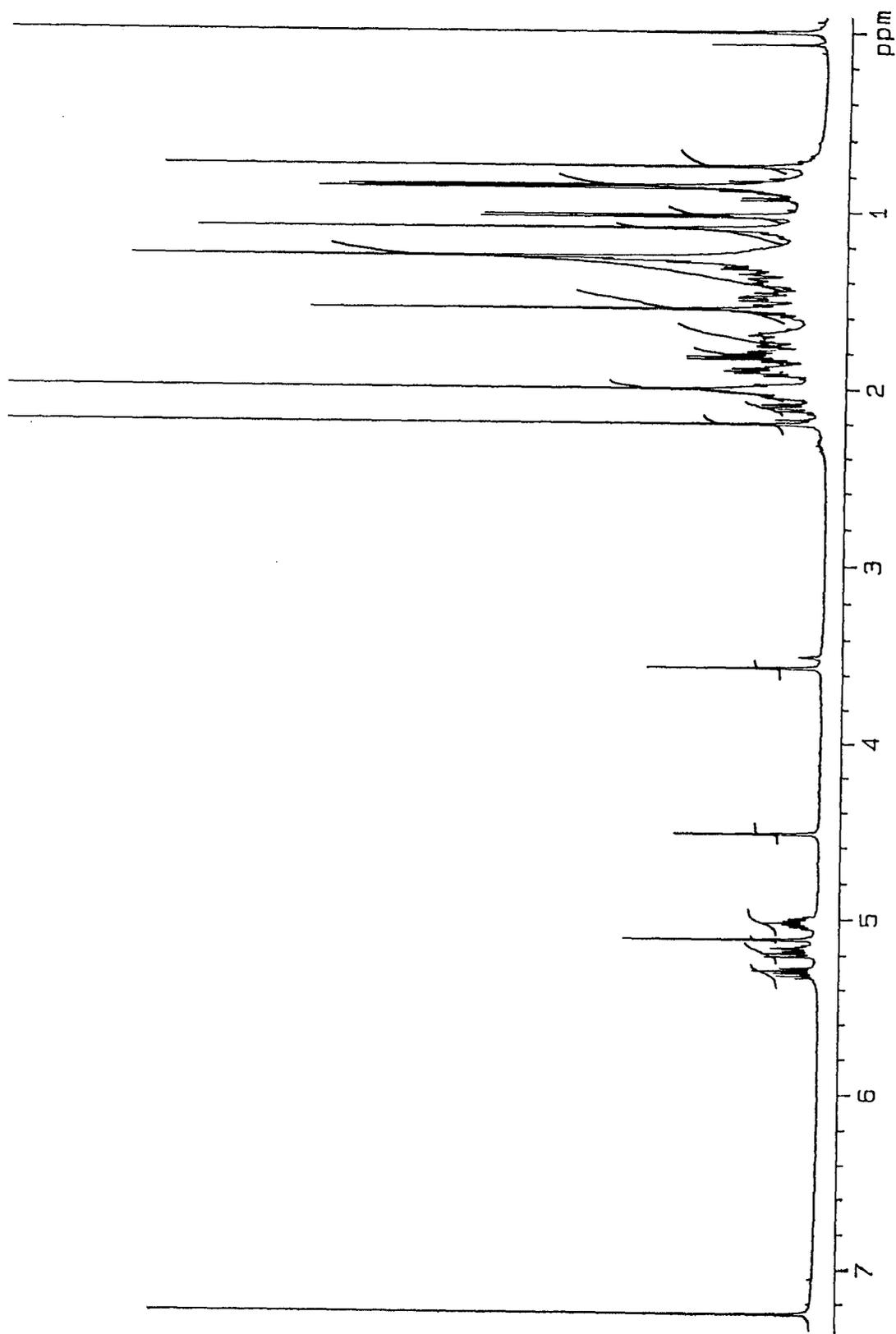


Fig. 2-112. Proton NMR spectrum of compound 94K-1-4

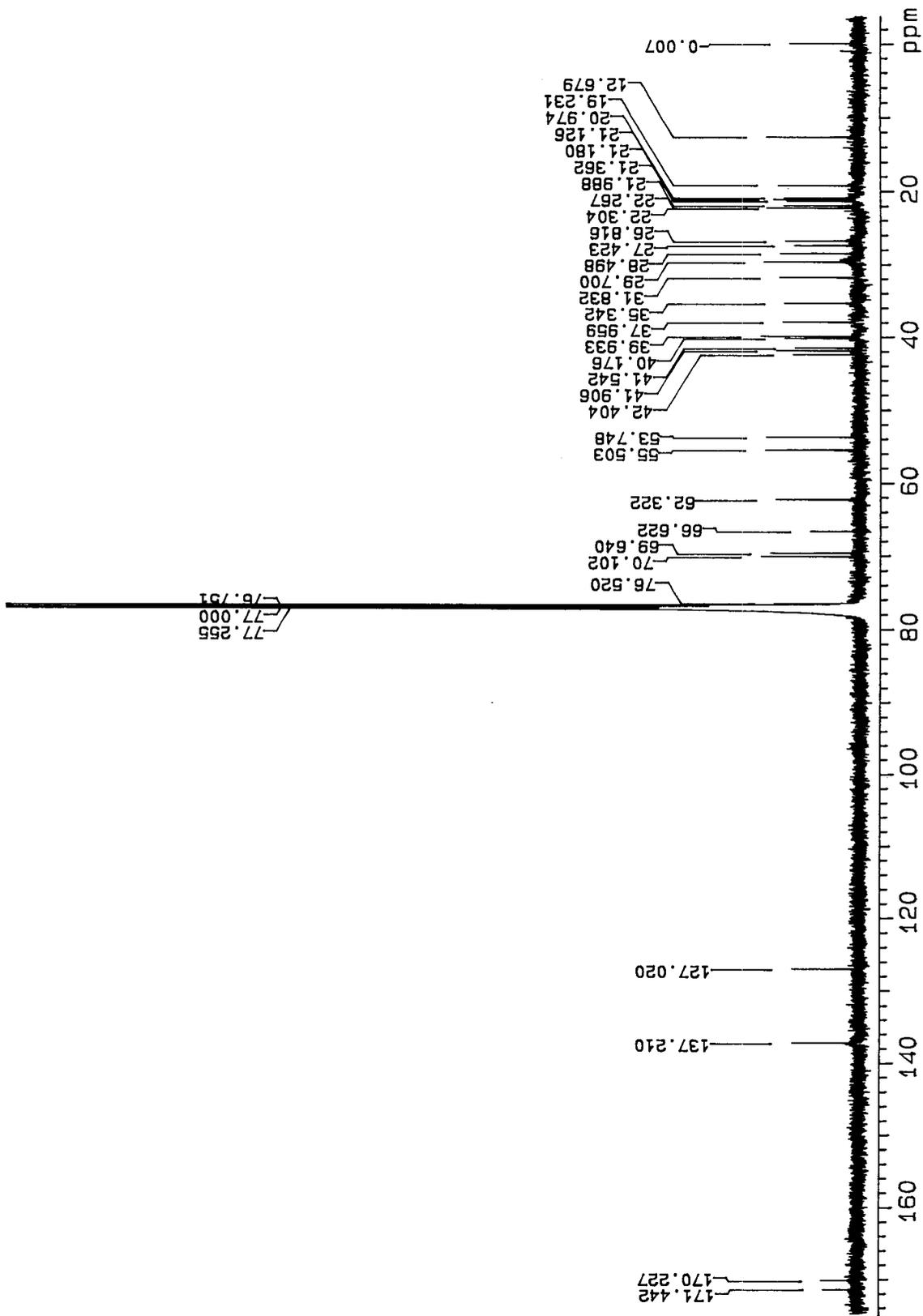


Fig. 2-113. Carbon NMR spectrum of compound 94K-1-4

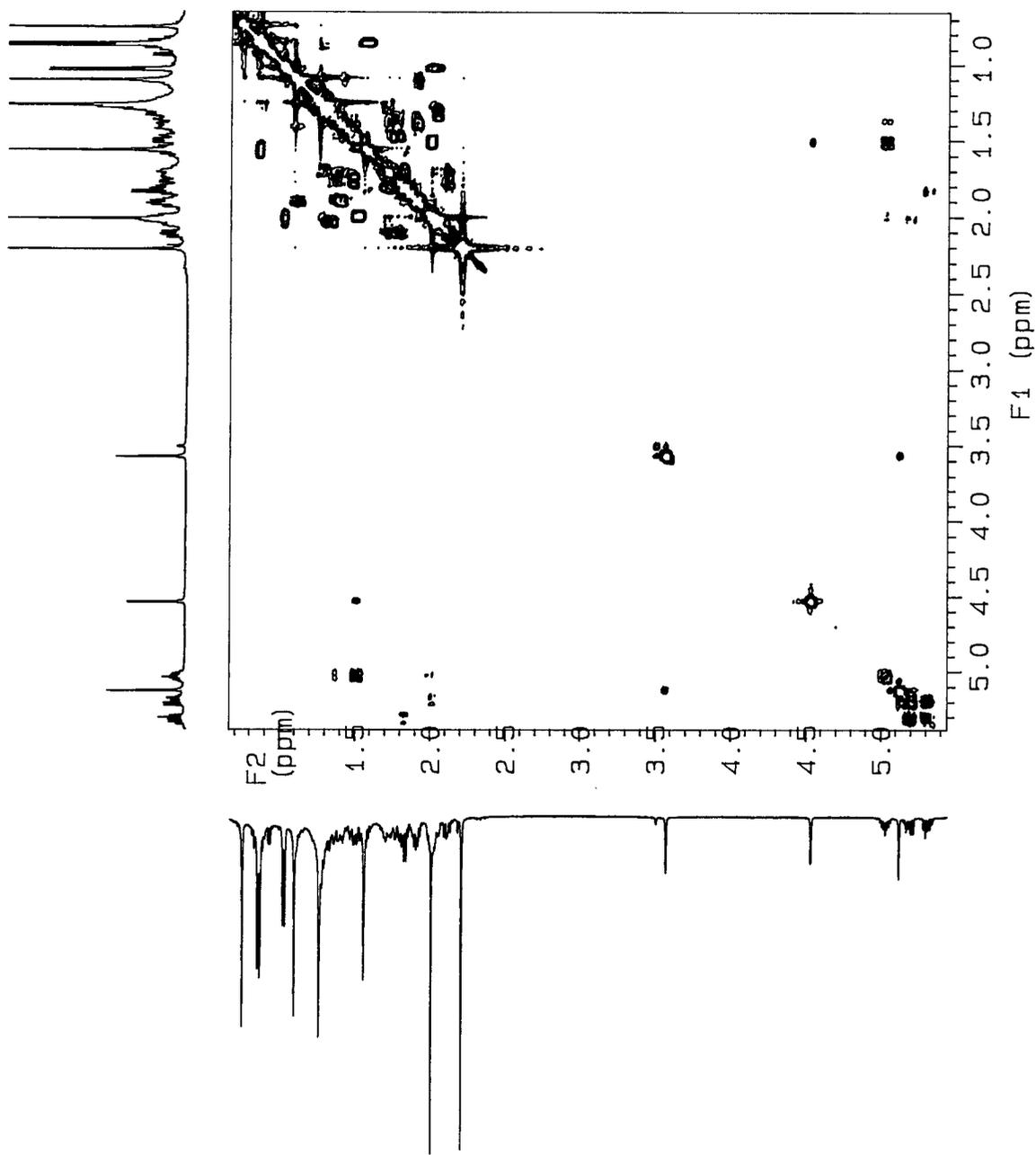


Fig. 2-114. Proton COSY spectrum of compound 94K-1-4

제 3 장 해면동물의 대사물질

3. 1. 연구의 배경

해면동물(phylum Porifera)은 현존하는 해양동물중 가장 다양한 생물중의 하나로 전세계에 10,000종이상이 존재하는 것으로 알려져있다. 이들의 분포는 대단히 넓어 열대에서 한대까지 전세계의 거의 모든 해역뿐만 아니라 간조선부근부터 9000m 까지의 깊이에도 서식하고 있다. 우리 나라에서는 석회해면강(Calcarea) 9종, 육방해면강(Hexactinellida) 2종, 보통해면강(Demospongiae) 114종으로 모두 125종이 밝혀져 있다.

이들은 그 종류 및 서식 환경의 다양함과 채집의 용이함으로 인하여 해양 천연물 연구의 초기부터 많은 주목을 끌어 왔다. 더우기 초기에 추출된 해면의 대사물질중 생리활성 물질의 출현빈도가 매우 높아 집중적인 연구의 대상이 되어 왔다. 그 결과 현재까지 해면에서 추출된 천연물은 전체 해양 천연물의 거의 30%를 차지하고 있으며 이는 단일 생물문으로서서는 최대이다(Ireland et al, 1988; Faulkner, 1988). 이러한 경향은 날이 갈수록 더욱 심화되고 있어 최근의 연구결과를 분석해보면 해면이 해양 천연물에서 차지하는 비중은 계속적으로 증가하고 있다(최근의 연구보고중 약 50%를 차지하고 있다.) 천연물 연구 뿐만 아니라 이들과 다른 생물간의 화학적 생태에 대한 연구 또한 최근에 매우 활발히 이루어지고 있다.

해면에서 추출된 천연물은 그 구조 또한 지극히 다양하여 terpenenoids, polyketides, amino acids, mixed biosynthetic products 등 모든 생합성의 전구 물질로부터 생성 가능한 천연물이 망라되어 있다. 수 백종 이상의 해면이 화학적으로 조사되어 왔고, 많은 경우 각 종에 따른 특이한 물질들이 추출되었으므로 여기에서 각각의 종의 천연물을 개별적으로 분석하는 것은 대단히 어렵다. 또한 해면에 대한

분류체계가 확실하지 않아 여러 이론이 존재하고, 동일 표본에 대해서도 학자에 따라 목, 과 및 속을 달리하는 예가 적지 않으므로 생물의 종류별로 천연물을 특징짓는 것도 어려움이 많다.

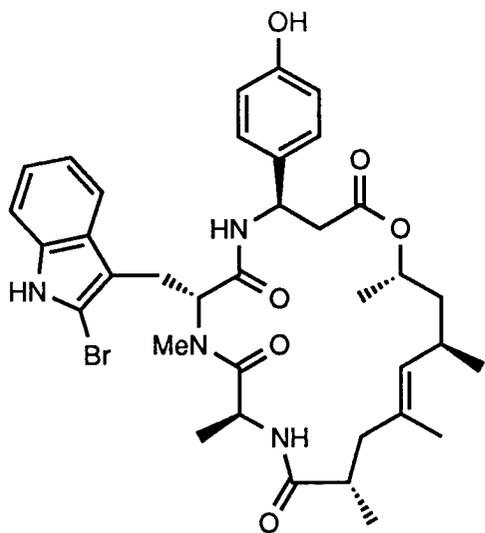
뿐만 아니라 해면은 많은 경우에 다량의 착생 생물(epiphytes)이나 micro-algae, bacteria등을 체내에 다량으로 보유하고 있으므로(*Aplysina cavernicola*의 경우는 조직 부피의 38%가 bacteria) 추출된 물질이 해면의 고유한 대사물질인지 공생하는 미생물 혹은 미세조류의 대사 물질인가의 구분이 어렵다(Bergquist & Wells, 1983; Faulkner, 1984b). 대표적인 예로 가장 연구가 많이 된 해면의 일종인 *Dysidea*속의 경우를 보면 terpenoids, alkaloids, diphenyl ethers등 구조적으로 연관이 전혀 없고 기원도 서로 상이한 물질들을 함께 보유하고 있는데 이들중 최소한 일부는 공생하는 광합성 생물에 의하여 합성된 것으로 추측되고 있다(Faulkner, 1984b; 1986). 또한 잘 알려진 예로서 강력한 DSP toxin인 okadaic acid는 해면 *Halichondria okadai* 에서 처음 추출되었으나 실제로는 dinoflagellate *Prorocentrum lima*의 대사 물질임이 규명되었다(Tachibana et al, 1981; Murata et al, 1982). 이러한 점에 착안하여 생리활성 물질을 함유하는 해면으로부터 이들 미생물을 분리, 배양하여 산업적 가치가 높은 신물질의 대량생산을 위한 시도가 최근에 진행되고 있다.

이러한 분류학상의 어려움과 천연물의 생산주체의 모호함을 감안하고 현재까지의 연구 결과를 개략적으로 살펴 보면, 먼저 천연물 화학 연구는 해면의 여러 강중 주로 Demospongiae강에 대하여 집중적으로 이루어져 왔다. 그러나 Demospongiae강에 속하는 해면들은 목, 과 혹은 속에 따라 함유하는 천연물의 종류가 매우 다름이 밝혀졌다. 먼저 해양 천연물중 매우 중요한 위치를 차지하는 terpenoids와 terpene part가 포함된 mixed biosynthetic products는 여러 종류의 해면에서 매우 다양한 탄소 골격의 형태로 추출되었으나 특히 Demospongiae에 속하는 Dictyoceratida와 Dendroceratida 의 두 목에서 집중적으로 추출되었다. 그러나

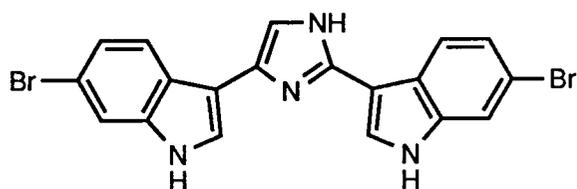
Axinella, *Acanthella* 및 *Hymeniacydon*속 등 다른 목에 속하는 해면으로부터 isocyanide, isothiocyanates, formides 등 nitrogen part가 terpene에 결합된 특이한 형태의 물질들이 다수 발견되었다. Verongida목으로 부터는 다양한 형태의 alkaloids 즉 nitrogen을 포함한 물질들이 추출되었는데 이들의 구조적인 특이성이 Dictyoceratida목의 한 과(Verongiidae)로 전통적으로 분류되었던 이 종류의 해면이 근래 독립된 목으로 분류하게 된 주요 이유이다(Bergquist & Wells, 1983). Polyacetylenes은 여러 종류의 해면에 걸쳐서 추출되고 있다.

해면동물에서는 다른 생물에서 찾아 보기 어려운 특이한 종류의 천연물이 다수 발견되었는데 이들은 소수의 속으로부터 집중적으로 추출되어 화학적으로 그들 속의 상징으로 여겨지고 화학적 분류의 지표로 이용되는 경우가 많다. 예를 들면 *Plakortis*, *Prianos* 및 *Sigmosceptrella*속으로 부터는 cyclic peroxide나 그로부터 기원함이 명백한 물질들이 추출되었다. 또한 *Petrosia*, *Xestospongia* 및 *Reniera* 등에서는 천연물중 그 예가 극히 드문 quinolizidine alkaloids 및 그와 구조상으로 유사한 물질들을 보유하고 있으며 *Algelas*와 *Adocia*속으로 부터 terpene과 adenine 혹은 guanidine이 결합된 매우 드문 형태의 mixed biosynthetic products가 많이 추출되었다. 이 밖에도 여러 종류의 해면으로 부터 구조의 분석이 지극히 어려운 복잡하고 독특한 형태의 물질들이 많이 추출되었다.

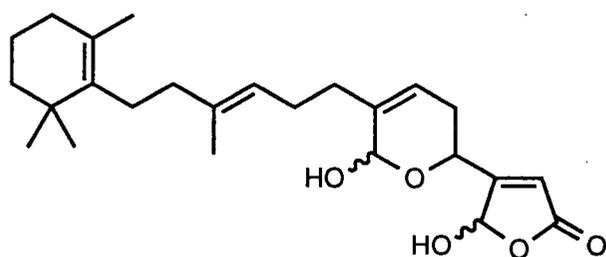
해면 대사물질의 구조적 다양함과 강력한 생리 활성도는 필연적으로 신물질의 산업화를 위한 시도를 유발시켜 현재까지 물질특허를 획득한 해양 천연물의 절반 이상이 해면에서 추출된 물질이다. 해면에서 추출된 특허물질의 몇 가지 예를 들면 *Jaspis* sp.에서 추출된 항진균성 cyclic peptide jaspamide(=jaspakinolide), *Luffariella variabilis*에서 추출된 terpene계 소염제 manoalide, *Latrunculia* sp.의 항암제 discorhabdins, *Spongesorites ruetzleri*와 *Halichondria* sp.의 항암, 항미생물제 nortopsentins 등이다. 또한 다수의 독성물질이 생리, 병리작용의 규명을 위한 연구용 시약으로도 이용되고 있는데 *Halichondria okadae*에서 분리한 okadaic acid는 대표



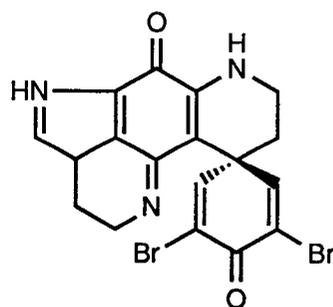
jaspamide
(*Jaspis* sp.)



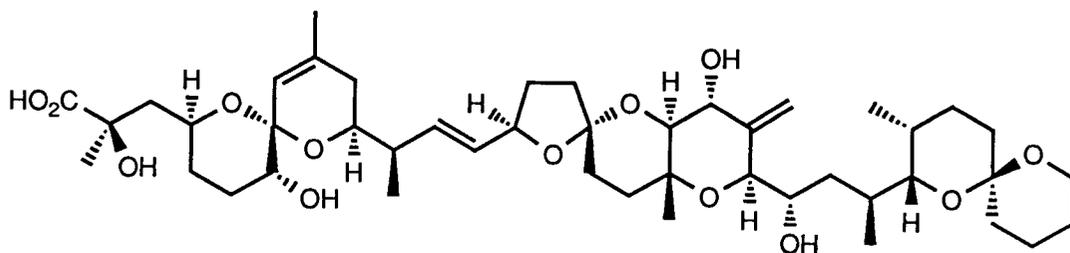
nortopsentin A
(*Spongisoritis* sp. and *Halichondria* sp.)



manoalide
(*Luffariella variabilis*)



discorhabdin C
(*Latrunculia* sp.)



okadaic acid
(*Halichondria okadae*)

Fig. 3-1. Potential drugs isolated from sponges.

적인 예이다(T. M. Zabriskie et al, 1986; E. D. De Silva & P. J. Scheuer, 1980; N. B. Perry et al, 1986; S. Sakemi et al, 1991; K. Tachibana et al, 1981)(Fig 3-1).

해면의 천연물은 1000이상이 알려져 있어서 해양생물중 최대이기는 하나 현존하는 종 중에서 불과 5%미만만이 연구되었으므로 신물질을 발견할 가능성은 여전히 매우 높다. 더우기 현재 다각도로 시도되고 있는 해면 천연물의 대량 생산이 성공할 경우 생리활성물질의 산업적 이용과 더불어 해면의 천연물은 해양 천연물 내지는 육상을 포함한 전 천연물 연구의 핵심적인 위치를 차지할 것으로 기대된다.

3. 2. *Cliona celata*에서 추출된 대사물질

본 연구에서 천연물 화학적 분석이 시도된 해면동물은 거문도 근해에서 채집된 *Cliona celata*(시료번호 94K-4)이다. 이들은 채집된 시료의 양과 유기 조추출물에 대한 TLC분석, brine shrimp 치사율등의 생리활성도 측정결과가 다른 시료에 비하여 우수하였다.

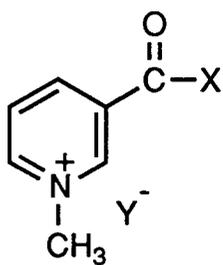
*Cliona celata*는 94년 8월에 거문도 부근의 대삼부도 근해 수심 15 - 20 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었다. 군체의 색깔은 검은 갈색이었으며 우리나라에서는 이 해면을 호박해면이라고도 부른다. 냉동보관한 1 kg의 시료를 메탄올로 반복해서 추출한 후에 다시 dichloromethane으로 반복 추출하였다. 이렇게 해서 얻어진 조추출물을 다시 n-butanol과 물을 이용하여 분배하였으며 수용액층에서 얻어진 조추출물에 대하여 실리카 고속 가압 크로마토그래피를 실시하였다. 용매로는 ethyl acetate, acetone, methanol, acetic acid를 순서대로 용출하였으며 이렇게 얻어진 분획(fraction, fx)들에 대해 ^1H NMR을 측정한 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 methanol 분획에서 발견되었다. C_{18} reversed phase HPLC를 반복적으로 실시한 결과 2개의 물질(94K-4-1 ~ -2)이 분리되었다. 이들의 구조는 아래에서 설명한 바

와 같이 NMR 자료해석에 의해서 pyridinium salt 유도체들로 결정되었다(Fig. 3-2).

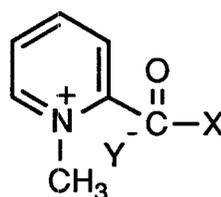
주대사물질인 94K-4-1은 흰색의 고체로 얻어졌다. 이 물질의 핵자기 공명분광 스펙트럼을 측정한 결과 ^{13}C NMR에서 methyl 1, methine 4, quaternary carbon 2, 모두 7개의 peaks가 발견되었으며 ^1H NMR에서도 1개의 methyl peak(δ 4.43)와 4개의 aromatic protons(δ 8.05 - 9.20)이 발견되었다(Fig. 3-4, -5). 이 물질의 전체적인 구조는 proton decoupling과 ^1H COSY 실험 및 알려진 물질과의 데이터 비교에 의하여 결정되었다(Fig. 3-6). Aromatic region에 나타난 ^1H NMR의 splitting pattern과 ^{13}C NMR상의 δ 150 - 125 ppm 영역에 나타난 5개의 downfield peaks는 pyridine의 3번 위치가 치환된 물질들과 매우 유사한 값을 나타내었으며 또 ^{13}C NMR상의 δ 166.73 ppm에서 발견된 quaternary carbon은 이 물질이 carbonyl group을 가지고 있음을 나타내었다. 문헌조사 결과 육상식물과 해양무척추 동물에서 흔히 발견되는 trigonelline과 매우 유사한 물질로 생각되며 앞으로 질량분석 데이터 결과에 의하여 이 물질의 최종적인 구조를 밝힐 예정이다.

대사물질 94K-4-2 역시 흰색의 고체로 분리되었다. 이 물질의 NMR 분광 스펙트럼에 나타난 protons 및 carbons의 ppm 영역이나 그 갯수가 94K-4-1과 대단히 유사하여 역시 pyridinium salt 유도체에 해당하는 물질로 생각되었다(Fig. 3-10, -11). 하지만 ^1H NMR 스펙트럼에서 각 peak들의 splitting pattern은 94K-4-1과 상당한 차이를 보였기 때문에 94K-4-1과 비교할 때 aromatic ring에 존재하는 치환기가 위치가 바뀐 물질로 여겨 졌으며 ^1H COSY 실험에 의하여 이 치환기의 위치가 pyridine ring의 3번 위치로 결정되었다(Fig. 3-12). 문헌조사 결과 알려진 물질 homarine과 매우 유사한 물질로 생각되었으며 이 물질 역시 질량분석 데이터 결과에 의하여 최종적인 구조를 밝힐 예정이다. 94K-4-1과 94K-4-2에 대한 proton 및 carbon에 대한 assignments는 Table 3-1과 같다.

해양에서 발견된 pyridinium salt 유도체들은 그렇게 많지 않으며 지금까지 알



94K-4-1



94K-4-2

Fig. 3-2. Pyridinium derivatives isolated from the sponge *Cliona celata*.

Table 3-1. Proton and carbon NMR assignments for **94K-4-1** and **94K-4-2**

94K-4-1		
#	¹H	¹³C
1		
2		155.68 s
3	8.07(1H, dd, 7.8, 1.0)	127.50 d
4	8.51(1H, ddd, 7.8, 7.8, 1.5)	146.99 d
5	7.92(1H, ddd, 7.8, 6.4, 1.5)	127.47 d
6	8.75(1H, d, 6.4)	146.45 d
CO		165.26 s
CH ₃	4.41(3H, s)	47.43 q
94K-4-2		
#	¹H	¹³C
1		
2	9.20(1H, s)	147.50 d
3		139.91 s
4	8.90(1H, d, 7.8)	145.88 d
5	8.05(1H, dd, 7.8, 6.4)	128.39 d
6	8.86(1H, d, 6.4)	146.74 d
CO		166.73 s
CH ₃	4.43(3H, s)	48.67 q

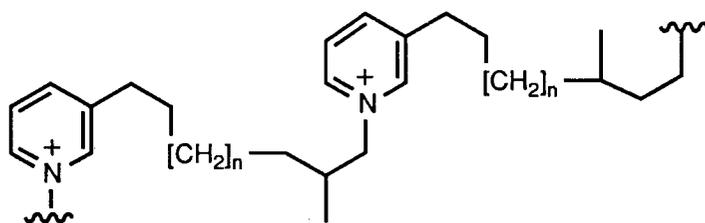
Proton and carbon NMR spectra were recorded in MeOH-d₄ solution at 500 and 125 MHz, respectively. Chemical shifts are reported in δ values. J values are reported in Hz. Assignments were aided by proton decoupling, COSY, HMQC and HMBC experiments.

려진 몇 개의 pyridinium 유도체들은 Fig. 3-3에 나타나 있다. Sponge *Haliclona* spp.로부터 halitoxin이 분리되었으며 물고기와 쥐에 세포독성을 나타낸다. 이 물질의 구조는 Fig. 3-3에 나타나 있는 두 개의 일반적인 구조형태가 반복적인 여러 가지 조합으로 결합된 polymers이다(R. J. Andersen & R. J. Stonard, 1979). Sea anemone와 anemone fish의 공생에 관련된 물질 amphikuemin은 sea anemone *Radianthus kuekenthali*로부터 추출되었으며 anemone fish를 유인하는 물질이다(M. Murata et al, 1986). 지중해에 서식하는 해면 *Crambe crambe*로부터 pyridinium salts가 분리되었다. 이 물질들은 강한 향미생물 효과를 보였으나 세포독성을 나타내지는 않는다(D. B. Stierle & D. J. Faulkner, 1991). 홍해의 *Niphates* sp.로부터 어류독성 및 세포독성을 보이는 pyridinium 대사물질들이 분리되었다(R. Talpir et al, 1992). Okinawa에서 채집한 *Psammaphysilla purea*로부터 bromotyrosine 유도체 purealidin D가 분리되었다(M. Tsuda et al, 1992)(Fig. 3-3).

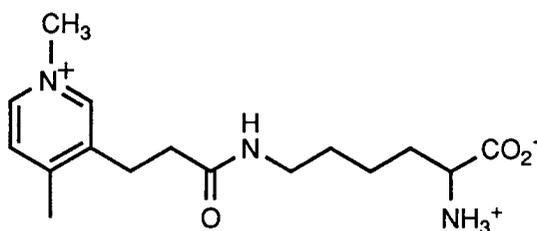
3. 4. 실험 방법

3. 4. 1. 시료의 채집 및 유기물질의 추출과 flash chromatography

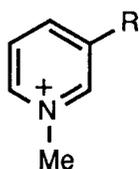
Cliona celata(94K-4)는 '94년 8월에 거문도 연안해역의 수심 15-20 m에서 SCUBA 다이빙에 의하여 채집되었으며 이 시료는 채집해 오는 즉시 냉동고에 보관되었다. 냉동보관중인 시료(수분포함한 무게량: 1 kg)를 해빙한 후에 잘게 자른 후에 추출용매 1L를 가하여 실온에서 48시간 방치한 후에 그 용액을 걸러내었다. 추출용매로는 methanol 1 L와 methylene chloride 1L를 각각 순서대로 두 번 사용하였다. 이렇게 추출하여 얻어진 조추출물을 다시 n-butanol과 물을 이용하여 분배하였으며 얻어진 조추출물의 양은 수용액층에서 44.2 g, n-butanol에서 얻어진 양이 54.0 g이었다.



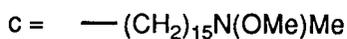
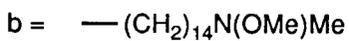
halitoxin
(sponge *Haliclona* spp.)



amphikuemin
(sea anemone *Radianthus kuekentali*)

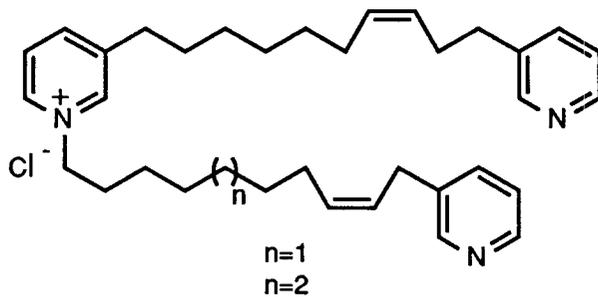


R = a, b, c
R = b
R = c

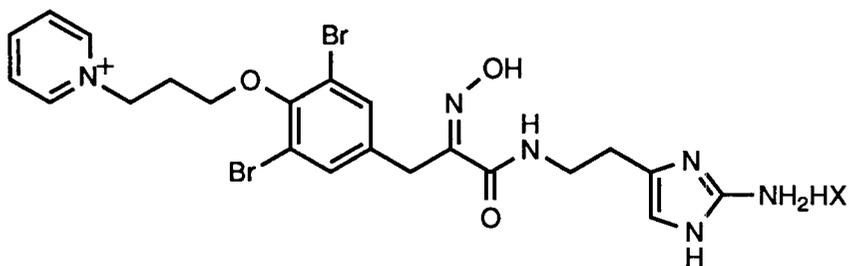


xestamines F-H
(sponge *Calyx podatypa*)

Fig. 3-3. Pyridinium derivatives isolated from marine organisms.



niphataxins A and B
(sponge *Niphates* sp.)



purealidin D
(sponge *Psammallyssila purea*)

Fig. 3-3. Continued.

수용액층에서 얻어진 조추출물 44.2 g중에 6.4 g을 취하여 실리카 고속 가압 크로마토그래피를 실시하였으며 용매로는 ethyl acetate(150 ml), acetone(150 ml), methanol(150 ml x 8), acetic acid(150 ml)를 순서대로 용출하였다. 이렇게 얻어진 9개의 분획(fraction, fx)을 각각 용매를 제거한 후 ^1H NMR을 측정된 결과 흥미 있는 2차 대사물질이 fx-5(470 mg), fx-6(370 mg), fx-7(454 mg), fx-8(295 mg), fx-9(334 mg), fx-10(101 mg)에 포함되어 있음이 밝혀 졌다.

3. 4. 2. 94K-4-1의 분리

고속가압 크로마토그래피로 분리한 fx-5(470 mg), -6(370 mg), -8(295 mg), -9(204 mg), -10(101 mg)을 5% acetic acid/water에 녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 reversed phase(YMC C_{18} column, RI detector, 2 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 8분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 용매만 100% water로 바꾼 후에 동일한 조건하에서 HPLC로 분리하면 retention time 8분에서 순수한 94K-4-1이 12 mg 얻어 졌다.

94K-4-1: 흰색 고체 mp 139-141 °C; IR(KBr) 3420, 3115, 1644, 1616, 1488, 1372, 1218, 1119, 782, 572 cm^{-1} ; UV(MeOH) λ_{max} 218.1 nm(ϵ 7100), 280.5 nm(ϵ 2300); ^1H NMR(CDCl_3 , 500 MHz) δ 9.20(1H, s, H-2), 8.90(1H, d, 7.8, H-4), 8.86(1H, d, 6.4, H-6), 8.05(1H, dd, 7.8, 6.4, H-5), 4.43(3H, s); ^{13}C NMR(CDCl_3 , 125 MHz) δ 166.73(C, CO), 147.50(CH, C-2), 146.74(CH, C-6), 145.88(CH, C-4), 139.91(C, C-2), 128.39(CH, C-5), 48.67(CH_3)

3. 4. 3. 94K-4-2의 분리

고속가압 크로마토그래피로 분리한 fx-5(470 mg)를 5% acetic acid/water에

녹이고 녹지 않는 물질은 spartan filter(Aldrich)로 여과한 후에 이 용액을 reversed phase(YMC C₁₈ column, RI detector, 2 ml/min)를 이용하여 분리하였으며 retention time 10.2분에 나오는 peak를 모으고 이것을 다시 용매만 100% water로 바꾼 후에 동일한 조건하에서 HPLC로 분리하면 retention time 8분에서 순수한 94K-4-2가 5 mg 얻어 졌다.

94K-4-2: 흰색 고체 mp 149-151 °C; IR(KBr) 3424, 1644, 1364, 1288, 1172, 1068, 772, 676 cm⁻¹; UV(MeOH) λ_{max} 218.1 nm(ε 7100), 280.5 nm(ε 2300); ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 8.75(1H, d, 6.4, H-6), 8.51(1H, ddd, 7.8, 7.8, 1.5, H-4), 8.07(1H, dd, 7.8, 1.0, H-3), 7.92(1H, ddd, 7.8, 6.4, 1.5, H-5), 4.41(3H, s); ¹³C NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ 165.26(C, CO), 155.68(C, C-3), 146.99(CH, C-4), 146.45(CH, C-6), 127.50(CH, C-3), 127.47(CH, C-5), 47.43(CH₃)

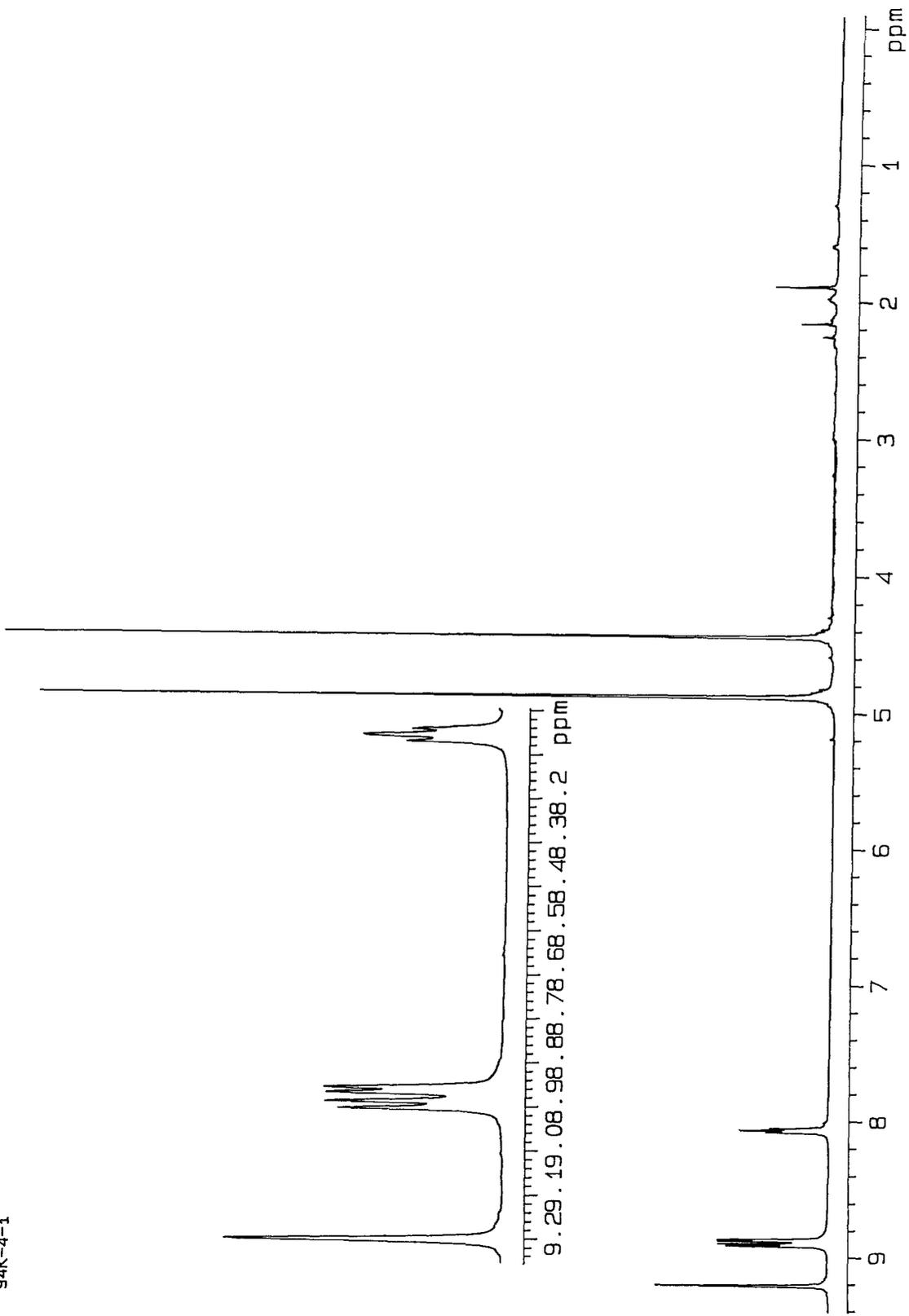
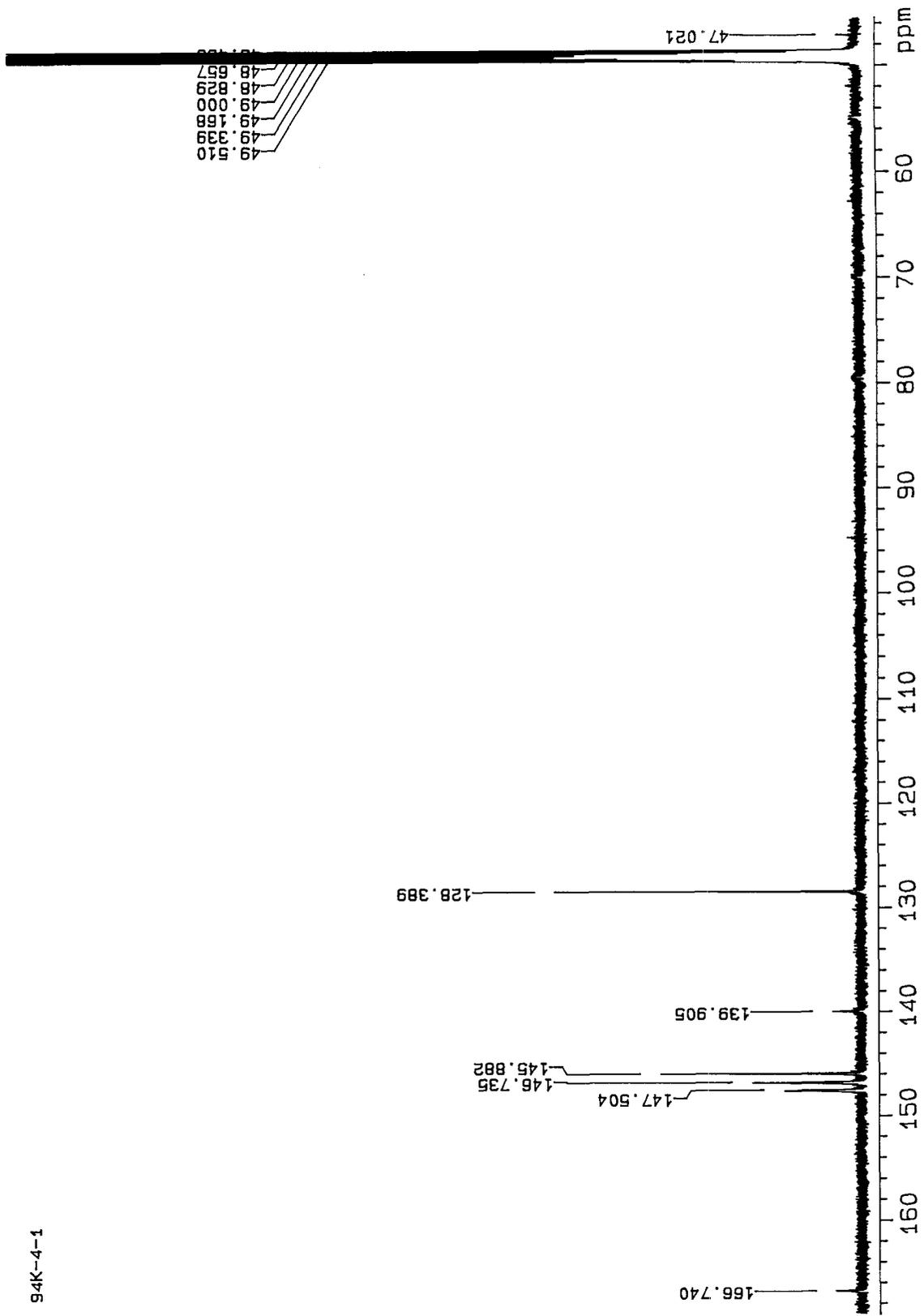


Fig. 3-4. Proton NMR spectrum of compound 94K-4-1



49.510
49.339
49.168
49.000
48.829
48.657
48.486

Fig. 3-5. Carbon NMR spectrum of compound 94K-4-1

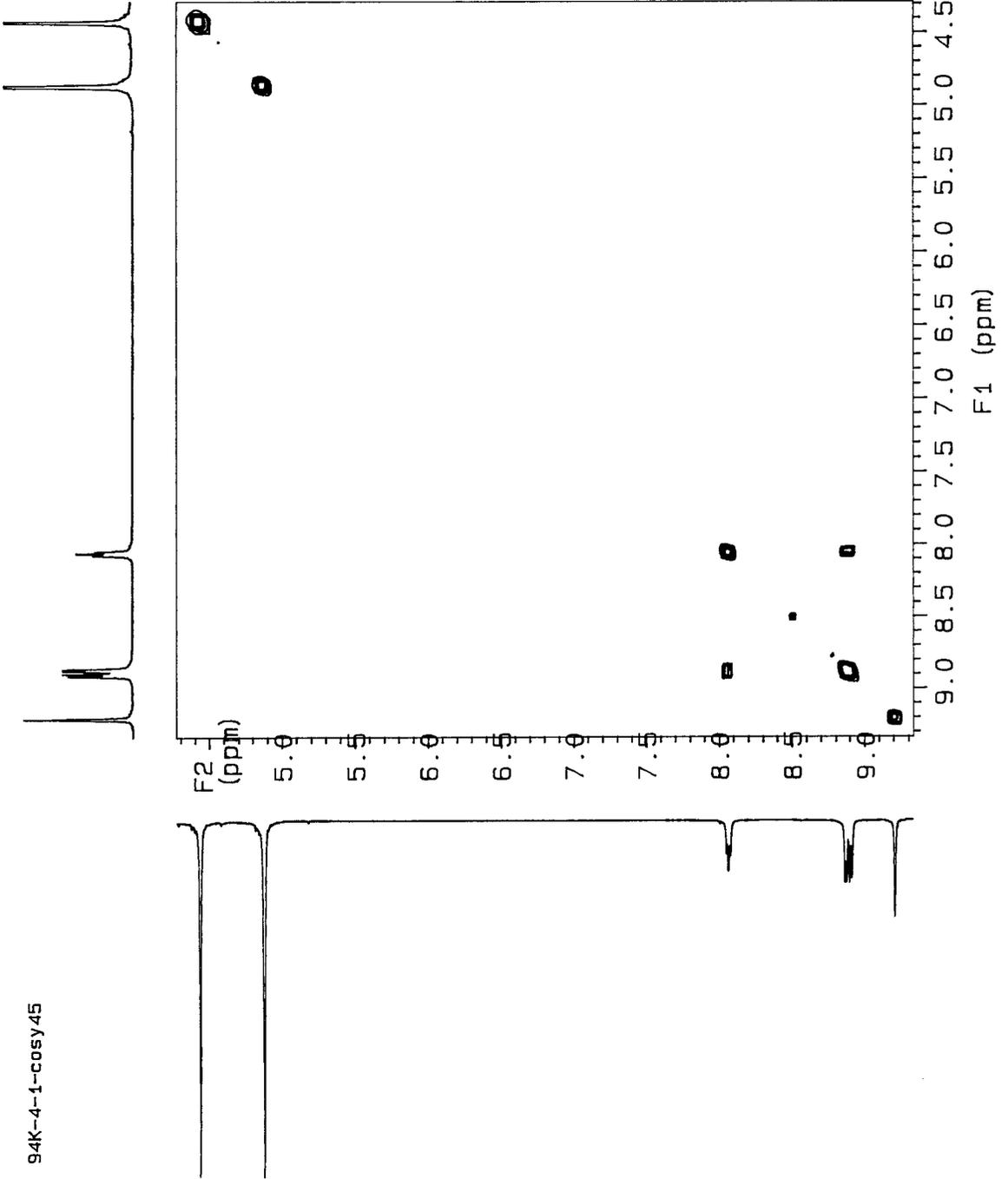


Fig. 3-6. Proton COSY spectrum of compound 94K-4-1

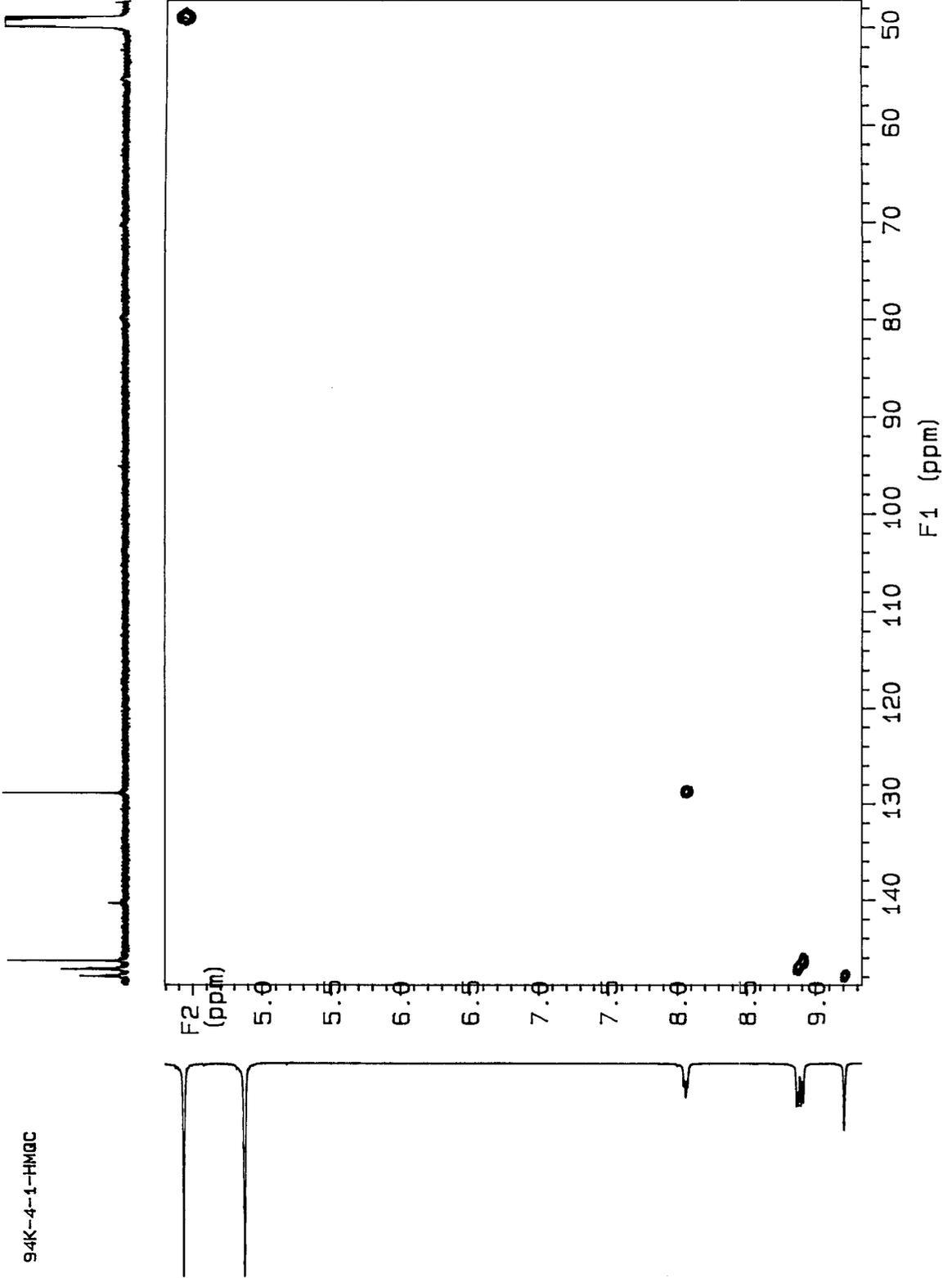


Fig. 3-7. HMQC spectrum of compound 94K-4-1

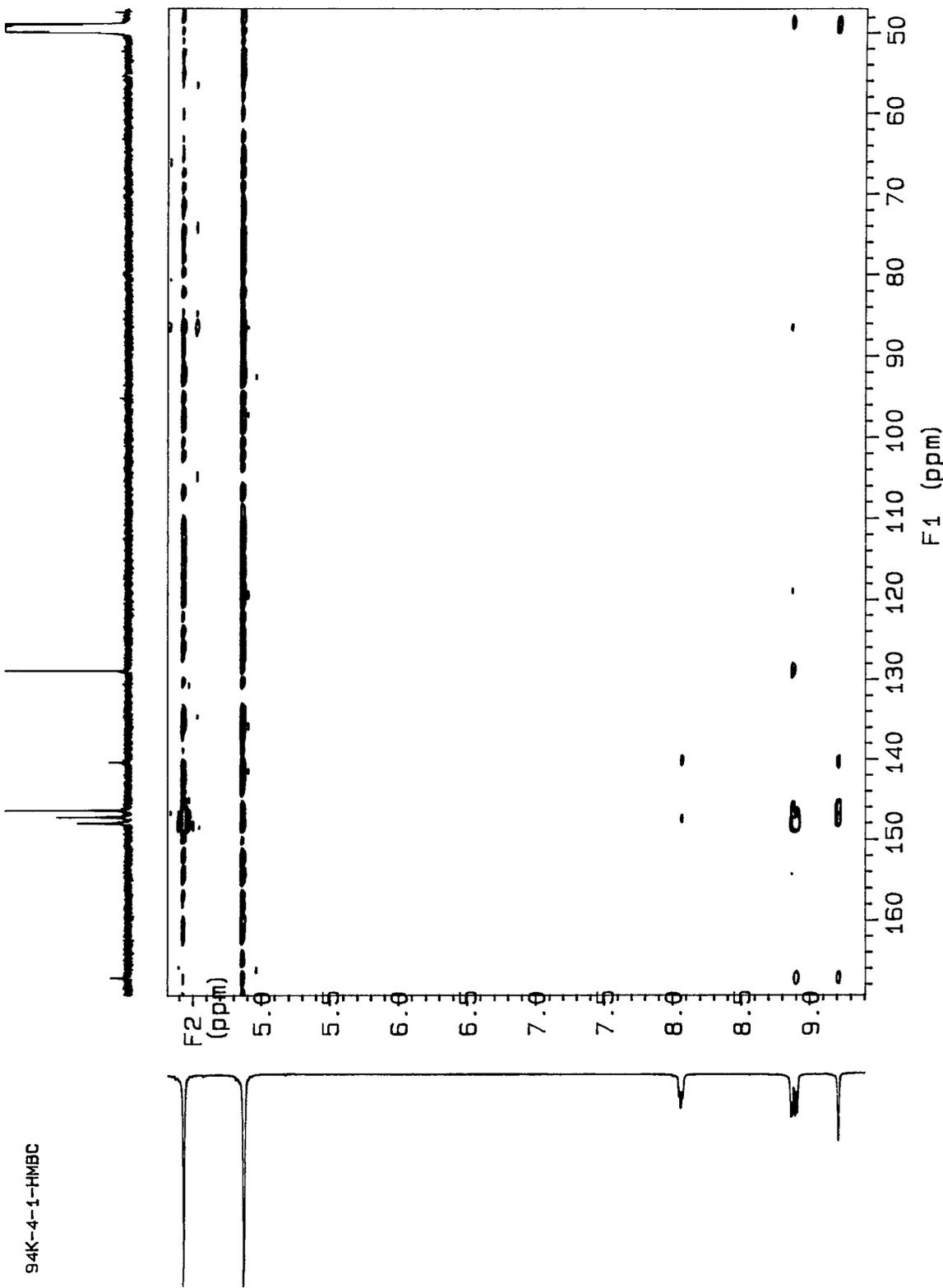
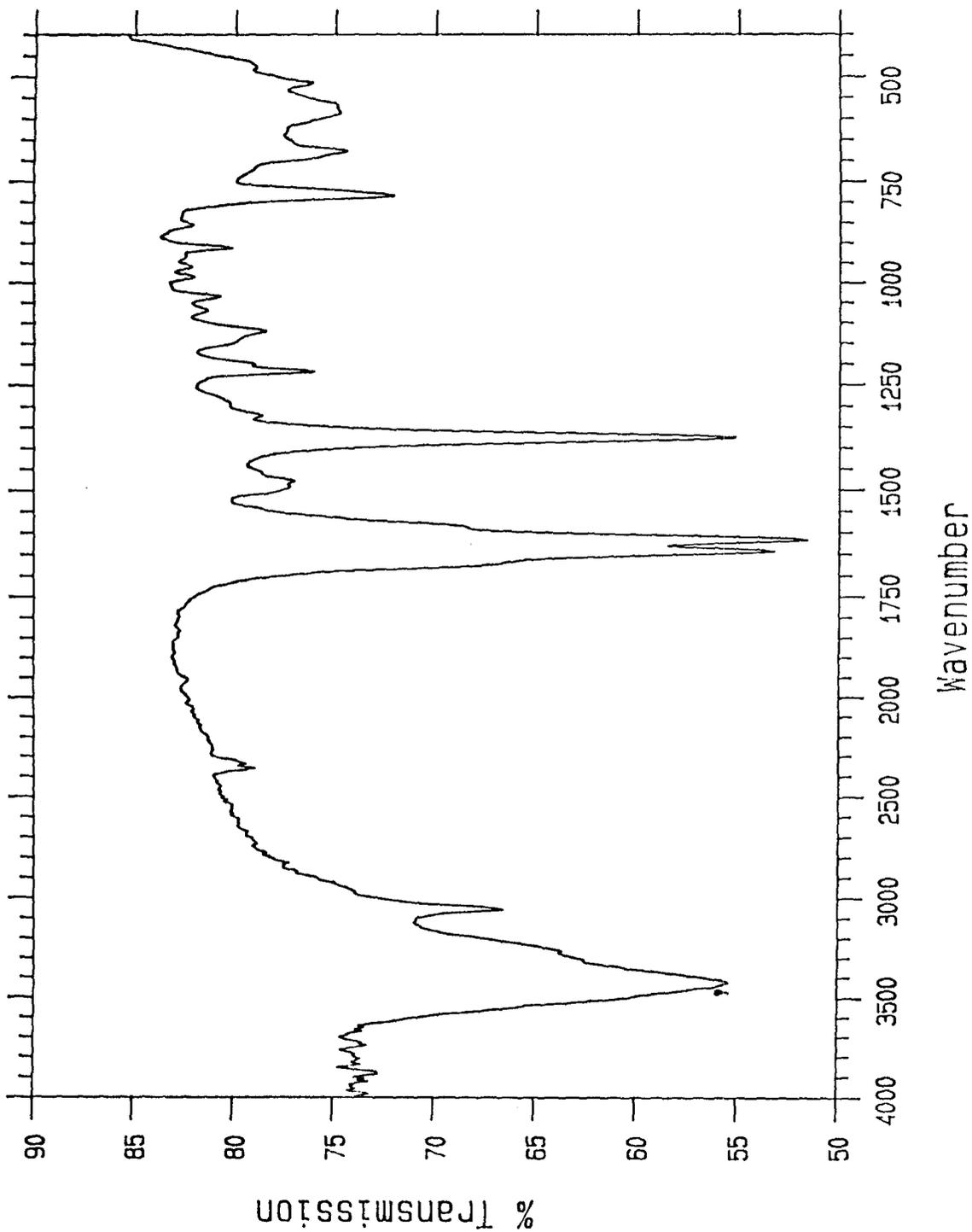


Fig. 3-8. HMBC spectrum of compound 94K-4-1

Mattson Instruments FTIR



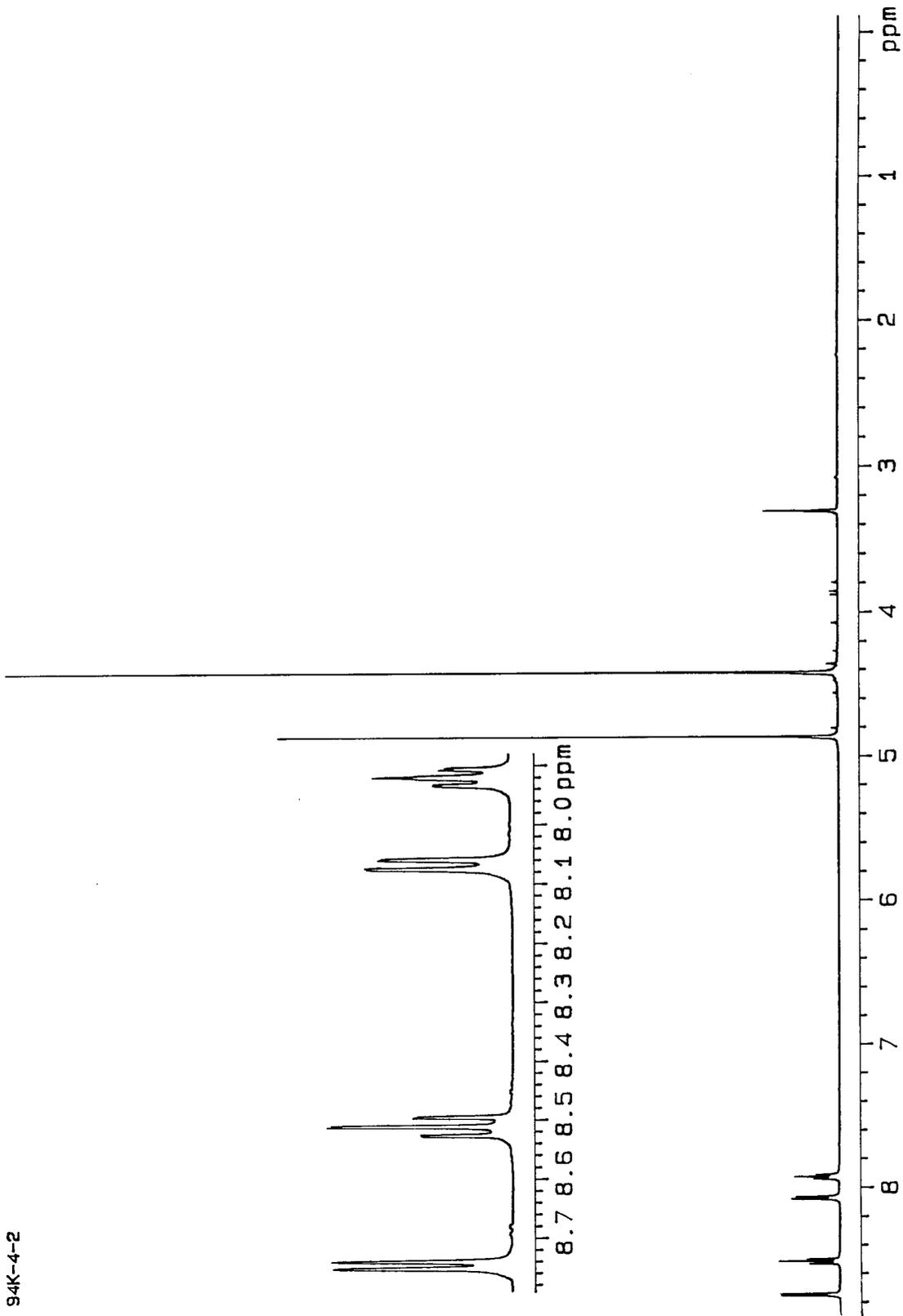


Fig. 3-10. Proton NMR spectrum of compound 94K-4-2

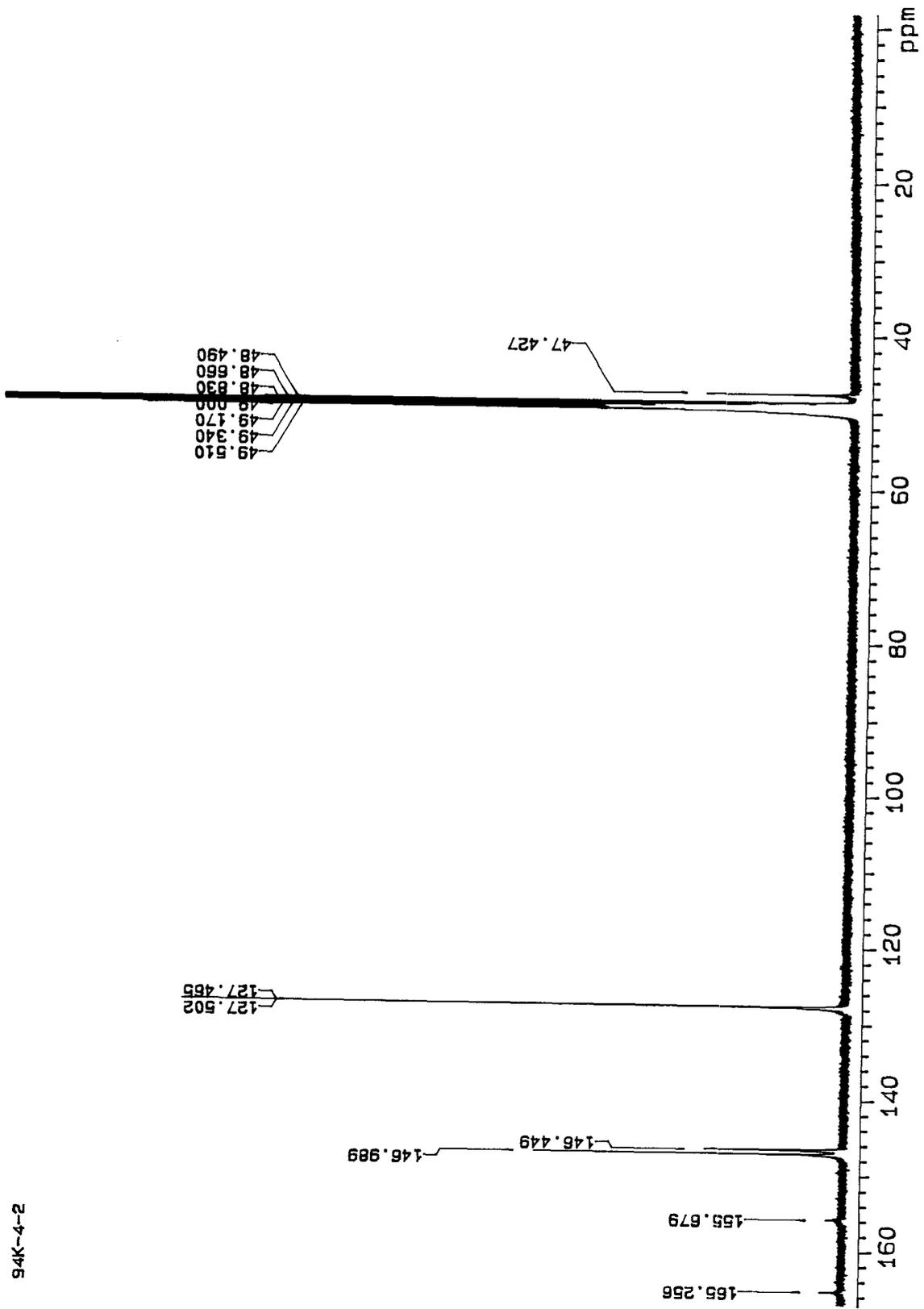


Fig. 3-11. Carbon NMR spectrum of compound 94K-4-2

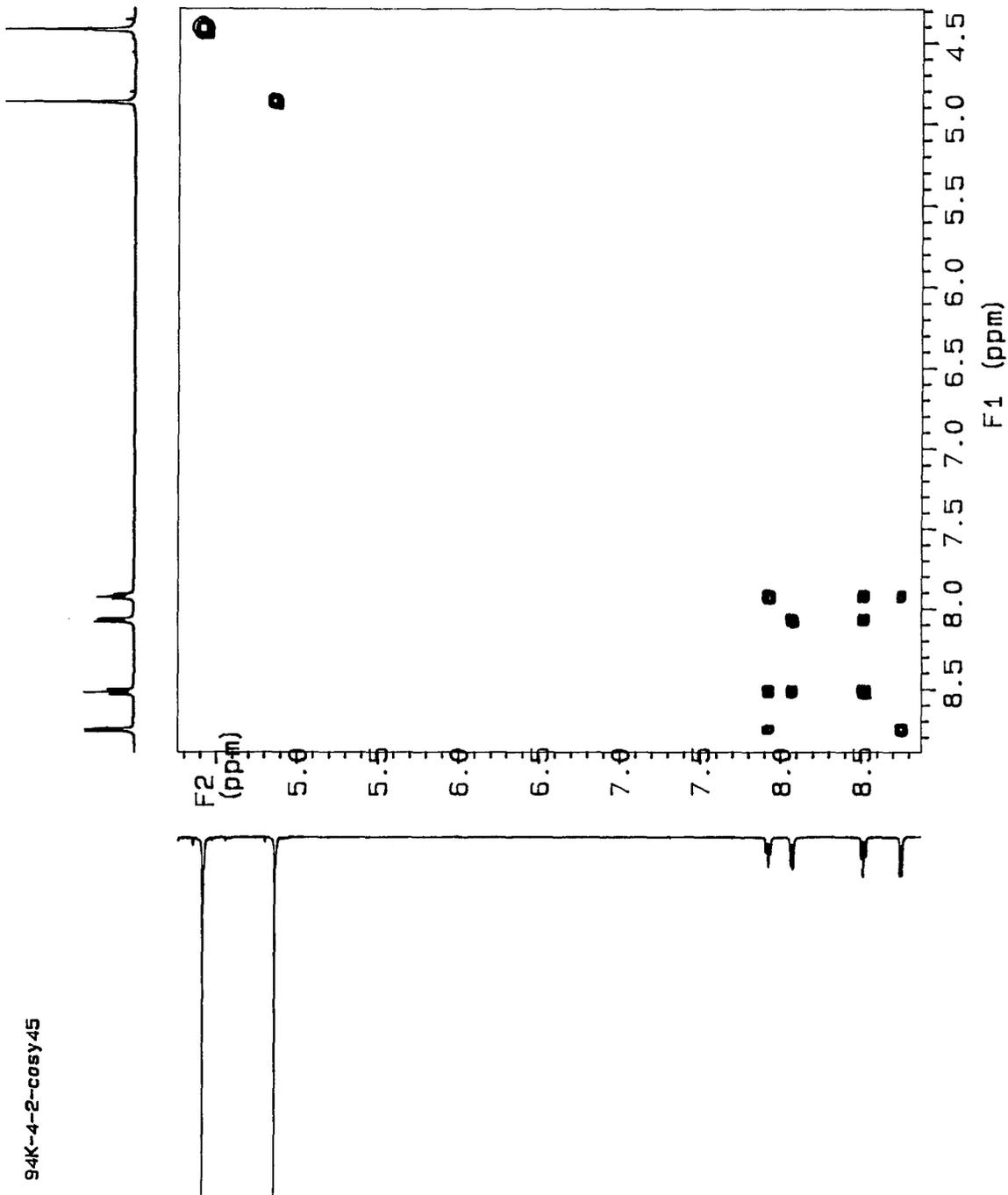


Fig. 3-12. Proton COSY spectrum of compound 94K-4-2

94K-4-2-HMBC

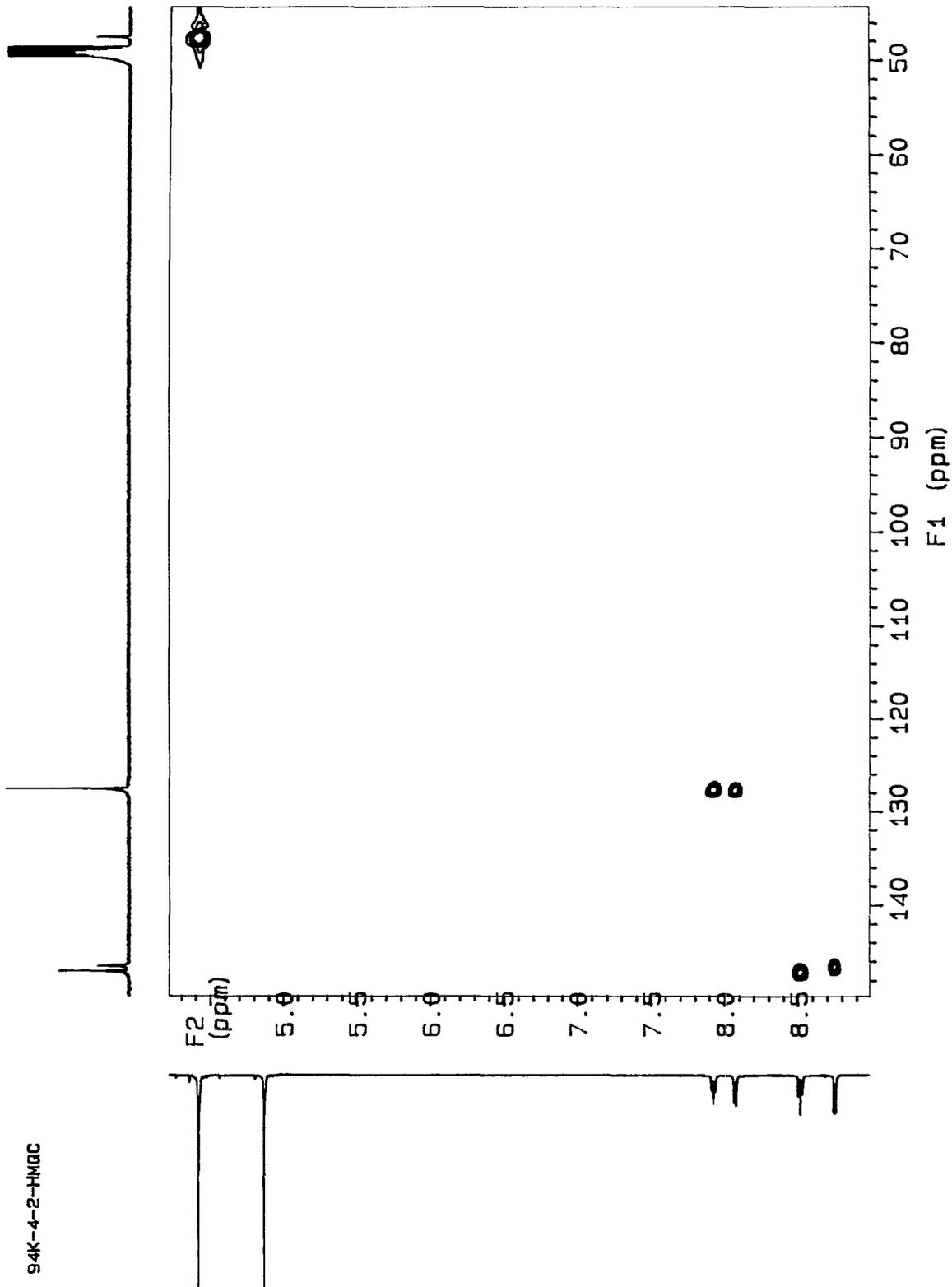


Fig. 3-13. HMQC spectrum of compound 94K-4-2

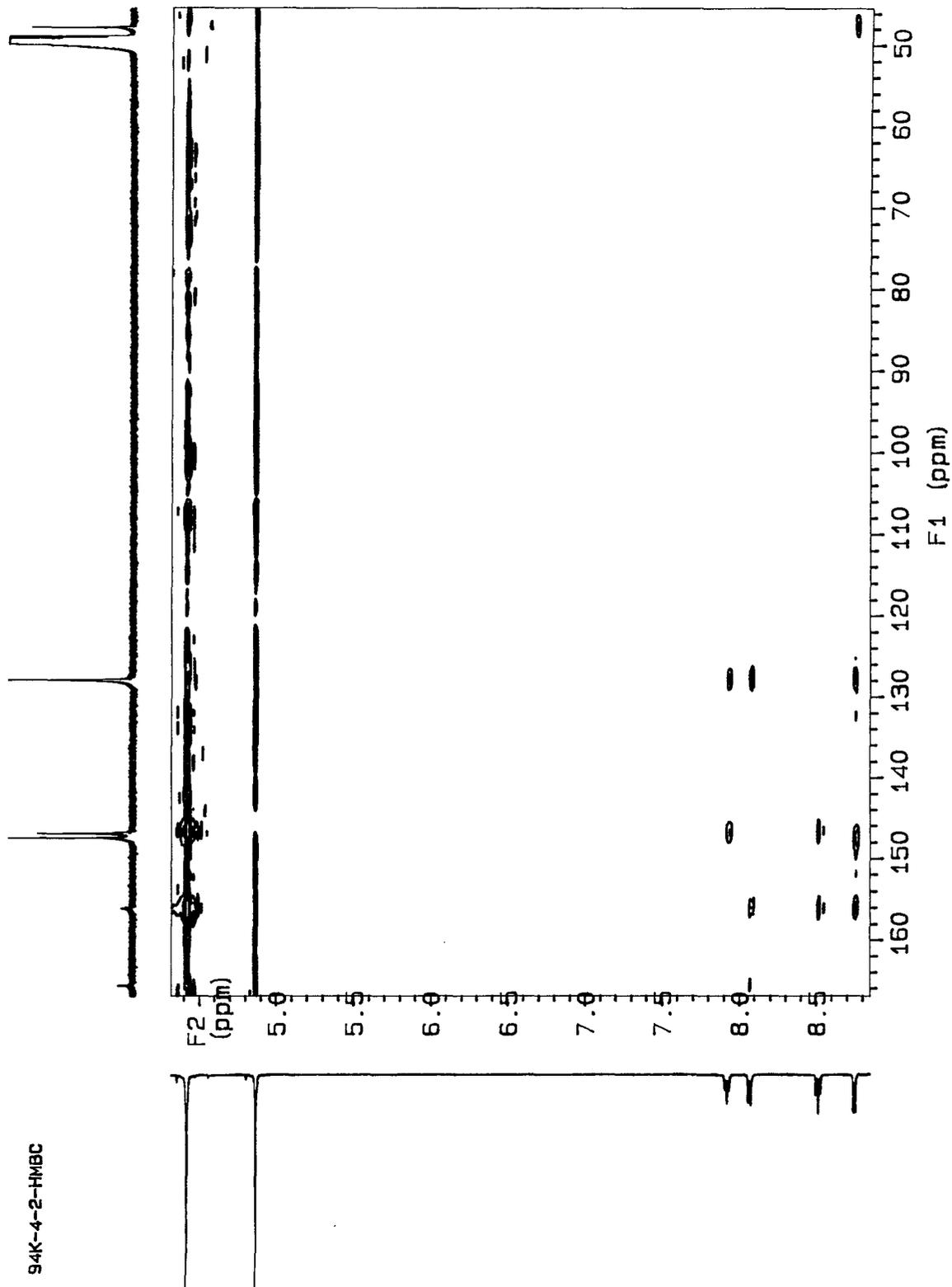
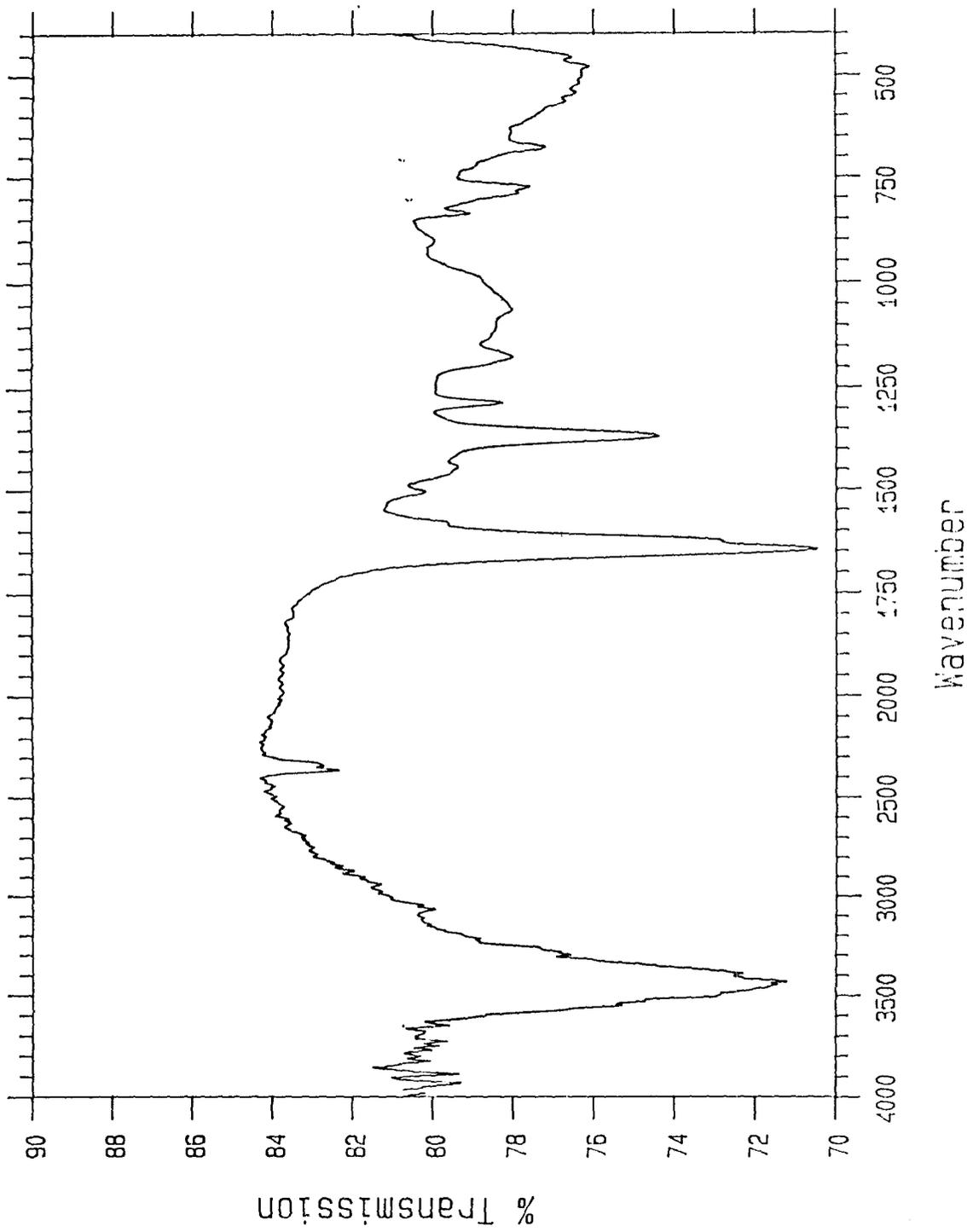


Fig. 3-14. HMBC spectrum of compound 94K-4-2



제 4 장 해양생물로부터 유용물질 개발

해양생물과 공생 혹은 공존하는 미생물들을 대상으로 균주의 순수 분리, 보존하고 이들을 대상으로 항세균 및 항진균 활성도를 검색하여 활성도가 발견된 균주들을 대량 배양하고 이로부터 항세균 및 항진균 활성도를 보이는 물질을 순수 분리하여 구조 결정을 통하여 신물질 여부를 확인하는 한편, 항종양, 항바이러스 등의 활성도 여부를 추가로 검색한다. 산업적으로 그 이용도가 높은 효소들의 생산 여부를 수집된 균주를 대상으로 검색하고 배양량당의 효소 역가 검사를 통하여 활성도가 높은 효소원을 확보한다. 이렇게 확보된 효소원을 이용하여 효소를 분리 정제하고 그 응용분야를 개발한다.

4. 1 연구의 배경 - 효소의 기술개발 동향

4. 1. 1. 효소의 특성

효소는 생체내의 생화학반응을 촉진시키는 촉매로서 소수의 극한 환경 서식생물의 경우를 제외하고는 효소반응이 일반 화학반응에 비해 상온 상압에서 일어난다는 점과 효소반응의 결과 자연계에 수많은 종류의 유기물질이 존재한다는 사실은 효소촉매작용의 막대한 잠재력을 보여준다. 효소가 유기화합물합성에 촉매로서 사용될 수 있는 가능성은 효소의 여러 장점에 기인하고 있는데 효소의 촉매 효율성은 비슷한 반응조건하에서의 비효소반응 (nonenzymatic reaction), 화학반응에 비해 무려 10^8 - 10^{14} 배나 되며 기질에 대한 특이성, 광학활성에 대한 특이성, 화학구조상의 특정 부위에 대한 특이성 등의 특성이 있어 화학 촉매 반응에 비해 반응의 선택성이 매우 높다. 그러나 이러한 많은 장점에도 불구하고 효소촉매의 실제 산업적 응

용범위가 제한적인 것은 효소를 유기합성 공정의 촉매로 사용하는 경우 나타나는 문제점에 기인하고 있다. 즉, 단백질의 일종인 효소는 본질적으로 열이나 산, 염기에 약하며 유기합성에 사용되는 유기용매에 의해 쉽게 변성되거나 불활성화되는 경우가 많고 또한 반응기질이나 생성물에 의해 효소활성이 저해되는 경우도 있어 기질 또는 생성물의 농도를 증가시키는데 한계가 있어 화학공정에 비해 상대적으로 저농도 반응체계가 되며 효소를 이용한 합성반응에서는 많은 경우 소모성 조효소를 필요로하여 공정이 복잡하게 되고 경제성을 낮추는 요인이 되고 있다. 이외에도 효소의 기질 특이성으로 인하여 다양한 기질의 사용이 제한되어 유사한 구조를 갖는 저렴한 반응기질의 사용이 어려워지기도한다. 그러나 최근들어 유전공학, 단백질 공학 및 효소화학등 기초 학문 분야의 발전과 생물공정 분야의 기술 개발로 이러한 문제점들을 개선 시킬수 있을 것으로 전망되고 있다. 특히 자연상태에 적합하도록 되어있는 효소를 산업적목적에 적합하도록 변형시키는 효소의 새로운 기능개발과 비수용성 (non-aqueous)효소반응기 기술개발등 효소기술의 활용기술개발은 효소 촉매의 이용에 혁신적인 변화를 가져올 것으로 기대되고 있다. 즉, 최근까지의 효소 반응은 상온 상압등 온화한 조건하에 수용액 상태에서 생체내에 일어나는 자연 반응을 이용하는 것이 거의 대부분이었으나 1980 년대들어 기존의 효소반응의 개념을 벗어난 인위적, 비자연적 상태에서의 효소반응에 대해 연구한 결과 새로운 효소반응의 특성이 밝혀 지면서 종래의 효소 촉매 반응과 구별되는 nontraditional biocatalyst의 개념이 형성되었다.

4. 1. 2. 효소공학의 발전

효소가 산업적으로 의미를 갖기 시작한 것은 1884 년 네덜란드의 Hansen이 송아지의 위액에서 rennet를 추출하여 사용한 것이 처음이고 1894년 일본에서 Takamine가 Koji 배양법으로 곰팡이의 Amylase를 생산하여 상업화 하면서 미생물

을 이용한 효소 생산이 본격화되었다. 이후 20 세기들어 독일의 Tohm에 의하여 피혁 가공 및 세제에 효소를 이용하기 시작하였고 1911 년 미국의 Waltersten이 효소를 이용한 Chill proffing 맥주를 개발하여 효소의 이용 용도가 식품, 환경공업등으로 확대되었다.

효소산업의 발전은 현재까지 대략 3 단계로 구분하는데 제 1 단계는 1908 년 Boidin 과 Effront가 *Bacillus subtilis*를 액체 배양하여 amylase를 생산하기 시작한 이후 제 2 차 세계대전을 전후하여 심부 배양법 (Submerged fermentation)에 의하여 효소를 대량 생산하는 기술이 정립되다. 이 때에는 주로 식품분야에 이용되었고 주요효소는 주로 전분당화 효소와 단백질 응유효소로서 효소원은 주로 동식물 및 곰팡이가 이용되었으며 효소자원의 탐색은 주로 고 역가 효소의 탐색에 집중되었다. 효소공업발전의 제 2 단계는 1953 년 효소고정화 (Enzyme immobilization)기술 개발이래 1969 년 Glucose isomerase의 효소고정화 반응기를 통해서 고농도 과당의 생산이 가능해지고 이에 따라 효소산업도 식품생산을 포함하여 정밀 화학 제품의 생산에도 이용되기 시작했다. 이 때의 효소생산 방법은 제 1 세대의 심부 배양법 이외에 유가식 배양을 하는 유가식 배양법 (Fed batch fermentation)으로 발전하였고 효소자원도 그 배양시간이 짧은 세균을 대상으로 변화하기 시작하였다. 제 3 세대 효소기술의 발전은 1977 년 비수계 효소반응 합성이 성공하였고 1988년 비수계 효소반응기가 실용화되면서 활성화 되었는데 이 때의 효소생산 방식은 주로 유전자 재조합 균주 발효계를 사용하여 효소를 대량 생산하는 방식을 택하였고 효소의 활성도 단백질 공학 기술을 활용하여 변형된, 산업적으로 이용도가 높은 효소의 생산이 시도되었다. 신효소자원의 탐색도 초기의 고역가 효소자원 중심에서 신 반응성, 신특이성, 신이용성이 있는 효소자원을 선정하여 유전자 재조합기술을 이용하여 대량 생산하는 체제로 발전하였다. 제 3 세대 효소기술의 발전에 기여한 효소들은 esterase, hydrogenase, lipase, oxidase등의 효소가 가장 많고 이 시기의 효소 세계시장은 세계의 전체 효소 시장을 제 3 세대효소기로 분류되는 1985 년에 비해

서 8 년 후인 1993 년의 효소시장이 225 % 증가된 9 억달러 수준이고 이중 특기 사항은 진단, 정밀화학 분야가 급속히 성장하는 시장으로 대두되고 있다. 기타 의약, 펄프 및 폐수처리 섬유, 동물 사료 분야가 획기적으로 증가하여 효소시장이 초기의 식품산업 중심에서 전산업으로 그 활용폭이 넓어졌다. 제 3 세대에서의 효소 이용이 화학 반응의 촉매로 사용되기 시작하는데 이는 효소의 높은 기질특이성 (Substrate specificity), enantioselectivity, regioselectivity 등의 성질을 이용하여 고가의 chiral intermediates를 제조, 항생물질의 중간체 합성, 탄수화물구조의 의약품, 신물질의 효소적 합성 및 고분자 화합물의 합성등에 다양하게 이용됨에 따라 이러한 효소들을 생촉매 (Biocatalyst)라 명명하고 효소산업 분야의 신규 분야로 대두되고 있다. 이러한 생촉매에 대한 수요도 정밀화학 분야에서 1993 년도에는 1985 년 대비 563 % 증가한 4500 만달러 로 늘어나고 있으며 이러한 추세는 점차 심화될 것으로 보인다. 이와같이 효소의 다양한 반응성을 이용함에 따라 보고되고 있는 효소의 종류도 점차 다양해져 1961 년 712 개, 1964년 875 개, 1972 년 1770 개, 1978 년 2122 개 1984 년 2477 개 그리고 1993 년 현재 3300 여개가 보고되고 있다. 제 3 세대의 효소이용기술은 지구 환경보존과 관련 청정산업화기술(Clean technology)의 여파로 효소를 사용하려는 움직임이 증가하여 산업 전반에 고효율, 저에너지, 저공해 기술인 효소이용기술을 도입하는 추세이다. 제 3 세대 효소공학 기술의 개발에 필요한 주요 관련 기술들은 기초연구분야에 미생물 탐색기술, 유전공학 기술, 단백질 공학 기술, 단일 클론 항체기술 등이, 그리고 응용연구분야에 유기합성기술, 생물 반응기술, 발효공학 기술, 분리정제 기술등이 연계되어있다.

미래의 효소 공학기술은 생체 모방기술(Biomimetics)의 한 분야인 효소모방 기술 (Enzyme mimetics)로 1982 년 최초의 인공효소가 합성된후 가시화되었고 현재 까지 천연효소가 가지고 있는 고분자성, 안정성, 반응성 및 재사용성 등의 한계점을 극복한 인공효소인 xenozyme, abzyme, 및 chemozyme등의 생산이 가능해 짐에 따라서 효소의 생산 기술도 전통적인 미생물 발효에 의한 방법보다도 획기적으로 저

렴할 뿐 아니라 동시에 특성이 다른 효소를 대량 생산 가능한 효소모방 합성법에 의해서 생산 할 것으로 예상된다. 이와같은 기술이 확립되면 효소이용 산업도 현재 활용되고 있는 일부 식품, 정밀화학 및 의약 분야에서 전산업 분야로 확대 이용될 것이고 효소반응도 순환되면서 연속적으로 사용되는 동시에 효소자체가 재생되는 현재의 생체 기능과 같은 방식으로 원하는 산물을 생산하게 될것으로 기대된다.

이상과 같은 효소산업의 발전은 사회적 요구와 주변 기술의 발달에 의해서 획기적으로 발전하고 있으며 산업적 중요성이 점차 가증됨에 따라서 기존의 알려진 효소에 대해서도 신규기능이 있는지 여부를 확인하고 아울러 반응성에 맞는 신규효소의 탐색이 중요하고 이런 효소들을 이용한 새로운 공정 개발을 통한 산업적응용은 중요한 의미가 있다.

4. 1. 3. 효소촉매 기술개발 동향

효소촉매 기술개발 동향을 두가지 측면에서 살펴보면 한가지는 효소자체의 특성 및 기능을 보완 발전 시키기 위한 것이며 다른 한가지 측면은 효소의 생산 효율성을 증대 시키기위한 것이다. 전자는 이미 앞에서 기술한 바 있는 효소의 특성 가운데 효소의 촉매로서의 단점들인 안정성 미흡, 특이성 및 촉매 능력의 한계등을 개선하기 위한 효소 촉매의 단점 보완 방향과 효소촉매 자체가 가지는 잠재능력을 최대한으로 증대 시키기위한 효소 촉매의 장점 증대 방향으로 구분된다. 한편 효소 생산의 효율성 향상 기술에는 1970 년대 중반이후에 응용되기 시작한 유전자 재조합 기술과 aqueous two phase partitioning이 있다.

효소특성 변환 기술에는 단백질 공학, 인공효소개발, 효소고정화기술등을 들수 있는데 단백질 공학 (protein engineering)은 단백질의 기능을 의도적으로 설계 변경하여 여러가지 필요에 부합하도록하는 기술로서 효소이용기술의 발전에 큰 기여를 할 것으로 기대된다. 단백질 공학 기술을 효소에 응용할 경우 반응속도의 증가,

열 및 유기 용매에서의 안정성 증가, 최적 pH의 변화 이외에도 기질특이성 및 반응 특이성의 변이등이 기대되며 조효소 요구성, 단백질 분해효소에 대한 내구성, allosteric 제어의 완화 그리고 분자량 및 subunit 구조의 변화등이 가능하다. 최근에는 단백질의 구조와 기능간의 관계 해석에 대한 연구가 활발하여 CAED (computer aided enzyme design)이 가까운 시일내에 실현될 것으로 전망되고 있다. 단백질 공학기술을 효소의 활성증대에 응용한 예는 tyrosyl tRNA synthetase 의 35-Cys를 Ser으로 치환하여 ATP에 대한 친화력이 증대된 경우 (Fersht et al., 1989)나 protease의 일종인 subtilisin 의 222-Met를 Ala. 나 Ser.으로 치환하여 효소세제에 첨가되는 peroxide계열의 표백제에 대한 안정성을 향상시킨 예가있고 Bacterial luciferase의 106-Cys를 Val.으로 치환하였을 경우 monooxygenase인 luciferase가 dioxygenase로 효소자체의 성격이 변화되는 현상이 보고되었다 (Xi et al., 1990).

효소의 기능을 모방한 생체모방기술 (Biomimetics)의 한 분야로서 최근 인공 효소에 대한 연구가 활발해지고 있으며 이는 기질의 효소에의 결합 부위와 촉매작용부위를 화학적으로 합성하여 제조하는것으로 대표적인것이 crown ether 류나 cyclodextrin 등의 물질에 촉매기능을 갖는 아미노산 side chain 을 결합시키거나 금속 이온을 결합시키는 형태에서 출발하였다. 이들의 발전된 형태로 효소 또는 단백질의 chemical modification 에 의하여 형성된 semisynthetic enzyme의 기술도 발전하고 있다. 또 최근에는 항원 항체 반응의 고기질 특이성을 이용하여 이 항체에 촉매기능을 갖는 아미노산 side chain 을 결합시키거나 금속 이온, 또는 조효소 분자를 결합시키는 형태로 발전하고 있으며 단일 항체기술의 발전에 힘입어 비자연적 기질에 대한 항체를 형성시킴으로써 이에 대한 활성을 갖는 새로운 효소의 개발이 가능해질 전망이다. 이는 종래의 수용성인 효소가 반응후 분리 과정에서 소실됨을 방지하고 그 안정성을 증대시키기위해 사용되고 있는데 이는 효소의 연속적 재사용을 가능하게하여 효소공학의 발전에 크게 기여해 오고있다. 효소의 고정화 방

법은 흡착법, 이온결합법, 공유결합법, cross-link 법, 포괄법등이 있는데 이는 효소 뿐만이 아니라 세균등의 고정화에도 응용되는 기술로서 agarose 나 aliginat등과 같은 천연고분자 물질이나 전기영동에 사용되는 polyacryamide등의 합성고분자 물질도 사용되고 있고 다공성 유리 bead, bentinite등의 무기물질도 사용되고 있다.

4. 2. 균주수집

해양생물로부터 유용물질을 생산하는데는 생물 그자체가 생산하는 물질을 대상으로 할수도 있으나 이 경우 때번 다량의 시료가 필요하므로 본 과제에서는 이와 함께 실험실에서 대량 배양이 가능한 미생물에 의해 생산되는 유용물질에 주안점을 두고 연구를 수행하였다. 이 경우 순수한 형태로 분리된 균주는 일단 배양 조건만 수립되면 원하는 시기에 신속하게 필요한 양의 균체를 유용물질의 원료로서 공급될 수 있으며 생산 작업의 규모도 필요한 대로 증대시킬수 있는 장점이 있고 아울러 균주개량등을 통하여 생산량을 증대 시킬수 있다.

Table 4-1. Isolation of marine bacterial strains (till 1995.4.)

		해양세균	방선균
1994.2.	남극	45	
1994.4.	심해저	20	
1994.8.	주문진	240	2
1994.8.	거문도	160	13
1994. 10.	거제도	80	12
1994.10.	앵강만	47	3
1994.11.	본악산		55
1994. 12.	거제도	230	17
1995.2.	안산	57	25
1995.3.	사천	120	9
1995.4.	반월	33	
기타 수집균주		420	22
합 계		1,507	158
항세균및 항진균 활성균주		8	17
세포외 다당류형성 균주		1	

4. 3. 유용물질 생산 검색

수집된 세균과 방선균을 대상으로 일반 생리 활성을 검색하는데 key activity로서 지나치게 강하지 않은 항진균 활성 (antifungal activity)을 선택하였다. 그 이유는 이방법이 비교적 생리활성도 측정이 용이하며 그 자체로서도 의미가 있을 뿐만 아니라 대개의 항암등의 활성도를 보이는 물질들에서 항진균활성이 공통적으로 발견되기 때문이다. 따라서 단순히 antibiotic 활성만을 보이는 시료는 선택하지 않고 항세균활성과 항진균활성을 동시에 보이는 균주만을 분리정제 및 구조분석의 대상으로 선정하였다. 탐색결과 antibiotic, antifungal activity를 보이는 세균 8 종을 발견하였으며 antibiotic, antifungal activity를 보이는 방선균 18 종을 발견하였고 이외에 세포외 다당류 형성 세균 1 종을 발견하였다 (Table 4-1). 이들을 대상으로

구조 결정을 위한 분리, 정제를 수행하고 있다.

4. 4. 유용효소 생산 검색

Lipase, phospholipase, superoxide dismutase, haloperoxidase의 활성도 분석법 및 screening 방법을 수립하였다. Lipase는 가수분해, 에스테르화, 트랜스에스테르화 반응들을 촉매하는데 반응에 조효소를 필요로 하지않고 상대적으로 여타 효소들에 비해 열 및 유기 용매에 안정하며 우수한 입자선택성 (stereospecificity)을 갖고 있어 enantiomer합성등에 많이 이용되고 있다. 실제로 많은 chiral 약품들이 한종류의 enantiomer 만이 치료에 유용하며 반대의 enantiomer는 효과가 없거나 심지어는 독성을 나타내는 경우도 있어 enantiomer들이 섞여 있는 약품의 수요가 점차 순수한 enantiomer에 대한 수요로 대체되고 있다. 화학적 합성의 경우 이러한 특정 종류의 enantiomer를 선택적으로 합성하는데 어려움이 있고 합성후 특정 enantiomer를 선택적으로 분리하는데도 많은 노력이 필요하다. 현재 이러한 enantiomer들의 합성에 효소, 특히 lipase의 사용이 새로운 가능성으로 대두되고 있다. Lipase는 이외에도 소화제, 세제등에 광범위하게 사용되고 있다.

Phospholipase A₂ 는 여러 종류의 세균이나 고등 동물의 독소의 중요한 부분을 구성하고 있고 sn-2 위치의 지방산을 교체하거나 제거한 새로운 인지질등의 합성에 사용되는 유용한 효소이다 (Hosokawa et al.,1993). 이렇게 sn-2 위치의 지방산을 제거한 인지질 (lysophospholipid)는 천연 소재의 유화제로서 가티가 높을 뿐 아니라 sn-2 위치에 arachidonic acid를 갖고 있는 인지질의 경우 본 효소에 의하여 유리된 arachidonic acid가 eicosanoid라고 통칭되는 세포활성 조절물질로서 그 중요성이 높다.

지방산은 공업적으로 계면활성제, 세제, 고무산업, 도료 또는 vitamine이나 색소의 운반체등의 기본 소재로서 그 응용도가 높다. 따라서 일반 지방으로부터 지방

산의 효율적인 생산은 공법적인 측면에서 그 중요성이 크다. 현재 가장 일반적으로 사용되고 있는 지방산의 생산 방법은 Colgate Emery Method라 불리는 화학적 가수분해법으로 많은 에너지를 필요로 할 뿐 아니라 원치않는 부산물의 생산이 문제가 되고 있다. 이를 대체할 수있는 방법으로 대두되고 있는 것이 지방가수분해 효소인 lipase를 이용하여 지방으로부터 지방산을 생산하는 방법인데 유용한 lipase의 원천으로서 미생물의 중요성이 강조되고 있다. 나아가서는 lipase를 분리 정제하여 사용하는 것보다 lipase를 생산하는 미생물 그 자체를 biocatalyst로 사용하여 지방으로부터 효율적으로 지방산을 생산하는 방식이 연구되고 있다. 특히 유기용매에 견딜수 있는 균주를 이용하여 유기용매:수용액의 2-phase 구조하에서 균주를 배양하는 것은 lipase반응후 형성되는 산물인 지방산과 glycerol을 각각 유기용매층과 수용액층으로 흡수시켜 원하는 산물인 지방산의 회수를 용이하게하고 아울러 균체가 존재하는 수용액층으로 녹아들어가면 glycerol은 균체의 영양물질로 흡수되어 균체의 적정성장 및 활성도 유지에 도움을 주므로 대단히 유용한 반응체계이다. 현재 분리된 대부분의 lipase생산 균주는 isooctane, toluene등 유기용매하 (up to 20 %)에서도 성장 가능하므로 이러한 유기용매:수용액의 2-phase 구조하에서 일반 지방으로부터 지방산의 생산에 유용하게 사용될수있다. 분리된 각균주에 대한 최적 성장 및 지방산의 최적 생산 조건에 대한 연구가 수행되고 있다.

Superoxide dismutase (SOD)는 분자 산소가 1 개의 전자를 받아 환원된 superoxide anion (O_2^-)를 제거하는 반응을 수행하는 효소로서 산소 호흡으로 생명을 유지하는 생물들의 생체내에서 필연적으로 발생하는 active oxygen radical 들을 제거하는 생체 방어 체계의 일종이다 (Oyazagui, 1980). 본 효소는 자유산소 라디칼 등에 의하여 야기되는 통증 치료등 소염 진통제나 피부보호를 위한 화장품 첨가제로 그 이용범위가 넓다.

Haloperoxidase는 Iodoperoxidase, Bromoperoxidase, chloroperoxidase등이 있으며 해양유래 천연물들의 많은 수가 halogenation되어 있는데 기여하는 효소로 추

정되고 있다 (Buter and Walker, 1993). 용도는 유기물의 특정한 공간적 위치에 halogenation 반응을 수행하여 Bioconversion 과정에 중요한 산업적 응용이 가능하다. 다당류분해효소에는 amylase등을 위시하여 많은 종류의 효소가 알려져있고 이 글중 상당수가 산업적으로 유용하게 이용되고 있다. 많은 다당류 자원 중에서 그 이용빈도가 높은것은 cellulose로 대표되고 있는데 이는 곡류의 폐자원의 활용에 이용되고 있다. 해양에서 이용가능한 다당류로서는 많은 종류의 해조류의 agar성분이나 chitin등이 있는데 이들은 그 구조의 특이성으로 인하여 육사의 효소로는 그 분해가 어려운 실정이다. 특히 agar의 경우에는 그 분해에 대한 안정성으로 세균의 배양에 사용되는 고형 배지의 원료로 쓰이고 있다. 본 연구에서 분리한 agar 분해 균주는 이러한 agar등 해양유래 다당류의 산업적 이용에 사용될 것으로 기대된다. 이와같은 유용효소들을 생산하는 미생물의 분리 현황을 Table 4-2 에 명시하였다.

Table 4-2. Results of assays for production of enzymes

Lipase	12 종
Phospholipase A ₂	1 종
Superoxide dismutase	30 종
haloperoxidase	-
Agar digesting enzyme	5 종

4. 5. 해양발광세균의 발광 반응의 이용법 개발

새로운 이용방법을 개발하기 위한 해양생물 유래 유용효소로는 해양발광 세균의 발광 반응을 촉매하는 bacterial luciferase를 선정하였고 이의 새로운 응용방법은 기존의 미량 분석 방법을 개선, 대체할 수 있는 새로운 분석법의 개발과 이 효소의 유전자를 이용한 변형 균주의 개발에 주안점을 두었다.

본 효소에 기인한 발광 반응의 이용은 크게 발광 세균 그자체를 이용하는 방법과 분리된 효소 혹은 세포내 추출물을 이용하는 방법, 그리고 본 효소를 생산하는 유전자 (Lux gene system)을 이용하는 방법등 크게 3 분야로 구별할수 있다.

4. 5. 1. Bacterial luciferase의 분리 정제

Bacterial luciferase는 해양에서 서식하는 세균들중에서 발견되는 효소로서 특이한 발광 반응을 일으키는 효소이다. Bacterial luciferase를 갖고 있는 해양세균으로는 *Vibrio harveyi*, *V. fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *P. leiognathi*, *Schewanella hanedai*등이 있으며 어패류에서 여름철 vibrio 패혈증을 유발하는 *V. vulnificus*중 몇몇 strain에서도 이 효소가 발견되고 있다. Bacterial luciferase는 그 특이한 발광 반응으로 그자체의 반응 기작이 흥미로울 뿐만아니라 이를 미량성분의 고감도 분석에의 응용또한 최근들어 큰관심을 끌고 있다. 그 이유는 본 효소의 반응 산물이 빛이므로 그 검출한계가 발색반응등 여타의 분석 방법에 비할수 없이 높아 방사성동위원소를 이용한 분석방법의 검출한계와 거의 동일한 수준이며 방사성 동위원소에 의한 분석방법이 많은 유해 오염원으로 작용하여 많은 환경 문제를 야기시키고 있는데 반하여 오염물질 배출이 전무한 소위 clean (or Green) assay method로 인정되고 있기 때문이다.

4. 5. 2. 해양발광세균을 이용한 항생물질 검색법

기존의 paper disk방법은 활성도를 검색하는데 최소한 하루의 배양시간을 필요로 하므로 물질의 분리정제등과 같이 신속히 활성도 유무를 검사하는데는 다소 문제가 있어 이를 위하여 해양발광 세균 (*Vibrio harveyi*)을 이용하여 신속한 검색법을 고안하였다. 그 방법은 late exponential phase의 균체를 3 % NaCl 용액에 $A_{600 \text{ nm}}$ 값이 약 0.1 정도되게 희석한후 이를 각각 1 ml 씩 취하여 20 ml들이 scintillation vial 2 개에 나누어 넣고 대조균주에는 0.1 ml의 methanol 그리고 실험균주에는 0.1 ml의 methanol에 녹아있는 sample을 가하고 luminometer에서 방출되는 빛의 변화를 5 분 간격으로 관찰한다. 그러나 해양발광 세균은 Gram negative 세균이므로 발광현상을 보이는 Gram positive세균을 확보해야한다. 이를 위하여 해양발광 세균의 발광 유전자 (Lux gene)을 Gram positive세균인 *B. subtilis*에 cloning 하는 작업을 수행하고 있다. 현단계에서는 *B. subtilis* 균체 내부로 plasmid를 electroporation 으로 주입이 가능하나 pTH2의 경우 계대 배양시 plasmid의 안정성과 발현에 문제가 있어 실제 사용에 어려움이 있어 이를 해결하기위한 실험이 진행중이다. *C. albicans*에로의 pTH2의 transforamtion은 본균주가 세균이 아니라 진핵생물인 yeast이므로 pTH2의 carrier인 pBR322로는 한계가 있어 yeast 전용 promoter를 갖고있는 cloning vector를 사용하여야할것으로 사료된다.

4. 5. 3. 해양발광 세균을 이용한 Phospholipase A₂ 활성도 분석

Phospholipase A₂ 활성도 측정에는 주로 사용되는 방법이 sn-2위치에 방사성 동위 원소로 표식된 지방산을 갖는 인지질 (주로 phosphatidyl choline 또는 phosphatidyl ethanolamine)을 기질로 사용하여 이로부터 본 효소의 반응 결과 유리된 방사성 동위 원소로 표식된 자유지방산을 박막 크로마토그래피등의 방법으로 기

질과 분리하여 liquid scintillation counter를 이용하여 정량하는 방법이 가장 보편적으로 사용되고 있으며 이외에 유리되는 지방산에 의하여 반응액의 pH가 낮아지는 것을 이용하여 검출하는 pH-Stat 방식등이 사용되고 있다. 그러나 pH-stat의 경우 그 민감도가 그리 높지 않고 방사성 동위 원소 사용법은 환경오염등의 이유로 그 사용에 많은 규제가 따르고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 새로이 해양발광 세균을 이용한 Phospholipase A₂ 활성도 분석법을 개발하였다 (Cho, 1994). 이 방법은 해양에 서식하는 발광 세균을 이용하는 것으로 사용된 균주는 발광 세균 *Vibrio harveyi*를 nitrosoguanidine으로 돌연변이를 유도 시켜 얻어진 돌연변이 균주 M-17 을 사용하였다. 본균주는 항상 빛을 내는 wild-type과는 달리 빛을 내지 않으나 긴사슬을 갖는 알데히드 (decanal 또는 tetradecanal)나 지방산중의 myristic acid (14:0)를 첨가하였을 경우 wild-type수준의 밝은 빛을 내는 특징을 지니고 있다. 따라서 sn-2 위치에 myristic acid를 갖고 있는 phosphatidyl choline 을 기질로 사용하면 반응 결과 유리된 myristic acid에 의하여 발광 반응이 유도 되며 방출되는 빛의 양은 유리된 myristic acid의 양에 비례한다. 우선 myristic acid의 농도에 따른 빛의 세기를 본 standard curve 를 구하였다. 약 5 nM부터 10 uM까지의 myristic acid에서 직선 의존도를 보였으며 이보다 높은 농도에서는 포화 현상이 관찰되었다 (Cho, 1994). 반응이 종료된 후 이로부터 시료내에 함유된 유리 myristic acid의 양을 정량할수 있으며 이에 따라 효소의 활성도를 계산할수있다.

본 실험에서는 균체 0.1 g을 1 ml의 lysis buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.5, 10 mM EDTA, 5 mM DTT)에 현탁한 후 초음파 분쇄하여 (10 초 X 5 회) 이를 4 °C에서 원심분리하여 얻어진 상층액을 조효소로 사용하였다. 반응은 0.9 ml의 reaction buffer (20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)에 0.1 ml의 Folch solution 에 녹인 1-stearoyl-2-myristoyl phosphatidyl choline을 가한 후 Vortex로 현탁하여 suspension을 형성하고 조효소액 10 ul를 가하여 상온에서 반응을 진행하였다.

유리된 myristic acid의 분석은 반응액 50 ul를 취하여 미리 준비된 발광세균 *Vibrio harveyi* M-17 현탁액에 가하여 5 초간 Vortex하여 빛의 최대 강도값 (I_0)을 luminometer로 측정하였다. 2 차년도에서는 유용효소탐색을 계속하는한편 분리된 유용물질 및 효소생산 균주들로부터 유용물질 및 효소의 구조 결정 및 특성 조사를 위한 분리정제를 수행할 예정이다.

4. 6. 실험 방법

4. 6. 1. 균주수집

해양천연물을 분리하기 위한 해양생물을 채집하는 현장에서 얻어진 생물 시료를 약 1 g 씩 취하여 미리 준비된 멸균된 해수를 2 ml씩 가하여 잘게 분쇄한뒤 이를 평판 배지에 순차적으로 도말하는 방법으로 해양생물 공생 미생물등 생물체내에 함유된 균주를 분리하였다. 균주를 분리하기 위한 배지로서는 세균의 경우는 주로 ZoBell 배지와 sea water complete 배지를 사용하였고 방선균의 경우는 변형된 Bennett's 배지, ISP-4 배지, Starch-casein KNO_3 배지, Chitin 배지등을 사용하였다.

ZoBell 배지; 0.5 % peptone,
 0.1 % yeast extract,
 Agar 15 g/liter
 Aged Sea Water 50 % (pH 7.0).

Sea Water Complete media

0.5 % Bacto triptone,
0.3 % Yeast extract
0.3 % (v/v) Glycerol
Agar 15 g/liter
Aged Sea Water 75 % (pH 7.0)

변형된 Bennett's 배지

Glucose 2 g
Yeast extract 1 g
Malt extract 1 g
Peptone 2 g
Agar 15 g

75 % Aged Sea water per liter (pH 7.4)

형성된 균체 집락들을 육안으로 그 집락 형태를 관찰하여 특성에 따라 새로운 고형 배지에 접종하여 동일 형태의 순수 집락을 형성하도록 세균의 경우 2 일간 25 °C 에서 그리고 방선균의 경우 7 일간 35 °C에서 배양한 후 순수 분리를 하였다. 분리장소는 거문도, 삼부도, 백도, 거제도, 남해도등 남해 일원을 중심으로 동해안과 서해안을 포함하고 아울러 태평양 심해저 시료와 남극 세종기기 근처 해역의 시료를 대상으로 해양세균과 방선균을 중심으로 수집하였으며 분리된 균주는 glycerol 을 20 % 함유한 멸균 해수에 현탁하여 영하 70 도에 보관하였다.

4. 6. 2. 균주검색

4. 6. 2. 1. 유용물질의 검색

가. 항세균물질 및 항진균물질 생산 검색

혼합배양 평판배지 상에서 인접 균주의 성장을 저해하는 원형지역을 형성하는 균주를 대상으로 순수분리한후 paper disk 판별법을 이용하여 항생물질 생성 여부를 검색하였다.

* 항세균물질 및 항진균물질 생산 검색에 사용된 균주

Escherichia. coli,

Bacillus. subtilis,

Candida albicans,

Sacharomyces serevius,

Staphylococcus aureus

나. 세포외 다당류 생산 검색

세포외 다당류의 생산 여부는 포도당을 기본으로하는 액체배지에서 균주를 배양한뒤 소량 (1.5 ml)의 시료를 원심 분리하여 균체 이외의 고형물질이 형성되는지를 중점적으로 검사하였다.

다당류 생산 배지 조성

Peptone	5.0 g
Glucose	10.0 g
Ammonium nitrate	1.6 mg
Na ₂ HPO ₄	8 mg
50 % aged sea water in 1 liter (pH 7.5)	

4. 6. 2. 2. 유용효소 생산검색

가. Lipase 생산 검색

Lipase 생산 검색은 시판되는 식용유 (콩기름)을 함유한 평판 배지에서 clear zone을 형성하는 균주를 중심으로 검색하였으며 최소 배지에서도 성장이 빠른 균주를 선택하였다.

배지조성: 1 g Yeast extract

1 g KH₂PO₂

0.5 g MgSO₄·7H₂O

1 g (NH₄)₂SO₄

15 g Agar per 0.5 liter of Aged Sea Water

100 mM CaCl₂ solution in 0.5 liter of Distilled water

121 °C 에서 autoclave 한후 50 °C 정도로 식힌후 10 g의 멸균된 콩기름과 5 g의 Triton X-100을 가하고 magnetic stirrer로 상온에서 격렬하게 저어 섞어 준 다음 plate에 각각 20 ml정도씩 분주하여 사용하였다.

나. Phospholipase A 생산 검색

1. Screening with plate containing phospholipid

Phospholipase A 생산 검색은 Phospholipase A 중에서도 경제적 가치가 높은 Phospholipase A₂의 생산 검색에 주안점을 두었으며 soybean lecithine (Phosphatidyl choline)을 함유한 평판 배지에서 clear zone을 형성하는 균주를 중심으로 검색하였다.

배지조성: 1 g Yeast extract

1 g KH₂PO₂

0.5 g MgSO₄·7H₂O

1 g (NH₄)₂SO₄

15 g Agar per 0.5 liter of Aged Sea Water

100 mM CaCl₂ solution in 0.5 liter Distilled water

121 °C 에서 각각 autoclave 한후 50 °C 정도로 식힌후 10 g의 멸균된 soybean lecithine (Sigma Co., 60 % phosphatidyl choline 함유)과 5 g의 Triton X-100을 가하고 magnetic stirrer로 상온에서 격렬하게 저어 섞어 준 다음 plate에 각각 20 ml정도씩 분주하여 사용하였다.

다. 다당류 분해효소 생산 검색

다당류 분해효소 생산 검색은 agar plate에서 agar를 분해하는 성질을 보인 균주를 중점적으로 분리하였으며 최소배지에서 agar 만을 분해하여 성장하는 균주를 선택하였다. Agar (2 %) 만을 함유한 sea water 에서 성장 가능하며 육안으로 agar 의 분해가 관찰된 균주를 분리하였다.

라. Superoxide Dismutase 생산 검색

◦ Screening method

다수의 시료를 동시에 검색하기 위하여 다음의 방법이 사용되었다. Agar plate 당 10 개의 대상 균주를 작은 막대 형태로 배양한후 균체 집락이 형성되었을 때 Whatman #1 filter를 이용하여 제작된 replica로 균체를 찍어서 균체를 filterpaper로 옮기고 이를 0.5 ml의 lysozyme solution (1 mg/ml)을 흡수시켜 30분간 반응시켜 균체의 세포벽을 깬다. 다시 CHCl_3 증기로 포화된 desiccator에서 30 분간 방치하여 세포막을 분해한다. 필요에 따라 2-3회 얼렸다 녹이는 과정을 반복하여 세포내 물질을 유출시킨뒤 이 filter paper를 미리준비한 plate 내의 고형 buffer (50 mM phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 1 % agar, pH 7.5)에 3 시간 올려 놓아 효소등 세포내 물질들을 고형 buffer로 이동 시킨다. 여기에 반응 용액 (0.55 mM NBT, 66 μM riboflavin, 0.1 % TEMED, 50 mM phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 1 % agar, pH 7.5)을 끓여 agar를 녹인뒤 55°C로 식힌후 15 ml씩을 각 탐색 대상 plate 위에 붓는다. 상온, 암실에서 3 시간 동안 반응 시킨뒤 형광에 쬐어 발색 반응을 유도한다. NBT와 superoxide anion 간의 반응에 의해 짙은 푸른색의 monoformazan 이 형성되고 SOD activity를 갖고 있는 균체의 위치에서는 이러한 발색이 유도되지 않아 반투명한 반점으로 나타나게 된다.

◦ 효소활성도 측정법

- naphthyl amine 용액(7 mM)의 제조

0.5 g의 naphthyl amine을 100 ml의 끓는 증류수에 녹인후 상온으로 식혀서 여기에 125 ml의 acetic acid를 가하고 다시 증류수로 500 ml로 부피를 맞춘다.

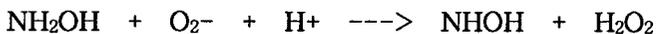
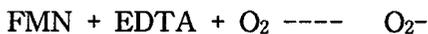
Acetic acid의 농도는 4.2 M로 조정되었다. Naphthyl amine은 발암 물질로 추정되고 있으므로 사용에 각별한 주의를 기울여야한다.

- sulfanilic acid 용액 (20 mM)의 제조

1.7 g의 sulfanilic acid를 375 ml의 더운 증류수에 녹인뒤 상온으로 식혀 여기에 125 ml의 acetic acid를 가하여 부피를 500 ml로 맞춘다. Acetic acid의 농도는 4.2 M로 조정되었다.

Agar plate에서 자란 탐색 대상 균주를 loop로 약 50 mg 정도 취하여 시험관에 옮기고 Tris buffer (25 mM Tris.HCl, 1 mM sodium EDTA, pH 8.0) 1.0 에 현탁한다. 여기에 다시 1 ml의 toluene을 가하고 1 분간 vortex로 섞어준후 층이 분리될 때까지 얼음물에 담가둔다. 층이 분리된후 0.2 ml의 수용액층을 회수하여 여기에 5 ml의 Tris buffer (25 mM Tris.HCl, 1 mM sodium EDTA, 10 uM FMN, 5 mM hydroxyamine, pH 8.0)을 가하여 잘 섞어준후 25 °C 에서 형광등으로 빛을 쬐어 25 분간 방치한다. 반응물에서 1 ml를 취하여 여기에 각각 1 ml씩의 naphthyl amine 용액 (7 mM)과 sulfanilic acid 용액 (20 mM)을 가하여 20 분후 spectrophotometer를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 조사한다.

반응의 원리는 다음과 같다.



이렇게 형성된 nitrites는 산성 조건에서 sulfanilic acid와 반응하여 diazo 화합물을 형성하고 이것이 다시 naphthyl amine과 반응하여 530 nm에서 최대 흡광치를 보이는 붉은색 화합물을 형성한다.

마. Haloperoxidase 생산 검색

ZoBell 액체배지에서 성장한 균체 1 ml를 배양시험관 내에서 직접 sonication 하여 균체를 파쇄한뒤 haloperoxidase검출 용액 1 ml를 가하고 신선한 과산화수소수 (0.3 %, V/V hydrogen peroxide)를 가하여 처음의 주황색의 시료가 보라색으로 변하는 가를 육안으로 관찰하여 효소활성도 유무를 측정한다. 또는 595 nm에서 흡광도의 변화를 spectrophotometer를 사용하여 측정한다.

- haloperoxidase검출 용액

40 ml of 0.2 % (V/V) phenol red in 95 % EtOH

0.3 M potassium phosphate buffer, pH 7.0,

50 mM KBr, per liter Distilled Water

4. 6. 3. Bacterial luciferase의 분리 및 이용방법

4. 6. 3. 1. Luciferase의 분리

*Vibrio harveyi*의 경우 sea water complete 배지 (5 g Tryptone, 3 g yeast extract, 3 ml glycerol in 1 liter of 70 % aged sea water, pH 7.0)에서 배양하여 cell mass가 5 g/l 정도일때 Sorvall RC-5C high speed centrifuge와 SS-34 rotor에 장착된 continous centrifuge system을 이용하여 균체를 수확하였다. 20 l 배양액에서 100 g의 균체를 얻은후 이를 멸균된 비닐 봉지에 넣어 두께 1 cm 되는 시루떡 형태로 모양을 잡아 영하 20 °C에서 하룻밤 얼린후 다음날 녹인후 다시 얼리기를 2 차례 반복하여 세포벽 구조를 약화 시키고 여기에 미리 40C로 식혀둔

900ml의 lysis buffer (5 mM phosphate buffer, 10 mM EDTA, pH 7.0)를 가하여 cold room에서 1 시간동안 교반 시킨다. 이 과정에서 염농도가 높은 배지에서 자란 균체들이 염농도가 낮은 lysis buffer에서 삼투압 차이에 의하여 터지는 소위 osmotic lysis에 의하여 세포내 물질들이 녹아 나오게된다. 세포파괴를 보다 확실하게하기위하여 초음파분쇄기 (Fischer,fff)를 이용하여 얼음물에 담긴 상태에서 1 분간 초음파를 가하고 1 분간 교반 시키는 과정을 5 회 반복한다.

세포내 추출물을 분리하고 파괴된 세포 부스러기를 제거하기위하여 GSA rotor를 이용하여 10,000 rpm 에서 30 분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 이 상등액에 DEAE-cellulose를 가하여 30 분간 교반한후 column (5 cm x 50 cm)에 충전하였다. DEAE-cellulose에 흡착되지 않은 물질들을 흘려 내리고 500 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)으로 resin 을 씻어 약하게 흡착된 물질들을 제거한다. 다시 500 ml의 150 mM phosphate buffer (pH 7.0)으로 resin 을 씻어 중간정도로 흡착된 물질들을 제거한후 0.5 M phosphate buffer (pH 7.0)로 흡착된 luciferase를 용출시킨다. 이때는 fraction collector (Eyela DC-1200)을 이용하여 10 ml 씩 분취하여 각각의 luciferase활성도와 단백질 함량을 측정한후 luciferase활성도를 보이는 분액들을 합친후 이를 ammonium sulfate농도 35%와 75 % 사이에 침전된 침전물을 회수하였다. 이를 20 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인후 Sephadex G-25 desalting column으로 ammonium sulfate를 제거한뒤 DEAE-Sephadex column (2.5 cm x 30 cm)에 가하고 column을 100 ml의 동일한 buffer로 씻어준다. 여기서 50 mM에서 500 mM 까지 phosphate buffer 농도구배로 column을 용출시켜 5 ml씩 분취하여 luciferase활성도를 보이는 분액을 회수하였다. 이를 고순도로 손쉽게 분리하는 방법을 개발하고 있으며 이는 주로 본 효소의 cofactor인 FMN을 ligand로 사용한 affinity chromatography system 개발을 목표로 하고 있다.

4. 6. 3. 2. 발광 유전자의 이용법

가. 발광 유전자 (luxA, luxB gene)의 분리.

해양 발광 세균 *Vibrio harveyi* B392 의 발광 유전자 (luxA, luxB gene)는 Xi 등 (1990)에 의하여 cloning 되어 pBR322 plasmid에 접합된 형태 (pTH2)로 이를 함유하고 있는 *E. coli* HB101 균주로 부터 분리되었다. 배양된 균체 약 30 mg 정도를 1.5 ml eppendorf tube 에 넣고 100 μ l lysis buffer (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 가하여 현탁한 후 10 μ l Lysozyme 용액 (50 mg/ml)을 가하여 실온에서 5 분간 방치한 후 0.2 ml의 SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액 (1 % SDS, 0.2 N NaOH) 를 가하여 섞어 준 후 얼음에서 5 분간 방치하여 cell membrane을 용해시킨다음 150 μ l 의 potassium acetate 용액을 가하여 SDS를 침전 시키고 4 $^{\circ}$ C 에서 5 분간 원심 분리하여 SDS와 cell debris 를 제거한다. 상층액을 취하여 phenol:chloroform =1:1 solution으로 추출하여 단백질을 제거한후 원심 분리하여 층을 나누고 다시 상층액만을 취하여 2 배 부피의 absolute ethanol 을 가하여 plasmid DNA를 침전시킨다. 4 $^{\circ}$ C 에서 10 분간 원심 분리하여 DNA를 얻은후 70 % Ethanol로 씻어 준후 50 μ l 의 Tris buffer 로 녹인다. Bromophenol blue 와 zylene cyanol FF 가 포함된 loading solution (50 % glycerol) 2 μ l를 DNA시료 10 μ l 에 가한후 1 % agarose gel에 loading 하고 100 volt에서 약 30 분간 전개한다. 전개가 완료된 gel plate 를 ethidium bromide 용액에 담가 염색시킨 후 자외선등아래서 DNA band를 확인하고 pTH2 를 함유한 gel 을 오려내어 electroelution 으로 pTH2를 gel에서 추출한후 ethanol precipitation step을 거쳐 plasmid DNA를 정제한다.

나. 발광 유전자 (luxA, luxB gene)의 이용.

- lux gene을 갖고 있는 plasmid (pTH₂)를 *B. subtilis*에 cloning.
- lux gene을 갖고 있는 plasmid (pTH₂)를 *C. albicans*에 cloning.

분리된 pTH₂ plasmid를 electrophorator (Cellject-100)를 이용하여 균체에 강제 주입하여 transformation을 수행하였다. 4 mm cell을 사용하여 2,500 Volt에서 transformation을 수행한뒤 ampicilin 과 chloroamphenicol을 함유한 LB-agar plate에 도말하여 성장하는 균주를 회수하여 agarose electrophoresis를 통하여 plasmid의 transformation을 확인하였다. 동시에 decanal 증기하에서 형성된 colony에서 발광 여부를 확인하여 luciferase의 발현 여부를 확인하였다.

제 5 장 생리활성물질 검색기술의 개발

5. 1. 연구의 배경

천연물 화학은 생리활성물질을 발견하는 주요 방법중의 하나이다. 사람, 동물 및 식물의 질병유발 기작에 대하여 세포내의 생화학적 과정이나 분자생물학적 수준의 반응에 대해서 거의 알려진 것이 없기 때문에 질병저해물질을 직접적으로 디자인하여 치료하기가 어려우므로 활성형의 물질을 자연물에서 찾는것은 계속될 것이다. 지금까지는 2차 대사산물의 단순한 분리와 구조해석에만 관심을 기울였으나 유용한 약제를 발견하기 위해서 또한 생명과학에서 복잡한 문제를 해결하기 위해서는 각 전문 분야의 협력이 필수적이다. 1984년 Fainworth가 식물로부터 유용 의약품의 개발프로그램의 문제점은 화학자, 식물학자, 생물학자, 물리학자 등의 공동연구가 결핍되었다고 주장한 바와 같이, 성공적인 생리활성물질 개발을 위해서는 여러분야의 전문가들의 공동연구로 다양한 범위에서 새로운 bioassay의 개발과 대상생물의 선별, 선도물질의 분리, 정제방법의 효율성을 증진시키므로 더욱 가까이 도달할 수 있을 것이다. 다양한 생리활성물질을 검색하는 방법으로는 약용식물, 목표물(Target-directed screening)이나 기작(Mechanism-directed screening)에 근거를 둔 검색방법 또는 일반적인 검색방법 등이 있는데 민간요법 중에서 약용식물로부터 개발된 의약품으로는 chinese medical herb 유래 antimalarial sesquiterpene인 Artemisinin (ginghaosu), *Coleus forskohlii* 유래 antihypertensive agent(항고혈압제)인 Forskolin, 은행나무에서 추출한 향천식·향기침제용의 Ginkgolides를 들 수 있다.

Screening 기술의 이용은 1942년 경에서 1968까지는 penicillin이후 β -lactam 물질의 발견에 집중되었으나 1970년대에는 β -lactamase 저해제 선별법, 황함유물질 선별법이 주력을 이루었다. 이외에 기생 동·식물의 감염에 대한 미생물유래 생

리활성 물질로 *Nematospiroides dubiusdml*의 유충에 감염된 mice를 이용하는 in vivo mouse assay를 통하여 Avermectins (e.g., avermectin by *Streptomyces avermitilis*)를 발견하였다. 질병에 관련된 단백질효소 저해제의 연구를 통하여 미생물의 배양액에서 100종류 이상의 저분자성 물질을 발견하였는데, 예로 mevinolin과 compactin은 HMG-CoA reductase 저해제로 발견되었다. Cyclosporin A의 경우 토양 곰팡이 *Tolylocladium inflatum* 유래의 항진균 활성이 있는 물질로 분리되었으나 delayed-type hypersensitivity억제 및 inflammatory mediator 분비저해기능이 있는 면역조절 물질로 최근 각광을 받고 있다. Azidothymidine은 항암 활성의 검사에서 음성으로 나타났으나 HIV-1 virus의 reverse transcriptase inhibitor로 밝혀졌고, Compactin은 항진균제로 발견되었으나 cholesterol-lowering agent로 후에 새로운 생리활성 기작이 발견되어지기도 하였다. 이와같이 과거에 많은 생리활성물질이 발견되었으나 서로 다른 이유로 그 활성의 대부분이 연구되지 않았으나 새로운 screening법을 통해서 많은 물질들의 예전에 예상하지 못했던 새로운 작용기작이 재발견되었다(Ghisalberti, 1993).

각 생리활성 연구그룹마다 독특한 bioassay 전략이 구축되어 있는데 전형적인 스크리닝 시스템은 다음 그림 5-1 과 같이 개략적으로 도식화 할 수 있을 것이다 (Suffness et al., 1989).

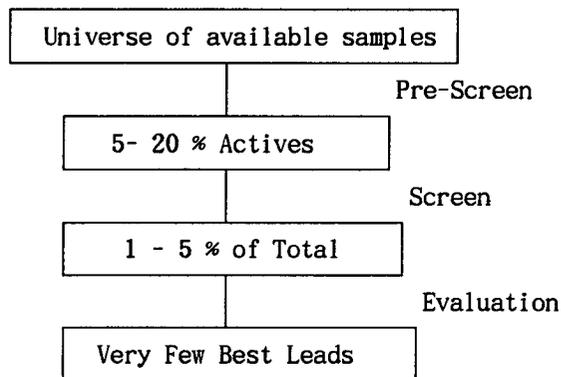


Fig. 5-1. Typical outline of screening process.

생리활성 검색법중 prescreening(primary screening)은 front-line screening bioassay의 기준을 충족시키면서 생리활성물질의 분리 정제시 쉽게 모니터링할 수 있는 방법을 채택하는데 이의 조건으로는 1) 신속, 2) 편리, 3) 정확성, 4) 경제성, 5) 높은 감도, 6) 적은량의 물질로도 검사 가능, 7) 광범위한 활성을 확인, 8) 전문가 없이 in-house application이 가능할 수 있어야 하는 조건 등을 꼽을 수 있다. 이에 속하는 대표적인 assay로는 Brine Shrimp Lethality Test, Crown-Gall Tumor Bioassay, Sea Urchin Assay, Bioassay for antibiotic activity 등을 들 수 있다.

Specialized screening assay의 예로 항바이러스, 항암물질 분야의 검색기술을 들면 다음과 같다. Antiviral Activity의 경우 Plaque reduction 또는 titer reduction assay이 사용되는데 이는 mammalian cell line에 비루스의 plaque-forming unit 감염시켜 시료를 처리한 후 plaque의 감소를 측정하는 방법이다. Herpes simplex type I [HSV-1], Vesicular stomatitis[VSV], Polio type I 등의 비루스에 대하여 행하며 세포독성도 동시에 측정 가능하여 활성이 있는 후보 물질은 p388과 L1210에 대하여도 조사한다. Bioautographic assay의 경우에는 Herpes simplex virus(HSV)에 감염된 CV-1(monkey kidney) cells에 물질이 전개된 TLC plate를 두어 활성을 조사하는데 곤충과 식물에 대하여 조사한 결과 육상 식물과 해양식물이 같은 비로 antiviral activity를 가진다고 보고 되었다. 이 경우 정상세포 CV-1 cell에 대한 세포독성도 확인할 수 있다. Human Immunodeficiency virus type I (HIV- I)의 경우는 reverse transcriptase 저해제를 목표로 virion의 효소를 검사하는 방법으로 분석한다. Cytotoxicity, Antitumor 및 Antineoplastic activity 의 검색의 경우 우선 세포독성, 항암 항종양활성등의 용어가 서로 혼용되어 사용되어 지는데 NCI규정에 따른 용어의 정의를 보면 cytotoxicity의 경우 in vitro toxicity를 나타내는 세포독성을 뜻하며, antineoplastic 나 antitumor 활성은 in vivo activity를 나타내는 항암, 항종양성 활성을 뜻한다. 항암물질을 스크리닝하는 여러 시스템들을 간략히 도식화 하면 그림 5-2와 같다.

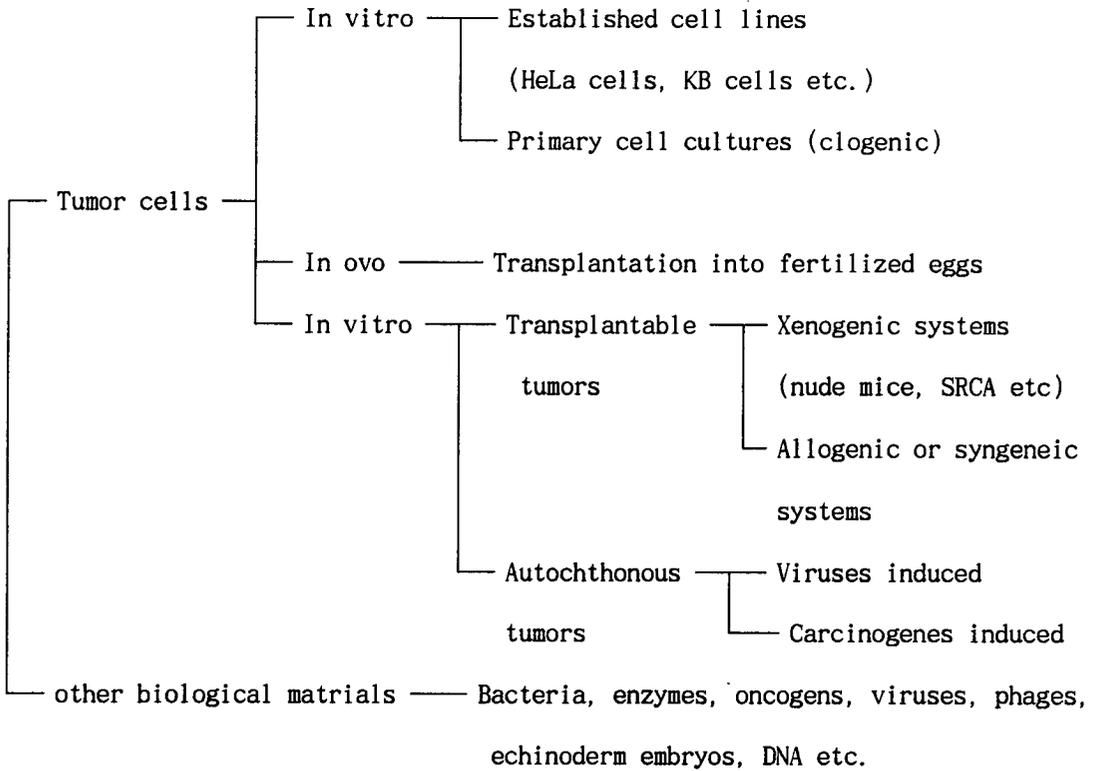


Fig. 5-2. Screening systems used to search for antitumor compounds of microbial origin (Komiyama & Funayama, 1992).

In vitro에서 세포독성 시험시 여러 가지의 암세포를 대상으로 다양하게 조사 하는데 표 5-1에서 보는 바와 같이 주로 세포 배양한 후 성장 또는 저해 정도를 microplate reader를 사용하여 판독함으로써 다량의 시료를 검색할 때 신속 정확하게 결과를 얻을 수 있다. 이외의 방법으로 세포 염색 후 현미경으로 관찰하거나 방사성 동위원소를 사용하여 세포의 성장 저해여부를 판독하는 방법등이 있다.

Table 5-1. Screening systems used to search for antitumor compounds of microbial origin using tumor cells(Komiyama & Funayama, 1992).

Screenign System	Materials	Evaluation
Morphology change	Giemsa; HeLa cells	Microscopic Obs.
Dye staining	Neutral red; L1210, KB	Spectrophotometry
	MTT; Human tumor cell	Microplate reader
	Giemsa; B16 mouse melanoma	Microplate reader
	HT-29 human colon	
	Methylene blue; human colon carcinoma, melanoma	Microplate reader
	Crystal violet; human, mouse tumor	Visual exam.
HTCA	Human tumor cell, agar medium	Nr. of colonies
Uptake of radioisotope substance	14C-adenine into EAC/p388	Radioactivity
Colony formation	Agar medium, paper disk	Diameter Inhib.zone
Inhibition of focus formation	Chicken fibroblast, Rous sarcoma virus	Nr. of foci
Drug-resistant cell	p388/adriamycin	count cell number
Conversion of transformed morphology to normal morphology	Rous sarcoma virus infected rat kidney cell	Morphology observ.
Cell and bacteria	KB, L1210, <i>E.coli</i> , <i>B. subtilis</i>	Cytotoxicity, anti-microbial activity

세포독성 조사시 사용되는 Waker carcinosarcoma 256 세포의 경우 너무 예민하고 Mouse L-1210 leukemia는 감도가 떨어지나 p388 leukemia는 in vitro, in vivo assay 모두에서 감도와 predictivity가 좋다고 알려졌다. Lewis lung carcinoma, colon 38, CD8f1 mammary 등은 in vivo test에 주로 사용된다. 이상의 선별과정을 통하여 분리된 antitumor compound는 많으나 slow-growing solid tumor에 대해서는 임상적으로 효과적인 것은 적었다. 이것은 primary screen에서 빨리 분화하는 tumor만을 사용한 결과의 문제점이다. In vivo assay의 경우 시간적·경제적으로 비실용적이나 주요 암의 very sensitive disease oriented human tumor cell line에 집중하여 분석한다. 특정 tumor에 대해서 다른 세포독성을 보이는 compound에 대해서는 같은 tumor line 으로 in vivo test를 한다(Ghisalberti, 1993).

Mechanism-based assay에 의해서는 carcinogenesis 저해제 선별하거나 blocking agent를 선별하는 분석법이 있는데 암 발생 저해제로는 1) carcinogen 형성 방지, 2) target에 carcinogen의 결합 방지, 3) tumor의 발달 방지 기작에 관여하는 물질을 선별하는 방법을 들 수 있고 blocking agent로는 carcinogen 자체의 대사나 carcinogen의 DNA와의 상호 작용을 조사하는 방법으로 예로 rapid mutagenic assay를 들 수 있는데 이는 Ames S-9 metabolic activation preparation 존재하에서 2-aminoanthracene의 mutagenic활성의 저해를 조사하는 방법이다.

해양으로부터 새로운 의약품을 개발하는데는 여러 기업들이 주력하고 있다. 대표적인 기업으로는 오스트레일리아의 Roche Institute for Marine Pharmacology, 영국과 미국의 Wellcome, 유럽의 Ciba-Geigy, 미국의 Sea Pharm을 꼽을 수 있다. 대학내의 여러 연구소도 이 분야에 대하여 활발히 연구를 진행하고 있는데 대부분 p388 세포나 다른 감도 높은 cell line으로 prescreen을 하고 있다. University of Hawaii의 경우는 cyanobacter를 대상으로, University of Rgode Island는 algae를 대상으로, Scripps Institution of Oceanography는 해양의 macro 및 microorganism을 대상으로 탐색작업을 벌리고 있다. 뉴질랜드의 University of Canterbury는

macro생물을 대상으로 Tokyo의 Institute of Microbial Chemistry는 미생물을 대상으로 항암물질을 탐색하고 있다. 미국의 NCI에서는 지난 20년 이상 18,000개의 해양생물 추출물을 대상으로 p388 model을 사용하여 스크리닝하였다(Suffness et al 1989). 해양생물유래 항암물질은 암전이과정에서 작용하는 것과 in vivo에서 항암활성이 우수한 것이 약제로 개발될 가능성이 높는데 대표적인 해양유래 항암물질로 보고된 것은 다음과 같다(Ireland et al., 1988, Rinehart, 1988. 1992)

Californian colonial tunicate인 *Alidium californicum*에서 분리한 hemiterpenoid 유도체는 해양에서 유래된 첫 예이며 prehydroquinone, 6-hydroxy-2,2-dimethylchromene, prenylquinone이 있다. Geranylhydroquinone과 같은 prehydroquinone은 실험동물에 preadministration시 leukemia, Rous sarcoma, mammary sarcoma의 몇몇 형태의 유도를 저해했다. Prehydroquinone은 tumor를 예방할 뿐만 아니라 mutagen도 방어한다. Modified Arm's test에서 prenylquinone과 chromene유도체는 carcinogen benzo(a)pyrene과 aflatoxin B1의 *Salmonella typhimurium*에 대한 potential mutagen의 효력을 극적으로 감소시켰다. Terpene hydroquinone은 algae, ascidians, octacorals, sponges같은 다양한 해양생물에서 분리하였다. Palytoxin은 Zooanthid *palythoa toxa*에서 분리된 비단백질성 marine toxin이며 가장 치명적이다. *P. tuberculosa*, *P. mammilosa*와 같은 다른 *palythoa* spp.도 palytoxin의 source이다. 이 독소는 공생세균에 의해 생산되기 때문에 농도가 계절적이다. 강한 in vivo 활성을 가지며 대부분 연구가 진행되고 있는 물질로는 우선 항암활성을 가진 해양성 biopolymer들로 sulfated polysaccharides, sphyrnastatins, strongylostatin 1,2, lytechinastatin, palystatin이 있다. Caribbean tunicate *Ecteinascidae turbinata*의 ethanol-water extracts는 매우 큰 항종양 특성을 가지고 보고되었는데 Kb cell에 대해 활성을 보였는데 in vivo p388에도 상당한 활성을 보이며 T/C value가 230%이상이다. Source의 지리적 위치에 관계없이 유사한 antineoplastic activity가 존재하며 면역반응의 강력한 modulator로도 작용하고 고

분자량이며 복강 cells 유래의 macrophage의 killer기능을 자극한다. 또한 다양한 human cell line에 대한 DNA합성 저해제이나 문제점은 낮은 농도로 존재하며 불안정하다. Lemnalol은 soft coral *Lemnalia tenuis* 유래이며 보고된 최초의 해양성 ylangene sesquiterpenoid이며 origine에 관계없이 최초의 oxygenated ylangene이다. 사용된 in vitro assay system은 DBA/MC fibro sarcoma cell line에 대한 murine peritoneal exudate cells(PEC)의 activation을 검색하는 분석체계이다. 즉, lemnalol 자체는 10 - 40 μ g/ml 농도에서 세포독성이 없으나 PEC 존재하에서 macrophage를 활성화시켜 tumor cells에 대한 선택적인 독성을 가진다. 이는 합성 nucleocidic poly(I)-poly(C)와 유사한 작용양상을 띠며 400 μ g/ml/site 농도에서 항종양활성이 있다.

대표적인 항암물질인 Bryostatins의 경우 Pettit 그룹은 토양절족동물에서 antineoplastic compounds를 발견한 후 1968년 해양생물로부터 항종양물질탐색을 위해 지리학적으로 체계적인 탐색을 시작했다. 특히 이끼벌레류(Bryozoa, Ectoprocta, Polyzoa)의 alcohol extract에서 유망한 항종양성물질을 탐색하였다. Bryozoan *Bugula neritina*의 추출물의 경우 p388세포의 68 -100% life extension을 보였다. *B.neritina* 외에 이끼벌레류인 *Amathia convoluna*에서 발견되었다. 유도체는 지역적 생물유래적 특성을 가진다. 예를 들어 bryostatin 1 -3, 12는 California에서만 발견되며 bryostatin 8은 *A.convoluna*에서만 발견되고 bryostatin A,B는 *B.neritina*에 감염된 해면류 *Lissodeudoryx isodictyalis*에서 발견된다. ED₅₀ 은 10⁻³ ~10⁻⁵이며 Bryostatin 1 만 NCI에 의해 preclinical test를 받고 있다. Dolastatins의 경우 이미 2,000년 전 인도양의 sea hare의 *Dolabella*속의 독성에 대해서 보고되었으며 Pittit그룹에 의해 1976년 *Polabella auriculaviva*에서 분리한 생리활성 물질이 p388에 대한 항종양 효과가 발견되었다(11 μ g/Kg에서 88% life extension). 구조는 Cyclic peptide로 유도체 polastatin 3, 10, 11, 12, 13, 15가 대표적이다. Didemnin은 항바이러스성 특성 뿐만아니라 많은 생화학적 작용의 활성 modulator이다.

Didemnin B는 여러가지 lymphocyte면역기능의 in vitro assay에서 면역억제활성을 가지는데 in vivo에서 대부분 활성을 가지지않는 많은 compounds에 비해 이는 graft-versus-host반응을 이용한 murine model에서 in vivo assay에서도 활성을 보인다. 이는 다양한 human neoplastic cell type, 즉 ovarian, breast, renal carcinoma, mesothelioma, sarcoma에 대해서 활성을 보이며 1984년 phase 1 clinical trials에 들어간 첫 해양 천연물이다. P388 cell에 대하여 Didemnin A는 ED₅₀ 0.03μg/ml, Didemnin B는 ED₅₀ 0.0022μg/ml이다. In vivo p388 leukemia test에서 didemnin B는 100%의 최대 생명연장을 보이나 didemnin A는 B보다 효과적이지 못하다. In vivo B16 melanoma에 대해 최대 57% 생명연장을 보인다. Didemnin A와 B는 모두 매우 강력한 약제이나 항암, 면역억제, 항바이러스 약제로써의 유용성과 이용성이 증명되어야 한다. 또한 구조적으로 매우 유사하나 생물학적 특성은 매우 다양하고 적당한 치료 분야로 바꿀 수 있는 유사체 생산이 장려된다.

본 연구에서는 해양유래 공생미생물의 분리, 배양 및 시료 조제 방법과 1차 스크리닝방법으로 구축된 세포독성 조사방법 그리고 암기작에 관여된 효소저해제 type IV collagenase 저해제 탐색 및 topoisomerase I 저해제 탐색방법을 보고하고자 한다.

5. 2. 해양미생물의 분리, 배양 및 유기물질의 추출

해양생물에 공생하는 미생물이나 자연해수, 해양저질층에 서식하는 미생물을 분리하기 위하여 해양세균의 경우는 PYG agar 배지, 방선균의 경우는 75%의 속성된 해수로 조제한 Bennett 배지를 사용하였다. 해양시료를 해수로 적당히 희석한 후에 위의 고체배지에 접종한 뒤 glass rod로 도말하여 25°C에서 5일 내지 6일간 배양하여 나타난 colony를 순수분리 하였다. 분리된 균주는 20%의 glycerol용액에 넣어 -70°C에서 보존하였다. 시료조제를 위하여 균주의 배양 시 해양세균은 PYG배

지 4ml에 접종하여 25°C에서 5일 내지 6일간 정치배양하였다. 방선균은 변형된 Zobell 배지(SZ Medium) 5ml에 접종하여 30°C에서 7일간 진탕배양하였다. 숙성된 해수를 넣어 사용된 PYG 배지, Benett 배지 및 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 7.2	

* Benett medium (modified)

glucose	2.0 g
yeast extract	1.0 g
malt extract	1.0 g
peptone	10.0 g
agar	15.0 g
aged sea water	750 ml
dest.water	250 ml
pH 7.4	

* SZ medium

glucose	20.0 g
polypeptone	5.0 g

yeast extract	1.0 g
ferric phosphite	0.1 g
aged sea water	750 ml
dest. water	250 ml
pH	7.4

시료의 조제를 위해 PGY배지에서 정치배양이 끝난 해양세균 배양액은 원심분리하지 않고 세포가 혼합되어 있는 상태에서 3.5 ml의 Folch solution (CHCl₃:MeOH=2:1)을 첨가하여 그림 5-3과 같이 추출하여 Folch solution layer와 water phase의 시료로 각각 분리조제하였다. 방선균은 그림 5-4와 같이 배양한 후 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 ethylacetate 층과 water phase로 분리한다. Folch soluble phase와 ethylacetate soluble phase는 speed vac 으로 농축하고 각 시료는 eppendorf tube에다 넣어 4°C에 보관하였다. 농축된 Folch soluble phase와 ethylacetate soluble phase의 농축된 시료는 검색 전 각각 350ul, 450ul의 methanol을 넣어 사용하였다.

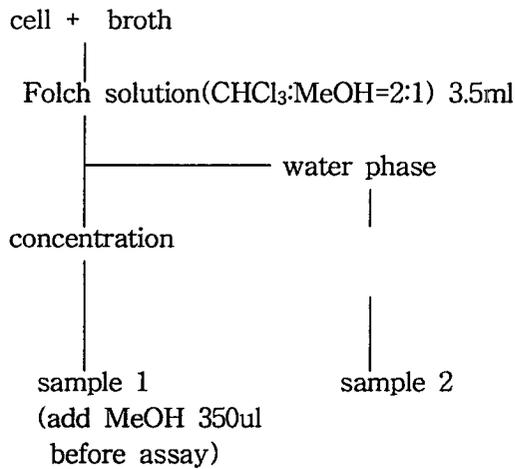


Fig. 5-3. Extraction and fractionation of marine bacteria culture.

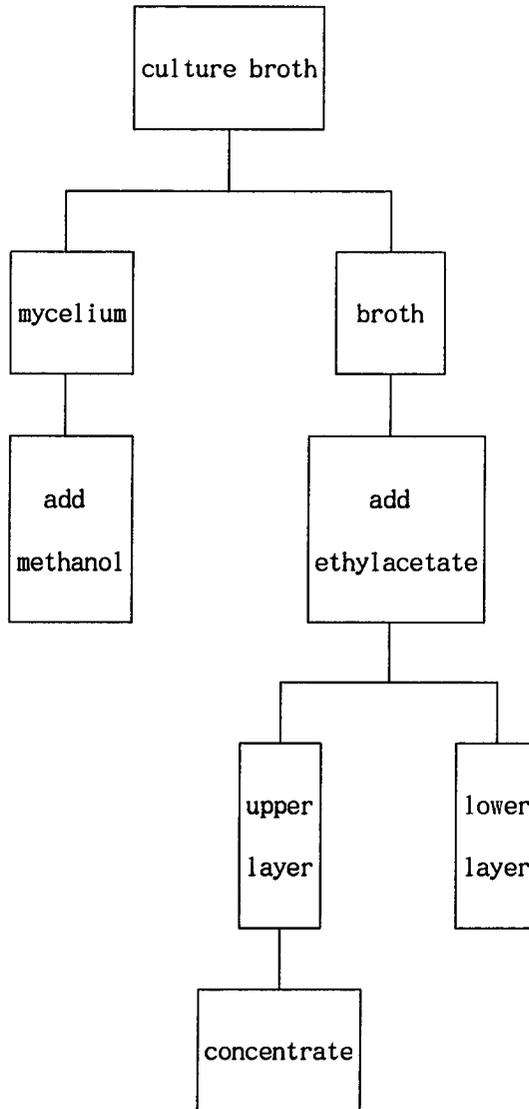


Fig. 5-4. The scheme of sample preparation from Actinomycetes.

5. 3. Prescreening assay

5. 3. 1. 세포독성능검사

실험에 사용한 세포는 한국 세포주 은행에서 분양받은 Human adenocarcinoma 인 DLD-1와 Mouse Lymphoid neoplasm 인 P388D1을 사용했다. 실험에 사용된 배지와 혈청은 Gibco 제품을, 항생제와 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 CO₂ incubator를 사용하였다. 세포수 측정은 Hemacytometer를 사용하였다.

세포배양을 위해서는 실험에 사용된 세포인 DLD-1, P388D1은 10%FBS(Fetal Bovine Serum)와 kanamycin 20 μ g/ml이 들어 있는 RPMI 1640 배양액을 사용하여 25cm² flask에 넣어 37°C, 5% CO₂가 유지되는 항온기에서 배양하였다. 세포독성능 측정시 P388D1은 대수기의 세포를 1,500rpm으로 5분 동안 원심분리하고, PBS(-)로 1번 washing한 후에 새로운 배양액에 2x10⁴cells/ml로 부유시켜 사용하였으며 DLD-1의 경우는 대수기에 monolayer를 이루도록 배양 시키다가 0.25% trypsin-EDTA solution으로 세포를 부유시키고 1,500rpm으로 5분동안 원심시킨 후 RPMI 1640 배지로 1번 washing 한 후에 4x10⁴cells/ml로 부유시켜 사용하였다.

세포독성능의 측정은 Carmicheal등의 MTT(methyl tetrazolium bromide) 측정법을 modification하여 사용 하였다. 시료의 암세포 독성능을 측정하기 위해 96well plate에 대수기에 도달한 P388D1 cell (2x10⁴cells/ml)과 DLD-1 (4x10⁴cells/ml)을 100 μ l씩 접종하고 조추출물 시료를 각각 10배 연속희석하여 100 μ l씩 접종하여 최종 volume이 200 μ l가 되게 한 후 37°C에서 5% CO₂농도의 항온기에 5일 간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 증류수에 녹인 MTT용액 (1.1mg/ml)을 50 μ l씩 각각의 well에 넣어주고 나서 최적반응 4시간 동안 37°C의 CO₂항온기에 더 배양시켰다. 배양 상등

액을 multiwell plate washer를 사용하여 제거하고 살아있는 세포에 의하여 형성된 formazone결정을 150 μ l 의 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹인 다음 발색정도를 관찰하였다. 아무것도 처리하지 않고 세포만 넣어서 배양한 well에서는 진한 보라색이 나타나며 세포가 모두 죽은 well에서는 투명에 가까운 옅은 보라색이 나타나는 것으로 세포독성능을 판정하였다. 0.5 μ l/ml 농도에서 세포독성능을 나타내는 시료들은 최종농도 0.05 μ l/ml 과 0.005 μ l/ml 까지 희석하여 세포독성능을 검사하였다.

5. 3. 2. Lymphocyte에 대한 세포독성 조사

Mouse의 spleen에서 lymphocyte를 추출하여 물질의 정상세포에 대한 세포독성 양상을 조사하였다. Mouse의 배를 절개한 후 spleen을 채취하여 PBS와 함께 hand homogenizer로 부드럽게 갈아서 gauze로 거른다. 2,000 rpm, 4분, 4 - 10 $^{\circ}$ C 조건에서 원심분리 하였으며 최종 침전물을 RPMI-1640 혹은 D-MEM 배지로 희석하여 2 - 5 x 10⁶ cell/ml 농도가 되도록하여 실험에 사용하였다. 96-well microplate에 먼저 시료를 10 μ l 씩 넣은 다음 lymphocyte 현탁액을 100 μ l 씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 후 MTT를 50 μ l 첨가하여 4시간동안 더 반응시켰다. 양성 대조군으로는 방선균 630-A 균체의 methanol추출액을, 음성대조군으로는 PBS를 넣어 주었다. 상등액을 제거한 후 150 μ l의 DMSO로써 formazone을 녹여서 540 nm에서 OD를 측정하였다.

5. 3. 3. Haemolytic activity 조사

물질의 적혈구 용해도를 측정하기위해서 mouse로부터 혈액을 채취하여 96-well microplate에서 반응시켰다. Mouse의 목을 잘라서 혈액을 얻은 다음 PBS로 3회 씻는다. 2,000 rpm에서 4분 동안 원심분리 하였으며 최종침전물은 약 50%

erythrocyte가 된다. 96-well microplate의 각 test well에 먼저 시료를 20 μ l 씩 넣은 다음 PBS로 희석한 1% erythrocyte 현탁액을 200 μ l 씩 넣는다. 양성 대조군으로 방선균 630-A 균체의 methanol추출액을 사용하였으며 음성 대조군으로 PBS를 사용하였다. 30 $^{\circ}$ C 에서 1 시간동안 반응시킨 후 육안 관찰시 시료가 용혈활성을 나타내면 적혈구가 용해되므로 투명한 상태가 되고, 용혈활성을 나타내지 않는 경우에는 적혈구가 well의 바닥에 침전되어 불투명하게 보인다.

Microplate reader에서는 540 nm에서 OD를 측정하였다.

5. 4. Topoisomerase 저해물질의 탐색

신규 항암제를 개발하는데 있어서 주요 방향은 독성이 적고 특정 암에 항암 효과를 나타내며 또한 그 작용 기작이 뚜렷한 약물의 개발에 있다. DNA topoisomerase I(topo I) 은 single strand DNA의 절단과 통과 그리고 재봉합하는 기작을 가지고 negative supercoil을 제거하는 작용을 한다. 항암제 탐색중에서 topoisomerase inhibitor의 탐색을 위하여 screening에 필요한 topo I을 송아지 흉선으로 부터 분리하고 그 기질로 사용될 supercoiled DNA는 *E.coli*로 부터 pBR 322을 분리하였다. 종양세포에 대하여 세포독성능을 나타낸 시료에 대해서 Topo I relaxation 활성 측정을 실시함으로써 1차적으로 Topo I 저해가 일어났는지의 여부를 조사하고 DNA relaxation test로 이를 확인하였다.

5. 4. 1. 연구의 배경

세포의 형질저장 수단인 DNA는 복제나 전사와 같은 세포내 대사과정 동안에 형태학적이고 위상학적인 변화를 받게된다. 따라서 세포내에는 DNA의 이러한 변화를 조절해주는 기작을 가지고 있으며 DNA topoisomerase가 이 기작을 촉매하는

역할을 담당한다. DNA topoisomerase는 DNA 분자내부 혹은 분자들 사이에서 DNA의 초나선 상태를 제거하거나 도입함으로써 DNA knots의 형성과 해제, 환상 DNA 분자의 catenation과 decatenation을 행한다. 즉 DNA topoisomerase는 세포내 필수대사과정인 DNA 복제, RNA의 전사에 의해 발생하는 DNA의 overwinding, underwinding, catenation과 같은 위상학적인 문제들을 해결해주는 역할을 한다 (Silverman, 1992, D'Arpa & Liu, 1989). 이러한 DNA topoisomerase는 DNA의 phosphodiester 골격을 절단하고 재결합하면서 위상학적인 상태를 변경하는데 진핵 세포에서 그 작용기작에 따라 topoisomerase I (Topo I)과 topoisomerase II (Topo II)로 나뉘어진다. Topo I 은 이중나선 DNA 중 한가닥에 nick를 형성하는데, 이 nick된 사이로 다른 DNA 가닥이 통과한 후 재조합됨으로써 DNA의 supercoiling이 제거된 relaxed form이 형성된다. Topo II 는 DNA 이중나선의 양가닥에 모두 nick를 형성하고 이 nick를 통하여 각각의 상보적인 DNA 가닥이 통과함으로써 DNA의 supercoiling을 제거하게된다. 또한 Topo I 과 II의 중요한 차이점은 Topo I 의 경우 촉매과정 중에서 ATP를 필요로 하지 않지만 Topo II 의 경우는 DNA 가닥이 nick된 다른 가닥을 통과할때 ATP를 필요로 한다는 점이다(Liu, 1989). 원핵세포에서 ω protein은 type I topoisomerase와 같은 작용을 하며 gyrase는 type II topoisomerase와 같은 활성을 나타낸다. 특히 gyrase는 DNA의 negative supercoiling을 유도할 수 있어서 진핵세포의 type II topoisomerase와 차이를 나타낸다. 이와같이 topoisomerase는 DNA의 대사에서 중요한 역할을 수행하므로 세포 주기에 있어서 DNA의 대사가 활발한 상태에서 혹은 세포증식능이 왕성한 조직이나 세포에서 그 활성이 높을 것으로 예상된다. Topo I의 경우 mouse embryo fibroblast cell에서의 실험에서 증식할 때의 활성이 비증식할 때의 활성에 비해 4배 가량 증가하는 것이 관찰되었고(Tricoli et al , 1985) 또한 Topo II 역시 활발히 자라는 세포에서 그 양이 증가된다고 알려져 있다.

따라서 세포의 증식이 활발한 암세포에 대한 topoisomerase inhibitor의 개발

은 효과적인 항암제로서 선택될 가능성 또한 높게 된다. 지금까지 DNA topoisomerase inhibitor로 발견된 화합물은 *m*-AMSA, VP-16, VM-26, coumermycin A₁ 등의 eukaryotic Topo II inhibitor와 novobiocin, nalidixic acid 등의 bacterial gyrase inhibitor(Drlica & Franko, 1988)등이 있다. Topo I의 저해제는 Topo II의 저해제에 비해 발견된 것이 훨씬 적은데 1970년대에 발견된 camptothecin(CAM)이 대표적인 저해제이다(Hertzberg et al. 1989). Camptothecin은 식물 *Camptothecin acuminata* 에서 분리된 alkaloid로서 colon, gastric adenocarcinoma 등 소화기암에 유효하며 유도체인 topotecan, 9-amino-20-(S)-camptothecin 등은 phase II 시험이 종료된 상태로 adriamycin 이래 우수한 항암제로 평가받고 있다. 1990년대에 들어와서 Topo I 저해제 개발연구가 활발해 지면서 erbstatin, tyrphostin 유도체, intoplicine, naphthacenecarboxamide 유도체 등 새로운 물질들이 발견되고 있다.

5. 4. 2. Topoisomerase의 조제

다량의 시료를 검색해야하므로 경비의 절감을 위해 시약용으로 판매되는 정제된 효소를 사용하지 않고 송아지 흉선으로부터 이(1992)의 방법을 변형하여 topo를 분리하여 사용하였다. Deep freezer에서 -80℃로 보관중인 송아지 흉선 100g을 -20℃에서 1일간 방치하고 이어서 4℃에서 2일간 방치하여 조직을 완전히 녹였다. 이것을 표면에 존재하는 막과 대강의 지방질들을 제거한 후 100 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 깨끗이 세척하고 잘게 조각을 내었다. 이 조각들을 Warning blender에 넣고 NW buffer (5 mM potassium phosphate, 100 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF) 를 100 ml첨가한 후 약 30초간격으로 5차례 이상 갈았다. 4℃에서 30분간 방치한 후 위의 용액을 2겹의 가아제를 통하여 거른 후 다시 30분간 방치하였다. 이때 형성된 침전물은 hand homogenizer로 분쇄한 후 2

겉의 가아제를 사용하여 다시 여과하였다. 이 여과액들을 모은 후 10% polymin P 를 최종농도가 0.35% 되도록 첨가하고 약 10분간 교반하여 8,000 rpm에서 원심분리하였다. 이 침전물에 PR buffer (20 mM potassium phosphate, 10% glycerol, 10 mM NaHSO₃, 500 mM EGTA, 10mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF) 50 ml을 넣고 현탁한 후 5 M 의 NaCl을 최종농도가 0.55 M이 되도록 첨가한 후 교반하면서 30분간 방치하였다. 이를 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상청액을 회수한 다음 여기에 ammonium sulfate를 0.4 g/ml의 농도가 되도록 첨가한 후 역시 30분간 방치한 후 다시 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 그 침전물을 dialysis tube에 옮긴 후 동일한 buffer 2 L로 투석하였다. 투석후에는 침전물을 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 제거하고 상청액을 Bio-Rex 70 을 이용하여 분리하였다. Sample 용액을 Bio-Rex 70 resin이 있는 column에 loading 하고 200 mM의 phosphate buffer 용액 1 l로 씻어낸 후 200 mM에서 1 M에 이르는 농도 기울기 용출법으로 전개를 하였고 용출속도는 1.8 ml/min 으로 조정하였다. 그 과정을 요약하면 그림 5-5와 같다. 부분정제된 topo는 소량씩 분주하여 deep freezer 에 보관하였다.

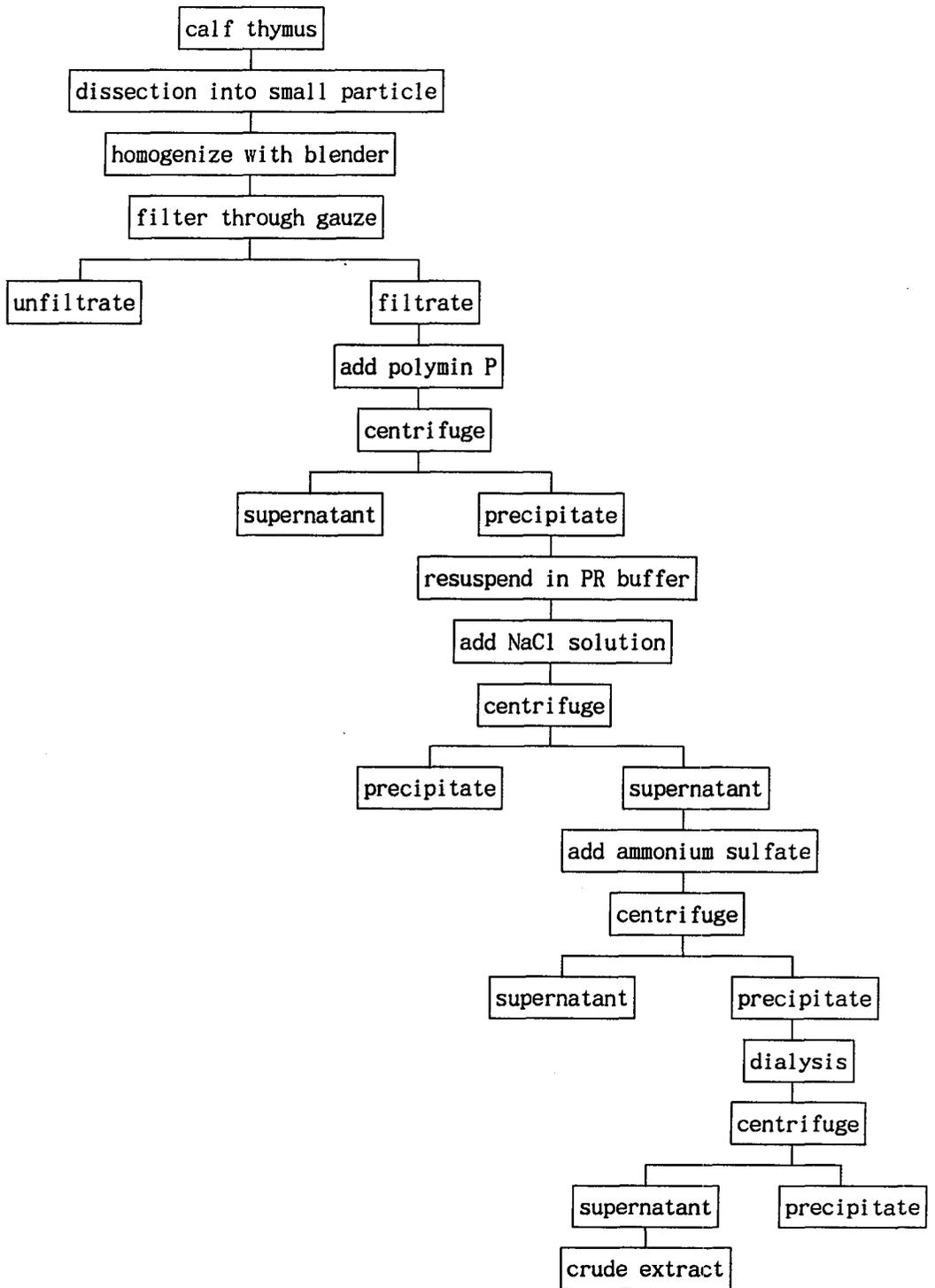


Fig. 5-5. The scheme for preparation of Topo I crude extract.

5. 4. 3. Supercoiled DNA의 제조

Topo I의 기질로 사용될 supercoiled DNA는 Sambrook 등(1989)의 방법을 이용하여 *E.coli*로 부터 pBR 322를 분리하여 사용하였다(그림 4.2.) LB broth (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH 7.2, D.W 1000 ml) 50 ml에 균주를 접종하여 37°C에서 O.D.(540 nm) 가 0.6 이 되도록 전배양을 한 후 LB broth 500 ml 에 옮겨 3시간 이상 배양하여 O.D.가 0.4 이상이 됐을때 chloramphenicol (34 mg/ml) 2.5 ml 을 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난후 배양액을 6,000 rpm으로 원심분리하여 cell을 회수한 후 cold STE solution (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)) 100 ml에 현탁시킨 후 4°C에서 6,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 세척하였다. 여기에 10 ml의 solution I (50 mM sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0))을 첨가하여 현탁시킨 후 1 ml의 lysozyme solution (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) 을 첨가하였다. 여기에 20 ml의 solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다. 15 ml의 ice-colded solution III (5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, D.W 28.5 ml)을 위의 용액에 첨가하여 잘 섞은 후 얼음 위에서 10분간 방치하였다. 이 용액을 6,000 rpm 에서 4°C로 15 분간 원심분리한 후 상청액을 회수하여 0.6 volume의 isopropanol을 넣고 잘 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다. 이를 6,000 rpm 에서 4°C로 15 분간 원심분리한 후 남아있는 물기를 완전히 제거하고 70% ethanol로 씻어내었다. Ethanol을 완전히 제거한 후 DNA pellet을 5 ml의 TE buffer (pH 8.0)에 녹였다. 이 용액을 50 ml 짜리 원심분리용 tube에 넣은 후 5 M 의 ice colded LiCl solution 3 ml 을 첨가하여 잘 섞고 4°C에서 10,000 rpm으로 10분동안 원심분리한 후 상청액을 회수하여 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 이를 4°C에서 10,000 rpm으로 10분동안 원심분리한 후 상청액을 제거하고 침전물을 70% ethanol로 씻어내었다. Ethanol을

완전히 제거한 DNA pellet을 500 μ l 의 TE buffer (containing RNase A (20 μ g/ml, 80°C heat treated for 3 min))에 녹여서 실온에서 30분간 방치하고 500 μ l 의 1.6 M NaCl (containing 13% (w/v) PEG 8000)solution을 첨가하여 잘 섞은 후 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리 (10,000 rpm) 하였다. 상층액을 제거하고 DNA pellet을 400 μ l의 TE buffer (pH 8.0)에 녹이고 chloroform:isoamylalcohol (24:1) solution을 600 μ l 첨가하여 잘섞은 후 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액을 다른 tube에 옮긴 후 100 μ l 의 10 M ammonium acetate를 첨가하여 잘 섞고 2 volume의 ice-colded ethanol을 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하여 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리하였다. 다시 200 μ l 의 ethanol로 씻어낸 후 DNA pellet을 100 μ l 의 TE buffer (pH 8.0)에 녹인 후 -20°C 에서 보관하여 기질로 사용하였다.

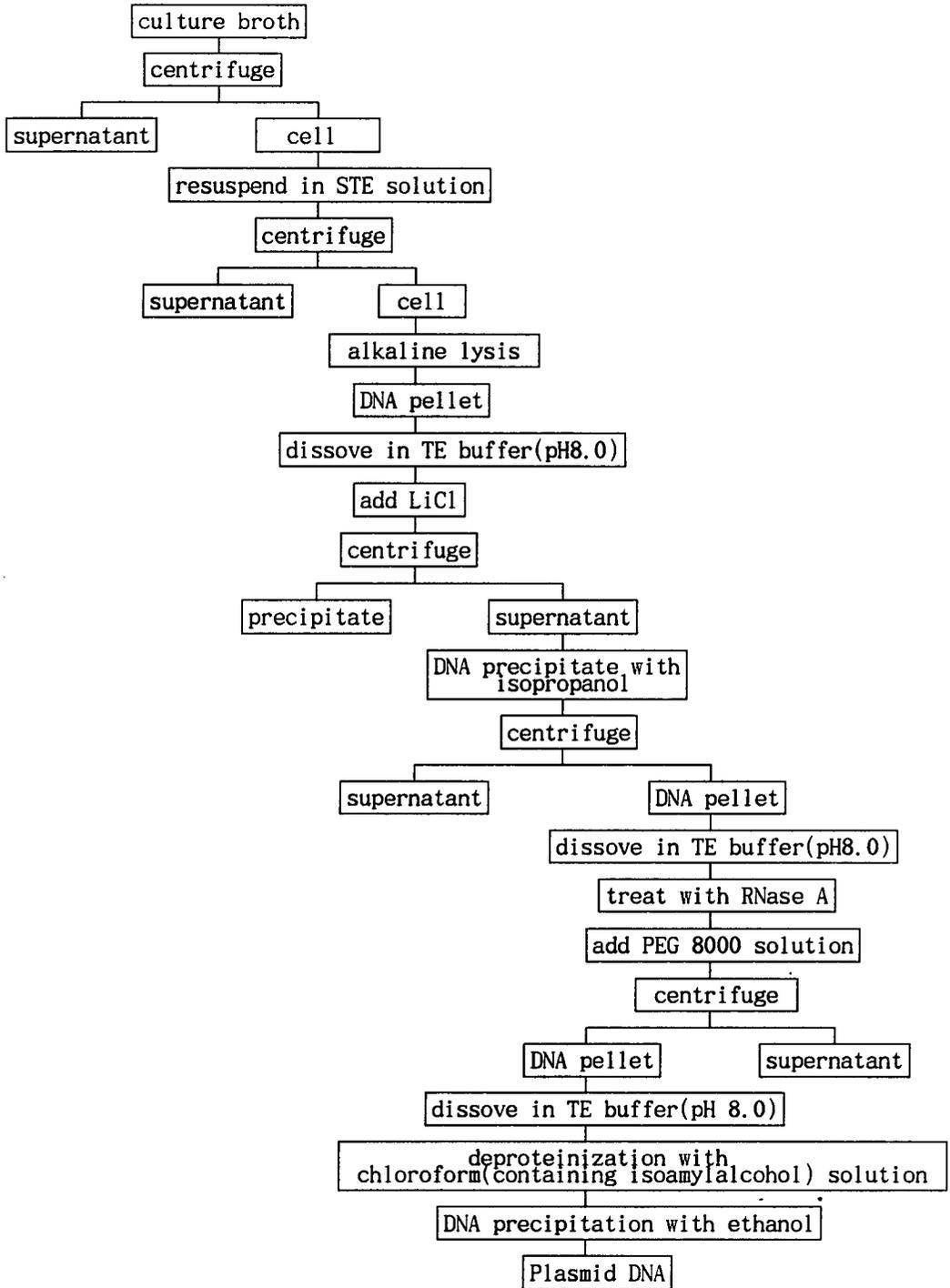


Fig. 5-6. The scheme for isolation of plasmid pBR 322.

5. 4. 4. DNA Relaxation assay

세포독성능을 나타낸 시료에 대해서 Topo I 저해가 일어났는지의 여부를 1차적으로 조사하기 위해 Topo I relaxation 활성 측정을 실시하였다. Topo I 활성 측정반응계의 조성은 다음과 같다.

* Topo I reaction mixture for relaxation assay

2x stock solution (100mM Tris-HCl pH 7.9, 0.06 mg/ml of BSA, 200mM KCl, 20mM MgCl ₂ , 1mM Dithiothreitol, 1mM EDTA)	10 μ l
pBR 322 supercoiled DNA (100 μ g/ml)	2 μ l
Enzyme solution purified from calf thymus (1unit)	6 μ l
Tested sample	2 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l
<hr/>	

반응 buffer에 시료 2 μ l 와 topoisomerase I 조정제액 6 μ l 를 넣어 최종 volume이 20 μ l 가 되도록 조정한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 loading solution 4 μ l 을 첨가하여 1% agarose gel에서 100 Volt로 한 시간 가량 전기영동하였다. Ethidium bromide 용액에서 30 분간 gel을 염색한 후 314nm의 UV-transilluminator에서 DNA band를 관찰하였다. Positive control로는 topo I의 저해제로 밝혀진 camptothecin을 사용하였다. 효소활성의 1 unit는 초나선형의 0.3 μ g의 DNA를 30분동안 반응하여 완전히 이완된 형태로 전환시키는 효소량으로 정하였다.

5. 4. 5. DNA cleavable complex assay

위의 topo I relaxation test에서 초나선형의 DNA를 이완된 형태로 전환시키는 시료에 대하여 topo I cleavable complex assay를 수행하여 시료가 cleavable complex 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 이는 DNA와 효소에 의한 cleavable complex가 약제에 의해 안정화되었는지를 관찰하는 실험이다. Topoisomerase는 DNA에 결합하여 DNA중 한가닥에 nick를 형성할때 DNA의 nick된 부분과 일시적인 공유결합체를 형성하는데 이상태에 시료가 작용하여 안정화 되면 나중에 denaturation solution으로 처리했을때 nick 된 DNA가 남게된다. 이를 ethidium bromide 가 포함된 agarose gel에서 전기영동하여 확인하는 것이다(Hsiang et al., 1989). Topo I 활성 측정반응계의 조성은 다음과 같다.

* Topo I reaction mixture for cleavable complex assay

2x stock solution (100mM Tris-HCl pH 7.9, 0.06 mg/ml of BSA, 200mM KCl, 20mM MgCl ₂ , 1mM Dithiothreitol, 1mM EDTA)	10 μ l
pBR 322 supercoiled DNA (100 μ g/ml)	2 μ l
Enzyme solution purified from calf thymus (1unit)	6 μ l
Tested sample	2 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l

반응 buffer에 시료 2 μ l 와 topoisomerase I 조정제액 6 μ l 를 넣어 최종 volume이 20 μ l 가 되도록 조정한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 여기에

0.75mg/ml proteinase K와 2.5% SDS가 혼합된 denaturation solution 5 μ l를 첨가하여 같은 온도에서 1시간 동안 계속 반응시켰다. Loading solution(5% SDS, 0.25% 의 xylene cyanol FF, 0.25% Bromophenol blue, 25% sucrose) 5 μ l 을 넣어 반응을 중지시킨 후 0.5 μ g/ml 의 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel 에서 100 Volt 조건하에서 한 시간 가량 전기영동하였다. Ethidium bromide 용액으로 gel을 염색한 후 314nm 의 UV-transilluminator하에서 DNA band를 관찰하였다. Positive control로는 topo I의 저해제로 밝혀진 camptothecin을 사용하였다.

5. 5. Type IV collagenase 저해물질의 탐색

암이 치명성을 가지는 원 중의 하나는 악성세포가 다른 부위로 전이하여 확산 되기 때문이다. 암세포가 한 조직에서 다른조직으로 침윤하고 전이할 때 혈관 또는 림프관을 뚫고 들어가는 침윤단계(invasion)와 뚫고 나오는 내출혈단계(extravasation)를 반드시 거치며, 이 과정에서 세포외부 기질을 분해해야 한다 (Liotta, Kohn, 1990). 따라서 세포외부기질의 구성성분인 기저막의 가장 중요한 단백질인 type IV collagen을 분해하는 type IV collagenase는 암세포의 전이과정에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 암세포의 침윤과 전이에 관여하는 효소인 72-kDa type IV collagenase의 저해제 검색방법의 확립은여 해양생물로부터 항암물질 개발을 위한 효과적인 검색작업에 중요할 것이다.

5. 5. 1. 연구의 배경

암의 침윤과 전이에 관련된 주요 proteases로는 (1) MMPs(Matrix Metallo-Proteinases) ; interstitial collagenase, stromelysin-1, stromelysin-2, pump-1, Mr 72,000 type IV collagenase, Mr 92,000 type IV collagenase, (2) serine

proteinases, (3) cathepsin등이 있으며 이는 다양한 암세포에 의해서 분비된다 (Goldfarb, Liotta, 1986). 이중에서 collagenase를 포함하는 metalloproteinase는 cofactor로써 calcium과 zinc ion을 필요로 하며 matrix metalloproteinase의 생산유도를 자극하는 인자로는 IL-1, TNF- α , EGF, TGF- β , TPA, H-ras이 있으며 생산 억제인자로는 TGF- β , letinoid, steroid hormone이 있다. Collagenase의 주요 두 가지 형은 간질 collagen을 분해하는 간질 collagenase와 기저막의 type IV collagen을 분해하는 type IV collagenase가 있다. Type IV collagenase는 72-kDa형, 92-kDa형, 100-kDa형의 적어도 세가지 형태가 있으며 72-kDa형이 가장 잘 알려져 있다. 이들은 모두 잠재형과 활성형 양쪽 다 존재하며 organomercurial compounds, sodium dodecyl sulfate, proteases와 같은 화학·효소 활성화에 의해서 N-말단의 80 아미노산을 잃고 활성형이 된다(Liotta et al., 1981). 이러한 zymogen의 합성, 분비, 그리고 활성화는 이들 저해제의 합성 분비와 함께 상처의 치료, 맥관형성, 류머티스성 관절염, 암침윤과 같은 정상적·병적인 과정에서 일어나는 세포외부기질의 재형성에서 중요한 조절단계들이다.

Liotta et al.(1980)은 최초로 type IV collagen 분해효소가 mouse B16 melanoma cell line의 전이능과 잘 일치한다고 보고 했으며, 다양한 oncogene에 의해 형질전환된 rat embryo cell line에서도 같은 결과가 관찰되었다(Garbisa et al., 1987). P. D. Brown et. al.(1990)은 Mr 92,000 type IV collagenase(MMP-9)는 간질 collagenase와 함께 cellular processing의 증거가 없음을 보고하였다. 따라서 잠재형인 72-kDa proenzyme에 대한 활성형효소의 비가 다른 metalloproteinase의 전체적인 수준보다 침윤능과 더 많은 연관성을 가질 수 있으므로 Mr 72,000이 type IV collagenase의 활성화 과정에 연구의 초점이 되었다.

본 연구에서는 항암제 개발의 일환으로써 암세포의 침윤과 전이를 막을 수 있는 약제를 개발하기 위해서 72-kDa type IV collagenase(MMP-2)의 활성화 과정의 저해제를 선별하기 위한 분석법을 확립하였다. 이는 type IV collagenase를 분비하는

고전이성의 HT-1080 세포의 배양액에 직접 시료를 첨가하는 in vivo 실험이므로 암세포에 대해서 세포독성을 나타내는 시료는 제외시켰으며, 동시에 정상세포인 lymphocyte에 대한 세포독성 검사와 적혈구의 용혈능 검사와 같은 전단계의 선별 과정을 통해서 모두 활성이 없는 시료를 선정하여 type IV collagenase에 대한 분석시료로 사용하였다. 암세포에 대한 세포독성능을 가지는 물질을 생산하는 균주가 많이 선별되는 것과는 달리, 효소 저해제와 같이 한 단계를 특이적으로 저해하는 물질을 생산하는 균주의 선별은 어려우나, 선발된 물질에 대해서는 신물질일 가능성이 높으며 특이적으로 작용하는 약제로써 개발하기에 유망하다고 생각된다.

5. 5. 2. 검색 시료의 선별

Type IV collagenase의 활성화를 저해하는 물질을 선별하기 위하여 이 효소를 분비하는 HT-1080 세포주에 시료를 처리하기 전단계로 세포독성시험을 거친 시료에 대하여 1차 선별을 하였다. HT-1080세포가 분비하는 72-kDa type IV collagenase에 시료가 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양액에 직접 시료를 첨가하여 세포배양을 함으로 암세포 p388D1과 DLD-1에 대한 세포독성능 검사에 의해서 세포독성능이 없는 시료를 선정 하였다. 세포독성 검사는 본 보고서 Prescreening assay에 기술한 방법으로 조사하였다. 약제 개발에 유용한 시료를 선택하기 위하여 lymphocyte에 대한 세포독성능 검사와 적혈구의 용혈능 검사를 하여 정상세포에 대해서 세포독성이 없으며 용혈활성이 없는 시료를 선정하였다. 따라서 암세포(p388D1, DLD-1)에 대한 세포독성능 검사, 정상세포인 lymphocyte에 대한 세포독성능 검사, 적혈구에 대한 용혈능 검사를 거쳐서 세가지의 실험에서 모두 음성을 보이는 시료를 선정하여 type IV collagenase의 활성화 저해를 분석하기 위한 시료로 사용하였다. 또한 암세포에 대한 세포독성과는 상관 없이 정상세포에 대한 세포독성이 없고 용혈 활성이 없는 시료를 활성형의 type IV collagenase 저

해제를 선별하기 위한 시료로 선정하였다. Type IV collagenase 활성화 과정의 저해물질을 탐색하는 체계를 요약하면 다음의 그림 5-7과 같다.

(II) Cell culture(HT-1080)

Cell culture to 80% confluence
with DMEM(+FBS)

Medium change
with DMEM(+ITS⁺)

4h

Medium change with
DMEM(+ITS⁺) &
add sample

48h

Collection of conditioned medium

**(III) Electrophoresis
(gelatin zymography)**

SDS-PAGE in 8% acrylamide gel
containing 0.1% gelatin

Remove SDS from the gel
& incubate gel in reaction buffer

Stain & destain

(I) Sample preparation

Culture of microorganism &
extract with organic solvent

Cytotoxicity test for tumour cell
(p388D1, DLD-1)

Cytotoxicity test for lymphocyte
Haemolytic activity test

Fig. 5-7. The screening procedure for inhibitor of 72-kDa type IV collagenase activating process.

5. 5. 3. 세포 배양과 시료의 처리

72-kDa type IV collagenase의 활성화 저해제를 선별하기 위한 분석을 위하여 type IV collagenase를 분비하며 강한 전이능이 있는 HT-1080 세포주(human fibrosarcoma cell)를 한국 세포주은행에서 분양받았다. 세포 배양 배지는 filter(0.22 μ m)멸균한 DMEM배지에 FBS(fetal bovine serum, 10%)와 kanamycin(20 μ g/ml)를 첨가하여 사용하였고, 일주일 간격으로 계대 배양하였으며 배양 5일째에 새로운 배지로 교환하였다. HT-1080 세포를 계대 배양 할 때는 배양 상등액을 vaccum pump를 이용하여 제거하고 세포의 노폐물과 죽은 세포를 PBS로 씻어준 다음 한 플라스크에 200 μ l 의 trypsin-EDTA(0.05%)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 2분 동안 반응시켜서 세포를 플라스크 바닥에서 약하게 떼어준 후 trypsin-EDTA를 제거하고 새로운 배지를 넣어서 pipetting하면서 세포를 플라스크 바닥에서 떼어내었다. Haemocytometer로 세포수를 측정하여 새로운 배지로 1 X 10⁴ cells/ml 농도가 되도록 세포수를 조정하여 세포 현탁액을 2개의 세포배양 플라스크(25 cm²)에 각각 5ml 씩 넣어서 CO₂ incubator(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

72-kDa type IV collagenase의 활성화 저해제를 분석하기 위해서 1 X 10⁴ cells/ml 농도의 HT-1080 세포 현탁액을 24-well microplate에 각 well 마다 1ml 씩 분주한 후 3일 정도 배양하여 플라스크 바닥에 80% 정도 깔리도록(80% confluence) 배양하였다. 이 세포 배양 plate에서 배양 상등액을 vaccum pump로 제거하고 FBS대신 ITS⁺를 첨가한 세포 배양 배지를 well 마다 0.5ml 넣어 4시간에서 하루 동안 적응시켰다. 다음으로 새로운 ITS⁺ 첨가 배지로 각 well 마다 1ml 씩 교환한 후 5 μ l/ml 농도의 시료를 세포배양액에 첨가하여 세포 배양기에서 2일 동안 더 배양하였으며 배양 상등액을 회수하여 원심분리한 다음 -20 $^{\circ}$ C에서 보존하고 type IV collagenase의 활성화 저해제 분석을 위한 시료로 사용하였다.(Fig.5-8).

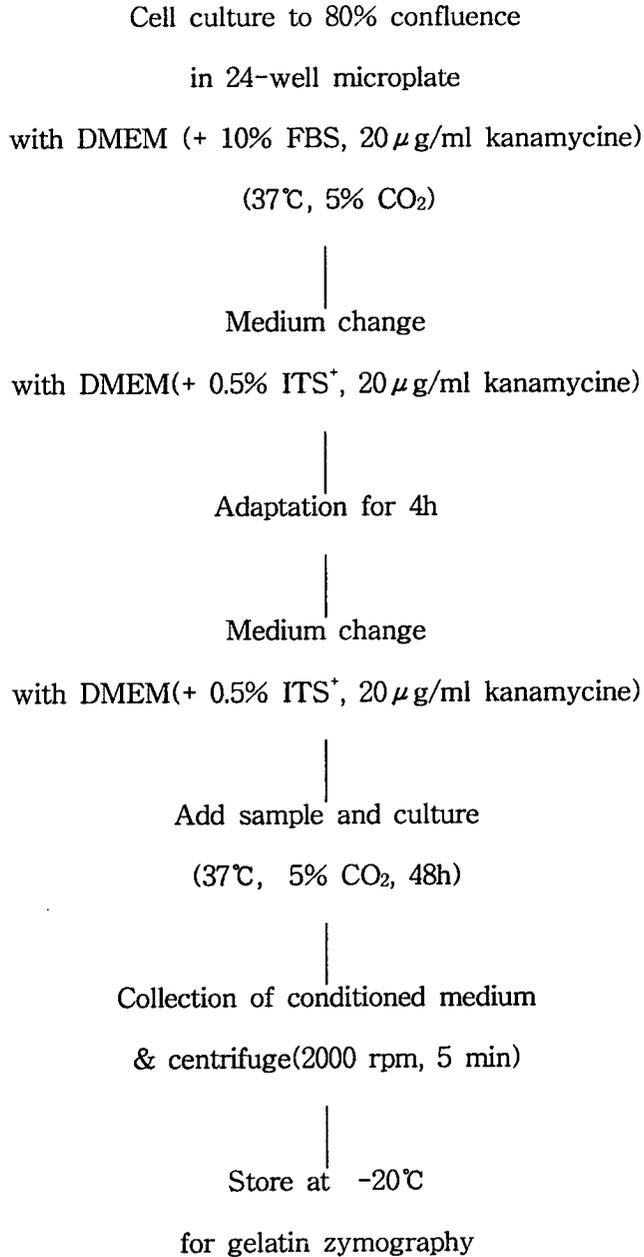


Fig. 5-8. Cell culture and sample preparation for the screening of inhibitor of type IV collagenase activating process.

5. 5. 4. Gelatin zymography

HT-1080 세포가 분비하는 72-kDa type IV collagenase의 활성화 정도를 확인하기 위하여 시료를 처리한 배양 상등액을 Heussen & Dowdle 방법(1980)에 따라서 gelatin zymography하였다. Gelatin zymography는 기질로써 gelatin이 함유된 mini SDS-polyacrylamide gel상에 나타난 효소의 투명대로 분자량을 확인하여 잠재형과 활성형의 효소를 판별하는 방법이다.

Gelatin zymography법에 따른 분석에 필요한 acrylamide gel과 buffer들의 조성은 다음과 같다.

Separating gel(ml)

Acrylamide(30%) and	
bisacrylamide(1%)	1.2 ml
1.5M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS	1.12 ml
Gelatin(1%)	0.5 ml
Ammonium persulfate(100mg/ml)	0.02 ml
TEMED	0.01 ml
Water	1.72 ml

Stacking gel(ml)

Acrylamide(30%) and	
bisacrylamide(1%)	0.4 ml
0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS	0.5 ml
Gelatin 1%	0.2 ml
Ammonium persulfate(100mg/ml)	0.035 ml

TEMED	0.005 ml
Water	2.9 ml

Sample buffer(5X)

1M Tris-HCl, pH 6.8	3.1 ml (312.5 mM)
Glycerol	5 ml(50%)
1 % Bromphenol blue	0.5 ml (0.05 %)
d-H ₂ O	1.4 ml
SDS	1.25(12.5 %)

Electrophoresis buffer (Reservoir buffer)

Tris	3 g (25 mM)
Glycin	14.4 g (0.192 mM)
SDS	1 g (0.1 %)
H ₂ O to make 1 liter	
pH 8.3	

Reaction buffer

Glycin	7.5 g (0.1 M)
Tris	6.05 g (50 mM)
NaCl	11.69 g (0.2 M)
CaCl ₂	0.73 g (5 mM)
Brij	0.02 %
pH 8.3	

24-well microplate에서 세포를 배양하면서 시료를 처리하였으며, 준비한 세포 배양 상등액을 sample buffer(5X) 와 4:1로 섞어서 기질로써 gelatin(0.1%)을 함유하는 8%(W/V) polyacrylamide gel의 각 well에 10 μ l씩 loading하여 처음 20분 동안 120V 전기를 흘려준 다음 120분 동안 200V의 전기를 흘려 주었다. 전기 영동을 끝낸 gel을 2.5%(V/V)의 Triton X-100 용액에 담구어 1시간 동안 상온에서 진탕하면서 gel 내의 SDS를 제거하였으며 중간에 효과적인 SDS 제거를 위하여 Triton X-100 용액을 한 번 교환해 주었다. SDS를 제거한 gel을 반응 buffer에 넣어 10분 동안 Triton용액을 씻어주었으며 새로운 반응 buffer에 넣어서 water bath(37 $^{\circ}$ C)에서 진탕하면서 over night 반응시켰다. 다음으로 Methanol/acetic acid/water=30/10/60 용액에 녹인 0.5% coomassie brilliant blue G-250 용액에 gel을 넣어 진탕하면서 3시간 동안 염색하고 색소가 포함되지 않은 동일 용액을 교환하면서 탈 염색한 후 transilluminator위에서 투명대를 확인하였다. 이 때 gelatin이 분해되지 않은 배경(background)은 염색되어 푸른색으로 보이고 collagenase에 의해서 젤라틴이 분해된 부분은 투명대로 나타난다 (Fig.5-9).

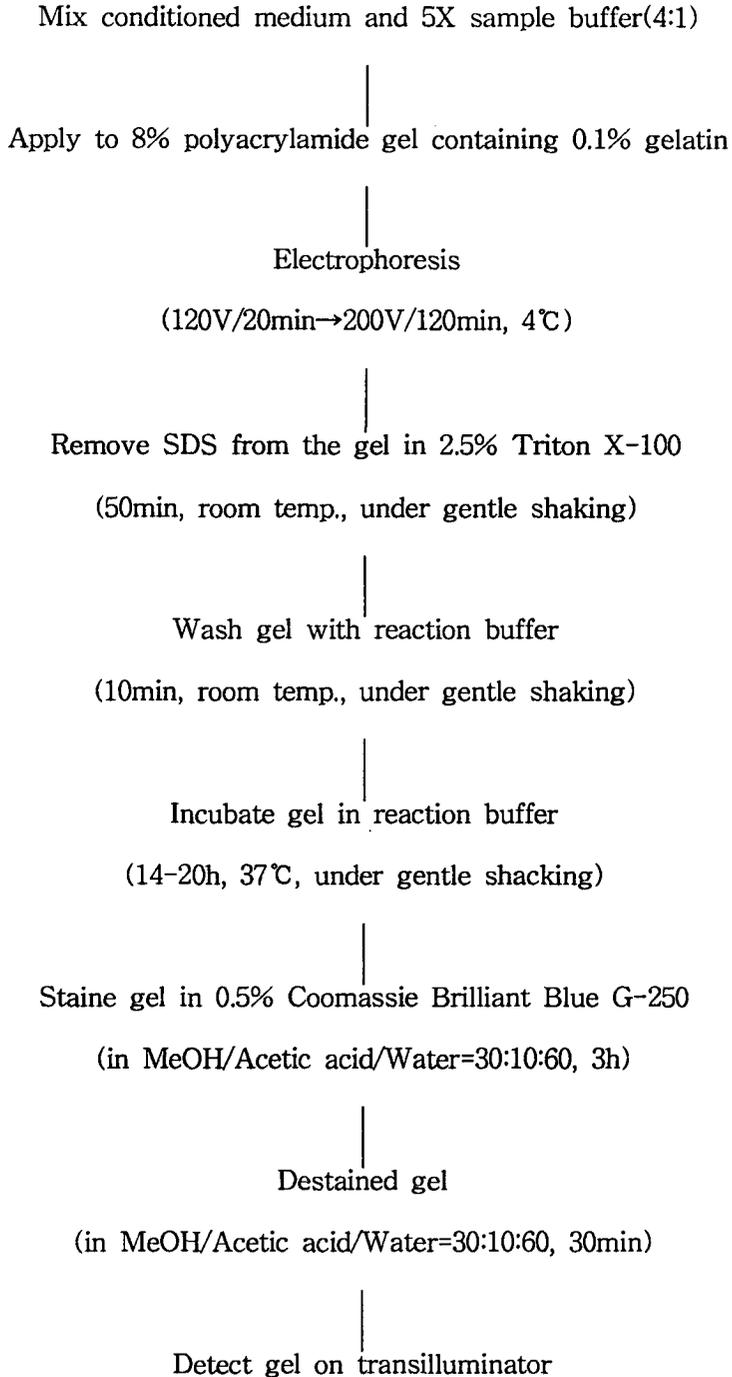


Fig. 5-9. The procedure of gelatin zymography.

5. 6. 연구의 결과

본 실험실에서 분리 보전한 한국 근역안 해역의 해수, 해변모래, 해양 저질층, 해양동물 시료, 남극시료등에서 분리한 세균과 방선균을 배양 추출하여 시료를 만들었고, 72-kDa type IV collagenase의 활성화 저해제와 type IV collagenase 저해제의 효율적인 선별을 위해서 1차 prescreening을 하였으며, prescreening법으로서 암세포에 대한 세포독성 검사, lymphocyte에 대한 세포독성능 검사, 적혈구의 용혈능 검사를 하였다.

72-kDa type IV collagenase의 활성화 저해제의 분석은 이 효소를 분비하는 HT-1080 (highly metastatic fibrosarcoma)세포의 배양액에 직접 시료를 첨가하여 배양하는 방법으로써 HT-1080 세포에 독성을 보이지 않는 시료를 선택하기 위하여 본 실험실에서 확립되어 있는 암세포 p388D1과 DLD-1에 대한 세포독성 검사를 하여 세포독성이 없고 mouse spleen lymphocyte의 성장을 저해하지 않고 적혈구를 용해 시키지 않는 시료를 선정하였다. p388D1과 DLD-1에 대한 세포독성이 없는 시료 중에서도 HT-1080 세포에 대해서 세포독성을 나타내는 시료가 있었으며, HT-1080 세포가 시료에 의해서 죽었을 때 배양 상등액에 분비되는 효소량이 매우 적으며 gelatin zymography법에 따른 분석에서 72-kDa의 투명대 만이 희미하게 형성되었다. 1차 선별에서 분석한 시료는 1237개 이며 이 중에서 암세포에 대해서 세포독성능이 없으며 lymphocyte에 대한 세포독성능 검사와 적혈구의 용혈능 검사에서 10%이하의 매우 낮은 활성을 가진 시료를 72-kDa type IV collagenase의 활성화 저해제 분석용으로써 738개 선정하였다.

Gelatin zymography 분석시 대조구로는 TPA(phorbol 12-Myristate 13-acetate)와 retinoic acid를 처리한 구와 시료를 처리하지 않은 구를 포함하여 세 개로 두었다. TPA는 matrix metalloproteinase의 생산유도 과정의 자극인자로서 HT-1080 세포의 배양액에 첨가하여 배양한 상등액을 gelatin zymography 하였을

때 잠재형의 72-kDa 효소가 모두 활성화 되어서 gel상에서 62-kDa과 59-kDa의 효소에 의한 투명대만이 형성되었다. 반면에 retinoic acid는 type IV collagenase의 mRNA생산과 효소의 생산을 억제하는 물질로 알려져 있으며 이를 첨가하여 세포 배양한 상등액을 분석하면 주로 72-kDa 의 투명대가 gel상에서 형성되었다. 그리고 아무것도 처리하지 않은 세포 배양 상등액은 72-kDa, 62-kDa, 59-kDa의 세개의 투명대가 형성되었다. 미생물의 배양액 추출액을 시료로 하여 72-kDa type IV collagenase의 활성화 저해물질을 선별하는 실험을 하였으며 1차 실험에서 방선균 5346-1, 5765, 5836을 분리하였는데, 이 세 균주 모두 배양액을 ethylacetate로 추출한 층의 시료가 type IV collagenase의 활성화 과정의 저해제로서 선별되었다.

제 6 장 결 론

해양천연물 연구는 지난 30여 년 간 눈부시게 발전하여 왔다. 이미 6000여에 달하는 신물질의 특이한 구조는 종래의 유기화학이나 천연물화학에서 인식되어 왔던 유기물질에 대한 개념자체를 변화시켰으며 다수의 해양천연물이 나타내는 강력한 생리활성 효과와 독특한 반응기작은 의·약학과 생물·생태학에 속하는 여러 분야의 기초 및 응용연구에 막대한 기여를 하여왔다. 산업적인 면에서도 이미 50 이상의 해양생물 유래 생리활성 물질이 특허를 획득하여 의약품, 건강식품 등으로 개발중이며 유용효소와 고분자 물질의 산업적 이용을 위한 연구노력도 매우 활발하다.

60년대이래 선진국에서의 해양생물 유래 신물질과 유용물질에 대한 연구노력은 지속적으로 증가하여 왔다. 더욱이 오랜 기간 유용물질의 보고 역할을 하여 왔던 육상생물로부터 천연물의 개발이 근년에 이르러 점차로 정체되어 가는 경향을 나타냄에 따라 해양생물의 중요성이 더욱 부각되어 집중적인 연구를 하고 있다. 선진국뿐만 아니라 여러 개도국에서도 해양생물을 더이상 단순한 식량자원으로만 보지 않고 유용물질의 원천으로 인식하고 있으며 이에 따라 국가간의 자원확보 경쟁의 차원에서 자국내 해양생물을 취급하는 국가가 증가하고 있는 실정이다.

반면 국내에서는 천혜의 해양환경에 따른 무수한 동·식물과 미생물이 근해에서 서식함에도 불구하고 인식과 전문연구 인력의 부족으로 유용물질의 연구대상이 육상식물과 미생물에 국한되어 있으며 해양생물은 거의 주목을 받지 못하고 있다. 본 연구진에서는 체계적인 해양생물 유래 신물질 및 유용물질 연구를 위한 기초연구로서 우리나라와 남극 근해에 서식하는 저서군체 동물로부터 신물질 추출, EPA 생산균주의 개발 등을 비롯한 수개의 연구과제를 성공적으로 수행한 바 있으며 이를 기초로 하여 본 장기연구과제를 수행하게 되었다.

제1차년도인 당해년도에는 연구대상 생물시료의 확보, 생리활성탐색 방법의

확립등 체계적인 연구를 위한 기반을 확충하고 조추출물에 대한 생리활성도 측정과 화학적 분석의 결과에 의한 중점연구대상 시료의 선정, 5종 이상의 신물질 분리 및 구조결정, 유용효소 생산균주의 분리 등을 중점 목표로 하여 연구를 수행하였으며 주요 연구결과는 다음과 같다.

1. 남해안의 거문도와 해역에서 11종의 강장동물, 43종의 해면동물, 4종의 원색동물등 58종 260kg의 저서균체동물 시료를 채집하였다. 또한 우리나라 근해, 동해와 태평양 심해, 남극연안 등지로부터 1500여 해양세균과 150여 방선균 균주를 분리하였다.

2. 저서균체동물 시료로부터 얻은 조추출물에 대한 생리활성도 측정과 화학적 분석의 결과를 종합하여 6종의 강장동물과 3종의 해면동물을 중점연구 대상으로 선정하여 천연물 연구를 수행중인 바 현재까지 18종의 천연물이 분리되었다. NMR등 분광자료 해석과 화학반응의 결과를 종합하여 sesquiterpenoids, diterpenoids, secosteroids, polyhydroxy steroids, pyridinium carboxylates 등으로 이들의 구조를 결정하였다. 또한 생리활성도 측정결과 이들중 다수가 항박테리아, 항바이러스, 세포독성 등의 활성효과를 갖고 있음을 확인하였다.

3. 해양미생물로부터 생리활성물질 검색방법의 개선을 위하여 해양발광 세균을 이용한 항생효과와 phospholipase A₂ 활성을 분석하는 방법을 개발하였다. 또한 lipase, superoxide dismutase, haloperoxidase등 유용효소의 활성측정 방법을 수립하였다.

4. 전기한 해양세균과 방선균에 대한 생리활성 측정결과 항균 및 항진균 효과가 우수한 8종의 세균과 17종의 방선균을 선택하여 대량배양과 천연물 분리작업이 진행중이다. 또한 거대물질과 유용효소 활성검색에 의하여 체외 다당류 생산균주 1종, lipase 생산균주 12종, PLA₂ 생산균주 1종, superoxide dismutase 생산균주 3종 및 agar 분해효소 생산균주 5종을 분리하였으며 거대물질과 효소에 대한 분리작업이 진행중이다.

5. 해양생물로부터 항암물질을 개발하기 위하여 기존의 항암제 탐색 기술에

대한 자료수집 및 분석을 하였으며 P388등 기존의 세포독성 실험을 보강하기 위하여 type I topoisomerase와 type IV collagenase 등 암세포 증식과 전이에 작용하는 효소에 대한 저해 활성탐색 방법을 확립하였다. 또한 해양세균과 방선균 500여 균주의 조추출물에 대한 생리활성도 측정결과 세포독성과 collagenase 저해 활성이 우수한 균주 각 20종과 3종을 선택하여 현재 대량 배양과 생리활성 물질 탐색이 진행 중이다.

요약하여 본 1차년 도에는 장기적인 해양생물 유래 신물질 및 유용물질 연구를 위한 기반이 확립되었으며 10여종의 신물질을 포함한 다수의 천연물이 분리, 구조가 결정되었다. 또한 생리활성물질, 거대물질, 유용효소를 생산하는 다수의 해양 미생물 균주가 분리되었다.

본 1차년 도의 연구결과는 국내에서도 해양천연물에 대한 연구가능성이 매우 높음을 입증하였으며 체계적이고 지속적인 연구노력을 기울일 경우 우수한 결과가 양산될 것이다.

참 고 문 헌

1. 한국해양연구소, 한국근해 저서군체 생물로부터 신물질 추출 연구(I), BSPG 00157-467-4, 1992, 256pp.
2. 한국해양연구소, 한국근해 저서군체 생물로부터 신물질 추출 연구(II), BSPN 00179-603-1, 1993, 191pp.
3. 한국해양연구소, 해양동물로부터 추출된 천연물에 관한 연구(문헌중심), BSPE 00308-512-4, 1992, 417pp.
4. 이광호. Topoisomerase 분리 정제 및 특성. 경북대학교 석사학위 논문. 1992.
5. Adinolfi, R., Migliuolo, A., Piccialli, V., Sica, D., *J. Nat. Prod.*, 1994, 57, 1200.
6. Anderson, R. J., Stonard, R. J., *Can. J. Chem.*, 1979, 57, 2325.
7. Bergquist, P. R., Wells, R. J., in '*Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspective*', ed., Scheuer, P. J., Vol. V, Academic press, New York, 1983, p1.
8. Bonini, C., Cooper, C. B., *J. Org. Chem.*, 1983, 48, 2108.
9. Borman, S. *Chem. Eng. News*, June 1992, 15, 5.
10. Brown, P. D., Levy, A. T., Margulies, I. M. K., Liotta, L. A. Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res.* 1990, 50:

6184.

11. Buter A. and Walker, J. V. *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1937.
12. Capon, R. J., Faulkner, D. J., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 4771.
13. Cho, K. W. *Kor. J. Biochem.*, **1994**, 27, 522.
14. Cline, T. W. and J. W. Hastings *Proc. Natl.Acsd.Sci. U.S.A.*, **1971**, 68, 500.
15. Culver, P., Burch, M., Porenza, C., Wasserman, L., Fenical, W., Taylor, P., *Mol Pharmacol.*, **1985**, 28, 436.
16. D'Arpa, P. and Liu, L. F. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochemica et Biophysica Acta.* **1989**, 989:163.
17. D'Auria, M. V., Paloma, L. G., Minale, L., Riccio, R., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 2149.
18. Dennis, E.A., *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 13057.
19. Dennis, E.A. Phospholipases, in "The Enzymes" (Ed. by P.D.Boyer), **1983**, pp307-354, Academic press, NY.
20. De Silva, E. D., Scheuer, P. J., *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 1611.
21. Dies, E. and S. Mong *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 14654.

22. Drlica, K. and Franco, R.J. Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry*. **1988**, 27(7):2253.
23. Enwell, E. L., Van Der Helm, D., Nan Hsu, I., Pattabkiran, T., Schmitz, F. J., Spraggins, R. L., Weinheimer, A. J., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1972**, 215.
24. Farnworth, N. R. The role of medicinal plants in drug development, in *Natural Products and Drug Development*, Krogsgaard, P., Christensen, B.S. and Kofoe, H. Eds., Munkgaard, Copenhagen, **1984**. pp 17.
25. Faulkner, D. J., *Nat. Prod. Rep.*, **1984**, 1, 551.
26. Faulkner, D. J., *Nat. Prod. Rep.*, **1986**, 3, 1.
27. Faulkner, D. J., *Nat. Prod. Rep.*, **1988**, 5, 613.
28. Federsel, H. J. *CHEMTECH* december, **1993**. 24.
29. Fusetani, N., Matsunaga, S., Konosu, S., *Experientia*, **1981**, 37, 680.
30. Fusetani, N., Nagata, H., Hirota, H., Tsuyuki, T., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 7079.
31. Fusetani, N., Yasukawa, K., Matsunaga, S., Hashimoto, K., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 28, 5837.
32. Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R. J., Sattiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R. H., Khoury, G., and Liotta, L. A. *Cancer Res.* **1987**, 47: 1523.

33. Ghisalberti, E. L. Detection and isolation of Bioactive Natural Products, in Bioactive Natural Products, Colegate, S.M. and Molyneux, R.J. Eds., CRC Press. 1993, pp 10-57.
34. Goldfarb, R. H., and Liotta, L. A. Proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Semin. Thromb. Hemost.*, 1986, 12: 294.
35. Hastings, J. W., T. O. Baldwin, M. Z. Nicoli *Methods in Enzymology*, 1978, Vol. 57 Ed. by M.DeLuca, 135-152, Academic Press, NY
36. Hertzberg. R. P., Caranfa, M. J. and Hecht, S. M. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: Evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*. 1989, 28:4629.
37. Heussen. C. and Dowdle, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 1980, 102: 196.
38. Hochlowski, J. E., Faulkner, D. J., *Tetrahedron Lett.*, 1980, 21, 4055.
39. Hosokawa, M., H. Oshima, H. Kohno, K. Takahashi, M. Hatano and S. Odashima., *Nippon Suisan Gakkishi*, 1993, 59, 309.
40. Hsiang, Y-H., Lihou, M. G. and Liu, L. F. Arrest of replication forks by Drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer research*. 1989, 49:5077.
41. Hunter-Cevera, J. C. and Sotos, L. *Microb. Ecol.*, 1986, 12, 121.

42. Imre, S., Thompson, R. H., Yalhi, B., *Experientia*, **1981**, 37, 442.
43. Ireland, C. M., Roll, D. M., Molinski, T. F., Mckee, T. C., Zabriskie, T. M., and Swersey, J. C. Uniqueness of the marine chemical environment: Categories of marine natural products from invertebrates. In: D.G. Fautin ed., Biomedical importance of marine organisms, *California Academy of Sciences*, **1988**, pp.41-58.
44. Ireland, C. M., Roll, D. M., Molinski, T. F., Mckee, T. C., Zabriskie, T. M., Swersey, J. C., in 'Biomedical Importance of Marine Organisms', ed. Fautin, D. G., *California Academy of Science*, **1988**, pp41.
45. Kashman, Y., *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 879.
46. Kazlauskas, R., Murphy, P. T., Ravi, B. N., Sanders, R. L., Wells, R. J., *J. Aust. J. Chem.*, **1982**, 35, 69.
47. Kim, D. K., P. G. Suh and S. H. Ryu *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1991**, 174, 189.
48. Kim, M. K. and Rhee, J. S., **1994**, 8, 635.
49. Kobayashi, M., Kobayashi, K., Ramana, K. V., Rao, Ch. V. L., Rao, D. V., Rao, Ch, B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1991**, 493.
50. Komiyama, K. and Funayama, S. *Antitumor Agents, in The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*, eds S. Omura, Springer-Verlag, **1992**. pp63-78.

51. Koshiro, S., Sonomoto, K., Tanaka, A. and Fukui, S. *J. Biotechnol.* **1985**, 2, 47.
52. Lee, D. K., J. K. Jung, K. P. Kim, C. Yon, J. W. Suh, C. O. Kim, B. C. Hyun, S. H. Kim, Y. H. Lim and C. H. Lee *Kor. Biochem. J.*, **1993**, 26, 625.
53. Li, M. K. W., Scheuer, P. J., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 587.
54. Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M., and Shafie, S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, **1980**, 284: 67.
55. Liotta, L.A., Tryggvason, K. and Garbisa, S. Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen. *Biochemistry*. **1981**, 20: 100.
56. Liotta, L.A. and Kohn, E. Cancer invasion and metastasis. *JAMA*. **1990**, 263: 1123.
57. Liu, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58:351.
58. Madaio, A., Notaro, G., Piccialli, V., Sica, D., *J. Nat. Prod.*, **1990**, 53, 565.
59. Madaio, A., Piccialli, V., Sica, D., Corriero, G., *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 952.
60. Madaio, A., Piccialli, V., Sica, D., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 5999.
61. Migliuolo, A., Piccialli, V., Sica, D., *Steroids*, **1992**, 57, 344.

62. Murata, M., Miyagawa-Kohshima, K., Nakanishi, K., Naya, Y., *Science*, **1986**, 234, 585.
63. Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T., *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **1982**, 48, 549.
64. Newman, D. J., Jensen, P. R., Clement, J. J. and Acebal, C. Novel activities from marine derived microorganisms. In: A. L. Demain, G. A. Somkuti, J. C. Hunter-Cevera, H. W. Rossmore eds.. *Novel microbial products for medicine and agriculture*, Elsevier. **1989**. pp.239-251.
65. Notaro, G., Piccialli, V., Sica, D., *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55, 773.
66. Ochi, M., Kataoka, K., Tatsukawa, A., Kotsuki, H., *Chem. Lett.*, **1993**, 2003.
67. Ochi, M., Yamada, K., Kotsuki, H., Shibata, K., *Chem. Lett.*, **1991**, 427.
68. Okuda, R. K., Klein, D., Kinnel, R. B., Li, M., Scheuer, P. J., *Pure & Appl. Chem.*, **1982**, 54, 1907.
69. Oyazagui, Y. in "Biological and clinical aspect of Superoxide and superoxide dismutase" **1980**. Vol. IIB (ed. by Bannister and Banister), Elsevier, New York
70. Perry, N. B., Blunt, J. W., McCombs, J. D., Munro, M. H. G., *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 5476.
71. Reynolds, L. J., L. L. Hughes, and E. A. Dennis, *Anal. Biochem.*, **1992**, 204, 190.

72. Rinehart, K.L. Antiviral agents from novel marine and terrestrial sources. In: T. Block et al. ed. Innovations in antiviral development and the detection of virus infection, Plenum Press. 1992. pp41-60.
73. Rinehart, K.L. Screening to detect biological activity. In: D. G. Fautin ed. Biomedical importance of marine organisms, *California Academy of Sciences* . 1988. pp. 13-22.
74. Sakemi, S., Higa, T., *Experientia*, 1987, 43, 624.
75. Sakemi, S., Sun, H. H., *J. Org. Chem.*, 1991, 56, 4304.
76. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular cloning. Coldspring harver laboratory press. 1.21-1.41. 1989.
77. Silverman, R.B. The organic chemistry of drug design and drug action. Academic press, 1992. pp220-276.
78. Stierle, D. B., Faulkner, D. J., *J. Nat. Prod.*, 1991, 54, 1134.
79. Suffness, M., Newman, D.J. and Snader, K. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources, in Bioorganic marine Chemistry III. Scheuer, P.J. ed. Springer-Verlag, 1989. pp131-168.
80. Tachibana, K., Scheuer, P. J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2469.
81. Tachibana, K., Scheuer, P. J., Tusukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 2469.

82. Talpir, R., Rudi, A., Han, M., Koshman, Y., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 3033.
83. Tricoli, J. V., Sahai, B. M. DNA topoisomerase I and II activities during cell proliferation and the cell cycle in cultured mouse embryo fibroblast(C3H 10T1/2) cells. *Experimental cell research*. **1985**, 158:1.
84. Tsuda, M., Shigemori, H., Ishibashi, M., Kobayashi, J., *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55, 1325.
85. Tsuda, M., Shigemori, H., Ishibashi, M., Kobayashi, J., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 2597.
86. Ulizer, S and J.W. Hastings *Methods in Enzymology*, **1978**. Vol. 57 (Ed. by M.DeLuca), pp189-194, Academic Press, NY
87. Van den Bosch, H. *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, 604, 191.
88. Xi, L., K. W. Cho, M. E. Herdon and S.-C. Tu, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265:4200.
89. Zabriskie, T. M., Klocke, J. A., Ireland, C. M., Marcus, A. H., Molinski, T. F., Faulkner, D. J., Xu, C., Clardy, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 3123.

위탁과제

연구과제명: 항바이러스 약효검색

연구기간: 1994. 5. 1 - 1995. 4. 30

연구기관명: 한국화학연구소 스크리닝부

연구책임자: 이종교

연구원: 홍승경

김지현

김해수

피미경

요 약 문

I. 제목

항바이러스 약효검색

II. 연구개발의 목적 및 중요성

부작용이 적고 지속적인 치유효과를 가지는 항바이러스물질을 개발하기 위하여 해양생물로 부터 분리된 물질들의 항바이러스활성을 평가함을 목적으로 하였다. 일차로 대량검색이 가능한 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 함께 조사하고 광범위 효과를 알기 위하여 이차로 cytomegalovirus와 varicella virus에 대한 약효검색을 평가함을 목표로 하였다. 신약개발시 시험물질이 개발목표로 하는 분야에 대한 약효를 지니는가가 확인되어야 다음 개발 단계를 거칠 수 있기 때문에 항바이러스제개발을 위해 준비되는 시료의 약효평가는 필수적이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

해양생물로 부터 분리된 물질들을 일차로 Vero 세포체계에서 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세

포에 대한 독성을 CPE저해법으로 함께 조사하였다. 이차로 cytomegalo virus와 varicella virus에 대한 약효검색을 CPE저해법과 plaque감소법을 이용하여 수행하였다. 또한 일부시료에 대한 HeLa 세포체계에서 RNA virus 인 poliovirus, coxsackie virus B와 vesicular stomatitis virus에 대한 약효검색도 CPE 저해법을 이용하여 수행되었다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

한국해양연구소에서 해양생물로 부터 분리되어 의뢰된 17개의 시료에 대한 항바이러스약효를 평가하였다. 모든 시료에 대하여 일차로 Vero세포체계에서 HSV-1과 HSV-2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법을 이용하여 함께 조사하였다. 이차로 CPE저해법을 이용하여 CMV와 plaque감소법을 이용하여 VZV에 대한 약효검색을 수행하였다. 또한 일부시료에 대한 HeLa 세포체계에서 RNA virus 인 PV-1, CoxB3와 VSV에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행되었다. 시험된 바이러스에 대하여 뚜렷한 약효를 나타내는 물질이 아직 발견되지 않았으나, 신약을 개발하기 위하여 앞으로도 많은 시료에 대한 지속적인 약효검색이 요구된다.

SUMMARY

For the development of new antiviral agents in vitro evaluation of antiviral activity of the compounds derived from marine organisms has been performed. To evaluate anti-herpetic efficacy Vero cells were infected with HSV-1 or HSV-2 and sensitivity to test compounds was measured by CPE inhibition assay. Anti-CMV activity was measured by CPE inhibition assay and anti-VZV by plaque reduction assay. HEL 299 cells were used for both viruses. In HeLa cell culture system antiviral activity against poliovirus, coxsackie B3 virus and vesicular stomatitis virus was also tested by using CPE inhibition assay. No compound showed the significant antiviral activity against the tested viruses.

목 차

제 1 장 서론	307
제 2 장 연구추진방법	311
제1절 연구내용	311
제2절 실험재료	311
1. 세포	311
2. 바이러스	311
3. 시험물질 및 표준물질	312
제3절 실험방법	312
1. 세포배양	312
2. 바이러스증식	313
3. 바이러스역가 측정	315
4. 항herpes simplex virus 약효검색	315
5. 항cytomegalovirus 약효검색	316
6. 항varicellavirus 약효검색	316
7. 항poliovirus 약효검색	316
8. 항coxsackie B virus 약효검색	317
9. 항vesicular stomatitis virus 약효검색	317
10. 세포독성검사	317
11. MTT검색법	317
제 3 장 연구결과 및 고찰	319
제1절 항herpesvirus 약효검색	319
1. 항herpes simplex virus 약효검색	319

2. 항cytomegalovirus 약효검색	320
3. 항varicellavirus 약효검색	323
제2절 항RNA virus 약효검색	323
1. 항enterovirus 약효검색	323
2. 항vesicular stomatitis virus 약효검색	323
제 4 장 결론	328
제 5 장 참고문헌	329

제 1 장 서 론

천연두, 홍역, 소아마비 등의 바이러스 질환들은 백신접종에 의한 면역요법으로 예방이 성공적으로 이루어지고 있으나 항원의 빈번한 돌연변이, 다양한 항원을 가지고 있는 바이러스들, 또는 잠복감염이나 발병도중 viremia (바이러스가 혈액으로 퍼지는 현상)가 잘 나타내지 않는 바이러스에 대한 백신개발은 아직 어려운 형편이다.⁽¹⁾ 분자생물학, 생화학등의 근대과학의 큰 발전에 힘입어 바이러스질환의 진단이 용이해지고 증식기작 및 질병기작 이해에 급속한 진전이 있었고 후천성면역결핍증 (AIDS: acquired immunodeficiency syndrome) 등의 바이러스질환의 창궐로 인하여 바이러스치료제 개발연구가 최근부터 활발히 진행되어 왔다. 그러나 아직 공인된 치료제 수가 적고 그나마 치료가 허용된 바이러스종류도 주로 AIDS 바이러스 (HIV : human immuno-deficiency virus), herpes simplex virus (HSV)와 cytomegalovirus (CMV)에 불과하고 약물의 종류는 대부분 핵산유도체들이다.^(2,3) 최근에 바이러스증식기작에 관한 새로운 지식과 정보 공급에 힘입어 바이러스특이 기작 저해를 목적으로 하는 물질개발에 대한 시도가 많아졌고, 다른 구조와 기능을 가진 물질개발에 대한 관심이 높아지고 있으나 아직도 대량 검색에 의한 새로운 물질발견 가능성이 더 큰 편이다.

사람에게 감염하는 HHV는 현재 7가지가 알려져 있는데 (표 1), 가장 최근에 밝혀진 HHV type 7을^(4,5) 제외하고는 모두 다양한 질병을 유발함이 알려져 있다. 이들중 HSV-1과 HSV-2와 VZV와 Epstein-Barr virus와 CMV는 모두 AIDS 환자의 바이러스에 의한 기회감염의 주원인균들로 알려져 있고, CMV는 환자 죽음의 직접적인 원인이 되기도 한다.^(6,7) 장미진의 원인균으로 최근에 밝혀진 HHV type 6 는 AIDS 환자의 질병을 촉진시키는 역할을 하는 human immunodeficiency virus

(HIV)의 cofactor일 가능성이 큰 것으로 알려져 있다.⁽⁸⁾ 따라서 HHV는 바이러스질 환치료제의 개발대상으로서 큰 관심을 끌고 있다. HHV질환 치료제로는 HSV와 VZV와 CMV치료제만이 공인되어 있는데 약효와 독성면에서 가장 우수한 약물로서 인정되는 acyclovir (ACV)의 경우에도 HSV type 1 (HSV-1)과 HSV type 2 (HSV-2)와 varicella-zoster virus(VZV)감염에만 이용되고 있고 최근에 이들 바이러스에 의한 이차감염된 AIDS환자수의 급증으로 약물내성균주출현도 급증하고 있다. 그리고 CMV 치료제로 공인된 Foscarnet (phosphonoformic acid, sodium salt)나 Ganciclovir의 경우 독성 때문에 AIDS나 면역저하 환자에게만 치료하도록 허가되어 있고 치료 효과도 일시적일 뿐이다. 따라서 광범위 효과를 지니면서도 부작용이 적고 지속적인 치료효과를 지닌 물질의 발견이 시급하다.

바이러스는 종류에 따라 숙주 및 증식기작등이 다르기 때문에 광범위 효과를 가진 약물을 발견하기 어렵다. 유기화합물의 경우 구조가 결정되었고 치료제가 없는 바이러스질환이 많음으로 시료량이 충분할 경우 가급적 여러가지 바이러스에 대한 약효를 조사해보는 것이 바람직하다. Herpesvirus는 DNA virus임으로 적은 시료량으로 손쉽게 약효를 평가할 수 있는 RNA virus인 poliovirus type 1 (PV-1) (소아마비유발), coxackie B virus type 3 (CoxB3) (감기 및 열성질환,간혹 무균성 수막염, 심장질환 유발), 와 vesicular stomatitis virus (VSV)를 시험항목으로 추가하였다. PV-1과 CoxB3는 작으면서 외피가 없는 positive-single-stranded RNA 바이러스인 picornaviridae에 속하는 enterovirus속에 포함된다. 이들은 주로 구강으로 전염되며 주로 중추신경계 질병을 유발하나 심장질환을 유발하기도 한다. 화학 치료제나 예방제가 전혀 개발되어 있지않고 백신에 의한 예방이 거의 완벽한 poliovirus (PV)를 제외한 나머지 종류의 바이러스에 대한 백신은 개발 되어있지않다. 소나 말에 수포성 구내염을 일으키는 VSV는 외피를 가진 negative single-stranded RNA virus인 rhabdoviridae에 속하며 rabies virus (광견병유발)도 이에 포함된다.

Table 1. Human viruses of the family Hepresviridae

Human herpes	Common name	Abbreviation	Disease
type 1	Herpes simplex type 1	HSV-1	herpes labialis, encephalitis, keratitis,eczema herpeticum
type 2	Herpes simplex type 2	HSV-2	genital and anal lesion, neonatal herpes
type 3	Varicella-zoster	VZV	chickenpox, shingles
type 4	Epstein-Barr	EBV	mononucleosis, Burkitt's lymphoma, nasopharygeal crcinoma, lymphotro-liferative disease in immuno-suppressed patients
type 5	Cytomegalovirus	CMV	major causes of morbidity and mortality amongimmuno-compromized patients (encephalitis, retinits pneumonitis, CNS disease)
type 6	Human herpesvirus type 6	HHV-6	exsanthem subitum, roseola infantum,
type 7	Human herpesvirus type 7	HHV-7	not well known

해양 생물로 부터의 항바이러스물질 발견은 최근에서야 가능해진 대량 약효검 색법으로 인하여 국제경쟁력도 있다 할 수 있고 우리나라 보유자원의 생리활성물질 보유정도에 대한 정보축적이란 점에서 의의가 크다 할 수 있겠다. 따라서 본 보고서에서는 herpesvirus 치료제개발을 목적으로 한국해양연구소에서 분리된 해양생물 추출물질들에 대하여 HHV의 7가지 중 4가지 바이러스, 즉, HSV-1, HSV-2, CMV 와 VZV에 대한 증식저해작용을 조사하였으며 추가로 PV-1, CoxB3, VSV등의 RNA virus들에 대한 약효검색을 수행하였음을 보고하려한다.

제 2 장 연구추진방법

제 1 절 연구내용

한국해양연구소에서 해양생물들로 부터 분리된 물질들을 일차로 Vero 세포체계에서 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법을 이용하여 함께 조사하였고, 이차로 CPE저해법을 이용하여 cytomegalovirus와 plaque 감소법을 이용하여 varicella virus에 대한 약효검색을 수행하였다. 또한 HeLa 세포체계에서 일부시료에 대한 RNA virus 인 poliovirus, coxsackie B virus 와 vesicular stomatitis virus에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행하였다.

제 2 절 실험재료

1. 세포

세포는 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 구입한 Vero세포 (African green monkey kidney cell) (ATCC CCL 81)와 HEL 299세포 (human embryonic lung fibroblast cell) (ATCC CCL 137)과 HeLa세포(human cervix epitheloid carcinoma cell) 를 사용하였다.

2. 바이러스

시험에 사용된 human herpesvirus 들은 다음과 같다.

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain F (ATCC VR-733)

Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain MS (ATCC VR-734)

Cytomegalovirus (CMV) strain AD-169 (ATCC VR-538)

Cytomegalovirus (CMV) strain Davis (ATCC VR-807)

Varicellavirus(VZV) strain Oka

시험에 사용된 RNA virus 중 enterovirus들은 다음과 같다.

Poliovirus type 1 (PV-1) strain Brunhilde

Coxsackie B virus type 3 (CoxB-3) strain Nancy

Rhabdovirus에 속하는 vesicular stomatitis virus도 시험에 이용되었다.

3. 시험물질 및 표준약물

시험물질로는 한국해양연구소 (KORDI)에서 의뢰된 해양생물로 부터 분리된 물질들이었다. 표준약물로서 이용된 화합물들의 이름과 약칭과 제조회사 및 대상바 이러스를 Table 2에 표시하였다. 그중 ACV와 AZT는 삼천리제약으로 부터 GCV는 연세대학교 의과대학 김준명교수로부터 기증받았으며 나머지는 구매하였다. PAA와 PFA와 GCV는 증류수에 나머지는 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 20 mg/ml로 녹여 사용하였다.

제 3 절 실험방법

1. 세포배양

Vero세포와 HeLa세포를 지름 10 cm petri dish에 4 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin (Gm)(Sigma)과 5%의 열처리된 fetal bovine serum (FBS) (Gibco)이 첨가된

Dulbecco's modified Eagle (DME) (Gibco)배지(DME/5% FBS)에서 세포단층이 형성될 때까지 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 증식시켰다. HEL 299은 4 µg/ml Gm과 10% FBS와 불필수 아미노산이 포함된 DME 배지에서 증식되었다. Vero와 HeLa 세포는 3 -4 일, HEL 299세포는 일주일 간격으로 trypsin처리를 하여 계대하였고, HEL 299세포의 경우 계대회수가 20번이 지나면 폐기하였다.

2. 바이러스의 증식

HSV-1과 HSV-2는 Vero세포에서, CMV와 VZV는 HEL 299세포에서, RNA virus들은 HeLa세포에서 증식되었다. 즉, T75-flask (배양면적 75 cm²)에 숙주세포단층이 형성되면 배양액을 제거하였다. 바이러스를 DME/2% FBS 에 희석하여 1.5 ml 바이러스 희석액에 세포 한개마다 0.1 M.O.I (multiplicity of infection)이 되도록 접종하였다. 37°C, CO₂ 배양기에서 1 시간 동안 (CMV나 VZV의 경우 2 시간) 흡착시킨 후 배양액을 제거함으로써 세포에 흡착되지 못한 바이러스들을 제거하였다. DME/2% FBS 를 6 ml 첨가한 후 70%의 세포가 CPE (cytopathic effect)를 나타낼 때까지 계속 배양하였다. 세포와 배양액을 회수하여 시험관에 넣었다. -70°C에서 얼리고 37°C에서 녹이는 작업을 세번 시행한 후 4°C, 5000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상등액을 소량 씩 용기에 분주한 후 -70°C에 바이러스 종균액으로서 보관하였고, 실험직전에 바이러스를 37°C에서 신속히 녹여 사용하였다. VZV의 경우 세포를 trypsin처리하여 회수한 후 DMSO농도가 10%가 되도록 한 후 -70°C나 액체질소에 종균액으로 보관하였다. 실험직전 세포를 37°C에서 신속히 녹인 후 원심분리시켜서 DMSO를 제거하고 배양액에 세포를 희석시켜 사용하였다.

Table 2. List of standard compounds

Abbr.	Compound	Manufacturer	Test virus
ACV	acyclovir 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine	Samchunli	HSV-1, HSV-2 VZV
ARa-C	cytosine- β -D-arabinofuranoside	sigma	HSV-1, HSV-2
BVdUrd	(E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine	Sigma	VZV
GCV	ganciclovir or DHPG 9-(1,3-dihydroxy-2-proxymethyl)guanine	Synthex	CMV
PFA	phosphonoformic acid, trisodium salt foscarnet	Sigma	CMV
Rib	Ribavirin	ICN	PV-1, CoxB3, VSV

3. 바이러스 역가측정

바이러스종균액의 역가를 알기위하여 1:10으로 연속희석한 후 96-well plate에 confluent하게 배양된 세포단층에 well당 100 μ l씩 접종하였다. CMV와 VZV의 경우 2 시간동안 나머지 바이러스의 경우는 1 시간동안 흡착 시킨 후 100 μ l의 배양액을 첨가하였다. HSV-1과 HSV-2의 경우 3일간, CMV의 경우 7 일간, VZV의 경우 5 일간, RNA virus의 경우 2일 간 CO₂ 배양기에서 배양한 후 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법 (실험방법 11 항 참조)을 이용하여 역가를 측정하였다.

4. 항herpes simplex virus 약효검색

약효검색은 virus-induced cytopathic effect (CPE) 저해법을 이용하였다. 즉, 96-well plate에 Vero세포를 증식시킨 다음 DME/2% FBS 배양액으로 희석된 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID₅₀ (50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100 μ l씩 접종하고 1시간동안 37 °C에서 흡착시킨 후 배양액을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물을 duplicate로 각 well에 100 μ l씩 첨가하고 37°C CO₂ 배양기에서 3일 배양한 다음 MTT검색법 (실험방법, 11항 참조)으로 50%의 세포를 살아남도록 한 약물의 농도를 EC₅₀ (50% effective concentraion)로 결정하였다. 약효평가 결과의 약물의 독성에 의한 영향을 알 수 있도록 바이러스 접종시 바이러스가 첨가되지 않은 배양액을 세포에 더해진 다음 (mock-infected) 바이러스로 접종된 세포와 같은 방법으로 처리되었다. 즉, 한시간 배양 후 배지가 제거되었고 배양액에 희석된 약물이 duplicate로 첨가되었다. 3일 배양 후 MTT검색법으로 약물이 첨가된 각 well의 살아남은 세포수를 약물이 첨가되지 않은 세포 control well과 비교하여 50%의 세포를 죽도록 한 약물의 농도를 CC₅₀ (50% cytotoxic concentraion)로 결정

하였다.

5. 항cytomegalovirus 약효검색

약물의 항 CMV 약효는 HSV와 같이 CPE 저해법으로 평가하였다. 성장이 멈춘 HEL 299세포에 희석된 바이러스를 96-well plate의 well당 2~4 CCID₅₀가 되도록 100 μ l씩 접종시키고 두시간동안 37 °C CO₂ 배양기에서 흡착시켰다. 바이러스액을 제거하고 HSV에서와 같이 약물을 100 μ l씩 duplicate로 첨가한 후 일주일동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 세포를 고정시키고 Giemsa 염색액으로 세포를 염색한 후 현미경으로 관찰하여 50%의 세포가 바이러스에 의한 CPE를 나타내지 않도록 한 약물의 농도를 EC₅₀로 산출하였다.

6. 항varicellavirus 약효검색

약물의 약효를 plaque 감소법 (plaque reduction assay)으로 평가하였다. 증식이 멈춘 HEL 299 세포에 96-well plate의 well당 10~20 PFU (plaque forming unit)의 바이러스를 100 μ l씩 접종하였다. 두시간동안 세포에 바이러스를 흡착시킨 다음 약물을 100 μ l씩을 첨가하였고 5일간 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. Giemsa 염색법으로 세포를 염색한 후 현미경을 이용하여 plaque수를 세었다. 약물이 첨가되지 않은 well의 plaque수를 100%로 기준하여 약물이 첨가된 well의 plaque수를 %로 환산하고, plaque수가 50% 감소되도록 한 약물의 농도를 EC₅₀로 결정하였다.

7. 항poliovirus 약효검색

접종량이 100 CCID₅₀로 희석된 바이러스를 96-well plate의 HeLa세포에 앞에 기술한 항HSV-1과 HSV-2약효검색법과 같이 시행하였는데, 2 일간 배양한 다음 약효를 판정하였다.

8. 항coxsackie B virus 약효검색

앞에 기술된 항poliovirus 약효검색방법과 같이 시험하였다.

9. 항vesicular stomatitis virus 약효검색

앞에 기술된 항poliovirus 약효검색방법과 같이 시험하였다.

10. 세포독성검사

약물이 세포에 끼치는 독성을 세포성장에 주는 영향조사 (cell growth test)와 성장이 멈춘 세포를 죽이는 독성조사 (cell viability test)의 두가지 측면에서 조사할 수 있다. 실험방법 4항에 기술한 바와 같은 mock-infected 실험은 후자에 대한 조사였다.

11. MTT검색법

이 검색법은 살아남은 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 노란색을 띤 MTT를 보라색을 지닌 formazan으로 환원시키고, 이 생성물을 유기용매로 녹여 흡광도를 측정하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 상대적으로 비교하는 것이다.⁽⁹⁾ 배양이 끝난 Vero세포의 배양액을 제거하고 DME/2% FBS에 3 mg/ml로 희석된

MTT (Sigma)액을 96-well plate의 well당 50 ul씩 넣어준 후 37 °C CO₂ 배양기에 서 두시간 동안 배양하였다. 산성화된 isopropanol/6% triton X-100액을 100 ul 씩 각 well에 넣어준 후 교반기를 이용하여서 formazan결정들이 완전히 녹도록 하였 다. Microplate reader (Vmax,Molecular Devices)를 이용하여 540 nm와 690 nm에 서의 흡광도를 읽었다. A₅₄₀과 A₆₉₀의 흡광편차에서 blank값을 뺀 다음 cell control 과 virus control과 비교하였다.

즉, 항바이러스효과는

$$\frac{(A_T)_{HSV} - (A_C)_{HSV}}{(A_C)_{mock} - (A_C)_{HSV}} \times 100 (\%) \text{로서}$$

세포독성은

$$\frac{1 - (A_T)_{mock}}{(A_C)_{mock}} \times 100 (\%) \text{로서}$$

(A_T)_{HSV}: 바이러스와 약물이 첨가된 well의 흡광도

(A_C)_{HSV}: 바이러스만 첨가된 well의 흡광도 (virus control)

(A_C)_{mock}: 배양액만이 약물이 첨가된 well의 흡광도 (cell control)

(A_T)_{mock}: 약물이 첨가된 well의 흡광도

항HSV값으로 부터 EC₅₀와 세포독성 값으로 부터 CC₅₀를 구한 후 selectivity index (SI) (CC₅₀/ EC₅₀) 를 구하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

한국해양연구소에서 해양생물로 부터 분리되어 의뢰된 17개의 시료에 대한 항바이러스약효를 평가하였다. 일차로 Vero세포체계에서 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE저해법을 이용하여 함께 조사하였고, 이차로 CPE저해법을 이용하여 cytomegalovirus와 plaque 감소법을 이용하여 varicella virus에 대한 약효검색을 수행하였다. 또한 HeLa 세포체계에서 일부시료에 대한 RNA virus 인 poliovirus, coxsackie B virus 와 vesicular stomatitis virus에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행하였다. 보내진 시료수와 시험된 약효검색 항목을 표 3에 표시하였고, 각 시료의 항바이러스 효과를 표 4에 요약하였다.

제 1 절 항herpesvirus 약효검색

1. 항herpes simplex virus 약효검색

시험이 의뢰된 모든 시료에 대하여 일차로 HSV-1 strain F와 HSV-2 strain MS와 세포독성으로서 cytotoxic effect를 조사하였다. 실험방법에 기술한 바와 같이 접종량 100 CCID₅₀인 바이러스로 96-well에 배양된 Vero 세포를 감염시키고 1시간 흡착시킨 다음 시험약물을 duplicate로 첨가하였다. 매 실험마다 ACV와 Ara-C를 표준약물로서 이용하였다. 3일 배양 후 CPE 저해법으로 약물이 첨가되지 않은 virus control과 약물이 첨가된 well의 세포수를 상대적으로 비교하여 항바이러스약효를 EC₅₀값으로서 표시하였다. 또한 약물의 항바이러스약효가 약물이 지니는 독성에 의해 받는 영향을 조사하기 위하여 바이러스없이 약물만 duplicate로 첨가하여

세포독성을 함께 조사하였다. 모든 실험 과정은 항바이러스 약효와 동시에 같은 방법으로 수행되었고 약물이 첨가되지 않은 well을 cell control로 하였다. 약물이 첨가된 well에 살아남은 세포수가 1 CCID₅₀가 되는 약물의 농도를 cell control과 비교하여 조사하였다. CC₅₀값과 EC₅₀값을 비교하여 SI값을 구하였다 (CC₅₀/EC₅₀). SI가 1은 50 % 독성을 나타내는 농도와 50% 바이러스저해농도와 같음을 뜻하며, 10인 경우는 독성치의 1/10 농도에서 항바이러스 약효를 나타냄을 뜻한다. 따라서 SI값이 높을수록 독성은 적고 약효가 큼을 뜻하고 개발가치가 높음을 뜻한다.

해양생물로 부터 분리되어 의뢰된 모두 17개의 시료에 대한 약효를 평가하였는데, 뚜렷한 약효를 나타낸 물질은 없었다(표 4). 한 시료에 대한 시험결과를 그림 1에 나타냈다.

2. 항cytomegalovirus 약효검색

실험방법에서 기술한 바와 같이 CMV 질병치료제로 공인된 GCV (Cytovene)와 phosphonate유도체인 PFA disodium salt (Foscarnet, Foscavir)를 표준약물로 사용하였다. 바이러스에 감염된 HEL 299세포에 일주일간 약물을 처리한 후 약물들의 CMV증식 억제효과를 CPE 저해법으로 평가하여 EC₅₀값으로서 표시하였다. 시험균주는 Davis와 AD-169을 사용하였고 HEL세포에 대한 약물의 독성은 따로 검색하지 않았다. 총 17 개의 시료를 검색하였는데, 독성이 적으면서도 뚜렷한 약효를 나타낸 물질은 없었다 (표 4). 한 시료에 대한 시험결과를 그림 2에 나타냈다.

Table 3. Numbers of the compounds tested

Family	Virus	Strain	Number
Herpesviridae	Herpes simplex virus type 1	F	17
	Herpes simplex virus type 2	MS	17
	Cytomegalovirus	Davis AD-169	17 17
	Varicellar-zoster virus	Oka	15
Picornaviridae	Poliovirus type 1	Brunhide	17
	Coxsackie B virus type 3	Nancy	17
Rhabdoviridae	Vesicular stomatitis virus	Indiana Lab	17

Table 4. Summary of antiviral activity of the tested and the standard compounds

Compound	CC50 (ug/ml)	IC50 (ug/m					CC50 (ug/ml)	EC50 (ug/l		
		HSV-1	HSV-2	VZV	HCM			PV-1	CoxB3	VSV
	Vero cell	F	MS	Oka	Davis	AD-169	HeLa cell	Brunhilde	Nancy	Indiana
1	4.6	3.2	>4.6		NC *	NC	6.7	>6.7	>6.7	>6.7
2	5.5	>5.5	>5.5		<3.7	<3.7	6.5	>6.5	>6.5	>6.5
3	5.1	>5.1	>5.1	NC			1.5	>1.5	>1.5	>1.5
4	<1.2	NC	NC	NC			<0.06	NC	NC	NC
5	7.2	>7.2	>7.2	1.7			7.9	>7.9	>7.9	>7.9
6	16.6	>16.6	>16.6	28.4			57.6	>57.6	>57.6	>57.6
7	56.6	>56.6	>56.6	11			53.2	>53.2	>53.2	>53.2
8	>100	>100	>100	>100			>100	>100	>100	>100
9	<1.2	NC	NC	>3.7			7.8	>7.8	>7.8	>7.8
10	1.9	>1.9	>1.9	>1.2			5.3	>5.3	>5.3	>5.3
11	38.5	>38.5	>38.5	15.5			33.5	>33.5	>33.5	>33.5
12	>100	>100	>100	>100			7.8	>7.8	>7.8	>7.8
13	>100	>100	>100	>100						
14	19.1	>19.1	>19.1	>1.2						
15	23.2	>23.2	>23.2	>3.7						
16	46.9	>46.9	>46.9	>3.7						
17	30	>30	>30	>3.7						
Acyclovir	>100	0.3*	4.2	0.3						
Ara-C	4.2	0.2	3.2							
BVdUrd	>100			0.001						
Ganciclovir	>100				1.1	0.6				
Foscarnet	>100				54.4	52.2				
Ribavirin	>100						>100	65	>100	20

* NC: showed strong cytotoxicity at the lowest concentration

3. 항varicella virus 약효검색

시험약물들의 약효를 검색하기 위하여 바이러스에 감염된 HEL 299세포에 약물을 처리하고 5일 후 plaque 감소법으로 EC₅₀값을 산출하였으며 (실험방법참조), HEL세포독성은 검색하지 않았다. 모두 15개의 화합물의 약효를 조사하였으며, 표준약물로는 ACV와 BVdUrd를 사용하였다. 독성이 적으면서도 뚜렷한 약효를 지닌 화합물은 발견되지 않았다 (표 4). 표준약물에 대한 시험결과를 표 5에 나타냈다.

제 2 절 항RNA virus

1. 항enterovirus 약효검색

실험방법에 기술된 바와 같이 PV-1 strain Brunhilde와 CoxB3 strain Nancy에 대한 항바이러스약효를 HeLa세포체계에서 검색하였다. 약물의 cytotoxic effect도 함께 조사되었으며 표준약물로는 ribavirin을 이용하였다. 모두 17개 시료에 대한 약효검색이 수행되었으며 뚜렷한 효과를 나타내는 화합물은 발견되지 않았다(표4). 시험결과 양식을 그림 4에 표시하였다.

2. 항vesicular stomatitis virus

항enterovirus 약효검색법과 같은 방법으로 HeLa세포체계에서 동시에 수행되었다. 표준약물은 ribavirin이었으며 모두 17개 시료에 대한 약효검색이 수행되었으며 뚜렷한 효과를 나타내는 화합물은 발견되지 않았다(표4). 시험결과 양식을 그림 4 표시하였다.

KRICT Pharmaceutical Screening Center

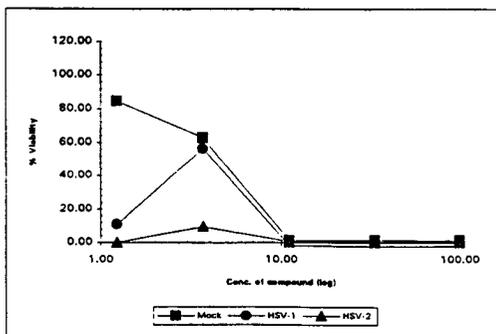
Exp.No	94H44	Antiviral Evaluation Report	Date	11-Oct-94
Code	92A-15-1		Source	KORDI-신종현

Virus information			Host cell information		Assay information	
Virus Strain	HSV-1 F	HSV-2 MS	Cell Passage	Vero (CCL81) 20	Assay Day	CPE / MTT 3d
Batch No	A1	A5	Remark		Plate No	94H4L
Inoc. size	100	CCID50			실험자	윤소현, 김해수
Dilution	500.00	75.00			책임자	이종교

Mock infected cells							
$\mu\text{g}/\text{mL}$	OD values		Mean	Std	CC OD	% Viability	Remark
100.00	0.02	0.02	0.02	0.00		1.36	Max. via 84.49
33.33	0.02	0.02	0.02	0.00		1.49	Min. via 1.23
11.11	0.01	0.02	0.01	0.00	1.14	1.23	Max. std 0.09
3.70	0.65	0.78	0.71	0.09		62.59	Min. std 0.00
1.23	1.01	0.92	0.96	0.06		84.49	

HSV-1 infected cells							
$\mu\text{g}/\text{mL}$	OD values		Mean	Std	VC OD	% Viability	Remark
100.00	0.02	0.02	0.02	0.00		-2.27	Max. via 56.63
33.33	0.02	0.02	0.02	0.00		-2.04	Min. via -2.27
11.11	0.02	0.02	0.02	0.00	0.04	-1.91	Max. std 0.02
3.70	0.66	0.67	0.66	0.01		56.63	Min. std 0.00
1.23	0.15	0.18	0.16	0.02		11.13	

HSV-2 infected cells							
$\mu\text{g}/\text{mL}$	OD values		Mean	Std	VC OD	% Viability	Remark
100.00	0.02	0.02	0.02	0.00		0.40	Max. via 9.56
33.33	0.02	0.02	0.02	0.00		0.62	Min. via 0.09
11.11	0.02	0.02	0.02	0.00	0.01	0.53	Max. std 0.03
3.70	0.10	0.14	0.12	0.03		9.56	Min. std 0.00
1.23	0.01	0.01	0.01	0.00		0.09	



Result

Antiviral activity			
Virus	Strain	EC50	SI
HSV-1	F	3.16	1.47
HSV-2	MS	>4.64	<1
Cytotoxicity activity			
CC50	4.64		
Remarks			
Suggestions			

Fig. 1. Anti-herpes simplex virus activity report

KRICT

Pharmaceutical Screening Center

Anticytomegalovirus Evaluation Report

Rep. Date	7-Nov-94	Rep. to	KORDI-신종현
Exp. No	94CV19	Exp. Date	26-Oct-94
Virus	Human cytomegalovirus	Host Cell	HEL299
Strain	AD-169 Davis	Inoculum size	CCID50/well
Incubation	7일 7일	Assay	CPE inhibition/Giemsa stain

Sample Code	Conc. $\mu\text{g/ml}$	Observed	AD-169				Cytotoxicity		Davis				IS
			Net CPE %		% Via.		Observed		Net CPE %		% Via.		
92A15-1	100.00	+++ +++	CT	CT	#####	#####	+++	+++	CT	CT	#####	#####	AD :0.6
	33.33	+++ +++	CT	CT	#####	#####	+++	+++	CT	CT	#####	#####	Davis :0.6
	11.11	+++ +++	CT	CT	#####	#####	+++	+++	CT	CT	#####	#####	
	3.70	++ ++	CT	CT	#####	#####	++	++	CT	CT	#####	#####	
EC50			CT						CT				
92A15-9	100.00	+++ +++	CT	CT	#####	#####	+++	+++	CT	CT	#####	#####	AD :0.6
	33.33	+++ +++	CT	CT	#####	#####	+++	+++	CT	CT	#####	#####	Davis :0.6
	11.11	+++ +++	CT	CT	#####	#####	+++	+++	CT	CT	#####	#####	
	3.70	++ ++	10	10	66.67	66.67	++	++	10	10	66.67	66.67	
EC50			<3.7						<3.7				
PFA	300.00		5	5	83.33	83.33			5	5	83.33	83.33	AD :0.6
	100.00		5	5	83.33	83.33			15	15	50.00	50.00	Davis :0.6
	33.33		30	30	0.00	0.00			30	30	0.00	0.00	
	11.11		30	30	0.00	0.00			30	30	0.00	0.00	
EC50			64						100				
GCV	10.00		10	10	66.67	66.67			10	10	66.67	66.67	AD :0.6
	3.33		20	20	33.33	33.33			20	20	33.33	33.33	Davis :0.6
	1.11		30	30	0.00	0.00			30	30	0.00	0.00	
	0.37		30	30	0.00	0.00			30	30	0.00	0.00	
EC50			5.8						5.8				

Remark

두약물 모두 강한 독성을 보이므로 농도를 낮추어 재실험할 예정임.

Fig. 2. Anti-cytomegalovirus activity report

Table 4. Anti-varicella virus activity of standard compounds

Concet. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Acyclovir		BVdUrd	
	Plaque No.	% Protection	Plaque No.	% Protection
1.2	2/4	76	NT	NT
0.4	8/10	30	NT	NT
0.13	5/12	34	0/0	100
0.05	11/13	7	0/0	100
0.02	NT	NT	0/0	100
0.006	NT	NT	0/0	100
0.002	NT	NT	0/0	100
0.0006	NT	NT	0/2	92
0.0002	NT	NT	6/7	50
0	12/14	0	12/14	0
EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.64		0.0002	

BVdUrd: (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine

NT: not tested

KRICT

Pharmaceutical Screening Center

Anti-Polio Evaluation Report

Exp. No	99PC09
Code	92A-15-1

Date	9-Nov-94
Source	KORDI

Virus information				Host cell information		Assay information	
Virus	PV-1	Coxs.B3	VSV	Cell line	HeLa	Assay	CPE/MTT
Strain	BH	Nancy		Passage	?	Day	2d
Batch No	C2	C5	G2	Remark		Plate No.	94PC09A
Inoc. size		100				실험자	윤소현, 김해수
Dilution	17333	52	34211			책임자	이종교

Mock infected cells

Conc.	OD value		Mean	Std	Control	% Viability	Remark
100.00	0.019	0.021	0.020	0.001		1.36	
33.33	0.019	0.022	0.021	0.002		1.39	
11.11	0.193	0.12	0.157	0.052	1.47	10.63	
3.70	1.416	1.425	1.421	0.006		96.47	
1.23	NT	NT	#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!	

PV-1 infected cells

Conc.	OD value		Mean	Std	Control	% Viability	Remark
100.00	0.021	0.018	0.020	0.002		-0.73	
33.33	0.02	0.016	0.018	0.003		-0.83	
11.11	0.036	0.066	0.051	0.021	0.03	1.46	
3.70	0.024	0.031	0.028	0.005		-0.17	
1.23	NT	NT	#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!	

Cox B3 infected cells

Conc.	OD value		Mean	Std	Control	% Viability	Remark
100.00	0.018	0.019	0.019	0.001		-0.45	
33.33	0.018	0.018	0.018	0.000		-0.48	
11.11	0.024	0.021	0.023	0.002	0.03	-0.17	
3.70	0.046	0.048	0.047	0.001		1.52	
1.23	NT	NT	#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!	

VSV infected cells

Conc.	OD value		Mean	Std	Control	% Viability	Remark
100.00	0.019	0.024	0.022	0.004		-0.31	
33.33	0.018	0.019	0.019	0.001		-0.52	
11.11	0.037	0.17	0.104	0.094	0.03	5.36	
3.70	0.022	0.023	0.023	0.001		-0.24	
1.23	NT	NT	#DIV/0!	#DIV/0!		#DIV/0!	

Result

Cytotoxicity activity	CC50	Antiviral activity	EC50	EC90
Cytocidal effect	6.71	PV-1	>6.71	>6.71
		Cox B3	>6.71	>6.71
		VSV	>6.71	>6.71

Fig. 3. Anti-poliovirus, coxsackie B virus and vesicular stomatitis virus activity report

제 4 장 결 론

한국해양연구소에서 해양생물로 부터 분리되어 의뢰된 17개의 시료에 대한 항 바이러스약효를 평가하였다. 모든 시료에 대하여 일차로 Vero세포체계에서 HSV-1 과 HSV-2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 CPE 저해법을 이용하여 함께 조사하였다. 이차로 CPE저해법을 이용하여 CMV와 plaque 감소법을 이용하여 VZV에 대한 약효검색을 수행하였다. 또한 일부시료에 대한 HeLa 세포체계에서 RNA virus 인 PV-1, CoxB3와 VSV에 대한 약효검색도 CPE저해법을 이용하여 수행되었다. 덕성여대에서 합성된 Ara-C유도체가 HSV-1, HSV-2, CMV, VZV에 대하여 Ara-c와 비슷하거나 더 좋은 약효를 나타냈으며 KIST의 일부 천연물시료에 항HSV-1과 항 HSV-2효과가 관찰되어 순수분리가 시도되는 중이다. 다른 바이러스에 대하여 뚜렷한 약효를 나타내는 것은 아직 발견되지 않았다. 신약을 개발하기 위하여 앞으로도 많은 시료에 대한 지속적인 약효검색이 요구된다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Prusoff WH, Lin T-S, Zucker M: Potential targets for antiviral chemotherapy. *Antiviral Res* 6:311-328, 1986.
2. Lee, Chong K: Present trends in the development of antiviral agents. *Pharma News* 2(1): 2-21, 1992.
3. De Clercq E: New acquisitions in the chemotherapy of viral infections. *Verhandelingen Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie* 52:69-99, 1990.
4. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM, June CH: Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:748-752, 1990.
5. Wyatt LS, Rodriguez WJ, Balachandran N, Frenkel N: Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol* 65:6260-6265, 1991.
6. Mills J, Masur H: AIDS-related infections. *Scient American*:32-39, August, 1990.
7. Nelson JA, Ghazal P, Wiley CA: Role of opportunistic viral infections in

AIDS. AIDS 4:1-10, 1990.

8. Lusso P, De Maria A, Malnati M, Lori F, DeRocco SE, Baseler M, Gallo RC : Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. Nature 349:533-535, 1991.

9. Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J, De Clercq E: Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti HIV compounds. J Virol Methods 20:309-321, 1988.