

제 1 차 년 도
년 차 보 고 서

BSPN 00219-620-3

생리활성물질 탐색기술개발

Development of Screening System and Discovery of
Bioactive Substances

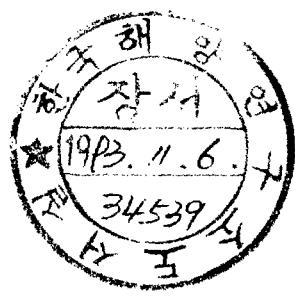
해양미생물을 이용한 생리활성선도물질 탐색기술개발

Development of Screening System for Bioactive Substances
from Marine Microorganisms

1993. 8

연 구 기 관
한 국 해 양 연 구 소

과 학 기 술 처



제출문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “해양미생물을 이용한 생리활성선도물질 탐색기술개발”
과제의 보고서로 제출합니다.

1993년 8월

연구기관 : 한국해양연구소

연구책임자 : 이홍금

연구원 :	김상진	신종현	조기웅
	정지형	서영완	권개경
	정상운	배명애	정주희
	노정래	백은주	공재열
	류병호	공인수	이종교
	홍승경	김해수	

요약

I. 제목

해양미생물을 이용한 생리활성선도물질 탐색기술개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양미생물을 분리하여 항바이러스 및 항암물질을 탐색하고 분리하여 신규 생리활성물질의 개발을 목표로한다.

연간 1천5백억불이상에 달하는 시장을 갖고 있는 세계의약품산업은 지금까지 항생제개발에 눈부신 발전을 보여 세균감염에 의한 질병퇴치에 큰 기여를 하였으나 각종 암질환이나 AIDS등 새로운 질병에 대한 치료제 개발은 시급한 상태이다. 최근 G-7선진국가의 신물질 창출 동향은 육상 환경에서 해양환경으로 범위가 확대 되면서 현재까지 해양생물에서 약 3000여종의 신물질이 발견되었다. 이 중 약 70여 물질에서 항암, 항바이러스효과가 발견되었으며 5종이 상품으로 개발중이다. 지구상에 존재하는 생물 중 80 % 이상이 해양에 서식하고 있는 데 선진국의 해양미생물의 산업적 이용에 관한 연구가 초기 단계이므로 연구가 진행된 생물 종은 전체의 1 % 미만이다. 그동안 선진국에서 해양 동.식물의 생리활성물질 연구결과 상당수가 공생하는 해양미생물에 의해 생산된다고 밝혀짐에 따라 새로운 의약품의 자원으로서 해양미생물의 중요성은 더욱 커지고 있다. 따라서 선진외국에 의해 자원이용이 침식 당하기 전 해양생물 자원을 이용한 신물질 개발은 21세기 인류의 번영을 약속할 수 있는 과제로 꼭 수행되어야 한다.

III. 연구개발 목표 및 내용

1. 해양세균으로는 해수, 해양저질층, 해양동물시료, 남극시료 등에서 분리한 세균과 해양방선균, 극지방선균을 포함한 방선균을 확보하여 -80 °C에 보존한다.
2. 해양미생물의 유기조출물에 대한 여러 생리활성 검색방법을 확립하며 검색작업을 통하여 생리활성을 나타내는 미생물을 선별한다.
3. 생리활성을 나타낸 균주의 균체 및 배양액에서 생리활성물질을 분리 정제하고 구조분석을 위한 제반기기의 설치를 완료하며 대표적인 물질에 관한 자료를 정밀히 분석하여 데이터 베이스를 확립한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 균주 분리, 보전, 배양 및 시료조제

해양세균으로는 한국해양연구소에서 한국 근연안 해역의 해수, 해양저질층, 해양동물시료, 남극시료 등에서 분리한 세균 3,000주와 해양방선균, 극지방선균을 포함한 방선균 5,000주를 확보하여 glycerol 20% 용액에 넣어 영하 80 °C에 보존하여 생리활성물질 검색에 이용하였다. 해양세균 1,000여 주를 PYG배지 4 ml에 각각 20 °C에서 5-6 일 정체배양시키고 Folch용액으로 추출하여 Folch solution layer와 water phase 시료를 각각 분리 조제하였다. 해양방선균 1,000여주를 숙성된 해수가 첨가된 변형 ZoBell1배지에서 25 °C에서 6-7 일 진탕배양 시킨 후 원심분리하여 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 ethylacetate 층과 waterphase 층으로 분리하여 보관하였다.

2. 생리활성 검색방법 확립

Reverse transcriptase(RTase) 저해제 탐색방법은 Nakamura에 의한 방법 (이정준외, 1992)을 변형하여 96well plate를 이용하여 다양한 시료를 검색 할 수 있는 방법을 개발하였다. 항종양물질 탐색을 위하여 한국 세포주 은행에서 분양받은 Human adenocarcinoma 인 DLD-1, Mouse Lymphoid neoplasm 인 P388D를 사용하고 세포 독성능은 MTT(methyl tetrazolium bromide) 측정법을 변형하여 측정하였다. 세포독성을 나타낸 시료에 대해서는 Topoisomerase I relaxation 활성 측정을 실시함으로써 1차적으로 Topo I 저해가 일어 났는지의 여부를 조사 하였다. Human simplex virus의 저해활성검색은 숙주세포로 Vero 세포를 사용하여 HSV type 1과 2에 대한 항바이러스 효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 함께 조사하였다. 분리 된 sulfated polysaccharide의 생리활성 검색은 Sarcoma-180 세포를 이용하였다.

3. 생체활성물질 정제 및 구조분석

항암 및 항바이러스효과등의 생리활성도를 측정한 후 1차 연구대상으로 세포독성과 Topo I 저해능을 나타낸 방선균 균주 1318를 선정하여 이의 균체 및 배양액에서 생리활성물질의 이화학적 물리적 특성을 조사하고자 분리 정제 중이다. 항종양효과를 나타내는 광합유 다당류를 생산하는 균주 1주를 선정하여 다당류의 분리 정제작업을 하고있다. 또한 Semi-preparative 와 preparative용 HPLC 및 500 MHz superconducting FT-NMR system 등 신규생체활성물질의 정제 및 구조분석을 위한 제반 기기의 설치를 완료하였다.

4. 자료검색을 위한 Database 구축

신물질의 개발을 위해서는 기존 천연물에 대한 data search가 필수적이며

이는 많은 경우 신물질 구조결정에 있어서 결정적인 중요하다. 해양생물유래 생리활성물질에 관해 수집된 연구자료는 생물의 종류, 물질의 구조상의 특징 및 생리활성도에 따라 분류되었고 대표적인 물질에 관해서는 분리방법, 구조적 특징, 생리활성도, 전합성 및 생합성, 산업적 이용 방안 등이 분석되었다. 향후에 분리될 생리활성물질물에 대한 신물질 여부의 결정과 신물질인 경우 기존물질과의 구조적 유사성을 측정하기 위하여 chemical abstracts에 직접 접근이 가능한 STN express software를 도입, 설치 완료하였다.

결론적으로 본 연구를 통하여 본격적인 신규 생리활성물질 개발을 위한 생리활성도 측정방법의 도입, 실험기기의 설치, 기존자료에 대한 정리, 분석 및 Database구축 등 거의 모든 hard 및 soft wares의 준비가 완료되었으며 현재 탐색작업을 수행하고 있다.

Summary

I. Title

Development of screening System for Bioactive Substances from Marine Microorganisms

II. Objectives and significance

This study is initiated in the hope of finding many new antiviral and anticancer compounds from marine microorganisms.

Recently inciding of cancer like AIDS and viral diseases has been incresing. However non-toxic drugs for treating the above diseases are still not available. During last decades many leading countries have put great efforts and have found numerous biologically active and structually unique compounds from marine resouces. Despite its relatively short history, structures of over 3,000 novel secondary metabolites have been determined, and ca 70 compounds from these natural products showed anticancer and/or antiviral activity. Some lead compounds are expected to appear in the market in near future. Base upon the analysis of current activities in foreign countries and upon the expectation of future trends, research for development of novel compounds from marine organisms should be started immedately by domestic scientists.

III. Contents and Scope

The first year of the project was performed with the scope and area of the study as below.

1. Isolation and preservation of marine microorganisms from various marine samples.
2. Isolation of compounds appearing antiviral and anticancer activity
3. Establishment of database of reported marine natural products and installation of instruments for isolation and structural analysis of biologicaly actie compounds.

IV. Results and Suggestions

1. Over 3,000 strains of maine bacteria and 2,000 strains of actinomycete including marine actinomycete and Antarctic actinomycete isolated from sea water, sea sediment, marine animals and Antarctic samples were collected and stalked with 20% glycerol solution at -80°C. Crude extracts were prepared from 1,000 strains of marine bacteria extracted with Folch solution. Ca 1,000 strains of marine actinomycete were cultivated and the mycelia were extracted with methanol and broth was separated as ethylacetate phase and waterphase.
2. Antiviral and anticancer assay systems were established. Reverse transcriptase inhibitor assay test and human simplex virus inhibitor

assay test were selected as antiviral assay system. Cytotoxicity measurement method and Topoisomerase I inhibitor assay were installed as antitumor screening system. Marine actinomycetes strain A1318 showed cytotoxic activity against colon and leukemia cell line, and inhibited Topo I. Some microorganisms producing extra polysaccharide were isolated and one strain produced sulphated polysaccharide showing antitumor activity against Sarcoma cell line.

3. Two HPLC (one analytical and one preparative) with various detector systems and 500 MHz FT-NMR with probes and softwares were installed. This would be very helpful to isolate bioactive fractions and to identify novel structures. To isolate active compounds appearing anticancer activity, fermentation broth from strain A1318 was fractionated and its antitumor activities were investigated.

4. Database of marine bioactive substances were made on the basis of biological classifications and bioactivities. Based upon frequency of isolation, structural uniqueness and bioactivity including antiviral activity, representative metabolite from marine microorganisms were selected and analyzed for isolation methods, structural characteristics, bioactivities, and biosynthesis. This would be essential for identification of new bioactive compounds.

In conclusion, the first year of the project established foundations for effective screening system including collection of marine microorganisms, antiviral and anticancer assay systems, and installation of equipments and database essential for identification of novel compounds.

목 차

요약문	1
표목차	10
그림목차	12
제 1 장 서 론	15
제 2 장 연구추진방법	21
2.1. 연구내용	21
2.1. 실험재료 및 방법	21
제 3 장 연구결과 및 고찰	38
3.1. 해양미생물의 분리, 보전, 배양 및 시료조제	38
3.2. 항종양물질 생산균주 선별	38
3.3. Topo I 저해물질 생산균주 선별	42
3.4. Reverse transcriptase 저해활성 검사	44
3.5. HSV-1과 HSV-II 저해활성 검사	44
3.6. Sulfated polysaccharide 검색	48
3.7. 항종양활성물질의 분리 정제	49
3.8. 해양생물유래 생리활성물질(문헌중심)	59
제 4 장 결론	103
제 5 장 참고문헌	105
제 6 장 위탁과제	109
6.1. 항바이러스 약효검색	109
6.2. 항바이러스성 sulfate함유 polysaccharide탐색	114

Contents

Summary	1
List of Tables	10
List of Figures	12
1. Introduction	15
2. Methods of research	21
2.1. Scope	21
2.1. Materials and Methods	21
3. Results and discussion	38
3.1. Isolation, preservation, cultivation, and extraction of marine microorganisms	38
3.2. Isolation of microorganisms appearing anticancer activity	38
3.3. Isolation of microorganisms appearing Topo I inhibitory activity	42
3.4. Reverse transcriptase inhibition assay	44
3.5. Antiviral(HSV-I and HSV-II) activity assay	44
3.6. Screening of sulfated polysaccharide	48
3.7. Isolation and purification of compound appearing anticancer activity	49
3.8. Bioactive compounds from marine organisms(review)	59
4. Conclusion	103
5. References	105
6. Assinged study	109
6.1. Antiviral activity test	109
6.2. Screening of sulfated polysaccharide appearing antiviral activity	114

표 목 차

표 3-1. 분리된 해양미생물 균주의 세포독성	41
표 3-2. 항 헤르페스 심플릭스 바이러스 약효검사	47
표 3-3. 해양 진균류의 항생활성도 및 세포독성	68
표 3-4. 카리브해역의 알파 헬릭스 탐사에 나타난 항생활성과 항바이러스 효과를 나타낸 해양생물 문집	82
표 3-5. 해양저서동물의 생리활성	83
표 3-6. 탐사결과에 나타난 생리활성능의 비교	84
표 6-1. 황합유다당류생산 미생물의 생리학적 특성	139
표 6-2. 분리다당류의 비색반응 결과	140

List of Tables

Table 3-1. Cytotoxicity of isolated marine microorganisms-----	41
Table 3-2. Anti-herpes simplex virus activity report-----	47
Table 3-3. Antimicrobial and cytotoxicity of marine fungal extract-----	68
Table 3-4. Antimicrobial and antiviral activities and cytotoxicity in Phyla assay during the <i>alpha Helix</i> Caribbean Expedition-----	82
Table 3-5. Bioactivity profile of marine benthic organisms-----	83
Table 3-6. Comparison of bioactivities observed from major expeditions-----	84
Table 6-1. Physiological and biological analysis of sulfated polysaccharide producing microorganism-----	139
Table 6-2. General color reactions of the produced exopolysaccharide-----	138

그림 목차

그림 2-1. 해양세균으로부터 조추출물 조제	23
그림 2-2. 해양방선균으로부터 조추출물 조제	24
그림 3-1. 분리방선균 A4406, A89, and A1318 의 DLD-1 and p388D1 세포에 대한 항종양활성	40
그림 3-2. 아가로즈 젤상에 나타난 Topoisomerase 저해 패턴	43
그림 3-3. 항 헤르페스 심플릭스 바이러스 약효검사	46
그림 3-4. SZ 배지에서의 해양방선균 균주 A1318의 성장	51
그림 3-4. SZ 배지에서의 A1318의 성장에 따른 OD ₅₆₀ 변화	52
그림 3-6. 해양방선균 균주 A1318로부터 유기물 추출방법	54
그림 3-7. A1318의 분획 9-3의 Proton NMR spectrum	57
그림 3-8. A1318의 분획 9-4의 Proton NMR spectrum	58
그림 6-1. 항바이러스검색용 시료의 준비	116
그림 6-2. Acyclovir 와 cytosine-B-D-arabinofuranoside(Ara-C)의 구조식	117
그림 6-3. 조다당류의 조제법	134
그림 6-4. 다당류 생산균주의 사진 (X1,000)	138
그림 6-5. 분리 다당류의 IR spectrum	142
그림 6-6. 분리다당류함유배지에서의 Sarcoma-180 세포의 성장	143
그림 6-7. 분리다당류에 의한 Sarcoma-180 세포의 성장저해	144

List of Figures

Fig. 2-1. Extraction and fractionation of marine bacteria culture	23
Fig. 2-2. Extraction and fractionation of marine Actinomycete culture	24
Fig. 3-1. Antitumor activity of isolated Actinomycetes strains : A4406, A89, and A1318 tested with DLD-1 and p388D1 cells	40
Fig. 3-2. Topoisomerase I inhibition patterns on agarose gel	43
Fig. 3-3. Anti-herpes simplex virus activity report	46
Fig. 3-4. Growth of marine Actinomycetes strain A1318 on SZ medium	51
Fig. 3-5. Growth of A1318 and change of OD ₅₆₀ on SZ medium	52
Fig. 3-6. Procedure of extraction of organic material from the culture of marine Actinomycetes strain A1318	54
Fig. 3-7. Proton NMR spectrum of Fraction 9-3 from strain A1318	57
Fig. 3-8. Proton NMR spectrum of Fraction 9-4 from strain A1318	58
Fig. 6-1. Fractionation scheme of microbial culture broth and preparation of samples for antiviral testing	116
Fig. 6-2. Structural formulae of acyclclovir and cytosine-B-D- arabinofuranoside(Ara-C)	117
Fig. 6-3. A procedure of preparation of crude exopolysaccharide	134
Fig. 6-4. Photomicrograph of isolated strain(X1,000)	138
Fig. 6-5. IR spectrum of isolated exopolysaccharide	142
Fig. 6-6. Growth curves of Sarcoma-180 cells in the culture medium containing exopolysaccharide produced by isolated microorganisms	143

Fig. 6-7. Death curves of Sarcoma-180 cells in the culture medium
containing exopolysaccharide produced by isolated
microrganisms-----144

제1장 서론

지구상에 존재하는 생물중 80% 이상이 해양에 서식하고 있으나 지금까지 생물공학의 연구동향은 주로 육상 생체계에 존재하는 생물을 대상으로 하여 왔다. 육상생물에서 의약품등의 생리활성물질을 발견하고 개발하여 산업화 한 역사는 3백년이상의 역사를 갖고 있으며 지난 수십년간 활발히 이루어져 왔다. 그 결과 새로운 활성도를 가진 물질을 개발하는것은 점점 더 어려워 졌다. 이에 선진국 등에서는 이미 탐색대상을 육상생태계가 아닌 해양이나 극한 생태계 같이 별로 연구에 대상이 되오지 않았던 새로운 환경에 눈을 들려 연구를 시작했다(김, 1992; Attaway, 1989; Boerresen, 1990). 짧은 연구기간에도 불구하고 선진국의 집중적인 투자 및 연구개발결과 1989년 까지 해양생물에서 모두 2,500 여종의 신규 생체활성물질이 발견되었으며 이 중 5개 품목이 상품화 진행 중인 데 1990년도 부터는 육상생물보다 해양생물로부터 발견되는 생체활성물질 숫자가 우위를 차지하여 가히 '바다는 미래의 의약품원료의 보고' 라고 주장할 수 있게 되었다. 세균을 비롯하여 해조류나 해양동물에서 많은 종류의 생리활성물질이 얻어지고 있으며 최근에는 현대의 흑사병이라하는 AIDS치료제의 개발가능성도 보이고 있다. 일본의 미생물화학연구소 Okami 박사는 수년전부터 많은 해양 미생물을 분리하여 신생체활성물질을 확인했다. 그는 Sagami만에서 *Streptomyces griseus* 종을 분리하여 미생물로부터 Boron을 중심원소로 갖고 있는 ionophore 인 aplasmomycin을 발견했다 (Okami, 1986). 또한 새로운 종의 해양 방선균종인 *Streptomyces tenjimariensis* 을 분리하였고 이 균주로부터 새로운 aminoglycoside 항생제인 istamycin을 발견했다. 미국 Scripps연구소의 Fenical은 *Alteromonas* sp.의 대사산물인 isatin(2,3-indolinedione)을 발견하였는데 이 물질은 진균에 의한 갑각류 embryo의 감염을 저지한다고 밝혀졌다(Turnes, 1989). 해양세균인 *Florobacterium uliginosum* 에서

*marinactan*이라는 다당류가 분리되었는데 이물질은 항암효과 뿐만 아니라 면역체계를 강화시킨다고 밝혀졌다(Okami, 1986). Imada(1985)그룹은 *Alteromonas* sp.에서 단백질효소 저해제인 *marinostatin*과 *monastatin*을 발견하였는데 *monastatin*은 *glycoporotein*의 일종으로 어병을 유발하는 *Aeromonas hydrophila*와 *Vibrio anguillarum*의 protease에 대한 저해작용이 우수하다고 밝혀졌다.

이상의 예와 같이 국외에서는 해양생물로부터 새로운 생리활성물질의 탐색작업이 활발한데 비하여 국내 연근해의 해양생물 자원을 이용한 신물질 창출은 거의 전무한 상태이다. 우리나라의 해안은 많은 섬들과 내만으로 구성이 되어있어 생산성이 높고 생물종이 풍부하여 해양생물의 개발가능성은 상당히 높으며 부존자원이 부족한 우리의 실정에서 볼 때 해양자원의 개발은 절실히 요구된다. 해양생물공학분야는 선진국에서도 초기단계이므로 선진국에 의해 자원이용이 침식당하기전 적절한 정책적 지원, 집중적 투자 및 연구관계자의 노력으로 좋은 성과를 얻는다면 선진국 대열에 당당히 도입할 수 있다고 사료된다.

바이러스에 의한 질병은 예방법이나 치료법으로 조절될 수 있다. 예방법은 주로 백신에 의한 면역요법으로 여러가지 바이러스 질병에 대한 백신이 개발되어 있고 많은 효과를 보아왔다. 그러나 killed virus는 보통 면역기간이 길지않고 예방만이 가능할 수 있다는 단점이 있으며 rhinovirus와 같이 혈청형이 다양하거나 influenza virus와 같이 항체의 변이가 흔한 경우는 실용적이지 못하다. 최근에는 B형 간염 바이러스 백신에 의한 돌연변이 균주의 출현도 보고된다. 현재 치료제로서 tromantadine (Virus-Merz), lysozyme (Murazyme), moroxydine(Assur, Virustat), protamide, isoprinosine등의 약물들이 일부 국가에 등록되어 있고 세계적으로 공인된 치료제가 몇가지 있으나 호흡기 질환, herpesvirus와 retrovirus 질병에 대

한 약물일 뿐이다. Idoxuridine, Trifluridine, Vidarabine, Acyclovir등의 약물이 human herpes virus에 대하여 치료제로 쓰이고 AIDS를 유발하는 Human immunodeficiency virus에 대한 약물로는 Retrovir, Dideoxyinosine 등이 있으나 이들 약물들도 제한된 약효와 장기 복용시의 부작용과 내성균주의 출현등으로 인하여 새로운 약물의 개발이 요구된다. 아직 치료제가 없는 papillomavirus, adenovirus, 간염 virus, epstein-barr virus, rhinovirus, rotavirus등의 치료제 개발도 시급하다.

Virus에 기인한 암에 유용한 물질을 screening하는데는 바이러스 특유의 life-cycle에 있어서 어떤 단계를 특이적으로 차단하는 약물이 바람직하다. AIDS의 원인 바이러스인 HIV도 Retrovirus에 속하는데 이는 DNA를 중간체로 하여 복제하는 RNA virus로 이런 retrovirus의 중식에 필수적인 역전사효소 (reverse transcriptase:RT)의 존재가 1970년대에 보고되었으며 많은 retrovirus의 역전사효소들은 성질이 유사한 것으로 알려졌다. Retrovirus의 중식을 억제하는 방법은 여러 단계가 고려될 수 있지만 가장 효과적인 단계는 역전사효소를 저해하는, 즉 바이러스의 RNA가 DNA로 복제되는것을 방지하는 초기단계로 간주되고 있다. 따라서 역전사효소를 선택적으로 저해하는 물질은 우수한 항바이러스성 화합물로 기대되고 또한 AIDS에 대한 화학요법제로도 사용될 수 있을 것이다.

인간에게 감염하는 human herpesvirus(HHV)는 7가지가 알려져 있고 다양한 질병을 유발한다(이, 1992). 이제까지 공인된 치료제와 현재 활발히 개발이 진행되고 있는 화합물 중 Idoxuridine (Stoxil, IdUrd)과 trifluridine (Viroptic, TFT-Ophthiol, TFT)은 둘 다 DNA복제와 전사(transcription)를 저해하고 herpes keratitis 국소치료제로 이용되는데 TFT의 효능이 더 높고, 독성 또한 크다. Bromovinyldeoxyuridine(BVDU)은 HSV-1과 VZV의 치료제로서 최근에 가장 유망한 화합물중의 하나로 효능은 acyclovir(ACV)보다 높

고, 독성은 IdUrd나 TFT에 비해 낮다. 제약으로 개발된 Acyclovir (Zovirax, Aciclovir, ACV)인 ACV(9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine)는 keratitis, encephalitis, primary genital herpes, nepnatal herpes, prophylaxis, zoster 등과 같은 여러가지 herpes 질병에 대한 가장 뛰어난 치료제로 이용되고 있다. GCV(9-(1,3-dihydroxy-2-ropoxymethyl)guanine, 2'-nor-2'-deoxyguanosine)는 ACV와 같이 HSV-1,2와 VZV의 TK에 의해 GCV-monophosphate가 되며 ACV보다 *in vitro*, *in vivo*효능이 강하다.

Sulfated polysaccharide는 각종의 질병에 대해서 형태적, 양적 변화가 쉽게 일어나 질병생리학적 분야에서 주목받고 있다. 특히, dextran sulfate, pentosan polysulfate, fucaidan, carrageenan, heparin과 같은 sulfated polysaccharide는 herpes simplex virus, human cytomegalovirus, vesicular stomatis virus, sindbis virus, human immunodeficiency virus type I(HIV-I)의 replication을 *in vitro*에서 강하게 저해하고 있는 것으로 알려져 sulfated polysaccharide가 DNA, RNA virus에 대한 growth inhibitor로써 주목받고 있다 (Baba et al., 1988a,b). 현재까지 미생물로부터 생산되는 sulfated polysaccharide에 대한 연구는 극히 적어 *Clostridium welchii*가 생산하는 dermatan sulfate-like polymer (Nakoshima et al., 1988), *Halobacterium* spp.의 cell envelope에 존재하는 sulfated polymer(Darby et al. 1979), *Halococcus* spp.의 major cell wall component인 heteroglycan (Konciewica, 1972) 등이 알려져 있을 뿐이다. 따라서 미생물로부터 얻어지는 sulfated polysaccharide의 화학적, 생물학적 탐색은 매우 유용할 것으로 생각된다.

Retrovirus나 herpes simplex virus에 대한 치료제로는 위에 언급한 물질외에 부작용이 적고 효과가 우수한 물질의 개발이 요구되는데 미국의 Sea Pharm에서는 해양미생물의 대사물질을 대상으로 HSV 1, A59(coronavirus),

PR 8(influenza virus type A)등의 바이러스에 대한 생리활성이 있는 물질 뿐만 아니라 항종양, 항미생물, 면역체계 강화물질을 탐색하고 있다. 미국의 National Cancer Institute(NCI)에서는 1959년부터 1985년 까지 천연물을 대상으로 생리활성물질을 탐색하였는데 해면류와 갑각류로부터 didemnin-B, bryostatin이 각각 발견되면서 식물이나, 토양방선균보다 해양생물로부터 신물질을 발견할 가능성이 높다고 생각하여 1986년부터는 해양을 대상으로 생리활성물질 탐색작업을 벌리고 있다. 따라서 국내에서도 해양미생물을 대상으로 항바이러스물질을 탐색을 시작해야 한다.

DNA topoisomerase(topo)는 세포 DNA대사 과정중에 중요한 역할을 담당하고 있는 효소로서 각종 생물에 있어서 topo에는 두가지 형 topo I, II가 존재 한다. I형은 단량체로서, II형은 2량체로서 그 활성을 가지고 있다. Topo I, II의 죽매작용은 DNA와 결합, DNA가닥 절단, DNA 가닥 통과, DNA 재결합의 4단계로 구성되어 있으며 topo는 DNA의 conformation 혹은 topology의 변환을 유도한다고 생각되어지고 있다. 현재 강력한 항암제로 알려져 있는 epocide, anthracycline, adremycin 등은 topo를 저해함으로써 항암효과를 나타낸다고 보고되었다. 이와같은 결과를 계기로 해서 최근 topo를 저해하는 물질을 찾는 탐색이 각 방면에서 개발, 진행 중에 있다 (D'Arpa and Liu, 1989). 현재 임상에 사용되고 있는 대부분의 항암제는 topo II를 저해함으로써 그 활성을 나타낸다. 한편 topo I을 저해함으로써 항암효과를 나타내는 것은 Camptothecine(CAM) 한 종류가 보고되어 있다 (Dalica and Franco, 1988). 그러나 CAM은 독성이 강해서 실제 임상에 있어서는 많은 부작용을 동반하고 있어 현재 그 유도체가 개발 중이다. 따라서 topo I을 target로하여 항암제를 탐색하게 된다면 신규의 항암물질을 발견하게될 확률이 높다고 생각된다.

해양미생물로부터 항바이러스나 항종양성 생리활성물질의 탐색을 위하여 우

선 해양미생물에 대한 분리, 분류 및 보존 체계와 효과적인 탐색 system을 개발하고 아울러 신물질을 검색할 수 있는 data base system을 구축하고자 하였다.

제 2 장. 연구추진방법

2.1. 연구내용

해수, 해양저질층, 해양동물시료, 남극시료 등에서 분리한 세균과 해양방선균, 극지방선균을 포함한 방선균을 분리 보전하고 대량의 균주를 배양하여 조추출물 제조방법을 확립한다. 생리활성 검색방법으로는 reverse transcriptase와 topoisomerase I 저해제에 대한 검색체계와 DLD-1(human colon)와 p388D1 세포를 대상으로한 항종양물질 탐색방법을 확립한다. *Herpes simplex virus* (HSV-1, HSV-2)에 대한 탐색체계와 생리활성을 나타내는 sulfated polysaccharide 탐색방법을 구축한다. 이러한 여러 생리활성 검색 방법을 통하여 생리활성물질을 생산하는 미생물을 선별하고 그의 구조분석을 위하여 대량배양액을 분리 정제하고 그 특성을 조사한다. 신물질의 여부를 조사하기위해 자료수집을 통하여 생물의 종류, 물질의 구조상의 특징 및 생리활성도에 따라 분류하여 데이터 베이스를 만든다. 효과적인 연구수행을 위하여 HSV-1, HSV-2에 대한 항바이러스 약효검색은 한국화학연구소에 위탁하고 항바이러스성 sulfate함유 polysaccharide탐색은 부산수산대학교에서 수행한다.

2.2. 실험재료 및 방법

2.2.1. 배양 및 시료조제

해양생물에 서식하는 세균, 해수에 서식하는 일반 해양세균은 PYG배지 4ml에

접종하여 20°C에서 5일 내지 6일간 정치배양하였다. 해변의 토양, 해양저질층, 남극토양 등에 서식하는 방선균은 SZ배지 5ml에 접종하여 25°C에서 6일 내지 8일간 진탕배양하였다. 숙성된 해수를 넣어 사용된 PYG 배지와 SZ 배지의 조성은 아래와 같다.

* PYG medium

peptone	10.0 g
yeast extract	5.0 g
glucose	20.0 g
aged sea water	500 ml
dest. water	500 ml
pH 7.2	

* 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 3.5ml의 Folch solution($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=2:1$)을 첨가하여 그림 2-1과 같이 추출하여 Folch solution layer와 water phase의 시료로 각각 분리조제하였다. SZ 배지에 배양된 방선균은 그림 2-2와 같이 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 ethyacetate 층과 water phase로 분리한다. Folch soluble phase와 ethyacetate soluble phase는 speed vac 으로 농축하고 각 시료는 eppendorf tube에다 넣어 4°C에 보관하였다. 농축된 Folch soluble phase 와 ethyacetate soluble phase의 농축된 시료는 검색 전 각각 350ul, 450ul 의 methanol을 넣어 사용하였다.

cell + broth

Folch solution(CHCl₃:MeOH=2:1) 3.5ml

water phase

concentration

sample 1 sample 2

(add MeOH 350ul
before assay)

Fig. 2-1. Extraction and fractionation of marine bacteria culture

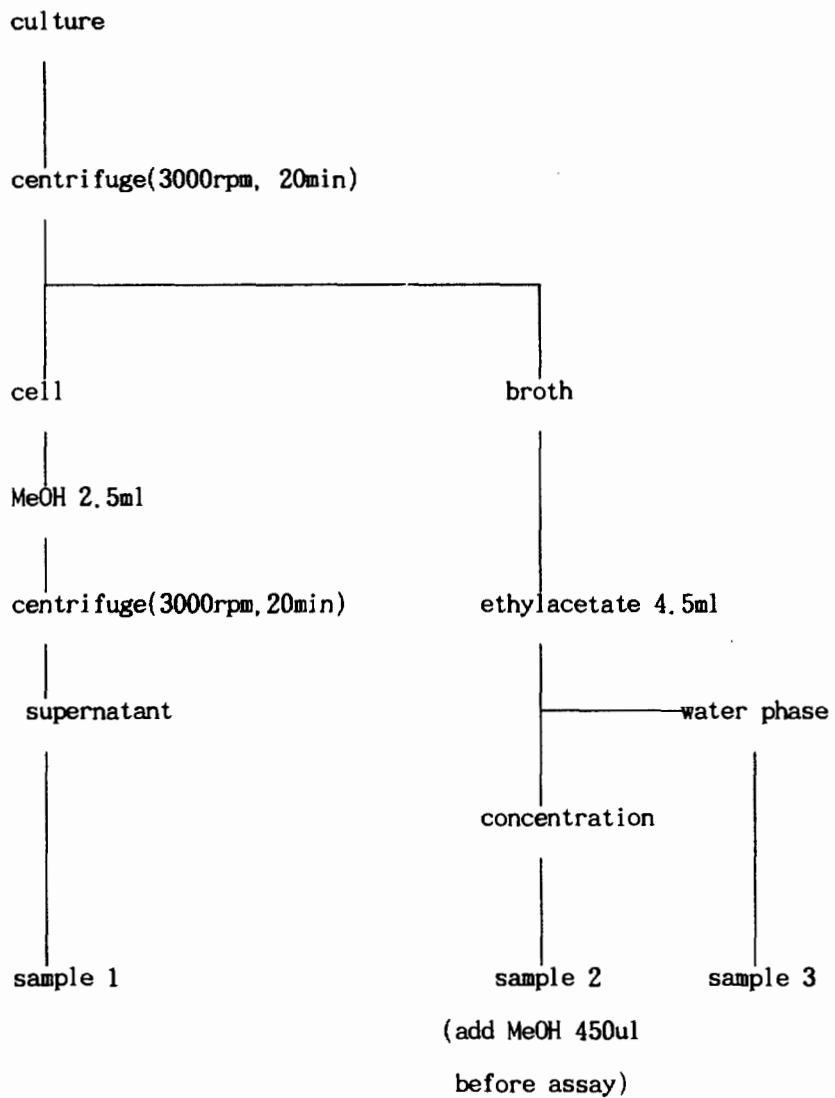


Fig. 2-2. Extraction and fractionation of marine actinomycetes culture

2.2.2. 세포독성능 검사

실험에 사용한 세포는 한국 세포주 은행에서 분양받은 Human adenocarcinoma인 DLD-1와 Mouse Lymphoid neoplasm인 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 Nunc 제품을 사용하였으며, 세포 배양기는 Revco사의 CO₂ incubator를 사용하였다. 세포수 측정은 Hemaytometer를 사용하였다.

세포배양을 위해서는 실험에 사용된 세포인 DLD-1, P388D1은 10%FBS(Fetal Bovine Serum)와 kanamycin 20μg/ml이 들어 있는 RPMI 1640 배양액을 사용하여 25cm² flask에 넣어 37°C, 5% CO₂가 유지되는 항온기에서 배양하였다. 세포독성능 측정시 P388D1은 대수기에 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 100μl씩 접종하고 조주출물 시료를 각각 10배 연속희석하여 100μl씩 접종하여 최종 volume이 200μl가 되게 한 후 37°C에서 5% CO₂농도의 항온기에 5일 간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 중류수에 녹인 MTT용액 (1.1mg/ml)을 50μl씩 각각의 well에 넣어주고 나서 최적반응 4시간 동안 37°C의 CO₂항온기에 더 배양시켰다. 그 후 상등액을 버리고 150

μ l의 dimethyl sulfoxide를 넣고 5분동안 흔들어 formazon crystal을 잘 용해시킨 뒤 발색정도를 관찰하여 세포독성능을 판단하였다. 이 때 아무처리 하지 않은 배양원액의 발색을 대조군으로 비교하였다.

2.2.3. Topoisomerase I inhibitor assay

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 흥선으로부터 분리하고 그 기질로 사용될 supercoiled DNA는 *E.coli*로부터 pBR 322를 분리하였다. 종양세포에 대하여 세포독성능을 나타낸 시료에 대해서 Topo I relaxation 활성 측정을 실시함으로써 1차적으로 Topo I 저해가 일어 났는지의 여부를 조사하였다.

2.2.3.1. Supercoiled DNA의 제조

Topo I의 기질로 사용될 supercoiled DNA는 Sambrook 등(1989)의 방법을 이용하여 *E.coli*로부터 pBR 322를 분리하여 사용하였다. 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 ml에 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 혼탁시킨 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 혼탁시킨 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 rpm에서 4°C로 15 분간 원심분리한 후 상청액을 회수하여 0.6 volume의 isopropanol을 넣고 잘 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다. 이를 6,000 rpm에서 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 M의 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 μl 의 TE buffer (containing RNase A (20 μg/ml, 80°C heat treated for 3 min))에 녹여서 실온에서 30분간 방치하고 500 μl 의 1.6 M NaCl (containing 13% (w/v) PEG 8000)solution을 첨가하여 잘 섞은 후 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리 (10,000 rpm) 하였다. 상청액을 제거하고 DNA pellet을 400 μl의 TE buffer (pH 8.0)에 녹이고 chloroform:isoamylalcohol (24:1) solution을 600 μl 첨가하여 잘 섞은 후 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 다른 tube에 옮긴 후 100 μl 의 10 M ammonium acetate를 첨가하여 잘 섞고 2 volume의 ice-colded ethanol을 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하여 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리하였다. 다시 200 μl 의 ethanol로 씻어낸 후 DNA pellet을 100 μl 의 TE buffer (pH 8.0)에 녹인 후 -20°C에서 보관하여 기질로 사용하였다.

2. 2. 3. 2. Topoisomerase의 분리

송아지 흥선으로부터 이(1992)의 방법을 변형하여 topo를 분리하였다. Deep freezer에서 -80°C로 보관중인 송아지 흥선 100g을 -20°C에서 1일간 방치하고 이어서 4°C에서 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 Waring blender에 넣고 NW buffer (5 mM potassium phosphate, 100 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF) 를 100 ml첨가한 후 약 30초 간격으로 5차례 이상 갈았다. 4°C에서 30분간 방치한 후 위의 용액을 2겹의 가아제를 통하여 거른 후 다시 30분간 방치하였다. 이때 형성된 침전물은 hand homogenizer로 분쇄한 후 2겹의 가아제를 사용하여 다시 여과하였다.

이 여과액들을 모은 후 10% polymin P를 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, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF) 50 ml을 넣고 혼탁한 후 5 M 의 NaCl 을 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 상청액 을 Bio-Rex 70 을 이용하여 분리하였다. Sample 용액을 Bio-Rex 70 resin 이 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. 부분정제된 topo는 소량씩 따로 deep freezer 에 보관하였다.

2.2.3.3. Topo I 저해능측정

세포독성능을 나타낸 시료에 대해서 Topo I 저해가 일어 났는지의 여부를 1 차적으로 조사하기위해 Topo I relaxation 활성 측정을 실시하였다. Topo I 활성 측정반응계의 조성은 다음과 같다.

* Topo I reaction kit

5x stock solution (25mM Tris-HCl pH 7.5,	
500mM KC1, 2.5mM Dithiothreitol, 2.5mM EDTA)	4 μ l
0.3 mg/ml of BSA	2 μ l
100 mM of MgCl ₂	2 μ l
dH ₂ O	9 μ l
pLIC 118 초나선 DNA (0.3 μ g/ μ l)	1 μ l
Enzyme solution (1unit/ μ l)	1 μ l
Sample(시료)	1 μ l
Total	20 μ l

위의 반응액 20 μ l를 37°C, 30분간 반응 후 stop buffer (5% SDS, 50mM EDTA, 20% Ficoll, 0.1mg/ml의 xylene cyanol, 0.1mg/ml의 Bromophenol blue) 5 μ l를 첨가하여 반응을 중지 시킨 후 초나선 DNA가 이완되는 정도를 1% agarose gel 전기영동에 의해 판단하였다. Positive control로는 topo I 의 저해제로 밝혀진 camptothecin을 사용하였다. 효소활성의 1 unit는 초나선형의 0.3 μ g의 DNA를 30분동안 반응하여 완전히 이완된 형태로 전환시키는 효소량으로 정하였다.

2.2.4. Reverse transcriptase inhibitor assay

Nakamura(이 등, 1992)에 의한 방법을 변형하여 96 well plate를 이용하여 다수의 시료를 소량검색할 수 있는 방법을 사용하였다.

해양미생물의 조추출 시료 20 μ l에 enzyme solution 10 μ l 와 reaction buffer 10 μ l를 가하여 균일하게 혼합한 후 37°C에서 60분간 incubation한 후 ice bath에서 반응을 중지시키고 40 μ l의 reaction mixture를 Nunc cell harvester filtration system으로 DEAE-Filterpaper에 흡착시켰다. Filter paper를 5% Na₂HPO₄·12H₂O용액으로 3번 씻고 이어서 물로 2번, ethanol로 1번 세척한 다음 완전히 건조한 후 남아있는 radioactivity를 Lumac사 제품의 Lumagel scintillation cocktail에 넣어서 B-counter로 방사능을 측정하였다. 실험에 사용한 reaction buffer와 enzyme solution의 조성은 다음과 같다.

* Reaction buffer

content	volume(μ l)	final conc.
1.0 M Tris-HCl (pH 8.3)	100	50 mM
0.3 M MgCl ₂	40	6 mM
1.0 M Dithiothreitol	2	1 mM
1.0 M KCl	80	40 mM
10 mM TTP	20	0.1 mM
0.5 mg/ml poly(rA)	20	5.0 μ g/ml
1.0 U/ml oligo(dT) ₁₂₋₁₈	40	0.02 U/ml
[³ H]TTP(1mCi/ml)	12.5	6.25 μ Ci/ml
0.5mg/ml BSA	4	1.0 mg/ml
H ₂ O	181.5	
Total	500 μ l	

* Enzyme solution

content	volume	final conc.
AMV Reverse Transcriptase	1.2	4.5 U/ml
Dilution Buffer	46.8	
H ₂ O	452	
Total	500 μl	

Positive control로는 조추출물 희석액을 사용하였고 negative control은 종류수 30μl에 reaction buffer 10μl을 가하여 다른 시액들과 같은 조작을 거쳤다. RTase 저해능의 지표물질로는 ddTTP를 사용하였으며 저해활성은 inhibition percentage로 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{CPM}/\text{PC}-\text{CPM}/\text{SAMPLE}}{\text{CPM}/\text{PC}-\text{CPM}/\text{NC.}} \times 100$$

2. 2. 5. Herpes simplex virus 저해활성 측정

Human herpes simplex virus inhibitor assay system은 한국화학연구소의 약활성실에서 개발한 방법을 이용하였다(위탁연구보고서 항바이러스 약효검색 참조).

숙주세포는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입한 Vero 세포 (African green monkey kidney cell)을 사용하였으며 시험에 사용된

human herpesvirus들은 Herpes simplex virus type 1 (HSV-1): strain F (ATCC VR 733)과 Herpes simplex virus type 2 (HSV-2): strain MS (ATCC VR-540)이다.

항 herpes simplex virus 약효검색은 virus-induced cytopathic effect(CPE)저해법을 이용하였다. 즉 96-well plate에 Vero 세포를 증식 시킨 후 배양액으로 회석된 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID₅₀(50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100ul씩 접종하고 한 시간 동안 37°C에서 흡착 시킨 후 배양액을 제거하였다. 각 농도로 회석된 약물을 duplicate로 각 well에 100ul씩 첨가하고 37°C CO₂ 배양기에서 3일 배양한 후 세포를 고정시킨 다음 MTT검색법으로 50%의 세포가 살아남도록 한 약물의 농도를 EC₅₀ (50% effective concentration)로 결정하였다.

바이러스약효검색시 약물의 독성치가 항바이러스약효에 끼치는 영향을 알기 위해서 성장이 멈춘 세포를 죽이는 독성(cell viability test) 측면에서 조사하였다. 따라서 항바이러스약효와 세포독성은 같은 plate에서 즉 mock-infected로 수행되었다. 바이러스 흡착시 바이러스 대신에 배지만을 첨가한 다음 한시간 배양 후 배지를 제거하고 회석된 약물을 100ul씩 첨가하였다. 3일 동안 배양한 후 증식된 세포의 수를 MTT검색법으로 측정 하였는데 약물이 첨가되지 않은 well과 비교하여 50%의 흡광도 감소를 유발한 약물의 농도를 CC₅₀(50% cytotoxic concentration)로 계산하였다.

2.2.6. 황함유 다당류의 분리

황함유 다당류 생산균주의 선별, 황함유 다당류의 분리 및 그의 생리활성도 시험은 부산수산대학교에서 위탁과제로 수행하였다(위탁연구보고서 항바이러스성 sulfate함유 polysahharide 탐색 참조).

2.2.6.1. 다당류생산균주의 분리, 배양 및 보존

균주의 분리는 부산 해운대, 여수 국동항, 전라남도 완도, 신지도 근해로부터 해수와 다시마, 미역 등의 흥조류를 채취하여 해수는 Difco marine medium에 도말하여 균을 분리하고 다시미, 미역 등은 부위별로 절단한 후 멸균된 자연해수에 침지시켜 25°C incubator에서 2-3시간 shaking시킨 다음 marine medium plate에 도말한 후 25°C incubator에서 3일간 배양하였다.

분리한 균주 중 고체배지에서 점조성 물질을 생성하는 균을 1차 선별하고 이를 다당류 생산배지에 액체배양하여 배양액의 점도가 10cp 이상 상승할 경우 exopolysaccharide를 생성하는 균으로 간주하여 분리하였다. 분리한 균을 Difco Marine Medium을 기본배지로 하여 사면배지에서 28°C, 72시간 배양한 후 4°C 냉장고에 보관하며, 4주마다 1회씩 계대배양시키면서 사용하였다. Exopolysaccharide를 생성하는 균의 대량배양에는 5L Jar Fermenter를 사용하여 working volume 3.0l, aeration 1vvm, temp. 30°C, stirring speed 150rpm의 조건하에서 72시간 배양하였다.

분리용 배지 및 보존용배지로 사용된 marine medium과 다당류생산배지의 조성은 다음과 같았다.

* Marine Medium(Difco2210E)

Peptone	5.0	g
Yeast extract	1.0	g
Ferric citrate	0.1	g
Ammonium nitrate	0.0016	g
Sodium phosphate [dibasic]	0.008	g
sea water	1000	ml
pH	7.8	

* 다당류생산배지

Peptone	5.0	g
Glucose	10.0	g
Ammonium nitrate 0.0016 g		
Sodium phosphate [dibasic] 0.008 g		
sea water	1000	ml
pH 7.8		

Glucose는 별도로 멸균하여 무균적으로 첨가하여 사용하였다.

2.2.6.2. 분리균의 동정 및 특성

분리균의 형태, 생리학적 및 생화학적 특성은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Sneath et al., 1984)에 준하여 실시하였다. 분리균의 형태적 관찰은 광학현미경(xl,000, Zeiss MC63, Germany)으로 관찰하였고 생화학적 test는 rapid multi test system인 API 20E kit를 이용하여 행하였다.

2.2.6.3. 황함유 다당류의 특성

배양액으로부터 분리된 조다당(crude polysaccharide)을 동결건조하여 실험에 사용하였는데 그 조성은 통상 사용되는 여러가지 비색반응법에 의해 분석하였고 가수분해시킨 시료는 Dodgson(1961)에 따라 500nm에서 흡광도를 측정하여 sulfate함양을 구하였다. 조다당은 KBr 정제법(Chaplin and Kennedy, 1986)으로 조제한후 IR spectrometer(Shimadzu, model 27K-01077)를 사용하여 IR spectrum을 측정하였다.

2.2.6.4. 분리된 다당류의 생리활성도 측정

분리된 다당류의 생리활성도는 Sarcoma-180(이하 S-180)을 대상으로 antitumor activity를 측정하였다. 분리된 조다당을 멸균된 PBS에 녹여 시료로 사용하였다. S-180 cell은 BALB/c mice의 복강에 1×10^6 cell/mouse로 주사하여 10-15일 경과 후 복수가 차면 복강에서 S-180 cell을 채취하여 culture plate로 옮긴 후 20% Fetal calf serum을 첨가한 RPMI 1640 배지에서 배양한 후 cell 농도를 2.5×10^5 cell/ml로 하여 사용하였다. 배양된 S-180 cell을 24 well 및 64 well culture plate에 2.5×10^5 cell/ml의 농도로 하여 2.5ml씩 분주한 후 각 조다당의 농도를 각각 100 μ g/ml, 300 μ g/ml, 600 μ g/ml로 하여 첨가한 후 CO₂ Incubator에서 96시간 동안 배양하면서 배양시간별로 cell counter로 세포수를 측정하여 대조군과 비교하였다.

2.2.7. A1318 의 시간별 성장특성 및 활성도 측정

세포독성물질 생산을 위한 최적의 배양시간을 알아내고자 방선균 A1318 군주를 배양하여 시간별로 성장도와 생리활성도를 조사하였다.

250ml 짜리 삼각 flask에 SZ broth 50ml 씩을 넣고 멸균한 후 500 ul의 A1318포자용액을 접종하여 25°C에서 진탕배양하였다. ISP4 agar plate상에서 포자형성이 된 A1318에 멸균된 증류수 10ml 을 넣고 loop로 포자를 긁어낸 후 이를 멸균된 cap tube에 옮겨 담고 vortexing 한 후 5mm 정도 두께의 솜으로 걸러낸 포자를 다시 10배 희석하여 접종용 포자용액으로 사용하였다.

시료의 채취는 7일간 매일 했으며 각각의 배양액에 대해서는 560 nm에서의 O.D. 값과 pH를 측정하였다. 배양액과 균체를 따로 분리하여 배양액 10ml에 ethylacetate 5ml 을 넣어 조추출물을 조제하였고 균체는 methanol로

추출하였다. 조제된 시료는 각각 DLD-1 과 P388D1 cell에 대해서 세포독성을 실증하였다.

2.2.8. 생리활성물질의 분리

유기물질의 추출 및 분리에 사용한 모든 용매와 시약은 GR등급을 사용하거나 EP급을 수분제거 및 재증류하여 사용하였다.

HPLC는 Spectra physics사의 SP-8810 isocratic pump와 SP-8800 ternary gradient pump를 모체로 하여 본 실험실에서 자체 조립한 제품을 사용하였다. 중요 부품은 injector(Rheodyne 7825)와 detector(Shodex RI와 spectra 100 UV) 및 2-pen recorder(Linear)로 구성되었다. 분리에 사용한 HPLC column은 YMC ODS semi-preparative column(1 cm x 25 cm)와 ODS guard column cartridge(Alltech)이었다. Vacuum flash chromatography에 사용한 adsorbants는 TLC grade silica와 chromatography용 ODS silica이었다. NMR측정은 Varian사의 Unity-500을 이용하였다. Proton NMR은 500 MHz에서 CDCl₃를 용매로, 그리고 TMS(tetramethyl silane)을 internal standard로 이용하여 측정하였다.

방선균 균주 A1318을 상온에서 2 1의 SZ media에 1주일 동안 배양한 후 원심분리하여 균체와 상동액(supernatant)로 분리하였다. 균체는 distilled MeOH(500 ml x 3회)로 추출하였으며 상동액은 ethylacetate(2 1 x 3회)로 분획하였다. 분리하고 남은 상동액은 rotavapor와 freeze dryer를 이용하여 대부분의 물을 제거한 후 ethylacetate(500 ml x 2회)로 추출하였다. Methanol과 ethyl acetate용액을 합한 뒤 rotavapor를 이용하여 추출용매를 완전히 제거한 후 남은 물질을 ethyl acetate(100 ml x 2회)로 추출하였고 ethyl acetate에 불용성인 물질은 다시 methanol(100 ml x 2회)로 추출한 뒤 inorganic salt로 생각되는 남은 물질은 버렸다(3.7.2.의 그림 3-6 참조). Ethyl acetate층에 강하게 나타난 non-polar compounds를 분리하기

위하여 silica vacuum flash chromatography를 하였다. 부분정제된 물질의 특성을 각 fraction별로 HPLC나 NMR을 사용하여 분석하였으며 그 생리활성도도 조사하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

3.1. 해양미생물의 분리, 보전, 배양 및 시료조제

한국해양연구소에서 한국 근연안 해역의 해수, 해양저질층, 해양동물시료 (김 등, 1992a), 남극시료 등에서 분리한 세균 3,000주와 해양방선균, 극지 방선균을 포함한 방선균 5,000주(김 등, 1992b)를 확보하여 이를 glycerol 20% 용액에 넣어 영하 80 °C에 보존하여 생리활성물질 검색에 이용하였다. 분리균주 중 약 2,000주를 관련연구기관인 제일제당에 제공하여 phospholipase A2 저해제 탐색에 사용할 수 있도록 하였다.

분리된 해양세균 중 1,007균주를 activation시켜 이 중 PYG배지에서 자란 820개 세균배양액으로부터 Folch용액으로 추출하여 Folch solution layer 와 water phase 시료를 각각 820개를 분리 조제하였다. 해양방선균 980주를 숙성된 해수가 첨가된 변형 ZoBell배지(SZ media)에서 activation 한 것 중 좋은 성장을 보인 882 개의 균주에서 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 ethylacetate 층과 waterphase 층으로 분리하여 총 2,661개의 시료를 조제하여 냉장고에 보관하였다.

3.2. 항종양물질 생산균주 선별

종양세포 Human adenocarcinoma인 DLD-1와 Mouse Lymopoide neoplasm인 P388D1을 사용하고 시료는 방선균의 농축된 ethylacetate 층은 200μl의 methanol에 용해시키고 세균의 농축된 Folch solution 층은 100μl의 methanol에 용해시켜 세포독성검사에 사용하였다.

1,506 sample에 대해서 DLD-1과 p388D1에 대한 MTT assay를 실시한 결과 1

차 시험에서는 218 개의 시료(116개의 균주)에서 활성이 보였고 시료의 회색배수를 늘려 재시험한 결과 활성이 큰 균주는 24개로 관찰되었다. 이 중 방선균 A1318, A89, A4406 균주의 sample은 강한 세포독성을 나타내었다 (Fig. 3-1). 표 2-1에서 나타난 바와 같이 냉동보관한 분리균주를 액체배지에 activation할 경우 해양방선균의 생존률은 92 %로 78.3%의 생존률을 나타낸 해양세균보다는 생존률이 높은 것으로 나타났으며 보전이 수월하다고 사료된다. 반면 일반해양세균은 해양방선균에 비해 냉동보전시 그 생존률이 떨어지며 세포독성을 나타내 보인 균주가 훨씬 적었다. 세포독성활성이 관찰된 시료들에 대해서는 topo I에 대한 저해능을 시험하였다.

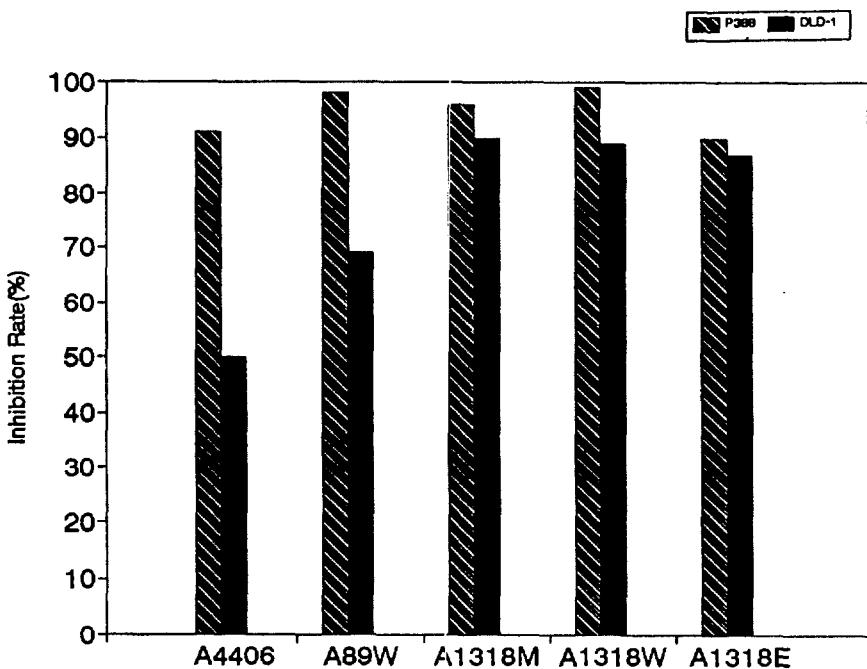


Fig. 3-1. Antitumor activity of isolated Actinomycetes strains:
 A4406, A89, and A1318 tested with DLD-1 and p388 cells.
 E: ethylacetate phase(culture broth), W:waterphase(culture
 broth), M:methanol extract phase(mycelium)

Table 3-1. Cytotoxicity of isolated marine microorganisms.

	bacteria	actinimycetes
Number of activated strains	1,007	980
Number of tested sample	820 x 2 = 1,640	887 x 3 = 2,661
Survival rate by cultivation(%)	78.3	92.0
Number of strains shown cytotoxicity with dilution rate	DLD-1 p388 10 ⁰ 8 4 2 10 ⁻¹ 18 129 10 ⁻² 8 29 10 ⁻³ 4 25 10 ⁻⁴ 18	DLD-1 p388

3.3. Topoisomerase I 저해물질 생산균주 선별

세포독성능을 나타낸 시료에 대해서는 Topo I relaxation 활성 측정을 실시 함으로써 1차적으로 Topo I 저해가 일어 났는지의 여부를 송아지홍선으로부터 분리된 topoisomerase와 *E.coli*로부터 pBR 322를 분리하여 기질로 supercoiled DNA로 사용하여 조사하였다.

세포독성능을 강하게 나타낸 A1318, A89 및 A4406시료에서 Topo I relaxation 반응을 저해하고 있음을 나타내었다(Fig. 3-2). 그러나 이들 시료는 crude한 상태이므로 특이적으로 Topo I을 저해함으로써 세포독성을 나타낸다고 할 수 없다. A1318은 이 균주들 중 세포독성도 가장 강하게 나타내었으므로 A1318을 대량배양하여 그 물질의 특성을 조사하고자 하였다. 향후 topo I 저해물질을 정제를 해나가면서 보충실험으로 ethidiumbromide solution으로 염색하여 cleavable complex 형성을 관찰하고 위와 같은 실험결과에 의해서 시료가 topo를 저해하는 것이 확실하다면 *in vivo test*를 할 예정이다. *In vivo* 시험은 시료의 저해작용이 cleavage complex에 작용하는지 아닌지를 세포 내에서 확인하는 것으로 ^{3}H - thymidine을 배지내에 포함시켜 세포를 배양한 다음 log phase에서 배지를 교환하고 나머지의 ^{3}H -thymidine을 제거한 후 시료를 처리한다. 이 때 만일 시료가 topo의 cleavage complex에 작용을 한다면 세포내의 cleavage complex가 측적될 것이고 이를 lysis buffer로 세포를 lysis하고 KCl과 SDS를 처리하면 이 cleavage complex가 침전되고 이를 scintillation counter를 사용하여 방사능량을 측정할 수 있을 것이다.

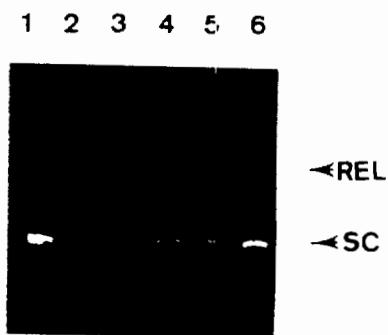


Fig. 3-2. Topoisomerase I inhibition patterns on agarose gel

1. only DNA
2. DNA + Topo I (1 unit)
3. DNA + Topo I + Camptothecin(0.2 ug/ml)
4. DNA + Topo I + A4406E
5. DNA + Topo I + A89W
6. DNA + Topo I + A1318M

3.4. Reverse transcriptase 저해활성 검사

Reverse transcriptase(RTase) 저해제 탐색방법은 Nakamura에 의한 방법을 변형하여 96well plate를 이용하여 다양한 시료를 검색할 수 있는 방법(2.2.4. 참조)에 따라 AMV(Avian Myeloblastosis virus) RTase에 대한 저해 활성을 조사하였다. 지표물질은 ddTPP를 사용하여 저해농이 1 ug/ml ddTPP 보다 좋은 시료를 검색하였으나 저해는이 우수한 물질은 아직 발견이 안되었으며 앞으로도 지속적인 검색작업이 요구된다.

3.5. HSV-1 과 HSV-2 저해활성 검사

항 herpes simplex virus 약효검색은 CPE저해법을 이용하였다. 모든 시료에 대해 HSV-1 strain F와 HSV-2 strain MS와 세포독성으로 cytocidal effect를 조사하였다. 실험방법 2.2.5.에서 기술한 바와 같이 96-well plate에 배양된 Vero 세포에 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID₅₀ (50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100ul씩 접종하고 한 시간 동안 37°C에서 흡착 시킨 다음 각 농도로 희석된 시료를 duplicate로 각 well에 100ul씩 첨가하였다. 매 실험마다 ACV와 Ara-C를 표준약물로 이용하였다. 37 °C CO₂ 배양기에서 3일 배양한 후 세포를 고정시킨 다음 MTT검색법으로 50%의 세포가 살아남도록 한 약물의 농도를 EC₅₀ (50% effective concentration)로 결정하였는데 이 값이 낮을수록 좋은 약물로 간주된다. Mock-infected cell에서 세포독성을 조사한 결과 약물이 세포를 죽이는 독성이 없을 경우 cell control과 같이 100% survival을 나타내고 독성이 강하여 모든 세포가 죽었을 경우 0% survival을 나타낼 것이다. 세포의 50%를 죽일 수 있는 약물의 농도를 CC₅₀(50% cytotoxic concentration)으로 표시하는데 이 값이 높을 수록 세포독성이 적은 것을 뜻하며 좋은 약물로 간주된다. CC₅₀와 EC₅₀ 값을 비교하여 SI(Selectivity index = CC₅₀/EC₅₀)를 구

하였는데 이 값이 높을 수록 독성은 적고 약효가 큼을 뜻하는데 이 값이 적어도 10이상일 경우에만 이차 검색단계로 진입할 가치가 있다.

총 215개 균주로부터 제조된 550개의 시료를 검사한 결과 Fig. 3-3과 Table 3-2에 나타난 바와 같이 CC_{50} 와 EC_{50} 값 및 SI치를 구하였으나 9개의 시료에서 HSV-1과 HSV-2에 대하여 약간의 약효를 나타내었으며 14개의 시료에서 VERO 세포에 대한 독성을 나타내었다. SI 값이 10이상이 되는 후보물질을 찾기 위해서는 앞으로도 지속적인 검색이 이루어져야 할 것이다.

Antiviral activity report

Virus information		Host cell information		Assay information	
Virus	Bacth No.	Cell #	Vero (CCL 81)	Assy day	CPE/MTT
HSV-1(F)	920809	7			3
HSV-2(MS)	920917	good		Exp.No	93H05J
Inoc.size	100 CCID50	DMEM		Date	93/02/17

Compound	Conc.(V/V %)	MOCK	F	MS
A1363-A	10	84.7%	35.6%	21.2%
	3.3	82.0%	10.3%	2.8%
	1.1	81.2%	2.8%	0.5%
	0.36	80.4%	2.4%	0.5%
	0.12	82.6%	5.1%	0.5%
	CC50&EC50	>10	>10	>10

Compound	Conc.(V/V %)	MOCK	F	MS
A1363-C	10	77.2%	0.7%	-0.1%
	3.3	82.2%	3.7%	0.2%
	1.1	90.4%	2.5%	0.2%
	0.36	92.5%	0.4%	0.1%
	0.12	91.9%	3.4%	-0.0%
	CC50&EC50	>10	>10	>10

Compound	Conc.(V/V %)	MOCK	F	MS
A1363-E	10	87.3%	9.3%	0.0%
	3.3	90.2%	9.8%	0.0%
	1.1	91.7%	8.0%	0.2%
	0.36	92.2%	4.0%	0.1%
	0.12	95.5%	7.6%	-0.0%
	CC50&EC50	>10	>10	>10

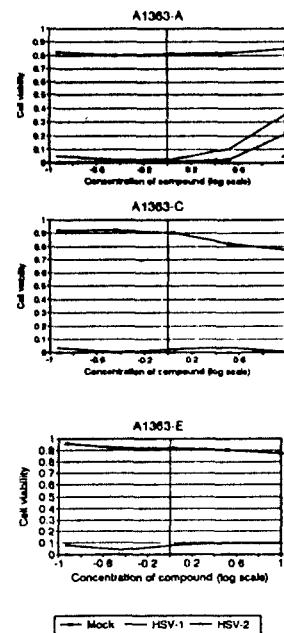


Fig. 3-3. Anti-herpes simplex virus activity report.

Table 3-2. Anti-herpes simplex virus activity report.

Summary									
No	#	Code	CC50(V/V %)	Source : KORDI-LHG		Host cell : Vero (ATCC CCL81)		Remark	
				EC50 (V/V %)		SI			
				F	MS	F	MS		
1	20	A1-A	>10	>10	>10	NC	NC		
2	21	A1-C	1.7	>1.7	>1.7	<1	<1		
3	22	A1-E	0.23	>0.23	>0.23	<1	<1		
4	23	A8-A	>10	>10	>10	NC	NC		
5	24	A8-C	>10	>10	>10	NC	NC		
6	25	A8-E	>10	>10	>10	NC	NC		
7	26	A10-A	>10	>10	>10	NC	NC		
8	27	A10-C	5.6	>5.6	>5.6	<1	<1		
9	28	A10-E	<0.12	<0.12	<0.12	NC	NC		
10	29	A621-A	>10	>10	>10	NC	NC		
11	30	A621-C	1.4	>1.4	>1.4	<1	<1		
12	31	A621-E	>10	>10	>10	NC	NC		
13	32	A652-A	8.8	>8.8	>8.8	<1	<1		
14	33	A652-C	5.6	>5.6	>5.6	<1	<1		
15	34	A652-E	>10	>10	>10	NC	NC		
16	35	A654-A	>10	>10	>10	NC	NC		
17	36	A654-C	>10	>10	>10	NC	NC		
18	37	A654-E	>10	>10	>10	NC	NC		
19	38	A655-A	>10	>10	>10	NC	NC		
20	39	A655-C	>10	>10	>10	NC	NC		
21	40	A655-E	>10	>10	>10	NC	NC		
22	41	A832-A	>10	>10	>10	NC	NC		
23	42	A832-C	>10	>10	>10	NC	NC		
24	43	A832-E	>10	>10	>10	NC	NC		
25	44	A1363-A	>10	>10	>10	NC	NC		
26	45	A1363-C	>10	>10	>10	NC	NC		
27	46	A1363-E	>10	>10	>10	NC	NC		
28	47	A3814-A	10	>10	>10	<1	<1		
29	48	A3814-C	>10	>10	>10	NC	NC		
30	49	A3814-E	>10	>10	>10	NC	NC		
31		ACV(1st)	>250	0.6	5	>416.6	>50	STD	
32		Ara-C(1st)	5	0.3	2.5	16.66	2	STD	
33		ACV(2nd)	>250	0.47	3.7	>531.9	>67.5	STD	
34		Ara-C(2nd)	6.7	0.32	2.3	20.9	2.9	STD	

3.6. sulfated polysaccharide 검색

3.6.1. Sulfated polysaccharide생산 미생물의 분리 및 특성

Sulfated polysaccharide를 생산하는 해양미생물을 찾기 위하여 채취원을 달리하는 달리하는 해양으로부터 약 1,500주의 미생물을 screening한 결과 약 10여 주의 미생물이 다당류를 생산하였다. 그 가운데 1주가 sulfate를 함유한 polysaccharide를 생산하였다. 이 균주의 특성은 위탁과제 보고서 Table 1에 보고된 바와 같이 그람 음성의 간균으로 glucose를 발효시키고 nitrate를 환원시키며 gelatinase와 alginine dihydrogenase를 생산하고 indole을 형성할 수 있으나 urease를 생산하지는 못했다. 탄소원으로 glucose를 이용할 수 있으나 arabinose, mannose, manitol, N-acetyl glucosamine, maltose, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate, phenylacetate를 이용할 수 없었다.

3.6.2. Sulfated polysaccharide의 특성

비색법에 의해 나타난 결과 crude polysaccharide는 소량의 protein을 함유하고 있는 비환원성의 hexose로 구성되어져 있으며 전분은 함유하고 있지 않는 것으로 나타났다. Hexoseamine은 존재하지 않는 것으로 나타났으며 uronic acid를 함유하고 있다. 전당(total sugar)의 측정결과 당의 함량은 46.4%(w/w)이었으며 53.65%(w/w)의 nonsugar compound로 구성되어져 있는 것으로 나타났다. 단백질 함량은 1.86%(w/w)이며 sulfate의 함량은 4.28%였다. IR spectrum으로 분석한 결과 당류 및 단백질에서 특이적으로 나타나는 3400cm^{-1} 에서의 강한 흡수가 관찰되었으며 $2880-2980\text{cm}^{-1}$ 부근의 C-H stretching, carboxyl기 유래의 1400 및 1600cm^{-1} 부근에서의 흡수가 관찰되었고 주로 uronic acid의 흡수를 나타내는 carbon산 2량체의 C=O의 신축

진동으로 고려되는 1725cm^{-1} 부근의 흡수도 관찰되었다. S-O의 진동으로 추측되는 1240cm^{-1} 에서의 흡수가 관찰되었으며 sulfate ester의 존재를 나타내는 830cm^{-1} 에서의 흡수도 관찰되었다 (위탁과제 보고서 참조).

3.6.3. 분리 조다당의 생리활성도 측정

분리된 sulfated polysaccharide의 생리활성을 검색하기 위해 Sarcoma-180 세포를 대상으로 항종양활성도를 검시하였다. Mouse 복강에서 키운 Sarcoma-180 세포를 96 well plate에 접종시킨 후 분리된 다당류를 첨가하여 배양한 결과 sulfated polysaccharide를 첨가할 경우 Sarcome cell에서 세포성장이 저해되었음을 나타내었다.

황합유 다당류의 herpes simplex virus, HIV-I등의 replication을 *in vitro*에서 저해하고 있는 것으로 보고되었는데 (Baba et al. , 1988a, b) 앞으로 이 다당류를 분리 정제해 나가면서 바이러스 저해능에 대한 조사가 필요하다.

3.7. 항종양활성물질의 분리정제

3.7.1. 방선균 A1318의 시간별 성장특성 및 활성도

A1318을 SZ배지에 배양하여 매일 시료를 채취하여 균체량의 증가, 색소형성과 pH의 변화를 조사하고 조추출액을 조사하여 세포독성을 조사하였다. Sample의 활성은 물총에서는 4일 이후에 최고에 다달했고 ethyl acetate 총에서는 3일 이후에 최고에 달하였다. 그림 3-4에 나타난 바와 같이 최종 pH는 7.7 정도에 도달하였다. 균체의 성장은 1일 까지 급속히 이루어 지며 이것은 A1318 균주의 성장을 위해 SZ 배지가 적합하다는 것을 말해주는

것이라 생각이 된다. 그것은 대부분의 미생물은 어떠한 배지에서 성장을 할때 그 배지에 적응을 하는 유도기가 존재하는데 A1318 균주는 유도기가 매우 짧은 것으로 나타났다.

A1318 균주는 성장하는 동안 붉은색의 균체를 생산하며 또한 붉은색의 색소를 분비한다. 미생물에 있어서 대부분의 색소 생성능은 이차대사와 관련되어 있으므로 A1318 균주의 활성물질 생산능력과 색소 생산능이 관련이 있는지의 여부를 알수 있으리라 생각되어 조사하였다. 그 결과 배양액의 560 nm에서의 O.D. 값은 1일 이후에 큰 폭으로 증가하고 다시 5일 후에 또 증가하는 양상을 나타낸다(그림 3-5). 활성검사인 세포독성능과 비교하여 보았을 때에는 1일째부터 활성이 나타나기 시작하였다. 그러나 sample 제조시 ethyl acetate로 추출한 추출액에서는 2일 이후부터 높은 수치의 활성을 나타낸 반면 물층에서는 2일째까지도 원액에서만 활성을 보였을뿐이다. 또한 pH의 변화에 있어서도 1일 이후에 매우 큰 폭으로 pH가 증가 하였다. 따라서 1일과 2일 사이에서 pH 와 O.D.의 증가, 그리고 2일 이후의 세포독성능의 증가와 같은 결과를 보면 세포독성 물질의 본격적인 생산은 1일과 2일 사이에 이루어지는 것으로 판단이 된다. 그리고 배양액의 pH와 O.D. 값은 초기 1일과 2일 사이에 같이 큰 폭으로 증가하여 관련이 있는 것으로 생각이 됐으나 5일 이후에 O.D. 값은 증가하는 반면에 배양액의 pH는 일정하게 유지되므로 관련이 없는 것으로 생각이 된다.

이와 같은 결과로 미루어 봄서 세포독성물질의 대량생산을 위한 배양시간은 약 4일에서 5일 정도만 배양을 해도 충분할 것이라고 사료된다.

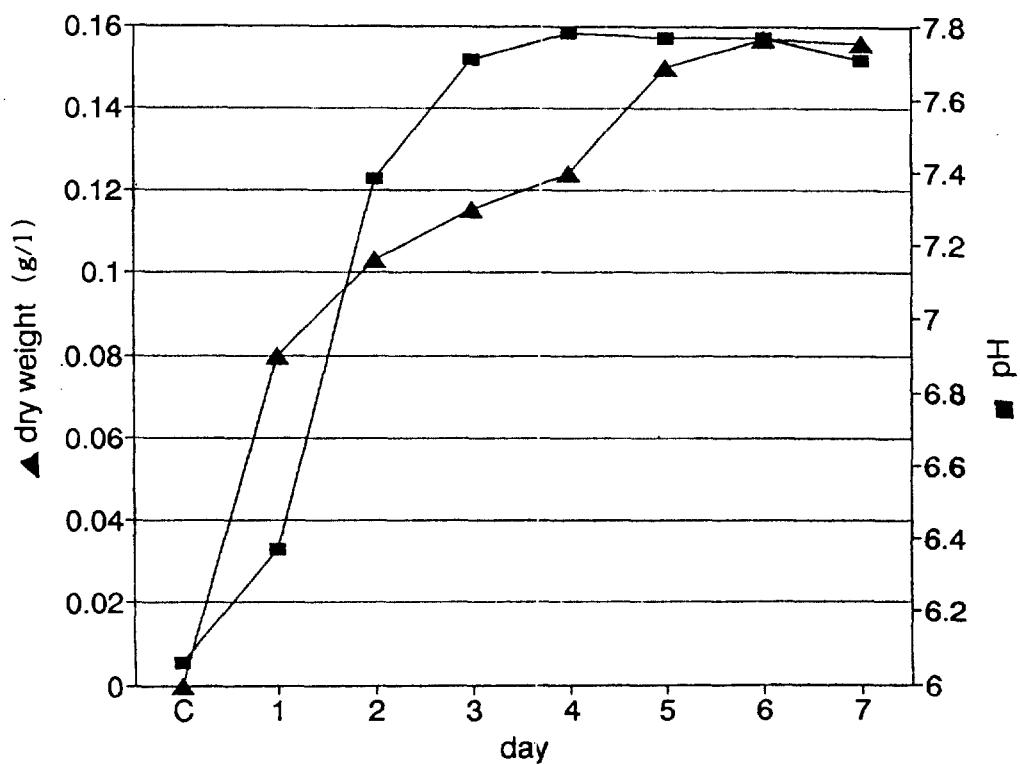


Fig. 3-5. Growth of A1318 on SZ medium.

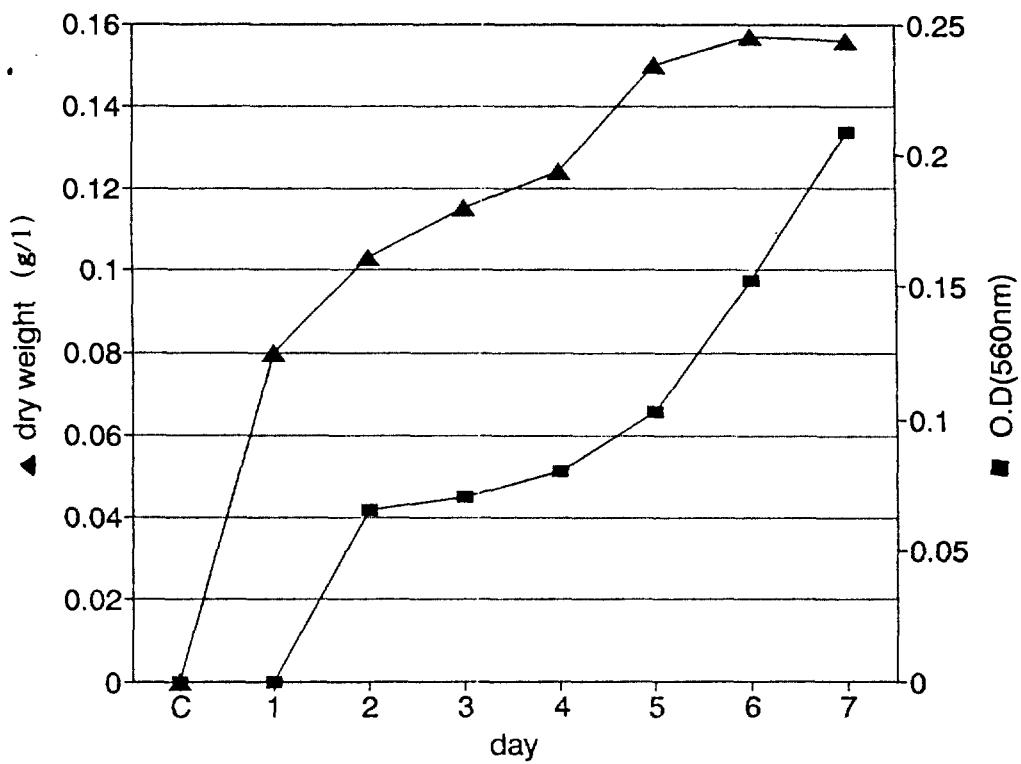


Fig. 3-6. Growth of A1318 on SZ medium and change of OD at 560 nm.

3.7.2. A1318의 분리정제

본 연구에서는 신규생체활성물질의 정제 및 구조분석을 위한 제반 기기의 설치를 완료하였다. Semi-preparative와 preparative용 HPLC를 각 1대 설치하였고 500 MHz superconducting FT-NMR system의 설치를 완료하였다. NMR system에는 첨단 2-D NMR 실험방법인 COSY, DQCOSY, TOCSY, HMBC, HMQC, HETCOR, 1H-Selective INEPT, INADEQUATE, NOESY등이 장착 완료되었고, 본 연구진에서 수행중인 관련연구과제인 해양동물에서 추출된 여러 가지 신물질에의 적용을 통하여 이들 첨단 실험방법을 습득하였다.

유기물의 추출을 위해 A1318을 상온에서 2 l의 media에 1주일동안 배양한 후 원심분리를 이용하여 균체와 상동액(supernatant)로 분리하였다. 균체는 distilled MeOH(500 ml x 3회)로 추출하였으며 상동액은 ethylacetate(2 l x 3회)로 분획하였다. 분리하고 남은 상동액은 rotavapor와 freeze dryer를 이용하여 대부분의 물을 제거한 후 ethyl acetate(500 ml x 2회)로 추출하였다. Methanol과 ethyl acetate용액을 합한뒤 rotavapor를 이용하여 추출용매를 완전히 제거한 후 남은 물질을 ethyl acetate(100 ml x 2회)로 추출하였고 ethyl acetate에 불용성인 물질은 다시 methanol(100 ml x 2회)로 추출한 뒤 inorganic salt로 생각되는 남은 물질은 버렸다. 최종적으로 용매를 제거한 뒤 무게를 쟁 결과 ethyl acetate와 methanol에 용출된 물질의 양은 각각 443.0 mg과 710.0 mg이었다. 추출과정을 간단한 diagram으로 표시하면 그림 3-6과 같다. 유기물질의 존재를 확인하기 위하여 TLC(silica PF₂₄₅, 100 % ethyl ether)를 측정한 결과 Rf 0.6, 0.5, 0.0에서 세개의 UV에 active한 spots이 ethyl acetate와 methanol층에서 함께 관찰되었다.

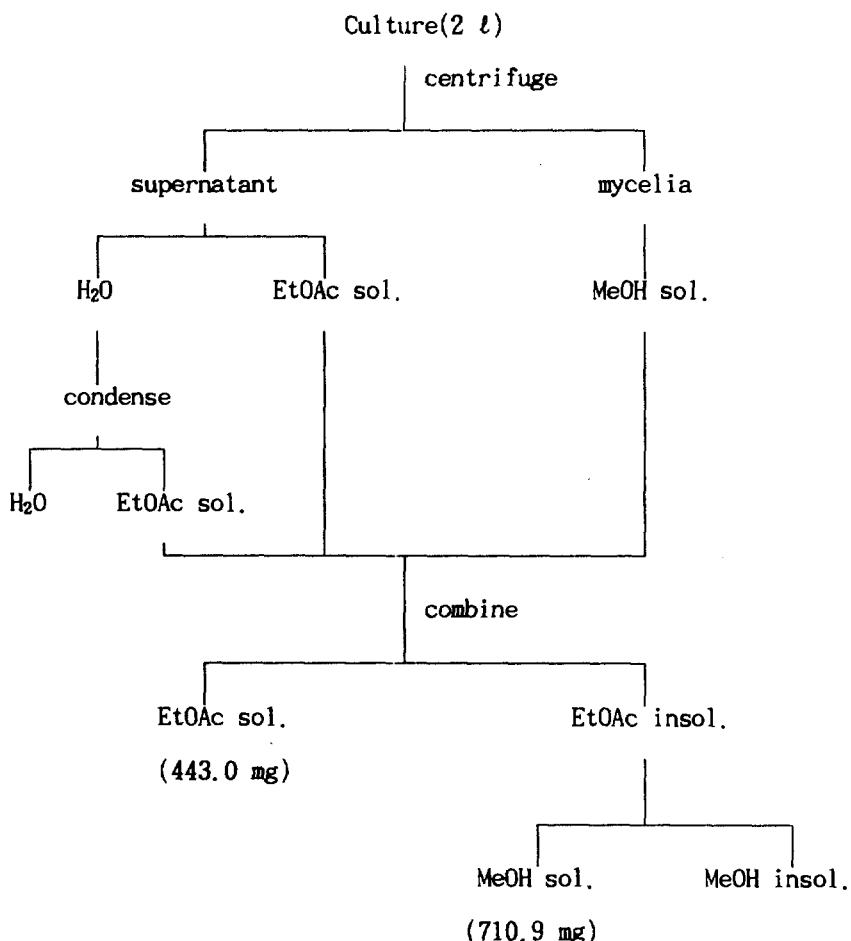


Fig. 3-6. Procedure for extraction of organic material from the culture of marine Actinomycetes strain A1318.

Ethyl acetate층에 강하게 나타난 non-polar compounds를 분리하기 위하여 silica vacuum flash chromatography를 하였다. 용매로서는 20 % ethyl acetate/n-hexne으로부터 시작하여 30, 40, 50, 70, 100 %까지 ethyl acetate의 양을 증가시킨 후 acetone과 methanol을 이용하여 극성물질을 용출시켰다. 각각의 fraction의 무게는 다음과 같다.

fr.	1	2	3	4	5	6	7	8
solvent	20 % EtOAc/ n-hex.	30 % EtOAc/ n-hex.	40 % EtOAc/ n-hex.	50 % EtOAc/ n-hex.	70 % EtOAc/ n-hex.	100 % EtOAc	100 % acetone	100 % MeOH
dry weight (mg)	145	50	29	35	22	23	38	101

각 fraction에 대한 proton NMR측정 결과 거의 모든 fraction에 있어서 포화 및 불포화 지방이 주요성분이었으나 수개의 fraction에서 소량의 흥미있는 물질이 함유되어 있는것을 확인하였다. 그러나 cytotoxicity측정 결과와 일치하지 않아서 이들 비극성 fraction에 대한 연구는 중단하였다.

한편 methanol 추출액은 극성물질이 주요 구성성분으로 생각되어 ODS reversed-phase vacuum flash chromatography로 분리하였다. 각 fraction에 대한 용출액과 물질의 양은 다음과 같다.

fr.	1	2	3	4	5
solvent	30 % H ₂ O/ MeOH	20 % H ₂ O/ MeOH	10 % H ₂ O/ MeOH	MeOH	EtOAc
dry weight	196 mg	49 mg	63 mg	37 mg	55 mg

위의 표에서 나타난 바와 같이 전체 710.9 mg의 methanol extract 중 약 45 %의 물질이 column packing material에 흡착된 후에 용출되지 않았다. 이 문제를 해결하기 위해서 물로부터 n-hexane에 이르는 여러가지 극성의 용매로 세척하였으나 추가적인 용출은 불가능하였다. 일반적으로 ODS reversed-phase chromatography에서는 다양한 극성의 용매를 사용할 경우 거의 모든 물질이 용출되는 것이 정상적인데 A1318의 extract에서 나타난 이런 현상은 상례를 벗어난 것으로서 그 원인은 알 수 없다.

ODS chromatography fraction에 대한 proton NMR을 측정한 후 cytotoxicity 측정 결과와 비교하였다. 그 결과 fraction 3과 4에 생리활성 물질이 함유되어 있는 것으로 추측되었다(Fig. 3-7, 3-8). 이 물질을 분리하기 위하여 ODS reversed-phase HPLC를 다양한 조건에서 시도하였다. 그러나 column chromatography와 동일한 현상이 일어났다. 즉 HPLC에서나 그 전단계 작업인 reversed-phase maxi-clean cartridge(Alltech)에 의한 washing에서도 거의 모든 물질이 packing material에 흡착된 후 전혀 용출이 되지 않았다. 소량의 용출된 물질을 proton NMR로 측정한 결과 간단한 불포화 지방산만 존재하는 것이 발견되었다. A-1318의 배양 추출액에서 나타난 이러한 현상의 원인은 알 수 없으며 보다 정밀한 조사가 필요할 것으로 생각된다.

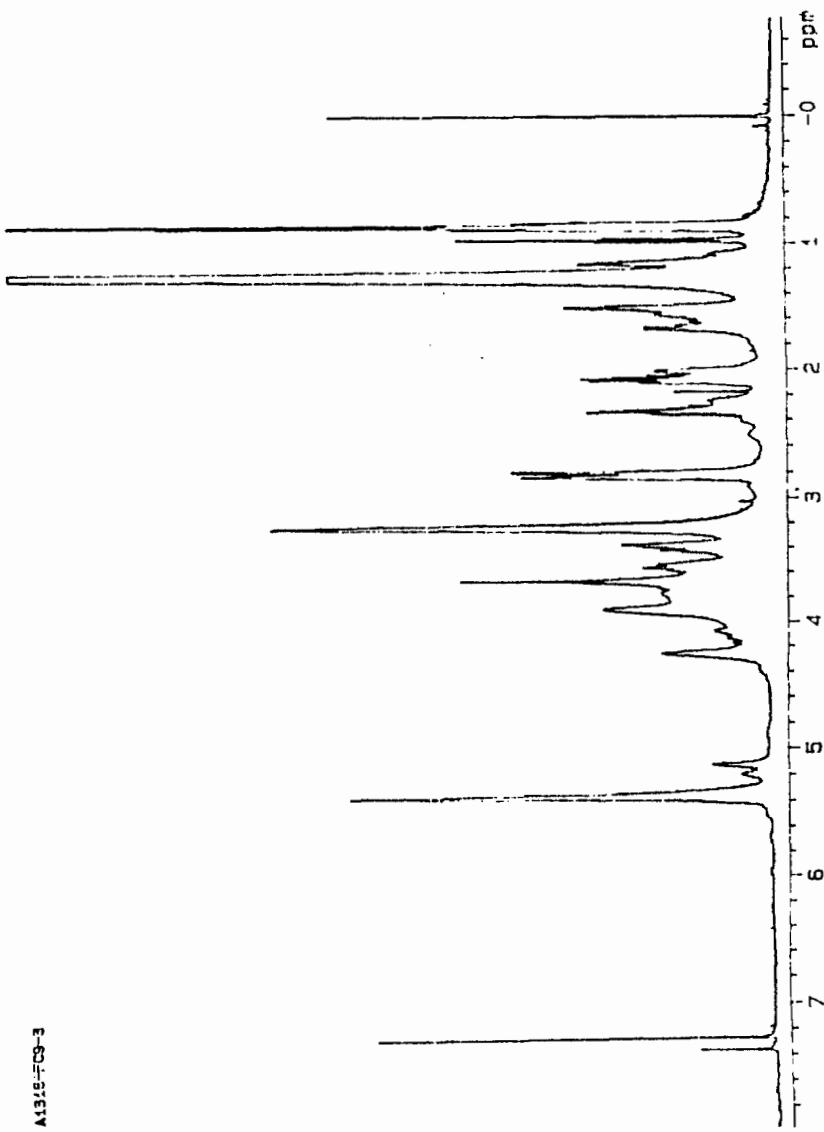


Fig. 3-7. Proton NMR spectrum of Fraction 9-3 from strain A1318.

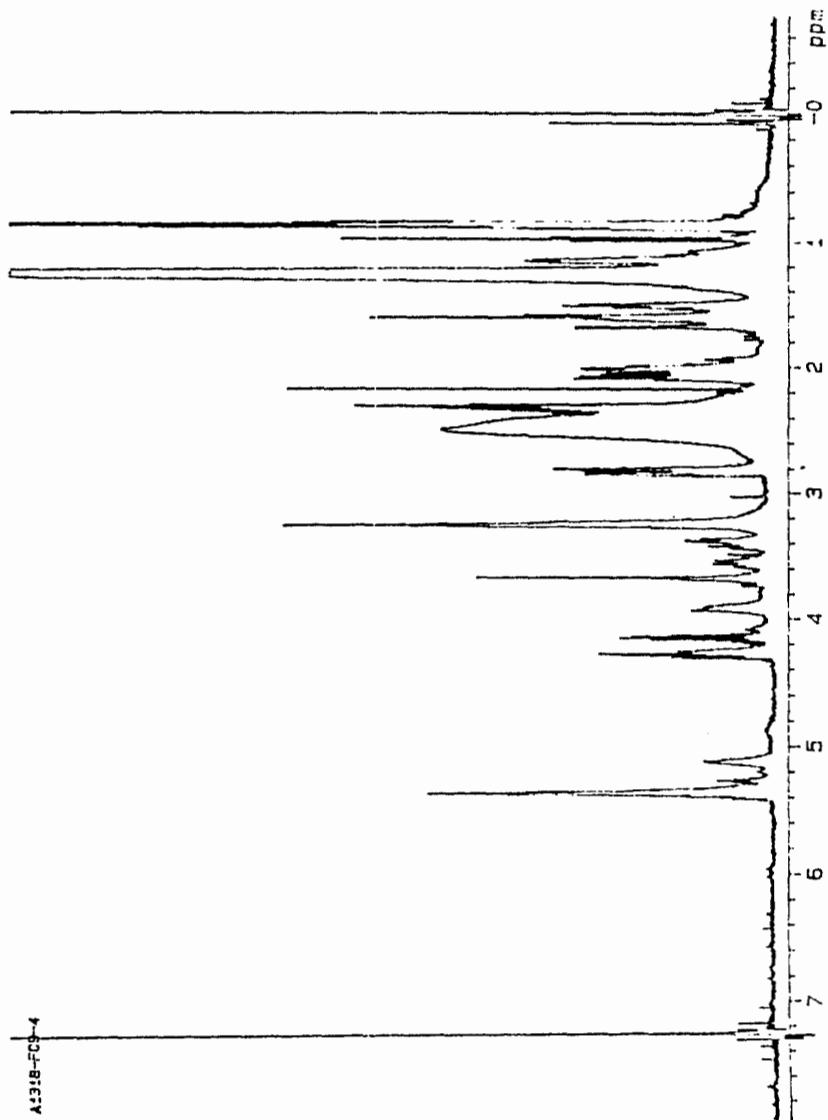


Fig. 3-8. Proron NMR spectrum of Fraction 9-4 from strain A1318.

3.8. 해양생물유래 생리활성물질(문헌중심)

신물질의 개발을 위해서는 기존 천연물에 대한 data search가 필수적이며 이는 많은 경우 신물질 구조결정에 있어서 결정적으로 중요하다. 향후에 분리될 생리활성물질물에 대한 신물질 여부의 결정과 신물질인 경우 기존물 질과의 구조적 유사성을 측정하기 위하여 chemical abstracts에 직접 접근이 가능한 STN express software를 도입, 설치 완료하였다. 아울러 현재 전세계 유수의 해양 미생물 연구진인 미국 Scripps 해양연구소의 Fenical group과의 연계하여 그들이 보유하고 있는 보다 광범위한 Database를 통한 간접 search망 또한 이용이 가능하게 되었다. 해양생물유래 생리활성물질에 관해 수집된 연구자료는 생물의 종류, 물질의 구조상의 특징 및 생리활성도에 따라 분류되었고 대표적인 물질에 관해서는 분리방법, 구조적 특징, 생리활성도, 전합성 및 생합성, 산업적 이용 방안 등이 분석되었다.

3.8.1. 해양미생물의 대사물질

3.8.1.1. 연구의 배경

현재까지 구조가 결정된 해양천연물의 수는 3,000을 훨씬 상회하고 있다. 이 중에서 해양미생물의 천연물은 숫자적인 면에서 대단히 미미한 위치를 차지하고 있다. Bacteria와 fungi 등 해양미생물(cyanobacteria를 제외한)로부터 분리된 물질은 85년도까지의 통계에 의하면 불과 30여개로서 이는 전 해양천연물의 1%에 불과한 것이다(Ireland et al., 1988). 최근 해양미생물의 대사물질의 출현 빈도가 상당히 증가하는 경향을 보이고 있으나 현재 까지 전체의 5%에도 미치지 못하고 있다.

육상천연물에서 미생물이 차지하는 증추적 위치와 비교하여 볼 때 해양미생물의 천연물에 대한 연구가 이렇듯 빈약함은 놀라운 일이다. 이 원인에 대

해서는 여러가지가 있으나 널리 알려진 것들을 요약하면 먼저 해양미생물에 대한 연구과정이 매우 복잡하다. 미생물의 천연물을 연구하기 위해서는 미생물의 분리, 동정, 보존, 시험배양 및 대량배양등 매우 복잡하고 긴 과정을 거쳐야 하며 많은 인력과 연구비가 소요된다. 그런데 현재 해양에서는 해조류와 저서군체동물등 연구대상 생물의 채집과 유기물질의 추출이 훨씬 용이한 대형 생물로부터 끊임없이 독특한 구조와 강력한 생리활성도를 가진 신물질이 분리되고 있으므로 해양미생물 연구의 시급성이 널리 인식되지 못하고 있다. 다른 원인은 해양미생물에 대한 생물학·생태학적 정보의 부족에 있다. 해양환경에 서식하는 무수한 미생물 중 실험실에서 배양에 성공한 종류는 10%에도 미달하며 더욱기 천연물 연구에 충분할 정도의 대량 배양은 더욱 어렵다. 다수의 해양미생물이 인위적인 배양조건에서 생존하지 못하는 원인도 현재까지 확실하지 않고 효과적인 배양배지의 개발도 이루어지지 않은 실정으로 실제로 해양환경에서 능동적으로 번식하는 진정한 해양미생물이 분리된 경우는 많지 않다.

Okami가 언급한 바와 같이 해양환경에는 다양한 종류의 고유한 미생물(*obligate marine microorganisms*)이 서식하고 있고 2차 대사물질의 생성은 *species-specific*이 아니라 *strain-specific*하며, 동일한 *strain*도 서식 조건에 따라 다른 천연물을 합성하는 예가 많으므로 육상미생물도 해양환경에 서식하는 종(*facultative marine microorganisms*)은 기존의 천연물과는 전혀 다른 구조의 생리활성 물질을 합성할 가능성이 매우 높다(Okami, 1986). 최근 해양미생물의 천연물이 보고된 예가 계속적으로 증가하고 있고 이들중 상당수는 전혀 새로운 탄소골격과 강력한 생리활성도를 갖고 있음이 밝혀졌다. 또한 유기조추출물에 대한 생리활성도 측정 결과도 이들이 천연물 연구대상으로서의 가치가 매우 높은 것으로 밝혀졌다(Shin, 1989). 그리하여 최근 해양미생물에 대한 연구가 점차 활발해지는 경향을 보이고 있으며 연구소와 대학뿐만 아니라 Bristol-Myers등 대기업에서도 직·간접으로 천연물의 개발에 참여하는 경우가 늘고 있다(Newman et al., 1989). 이러한 추세

는 미래에도 계속될 것이며 가까운 장래에 해양미생물이 신기능 생체활성물질의 보고로서 널리 인식될 것으로 기대된다.

3.8.1.2. 해양 bacteria의 대사물질

현재까지 알려진 해양 bacteria의 대사물질의 수는 40을 조금 상회한다. 이들의 구조는 매우 다양하여 1차 대사물질과 구조적으로 유사한 소형의 aromatics로부터 대형의 macrolides까지 폭넓게 분포한다. 이들의 생합성적 기원 또한 다양하여 polyketides, shikimic acid, amino acids 등으로부터 기원한 물질들이 다수를 이루고 있다. 그러나 해양천연물중 가장 빈번히 출현하는 terpenoids 즉 mevalonate로부터 기원한 물질은 현재까지 발견되지 않았다.

해양 bacteria의 대사물질을 육상에서 분리된 것과 비교하면 구조적 차이가 뚜렷하지 않다. 동일한 탄소골격을 갖고 있는 경우가 많고 심지어는 동일한 물질이 서식환경에 관계없이 추출되는 경우도 있다. 그러나 최근 octalactins나 macrolactins 등 육상 bacteria로부터 전혀 추출된 바가 없는 새로운 탄소계열의 물질이 점차 발견되고 있다. 따라서 육상과 해양 bacteria간의 대사물질의 구조적 특징의 비교는 보다 많은 해양 천연물의 구조가 결정된 후에 가능할 것이다.

미생물도 다른 생물과 마찬가지로 동일환경에 서식하는 생물과 격심한 생존경쟁을 하며 그 수단으로서 항생효과를 가진 대사물질을 생성하는 것은 육상미생물의 예로부터 잘 알려져 있다. 육상과 마찬가지로 해양 bacteria도 항생물질을 생성한다. 이들은 동일환경에 서식하는 다른 미생물의 성장을 억제할 뿐 아니라 자기 자신의 성장 또한 억제하는 (autotoxification) 효과를 나타낸다. 해양 bacteria로부터 얻어진 최초의 항생물질은 *Pseudomonas bromoutilis*로부터 얻어진 aromatic compound인 pentabromopseudilin이다. 강력한 항암 효과를 가진 이 물질의 구조는 분광자료 해석에 의하여 결정되

었으며 최근에 전합성을 통하여 구조확인에 성공하였다. 이 물질은 또한 *Chromobacter* sp.로부터 분리되었는데 이 경우에는 tetrabromopyrrole, hexabromo-2,2'-bipyrrole, p-hydroxybenzaldehyde등이 함께 분리되었다. 이들 소형의 aromatics은 배양액에 포함된 tryptophan과 tyrosine등의 amino acids가 bacteria의 체내에서 간단한 생합성적 반응에 의하여 생성된 것으로 추정된다. 소형의 aromatics는 육상의 bacteria나 fungi등으로부터도 흔히 추출되나 *Pseudomonas*와 *Chromobacter*로부터 분리된 이들 bromine을 함유하는 물질들은 bromine이 많은 해수에서 서식하는 미생물에서만 추출되는 것으로서 고유한 해양천연물로 간주된다. 위에서 언급한 소형의 aromatics와 함께 medium size chain을 갖고 있는 quinolinols가 pseudomonid bacterium strain으로부터 분리되었다.

경제적으로 가치있는 해양 무척추동물의 양식에 있어서 큰 장애요소는 해양 fungi에 의한 egg와 larvae의 폐사이다. Lower fungi에 의하여 주로 발생하는 이 질병은 이환율과 치사율이 매우 높아 양식산업에 큰 피해를 가져오는 경우가 많다. 최근 미국의 Fenical그룹에서는 shrimp *Palaeomon macrodactylus*의 egg로부터 *Alteromonas*에 속하는 strain을 분리 배양하여 2,3-indolidione 즉 isatin을 분리하였다. 이 물질은 *P. macrodactylus*에 질병을 일으키는 lower fungus *Lagenidium callinectes*에 대하여 타월한 항진균 효과를 갖고 있으나 숙주인 *P. macrodactylus*에 대해서는 무해함이 밝혀졌다. 정밀한 생태학적 실태에 의하여 *Alteromonas* sp.와 *P. macrodactylus*간의 공생관계가 규명되었다. 이 연구결과는 수산양식 산업에 큰 도움이 되었을 뿐 아니라 오랜기간 가설로만 존재하였던 해양고등동물과 미생물간의 공생관계에 대한 첫번째 증거로서 생태학적인 면에서 큰 의의가 있는 것으로 평가되었다. 최근 Fenical그룹에서는 lobster의 egg로부터 bacteria strain을 분리 배양하여 유사한 항진균효과를 갖고 있는 물질을 추출하였는데 이 경우 항생물질은 ubiquinone계열의 물질로 밝혀졌으나 자세한 연구결과는 보고되지 않았다.

Diketopiperazines 즉 두 분자의 amino acids가 6-membered ring을 이루고 있는 물질은 육상과 해양을 통하여 여러 생물로부터 분리된다. 해면 *Tedania ignis*로부터 분리되었던 세 개의 diketopiperazines가 동일한 시료로부터 분리·배양된 *Micrococcus* sp.로부터 추출되었다. 이 사실은 해면과 미생물간의 공생관계를 지지할 뿐 아니라 고등해양동물로부터 추출된 천연물의 상당수가 공생 미생물에 의하여 생합성된 것이라는 가설에 대한 중요한 증거이다.

심해 퇴적물로부터 분리된 *Bacillus* sp.로부터 알려진 항생물질인 3-amino-3-deoxy-D-glucose가 분리되었다. Aromatic acids인 rubrenoic acids A-C가 *Alteromonas rubra*로부터 분리되었다. 이들의 구조는 분광자료 해석에 의하여 결정되었으며 전합성에 의하여 확인되었다. Rubrenoic acids는 *in vitro* test 결과 기관지확장(bronchodilator)효과가 있음이 밝혀졌다.

전기한 diketopiperazines 이외에도 고등해양생물로부터 분리된 천연물이 후에 해양미생물로부터 재차 분리되어 생합성적 생산주체가 정정되어진 경우가 몇 가지 있다. 식용의 해양동물이 갑자기 독성을 띠게 될 때 이는 대부분 미생물나 단세포 조류등이 생성한 독성물질이 동물의 체내에서 농축된 것이다. 일본의 Suruga Bay에서 채집된 연체동물 *Babylonia japonica*의 소화선으로부터 대단히 복잡한 구조를 가진 alkaloid surugatoxin이 분리되었으며 그 구조는 X선 결정 분석에 의하여 확인되었다. 계속하여 다른 시료로부터 유도체인 neosurugatoxin과 prosurugatoxin이 분리되었으며 이들은 전합성에 의하여 구조가 확인되었다. Surugatoxins의 구조결정과 함께 이들이 *B. japonica*의 체내에서 주기적으로 발견된다는 사실은 surugatoxins의 생산주체가 미생물일 것이라는 추측을 놓았다. 최근 *B. japonica*의 digestive gland로부터 분리된 Coryneform bacterium의 배양액으로부터 surugatoxins이 발견되어 이 가설을 증명하였다.

복어의 신경독인 tetrodotoxin은 해양천연물중 가장 널리 알려진 물질이다.

이 물질의 강력한 독성과 독특한 구조 및 반응기작은 많은 연구를 유발시켰고 현재는 신경세포의 연구를 위한 연구용 시약으로 이용되고 있다. 그러나 이 물질은 복어 이외에도 여러 해양동물로부터 분리되었으며 심지어는 육상의 양서류로부터도 분리되었다. 최근 tetrodotoxin과 유도체들이 *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Vibrio* 등 여러종류의 해양 bacteria로부터 분리되었으며 특히 복어 *Fugu poecilonotus*의 피부로부터 분리된 *Pseudomonas*로부터 분리되었다. 이 사실로서 tetrodotoxins이 여러 해양동물로부터 발견되었던 원인이 규명되었다.

Prodigiosin은 bacteria로부터 흔히 발견되는 붉은 빛깔의 항생물질이다. 이 계열에 속하는 6-membered ring을 가진 물질이 *Alteromonas rubra*와 *Beneckea gazogenes*로부터 분리되었으며 그 구조는 분광자료 해석에 의하여 결정되었다.

Bacteria나 다른 미생물들은 금속이 성장에 필수적인 경우가 많다. 이들 금속은 free ion의 형태로 세포막을 통과할 수 없으므로 미생물은 metal ion과 chelation이 가능한 유기물질을 생성하여 이들을 세포막 바깥으로 배출하여 metal과의 complex를 형성시킨 후 그 complex를 세포막을 통하여 흡수한다. 이러한 유기물질을 ionophores라고 하며 특히 iron에 대한 chelation을 목적으로 생성된 물질을 siderophores라 부른다. 이들 ionophores는 여러가지 형태가 있으나 널리 알려진 것은 polycyclic ethers 와 aromatic peptides이다. 해양 bacteria로부터도 수종의 siderophores가 발견되었다. 어류에 질병을 일으키는 *Vibrio anguillarum*으로부터 anguibactin이 분리되었다. 이 물질의 구조는 유도체를 이용한 X선 결정구조 분석에 의하여 결정되었다. 또한 *Alteromonas haloplankis*로부터 siderophore인 bisucaberin이 분리되었다. 대단히 특이한 대칭적 구조를 가진 cyclic peptide인 이 물질의 구조는 분광자료 해석에 의하여 결정되었으며 전합성에 의하여 확인되었다.

육상에서 soil actinomycetes가 신물질 특히 생리활성 물질의 보고임은 주

지의 사실이다. 해양에서도 actinomycetes로부터 새로운 생리활성 물질이 지속적으로 발견되고 있다. 해양 actinomycetes의 대사물질에 대한 연구는 주로 일본의 Okami 그룹과 미국의 Fenical 그룹에 의하여 주도되고 있는데 이들은 다년간의 노력에 의하여 특수한 환경에 서식하는 bacteria를 위한 새로운 배양조건을 개발하고 전혀 새로운 탄소골격을 가진 생리활성 물질을 발견하는 등 해양 bacteria의 연구에 기여한 바가 매우 크다. 향후로도 이들 두 그룹이 상당기간 해양미생물의 천연물에 대한 연구를 선도할 것으로 추측된다.

Okami 그룹은 천해저 퇴적물로부터 분리한 actinomycete *Chainia* sp.로부터 항생효과가 있는 polyketide계 aromatic compound인 SS-228Y를 분리하였다. 이 물질은 열이나 빛에 대한 안정성이 약하여 쉽게 naphthacene quinone인 SS-228R로 변한다. 분광자료의 해석에 의하여 처음 제시되었던 구조는 후에 수정되었고 각각 다른 두 가지 경로를 통하여 합성에 성공하였다.

Sagami Bay의 퇴적물에서 분리한 actinomycete *Streptomyces griseus*의 marine strain SS-20로부터 육상천연물 boromycin과 유사한 구조를 가진 boron-containing macrolide ionophore인 aplasmomycins A-C가 분리되었다. Aplasmomycin A의 구조는 유도체에 대한 X선 결정구조 분석에 의하여 결정되었고 B와 C는 A와의 분광자료 비교에 의하여 결정되었다. 이들의 gram positive bacteria에 대한 항생효과는 alkali metal과의 ionophore적 결합에 의한 것이라는 사실이 밝혀졌다. 이 연구와 관련하여 발견된 특이한 사실은 Okami 그룹에서 다양한 배양조건을 이용하여 aplasmomycins의 생산조건을 연구한 결과 해수의 절반정도의 salt 함량과 해초를 배양액에 포함하는 것이 aplasmomycins의 생산에 최적조건이라는 것을 발견한 점이다. 해양미생물의 배양에 해초가 좋은 media로 이용된다는 사실은 현재까지 해양미생물에 대한 연구에 큰 장애요소였던 media의 개발에 좋은 가능성을 던져준다.

Streptomyces tenjimariensis SS-939로부터 aminoglycoside계 항생물질인

istamycins A와 B가 분리되었다. Gram positive와 negative bacteria에 대한 광범위 항생효과를 갖고 있는 이들의 구조는 분광자료 해석에 의하여 결정되었고 합성에 의하여 확인되었으나 상세한 연구결과는 보고되지 않았다. Fenical그룹은 열대의 산호로부터 분리한 *Streptomyces* sp. (strain PG-19) 으로부터 8-membered ring lactone을 가진 octalactins A와 B를 분리하였다. Octalactin A의 구조는 X-선 결정구조 분석에 의하여 그리고 B의 구조는 A와의 분광자료 비교에 의하여 결정되었다. 생리활성도 측정결과 octalactin A는 강력한 항암효과가 있음이 밝혀졌다. 그러나 A의 epoxide 가 double bond로 치환된 B는 항암효과가 전혀 없었다. 또한 분류되지 않은 actinomycete strain으로부터 C₁₅ linear butenolide를 분리하였다. 이 물질의 구조는 분광자료 해석에 의하여 결정되었고 전합성에 의하여 확인되었다.

Fenical그룹은 최근 deep-sea sediment core로부터 분리된 gram positive bacterium(strain C237)으로부터 macrolides인 macrolactins A-F와 macrolactic acid 및 isomacrolactic acid를 분리하였다. 다른 미생물로부터 발견된 바가 없는 24-membered lactone을 갖고 있는 이들의 구조는 분광 자료 해석에 의하여 제시되었고 비 대칭탄소의 절대배열은 부분합성에 의하여 결정되었다. 생리활성도 측정결과 주 대사물질인 macrolactin A는 항미 생물 및 항암효과와 함께 HSV-I, -II, HIV등의 virus에 대한 강력한 억제효과가 있음이 밝혀졌다. Bacteria strain의 분리조건과 구조의 특이성 및 강력한 생리활성도 등으로 인하여 macrolactins는 큰 주목을 끌고 있다. 위에서 언급한 물질들 이외에도 몇가지 연구사례가 보고되었으나 충분한 자료가 제시되지 않았거나 해당 물질이 천연물의 범주를 벗어나는 것이어서 간략히 언급하기로 한다. 먼저 중국에서 분리한 *Streptomyces rugresensis gulangyunensis*로부터 광범위 항생효과를 나타내는 antibiotic 8510-1이 분리되었다. 그러나 kasugamycin계열로 알려진 이 물질의 상세한 구조와 구조결정 방법은 보고되지 않았다. Sagami Bay에 서식하는 해초로부터 분리

된 *Flavobacterium uliginosum*(strain MP-55)으로부터 heteroglycan계의 polysaccharide인 marinatan이 분리되었다. 이 물질은 항암효과와 면역증진 효과가 매우 높음이 밝혀졌다. 소련에서 분리한 *Streptomyces*(strain KMM 9BS12A)로부터 분자량이 85kDa에 달하는 protein complex가 분리되었다. Palmorocin으로 명명된 이 거대물질은 gram positive bacteria에 대한 항생효과가 있음이 밝혀졌다.

3.8.1.3. 해양 fungi의 대사물질

Marine fungi에 대한 천연물화학적 연구는 marine bacteria에 비하여 덜 활발하다. 알려진 물질의 수도 30에 미달하며 생리활성 물질의 출현빈도도 훨씬 낮다. 이 원인은 전기 3.8.1.1. 연구의 배경에서 설명한 바와 같이 대부분의 연구가 특정한 한종류의 fungi 즉 lignicolous fungi에 대하여 집중되어 왔고 성장속도가 느리고 enzyme activity가 낮은 이 종류의 fungi는 대량배양이 어렵고 2차 대사물질을 생산하지 않는 경우가 많기 때문이다. 그러나 이들 lignicolous fungi도 항생물질등 생리활성물질을 생산한다는 간접적인 증거가 보고되었고(Table 3-3, Shin, 1989) 최근에 phomactins등 생리활성 물질이 발견되는 등 해양 fungi도 천연물화학적 연구가 점차 활발하여질 전망이다.

Marine fungi의 대사물질중 가장 먼저 보고된 것은 ascomycete *Leptosphaeria oraemaris*로부터 분리된 작은 lactone-amide leptosphaerin이다. 이 물질의 구조는 X선 결정구조 분석에 의하여 제시되었으나 전합성에 의하여 수정되었다. Leptosphaerin의 C6-꼴격은 배양액에 포함된 glucose가 분해되어 형성된 것으로 추정된다. 동일한 *L. oraemaris*의 다른 strain으로부터 육상 fungi의 대사물질로 알려진 sesquiterpene culmorin이 분리되었다. Deuteromycete *Asteromyces cruciatus*로부터 육상의 *Penicillium*의 대사물질로 알려진 gliovictin이 매우 높은 수율로 얻어졌다. Gliotoxin계

Table 3-3. Antimicrobial and cytotoxicity of marine fungal extract.

extracts		antimicrobial activity ^{a,b}					cytotoxicity ^{c,d}	
		1	2	3	4	5		
facultative fungi	A ^e	-	65	30	71	63	37	41
		+	8	28	2	4	17	-
		++	2	11	2	6	10	6
		+++	-	6	-	2	11	1
		total	75	75	75	75	75	48
	B ^e	-	33	25	37	34	30	NT
		+	3	10	-	3	4	
		++	1	2	-	-	2	
		+++	-	-	-	-	1	
		total	37	37	37	37	37	
lignicolous fungi	A ^e	-	33	12	30	23	13	29
		+	4	26	8	15	22	-
		++	1	-	-	-	3	7
		+++	-	-	-	-	-	-
		total	38	38	38	38	38	36
	B ^e	-	38	34	38	35	37	NT
		+	-	3	-	3	1	
		++	-	-	-	-	-	
		+++	-	1	-	-	-	
		total	38	38	38	38	38	

^a 1 - 5 are test organisms (1 = *Candida albicans*, 2 = *Bacillus subtilis*, 3 = *Escherichia coli*, 4 = *Streptococcus* sp., 5 = *Staphylococcus aureus*). ^b - ~ +++ are activities of 20 µg of extracts (- inactive, + < 5 mm, ++ 5 - 10 mm, and +++ > 10 mm of inhibition zone, respectively).

^c Cytotoxicity were measured by ED₅₀. ED₅₀ < 5 µg of extract were considered to be active (++ 0.1 - 5 µg, +++ < 0.1 µg). ^d NT were not tested. ^e A and B are extracts from media and mycelia, respectively.

(Shin, 1989).

diketopiperazine인 이 물질의 구조는 분광자료의 비교에 의하여 결정되었다. Ascomycete *Helicascus kanaioanus*로부터 helicascolides A와 B 그리고 (S)-(+)-ochracin등 세개의 lactones이 얻어졌다.

Mexico의 천해 sediment로부터 분류되지 않은 fungal strain이 분리되었는데 이 strain으로부터 육상 fungi의 독성물질로 유명한 trichothecene계의 macrolides가 대량(600mg/l)으로 분리되었다. 이들 중 주요 대사물질인 verrucarins A와 J, roridins H와 K acetate등의 구조는 기존 자료와의 분광데이타 비교에 의하여 결정되었다. Verrucarins와 roridins는 강력한 생리활성도로 인하여 연구용 시약으로 이용되고 있는 물질들이다. 전기한 gliovintin이나 trichothecene와 같이 비록 알려진 물질이라도 해양환경에서 분리된 미생물의 strain이 매우 높은 수율로 천연물을 생산한다는 사실은 해양미생물의 천연물에 대한 연구가 신물질의 개발 이외에도 유용물질의 대량 생산의 측면에서도 대단히 큰 연구가치가 있음을 시사한다.

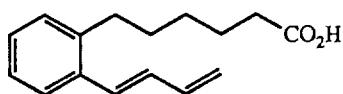
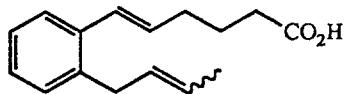
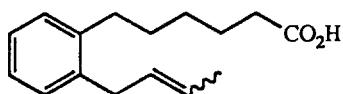
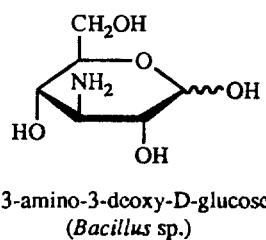
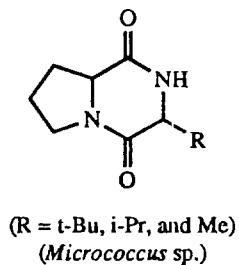
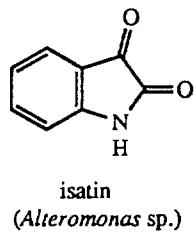
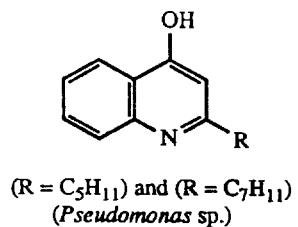
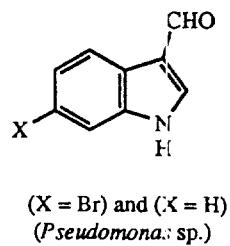
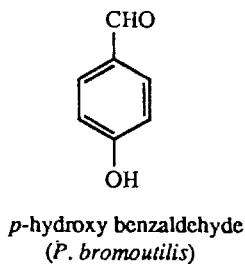
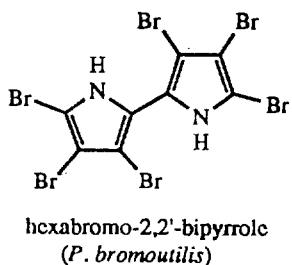
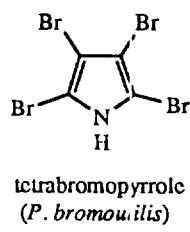
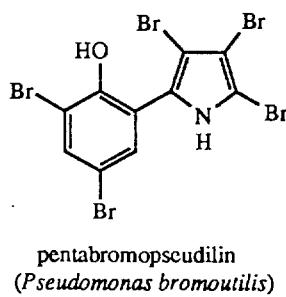
현재까지 해양 fungi중 신물질이 가장 많이 추출된 것은 deuteromycete에 속하는 *Dendryphiella salina*이다. 먼저 형광을 띠는 steroid인 (22E)-ergosta-4,6,8(14),22 -tetraen-3-one이 분리되었다. Fungi의 대표적인 steroids인 ergosterol계열에 속하는 이 물질은 ergosterol이 산화되는 과정에서 2중 결합의 위치가 바뀐것으로 추측된다.

*Dendryphiellin A*는 eremophilane계의 trisnorsesquiterpene과 C9 fatty acid chain이 결합되어 형성된 물질이다. Eremophilane계의 sesquiterpene은 고등식물이나 동물에서는 흔히 발견되나 fungi에서는 대단히 드물게 발견되며 특히 rearranged skeleton의 eremophilane골격의 terminal isopropyl기가 분리되어 형성된 trinoreremophilane골격은 다른 생물로부터 발견된 바가 없다. 계속하여 dendryphiellins B-G와 A₁, E₁, E₂등의 유도체가 분리되었다. 이들 중 dendryphiellins E, E₁, E₂, F 및 G는 완전한 eremophilane골격을 갖고 있어서 이들이 trinoreremophilane의 생합성적 전구물질임을 나타낸다. 또한 glycer-1- dendryphiellate, dendryphiellic

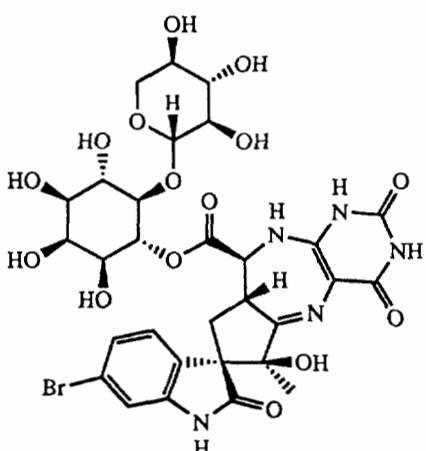
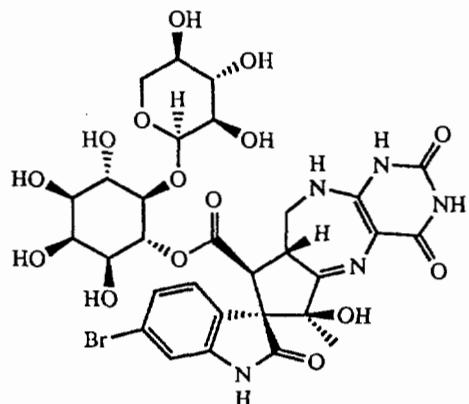
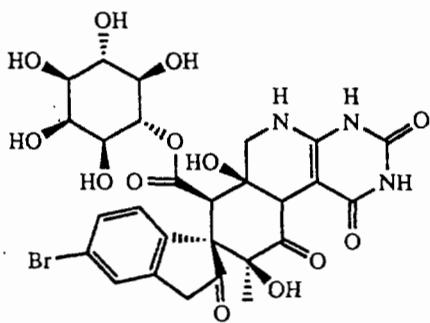
acids A와 B등 linear carboxylic acids가 함께 분리되었는데 이들이 eremophilane과 결합하여 dendryphiellins을 형성한 것으로 추측된다. 이들 *D. salina*의 대사물질의 구조는 분광자료 해석에 의하여 결정되었으며 생리활성도는 보고되지 않았다.

해양 fungi의 대사물질중 가장 흥미로운 것은 최근에 보고된 phomactins이다. 일본 근해에 서식하는 게 *Chinoecetes opilio*의 껍질로부터 분리한 fungus *Phoma* sp.로부터 rearranged diterpenoid인 phomactin A가 분리되었다. phomactin A의 구조는 분광자료 분석과 X선 결정분석에 의하여 결정되었다. 이 물질의 3중고리 탄소골격은 지금까지 동.식물이나 미생물에서 발견된 바가 없는 새로운 것이다. 생리활성도 측정결과 phomactin A는 대단히 강력한 PAF(platelet activating factor) antagonistic activity를 갖고 있으며 그 작용기작이 다른 PAF antagonists와 전혀 다름이 밝혀졌다. 최근 동일한 *Phoma* sp.로부터 phomactin A와 구조적으로 관계가 깊은 bicyclic diterpenoid phomactin B가 분리되었다. Phomactin B는 A보다 10배이상 강력한 PAF antagonistic activity가 있음이 밝혀졌다. 최근 phomactin B는 물질특허와 용도특허를 획득하였다.

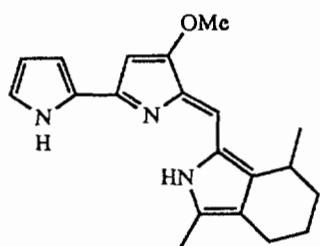
지금까지 수집된 대표적인 해양미생물유래 대사물질의 구조는 다음과 같다.



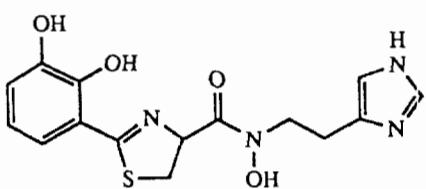
rubrenoic acids A (upper left), B (upper right)
and C (left) (*Alteromonas rubra*)



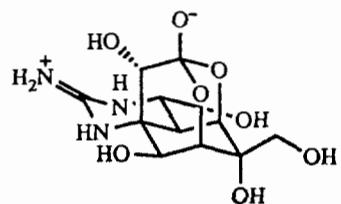
surugatoxin (upper left), neosurugatoxin
(upper right) and prosurugatoxin (left)
(a Coryneform bacterium)



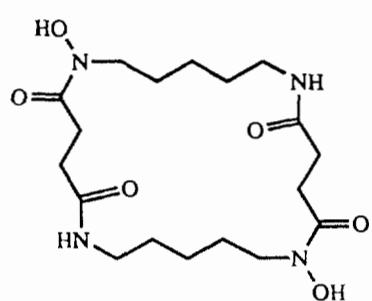
cyclic prodigiosin
(*Alteromonas rubra* and *Beneckea gazogenes*)



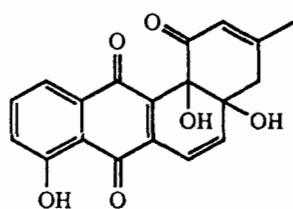
anguibactin
(*Vibrio anguillarum*)



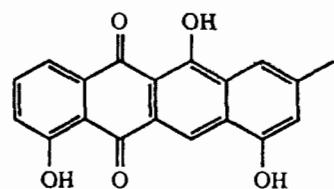
tetrodotoxin
(*Pseudomonas*, *Alteromonas*,
and *Vibrio* spp.)



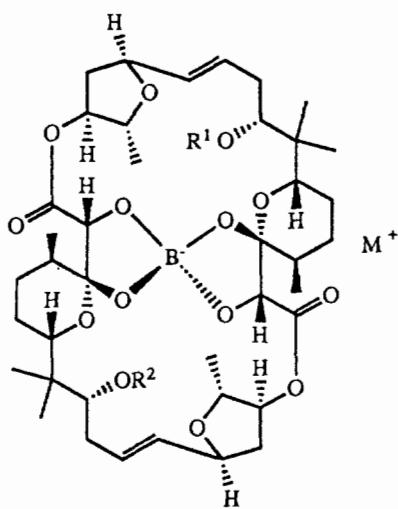
bisucaberin
(*Alteromonas haloplankis*)



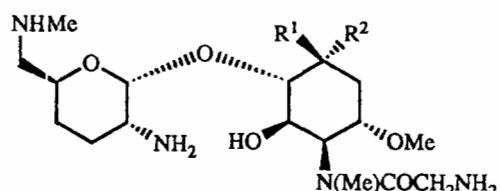
antibiotic SS-228Y
(*Chainia* sp.)



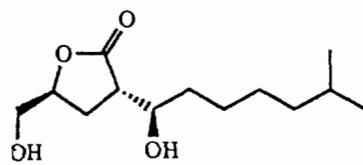
SS-228R



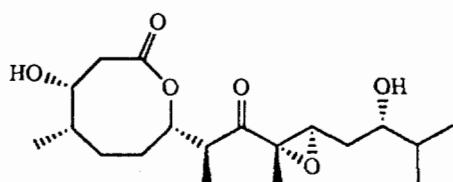
aplasmomycin A : $R^1 = R^2 = H$
B : $R^1 = Ac$, $R^2 = H$
C : $R^1 = H$, $R^2 = Ac$
(*Streptomyces griseus*)



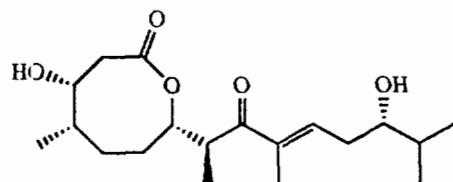
istamycin A : $R^1 = NH_2$, $R^2 = H$
B : $R^1 = H$, $R^2 = NH_2$
(*Streptomyces tenjimariensis*)



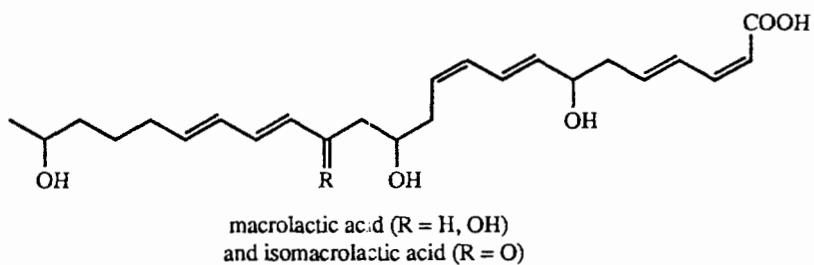
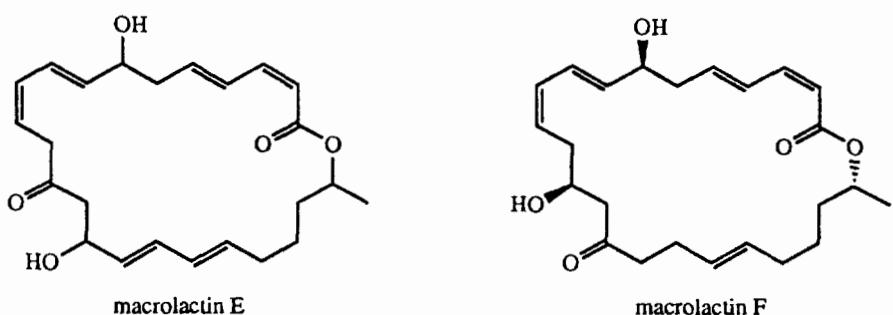
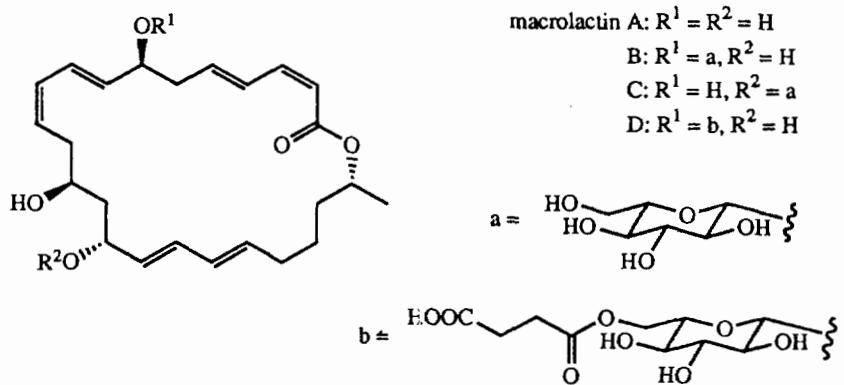
(unknown actinomycete)



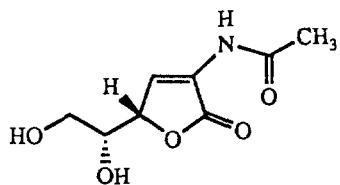
octalactin A
(*Streptomyces* sp.)



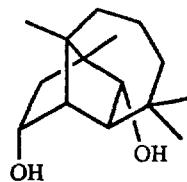
octalactin B
(*Streptomyces* sp.)



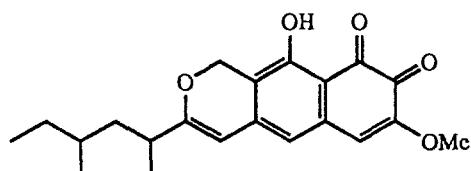
macrolactins from a gram positive bacterium (C237) isolated from a deep sea sediment core



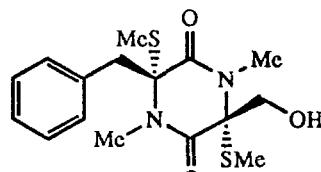
leptosphaerin
(*Leptosphaeria oraemaris*)



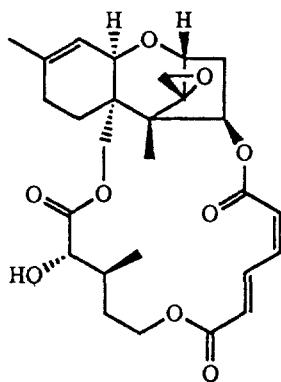
culmorin
(*Leptosphaeria oraemaris*)



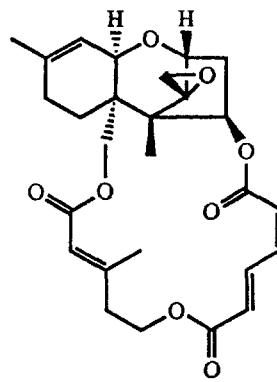
obionin A
(*Leptosphaeria obiones*)



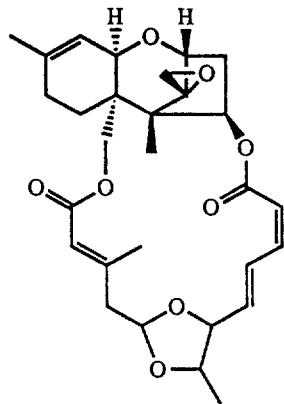
gliovictin
(*Asteromyces cruciatus*)



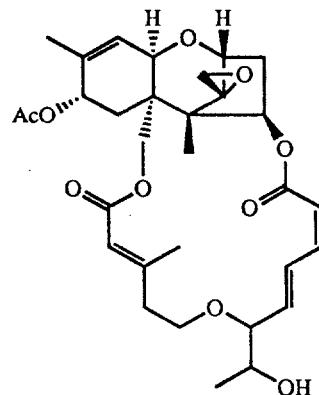
verrucarin A
(unidentified fungus)



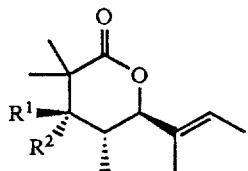
verrucarin J
(unidentified fungus)



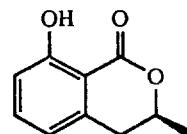
roridin H
(unidentified fungus)



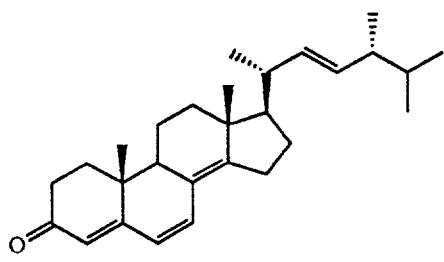
roridin K acetate
(unidentified fungus)



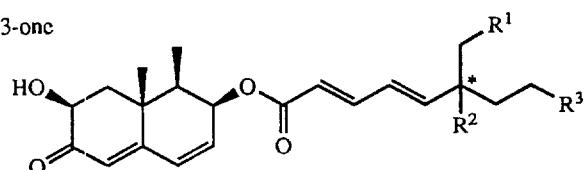
helicascolide A : $R^1 = H, R^2 = OH$
B : $R^1 = OH, R^2 = H$
(*Helicascus kanaloanus*)



(S)-(+)-ochracin
(*H. kanaloanus*)



(22E)-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one
(*Dendryphiella salina*)



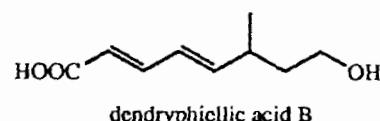
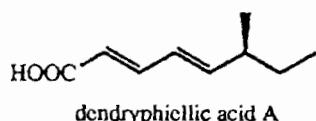
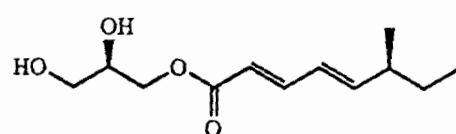
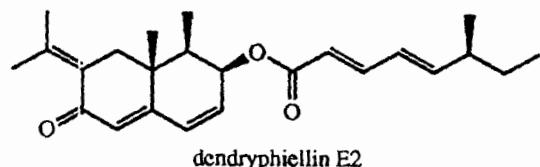
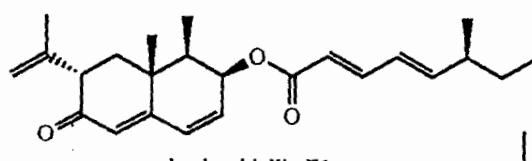
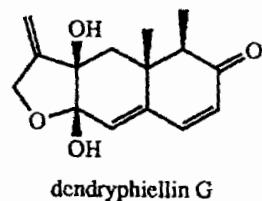
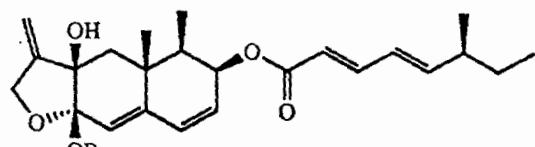
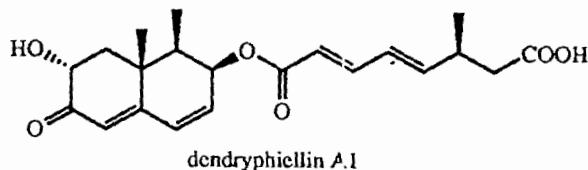
dendryphiellin A : $R^1 = R^2 = H, R^3 = OH$

B : $R^1 = R^3 = H, R^2 = OH$

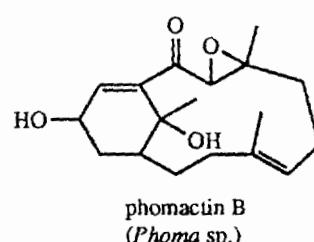
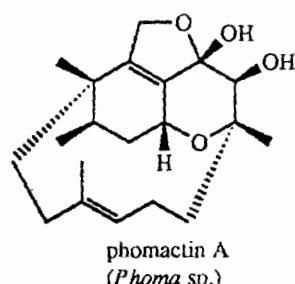
C : $R^1 = R^2 = R^3 = H$ (* = S)

D : $R^1 = OH, R^2 = R^3 = H$

(*D. salina*)



dendryphiellins from the marine deuteromycete *Dendryphiella salina*



3.8.2. 해양미생물로부터 추출된 항바이러스성 물질

3.8.2.1. 연구의 배경

새로운 항바이러스제의 개발을 위한 본 연구의 대상 생물은 해양미생물이다. 그러므로 대형 해조류나 무척추 동물등 현재까지 해양천연물 연구의 주요 대상이었던 대형 생물은 본 연구의 대상에서 제외된다. 그럼에도 불구하고 대형 해양생물의 천연물에 대한 고찰과 분석이 해양미생물로부터 생리활성 신물질의 개발 연구를 위하여 필수적으로 요구되는데 그 이유는 해양미생물과 대형 생물간의 공생관계 및 이 과정에서 필연적으로 수반되는 대사물질의 이동 및 축적이다. 즉 해양 동식물로부터 추출된 천연물중 상당수는 그 생합성적 생산주체가 동식물이 아니라 이들에 공생하는 해양 미생물인 것으로 추측된다. 그러므로 알려진 항바이러스성 해양천연물중의 상당수도 해양미생물에 의하여 생산되었을 가능성이 크다.

해양 동식물로부터 분리된 해양미생물에 의한 생리활성물질의 생산을 지지하는 직접적인 증거는 별로 많지 않아서 복어의 신경독인 tetrodotoxins, 연체동물 *Babylonia japonica*의 독성물질인 surugatoxins, 해면으로부터 추출된 diketopiperazines등(3.8.1. 해양 미생물의 대사물질 참조)을 제외하고는 알려진 예가 드물다. 그럼에도 불구하고 이 이론은 생물학, 생화학 및 천연물화학적 측면에서 충분한 논리적 근거와 다양한 간접적 증거를 갖고 있어서 현재 관련분야의 학계에서 광범위한 지지를 받고 있다. 이들 논거와 증거중 대표적인 것을 요약하면 다음과 같다.

먼저 천연물의 출현 빈도와 구조적 다양함에 있어서 단일 생물문(phylum)으로서는 전 해양생물중 최대를 차지하는 해면동물의 경우 박테리아등 공생미생물이 해면 조직의 상당부분을 차지하고 있다. *Aplysina cavernicola*의 경우는 공생미생물이 전체 조직의 38%나 차지하고 있다(Bergquist and Wells, 1983). 그러므로 채집한 해면으로부터 유기물질의 추출이 실제로는

해면을 culture media로 이용하여 배양한 미생물로부터 유기물질을 추출한 것으로 간주해도 무방한 경우가 드물지 않다.

연구대상 생물에 따르는 해양 천연물의 구조적 다양성과 생합성적 기원의 다양성은 대상 생물의 미생물과의 공생여부와 밀접한 상관관계를 맺고 있는 것으로 해석되고 있다. 즉 해면, 원색동물과 이끼벌레등 미생물과 밀접한 공생관계를 맺고 있는 생물의 천연물은 구조적으로 매우 다양할 뿐만 아니라 생합성적 기원도 mevalonate, shikimic acid, polyketides, amino acids, bases, mixed biogenesis 등으로 매우 다양하다. 그러나 대형 해조류나 강장동물등 미생물과 공생하는 예가 드문 생물의 천연물은 한, 두 가지의 생합성적 기원을 가진 물질이 천연물의 거의 전부를 차지한다(Ireland et al., 1988). 이 사실은 해면이나 원색동물에서 분리된 다양한 생합성적 기원을 가진 물질중의 일부는 숙주대신 공생미생물에 의하여 생산되었거나 미생물에 의하여 생산된 생합성적 전구물질이 숙주로 이동되어 변환된 것으로 추측된다. 특히 천연물의 구조적 다양함으로 잘 알려진 *Dysidea*속 해면의 경우는 linear polyketides, linear peptides, polybrominated anisols, terpenoids 등 생합성적 기원이 판이한 물질들이 동일한 시료로부터 함께 추출되는 예가 흔히 발견된다. 그런데 개개의 천연물을 생산하는데에는 막대한 energy가 소비되고 정교한 효소체계가 필요하므로 동일한 생물이 전혀 다른 생합성적 기원을 가진 대사물질을 함께 생산하는 것은 energy 관리의 측면에서 크게 위배되는 것으로서 이러한 비 효율적인 energy 관리는 그 생물의 생존을 위협하는 요소가 된다. 그러므로 이 사실은 *Dysidea*로부터 분리된 천연물중 다수는 전혀 다른 효소체계를 가진 생물 즉, 미생물에 의하여 생산되었다는 사실을 시사하고 있다.

미생물과 밀접한 공생관계를 유지하는 대표적인 해양 무척추동물인 해면과 원색동물은 그들의 대사물질의 구조가 매우 유사한 경우가 많다. 특히 polycyclic heteroaromatics, cyclic peptides, small aromatic compounds 등의 경우는 대사물질의 구조만으로는 어느 동물의 대사물질인가를 전혀 구

분할 수 없을 정도이다. 또한 이끼벌레(bryozoans)와 원색동물(tunicates) 간에도 대사물질이 동일하거나 매우 유사한 경우가 드물지 않다. 그리고 이들 천연물중 상당수는 육상미생물의 대사물질과 동일 혹은 유사한 구조를 갖고 있다. 이와같이 생물학적으로 전혀 다른 생물들이 유사한 천연물을 다수 함유하고 있는 것은 이들 천연물의 생산주체가 공통된 제3자(공생미생물)이라는 사실을 의미한다.

마지막으로 해양천연물중 상당수는 생체내의 농도가 매우 낮아 천연물의 채집된 생물에 대한 농도가 10^{-6} 이하인 경우가 흔히 있으며 유명한 이끼벌레의 항암물질인 bryostatins의 경우는 10^{-9} 이하이다. 뿐만아니라 천연물의 농도는 생물의 서식장소나 채집시기에 의하여도 극심한 편차를 나타내는 경우가 자주있다. 이와같이 극소량의 대사물질을 생산하기 위하여 복잡한 효소체계를 유지하거나 물리적 환경의 미미한 변화에 민감히 반응하는 효소체계를 갖고있는 것은 생물의 energy관리의 측면에서 대단히 불리한 것이다. 그러므로 이러한 천연물의 낮은 농도나 지역간의 격심한 편차 또한 천연물의 생산주체가 다른 생물 - 미생물 - 이라는 것을 의미한다.

대형 해양생물로부터 추출된 천연물의 다수가 해양미생물에 의하여 생산되었다는 사실은 새로운 생리활성 물질의 개발에 청신호를 던져주고 있으며 해양미생물의 학문적, 산업적 중요성을 더욱 증가시킨다. 해양미생물의 다수가 강력한 생리활성도를 갖고 있음에도 불구하고 신의약품의 개발을 위한 선도물질로 이용되지 못하는 가장 큰 이유가 시료의 다량 확보의 어려움임을 감안할 때 스쿠바ダイ빙이나 잠수정의 이용등 어려운 과정에 의한 시료의 소량 확보대신 해양생물로부터 분리한 미생물의 대량 배양을 통한 신물질의 대량 확보는 항바이러스제를 포함한 여러 생리활성 선도물질 및 신의약품의 개발 가능성을 획기적으로 증가시킬 것이다.

3.8.2.2. 항바이러스성 해양천연물에 관한 일반적 고찰

현재까지 구조가 알려진 해양천연물의 수는 3,000을 훨씬 상회하고 있으나 이들 중 항바이러스 효과를 가진 것으로 보고된 물질은 상당히 드물어 본 연구의 조사 결과 약 70 여 물질에 불과하며 이는 전체 해양천연물의 3%에도 미달하는 실정이다. 이는 항박테리아, 항진균, 세포독성 등 다른 생리활성도를 가진 물질의 수분지 일에 해당하는 미미한 것으로서 이 수치만을 고려하면 해양생물이 항바이러스성 신물질의 풍부한 원천이 되기에는 상당히 미흡하다. 그러나 이는 항바이러스 효과가 보고된 물질만을 대상으로 한 수치이므로 실제의 항바이러스 물질의 출현빈도는 훨씬 더 높을 것으로 보는 것이 학계의 일반적인 견해이다. 이 설을 강력히 지지하는 중요한 증거로는 다양한 해양생물로부터 얻어진 유기조추출물에 대한 생리활성도를 비교한 것이다(Table 4, 5, 6., Rinehart, 1988, 1992). 즉, 유기조추출물의 항바이러스 효과는 세포독성을 제외한 다른 생리활성도(항박테리아, 항진균, 면역억제, 면역항진 등)에 비하여 동등내지는 더욱 잦은 출현빈도를 나타내며 이러한 경향은 생물의 종류, 지역의 차이 및 수심에 무관하다.

해양천연물 중 항바이러스 물질이 보고된 계가 적은 중요한 이유는 항바이러스 효과 측정의 어려움과 해양천연물 연구진의 주된 연구방향이 생리활성도와 무관하였던 점 그리고 항바이러스제의 개발이 천연물보다는 합성물질에 치중되었던 점 등이다. 이들을 구체적으로 살펴보면 먼저 대부분의 천연물 연구진에서는 항바이러스효과 측정의 어려움으로 인하여 이를 기피하는 경우가 많다. 연구대상 생물로부터 신물질을 분리, 정제하여 구조를 결정하고 그 용용방안을 연구하는 것이 천연물화학의 일반적인 연구과정인데 오늘 날 신물질의 대표적인 용용방안이 신의약품의 개발이므로 이를 위하여 생리활성도의 측정이 필수적으로 요구되며 한 연구과정에서 분리단계에 따라 동일한 생리활성도를 여러차례 측정하는 것이 일반적이다.

그런데 유용한 생리활성도는 그 종류가 너무나 다양함으로 개개의 연구진이

Table 3-4. Antimicrobial and antiviral activities and cytoxicity in Phyla assay during the *alpha Helix* Caribbean Expedition.

Phylum	Overall anti-microbial	% species active ^a (number of species examined) ^b					
		<i>E.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>S.c.</i>	<i>P.a.</i>	HSV-1 ^c	CV-1 ^d
Porifera	(187)	14	41	19	11 (138)	14 (180)	62 (186)
Cnidaria	(70)	4	26	7	2 (66)	17 (69)	56 (70)
Ectoprocta	(1)	100	100	0	0	0 (1)	0 (1)
Mollusca	(20)	5	15	0	0 (17)	0 (21)	33 (21)
Annelida	(3)	33	0	0	0	0 (3)	0 (3)
Arthropoda	(6)	0	0	0	0	0 (6)	0 (6)
Echinodermata	(36)	0	3	50	26 (27)	16 (36)	72 (36)
Chordata	(27)	15	37	15	14 (22)	23 (26)	70 (27)
Cyanophyta	(5)	20	60	20	0 (4)	100 (5)	80 (5)
Chlorophyta	(42)	7	55	10	5 (41)	7 (42)	36 (42)
Phaeophyta	(19)	0	37	0	0 (18)	25 (19)	50 (19)
Rhodophyta	(43)	10	35	7	0	17 (42)	43 (42)
Tracheophyta	(3)	0	0	0	0	33 (3)	0 (3)

^a *E.c.* = *Escherichia coli*, *B.s.* = *Bacillus subtilis*, *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*, *P.a.* = *Penicillium arovenatum*.

^b Number of species examined same as overall antimicrobial except as noted.

^c Inhibiting *Herpes simplex* virus, type 1, at $\leq 200 \mu\text{g}/\text{disk}$.

^d Cytotoxic to monkey kidney cell at $\leq 200 \mu\text{g}/\text{disk}$.

(From Rinehart, 1988).

Table 3-5.

Bioactivity profile of marine benthic organisms.

Depth, m	AV			AT			AB			AF			ID			IS		
	Tstd	Act	%	Tstd	Act	%												
Galapagos																		
>600	147	22	15	150	13	9	150	10	7	150	4	3	150	13	9	150	4	3
600-450	74	8	11	78	13	17	78	10	13	78	3	4	78	22	28	78	4	5
450-300	190	24	13	193	24	12	193	16	8	193	5	3	193	22	11	193	1	1
300-150	56	7	13	62	13	21	62	4	6	62	5	8	62	8	13	62	0	0
<150	22	5	23	30	9	30	30	1	3	30	4	13	30	6	20	30	0	0
SCUBA	287	41	14	328	75	23	328	23	7	328	20	6	328	60	18	328	4	1
Snokel	112	14	11	123	21	17	123	6	5	123	11	9	123	7	6	123	0	0
Total	888	119	13	964	168	17	964	60	6	964	52	5	964	138	14	964	13	1
Cocos																		
>600	49	6	12	49	7	14	49	8	16	49	4	8	49	6	12	49	1	2
600-450	15	1	7	28	2	7	28	4	14	28	0	0	28	4	14	28	0	0
450-300	20	1	5	35	2	6	35	4	11	35	4	11	35	10	29	35	1	3
300-150	14	2	14	15	2	13	15	2	13	15	0	0	15	0	0	15	0	0
<150	13	0	0	16	1	7	16	0	0	16	1	7	16	1	6	16	0	0
SCUBA	38	11	29	50	18	36	50	9	18	50	8	16	50	10	20	50	0	0
Snokel	11	1	9	12	2	17	12	2	17	12	0	0	12	1	8	12	0	0
Total	160	22	14	205	34	17	205	29	14	205	17	8	205	32	16	205	2	1
Perlas																		
<150	37	9	24	19	14	74	37	9	24	37	1	3	37	10	27	37	1	3
SCUBA/ Snokel	88	18	20	74	24	32	84	18	21	84	8	10	88	21	24	88	0	0
Total	125	27	22	93	38	41	121	27	22	121	9	7	125	31	25	125	1	1
Total	1,173	168	14	1,262	240	19	1,290	116	9	1,290	78	6	1,294	201	16	1,294	16	1

AV = antiviral, AT = antitumor, AB = antibacterial, AF = antifungal, ID = immunodepressant, IS = immunostimulatory.

(from Rinehart, 1988).

Table 3-6. Comparison of bioactivities observed from major expeditions.

Depth, m	No. of samples	No. (%) active, preliminary results			
		Cytotoxic	Antiviral	Antibacterial	Antifungal
SeaPharm Spanish Expedition, March 1986					
3-30	174/491 (35)	26/266 (10)	14/454 (3)	12/454 (3)	
University of Illinois, Maine Collection, July 1985					
0-3	58	16 (28)	0/28 (0)	2/28 (7)	
3-30	96	25 (26)	4/46 (9)	4/48 (9)	
University of Canterbury, New Zealand Collections, 1982-1985^a					
3-30	1533				
30-130	216	259 (28)	146(16)		
>130	54				

^a Numbers and percentage approximate.

여러 생리활성도를 측정하는 것은 인력이나 연구비의 운용상 불가능하여 부득이 1-2 종류의 생리활성도만 측정하거나, 특정 생리활성도를 전문적으로 연구하는 관련분야의 연구진에 의뢰하는 것이 대부분이다. 이 과정에서 많은 연구진들이 운용하기가 쉽고 측정장비와 시설의 구입과 유지가 용이한 생리활성도를 선호하는 것은 당연하다. 그리하여 항균, 항진균, 항암(P388, KB등), 세포독성등의 생리활성도에 비하여 cell line의 유지가 어렵고 운용경비가 많이 드는 항바이러스도는 상대적으로 드물게 측정되어 온 것이다.

해양천연물에 대한 항바이러스 효과가 자주 측정되지 않는 다른 이유는 현재까지 항바이러스제의 개발을 위한 노력이 천연물보다는 합성물질에 치중되었기 때문이다. Ara-A를 비롯한 modified nucleosides가 우수한 항바이러스 효과를 가지고 있음은 주지의 사실이다. 이들 nucleosides나 bases들은 합성이 비교적 용이하므로 항바이러스성 신의약품의 개발은 천연물보다는 합성물질에 대하여 더욱 활발히 이루어져 왔으며(AZT, cyclovir등) 이에 따라 천연물에 대한 항바이러스 효과는 자주 측정되지 않았다.

해양천연물중 항바이러스성 물질이 보고된 예가 적은 또 한가지 이유는 해양천연물 연구진이 오랜기간 견지하여 온 연구방향이 생리활성도와 무관하였기 때문이다. 해양천연물 연구가 60년대 말에 본격적으로 시작된 이후 활발한 연구를 하였던 그룹들은 거의가 유기화학적 측면에서만 천연물에 접근하였다. 즉 이들은 천연물의 구조적 특이성과 이에 수반하는 유기화학적 제 현상의 해석에만 관심을 집중하였을뿐 생리활성도를 비롯한 천연물의 용용가능성에는 매우 등한하였다. 그리하여 80년대 초까지 구조가 결정된 해양천연물중 생리활성도의 측정등 약학적인 면에서 연구가 시도되었던 물질은 5%미만에 불과하다. 그러므로 구조만 보고된 해양천연물이 오랜 기간이 지난 후에 재추출되어 우수한 생리활성도를 가진 것이 뒤늦게 발견되어 재조명 받는 경우가 흔히 있다. 본 장의 3.8.2.3. 항바이러스 효과를 가진 해양천연물에서 상세히 언급될 해면의 항바이러스성 천연물 avarols의 경우

는 매우 잘 알려진 예이다.

위에서 언급한 여러 이유로 인하여 해양천연물로부터 항바이러스성 물질의 개발은 별로 활발하지 못한 것이 현실이다. 그러나 최근 AIDS의 확산등으로 새로운 항바이러스제의 개발에 관심이 급증함에 따라 천연물에 대한 항 바이러스 효과 또한 빈번히 측정되고 있으므로 항바이러스성 해양천연물의 수 또한 급격히 늘어날 전망이다.

3. 8. 2. 3. 항바이러스성 해양천연물

현재까지 보고된 70여 항바이러스성 해양천연물의 생물에 따른 분포를 살펴 보면 해면, 강장 및 원색동물에 집중됨을 알 수 있다. 다른 해양동물이나 미생물로부터는 매우 드물게 발견되고 해양식물로부터는 발견된 예가 없다. 그러나 이것은 해양식물이 항바이러스성 물질을 전혀 생성하지 않는 것을 의미하지는 않는다. 다수의 해조류의 조추출물이 항바이러스 효과를 나타 내며 특히 *Codium*, *Hypnea*, *Ulva*등 수 종의 속으로부터 분리된 polysaccharides와 fatty acid amides가 항바이러스 효과를 갖고 있음이 밝혀졌다. 그러나 이들 물질은 그 구조가 1차 대사물질과 매우 유사하여 신 물질로 인정할 수 없으므로 큰 주목을 받지는 못하였다.

해양식물로부터 항바이러스성 천연물이 발견되지 않은 것은 해양식물이 주로 연구되었던 시기와 무관하지 않은 것으로 추측된다. 즉 해양식물은 해양천연물 연구의 초기이었던 60년대말부터 70년대에 걸쳐 집중적으로 연구가 되었고 80년대 이후에는 관심이 점차 멀어져 신물질이 드물게 발견된다. 그런데 70년대까지는 해양천연물의 생리활성도 특히 항바이러스 효과에 대해서는 관심이 매우 적었으므로 이 시기에 구조가 발표된 해양식물의 천연물은 항바이러스 효과의 측정이 이투어지지 않았던 것이다. 그러므로 우수한 항바이러스 물질이 사장되었을 가능성이 매우 크다.

전체의 항바이러스성 해양천연물 중 약 반수가 해면동물로부터 분리되었다.

이는 해면의 천연물이 그 수에 있어서 전 해양 천연물의 35% 이상을 차지하고 있으므로 별로 놀라운 일이 아니다(신 과정, 1993). 오늘날 전 해양생물중 해면에 대한 연구가 가장 활발하고 이러한 경향은 미래에도 지속될 것 이므로 해면으로부터 추출된 항바이러스성 물질의 수 또한 계속적으로 증가 할 것이다. 해면의 항바이러스성 물질들은 대단히 다양한 생합성적 기원을 갖고 있다. 즉 polyketides, amino acids, terpenoids, bases, mixed biogenetic products 등 일반적으로 알려진 모든 생합성적 기원을 가진 물질을 망라하고 있다.

*Homospermidine*과 3개의 carboxylic acid amides가 결합된 acarnidines가 해면 *Acarnus erithacus*로부터 분리되었다. Guanidine기를 가진 이들은 다양한 항미생물 효과와 항바이러스 효과를 나타낸다. 이들은 최근 일반적인 경로에 의하여 전합성이 완료되었다.

Guanidine기를 가진 훨씬 더 복잡한 다중고리 화합물인 ptilomycalin A가 카리브해에 서식하는 *Ptilomycale Spiculifera*와 홍해에 서식하는 *Hemimycale* sp.로부터 함께 분리되었다. Guanidium salt의 형태로 분리된 이 물질은 분광데이터 분석에 의하여 구조가 결정되었으며 항종양, 항바이러스 및 항진균등 다양한 생리활성 효과를 갖고 있음이 밝혀졌다. 최근 해면 *Crambe crambe*로부터 4개의 유사한 물질들인 crambescidins가 분리되었다. 이들은 ptilomycalin A의 spermidineol hydroxy spermidine으로 치환된 구조적 특징을 갖고 있다. 이들 중 crambescidins 816, 830 및 800은 1.25 μ g/well의 농도에서 *Herpes simplex virus, type I* (HSV-1)의 성장을 완전히 억제한다.

New Zealand에서 채집된 *Mycale* 속과 일본에서 채집된 *Theoneilla* 속으로부터 각각 mycalamides A와 B 및 onnamide A가 분리되었다. 특이한 acylaminol 기를 가진 이 물질들은 대단히 강력한 항바이러스와 항암 효과를 갖고 있다. 최근 이들은 유기화학적 방법에 의하여 전합성되었는데 이 과정에서 구조 발표시에 명확하지 않았던 입체화학적 배열이 결정되었다.

Bromotyrosine계 거대물질인 fistularin 3와 11-ketofistularin 3가 *Aplysina archeri*로부터 분리되었다. 이들은 feline leukemia virus에 대하여 각각 ED₅₀ 22μM과 42μM의 농도에서 활성효과를 나타내었다. 이들은 상당한 항바이러스 효과에도 불구하고 세포독성이 없음이 밝혀져 AIDS등 바이러스성 질환에 대한 이용가능성이 있음을 시사하였다. 이들의 항바이러스도는 대표적인 항AIDS시약인 3'-azido-3'- deoxythymidine(AZT)에 비하면 상당히 낮으나 동종의 물질인 2',3'-dideoxy cytidine(ddCyd)와는 유사한 정도이다. Bromotyrosine계 물질은 해면증 Verongida목의 대표적 천연물이며 특히 fistularin 3와 같은 3분자의 bromotyrosine이 결합된 물질은 그 종류와 수가 대단히 다양하다. 그러므로 fistularin 3의 항바이러스 효과는 Verongida로부터 예전에 추출되었던 유사한 물질에 대해서도 항바이러스 효과를 측정할 필요성이 있음을 시사한다.

지중해에 서식하는 해면 *Topsentia genitrix*로부터 3개의 bisindole계 alkaloids인 Tosentin-A, -B1과 -B2가 분리되었다(Bartik et al., 1987). 이들은 모두 항암, 항바이러스 효과를 나타내었다. 최근 topsentins이 decarbonylation되어 형성한 것으로 추측되는 nortopsentins가 카리브해의 해면 *Spongisorites*와 *Halichondria*로부터 분리되었다. 이들은 비록 항바이러스 효과는 없으나 강력한 항암효과로 인하여 물질특허를 획득하였다. Dercitin은 심해에 서식하는 *Dercitus*속으로부터 분리된 강한 보라빛 형광을 나타내는 polycyclic heteroaromatics계의 물질이다. Acridine계 alkaloid인 이 물질은 *in vitro* test에서 강력한 항종양, 항바이러스 및 면역억제(immunomodulatory)효과를 나타내었다. 앞에서 언급한 fistularins 와 마찬가지로 dercitin또한 많은 analogs가 여러 해면으로부터 분리되었으므로 이들에 대한 체계적인 항바이러스도 측정은 새로운 항바이러스제의 출현을 낳을 가능성이 크다.

Terpenoids 즉 mevalonate에서 기원한 물질들은 해양천연물중 출현빈도가 가장 높으며 해면의 대사물질중에서도 가장 빈번히 발견된다. 해면의

diterpenoids의 다양한 골격중에서 spongian골격은 가장 흔하고 또한 해면 이외의 동·식물에서 전혀 발견되지 않으므로 해면의 대표적 천연물로 불리운다. spongian골격을 가진 세개의 유도체 spongiadiol, epispongiadiol 및 isospongiadiol이 카리브해의 심해성(>200m)해면으로부터 분리되었다. 이들의 구조는 알려진 spongians와의 분광데이터 비교에 의하여 결정되었으며 모두 항바이러스와 항종양 효과를 나타내었다.

Spongian과 전혀 다른 ring-reduced azulene골격을 가진 diterpenoids reiswigins A와 B가 Venezuela의 심해에서 채집된 해면 *Epipolias reiswigi*로부터 분리되었다. 이들의 구조는 2D-NMR을 주로 이용한 분광자료 해석에 의하여 결정되었다. Reiswigins A와 B는 2 μ g/ml에서 HSV-I과 vesicular stomatitis virus(VSV)의 성장을 완전히 억제하였으며 같은 농도에서 host인 CV-1 monkey kidney cell에 대한 독성이 없는 것으로 보고되었다. (-)-Reiswigin A는 최근 유기합성적 방법으로 전합성 되었으며 이 과정에서 구조결정 당시에 불명확하였던 side-chain의 절대 및 상대배열이 결정되었다.

해면의 항바이러스성 천연물중 최근에 가장 주목을 받고 있는 것은 avarol-avarone계열의 mixed biosynthetic products이다. 이들은 mevalonate에서 기원한 sesquiterpene part와 shikimic acid에서 기원한 quinone (hydroquinone)이 결합한 물질들이다. 이 계열의 물질들은 해양천연물 연구의 초기인 70년대 초부터 해면과 갈조류의 해초로부터 계속적으로 분리되어왔으나 오랜기간 큰 관심을 끌지 못하다가 최근에 이들이 강력한 항암, 항바이러스 효과를 갖고 있음이 밝혀져 이들의 생리활성 반응기작에 대한 의·약학적 연구가 집중되고 있다. 이들은 구조가 비교적 간단하여 유기합성적 방법에 의한 대량생산이 용이하므로 항바이러스제로의 개발 가능성이 높다. 이 계열에 속하는 대표적 물질인 avarol과 avarone이 *Dysidea avara*로부터 분리되었는데 *in vitro* test결과 HIV에 대한 강력한 억제효과가 있음이 밝혀졌다. 동일한 해면으로부터 avarol의 hydroquirole ring이 산화

된 diactylavarol과 6'-hydroxy-5'-acetylavarol이 분리되었다. Avarone 보다 생리활성 효과가 더 높은 유도체를 개발하기 위하여 여러개의 avarone-amino유도체가 합성되었으나 이들은 모두 avarone보다 생리활성도 가 현저히 낮음이 밝혀졌다.

Avarol과 구조적으로 밀접한 관련이 있는 aromatic ether인 aureol이 *Smenospongia aurea*로부터 분리되었다. 이 물질의 구조는 브롬화된 유도체의 X선 결정구조 분석에 의하여 결정되었다. Aureol은 P-388 tumor cell과 influenza type-A virus strain PR-8에 대하여 각각 IC₅₀ 9μg/ml와 11.6μM의 생리활성 효과를 나타내었으며 최근에 해면 *Strongylophora hartmanni*로부터 분리된 유사물질 strongylin A 또한 비슷한 생리활성 효과를 보여주었다. Aureol과 strongylin A 및 유도체들은 최근 구조와 생리활성도 및 이용 방법에 관한 물질특허를 획득하였다.

최근 Bahama에서 채집된 *Petrosia weinbergi*로부터 항바이러스 효과를 monitor로 이용한 체계적 분리과정을 거쳐서 sterol의 side chain이 산화된 3개의 orthoesterol disulfates A-C가 분리되었다. 이들은 feline leukemia virus(FeLV)에 대하여 EC₅₀ 1.0-1.3μg/ml의 항바이러스 효과를 나타내었다. 또한 세물질 모두 *in vitro* test 결과 20μg/well의 농도에서 influenza virus PR-8의 성장을 완전히 억제하였으며 murine coronavirus A59에 대하여는 동일한 농도에서 50-70%의 억제효과를 나타내었다.

변형된 nucleosides가 우수한 항바이러스 효과를 갖고 있음을 잘 알려진 사실이다. 이들은 구조가 비교적 간단하여 합성에 의한 대량생산이 용이하고 유도체로의 구조변환 또한 매우 용이하다. 그리하여 현재 항바이러스제의 개발노력은 주로 unusual nucleosides에 집중되고 있으며 최근 AIDS치료제로 공인된 AZT는 그 대표적인 예이다.

이러한 nucleosides가 해양생물 특히 해면으로부터 계속적으로 분리되고 있으며 항바이러스제의 개발에 크게 기여하고 있다. 일찌기 50년대에 카리브 해의 여러 해면으로부터 특이한 nucleosides인 spongouridine(Ara-U)과

spongoothymidine(Ara-T)이 분리되었으며 이들의 항바이러스 효과와 비독성은 modified nucleosides로부터의 항바이러스제 개발에 대한 큰 관심을 일으켰다. 그리하여 spongouridine이나 spongoothymidine과 구조적으로 관련이 있는 여러가지 nucleosides가 합성되었으며 이 노력은 ara-A(adenine arabinose, Vidarabine)과 ara-C(cytosine arabinose, Cytarabine)의 합성으로서 큰 결실을 맺게 되었다. Ara-A는 항바이러스제로 사용승인을 받았으며 ara-C는 목표한 항바이러스 효과는 약하였으나 탁월한 항암효과로 인하여 항암제로 승인을 받았다. 더우기 최근에는 ara-C의 sugar가 변형된 제3세대 물질인 acyclovir가 합성되었으며 항바이러스제로 이용되고 있다. Spongouridine (spongoothymidine)에서 ara-A 및 ara-C를 거쳐 acyclovir의 출현에 이르는 일련의 연구과정은 천연물연구가 신의약품 개발과 의약학 연구에 미치는 중요성을 명확히 드러내었다. 즉, 해양생물에서 처음 분리되었던 천연물 그 자체는 의약품으로 사용이 가능할 만큼 충분한 생리활성 효과는 없었고 대량으로 분리하는것 또한 불가능하였으나 이들의 특이구조와 생리활성도, 독성 및 안정성은 구조-생리활성도, 구조-독성간의 상관관계에 대한 연구를 유발시켰고 이 문제점을 해결하려는 노력에 의하여 여러 가지 변형된 유도체가 합성되었으며 그 결과 AZT나 acyclovir등의 우수한 의약품의 개발을 가져왔다. 이와같이 해양천연물은 천연물 그 자체의 의약품으로 이용가능성과 더불어 신의약품의 개발을 위한 lead compound로의 기여도가 매우 높으므로 항바이러스제나 기타의 신의약품의 개발을 위하여 해양천연물에 대한 연구는 더욱 더 활성화되어야 할 것이다.

Soft corals, gorgonians, hard corals 등 강장동물(coelenterates)은 해양천연물에 있어서 해면동물에 버금가는 중요성을 갖고 있다(Ireland et al., 1988). 그러나 비록 전 해양 천연물의 25%이상이 강장동물로 부터 분리되었으나 현재까지 밝혀진 항바이러스성 물질은 매우 드물다. 이유로는 여러 가지가 있겠으나 천연물의 구조와도 관계가 큰 것으로 추측된다. 즉 강장동물의 천연물은, 해면이나 원색동물과는 달라 생합성적 기원이 다양하지

않고 terpenoids가 전체의 90%이상을 차지한다. 뿐만아니라 이들 terpenoids의 대부분은 비극성(norpolar) 혹은 중정도 극성(moderately polar) 물질이므로 항 바이러스 효과를 측정하기가 용이하지 않다.

강장동물의 항바이러스성 물질로도 잘 알려진 것은 briarane계의 diterpenoids이다. 6-10-5 3중 고리 구조를 가진 briarane은 강장동물에서만 발견되는 독특한 탄소 골격이다. 이 계열에 속하는 최초의 물질인 briarein A가 카리브해의 gorgonian *Briareum asbestinum*으로부터 분리된 뒤 여러 soft corals과 gorgonians로부터 동일골격의 물질들이 계속적으로 분리되어 지금은 강장동물의 천연물에서 대단히 중요한 위치를 차지하고 있다. 이 골격을 가진 물질들은 항바이러스, 소염, 항미생물, 세포독성, 부착생물방제등 다양한 생리활성도를 나타내는데 이것은 이 계열에 속하는 물질들의 공통적인 현상인 탄소 골격이 산화되어 형성된 대단히 많은 작용기에 그 원인이 있는 것으로 추측된다. Briarein A가 분리되었던 동일한 *B. asbestinum*으로부터 유사한 물질인 brianthein V가 분리되었으며 항바이러스와 세포독성 효과가 있음이 밝혀졌다. 태평양에 서식하는 gorgonia *Solenopodium* sp.로부터 solenolides 가 추출되었으며 그 구조는 분광자료의 해석과 화학적 변화에 의하여 결정되었다. 이들중 solenolides A, D 및 E는 소염과 항바이러스 효과가 있음이 밝혀졌다. 또한 남지나해에 서식하는 *Junceella fragilis*와 *Plexaureides peaelonga*로부터 유사한 briareins 이 분리되었다. 이들중 junceellolide B와 praeolide는 각각 27과 52 μ g/ml에서 항바이러스 효과를 나타내었다.

강장동물의 천연물은 거의 대부분이 soft corals, gorgoniars등 alcyonarians에 집중되어 있고 hard corals, hydrozoan, sea anemones 등 다른 분류군으로 부터 얻어진 것은 매우 드물다. 일본근해에서 채집된 stony coral *Tubastrea aurea*로부터 분리된 amino acid에서 기원한 aromatic guanidine 인 tubastrine이 유일한 항바이러스성 물질이다.

해면동물과 더불어 항바이러스성 천연물이 많이 추출된 동물은 원색동물이

다. 이들은 알려진 천연물이 양적인 면에서는 미미하나(전 해양 천연물의 5%미만), 생리활성 물질의 출현 빈도가 해양 천연물중 가장 높아 현재 연구가 집중되고 있으며 미래의 해양천연물 연구의 핵심적인 위치를 차지할 것으로 추측된다.

원색동물로부터 생리활성 물질의 추출빈도가 높은 이유는 여러가지가 있겠으나 주목할 사실이 두가지 있다. 먼저 이들 천연물의 생합성적 기원과 탄소 골격의 생성 기작이 매우 다양하여 그 결과 천연물의 구조나 작용기의 종류 또한 매우 다양하다는 점이다. 일반적으로 화학물질의 생리활성효과는 탄소 골격에 의한 3차원적인 구조의 형태와 작용기의 반응성에 기인하므로 원색동물의 대사물질의 다양한 생리 활성도는 이들의 구조와 작용기의 다양성에 의한 것일 가능성이 높다. 또 한가지 이유는 원색동물의 대사물질이 다른 해양천연물 보다 훨씬 광범위한 생리활성도의 측정을 받았을 가능성이다. 원색동물의 천연물에 대한 연구는 다른 해양 생물에 비하여 훨씬 늦은 80년대에 들어서 본격적으로 시작되었다. 그러므로, 생리활성도에 대한 학계의 관심이 높아진 이후에 집중적으로 연구된 원색동물로 부터의 생리활성물질의 추출 빈도가 다른 해양 생물보다 높을 것은 당연하다. 이 주장을 지지하는 근거로는 현장에서 조·추출물에 대한 생리활성도의 측정결과를 비교해 볼때 원색동물의 생리활성 빈도가 다른 생물에 비하여 크게 높지 않은 점이다(Table 4). 어떤 이유에서든 현재 원색동물은 생리활성물질의 출현 빈도가 매우 높으며 의약품으로 개발중에 있는 물질 또한 다른 해양 생물보다 많아 큰 주목을 받고 있다.

Apelidium sp.로부터 2,3-threo-13,14-erythro-apelidiasphingosine이 분리되었으며 항미생물, 항암 및 항바이러스 효과가 있음이 밝혀졌다. 이 물질의 절대배열은 전합성에 의하여 규명되었다.

Tunicates로부터 분리된 small alkaloids 중 널리 알려진 것은 β -carboline 계 유도체인 eudistomins이다. 이들은 구조가 비교적 간단하고 생리활성도 특히 항바이러스도가 매우 높아 신의약품으로의 개발중에 있

다. 현재까지 20여 유도체가 태평양 및 카리브해에 주로 서식하는 *Eudistoma* spp. 와 *Ritterella sigillinoides*로부터 분리되었으며 계속 새로운 물질이 보고되고 있다. 이들은 모두 β -carboline heteroaromatic ring을 갖고 있으며 pyrrole, pyrrolidine, benzene, oxathiazepine 등의 ring을 갖고 있는 유도체도 많다. 독특한 구조와 강력한 항바이러스효과로 인하여 이들은 유기합성의 대단히 매력적인 목표로 인식되고 있으며 신의약품으로의 대량생산 또한 유기합성적 방법에 의하여 해결될 것으로 전망된다. 거의 모든 eudistomins이 전합성되었다. 현재까지 알려진 합성 방법도 10여 가지에 이르렀으며 개선된 방법이 계속 보고되고 있다. 이 과정에서 천연으로는 존재하지 않는 합성유도체 또한 다수 얻어졌는데 debromoeudistomin D는 대표적인 항바이러스성 합성유도체이다.

원색동물 나아가서는 전 해양천연생리활성 물질중 가장 유명한 것은 cyclicdepsipeptides인 didemnins일 것이다. 카리브해의 천해에 서식하는 *Trididemnum* spp.로부터 얻어진 didemnins는 그들의 강력하고 광범위한 항바이러스, 항암 및 면역억제 효과로 인하여 의약품으로 개발 중에 있으며 특히 lead compound인 didemnin B는 수년내에 시판될 예정이다. Didemnins는 그들의 강력한 생리활성도 뿐만 아니라 구조 결정의 어려움으로 유명하다. 질량분석과 분광자료분석에 의하여 수차례 구조가 변경되었으며 최종적으로 전합성에 의하여 완벽한 구조가 결정되었다. Didemnins의 특이구조와 다양한 생리활성도는 여러 관련분야의 연구를 촉진시켜 현재 이들의 3차원 구조, 생리활성 기작, 변형유도체의 합성, 분자역학 및 분자운동학 등의 약학과 유기화학의 여러 분야에서 didemnins에 대한 연구가 매우 활발하다.

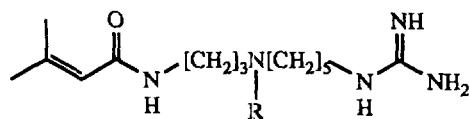
Linear peptides인 halocyanines A와 B가 tunicate *Halocynthia roretzi*로부터 분리 되었다. 원색동물의 혈액 환원성 색소인 tunichrome과 구조적으로 유사한 이들은 모두 항미생물 효과와 fish RNA viruses에 대한 성장억제 효과를 나타내었다.

위에서 언급한 세 종류의 해양 무척추 동물을 제외한 기타의 해양생물로부터 보고된 항바이러스성 천연물은 거의 없다. 드문 예로서 최근 pulmoante mollusc인 *Onchidium* sp.로부터 분리된 polypropionate계의 bispyrones인 onchitriols가 얻어졌는데 (10S,13R)의 기하배열을 가진 onchitriol이 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 항바이러스성 효과를 가진 것으로 알려졌다.

최근 심해 퇴적물에서 분리된 미확인종의 그람 양성 bacterium으로부터 macrolactins으로 명명된 일련의 C24 macrolides가 분리되었다. 이들중 대표물질인 macrolactin A는 강력한 항바이러스성 효과가 있음이 밝혀졌다. Macrolactins의 구조적 특징과 구조 결정 노력은 본 연구의 3.8.1. 해양 미생물의 대사 물질에서 상세히 언급하였다.

마지막으로 언급할 것은 극피동물(echinoderms)이다. 불가사리, 거미불가사리, 해삼등 극피동물의 천연물은 거의 대부분이 steroid(triterpene)계의 saponins이나 sapogenins이다. 이들은 여러 가지 생리활성도를 갖고 있으며 일부는 항바이러스성 효과를 나타내나 그 정도가 미약하여 신의약품으로의 개발가능성은 없는 것으로 알려졌다.

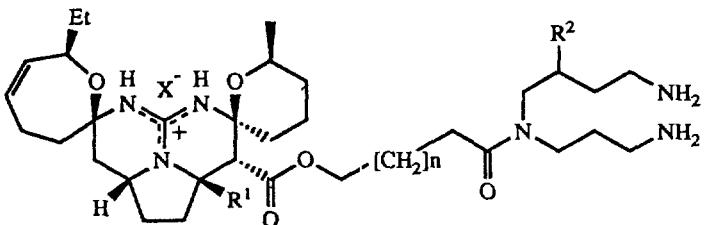
지금까지 수집된 대표적인 해양생물유래 항바이러스 물질의 구조는 다음과 같다.



(139) : $\text{R} = \text{COCH}_2\text{H}_{23}$

(140) : $\text{R} = \text{COCH}_2\text{H}_{21}$

(141) : $\text{R} = \text{CO}(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHC}_6\text{H}_{13}$
(sponge *Acarnus erithacus*)



ptilomycalin A (144) : $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$, $n = 13$

(sponges *Ptilomycale spiculifera* and *Hemimycale* sp.)

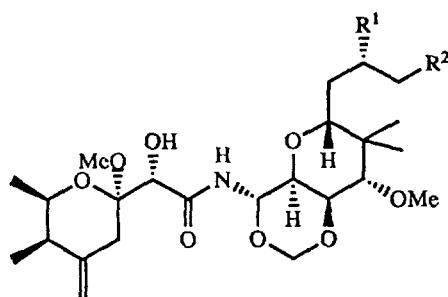
crambescidine 816 : $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{OH}$, $n = 13$

830 : $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{OH}$, $n = 14$

844 : $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{OH}$, $n = 15$

800 : $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{OH}$, $n = 13$

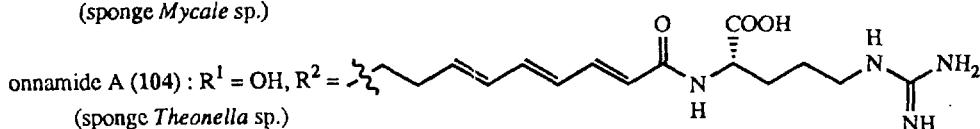
(sponge *Crambe crambe*)

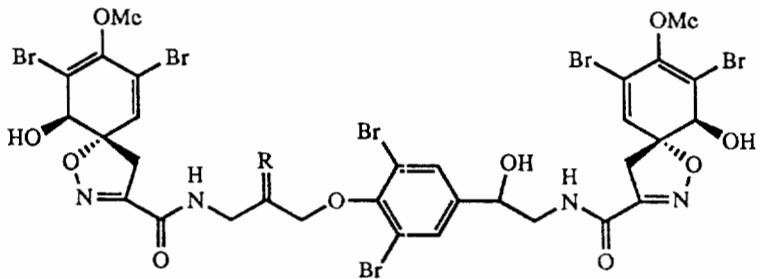


mycalamide A (103) : $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{OH}$

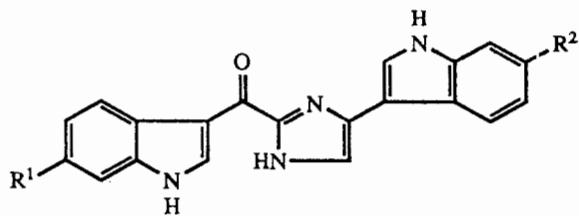
B : $\text{R}^1 = \text{OMe}$, $\text{R}^2 = \text{OH}$

(sponge *Mycale* sp.)

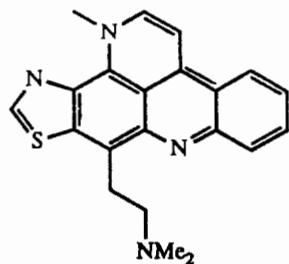




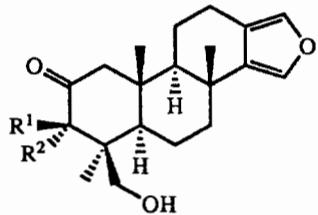
fistularin 3 ($R = H, OH$) and 11-ketofistularin 3 ($R = O$)
(sponge *Aplysina archeri*)



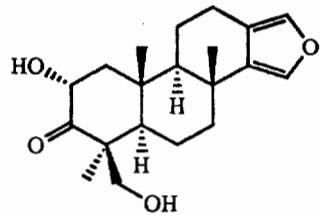
topsentin-A (167) : $R^1 = R^2 = H$
-B1 (168) : $R^1 = OH, R^2 = H$
-B2 (169) : $R^1 = OH, R^2 = Br$
(sponge *Topsentia genitrix*)



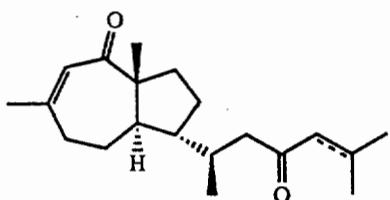
dercitin (202)
(sponge *Dercitus* sp.)



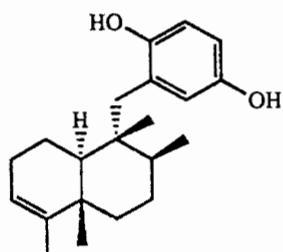
spongiadiol ($R^1 = H, R^2 = OH$) and
epispongiadiol ($R^1 = OH, R^2 = H$)
(sponge *Spongia* sp.)



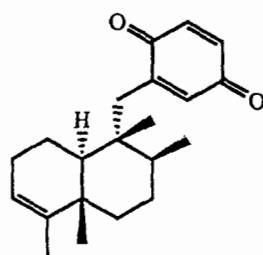
isospongiadiol
(sponge *Spongia* sp.)



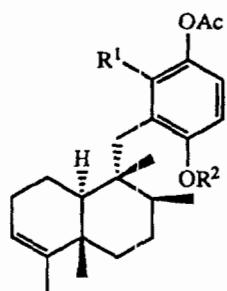
reiswigins A and B (dihydro) (424)
(sponge *Epipolasis reiswigi*)



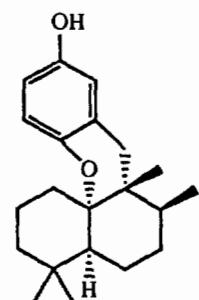
avarol
(sponge *Dysidea avara*)



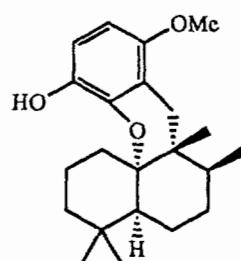
avarone
(sponge *Dysidea avara*)



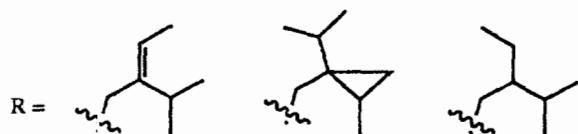
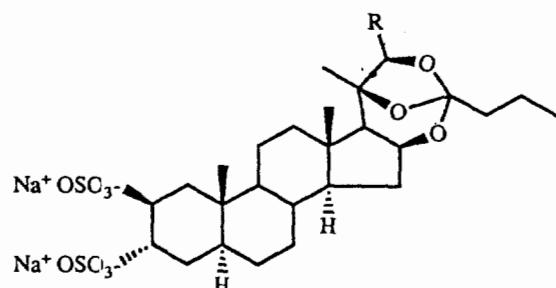
diacetylavarol ($R^1 = H, R^2 = Ac$)
and 6'-hydroxy-5'-acetylavarol
($R^1 = OH, R^2 = H$)
(sponge *Dysidea avara*)



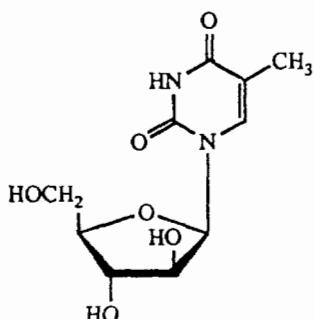
aurcol
(sponge *Smenospongia aurea*)



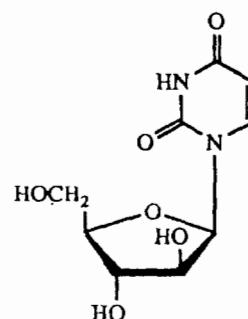
strongylin A
(sponge *Strongylophora hartmannii*)



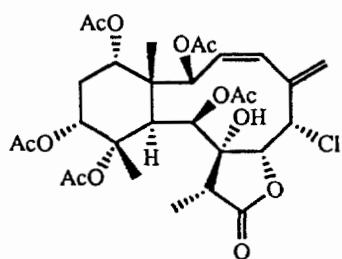
orthoesterol disulfates A - C (from left to right)
(sponge *Petrosia weinbergi*)



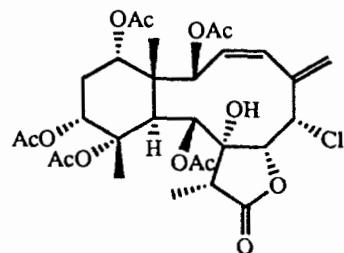
ara-T (spongorthymidine)
(various sponges)



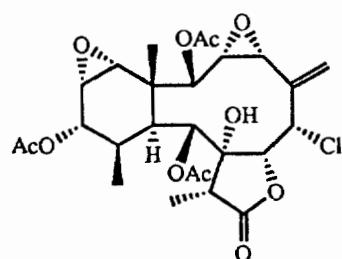
ara-U (spongouridine)
(various sponges)



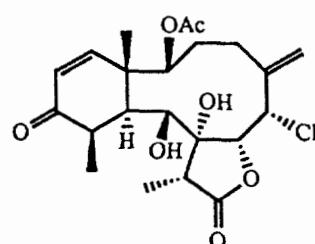
briarein A (760)
(gorgonian *Briareum asbestinum*)



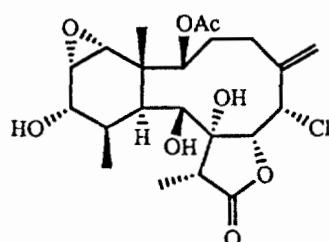
brianthecin V
(*B. asbestinum*)



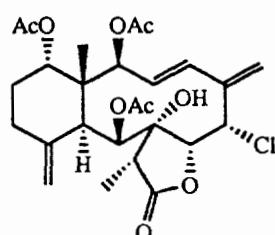
solenolide A
(gorgonian *Solenopodium* sp.)



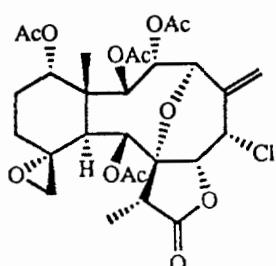
solenolide D
(*Solenopodium* sp.)



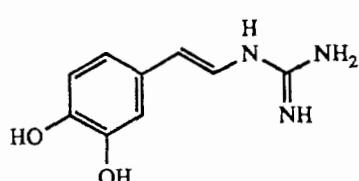
solenolide E
(*Solenopodium* sp.)



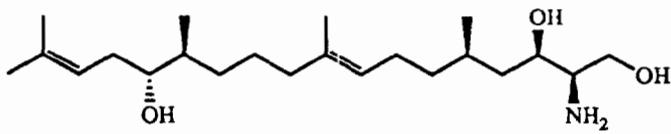
junceollolide B (770)
(gorgonian *Junceella fragilis*)



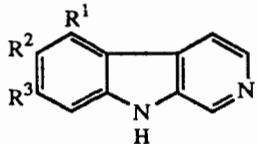
praeolide (771)
(gorgonian *Plexaureides praelonga*
and *J. fragilis*)



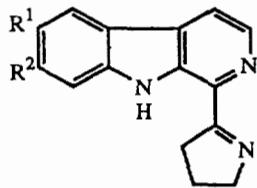
tubastrine
(stony coral *Tubastrea aurea*)



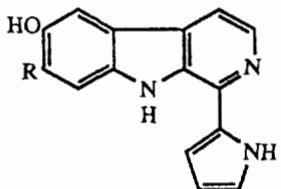
aplidiasphingosine (1243)
(tunicate *Aplidium* sp.)



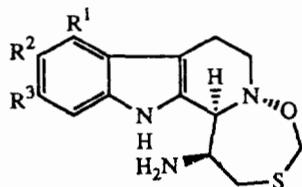
eudistomin D (1274) : R¹ = Br, R² = OH, R³ = H
 J (1275) : R¹ = H, R² = OH, R³ = Br
 N (1276) : R¹ = R³ = H, R² = Br
 O (1277) : R¹ = R² = H, R³ = Br
 7-bromo D (1292) : R¹ = R³ = Br, R² = OH



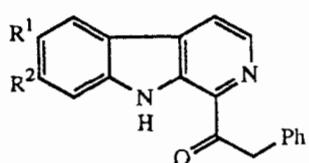
eudistomin G (1278) : R¹ = H, R² = Br
 H (1279) : R¹ = Br, R² = H
 I (1280) : R¹ = R² = H
 P (1281) : R¹ = OH, R² = Br
 Q (1282) : R¹ = OH, R² = H



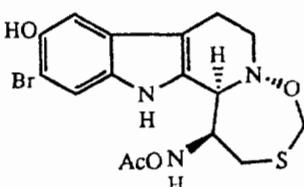
eudistomin A (1283) : R = Br
 M (1284) : R = H



eudistomin C (1285) : R¹ = H, R² = OH, R³ = Br
 E (1286) : R¹ = Br, R² = OH, R³ = H
 K (1287) : R¹ = R² = H, R³ = Br
 L (1288) : R¹ = R³ = H, R² = Br
 debromo-K (1294) : R¹ = R² = R³ = H

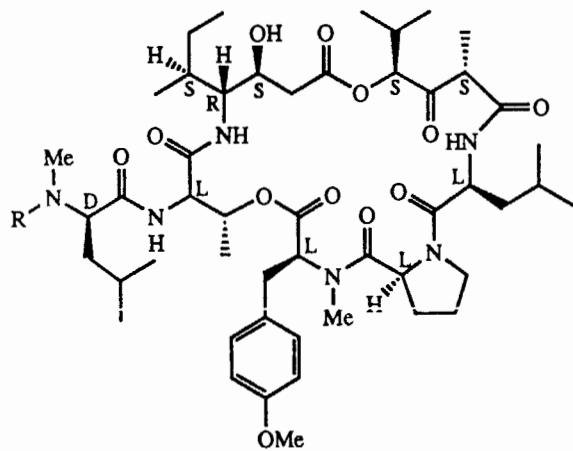


eudistomin R (1289) : R¹ = H, R² = Br
 S (1290) : R¹ = Br, R² = H
 T (1291) : R¹ = R² = H

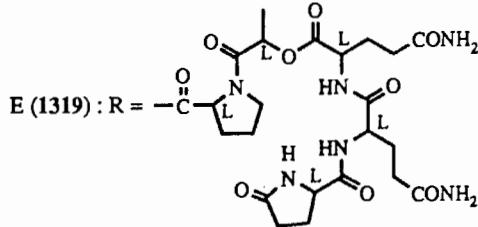
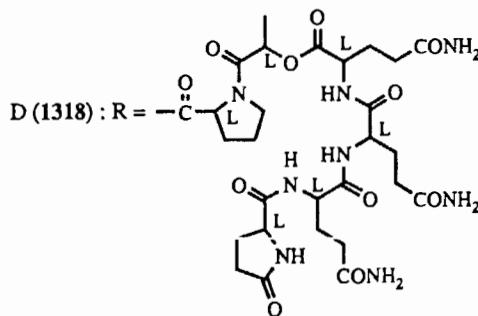
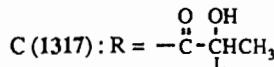
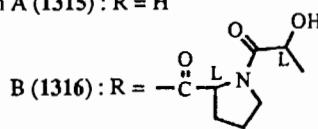


eudistomin F (1293)

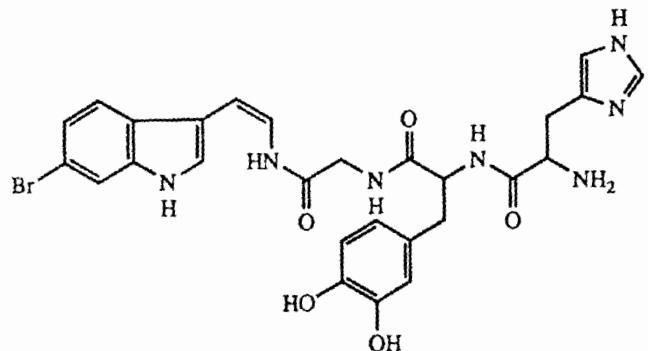
eudistomins from tunicates *Eudistoma* spp. and *Ritterella sigillinaoides*.



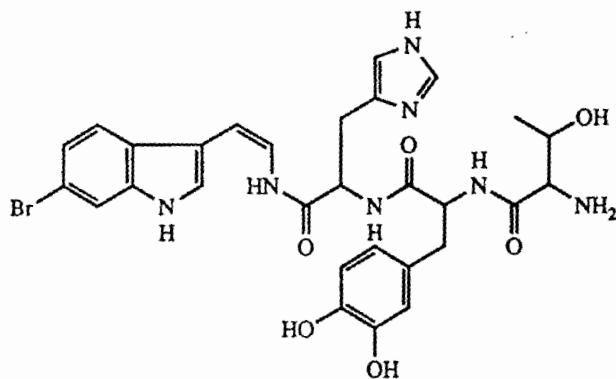
didemnin A (1315) : R = H



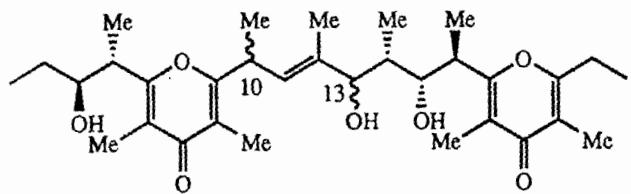
didemnins A - C (1315 - 1317) (*Trididemnum* spp.) and D - E
(1318 - 1319) (*Trididemnum solidum*)



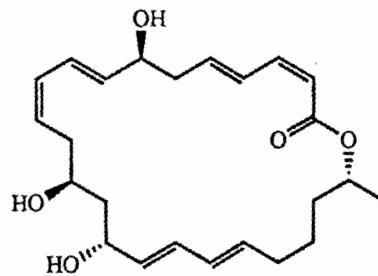
halocyamine A
(tunicate *Halocynthia roretzi*)



halocyamine B
(*H. roretzi*)



onchitriols I (10S, 13R) and II (10R, 13S)
(pulmonate mollusc *Onchidium* sp.)



macrolactin A
(deep sea gram positive bacterium)

제 4 장 결 론

최근 보고된 해양미생물의 생리활성 물질 중 상당수가 전혀 새로운 탄소골격과 강력한 생리활성도를 갖고 있음이 밝혀짐에따라 새로운 의약품의 자원으로서 해양미생물의 중요성은 더욱 커지고 있으며 해양생물 자원을 이용한 신물질 개발이 시급히 요구되고 있다. 이를 위해 본 연구과제에서 해양미생물을 대상으로 항바이러스나 항종양 물질의 탐색작업을 수행하였다.

해양세균으로는 해수, 해양저질층, 어류와 저서동물의 내장, 남극시료 등에서 분리한 세균 3,000주와 해양방선균, 극지방선균을 포함한 방선균 5,000주를 확보하여 -80 °C에 보존하였다.

해양세균 1,000여주와 해양방선균 1,000여주를 배양하여 그 배양액은 유기용매로 추출하여 해양세균시료 1,640개, 해양방선균시료 2,661개를 조제하였다.

생리활성 검색방법으로는 reverse transcriptase와 topoisomerase I 저해제에 대한 검색체계와 Herpes simplex virus (HSV-1, HSV-2)에 대한 검색방법이 확립되었다. DLD-1(human colon)와 p388 세포를 대상으로한 항종양물질 탐색방법도 확립하였다. 해양세균에서 분리한 sulfated polysaccharide의 생리활성도는 Sarcoma-180 세포를 사용하여 검색하였다. 항종양 검색체계를 이용하여 1,500여 시료를 처리하고 세포독성을 나타낸 것 중 Topoisomerase I 저해효과를 나타내는 물질을 선별하였다. 약 500개 시료에 대하여 항바이러스 활성을 검색하였다.

신규생체활성물질의 정제 및 구조분석을 위한 500 MHz superconducting FT-NMR system등 제반기기의 설치를 완료하였다. 현재 세포독성을 나타낸

방선균 균주 A1318의 균체 및 배양액에서 생리활성물질을 분리·정제 중이다. 항종양효과를 나타내는 다당류를 생산하는 균주 1주를 확보하였으며 항종양성을 나타내는 sulfated polysaccharide를 순수 분리 정제중이다.

해양생물유래 생리활성물질에 관해 수집된 연구자료는 생물의 종류, 물질의 구조상의 특징 및 생리활성도에 따라 분류되었고 테이타 베이스가 만들어졌으며 대표적인 물질에 관한 자료를 정밀히 분석하였다.

결론적으로 본 1차년도 연구를 통하여 본격적인 신규 생리활성물질 개발을 위한 해양미생물의 분리·보전 및 소량배양방법 확립, 생리활성도 측정방법의 도입, 실험기기의 설치, 기존자료에 대한 정리, 분석 및 Database구축 등 거의 모든 hard 및 soft wares의 준비가 완료되었다. 현재 reverse transcriptase inhibitor, topoisomerase inhibitor, Herpes simplex virus I, II 및 DLD-1, p388, Sarcoma cell등에 독성을 나타내는 물질을 탐색, 선별 작업이 활발히 수행되고 있다.

제 5 장 참 고 문 헌

김상진. 1992. 일본 해양생물공학 분야 최신동향. 미생물과 산업 18 : 9-12.

김상진, 조기웅, 이홍금, 강주경, 권개경. 1992. 해양미생물을 이용한 EPA 화합물 개발에 관한 연구. 한국해양연구소.

김상진, 이홍금, 조기웅, 정상운, 권개경. 1992. 생리활성물질 탐색을 위한 방선균의 분리, 분류 및 보전체계 확립에 관한 연구. 한국해양연구소.

신종현, 정지형, 서영완, 백은주. 1993. 해양동물로부터 추출된 천연물에 관한 연구(문헌중심). 한국해양연구소.

이광호. 1992. Topoisomerase 분리 정제 및 특성. 경북 대학교 석사학위 논문.

이정준, 김영호, 이성우, 김세은, 류택승, 김영희. 1992. Retrovirus 중식 억제인자의 탐색(III). 유전공학연구소

이종교. 1992. 항 비루스제 개발의 최신 동향. Pharma Review. 1,2:2-21.

Attaway, D. M. 1989. Marine biology in the national sea grant college program : Status and opportunities. In:S. Miyachi, I. Karube and Y. Ishida eds.. Current topics in marine biotechnology. The Japanese Society for Marine Biotechnology, Tokyo. pp. 37-40.

Baba, M., R. Pauwels, J. Balzarini, J. Arnout, J. Desmyter and E.D.

- Clecq. 1988a. Proc. Natl. Acad. Sci., **85**: 6132.
- Baba, M., M. Nakajima, D. Scholos, R. Pauwels, J. Balzarium, and E. De Clecq. 1988b. Antiviral Res., **9**: 335.
- Bartik, V., J.C. Braekman, D. Dafoze, C. Stoller, J. Huysecom, G. Vandevyver, and R. Ottinger. 1987. Can. J. Chem. **105**:2118.
- Bergquit, P.R. and J.J. Wells. 1983. In: P.J. Scheuer ed. Marine natural products: Chemical and biological perspectives, Academic Press, vol V.
- Boerresen, T., L. Gram. 1990. Workshop on marine biotechnology. In : C. Christiansen, L. Munck, J. Villadsen eds.. 5th. European Congress on Biotechnology proceeding. Munksgaard, Copengagen. pp. 1178-1183.
- Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1986. Carbohydrate Analysis : A Practical Approach, IRL press, Oxford, pp. 3.
- Darby, G.K., A.S. Johons, J.F. Kennedy, and R.T. Walker. 1970. J. Bacteriol., **103**:159.
- D'Arpa, P. and L.F. Liu. 1989. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. Biochimica et Biophysica Acta. **989**, 163-177.
- Dalica, K. and R.J. Franco. 1988. Inhibitors of DNA Toisomerases. Biochemistry. **27**, 2253-2258.
- Dodgson, K.S. 1961. Biochem. J., **78**: 312.

Imada, C., M. Maeda, N. Taga. 1985. Purification and characterization of the protease inhibitor "monastatin" from a marine *Alteromonas* sp. with reference to inhibition of protease produced by a bacterium pathogenic to fish. Can. J. Microbiol. 31:1089-1094.

Ireland, C.M., D.M. Roll, T.F. Molinski, T.C. McKee, T.M. Zabriskie, and J.C. Swersey. 1988. 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 . pp. 41-58.

Konciewica, M. 1972. Biochem. J., 130:40.

Nakashima, H., A. Tanabe , T.S. Tochikura, and N. Yamato. 1988. J. Clin. Microbiol., 26:1229.

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

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

Pauweis, R., J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijin, J. Desmyster, E. De Clercq. 1988. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection

of anti HIV compounds. J. Virol. Methods, 20:309-321.

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

Rinehart, K.L. 1992. 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. pp 41-60.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory press. 1.21-1.41.

Shin, J.H. 1989. Marine natural products:Chemistry and chemosystematics of the Gorgonian genus *Eunicea* and exploratory studies of the secondary metabolites of marine fungi. PhD thesis, University of California, San Diego.

Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology(2nd ed), Williams & Wilkins, Vol II.

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

제 6 장 위 탁 과 제

6. 1. 항바이러스 약효검색

연구과제명: 항바이러스 약효검색

연구기간 : 1992. 12. 5. - 1993. 8. 30

연구기관명: 한국화학연구소 의약활성연구실

연구책임자: 이 종교

요약문

I. 제목

항바이러스 약효검색

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양미생물로 부터 부작용이 적고 지속적인 치유효과를 가지는 항바이러스 물질을 발견하기 위하여 대량검색이 가능한 *herpes simplex virus type 1*과 *type 2*에 대한 *in vitro* 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 함께 조사함을 목적으로 한다. 미생물은 짧은 시간에 다양한 시료를 제공 할 수 있고 물질분리의 용이성 및 대량생산가능성이 높은점으로 보아 개발 된 치료제수와 치료효과가 크지않은 바이러스치료제 개발연구에 큰 공헌을 하리라 여겨진다. 특히 항바이러스 대량 약효검색이 비교적 최근에야 가능 하여졌으므로 해양미생물에 대한 항바이러스제 개발연구는 국제경쟁력이 크다 하겠고, 또한 우리나라 보유자원의 생리활성물질 보유 여부에 대한 정보 축적이란 점에서도 의의가 크다 하겠다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

해양미생물로부터 분리된 물질들로 부터 세포배양체계를 이용하여 일차로 *simplex virus type 1*과 *type 2*에 대한 항바이러스효과와 시료 자체의 세포에 대한 독성을 함께 조사한다. 독성이 적으면서 항바이러스 효과가 큰 시료들은 추가로 *varicella virus*와 *cytomegalovirus*에 대한 약효를 검색하여 *human herpesvirus*에 대해 광범위 효과를 나타내는 물질을 발견하려 한다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

방선균을 포함한 총 215개의 해양미생물 균주에서 분리한 550개에 대한 항 herpes simplex virus 약효 검색이 Vero세포체계에서 이루어졌는데 독성을 나타내지 않는 농도에서 뚜렷한 항바이러스약효를 나타내는 시료가 발견되지 않았다. 그러나 본연구에 의하여 좀더 많은 시료가 짧은시간에 검색되어질 수있는 시험조건이 결정되었음으로 지속적인 약효검색이 요구된다.

목 차

요약문	108
제 1 장. 서론	111
제 2 장. 연구추진방법	113
제 1 절. 실험재료	113
제 2 절. 실험방법	116
제 3 장. 연구결과 및 고찰	119
제 4 장. 결론	120
제 5 장. 참고문헌	120

제 1 장. 서론

천연두, 홍역, 소아마비등의 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 바이러스질병의 진단이 용이해지고 증식기작 및 질병기작 이해에 급속한 진전이 있었고 후천성면역결핍증 (AIDS: acquired immune deficiency syndrome) 등의 바이러스질병의 창궐로 인하여 바이러스치료제 개발연구가 최근부터 활발히 진행되어 왔다. 그러나 아직 공인된 치료제 수가 적고 그나마 치료가 허용된 바이러스종류도 주로 AIDS 바이러스 (HIV: human immunodeficiency virus), herpes simplex virus (HSV)와 cytomegalovirus (CMV)에 불과하고 약물의 종류는 대부분 핵산유도체들이다.^(2,3) 최근에 바이러스증식기작에 관한 새로운 지식과 정보 공급에 힘입어 바이러스특이기작 저해를 목적으로 하는 물질개발에 대한 시도가 많아졌고, 다른 구조와 기능을 가진 물질개발에 대한 관심이 높아지고 있으나 여러가지 바이러스들에 대해 광범위하게 약효를 가진 약물개발 가능성은 낮은 편이다. 따라서 아직도 무작위 대량 검색에 의한 새로운 물질발견 가능성 이 더 큰 편이다.

사람에게 감염하는 HHV는 현재 7가지가 알려져 있는데, 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 6는 AIDS 환자의 질병을 촉진시키는 역할을 하는 human

immunodeficiency virus (HIV)의 cofator일 가능성성이 큰 것으로 알려져 있다.⁽⁸⁾ 따라서 HHV는 바이러스질환치료제의 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 낙물내성균주출현도 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 부작용이 적고 지속적인 치료효과를 지닌 물질의 발견이 시급하다. 미생물로부터 항바이러스 물질을 분리 개발하려는 시도는 짧은 시간에 많은 시료를 제공할 수 있다는 점과 물질의 분리의 용이성이나 대량 생산가능성에서 물질 합성이나 동.식물 자원검색보다 더 유리할 수 있다 하겠다. 해양 미생물 대사산물에 대한 항바이러스약효는 최근에서야 가능해진 대량약효검색법으로 인하여 국제경쟁력도 있다 할 수 있고 우리나라 보유자원의 생리활성물질 보유 정도에 대한 정보축적이란 점에서 의의가 크다 할 수 있겠다. 본 보고서에서는 해양 미생물로 부터 HHV치료제 개발을 위한 일차검색으로 균 배양액의 추출물의 항HSV-1과 항HSV-2효과를 조사하였음을 보고하려한다.

제 2 장. 연구추진방법

제 1 절 실험재료

1. 세포

세포는 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 구입 한 Vero 세포 (African green monkey kidney cell) (ATCC CCL 81)를 사용하였다.

2. 바이러스

시험에 사용된 human herpesvirus 들은 ATCC로 부터 구입하였으며 다음 과 같다.

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

Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain MS (ATCC VR-540)

3. 시험물질 및 표준약물

시험물질은 한국해양연구소에서 분리한 해양미생물 배양액의 추출물들이었다. 시료의 종류는 추출방법에 의하여 4가지 종류로 분류되었다 (Fig. 6-1). 즉, 5 ml의 균 배양액을 원심분리하여 균침전물을 0.5 ml methyl alcohol (M-OH)에 녹인 것과 (시료이름으로 균주번호 뒤에 1 또는 C라고 불임), 상동액중 0.5 ml을 구멍크기 0.25 μm의 여과막에 통과 시킨 것 (시료이름, 2)들이 있었다. 상동액의 나머지를 동량의 ethyl acetate (EA)를 첨가하여 물층과 EA층으로 분리하였는데, 물층은 그대로 (시료이름, 4, A 또는 W), EA층은 건조 시킨 후 0.45 ml M-OH에 녹였다 (시료이름, 3 또는 E). 표준약물로서 삼천리제약에서 기증한 acyclovir (ACV)와 cytosine-β-D- arabinofuranoside (Ara-C) (sigma)를 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 20 mg/ml로 녹여 사용하였다 (약물구조 Fig. 6-2).

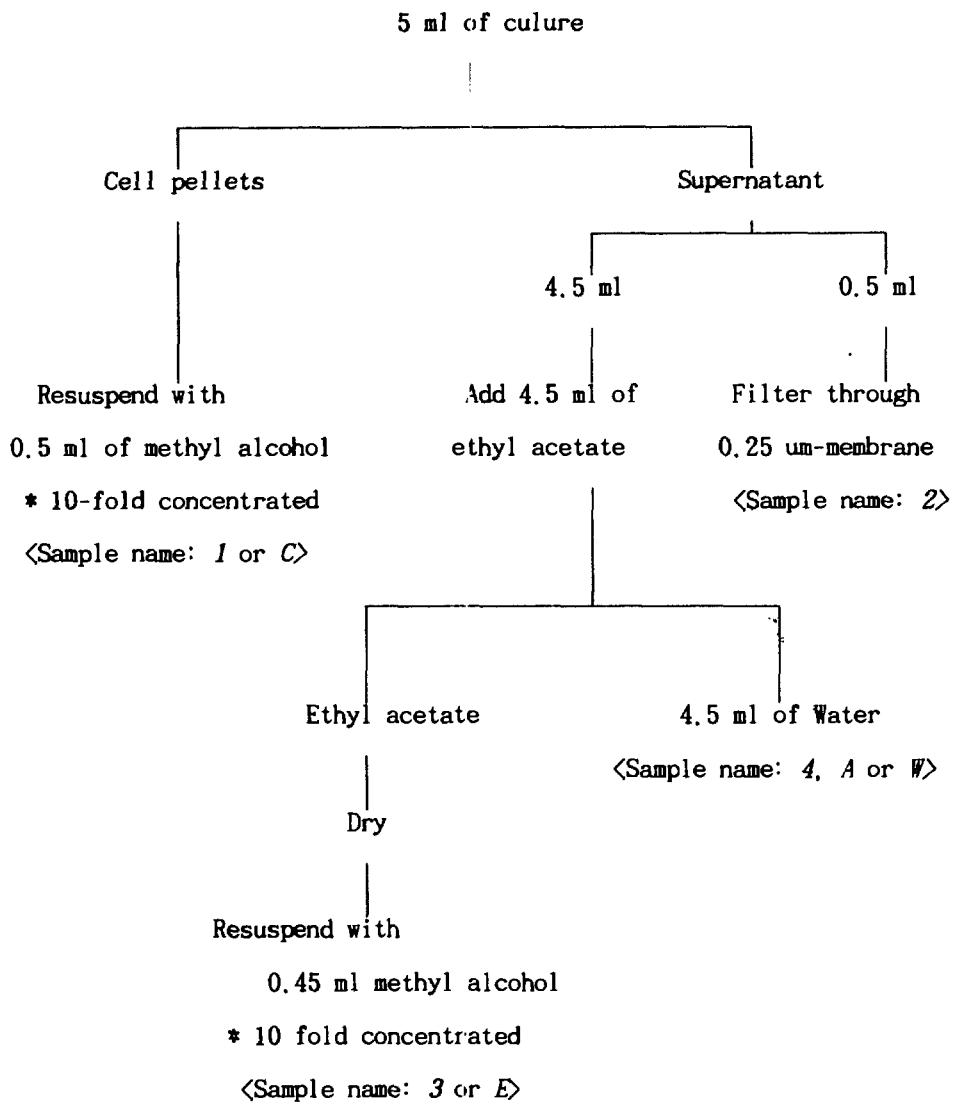
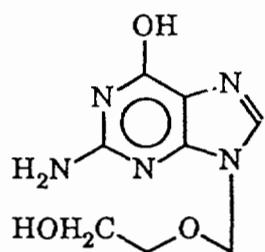
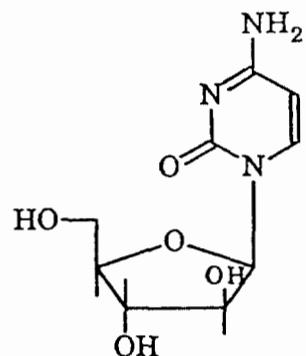


Fig. 6-1. Fractionation scheme of microbial culture broth
and preparation of samples for antiviral testing



Acyclovir



Ara-C

Fig. 6-2. Structural formulae of acyclovir and
cytosine- β -D-arabinofuranoside (Ara-C)

제 2 절 실험방법

1. 세포배양

Vero세포를 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 때 까지 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 증식시켰다. 접종 후 3 -4 일 마다 trypsin처리를 하여 세포를 1:4로 조개어 계대하였다.

2. 바이러스의 증식

HSV-1과 HSV-2를 Vero세포에서 증식시켰다. 즉, T75-flask (배양면적 75 cm²)에 Vero세포단층이 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 흡착시킨 후 배양액을 제거함으로서 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 삼회 거친 후 4 °C, 5000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상동액을 소량 씩 용기에 분주한 후 -70 °C에 바이러스 종균액으로 보관하고 실험에 이용되기 직전에 바이러스를 37°C에서 신속히 녹여 사용하였다.

3. 바이러스 역가측정

바이러스종균액의 역기를 알기위하여 DME/2% FBS 배양액으로 1:10으로 연속희석한 후 Vero 세포의 완전한 단층이 형성된 96-well plate에 well당 100 ul씩 접종한 후 1 시간 동안 배양 후 흡착되지 못한 바이러스액은 제거하였다. 새로이 100 ul의 배양액을 첨가한 후 3일간 37 °C의 CO₂ 배양기에

서 배양한 후 같이 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide)방법 (실험 방법, 5항 참조)을 이용하여 역가를 측정하였다.

4. 향herpes simplex virus 약효검색

약효검색은 virus-induced cytopathic effect (CPE) 저해법을 이용하였다. 즉, 96-well plate에 Vero세포를 증식시킨 후 DME/2% FBS 배양액으로 희석된 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID₅₀ (50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100 μl씩 접종하고 1시간동안 37°C에서 흡착시킨 후 배양액을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물을 duplicate로 각 well에 100 u1씩 첨가하고 37°C CO₂ 배양기에서 3일 배양한 다음 MTT검색법 (실험방법, 5항 참조)으로 50%의 세포를 살아남도록 한 약물의 농도를 EC₅₀ (50% effective concentration)로 결정하였다. 약효평가시 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 concentration)로 결정하였다.

5. 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 u1씩 넣

어준 후 37°C CO₂ 배양기에서 두시간 동안 배양하였다. 산성화된 isopropanol/6% triton X-100액을 100 ul 씩 각 well에 넣어준 후 교반기를 이용하여서 formazan 결정들이 완전히 녹도록 하였다. Microplate reader (Vmax, Molecular Devices)를 이용하여 540 nm와 690 nm에서의 흡광도를 읽었다. A₅₄₀과 A₆₉₀의 흡광편차에서 blank값을 뺀 다음 cell control과 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

실험재료 및 방법의 Fig. 6-1에 기술한 바와 같이 추출과정에 따라서 4가지로 분류되는 시료들은 조성을 알 수 없는 다양한 물질을 함유하고 있다: 1) M-OH에 10배농축되어 녹여진 균체시료(시료이름으로 균주번호 뒤에 1 또는 C라고 불임); 2) 균체가 제거된 상등액 (시료이름 - 2); 3) 건조되었다가 다시 M-OH에 10배농축되어 녹여진 EA 추출 시의 EA 총 (시료이름 - 3, 또는 E); 4) EA추출 시의 물총 (시료이름 - 4, A 또는 W). 대량검색을 위하여 각 시료의 실험농도 가지수를 최소로 하면서도 독성을 나타내지 않는 범위에서 항바이러스효과를 최대로 관찰할 수 있는 실험농도결정이 중요하였다. 여러번의 시험을 거친결과 상등액 그대로 (시료 2)와 EA추출 시 물총 (시료 4, A 또는 W)은 5 %와 1.25 %의 2 농도로 나머지는 5 %, 1.25 %와 0.31 % (원액에 대한 농도로는 50 %, 12.5 %, 3.1 %)의 세농도로 일차 검색하기로 결정하였다.

총 215개 균주에서 분리한 550개에 대한 Vero세포체계에서의 항HSV-1과 항 HSV-2 약효검색이 이루어졌는데 이는 방선균의 경우 균주당 C, E, W의 세종류의 시료가 나머지 균주의 경우 균체를 제외한 상등액추출물로부터 발생하는 E와 W 두종류의 시료가 보내어 졌기 때문이다. 대부분의 시료들이 일차검색시 약효보유여부가 판정되었으나 때로는 저농도에서 나타나는 독성 때문에 시험농도를 낮추어야 하였다. 세포독성을 나타내는 농도에서 항바이러스효과를 나타내는 시료들이 있었지만 순수분리 과정이 필요할 정도로 약효가 좋은 시료는 발견되지 않았다 (자세한 결과 보고하지 않음). 따라서 개발가치가 있는 물질을 발견하기 위하여 지속적인 약효검색연구가 이루어 져야 하겠다.

제4장 결론

해양미생물로 부터 부작용이 적고 지속적인 치유효과를 가지는 항바이러스물질을 발견하기 위하여 대량검색이 가능한 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성이 Vero세포체계에서 조사되었다. 방선균을 포함한 총 215개 균주에서 분리한 550개에 대한 검색이 이루어졌는데 독성이 나타내지 않는 농도에서 뚜렷한 항바이러스약효를 나타내는 시료가 발견되지 않았다. 따라서 지속적인 연구탐색이 요구된다.

제5장 참고문헌

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.

6.2. 항바이러스성 sulfate함유 polysaccharide 탐색

연구과제명: 항바이러스성 sulfate함유 polysaccharide 탐색 약효검색

연구기간 : 1992.12.5. - 1993.8.30

연구기관명: 부산수산대학교, 생물공학과

연구책임자: 공 재열

요약문

I. 제목

항바이러스성 sulfate함유 polysaccharide 탐색

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양으로부터 생산되는 다당은 예로부터 주목을 받아와 여러 방면에서 여러 가지 형태로 인간생활에 이용되어 왔다. 현재까지 항종양성 다당류로서는 hyaluronic acid로 대표되는 mucopolysaccharide가 병리학적 분야에서 herpes simplex virus에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 해양세균의 다당류에 관한 연구는 주로 *Vivrio*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*등에서 생산하는 polysaccharide의 항종양성에 관한 것이었다. 해조류 유래의 sulfate 함유 polysaccharide인 dextrin sulfate, pentosan polysulfate, carrageenan, heparin 등은 herpes simplex virus, cytomegalovirus, HIV-1 등에 효과가 있는 것으로 알려져 왔으나 해양미생물 유래의 sulfate함유 polysaccharide는 현재까지도 *Clostridium*, *Halobacterium spp.*가 생산하는 다당체만이 알려져 있을 뿐이다. 해양미생물이 생산하는 다당류의 생리활성에 관하여는 아직도 미지의 분야이며 특히 sulfate함유 다당류는 극히 제한된 종류에만 알려져 있다. 따라서 해양에 존재하는 많은 미생물 가운데 생리활성능이 있는 균을 선별하고 새로운 물질을 분리하여 화학적 특성 및 생체내에서의 기능에 관한 연구를 하는 것은 산업적으로 유용한 결과를 얻을 뿐만 아니라 그의 응용범위를 확대해 나갈 수 있을 것으로 생각된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

가능한한 채취장소를 달리하여 많은 수의 세균을 계속적으로 분리하고 보존 중인 세균들과 함께 고체배지에서 점조성 물질을 생산하는 세균을 1차 선별하고 이를 다시 액체배양하여 배양액에서 점도가 높은 점물질을 생산하는 세균을 분리한다. 선별된 미생물의 점성이 높은 배양액으로부터 다당류를 organic solvent로 부분정제한 후 sulfate함유 유무를 확인한다. 선별된 황함유다당 생산균주의 형태학적·생리학적 특성 및 그 생리활성도를 조사 한다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

채취원을 달리하는 해양으로부터 약 1,500주의 미생물을 screening한 결과 약 10여 주의 미생물이 다당류를 생산하였다. 그 가운데 1주가 sulfate를 함유한 polysaccharide를 생산하였다. 이 균주는 그람음성의 간균으로 glucose를 발효시키고 nitrate를 환원시키며 gelatinase와 alginin dihydrogenase를 생산하고 indole을 형성할 수 있으나 urease를 생산하지 못하였다. 분리된 sulfated polysaccharide의 생리활성을 검색하기 위해 mouse복강내에서 키운 Sarcoma-180세포를 96 well plate에 접종시킨 후 분리된 다당류를 첨가하여 배양한 결과 sulfated polysaccharide를 첨가할 경우 Sarcoma cell에서 세포성장이 저해되었음을 나타내었다. 앞으로는 이 황함유 다당류를 각종의 chromatography를 통하여 정제하여 그 구조를 분석하고 균주의 생육조건 및 다당류의 생산조건과 그 생리 활성도를 조사할 것이 요구된다.

목 차

요약문	123
제 1 장. 서론	126
제 2 장. 연구추진방법	130
제 3 장. 연구결과 및 고찰	135
제 4 장. 결론	143
제 5 장. 참고문헌	144

제 1 장. 서 론

생물이 생산하는 고분자물질을 생물고분자(biopolymer)라고 하며, 각종 생물은 유전자로서의 핵산 및 효소로서의 단백질 등과 같은 특이한 기능을 갖는 생물고분자를 함유하고 있어서 각종 환경에 대응하여 번식하고 있다. 그러나 생물체를 구성하고 있는 고분자물질 중에는 이외는 다른 다당류, 당지질 및 당단백질 등의 생물고분자도 다양 존재하며 지금까지 특정한 생물학적 기능이 확인되지 않았던 이유로 등한시되어 왔으나 점차 이들 물질의 많은 것을 생물체의 중요물질로서 인식하기에 이르렀다.

생체계에서 다당은 탄소 및 에너지 저장물질로서 아메바, bacteriophage 및 식균작용(phagocytosis)에 저항하며, 사멸을 일으키는 급격한 건조에 저항성을 보여주기도 한다. 또한 barrier로서의 역할을 수행하기도 하여 virus나 antibody가 세포벽의 특이 부위에 부착하는 것을 방지하고 전하를 띤 독소물질 및 독성의 금속 ion을 중화시키거나 착물을 형성케 하며 과잉의 기질을 다른 미생물이 쉽게 자화할 수 없는 형태로 전환시키는 역할도 수행한다(1-7).

다당은 주로 식물, 동물 및 미생물에 의하여 생합성되는데 특히 미생물 다당류나 이의 유도체는 이미 알려진 식물 및 해조류 유래의 천연다당류나 기타 합성고분자와는 달리 독특한 물성과 생리활성을 나타내며 생분해되므로 공해가 없는 특징을 갖는다. 식물성 점질 다당은 통상 식물점질물(plant mucilages)이라고 알려져 물에 용해되어 점성의 용액을 만든다. 고등식물의 뿌리, 잎, 꽃, 과실, 종자 등 각종 조직에 존재하여 세포간 물질로서 함유되어 있는 것외에도 pectin 등과 같이 세포벽 성분 등의 기초골격 물질로서도 역할을 담당하고 있으며 수분의 저장 및 외부 이상환경에 대응하는 역할도 가지고 있다. 또한, 식물이 상처부위로부터 분비되어 방치된 후 고형화하여 상처를 보호하는 역할을 하는 다당과 혼합물을 식물 gum(plant gum)이라 불려지며 구조상, 물성 등의 식물점질물과 매우 유사하

다(8). 해조류 유래의 다당류는 세포내에 저장되어 에너지원으로서 역할을 하는 다당과 세포벽을 구성하는 다당으로 크게 구별된다. 저장다당으로서는 녹조류 및 홍조류에 α -1,4, α -1,6 결합을 하고 있는 glucan, 홍조류, 염조류 등에는 glycogen의 존재가 알려져 있으며, 세포벽 다당으로서는 식물과 마찬가지로 glucan, cellulose, xylan, mannan 등이 존재한다고 보고하고 있다(9,10). 대표적인 해조의 점질다당으로는 대표적인 agar(11-13), porphyran(14), carrageenan(15-17), alginate(18) 등의 구조가 밝혀져 있으며, 식품·의약공업 등에 광범위하게 사용되고 있다. 자연계에 존재하는 진균류(true fungi) 가운데 생산되는 구성다당성분중 항종양 활성, 감염방어효과, 항보체 활성, 식세포활성 등의 면역조절활성, 소염활성, 혈당강하 작용을 갖는 다당이 분리되었다(19).

미생물 다당에 관한 연구는 1942년 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 다당인 dextran의 의료면에서의 용도로 사용하기 위해 개발된 이래 계속적으로 연구가 되어왔다(7,20).

미생물이 생산하는 세포외 다당류는 미생물의 생태학에서도 점차 중요해지고 있다. 특히 다른 생물에의 phagocytosis를 저해하거나 혈액에서 antimicrobial factor로서 작용하면서 pathogenic bacteria를 파괴하는 점에서 매우 중요하게 연구되고 있다(21). 세포외 다당류는 실제적인 측면에서 적당한 생산균의 선택 및 배양방법으로 대량생산이 가능한 다당류이며 발효액으로부터의 회수가 쉽고 정제비용이 적게 들므로 상업적 잠재력이 가장 높은 다당류이다. 더우기 최근에 들어서 다당의 구조, 물성, 기능의 상호관계가 점차 연구되고 유전자조작 등에 의한 구조의 변환도 가능하게 되어 바라는 물성의 다당을 얻을 수 있는 biopolymer engineering이 가능케 되어 미생물의 다당 및 유도체의 생산은 미생물을 이용한 유용물질 생산에 관한 학문적, 상업적으로 중요성을 인식받게 되었다.

해양으로부터 생산되는 다당은 예로부터 주목을 받아와 여러 방면에서 여러 형태로 인간생활에 이용되어 왔다. 다당의 생산은 주로 해조류로부터

이며 극히 일부분이기는 하나 해양의 동·식물에서도 발견되고 있다. 그러나 최근에 들어서 해양미생물이 생산하는 항종양성 다당체(anti-tumor polysaccharide)에 관한 연구보고가 나오면서 이의 작용기작과 구조해석 등에 많은 관심을 기울이고 있다.

일반적으로 미생물이 생산하는 다당체로서는 세포밖으로 생산하는 세포 외 다당과 미생물의 세포벽 구성성분으로서 미생물의 세포표층의 기층구조를 담당하고 있는 다당체가 있다. Gram 음성 세균에서는 세포벽을 구성하고 있는 다당체로써 lipopoly-saccharide(LPS)가 있는데 이 다당체는 항원으로서의 성질외에도 내독소로서의 다채로운 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져, 항원성은 다당부분이, 내독소로서는 지질부분이 담당하고 있다. 또한 lipopolysaccharide는 항종양 작용이 있는 것으로 연구되어 일시적으로 항암제로써 주목되어 연구되어 왔으나 치료효과는 낫다.

Mucopolysaccharide는 원래 동물 생체내에 존재하는 다당으로써 발견되어 분포와 구조, 기능에 대해서 많은 연구가 되어 왔으나 다수의 미생물에서도 존재하는 것으로 알려져 왔다. Mucopolysaccharide를 구성하고 있는 주 당성분은 일반적으로 amino acid와 uronic acid로서 hyaluronic acid(HA)로 대표되는 non-sulfated mucopolysaccharide와 heparin 등 동물생체내에서 중요한 역할을 담당하고 있는 sulfated polysaccharide로 크게 구분된다. 특히, sulfated polysaccharide는 각종의 질병에 대해서 형태적, 양적 변화가 쉽게 일어나 질병 생리학적 분야에서 주목받고 있다. 특히, dextran sulfate, pentosan polysulfate, fucaidan, carrageenan, heparin과 같은 sulfated polysaccharide는 herpes simplex virus, human cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, sindbis virus, human immunodeficiency virus type I(HIV-I)의 replication을 *in vitro*에서 강하게 저해하고 있는 것으로 알려져 sulfated polysaccharide가 DNA, RNA virus에 대한 growth inhibitor로써 장래 기대가 주목받고 있다(22-26).

AIDS는 현재 HIV virus의 감염에 의해서 생기는 질병으로써 생명에 커다

란 위협을 주고 있는 실정이다. Sulfated polysaccharide의 HIV type 1에 영향을 미치는 작용기작을 cell culture system에서 연구한 바에 의하면 virus의 CD4⁺ cell 흡착을 방해하는 것으로 보고 있다(27, 28). Dextran sulfate를 HIV-1 감염 C4⁺ cell과 함께 배양하면 AIDS 치료제로 쓰이는 3'-azido-2',3'-dideoxy thymidine(zidovudine)과는 달리 syncytium 형성을 저해하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 syncytium 형성은 AIDS 환자로부터 T4 lymphocyte 감소에 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정된다(28, 29). In vitro에서 sulfated polysaccharide는 여러 T4 cell line에 독성을 나타내지 않아 AIDS 치료에 사용될 수 있을 것으로 기대된다(24, 27, 28). 반면에 heparin이나 다른 sulfated polysaccharide는 in vitro에서 HIV virus의 생육을 크게 억제하고 있기는 하지만 혈액의 응고를 방해하는 것으로 밝혀져 anti-AIDS drug로서는 사용할 수 없을 것 같다. Anti-HIV-1 activity와 antithrombin activity와는 밀접한 관계가 있으며 따라서 강력한 anti-HIV activity를 나타내는 sulfated polysaccharide는 상대적으로 동시에 antithrombin activity를 낮춰주는 역할을 다져야만 하는 것을 요구하고 있다.

현재까지 미생물로부터 생산되는 sulfated polysaccharide에 대한 연구는 극히 적어 *Clostridium welchii*(29)가 생산하는 dermatan sulfate-like polymer, *Halobacterium* spp.(30)의 cell envelope에 존재하는 sulfated polymer, *Halococcus* spp.(31)의 major cell wall component인 heteroglycan 등이 알려져 있을 뿐이다. 따라서 미생물로부터 얻어지는 sulfated polysaccharide의 화학적, 생물학적 탐색은 매우 유용할 것으로 생각된다.

제 2 장. 연구 추진 방법

1. 다당류생산 균주의 분리

균주의 분리는 부산 해운대, 여수 국동항, 전라남도 완도, 신지도 근해로부터 해수와 다시마, 미역 등의 홍조류를 채취하여 해수는 marine medium에 도말하여 균을 분리하고 다시마, 미역 등은 부위별로 절단한후 멸균된 자연해수에 침지시켜 25°C incubator에서 2-3시간 shaking시킨 다음 marine medium plate에 도말한후 25°C incubator에서 3일간 배양하였다. 분리한 1,500여 균주중 고체배지에서 점조성 물질을 생성하는 균을 1차 선별하고 다시 액체배양하여 배양액의 점도가 10cp 이상 상승할 경우 exopolysaccharide를 생성하는 균으로 간주(32)하여 2차로 10균주를 분리하였다.

균의 보존은 각 지역으로부터 분리한 균을 Difco Marine Medium을 기본 배지로 하여 사면배지에서 28°C, 72시간 배양한후 4°C 냉장고에 보관하며, 4주마다 1회씩 계대배양시키면서 사용하였다.

2. 분리균의 동정 및 특성

분리균의 형태, 생리학적 및 생화학적 성질은 상법에 따라 행하였으며 이를 기초로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(33)에 준하여 동정하였다. 분리균의 형태적 관찰은 광학현미경(x1,000, Zeiss MC63, Germany)으로 관찰하였고 생화학적 test는 rapid multi test system인 API 20E kit를 이용하여 행하였다.

3. 사용배지 및 생육조건

분리용 배지와 보관용 배지로서는 해양으로부터 분리한 균임을 감안하여 Difco Marine Medium(2210E)를 기본배지로 사용하였으며 배지조성은 다음과

같다.

Peptone 0.5%(wt/vol), Yeast extract 0.1%(wt/vol), Ferric citrate 0.01%(wt/vol), Ammonium nitrate 0.00016%(wt/vol), Sodium phosphate [dibasic] 0.0008%(wt/vol), pH 7.8, sea water 1l.

생산배지로서는 Peptone 0.5%(wt/vol), Glucose 1.0%(wt/vol), Ammonium nitrate 0.00016%(wt/vol), Sodium phosphate [dibasic] 0.0008%(wt/vol), pH 7.8, sea water 1l. 을 사용하였으며 이때 glucose는 별도로 멸균시킨 후 clean bench내에서 첨가시켜 사용하였다.

Exopolysaccharide를 생성하는 균의 대량배양에는 5L Jar Fermenter를 사용하여 working volume 3.0l, aeration 1vvm, temp. 30°C, stirring speed 150rpm의 조건하에서 72시간 배양하였다.

4. 다당류의 추출

Exopolysaccharide의 분리는 Fig. 6-3과 같이 행하였으며 동결건조시킨 후 이를 조다당(crude polysaccharide)로 하여 실험에 사용하였다.

5. 비색법에 의한 일반적 분석법

5-1. General color reaction

Crude polysaccharide의 일반적인 정색반응으로서는 Molisch법, Iodine-전분 반응을, 그리고 ketose의 반응법으로서는 Recinol-HCl, Chromotropic acid법을, Pentose의 반응법으로서는 Orcinol법을, 환원당의 반응법으로서는 Fehling, Benedict, Tollen's반응법을, 단백질로서는 Nihydrin법을 각각 상법(34)에 따라 반응시켜 확인하였고, Uronic acid 반응법으로서는 Carbazole법(35)을 그리고 Hexoseamine의 반응법으로서는 Morgan-Elson법(35)을 각각 상법에 따라 반응시켜 확인하였다.

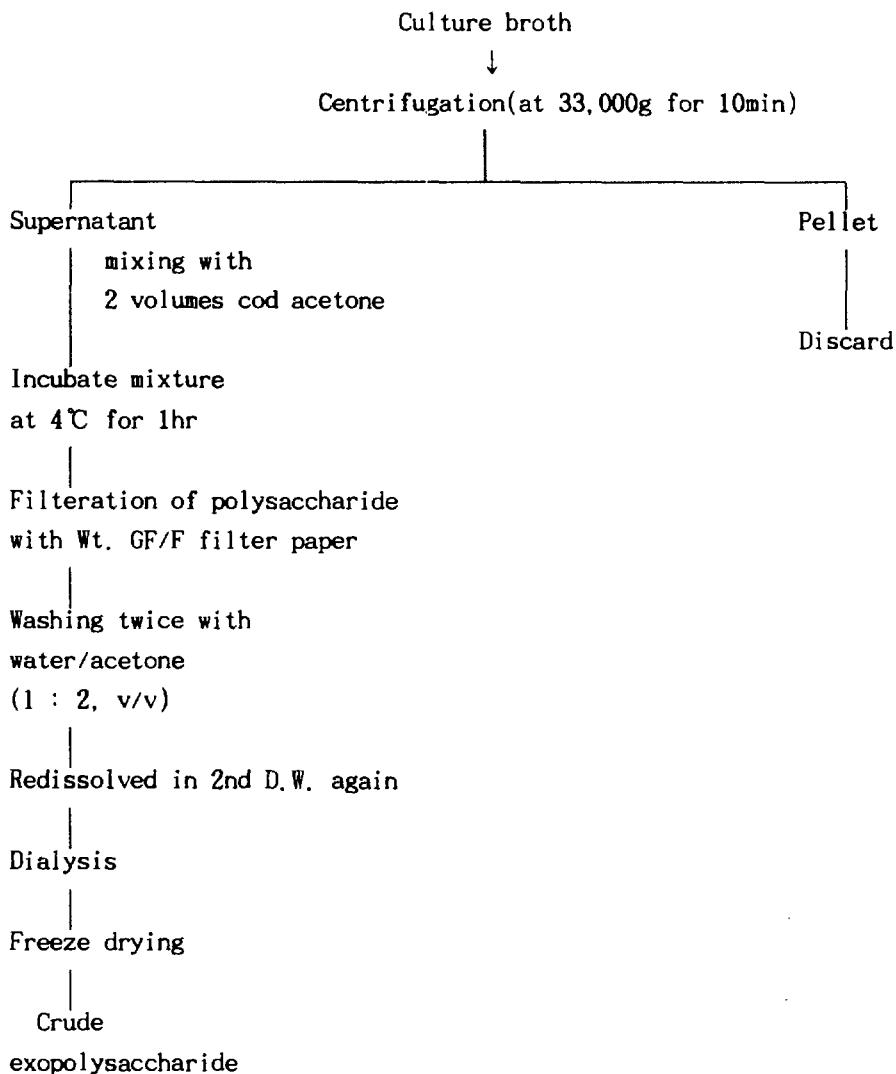


Fig. 6-3. A procedure of preparation of crude exopolysaccharide.

5-2. 전당(total sugar)의 측정

Exopolysaccharide의 total sugar의 함량은 Phenol-sulfuric acid method(35)를 이용하여 Glucose를 표준시료로 하여 구하였다.

5-3. 단백질 함량의 측정

Protein의 함량은 Bradford법(36)을 이용하여 Bovine serum albumin을 표준시료로 하여 구하였다.

5-4. Sulfate함량의 측정

Sulfate 함량은 Dodgson's method(37)를 이용하여 측정하였다. 시료 30mg을 90% formic acid를 사용하여 60% formic acid solution으로 조정한 후 100℃에서 8시간 동안 가수분해시킨 다음 감압하에서 건조시켰다. 건조 시료는 0.5ml의 D.W.에 재용해시켜 측정용 시료로 사용하였으며 표준시료로서는 K_2SO_4 를 사용하였다.

3.8ml의 TCA solution과 0.2ml의 가수분해 시료를 혼합한뒤 15분간 실온에서 방치시킨 다음 0.D. 500nm에서 흡광도를 측정하여 standard curve를 사용하여 sulfate의 함량을 구하였다.

6. IR spectrum

생산된 다당류 시료의 IR spectrum은 IR spectrometer(Shimadzu, model 27K-01077, Japan)를 사용하여 KBr 정제법(38)으로 조제한후 측정하였다.

7. In vitro antitumor activity의 측정

7-1. 시료

본 실험에 사용한 시료는 상기의 방법에 의해 분리한 것을 조다당으로 하여 멸균된 PBS에 녹여 사용하였다.

7-2. 암세포

암세포는 실험실에서 계대배양시키고 있는 흰생쥐의 육종 암세포의 일종인 Sarcoma-180(이하 S-180)을 사용하였다.

7-3. 암세포의 배양

본 실험에서 사용한 S-180 cell은 BALB/c mice의 복강에 1×10^6 cell/mouse로 주사하여 10-15일 경과후 복수가 차면 복강에서 S-180 cell을 채취하여 culture plate로 옮긴후 20% Fetal calf serum을 첨가한 RPMI 1640 배지에서 배양한 후 cell 농도를 2.5×10^5 cell/ml로 하여 사용하였다.

7-4. 조다당의 암세포 증식억제효과의 측정

배양된 S-180 cell을 24 well 및 64 well culture plate에 2.5×10^5 cell/ml의 cell 농도로 하여 2.5ml씩 분주한후 각 조다당의 농도를 각각 $100\mu\text{g}/\text{ml}$, $300\mu\text{g}/\text{ml}$, $600\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하여 첨가한후 CO₂ Incubator에서 96시간 동안 배양하면서 배양시간별, 조다당 농도별 등 각군의 세포수를 cell counter로 측정하여 대조군과 비교하였다. 이때 대조군에는 동량의 멸균된 PBS를 첨가하였다.

제 3 장. 결과 및 고찰

1. 분리균의 동정 및 특성

분리균의 형태는 Gram negative의 coccobacilli type임을 광학현미경 관찰로 확인하였으며(Fig. 6-4), rapid multi test system인 API 20NE kit를 이용하여 생화학적 성질을 검토한 결과는 Table 6-1과 같다.

2. 비색법에 의한 분리 조다당의 특성

2-1. General color reaction

Crude polysaccharide의 일반적인 정색반응의 결과는 Table 6-2와 같이 나타나 crude exopolysaccharide는 소량의 protein을 함유하고 있는 비환원성의 hexose로 구성되어져 있으며 전분은 함유하고 있지 않는 것으로 나타났다. 또한 Elson-Morgan reaction에 반응하지 않은 것으로 보아 hexoseamine은 존재하지 않는 것으로 나타났으나 Carbazole법에 의해 uronic acid의 존재는 확인할 수 있었다.

2-2. 전당(total sugar)의 측정

전당의 측정결과 당의 함량은 46.4%(w/w)이었으며, 53.65%(w/w)의 nonsugar compound로 구성되어져 있는 것으로 나타났다.

2-3. 단백질 함량의 측정

Bovine serum albumin을 표준시료로 표준곡선을 사용하여 측정결과 분리한 exopolysaccharide의 단백질 함량은 1.86%(w/w)였다.

2-4. Sulfate함량의 측정

표준시료로서는 K_2SO_4 를 사용하여 표준곡선으로 부터 구한 exopoly-saccharide의 sulfate의 함량은 4.28%였다.



Fig. 6-4. Photomicrograph of isolated strain($\times 1,000$).

Table 6-1. Physiological and biochemical analysis of sulfated polysaccharide producing microorganism.

Test	Result
Gram staining	-
Cell shape	coccobacilli type
Oxidase	+
Catalase	+
reduction of nitrates($\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$)	+
indole formation from tryptophane	+
glucose fermentation	+
alginine dihydrase	+
urease	-
gelatinase	+
β -glucosidase	+
β -galactosidase	+
assimilation of :	
glucose	+
arabinose	-
mannose	-
mannitol	-
N-acethyl glucosamine	-
maltose	-
gluconate	-
caprate	-
adipate	-
malate	-
citrate	-
phenyl-axcetate	-

Table 6-2. General color reactions of the produced exopolysaccharide.

Test	Crude polysaccharide
Phenol-H ₂ SO ₄ reaction	positive
Iodine reaction	negative
Molisch reaction	positive
Resorcinol-HCl reaction	negative
Chromotropic acid	negative
Orcinol reaction	negative
Fehling reaction	negative
Benedict reaction	negative
Tollen's reaction	negative
Nielsen reaction	positive
Cabazole reaction	positive

3. Exopolysaccharide의 IR spectrum

Fig. 6-5에 나타낸 바와 같이 당류 및 단백질에서 특이적으로 나타나는 3400cm^{-1} 에서의 강한 흡수가 관찰되었으며 $2880\text{-}2980\text{cm}^{-1}$ 부근의 C-H stretching, carboxyl기 유래의 1400 및 1600cm^{-1} 부근에서의 흡수가 관찰되었고 주로 uronic acid의 흡수를 나타내는 carbon산 2량체의 C=O의 신축 진동으로 고려되는 1725cm^{-1} 부근의 흡수(39)도 관찰되었다. 또한 S-O의 진동으로 추측되는 1240cm^{-1} 에서의 흡수가 관찰되었으며 sulfate ester의 존재를 나타내는 830cm^{-1} (40)에서의 흡수도 관찰되었다.

4. *In vitro* antitumor activity의 측정

실험결과 조다당의 *in vitro*에서의 암세포 증식억제효과의 측정결과 암세포 증식곡선은 Fig. 6-6와 같으며 이때의 사멸하는 cell량은 Fig. 6-7와 같이 나타나 *in vitro*에서의 암세포에 대한 조다당의 암세포 억제 효과를 확인할 수 있었다.

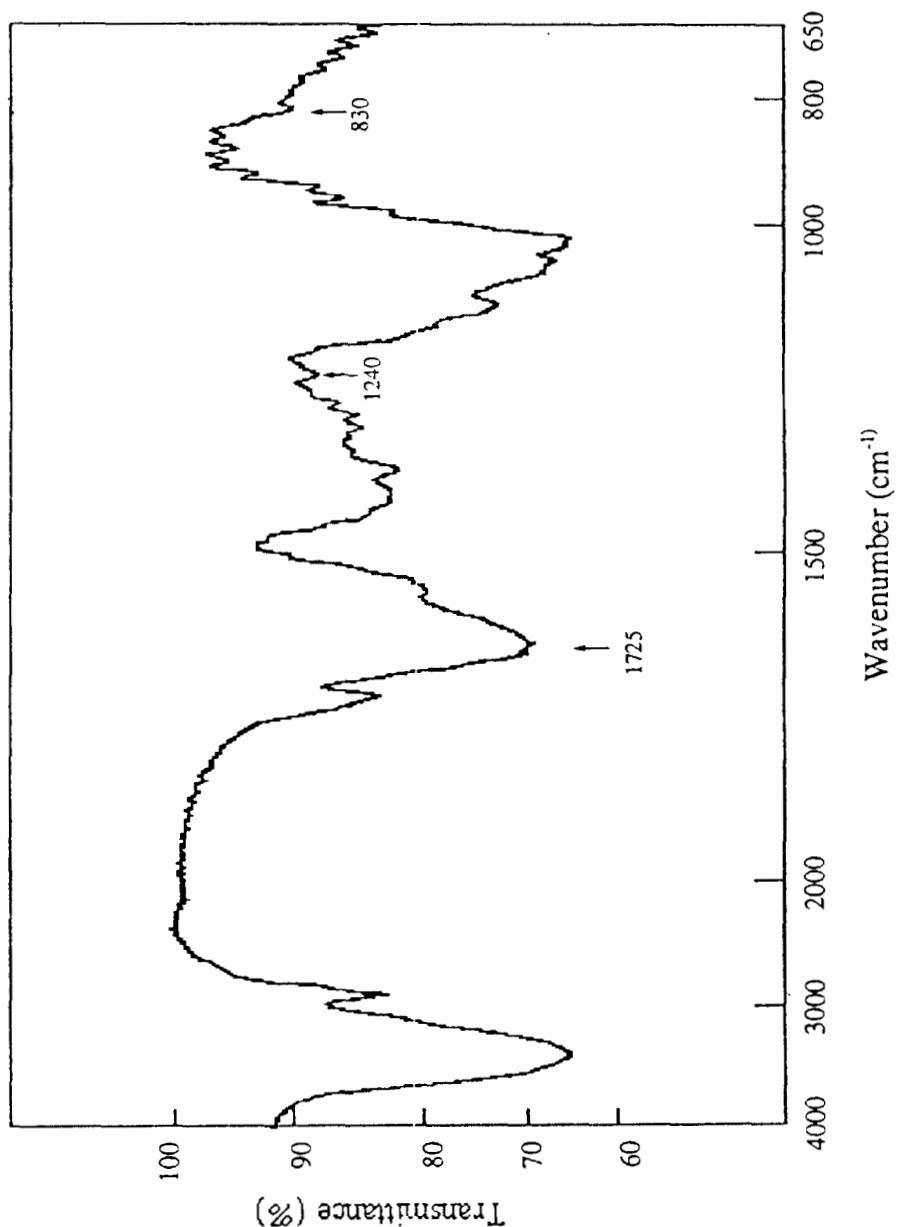


Fig. 6-5. IR spectrum of isolated exopolysaccharide.

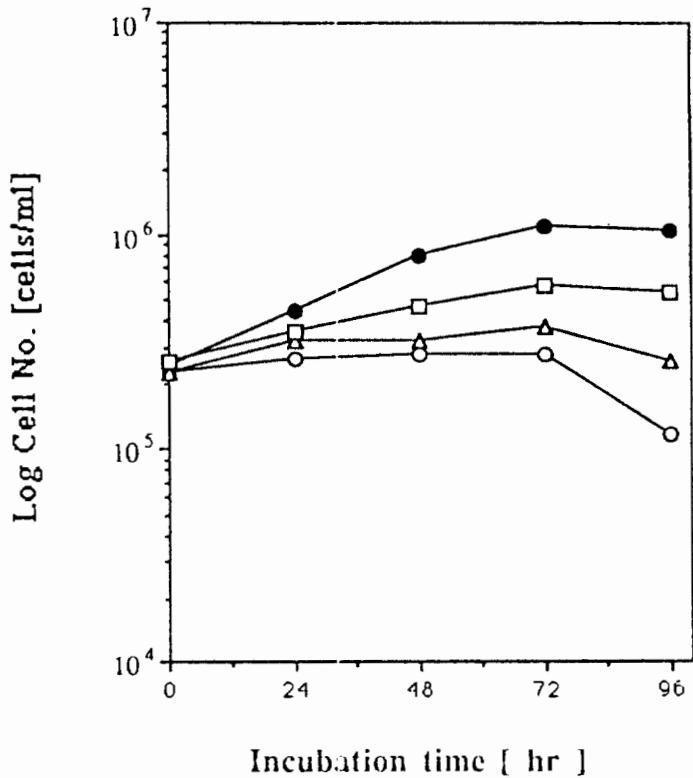


Fig. 6-6. Growth curves of Sarcoma-180 cells in the culture medium containing exopolysaccharide produced by isolated microorganism.

● - ● Control □ - □ 100 μ g/ml
 △ - △ 300 μ g/ml ○ - ○ 600 μ g/ml

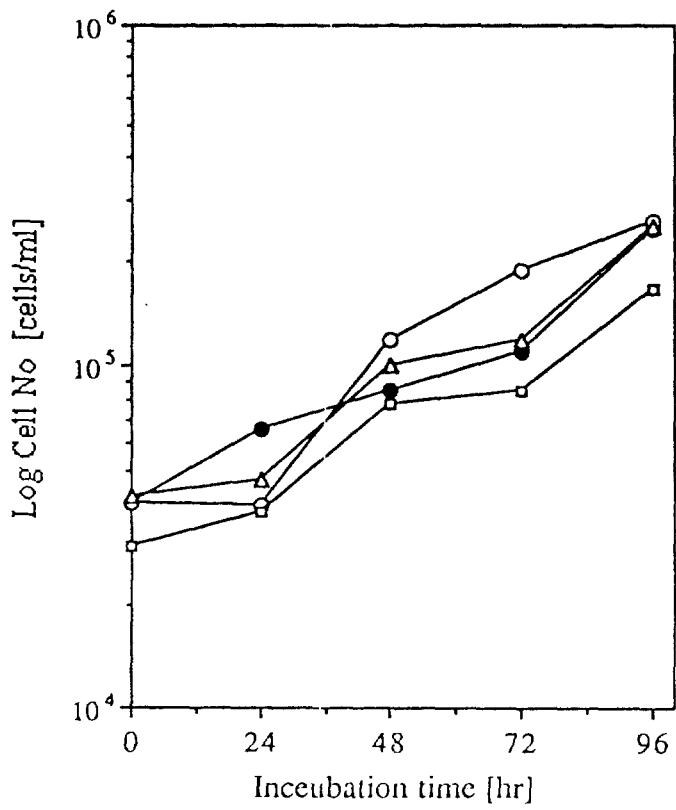


Fig. 6-7. Death curves of Sarcoma-180 cells in the culture medium containing exopolysaccharide produced by isolated microorganism.

● - ● Control □ - □ 100 μ g/ml
 △ - △ 300 μ g/ml ○ - ○ 600 μ g/ml

제 4 장. 결 론

해양으로부터 분리한 1,500여 균주중 sulfate함유 exopolysaccharide를 생성하는 균 1주를 분리하여 균의 생화학적 특성검사를 행하였으며, 추출한 exopolysaccharide는 일반적 비색분석법을 행한 결과, 전당(total sugar)의 함량은 46.4%였으며 uronic acid를 함유하는 hexose로 구성되어져 있는 것으로 나타났다. 또한 53.6%의 비당성분(nonsugar compound)중 단백질 함량은 1.86%였으며, sulfate의 함량은 4.28%로 나타났다. 그리고 IR spectrum에서 S-O의 진동으로 추측되는 1240cm^{-1} 의 흡수와 sulfate ester의 존재를 나타내는 830cm^{-1} 에서의 흡수를 확인할 수 있었다.

추출한 exopolysaccharide의 *in vitro*에서의 sarcoma-180 cell에 대한 항종양 활성은 첨가되는 exopolysaccharide의 양이 증가할수록 뚜렷한 암세포 억제 효과를 확인할 수 있었다.

제 5 장. 참 고 문 헌

1. Sutherland I.W. and Ellwood D.C. : in "Microbial Technology : Current state : Future prospects" ed. b A.T.Bull et al, 107, Cambridge Univ. Press, London(1979)
2. Sandford P.A. and Laskin A. : Extracellular Microbial Polysaccharides, ACS Symposium Series, 45(1977)
3. Slodki M.E. and Cadmus M.C. : Advances in Applied Microbiology, 23, 19(1978)
4. Kang K.E. and Cottrel I.W. : In Microbial Technology", vol(1), 2nd ed., Academic Press, Inc.(1979)
5. Ellooiott J.H. : In "Extrace llular Microbial Polysaccharides" ed. by R. F. Gould, ACS Symposium Series 45(1977)
6. Sandford P.A. : Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 36, 265(1979)
7. Alsop R.M. : *Progr. Ind. Microbiol.*, 18, 1(1983)
8. 多糖の構造と生物活性, 宮崎利夫, 朝倉書店, 97-133(1990)
9. Percival E. and R.H.McDowell : Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharide, Academic press(1967)
10. Painter J.J. : The polysaccharide, Vol(2), Academic Press(1983)
11. 葉木長次 : 日化, 58, 1388(1937)
12. Araki C. : Seaweed, Pergamon Press(1966), 3-7
13. Hirase S. : *Bull. Chem. Soc. Japan*, 30, (1957)
14. Rees D.A. and E.Conway : *Biochem.J.*, 84, 411(1962)
15. O'Neill A.N. : *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 6324(1955)
16. Weigl J., J.R.Turvey and W.Yaphe : Seaweed, Pergamon Press, 329-332(1966)

17. Dolan J.C.S. and D.A. Rees : *J. Chem. Soc.*, 3534(1965)
18. Hirst E. and D.A. Rees : *J. Chem. Soc.*, 1182(1965)
19. 多糖の構造と生物活性, 宮崎利夫, 朝倉書店, 1-36(1990)
20. L.H. Sperling and Carraher, C.E. : *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Vol(2), Wiley(1985)
21. W.D. Luzier : *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1151-1159(1982)
22. M. Baba, E.D. Clercq, D. Schols, R. Pauwels, R. Snoeck, C.V. Boeckel, G.V. Dedem, N. Kraaijeleves, P. Hobbrln, H. Offenheijm and F.D. Hollanfer : *J. Infect. Disease*, **161**, 208(1990)
23. M. Baba, D. Schols, R. Pauwels, R. Snoeck and E.D. Clercq : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**(11), 1742(1988)
25. M. Baba, R. Pauwels, J. Balzarini, J. Arnout, J. Desmyter and E.D. Clercq : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**, 6132(1988)
26. A.J. Nahmias, S. Kibrick and Bernfeld : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **115**, 993(1964)
27. K.K. Takemoto and P. Fabisch : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **116**, 140(1964)
28. M. Baba, Nakajima M., Scholos D., Pauwels R., Balzarium J. and De Clercq E. : *Antiviral Res.*, **9**, 335(1988)
29. H. Nakashima, Tanabe A., Tochikura T.S. and Yamato N. : *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1229(1988)
30. G. K. Darby, Johons A.S., Kennedy, J.F. and Walker, R.T. : *J. Bacteriol.*, **103**, 159(1970)
31. M. Konciewica : *Biochem. J.*, **130**, 40(1972)
32. 이신영 : 미생물과 발효, 15(3), 6-17(1991)
33. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt, Bergey's manual of systematic bacteriology(2nd ed), Williams & Wilkins,

