

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

1995. 8

연구기관
한국해양연구소

과학기술처

제출문

과학기술처 장관 귀하

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

1995년 8월

연구기관 : 한국해양연구소

연구책임자 : 이홍금

연구원 : 김상진 신종현 조기웅

 정지형 서영완 이상훈

 노정래 권개경 정상운

 윤탐미 이득수 박은희

 백은주

위탁연구기관 : (한국화학연구소)

 이종교 김해수 피미경

요 약 문

I. 제목

해양미생물을 이용한 생리활성선도물질 탐색기술개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

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

세계의약시장의 2%인 연간 30억불 이상을 갖고 있는 항암제 시장은 매년 20%이상의 증가추세를 보이며, 항바이러스약품은 1993년도의 경우 32억불의 판매를 보인 보였으며 그 중 60%는 AIDS 환자치료에 소요되었다. 항암이나 항바이러스 약제를 개발하기 위하여 일본, 미국, 유럽 여러국가에서는 새로운 선도물질을 찾고자 하며 지난 수십년간 해양생물은 새로운 생리활성의 제공자로서 여러 제약기업의 주목을 받아오고 있다. 현재까지 해양생물에서 약 5500여종의 신물질이 발견되었다. 이 중 농 의약품 용도로 약 40여 물질이 특허를 내었으며 그 중 5종이 상품으로 개발중이다. 현추세를 보면 새로운 의약품의 자원으로서 해양미생물의 중요성은 더욱 커지고 있으므로 우리나라도 해양생물 자원을 이용한 신물질 개발 분야에 대한 연구를 적극적으로 수행하여야 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 다양한 생리활성 검색방법을 확립하며 검색작업을 통하여 생리활성을 나타내는 미생물을 선별한다.
3. 생리활성을 나타낸 균주의 균체 및 배양액에서 생리활성물질을 분리정제하고 구조분석을 한다.
4. 생리활성물질을 구조분석한 균주의 생리학적, 생화학적 특성을 조사하고 동정한다.
5. 신물질인가의 여부를 확인하기 위하여 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, 오토츠크해역의 해양생물, 남극시료, 태평양 심해저 등에서 분리한 세균 5,000주와 해양방선균, 극지방선균을 포함한 방선균 5,000주

를 확보하여 glycerol 20% 용액에 넣어 영하 80 °C에 보존하여 생리활성 물질 검색에 이용하였다. 해양세균은 PYG배지에 정체배양시키고 Folch 용액으로 추출하여 Folch solution layer와 water phase 시료를 각각 분리 조제하였다. 방선균은 숙성된 해수가 첨가된 변형 ZoBell배지에서 진탕배양시킨 후 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 ethylacetate 층과 waterphase 층으로 분리하여 시료를 조제하였다.

2. 생리활성 검색방법 확립 및 후보균주 선정

3차년도에는 항종양물질 탐색을 위하여 해양세균시료 2,000 여개와 해양방선균시료 2,200 여개에 대하여 Human adenocarcinoma 인 DLD-1, Mouse Lymphotoic neoplasm 인 P388D에 대한 세포 독성능을 MTT(methyl tetrazolium bromide) 측정법을 변형하여 조사하였다. Lymphocyte에 대해 독성이 거의 없고 haemolytic activity가 없으나 암세포에 대하여는 강한 세포독성능을 나타낸 시료에 대해서는 Topoisomerase I 저해활성을 조사하였다. Human simplex virus의 저해활성검색은 숙주세포로 Vero 세포를 사용하여 HSV type 1과 2에 대한 항바이러스 효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 함께 조사하였다. 세포독성능이 높은 균주로는 8095A, 8265, 8273A, 8273, 7499, 8301, 7914, 8072A, 8321이 선별되었고, Topo I저해물질 생산균주로는 AF-1, 7798, 8441, 8032B가 선별되었다.

3. 생체활성물질 정제 및 구조분석

항암 및 항바이러스효과등의 생리활성도를 측정한 후 1차 연구대상으로 세포독성을 나타내는 시료를 선별하여 이의 균체 및 배양액에서 생리활성 물질의 이화학적 물리적 특성을 조사하고자 분리 정제하여 구조분석을 한 결과 균주중 8095A가 valinomycin을 생산하고 있음이 밝혀졌다.

현재 순수 분리 및 구조분석중인 시료는 Topo I저해효과가 있는 방선균 AF-1, 해양방선균 A8441, A8032-B와 세포독성능이 강한 남극방선균 A8273-A, A8273 균주 등으로 생리활성성분 모두 hemolytic activity가 없으며 actinomycin계열의 물질이 아니라고 분석되었다.

4. Valinomycin 생산균주의 동정

Valinomycin생산균주로 밝혀진 8095A의 형태학적, 생리학적 특성을 조사하고 세포벽 분석을 한 결과 *Streptomyces* sp.로 동정되었다. Topo I 저해능을 나타낸 균주 AF-1의 세포벽 분석, 형태학적 특성 및 생리 생화학적 특성을 조사하였으며 *Streptomyces* sp.로 동정되었다.

5. 자료검색을 위한 Database 구축

1차년도에는 해양미생물의 대사물질 및 항바이러스성 해양유래 생리활성물질에 대한 자료가 수집, 정리하였으며(1차년도 보고서 참조) 2차년도에는 해양생물유래 생리활성물질 중 세포독성능이 강하며 항암효과가 있는 대표적인 물질 200여가지에 대하여 생물의 종류, 물질의 구조상의 특징 및 생리활성도에 따라 분류하였고 대표적인 물질에 관해서는 분리방법, 구조적 특징, 생리활성도, 전합성 및 생합성, 산업적 이용 방안 등에 대한 자료를 정리하였다(2차년도 보고서 참조). 생리활성물질에 대한 신물질 여부의 결정과 신물질인 경우 기존물질과의 구조적 유사성을 측정하기 위하여 chemical abstracts에 직접 접근이 가능한 STN express software를 도입하여 이용하고 있다. 또한 미국 Scripps 해양연구소의 Fenical group과의 연계하여 그들이 보유하고 있는 보다 광범위한 Database를 통한 간접 search망 또한 이용이 가능하게 되었다.

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.

The global market for anticancers was estimated to be worth around \$3,000 million in 1991 - about 2% of the world drug market and increased by 20% yearly. Revenues from the sale of antiviral drugs were approximately \$3,200 million in 1993 of which agents in AIDS patients accounted for almost 60%. To develop anticancer and antiviral drugs Japan, USA, and European countries put great efforts to find new lead compounds. In last decades marine organisms caught great interest from pharmaceutical companies as sources for noble compounds. Despite its relatively short history, structures of over 5,500 novel secondary metabolites have been determined, of which ca 40 compounds revealed as agriculturally and pharmaceutically active compounds.

With expectation of future trends in search for bioactive compounds, research for development of novel compounds from marine organisms should be started immediately by domestic scientists.

III. Contents and Scope

The project was performed with the scope and area of the study as followings.

1. Isolation and preservation of marine microorganisms from various marine samples.
2. Isolation of compounds appearing antiviral and anticancer activity.
3. Structural analysis of isolated bioactive substances.
4. Identification of selected strains producing bioactive compounds.
5. Establishment of database of reported marine natural products with anticancer and antiviral activity.

IV. Results and Suggestions

1. Over 5,000 strains of marine bacteria and 5,000 strains of actinomycete including marine actinomycete and Antarctic actinomycete isolated from sea water, sea sediment, marine animals, algae, and Antarctic samples were collected and stored with 20% glycerol solution at -80°C . In third year crude extracts were prepared from 1,000 strains of marine bacteria extracted with Folch solution. Ca 700 strains of 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. Cytotoxic activities were measured against p388 and DLD-1 cell lines. Samples showing cytotoxicity were tested for inhibitory activity against topoisomerase I. Human simplex virus inhibitor assay test were selected as antiviral assay system. Marine actinomycetes strain AF-1, 8441, 8032-B, and 7798 showed cytotoxic activity against colon and leukemia cell line, and inhibited Topo I. Strain 8095A, 8273-A, and 8273 were selected for producing cytotoxic compounds without haemolytic activity. Strain 5826 and 5841 exhibited slightly antiviral activity againsts HSV-1 and -2 but their selectivity index was not enough high.

3. To isolate active compounds with strong anticancer activity, fermentation broth from strain 8095A and AF-1 was fractionated and its antitumor activities were investigated. The purified compound from strain 8095A was identified as Valinomycin. Another compounds

including AF1-A with topo I inhibitory activity but without haemolytic activity are under purification.

4. Strain 8095A producing valinomycin was identified as *Streptomyces* sp.. Its physiological and biochemical characteristics were tested. Strain AF-1 exhibiting topo I inhibitory activity was identified *Streptomyces* sp..

5. Database of marine bioactive substances were made on the basis of biological classifications and bioactivities. In first and second annual report, representative antiviral and anticancer metabolite from marine organisms and microorganisms were reviewed and analyzed for isolation methods, structural characteristics, bioactivities, and biosynthesis. This would be essential for identification of new bioactive compounds.

목 차

요약문	iii
표목차	3
그림목차	5
제 1 장 서론	9
제 2 장 연구추진방법	12
2.1. 연구내용	12
2.2. 실험재료 및 방법	12
제 3 장 연구결과 및 고찰	28
3.1. 해양미생물의 분리, 보전, 배양 및 시료조제	28
3.2. 항종양물질 생산균주 선별	29
3.3. Topo I 저해물질 생산균주 선별	31
3.4. HSV-1과 HSV-2 저해활성 검사	33
3.5. 항종양활성물질의 분리 및 특성	34
3.6. 선별균주 8095A와 AF-1의 동정 및 생화학적 특성	65
3.7. Topoisomerase I 저해물질 (문헌중심)	77
제 4 장 결론	88
제 5 장 참고문헌	90
제 6 장 위탁과제: 항바이러스약효검색	99

Contents

Summary.....	iii
List of Tables.....	3
List of Figures.....	5
1. Introduction.....	9
2. Methods of research.....	12
2.1. Scope.....	12
2.2. Materials and Methods.....	12
3. Results and discussion.....	28
3.1. Isolation, preservation, cultivation, and extraction of marine microorganisms.....	28
3.2. Selection of microorganisms appearing anticancer activity.....	29
3.3. Selection of microorganisms appearing Topo I inhibitory activity.....	31
3.4. Antiviral(HSV-I and HSV-2) activity assay.....	33
3.5. Isolation and structure analysis o f compound showing anticancer activity.....	34
3.6. Identification and physiological characteristics of strain 8095A and AF-1.....	65
3.7. Topoisomerase I inhibitors (review).....	77
4. Conclusion.....	88
5. References.....	90
6. Antiviral activity test	99

표 목 차

표 3-2-1. 분리한 해양미생물의 세포독성.....	30
표 3-6-1. 균주 8095A의 화학분류학적 특성.....	66
표 3-6-2. 균주 8095A의 형태학적 특성.....	69
표 3-6-3. 균주 8095A의 배양조건에 따른 성장.....	70
표 3-6-4. 균주 8095A의 형태학적, 생리 생화학적 특성.....	71
표 3-6-5. 균주 8095A와 <i>S. fulvissimus</i> 와의 비교.....	72
표 3-6-6. 균주 AF-1의 생리 생화학적 특성.....	76
표 6-1. 항헤르페스 비루스 활성화도 결과 요약.....	115
표 6-2. 균주 5826의 항비루스 활성화도.....	116
표 6-3. 균주 5841의 항비루스 활성화도.....	118

List of Tables

Table 3-2-1. Cytotoxicity of isolated marine microorganisms.....	30
Table 3-6-1. Chemotaxonomic characteristics of strain 8095A.....	66
Table 3-6-2. Effects of cultural conditions on the growth of strain 8095A.....	69
Table 3-6-4. Biochemical characteristics of strain 8095A.....	71
Table 3-6-5. Comparison of strain 8095A with <i>S. fulvissimus</i>	72
Table 3-6-6. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of strain AF-1.....	76
Table 6-1. Summary of anti-herpes simplex virus activity in Vero cell culture system.....	115
Table 6-2. Antiviral activity of 5826.....	116
Table 6-3. Antiviral activity of 5841.....	118

그림 목 차

그림 2-2-1. 배양액으로부터 시료조제 방법.....	14
그림 2-2-2. 플라스미드 pBR 322 분리방법.....	20
그림 2-2-3. Topo I 조효소 분리방법.....	22
그림 3-3-1. AF-1의 Topoisomerase I 저해 효과.....	32
그림 3-5-1. 물질 8095-A의 proton NMR spectrum.....	41
그림 3-5-2. 물질 8095-A의 carbon NMR spectrum.....	42
그림 3-5-3. 물질 8095-A의 HMQC spectrum.....	43
그림 3-5-4. 물질 8095-A의 infrared spectrum.....	44
그림 3-5-5. 물질 8095-A의 proton COSY spectrum.....	45
그림 3-5-6. 물질 8095-A의 HMBC spectrum(9Hz upfield).....	46
그림 3-5-7. 물질 8095-A의 HMBC spectrum(9Hz downfield).....	47
그림 3-5-8. 물질 8095-A의 HMBC spectrum(8Hz downfield).....	48
그림 3-5-9. 물질 8095-A의 HMBC spectrum(5Hz downfield).....	49
그림 3-5-10. 물질 8095-A의 NOESY spectrum.....	50
그림 3-5-11. 물질 8095-A의 HRFABMS spectrum.....	51
그림 3-5-11. 계속.....	52
그림 3-5-12. Ionophore의 분류.....	53
그림 3-5-13. Ionophore의 화학적 구조식.....	54
그림 3-5-13. 계속.....	55
그림 3-5-14. 물질 AF1-A의 proton NMR spectrum.....	59
그림 3-5-15. 물질 AF1-A의 carbon NMR spectrum.....	60
그림 3-5-16. 물질 AF1-A의 DEPT(135°) NMR spectrum.....	61

그림 3-5-17. 물질 AF1-A의 HMQC spectrum.....	62
그림 3-5-18. 물질 AF1-A의 proton COSY spectrum.....	63
그림 3-5-19. 물질 AF1-A의 HMBC spectrum.....	64
그림 3-6-1. 균주 8095-A의 TLC 상의 DAP분석.....	67
그림 3-6-2. 균주 8095-A의 TLC 상의 당분분석.....	68
그림 3-6-3. 균주 AF-1의 TLC 상의 DAP분석.....	74
그림 3-6-4. 균주 AF-1의 TLC 상의 당분분석.....	75
그림 3-7-1. Camptothecin에 의한 세포독성기작.....	80
그림 3-7-2. Topoisomerase 저해제의 화학적 구조식.....	82
그림 3-7-2. 계속.....	83
그림 3-7-2. 계속.....	84
그림 6-1. 항바이러스검색용 시료의 준비.....	108
그림 6-2. 균주 5826 시료농도에 따른 항 HSV-1, HSV-2 효과.....	117
그림 6-3. 균주 5841 시료농도에 따른 항 HSV-1, HSV-2 효과.....	119

List of Figures

Fig. 2-2-1.	Schemes for sample preparation from culture broth	14
Fig. 2-2-2.	Scheme for isolation of plasmid pBR 322	20
Fig. 2-2-3.	Scheme for preparation of crude Topo I	22
Fig. 3-3-1.	Inhibition of Topoisomerase I by purified fraction of AF-1	32
Fog. 3-5-1.	Proton NMR spectrum of 8095-A	41
Fig. 3-5-2.	Carbon NMR spectrum of 8095-A	42
Fig. 3-5-3.	HMQC spectrum of 8095-A	43
Fig. 3-5-4.	Infrared spectrum of 8095-A	44
Fig. 3-5-5.	Proton COSY spectrum of 8095-A	45
Fig. 3-5-6.	HMBC spectrum of 8095-A (9Hz upfield)	46
Fig. 3-5-7.	HMBC spectrum of 8095-A (9Hz downfield)	47
Fig. 3-5-8.	HMBC spectrum of 8095-A (8Hz downfield)	48
Fig. 3-5-9.	HMBC spectrum of 8095-A (5Hz downfield)	49
Fig. 3-5-10.	NOESY spectrum of 8095-A	50
Fig. 3-5-11.	HRFABMS spectrum of 8095-A	51
Fig. 3-5-11.	Continued	52
Fig. 3-5-12.	Classification of ionophores	53
Fig. 3-5-13.	Structures of ionophore	54
Fig. 3-5-13.	Continued	55
Fig. 3-5-14.	Proton NMR spectrum of AF1-A	59
Fig. 3-5-15.	Carbon NMR spectrum of AF1-A	60

Fig. 3-5-16. DEPT(135°) NMR spectrum of AF1-A.....	61
Fig. 3-5-17. HMQC spectrum of AF1-A.....	62
Fig. 3-5-18. Proton COSY spectrum of AF1-A.....	63
Fig. 3-5-19. HMBC spectrum of AF1-A.....	64
Fig. 3-6-1. TLC analysis of DAP isomer of 8095A.....	67
Fig. 3-6-2. TLC analysis of sugar from whole cell hydrolysis of strain 8095A.....	68
Fig. 3-6-3. TLC pattern of DAP isomer of strain AF-1.....	74
Fig. 3-6-4. TLC analysis of sugars from whole hydrolysate of strain AF-1.....	75
Fig. 3-7-1. Mechanism of cell killing by camptothecin.....	80
Fig. 3-7-2. Chemical structure of topoisomerase inhibitors.....	82
Fig. 3-7-2. Continued.....	83
Fig. 3-7-2. Continued.....	84
Fig. 6-1. Fractionation scheme of microbial culture broth and preparation of samples for antiviral testing.....	108
Fig. 6-2. Dose response curve for the fraction of 5826 against HSV-2 and HSV-2 replication in Vero cell cultur.....	117
Fig. 6-3. Dose response curve for the fraction of 5841 against HSV-2 and HSV-2 replication in Vero cell culture.....	119

제 1 장 서 론

해양은 지구상에 존재하는 생물종의 80%(곤충제외)가 서식하고 있는 생물 자원의 보고로서 지금까지는 어류, 한천, 간유 등 단순한 자원들만 이용되어 왔으나 인구의 증가와 자원의 고갈문제가 심각해지자 해양자원의 개발은 필요불가결하게 되었다. 인류의 식량, 건강 및 환경문제 해결에 크게 기여하고 있는 생물공학분야에서도 그 대상을 육상생물에서 해양으로 옮겨 '인간의 복지를 위하여 해양생물과 그들의 system, process를 이용하는 기술'인 해양생물공학이라는 분야가 탄생되었다.

1969년 美 오클라호마 대학 A. J. Weinheiner가 카리브해에 사는 강장동물 *Plexaura homomalla* 로 부터 prostaglandin을 얻은 것이 한층 해양 천연물연구의 계기가 되고난 후, 생리활성물질을 해양에서 찾고자 하는 연구가 비약적으로 증대되었다(Ireland et al., 1993). 해양이란 특이한 생태계를 이루는 환경때문에 해양생물이 만드는 대사산물은 육상생물에 비하여 특이한 골격의 화학구조를 가지게 하며 적자생존의 경쟁속에서 살아가기 위하여 이들 생물은 다양한 생리활성을 나타내고 있으며, 또한 해양생물은 30만 50만종 이상이라고 일컬어지는 풍부한 종으로 이루어져 있다. 이러한 이유로부터 해양생물을 이용하여 신물질을 창출하여 건강보전에 응용하고자 하는 연구가 세계각국에서 활발하게 진행되고 있다. 선진국에서는 해양천연물의 연구가 이미 산업화 단계에 진입하여 일본의 경우 24개의 민간회사가 주축이 되어 설립된 MBI(Marine Biotechnology Institute Co., Ltd)나 미국의 NCI (National Cancer Institute), 러시아의 PIBOC (Pacific Institute of Bioorganic Chemistry), 호주의 AIMS (Australian Institute of

Marine Sciences) 등의 국가 연구기관의 주도하에 생리활성물질의 추출에서 신의약품의 개발에 이르는 전과정에 걸쳐 산학연협동연구가 수행되고 있으며 특히 Roche, Wellcome, CIBA-Geigy, Sankyo 등의 제약회사들이 적극적으로 참여하고 있다.

해양미생물은 항암제외에도 다양한 생리활성물질이 생산자로 각광을 받고 있으며(Okami, 1986), monastatin같은 효소저해제(Imada et al., 1985), isatin같은 항진균제(Turnes et al., 1989) 등의 임상시험단계의 새로운 물질이 계속 발견 개발되고있다(Newmann et al., 1989). 해양유래 항암제 개발분야에서는 균체명계류에서 분리된 cyclic peptide 류인 didmenin B가 제 2 상 임상실험에 들어가 있으며, 명계류에서 분리된 ecteinascidin 743, sea hare 에서 분리된 dolastatin, 해조류에서 분리된 halomon, 이끼벌레류에서 발견된 bryostatin 1, 및 해면에서 분리된 halichondrin B 등이 항암제로 개발 중이다(Rinehart, 1988, 1992; Schmitz et al., 1993). 1993 년까지 선진국에서는 해양 생물에서 모두 5,500 여종의 신물질을 발견하였으며 그 중 특허가 40 종이며, 상품개발 진행중인 것이 5 종이 된다.

암을 정복하기 위해서는 암의 초기발생, 진행 및 전이, 약제의 내성 등이 여러현상에 대한 특이한 치료법의 개발, 치료백신의 개발과 예방법의 확립을 목표로 한다. 이를 위해서는 cytokine의 개발, CAM 이용 적용, 단일클론 항체의 개발, antisense 유전자의 이용등의 첨단 생명공학기술이 요구될 뿐만 아니라 우수한 성능의 새로운 antimetabolite, DNA-interactive약제, 세포분열 저해제, 호르몬제 등의 개발과 topoisomerase 저해제의 개발 등이 필요하다. DNA topoisomerase(topo)는 DNA와 결합, DNA가닥절단, DNA 가닥 통과, DNA 재결합의 4단계에서 촉매작용을 하며 DNA의 conformation혹은 topology의 변환을 유도하는, 세포의 DNA대사 과정중에 중요한 역할을 담당하고 있는 효소로서 I형은 single stranded DNA

에, II형은 double stranded DNA의 nick를 형성하는 활성을 가지고 있다. Topo I의 경우 colon adenocarcinoma의 세포에서 정상세포에 비해 그 양이 과다하게 생산된다고 보고된바와 같이(Giovanella et al., 1989) 임상치료의 좋은 목표가 될 수 있다. Topo II 역시 활발히 자라는 세포에서 그 양이 증가된다고 알려져 있다. 현재 강력한 항암제로 알려져 있는 etoposide, anthracycline, adriamycin 등은 topo를 저해함으로써 항암효과를 나타낸다고 보고되었다. 이와같은 결과를 계기로 해서 최근 topo를 저해하는 물질을 찾는 탐색이 각 방면에서 개발, 진행 중에 있다. 현재 임상에 사용되고 있는 대부분의 항암제는 topo II를 저해함으로써 그 활성을 나타낸다. 한편 topo I을 저해함으로써 항암효과를 나타내는 물질로는 camptothecin 한 종류가 보고되었었다(Hsiang et al. 1985). 그러나 camptothecin은 독성이 강해서 실제 임상에 있어서는 많은 부작용을 동반하고 있어 그 유도체가 지난 10년간 많이 개발되었다(Dunn, 1994; Potmesil and Pinedo, 1995). 일본에서는 irinotecan을 새로이 개발하였으며, topotecan의 경우 고품암에 대하여는 phase II/III단계의 실험 중이다. 또한 camptothecin의 유도체가 아닌 다른 화학구조를 가진 topo 저해제들에 대한 탐색작업이 활발히 이루어지고 있다. 따라서 topo I을 target으로하여 항암제를 탐색하게 된다면 신규의 항암물질을 발견하게될 확률이 높다고 생각된다.

본 연구에서는 해양미생물로부터 항바이러스와 항종양성 생리활성물질의 탐색을 위하여 우선 다양한 해양미생물을 분리하여 이를 대상으로 세포독성, topo I 저해효과, 항 HSV-1, -2 약효가 있는 균주를 선별하여 생리활성을 갖는 신물질을 찾고자 하였다.

제 2 장 연구추진방법

2. 1. 연구내용

해수, 해변모래, 해양저질층, 해양동물시료, 남극시료 등에서 분리한 세균과 방선균을 분리 보전하고 균주를 배양하여 균체와 배양액으로 부터 조추출물을 제조하여 탐색용 시료로 사용한다. 생리활성 검색방법으로는 DLD-1(human colon)와 p388D1 세포를 대상으로한 세포독성을 조사함으로써 항종양물질 생산균주를 선별한다. 쥐의 spleen lymphocyte에 대한 세포독성과 적혈구에 대한 haemolytic activity를 조사하여 균주를 선별하는데 참조하였다. 효소저해제로서는 topoisomerase I 저해제에 대한 검색체계를 실시하여 세포독성조사와 함께 항종양물질 탐색을 수행한다. 항바이러스약효검사는 Herpes simplex virus (HSV-1, HSV-2)에 대한 탐색체계를 활용한다. 구조분석을 위하여 선별균주의 대량배양액을 분리 정제하고 그 특성을 조사한다. 신물질의 여부를 조사하기위해 자료수집을 통하여 생물의 종류, 물질의 구조상의 특징 및 생리활성도에 따라 분류하여 테이타 베이스를 만든다. 효과적인 연구수행을 위하여 HSV-1, HSV-2에 대한 항바이러스 약효검사는 한국화학연구소에 위탁한다.

2. 2. 실험재료 및 방법

2. 2. 1. 배양 및 시료조제

해양생물에 공생하는 세균, 해수에 서식하는 일반 해양세균은 PYG배지

4ml에 접종하여 20°C에서 5일 내지 6일간 정치배양하였다. 해변의 토양, 해양저질층, 남극토양 등에 서식하는 방선균은 75%의 숙성된 해수로 조제한 Benett 배지에서 분리하였고 변형된 Zobell 배지(SZ Medium) 5ml에 접종하여 30°C에서 7일간 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(CHCl₃:MeOH=2:1)을 첨가하여 그림 2-2-1과 같이 추출하여 Folch solution layer와 water phase의 시료로 각각 분리조제하였다. 방선균은 그림 2-2-1과 같이 배양한 후 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 phase와 ethylacetate soluble phase의 농축된 시료는 검색 전 각각 350ul, 450ul의 methanol을 넣어 사용하였다.

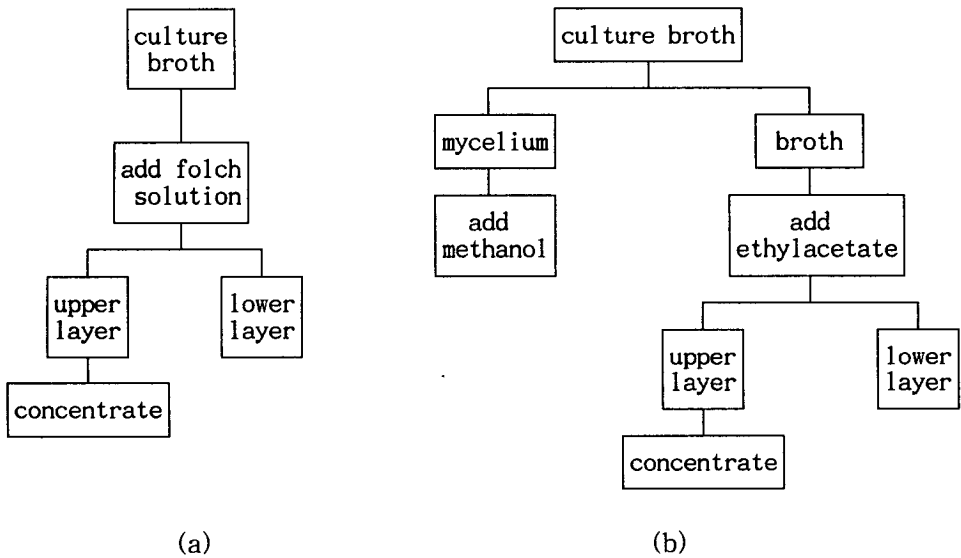


Fig 2-2-1. Schmes for sample preparation from culture broth: (a) bacteria, (b) actinomycetes.

2. 2. 2. 세포독성능 검사

실험에 사용한 세포는 한국 세포주 은행에서 분양받은 Human adenocarcinoma 인 DLD-1와 Mouse Lymphoid neoplasm 인 P388D1을 사용했다.

실험에 사용된 배지와 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 Hemacytometer를 사용하였다. Microplate reader는 Molecular Device의 Thermo max 제품을 사용하였다.

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

세포독성능의 측정은 Carmicheal등의 MTT(methyl tetrazolium bromide) 측정법을 modification하여 사용하였다(Pauweis et al., 1988). 독성능 실험은 우선 96well plate에 대수기에 도달한 P388D1 cell (2x10⁴cells/ml)과 DLD-1 (4x10⁴cells/ml)을 100 μ l씩 접종하고 조추출물 시료를 각각 10배 연

속회석하여 100 μ l씩 접종하여 최종 volume이 200 μ l가 되게 한 후 37°C에서 5% CO₂농도의 항온기에 5일 간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 증류수에 녹인 MTT용액 (1.1mg/ml)을 50 μ l씩 각각의 well에 넣어주고 나서 최적반응 4시간 동안 37°C의 CO₂항온기에 더 배양시켰다. 그 후 상등액을 버리고 150 μ l의 dimethyl sulfoxide를 넣고 5분동안 흔들어서 formazon crystal을 잘 용해시킨 뒤 발색정도를 540nm에서 관찰하여 세포독성능을 판단하였다. 이 때 아무처리하지 않은 배양원액의 발색을 대조군으로 비교하였다.

2. 2. 3. Lymphocyte에 대한 세포독성 조사

Mouse의 spleen에서 lymphocyte를 추출하여 물질의 정상세포에 대한 세포독성 양상을 조사하였다. Mouse의 배를 절개한 후 spleen을 채취하여 PBS와 함께 hand homogenizer로 부드럽게 갈아서 gauze로 거른다. 2,000 rpm, 4분, 4-10°C 조건에서 원심분리 하였으며 최종 침전물을 RPMI 1640 혹은 DMEM 배지로 희석하여 2-5 x 10⁶ cell/ml 농도가 되도록하여 실험에 사용하였다. 96-well microplate에 먼저 시료를 10 μ l 씩 넣은 다음 lymphocyte 현탁액을 100 μ l 씩 넣어 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 MTT를 50 μ l 첨가하여 4시간동안 더 반응 시켰다. 양성 대조군으로는 방선균 630-A 균체의 methanol 추출액을, 음성대조군으로는 PBS를 넣어 주었다. 상등액을 제거한 후 150 μ l의 DMSO로써 formazone을 녹여서 490 nm에서 OD를 측정하였다.

2. 2. 4. Haemolytic activity 조사

물질의 적혈구 용해도를 측정하기위해서 mouse로부터 혈액을 채취하여

96-well microplate에서 반응시켰다. Mouse의 목을 잘라서 혈액을 얻은 다음 PBS로 3회 씻는다. 2,000 rpm에서 4분 동안 원심분리 하였으며 최종침전물은 약 50% erythrocyte가 된다. 96-well microplate의 각 test well에 먼저 시료를 20 μ l 씩 넣은 다음 PBS로 희석한 1% erythrocyte현탁액을 200 μ l 씩 넣는다. 양성 대조군으로 방선균 630-A 균체의 methanol추출액을 사용하였으며 음성 대조군으로 PBS를 사용하였다. 30 $^{\circ}$ C 에서 1 시간동안 반응시킨 후 육안 관찰시 시료가 용혈활성을 나타내면 적혈구가 용해되므로 투명한 상태가 되고, 용혈활성을 나타내지 않는 경우에는 적혈구가 well의 바닥에 침전되어 불투명하게 보인다. Microplate reader로 490 nm에서 OD를 측정하였다.

2. 2. 5. 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 흉선으로부터 분리하고 그 기질로 사용될 supercoiled DNA는 *E.coli*로부터 pBR 322을 분리하였다. 종양세포에 대하여 세포독성능을 나타낸 시료에 대해서 Topo I relaxation 활성 측정을 실시함으로써 1차적으로 Topo I 저해가 일어났는지의 여부를 조사하고 DNA cleavable complex assay로 이를 확인하였다.

2. 2. 5. 1. Supercoiled DNA의 제조

Topo I의 기질로 사용될 supercoiled DNA는 Sambrook 등(1989)의

alkaline lysis에 의한 방법을 이용하여 *E.coli*(JM109)로 부터 pBR 322를 분리하여 사용하였다. LB broth (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, distilled water 1000 ml, pH 7.2,) 50 ml에 균주를 접종하여 37°C에서 O.D.(540 nm) 가 0.6 이 되도록 전배양을 한 후 LB broth 500 ml 에 옮겨 3시간 이상 배양하여 O.D.가 0.4 이상이 됐을때 chloramphenicol (34 mg/ml) 2.5 ml 을 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 회수한 균체는 alkaline lysis에 의한 방법으로 DNA를 추출하였고 PEG 8000을 이용하여 plasmid를 분리하였다(Figure 2-2-2).

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))으로 세척하였다. 여기에 10 ml의 solution I (50 mM sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0))을 첨가하여 현탁시킨 후 1 ml의 lysozyme solution (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))을 첨가하였다. 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 첨가하여 잘 섞은 후 얼음 위에서 10분간 방치하였다. 이 용액을 6,000 rpm 에서 4°C로 15 분간 원심분리한 후 상청액을 회수하여 0.6 volume의 isopropanol을 넣고 잘 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다. 이를 6,000 rpm 에서 4°C로 15 분간 원심분리한 후 남아있는 물기를 완전히 제거하고 70% ethanol로 씻어내었다. Ethanol을 완전히 제거한 후 DNA pellet을 5 ml의 TE buffer (pH 8.0)에 녹였다. 이 용액을 50 ml 짜리 원심분리용 tube에 넣은 후 5 M 의 ice colded LiCl solution 3 ml 을 첨가하여 잘 섞고 4°C에서 10,000 rpm으로 10분동안 원심분리한 후 상청액을 회수하여 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 이를 4

℃에서 10,000 rpm으로 10분동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 침전물을 70% ethanol로 씻어내었다. Ethanol을 완전히 제거한 DNA pellet을 500 μ l 의 TE buffer (containing RNase A (20 μ g/ml, 80℃ heat treated for 3 min))에 녹여서 실온에서 30분간 방치하고 500 μ l 의 1.6 M NaCl (containing 13% (w/v) PEG 8000)solution을 첨가하여 잘 섞은 후 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리 (10,000 rpm) 하였다. 상층액을 제거하고 DNA pellet을 400 μ l의 TE buffer (pH 8.0)에 녹이고 chloroform:isoamylalcohol (24:1) solution을 600 μ l 첨가하여 잘섞은 후 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 다른 tube에 옮긴 후 100 μ l 의 10 M ammonium acetate를 첨가하여 잘 섞고 2 volume의 ice-colded ethanol을 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하여 micro-centrifuge에서 20분간 원심분리하였다. 다시 200 μ l 의 ethanol로 씻어낸 후 DNA pellet을 100 μ l 의 TE buffer (pH 8.0)에 녹인 후 -20℃ 에서 보관하여 기질로 사용하였다.

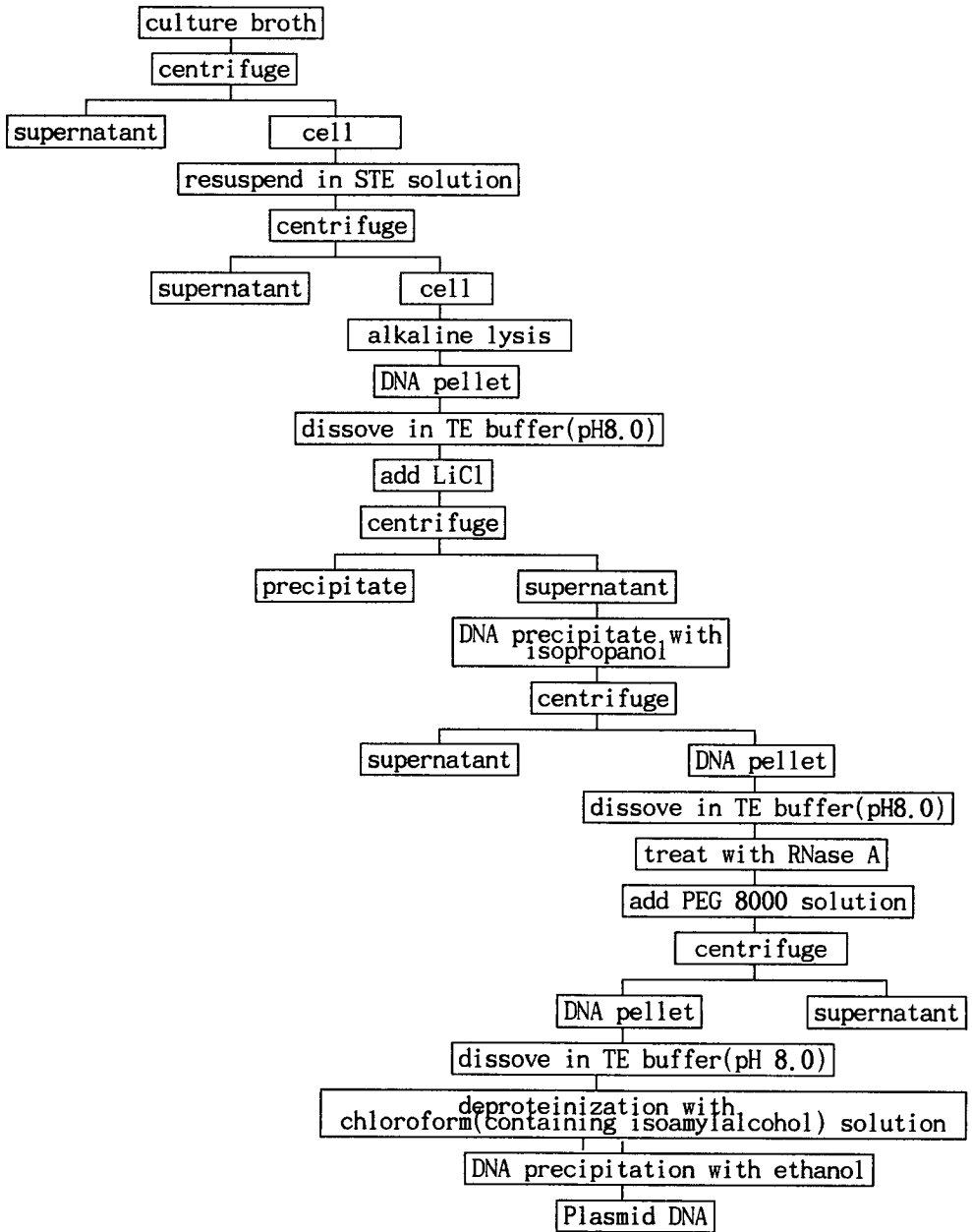


Fig. 2-2-2. Scheme for isolation of plasmid pBR 322.

2. 2. 5. 2. Topoisomerase I 의 분리

송아지 흉선으로부터 이(1992)의 방법을 변형하여 topo I을 분리하였다 (Figure 2-2-3). 송아지 흉선 100g의 조직의 표면에 존재하는 막과 대강의 지방질들을 제거한 후 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 깨끗이 세척하고 잘게 조각을 내었다. Warning blender에 NW buffer (5 mM potassium phosphate, 100 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF)를 100 ml 첨가하여 조각을 분쇄한 후 2겹의 가아제를 사용하여 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, 10mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF) 50 ml을 넣고 현탁한 후 5 M의 NaCl을 최종농도가 0.55 M이 되도록 첨가한 후 교반하면서 30분간 방치하였다. 이를 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상청액을 회수한 다음 여기에 ammonium sulfate를 0.4 g/ml의 농도가 되도록 첨가한 후 역시 30분간 방치한 후 다시 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 그 침전물을 dialysis tube에 옮긴 후 동일한 buffer 2 liter로 투석하였다. 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 상청액을 Bio-Rex 70을 이용하여 분리하였다. Sample 용액을 Bio-Rex 70 resin이 있는 column에 loading 하고 200 mM의 phosphate buffer 용액 1 liter로 씻어낸 후 200 mM에서 1 M에 이르는 농도 기울기 용출법으로 전개를 하였고 용출속도는 1.8 ml/min으로 조정하였다. 부분 정제된 topo I은 소량씩 분주하여 deep freezer에 보관하였다.

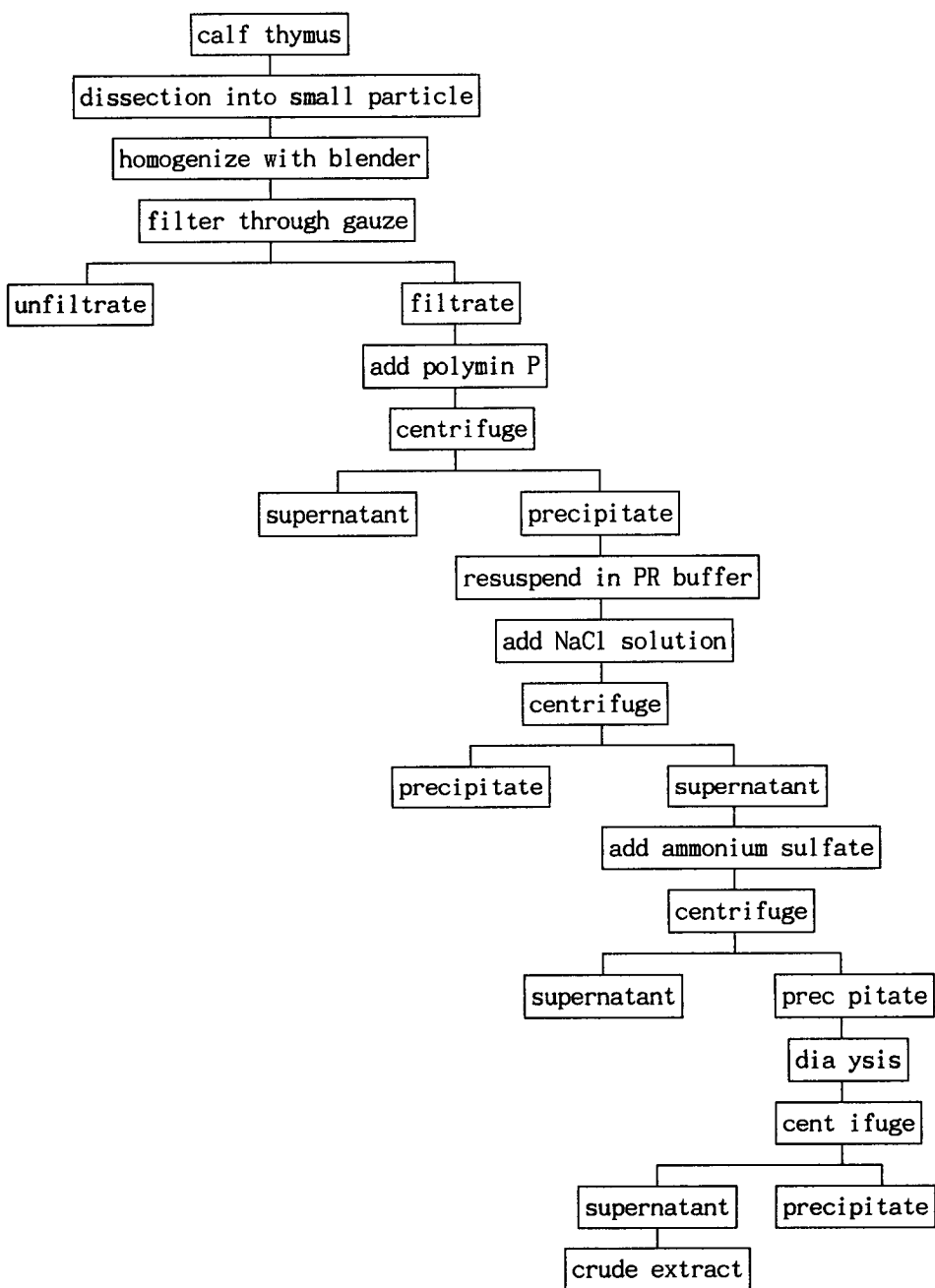


Figure 2-2-3. Scheme for preparation of crude Topo I.

2. 2. 5. 3. Topo I 저해능 측정

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

* Topo I reaction mixture for relaxation assay

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

반응 buffer에 시료 2 μ l 와 topoisomerase I 조정제액 6 μ l 를 넣어 최종 volume이 20 μ l 가 되도록 조정한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 stop buffer (5% SDS, 0.25% 의 xylene cyanol FF, 0.25% Bromophenol blue, 25% sucrose) 5 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 초나선 DNA가 이완되는 정도를 판단하기 위하여 loading solution 4 μ l 을 첨가하여 1%

agarose gel에서 100 Volt로 한 시간 가량 전기영동하였다. Ethidium bromide 용액에서 30 분간 gel을 염색한 후 314nm 의 UV-transilluminator에서 DNA band를 관찰하였다. Positive control로는 topo I의 저해제로 밝혀진 camptothecin을 사용하였다. 효소활성의 1 unit는 초나선형의 0.3 μ g의 DNA를 30분동안 반응하여 완전히 이완된 형태로 전환시키는 효소량으로 정하였다.

위의 topo I relaxation test에서 초나선형의 DNA를 이완된 형태로 전환시키는 시료에 대하여 topo I cleavable complex assay를 수행하여 시료가 cleavable complex 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

이를 위한 Topo I 활성 측정반응계의 조성은 다음과 같다.

* Topo I reaction mixture for cleavable complex assay

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

위의 반응액 20 μ l를 37°C에서 30분간 반응시킨 후 denaturation solution으로 0.75mg/ml proteinase K와 2.5% SDS가 혼합된 용액 5 μ l를 첨가한 후 다시 37°C에서 1시간 반응시킨다. Stop buffer (5% SDS, 0.25% 의 xylene cyanol FF, 0.25% Bromophenol blue, 25% sucrose) 5 μ l를 첨가하여 반응을 중지 시킨후 초나선 DNA가 이완되는 정도를 0.5 μ g/ml ethidiumbromide가 첨가된 1% agarose gel에서 100 Volt 조건하에서 한 시간 가량 전기영동하여 판단하였다. Ethidium bromide 용액으로 gel을 염색한 후 314nm 의 UV-transilluminator하에서 DNA band를 관찰하였다. Positive control로는 topo I의 저해제로 밝혀진 camptothecin을 사용하였다.

2. 2. 6. Herpes simplex virus 저해활성 측정

Human herpes simplex virus inhibitor assay system은 한국화학연구소 의약활성실에서 개발한 방법을 이용하였다(제 6 장 위탁연구보고서; 항바이러스 약효검색 참조).

2. 2. 7. 생리활성물질의 분리

2. 2. 7. 1. 기기 및 시약

NMR측정은 Varian Unity-500을 이용하였다. Proton NMR은 500 MHz에서 carbon NMR은 125 MHz에서 측정하였다. Chemical shifts는 internal standard인 TMS (tetramethylsilane)을 기준으로하여 측정하였다. 모든 NMR실험은 Varian사에서 공급한 software를 이용하였으며 HMQC,

HMBC, proton COSY, NOESY 등 2-dimensional NMR 실험을 위한 parameters는 본 실험을 위하여 optimize시킨 값을 이용하였다. HPLC는 Spectraphysics사의 SP-8810 isocratic pump를 모체로 하여 본 실험실에서 조립한 제품을 사용하였다. 천연물의 분리에 사용한 HPLC column은 YMC silica semiprep column(1 cm X 25 cm)과 C₁₈ reversed-phase semiprep column (1 cm X 25 cm)이었다.

천연물의 추출 및 분리에 사용한 용매와 시약은 모두 GR급을 그대로 사용하거나 EP급을 재증류하여 사용하였다.

2. 2. 7. 2. 천연물의 추출 및 분리

실온에서 7 일간 배양한 방선균 균주 8095와 7789 배양액을 원심분리하여 supernatant와 mycelia로 분리하였다. Supernatant는 ethylacetate로 추출한 후 감압증류하여 ethylacetate를 제거하였다. 균체는 methanol로 추출하였다. 추출된 유기물은 다양한 유기용매를 사용하여 silica vacuum flash chromatography를 하였다. 각각의 fraction에 대한 TLC와 proton NMR을 측정된 결과를 종합하여 silica semiprep HPLC(100% EtOAc)를 이용하여 주대사물질을 분리한 후 각각의 물질에 대하여 C₁₈ reverse-phase HPLC(15% H₂O/CH₃CN)을 이용하여 분리하였다. AF-1에 대해서도 동일한 과정을 거쳐 액체배지로부터 각각의 fraction을 분리하였다. 부분정제된 물질의 특성을 각 fraction별로 HPLC나 NMR을 사용하여 분석하였으며 그 생리활성도도 조사하였다(3. 5. 참조).

2. 2. 8. 선별균주의 동정 및 생리학적 특성조사 방법

선별균주 방선균 8095A와 AF-1의 동정 및 생리 생화학적 특성을 조사하기 위하여 우선 형태적 특성을 관찰하였다. 균집형태와 색깔은 Benett배지와 ISP 4 배지에서 배양한 후 관찰하였으며 색소는 기균사, 기층균사 및 soluble pigment 색의 변화를 관찰하였다. ISP 4 배지에서 2주간 배양한 균은 8%의 glutaraldehyde용액으로 고정한 후 P_2O_5 로 건조하여 Bio-Rad E5550 SEM coating system을 사용하여 gold coating한 후 주사현미경 (Philips model 515)을 사용하여 포자의 표면구조, 포자사슬의 형태를 관찰하였다. 동정을 위한 화학분류학적 특성 조사는 세포벽의 DAP (diaminopimelic acid)의 이성질체와 전균주 가수분해액의 당분석을 조사하였다. 생리 생화학적 특성 비교를 위한 시험항목은 Cross(1989) 및 Lechevalier 등이(1989) 사용한 Actinomycetes 동정 방법을 참조로 선별하였다. 멜라닌 색소형성, 탄소원 이용능, 유기산 이용능, 아미노산 이용능, 고분자 물질 분해능을 조사하였다. Catalase 존재여부 및 질산염 환원능, H_2S 생성능도 조사하였다. Penicillin등의 항생제에 대한 감수성도 조사하였다. 조사방법은 해양연구소(1992, 1993a) 보고서에 보고된 방법에 따라 수행하였다. (자세한 조사항목은 3. 6. 을 참조).

제 3 장 연구결과 및 고찰

3. 1. 해양미생물의 분리, 보전, 배양 및 시료조제

해양연구소에서 한국 근연안 해역의 해수, 해변모래, 해양저질층, 해양동물 시료, 남극시료 등에서 분리한 세균 4,000주와 해양방선균, 극지방선균을 포함한 방선균 5,000주를 1, 2차년도에 확보하여 이를 glycerol 20% 용액에 넣어 영하 80 °C에 보존하여 왔는데 이를 생리활성물질 검색에 이용하였다. 3차년도에는 거문도일대 해역과 Palau해역에 서식하는 해양생물에서 해양세균을 약 1,000주 분리하였으며 해양저질층, 해변, 한국 근연안 해양동물시료에서 방선균 20주를 분리하였다. 이는 1차년도에 확보한 균주처럼 glycerol 20% 용액에 넣어 영하 80 °C에 보존하였다. 분리균주 중 약 2,000주를 관련연구기관인 제일제당에 제공하여 phospholipase A2 저해제 탐색에 사용할 수 있도록 하였다.

분리된 해양세균 중 activation시킨 1,000여 균주를 PYG배지에서 배양한 후 배양액으로 부터 Folch용액으로 추출하여 Folch solution layer와 water phase 시료를 각각 각각 1,000여개를 분리 조제하였다. 방선균을 숙성된 해수가 첨가된 변형 ZoBell배지(SZ media)에서 activation 한 것 중 좋은 성장을 보인 700여개의 균주에서 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 ethylacetate 층과 waterphase 층으로 분리하여 총 2,000여개의 시료를 조제하였다. 시료 일부는 한국화학연구소에서 항바이러스효과를 검색하였고 한국해양연구소에서는 조제한 모든시료에 대하여 세포독성능을 조사하였다.

3. 2. 항종양물질 생산균주 선별

종양세포 Human adenocarcinoma 인 DLD-1와 Mouse Lymphotoic neoplasm 인 P388D1을 사용하고 시료는 방선균의 농축된 ethylacetate 층은 200 μ l의 methanol에 용해시키고 세균의 농축된 Folch solution 층은 100 μ l의 methanol에 용해시켜 세포독성검사에 사용하였다.

해양세균시료 1,962개와 방선균시료 2,246개에 대하여 DLD-1과 p388D1에 대한 MTT assay를 실시한 결과 표 3-2-1과 같이 해양세균보다 방선균 균주 중에서 강한 세포독성능을 나타내는 균주가 많았다. 3차년도 검색에서는 1, 2차년도에 비해 세포독성을 나타낸 세균추출물 시료가 없었으며 DLD-1 세포에 대한 독성을 나타내는 시료도 상대적으로 극히 적었다.

종양세포에 대하여 세포독성활성이 우수한 시료들 중 lymphocyte에 대한 세포독성이 낮고 haemolytic activity는 거의 없는 시료를 선별하였다. 선별된 대부분의 균주들은 적어도 한 fraction 시료에서 배양액 0.05 μ g/ml의 농도에서도 세포독성능을 나타낸 것 처럼 세포독성활성이 우수하였다. 2차년도에 선별된 A616 및 A4352 균주가 생산하는 생리활성물질의 분리 정제 및 구조분석 결과 actinomycin 계열의 물질임이 밝혀짐에 따라 (2차년도 보고서 참조) 선별균주 중 TLC상 Actinomycin D와 같은 spot의 물질을 생산하는 균주는 선별대상에서 제외하였다. 선별균주로는 8095A, 7798, 8441, 8032B, 8265, 8273A, 8273, 7499, 8301, 7914, 8072A, 8321, AF-1 이 대량배양하여 물질 정제를 할 필요가 있는 균주로 판단되었다.

Table 3-2-1. Cytotoxicity of isolated marine microorganisms.

	bacteria		actinomycete	
number of tested samples	1,962		2,246	
number of strains showing cytotoxicity with dilution rate (ul/ml)	DLD-1	p388	DLD-1	p388
5			3	162
0.5				99
0.05			1	1
0.005				

3. 3. Topoisomerase I 저해물질 생산균주 선별

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

세포독성능을 강하게 나타낸 시료 중 7798, 8441, 8032B, AF-1 등 4개의 시료가 relaxed된 형의 DNA를 agarose gel상에 보임으로써 이들이 topo의 활성을 저해한다고 볼 수 있었는데 cleavable complex assay 결과에서도 topo I의 저해가 나타남을 확인할 수 있었다.

선별균주 AF-1의 경우 분리 정제 과정에서 silica gel column chromatography로 분획하였을 때 SG 4 fraction에서 Topo I 저해능이 있음이 relaxation assay로 나타났다(Fig. 3-3-1).

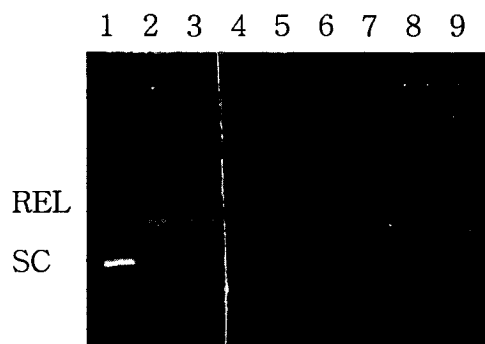


Fig. 3-3-1. Inhibition of Topo I by purified fraction of AF-1.

1 ; DNA control, 2 ; Topo I control, 3 ; methanol control,
 4 ; SG 2, 5 ; SG 3, 6 ; SG 4, 7 ; SG 2, 8 ; SG 3, 9 ; SG 4,
 SG ; The fractions by silica gel column chromatography
 4-6 ; Topo I 2 μ g, 7-9 ; Topo I 1 μ g.

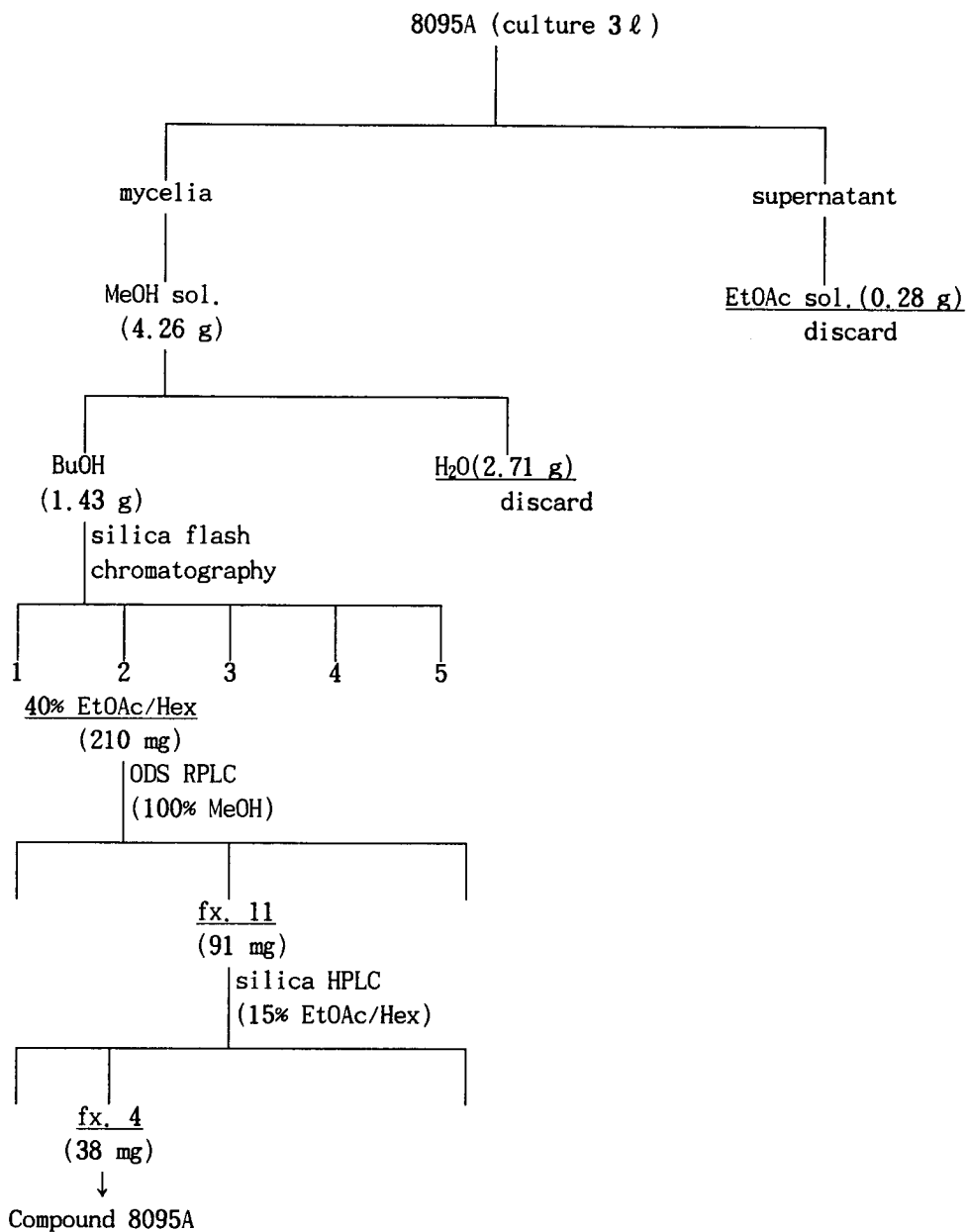
3. 4. HSV-1 과 HSV-2 저해활성 검사

총 34개 균주에서 분리된 102개 시료에 대한 항HSV-1과 항HSV-2약효검색이 수행되었다. 항바이러스약효는 대부분의 시료에서 관찰되지 않았는데 selectivity index는 높지 않으나 시료 5826E와 5842E, 5841M 등이 확인실험이 요구될 정도의 약효가 관찰되었다. 앞으로 정밀한 세포독성시험이나 항Cytomegalovirus와 항Varicella-zoster virus에 대한 약효평가 실험을 하여 광범위의 항 헤르페스물질의 약효검색이 요구된다. 또한 개발 가치가 있는 물질을 발견하기 위하여는 지속적인 약효검색연구가 이루어져야 하겠다. (위탁연구보고서 참조, 제 6 장).

3. 5. 항종양활성물질의 분리 및 특성

3. 5. 1. 균주 8095A로부터 생리활성물질의 분리 및 구조결정

강력한 세포독성을 나타내는 방선균(strain 8095A)를 실온에서 액체배지(3 l)에 7일간 배양한 후 원심분리 방법을 이용하여 상등액과 균체로 분리하였다. 균체에 대하여 MeOH (1 l x 3)를 가하여 유기물질을 추출한 뒤 n-butanol과 water partitioning을 이용하여 salt와 잔류 영양분을 제거하였다. 한편 상등액에 대한 ethyl acetate 추출액은 생리활성이 없고 proton NMR spectrum상에서도 fatty acids와 steroids를 제외한 이차대사물질의 존재가 드러나지 않아 폐기하였다. Partitioning으로 얻어진 BuOH 층은 water와의 azeotroph를 이용하여 저온에서 용매를 제거한 뒤 n-hexane과 ethyl acetate의 혼합액(20% gradient)을 용출액으로 이용하여 silica vacuum flash chromatography (F254)로 극성에 따른 분리를 하였다. 이들 중 40% n-hexane/ethyl acetate로 용출한 분획을 semi-preparative reversed-phase HPLC (100% methanol, YMC ODS column, 1 cm x 25 cm)을 이용하여 활성성분을 분리한 후 최종적으로 semi-preparative silica HPLC (15% n-hexane/ethyl acetate, YMC silica column, 1 cm x 25 cm)을 이용하여 순수한 물질 38mg을 분리하였다. 추출에서 HPLC에 이르는 전 과정에 걸쳐서 세포독성과 proton NMR spectrum을 측정하여 각 분획에 대한 생리활성의 원인물질을 추적하였다.



노란색의 고체 (mp 185-187°)로 얻어진 물질 8095 - A의 구조 결정은 분광자료를 종합적으로 해석하여 이루어졌다. 이 물질의 수소 NMR (CDCl₃) 상에서의 특징은 upfield region (δ 1.4 - 0.9)에 여러개의 doublet methyl groups이 존재하며 δ 7.88과 7.81에 2 개의 protons이 broad doublet의 형태로 나타난다는 점이다 (Fig. 3-5-1). 이들 두개의 downfield protons는 D₂O exchange experiment에 의하여 peak의 shape와 intensity가 변하는 것으로 미루어 amide protons으로 해석되었다. 이들과 δ 4.0 부근에 나타난 2 protons 그리고 upfield methyl signals는 8095 - A가 peptide계 물질임을 의미하였다.

이러한 해석은 carbon NMR과 HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence) 실험에 의하여 증명되었다 (Fig. 3-5-2, 3-5-3). 즉 carbon NMR에서 δ 170 부근에 나타난 4 개의 quaternary signals와 δ 50 - 80에 나타난 4 개의 methine signals는 이 물질이 4 개의 amino acids 혹은 그와 유사한 ester units로 구성되어 있음을 의미하였다. Infrared spectrum에서 3300cm⁻¹과 1630cm⁻¹에 나타난 강한 absorption bands는 peptide linkage의 존재를 지시하였으나 1750cm⁻¹에 나타난 band는 ester linkage도 함께 존재함을 드러내었다 (Fig. 3-5-4). 따라서 8095 - A는 peptide와 ester linkage가 함께 존재하는 물질 즉 depsipeptide로 생각되었다.

개개의 amino acid/ester unit의 구조는 전기한 HMQC와 proton COSY 실험의 결과를 종합하여 얻어졌다 (Fig. 3-5-5). δ 7.88 (1 H) - 4.12 (1 H) - 2.34 (1 H) - 1.05 (3 H), 0.96 (3 H)로 연결되는 spin system은 Valine의 존재를 나타내었으며 유사한 coupling pattern인 δ 7.81 (1 H) - 3.98 (1 H) - 2.25 (1 H) - 1.09 (3 H), 0.96 (3 H)의 spin system은 다른 Valine이 존재함을 드러내었다. 한편 δ 5.03 (1 H) - 2.34 (1 H) - 0.99 (3 H), 0.97 (3 H)간의 연결은 isobutyl group의 존재를 의미하였는데 δ 5.03 proton

signal에 해당하는 HMQC상의 carbon signal이 δ 78.50인 것으로 보아 carbonyl과 oxygen이 이 carbon에 함께 결합된 α -hydroxyvalerate (HIV)로 추측되었다. 마지막으로 δ 5.34 (1 H) - 1.45 (3 H)의 연결은 lactate (LAC)로 해석되었다.

각각의 부분구조에 대한 확인과 이들간의 결합형태는 HMBC (long-range heteronuclear multiple bond coherence, optimized for 5, 8, and 9 Hz)와 NOESY (nuclear Overhauser exchange spectroscopy) 실험에 의하여 이루어졌다 (Fig. 3-5-6 - 3-5-10). δ 4.12와 5.34에 나타난 protons와 δ 170.02의 carbon간의 상관관계는 LAC와 Val의 결합을 나타내었으며 δ 7.88 및 5.03의 protons와 δ 170.73 carbon간의 연결은 HIV와 Val의 결합을 의미하였다. 또한 δ 5.03 proton과 δ 172.48 carbon간의 상관관계는 HIV와 다른 Val 간의 결합으로 해석되었으며 NOESY data에서도 amino acids의 NH, C-2, C-3 protons간의 상관관계로서 증명되었다. 따라서 물질 8095 - A의 linear structure는 Val₁ - HIV - Val₂ - LAC이며 전기한 2 개의 NH 이외에 D₂O exchangeable proton이 없는 것으로 보아 LAC와 Val₁이 결합된 cyclic depsipeptide로 생각되었다.

NMR상에서 드러난 8095 - A의 분자식은 C₁₈H₃₀N₂O₆이었다. 그러나 3차원 modeling을 이용한 입체구조 탐색결과는 이 물질의 분자량에 대한 반론을 제기하였다. 즉 4 개의 amino acids (hydroxy acids)로 이루어진 cyclic structure는 12-membered ring을 형성하게 되나 ring carbon에 결합된 2개의 amide protons와 4개의 carbonyl oxygens간의 spacial crowding이 너무 커서 안정한 물질로 존재하기 어렵게 된다. 따라서 8095 - A는 전기한 분자식의 2배체 (dimer)나 3배체 (trimer)로 생각되었는데 이는 질량분석에 의하여 증명되었다. HRFABMS (high-resolution fast atomic bombardment mass spectrometry) 실험 결과 M+H에 해당하는 peak가

1112에 나타났으며 분자식은 $C_{54}H_{90}N_6O_{18}$ (M+H, calculated : 1111.6390, observed : 1111.6435, $\Delta m m u +12.8$) 이었다 (Fig. 3-5-11). 그러므로 물질 8095 - A는 전기한 4개의 acid units가 C3 symmetry를 유지하며 반복적으로 배열된 물질이며 문헌 조사결과 *Streptomyces* sp.의 대사물질로 알려진 valinomycin과 동일하였다 (Brockmann and Schmidt-Kastner, 1955). 시판되는 authentic valinomycin (Sigma)과 spectral data를 비교한 결과 proton 및 carbon NMR data가 완전히 일치하였으므로 8095 - A는 valinomycin으로 결론지워졌다. *Streptomyces* sp.의 대사물질인 valinomycin은 x-ray 결정구조 분석에 의하여 구조가 밝혀졌으며 몇 가지 다른 경로로 전합성된 바 있다 (Shemyakin et al, 1963; Dory et al, 1989).

Ionophores는 metal ions의 세포벽에 대한 투과성을 증가시켜 결과적으로 생리활성을 나타내는 천연물을 가리킨다. 이들은 대부분이 *Streptomyces* spp. 등 actinomycetes의 대사물질이다. 그러나 최근 *Alteromonas* 등 다른 종류의 bacteria로부터 발견되는 예가 증가하고 있다. 이들의 생리활성은 주로 세포벽 안과 밖사이의 ion농도와 전위를 과다하게 변화시켜 mitochondria내의 중요반응인 oxidative phosphorylation에 관여하는 핵심 효소인 ATPase의 작용을 방해하여 결과적으로 세포의 대사한계 (metabolic capacity)를 초과하게 되어 세포를 죽인다. 이들은 모두 여러개의 oxygen을 갖고있어서 수화된(hydrated) 금속 이온을 둘러싸는 것이 용이하하며 이에따라 금속이온의 전기성을 중화시켜 금속이온이 lipid membrane을 투과하는 것을 돕는다.

Ionophores는 분자의 구성과 작용기작에 따라 크게 3가지의 그룹 - natural carriers, carboxylate carriers, channel formers - 으로 나누어진

다. 먼저 가장 흔한 것은 carrier type으로 금속이온을 작용기로 둘러싸서 세포벽을 투과하는 일반적인 ionophores가 대부분 여기에 속한다. Carrier type은 chelating group의 종류에 따라 다시 natural carriers와 carboxylate carriers로 나누어진다. Natural carriers는 분자 전체의 charge가 없는 중성물질로서 수화된 금속이온과 결합이 가능한 electron-rich oxygen 즉 carbonyl기를 여러 개 가진 cyclic molecules가 대부분이다. 따라서 이들은 주로 cyclic peptides나 cyclic esters이며 valinomycin도 여기에 속한다. 한편 carboxylate carriers는 분자자체가 positive charge를 띠고있는 금속이온과 직접 이온 결합을 하여 전기적으로 중성화시키는 것이 가능한 물질들로서 monensin등 긴 polyether chain의 끝에 carboxyl기를 가진 물질들이다. 이에 비하여 channel formers는 전혀 다른 계열의 물질들로서 금속이온의 전기적 성질을 중화하는 대신에 이온의 투과가 가능한 새로운 channel을 lipid membrane에 만드는 물질들이다. 이들은 주로 linear peptides이며 유명한 항생물질인 gramicidin이 대표적으로 알려져 있다 (Fig. 3-5-12, 3-5-13). 특기할 것은 ionophores중에서 Fe ion에 선택적인 affinity를 나타내는 물질들을 siderophores라고 부르는데 이들은 생리효과 뿐만아니라 해양미생물의 생태학적인 연구 측면에서 큰 주목을 받고있다 (Reid et al, 1993).

Valinomycin의 반응성과 생체내 작용기작 및 metal-complex의 구조에 대해서는 많은 생리, 생화학적 연구가 이루어졌다. 이 물질은 divalent ion에 비하여 monovalent cation에 대한 affinity가 대단히 높으며 ion selectivity는 $H > Rb > K \geq NH_4 > Na > Li$ 의 순이며 특히 대표적인 cation인 K^+ 와 Na^+ 간의 binding affinity는 10,000배 정도 차이가 나서 알려진 monovalent ionophores중 K^+/Na^+ 의 selectivity가 가장 높은 물질이다 (Pressman et al, 1967; Easwaran, 1985; Ward, 1990). 이러한 ion selectivity의 이유는

valinomycin에 존재하는 각각 세쌍을 이루는 2개의 Valine-NH와 carbonyl oxygens 간의 hydrogen bonding에 의하여 solution내에서의 conformation이 고정되며 이에 따라 형성되는 cage의 크기가 Rb^+ (ion radius 1.45A), K^+ (1.33A)등과 bond를 형성하기 쉽기 때문이다. 그러나 Na^+ (0.95A), Li^+ (0.60A)등은 ion radius가 너무 작아 효과적인 bond를 형성하기 어려워 affinity가 약하다. 이러한 특성으로 인하여 valinomycin이 나타내는 항미생물, 세포독성등의 생리활성은 mitochondria내에서의 H^+ 와 K^+ 간의 교환에 영향을 미쳐 oxydative phosphorylation 과정의 짝반응을 변화시키는데 기인하는 것으로 알려져 있다.

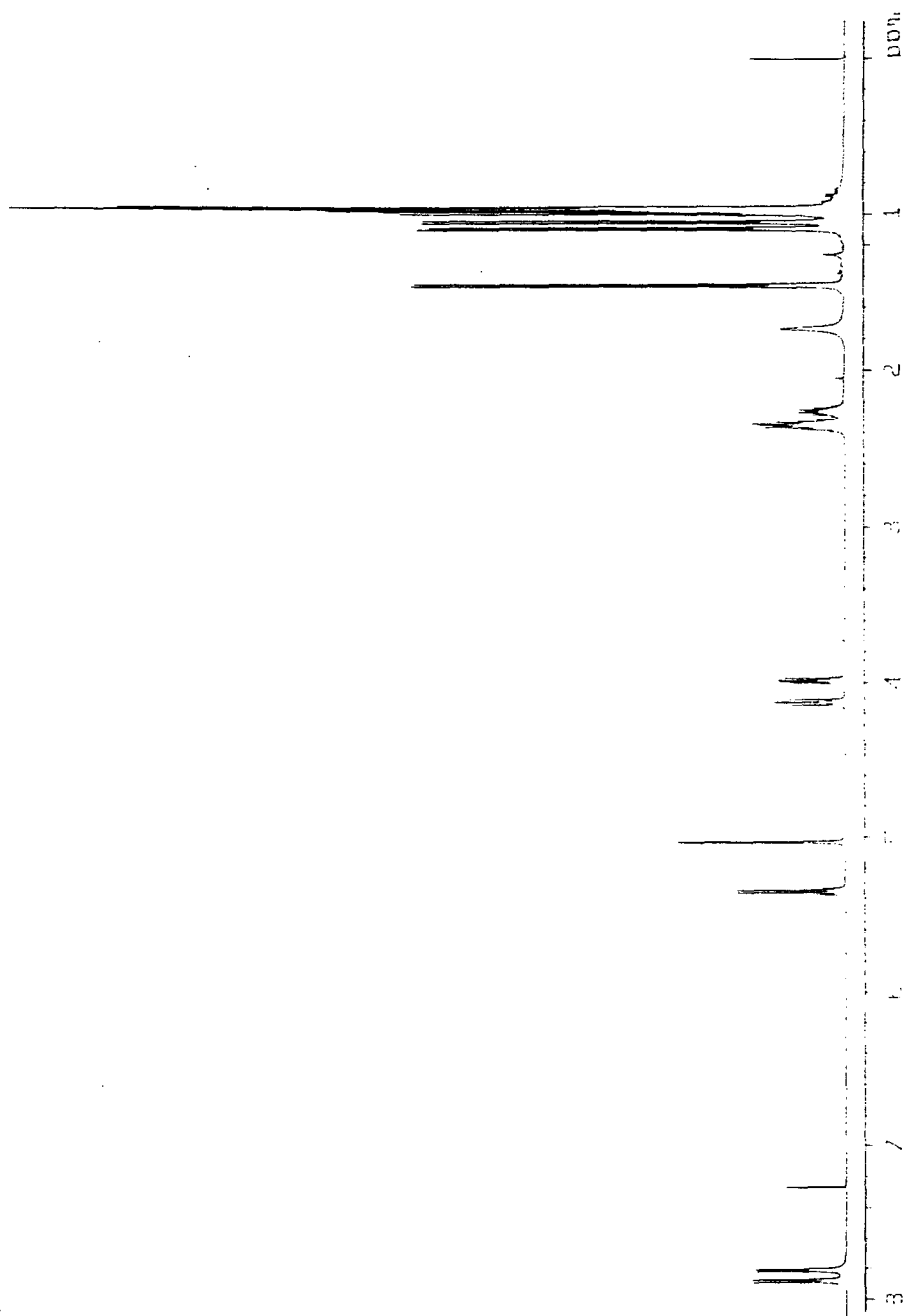


Fig. 3-5-1. Proton NMR spectrum of 8095-A.

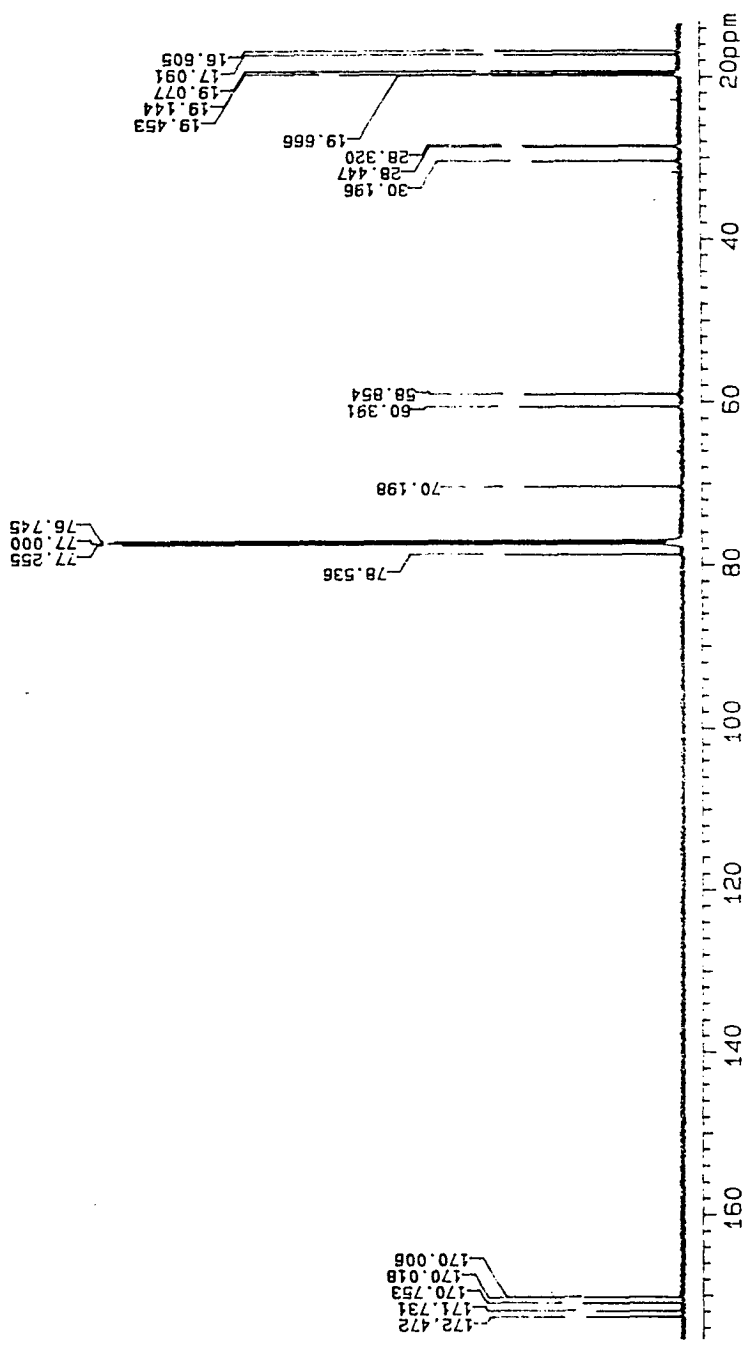


Fig. 3-5-2. Carbon NMR spectrum of 8095-A.

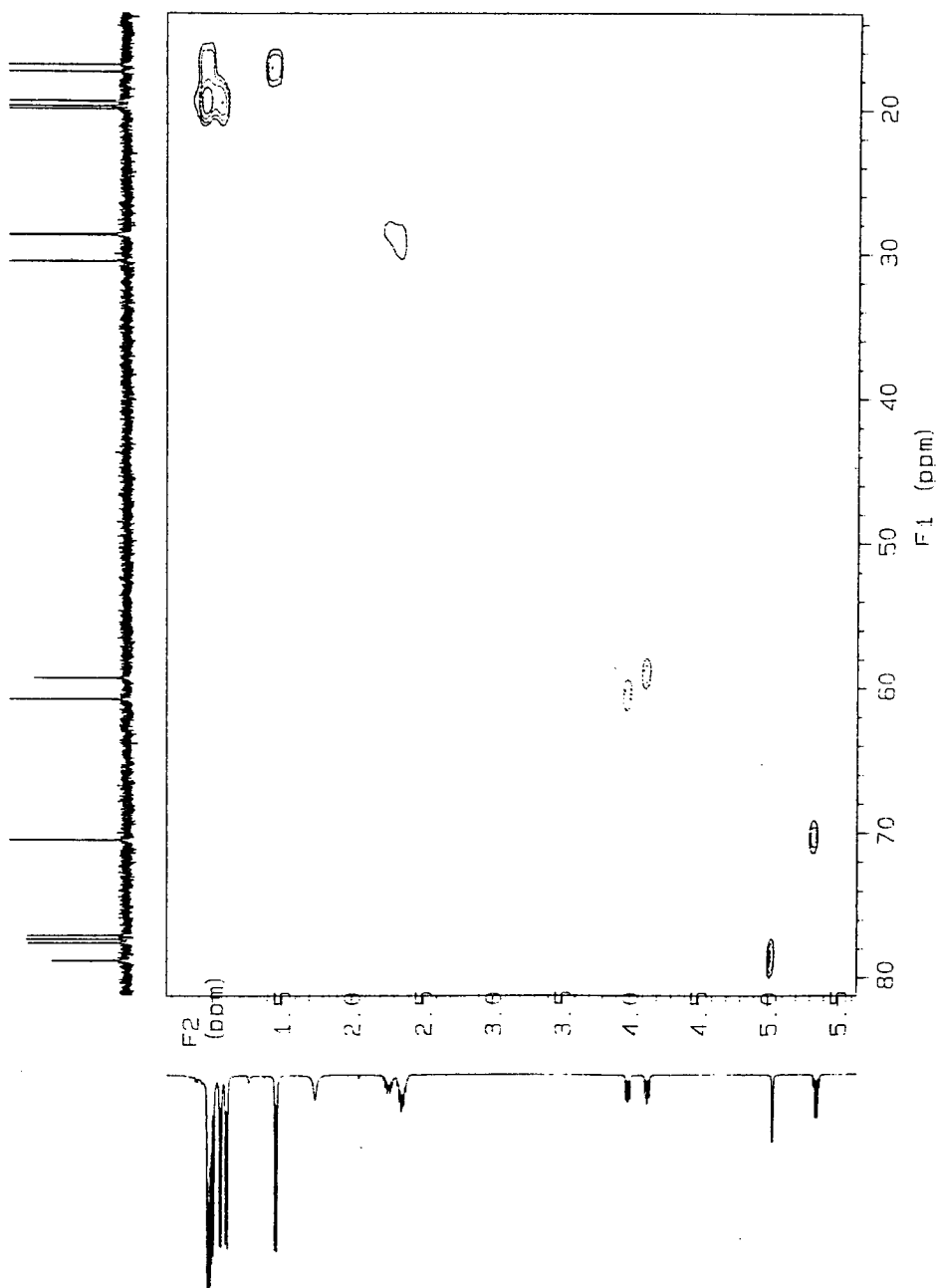


Fig. 3-5-3. HMQC spectrum of 8095-A.

Mattson Instruments FTIR

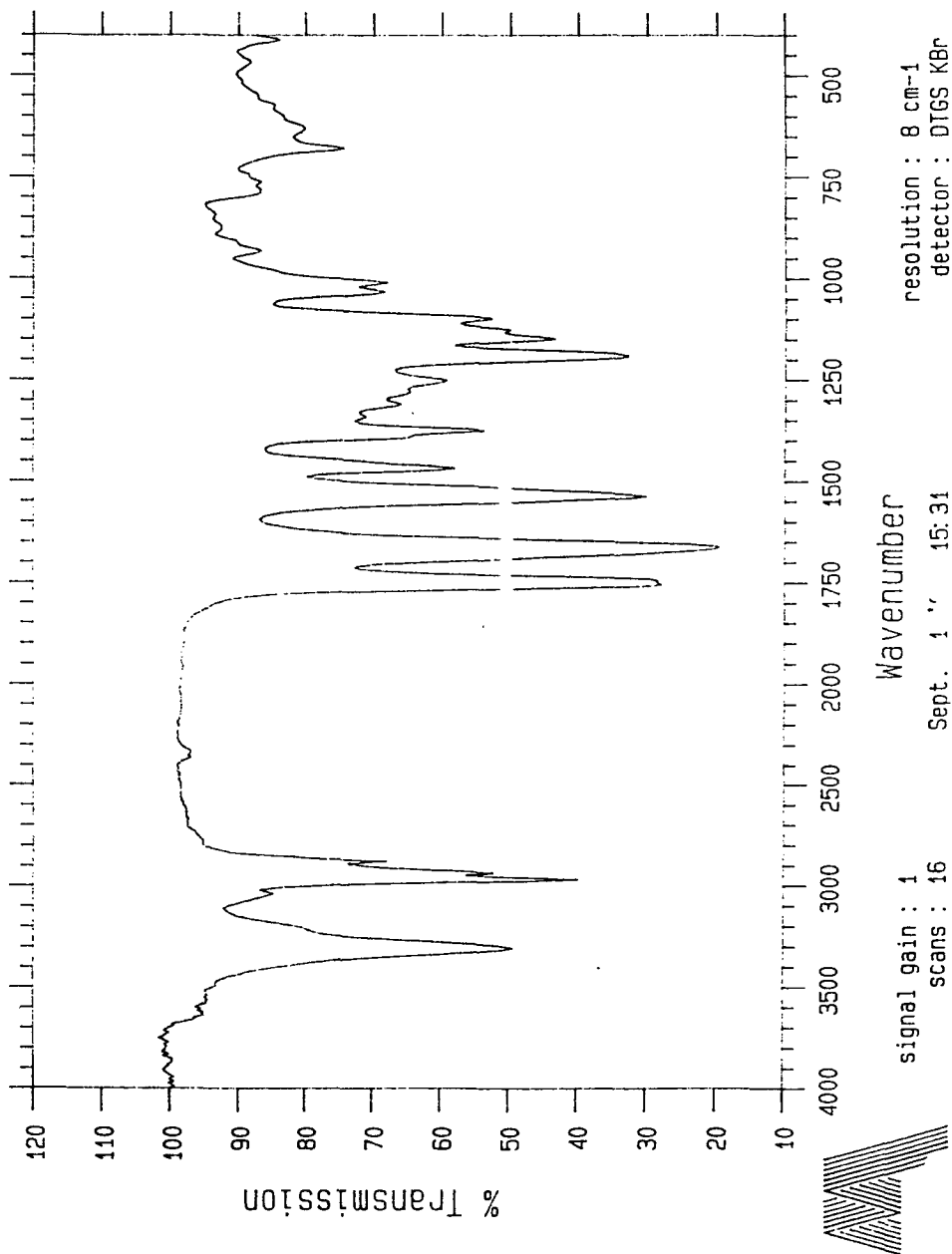


Fig. 3-5-4. Infrared spectrum of 8095-A.

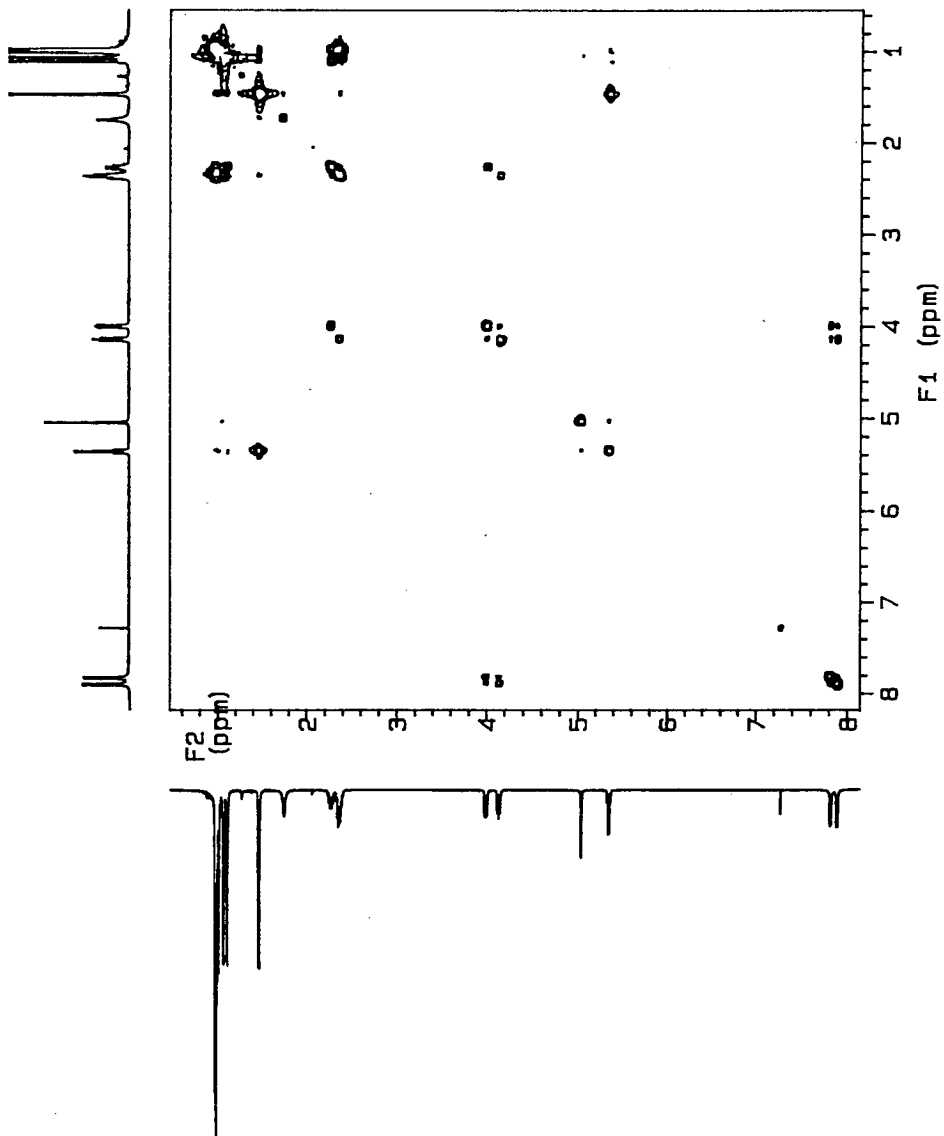


Fig. 3-5-5. Proton COSY spectrum of 8095-A.

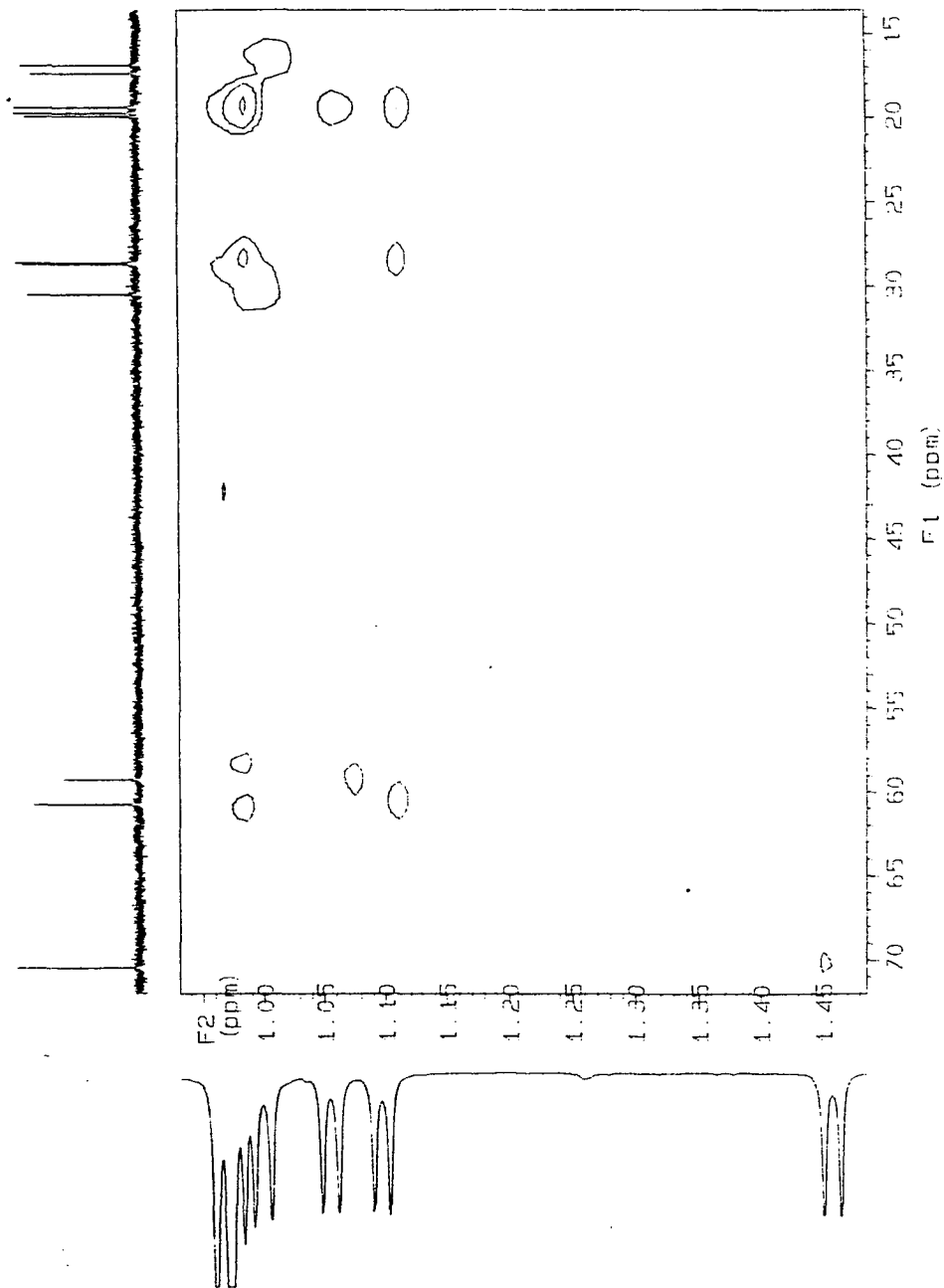


Fig. 3-5-6. HMBC spectrum of 8095-A (9 Hz - upfield).

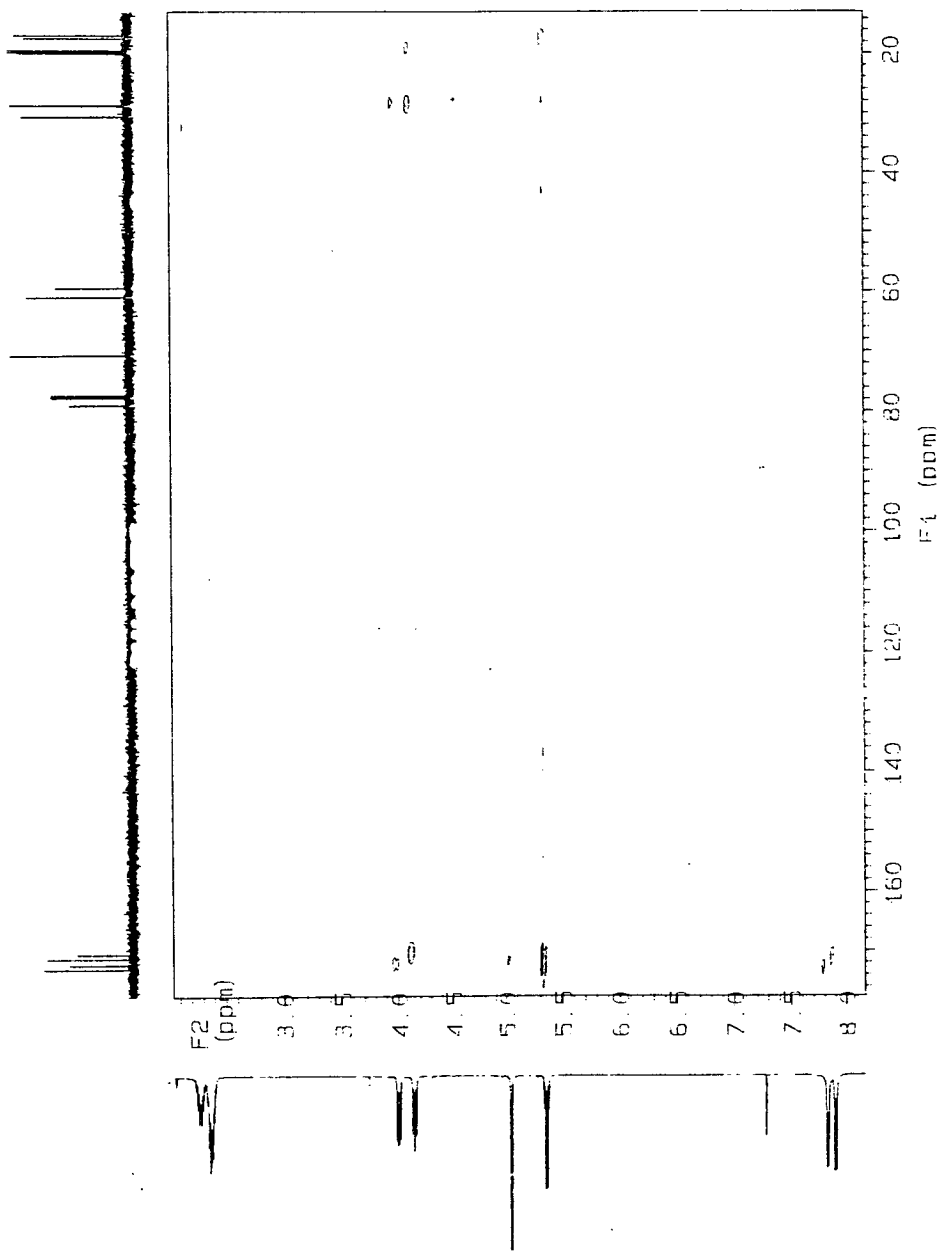


Fig. 3-5-7. HMBC spectrum of 8095-A (9 Hz - downfield).

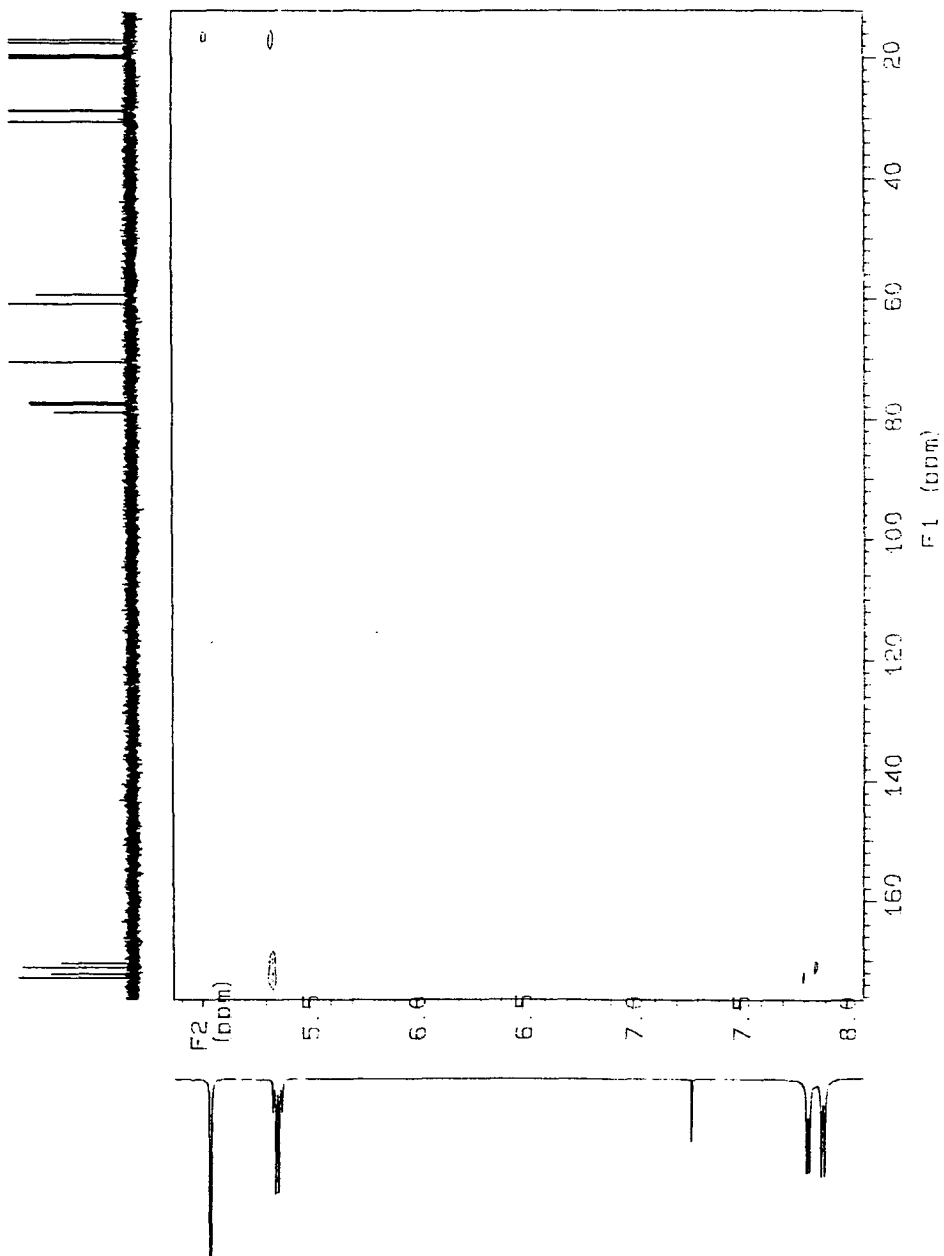


Fig. 3-5-8. HMBC spectrum of 8095-A (8 Hz - downfield).

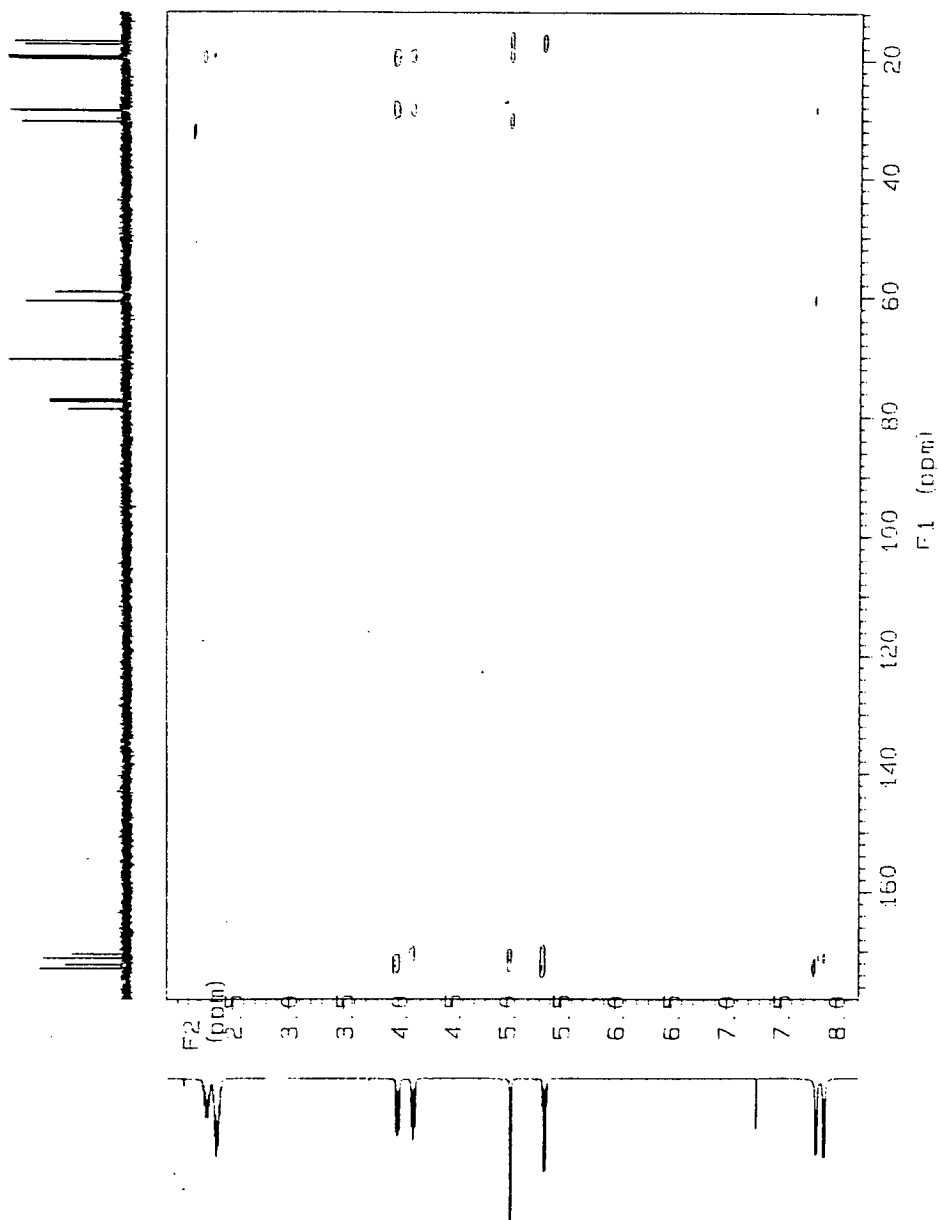


Fig. 3-5-9. HMBC spectrum of 8095-A (5 Hz - downfield).

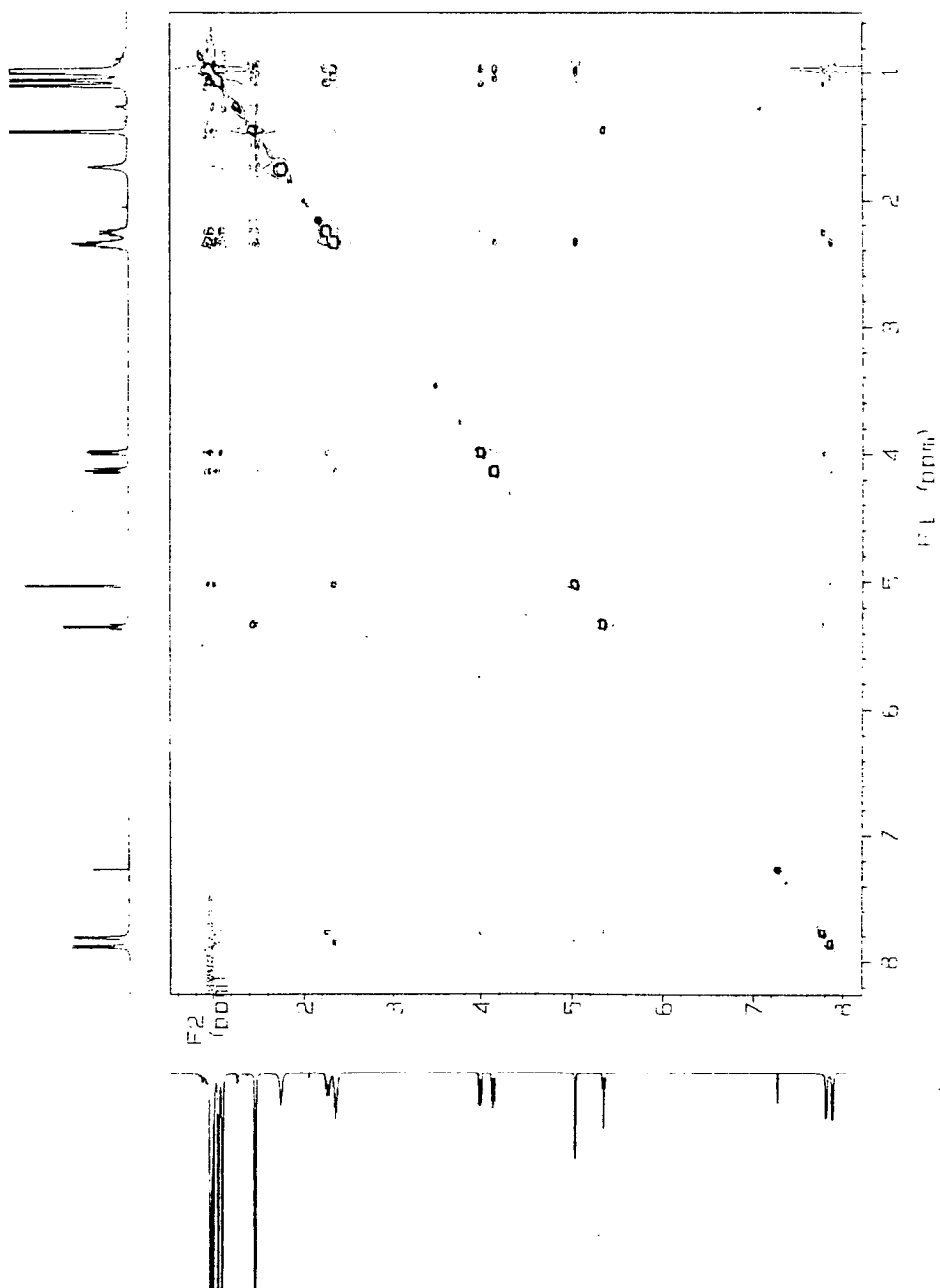


Fig. 3-5-10. NOESY spectrum of 8095-A.

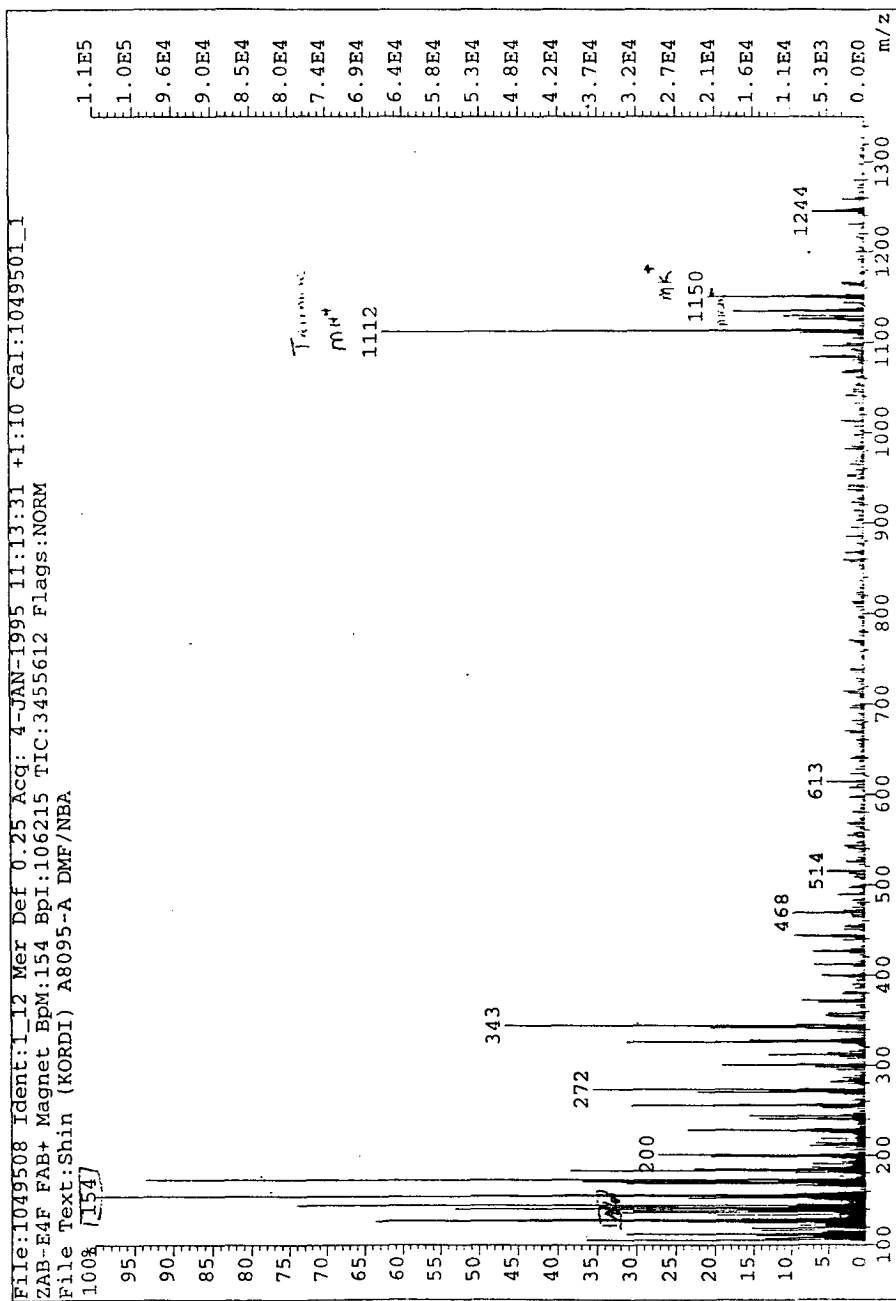


Fig. 3-5-11. HRFABMS spectrum of 8095-A.

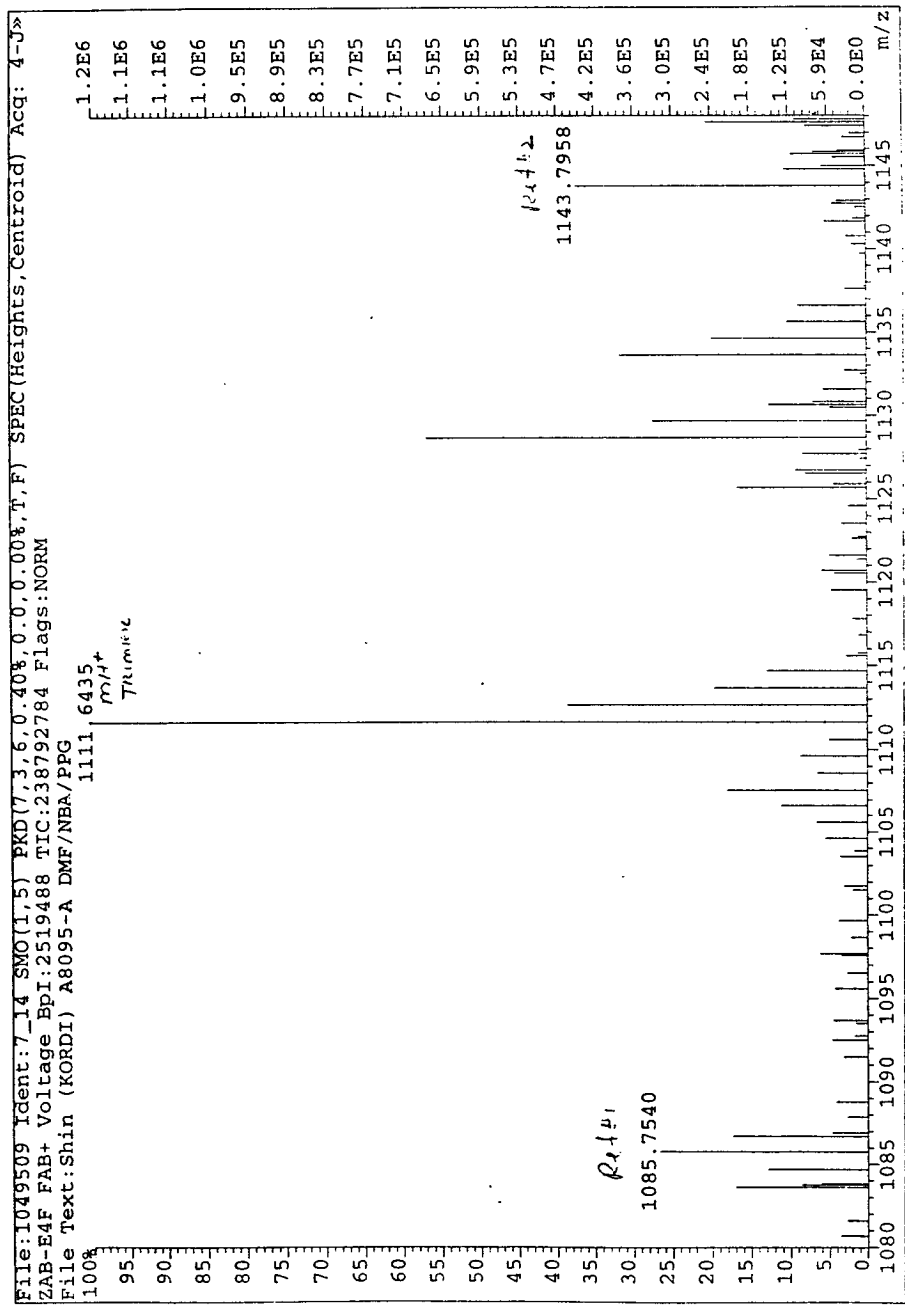


Fig. 3-5-11. Continued.

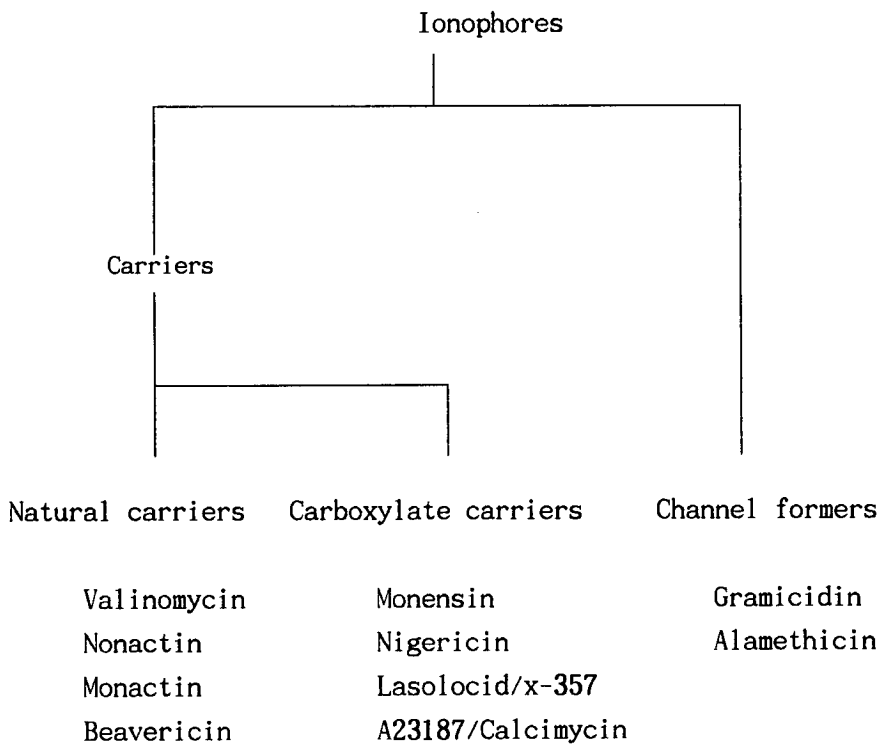
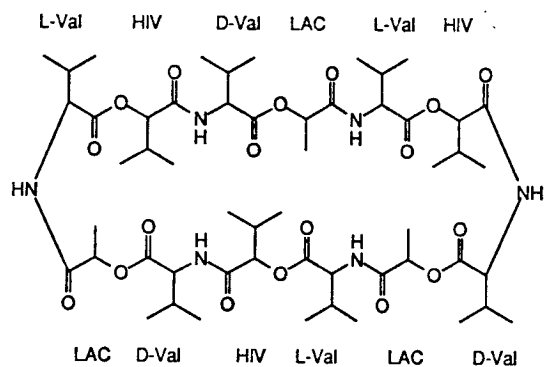
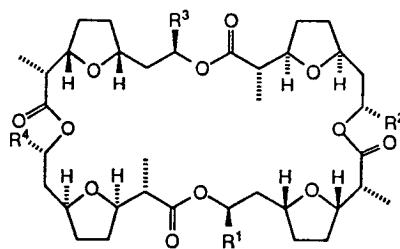
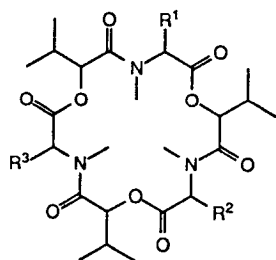


Fig. 3-5-12. Classification of ionophores (Ward, 1990)



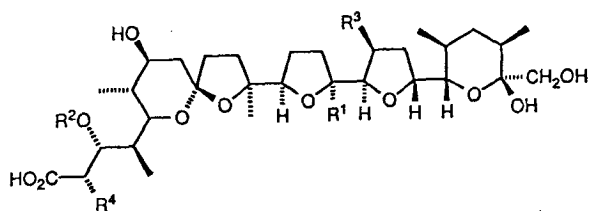
Valinomycin (8095-A)



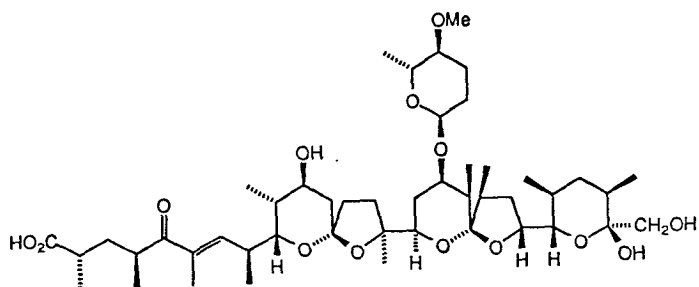
	R ¹	R ²	R ³
Enniatin A	Bu ^s	Bu ^s	Bu ^s
Enniatin A ₁	Pr ⁱ	Bu ^s	Bu ^s
Enniatin B	Pr ⁱ	Pr ⁱ	Pr ⁱ
Enniatin B ₁	Bu ^s	Pr ⁱ	Pr ⁱ
Enniatin C	Bu ⁱ	Bu ⁱ	Bu ⁱ
Beauvericin	benzyl	benzyl	benzyl

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Nonactin	Me	Me	Me	Me
Monactin	Me	Me	Me	Et
Dinactin	Me	Et	Me	Et
Trinactin	Me	Et	Et	Et
Tetranactin	Et	Et	Et	Et

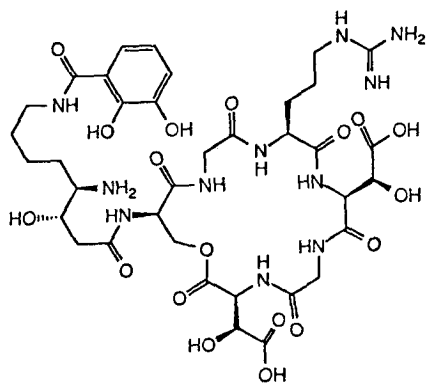
Fig. 3-5-13. Structures of ionophores.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Monensin A	Et	Me	Me	Me
Monensin B	Me	Me	Me	Me
Monensin C	Et	Me	Me	Et



Dianemycin



Alterobactin A

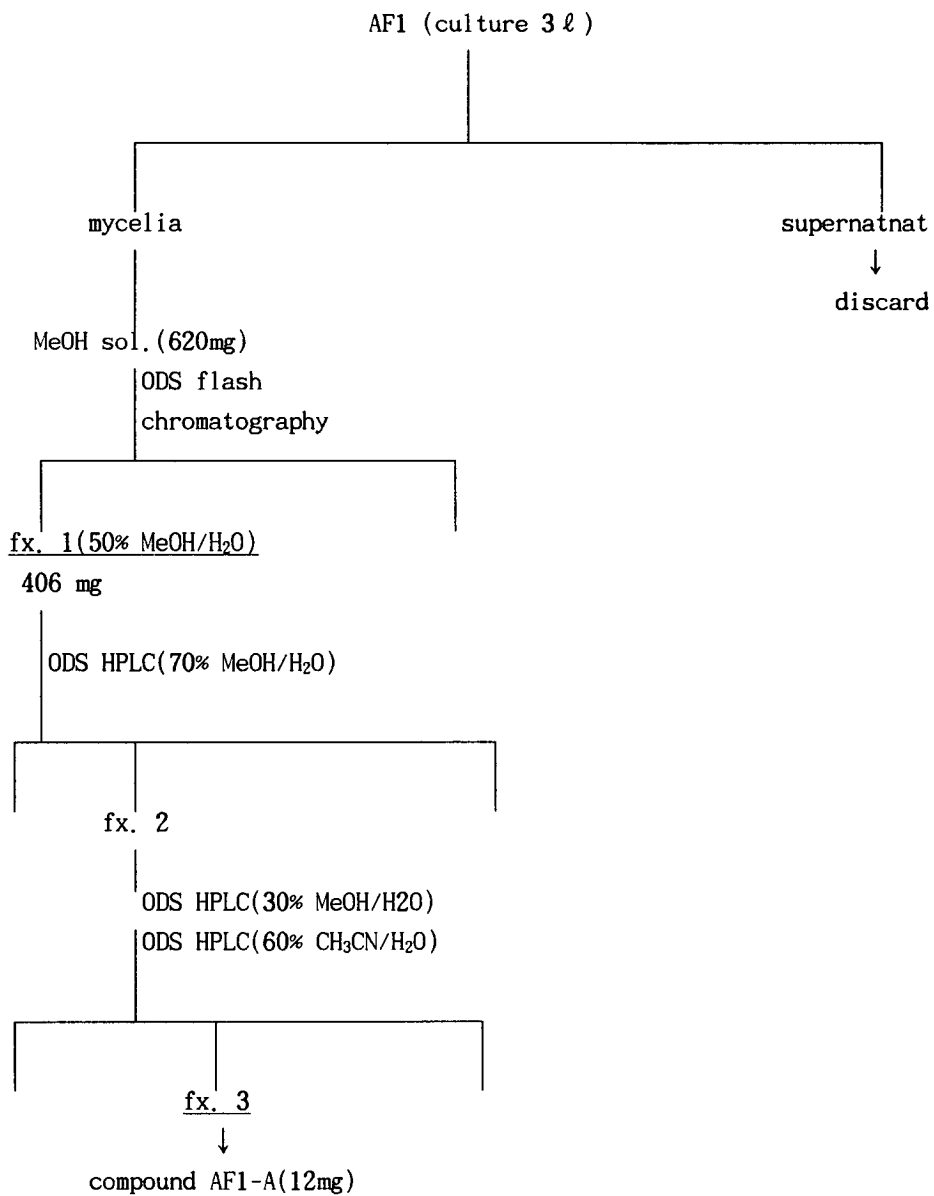
HCO-Val-Gly-Ala-D-Leu-Ala-D-Val-Val-
D-Val-Trp-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-D-Leu-
Trp-NH₂CH₂CH₂CH₂OH

Gramicidin

Fig. 3-5-13. Continued.

3. 5. 2. AF1으로부터 topoisomerase I 저해물질의 분리 및 구조결정

Topoisomerase I에 대하여 강한 활성을 나타내는 방선균(strain AF1)을 실온에서 액체배지(3 l)에 10일간 배양한 후 원심분리 방법을 이용하여 상등액과 균체로 분리하였다. 활성을 나타내지 않는 상등액을 제거한 후 균체에 대하여 MeOH (1 l x 3)을 가하여 유기물질을 추출하였다 (620 mg). 소량의 조추출물에 대한 생리활성도 측정결과 활성이 대단히 극성도가 높은 물질에서 나타나는 것으로 추정되었으므로 salt 제거 작업을 하지않고 물질분리를 시도하였다. MeOH와 water의 혼합액을 이용하여 C18 reversed-phase flash chromatography (YMC ODS silica)를 한 결과 50% water/MeOH로 용출한 분획에서 활성이 나타났다. 이 분획에 대하여 다양한 용매를 이용하여 semi-preparative reversed-phase HPLC (YMC ODS column, 50% MeOH/water, 30% MeOH/water, 60% acetonitrile/water)등을 이용하여 비교적 순수한 12mg의 AF1 - A를 분리하였다.



무색의 점성체로 얻어진 물질 AF1 - A의 구조는 NMR 해석에 의하여 접근되었다. 이 물질의 proton NMR은 모든 signal이 δ 5.2 - 3.0 region에 모여있는 것을 나타내었다. 따라서 이 물질은 oligosaccharide의 일종으로 생각되었다 (Fig. 3-5-14). Carbon NMR spectrum에서도 12 개의 signals가 δ 100 - 60 region에서 발견되었다 (Fig. 3-5-15). DEPT와 HMQC spectra에서는 δ 98.21과 δ 93.95에 나타난 methine carbon들이 각각 δ 4.46과 5.08 proton에 연결되어 있음을 보여주었다. 이들은 의심할 바 없이 C-1 anomeric carbons들로 해석되었다. 또한 δ 62.87과 62.74에 나타난 2 개의 methylene carbons이 δ 3.9 - 3.6 region에 존재하는 각각 2개의 protons에 연결되어 있음을 보여주었다 (Fig. 3-5-16, 3-5-17). 그러므로 물질 AF1 - A는 disaccharide의 일종으로 2개의 pyranohexose가 glycoside linkage로 연결된 물질이다.

그러나 δ 3.9 - 3.0 region에 12개의 proton signals가 중복되어 있어서 각각의 sugar residue의 구조는 명확하지 않다. Proton COSY와 HMBC spectra에서도 수 개의 protons 간의 coupling pattern만 알 수 있을뿐 (C-1 ~ C-2 ~ C-3, C'-1 ~ C'-2 등) sugar의 구조결정에서 가장 중요한 proton coupling constant가 결정되지 않았다 (Fig. 3-5-18, 3-5-19). MeOH- d_4 대신에 D₂O, pyridine- d_5 , DMSO- d_6 등 용매를 변화시킨 경우에도 peak의 resolution은 개선되지 않았다. 또한 peracetylation 반응을 이용하여 proton의 chemical shifts를 변환시키는 시도도 실패하였다. 이 문제점을 해결하기 위하여 high-resolution mass의 측정과 화학적 구조변환작업이 진행중이다.

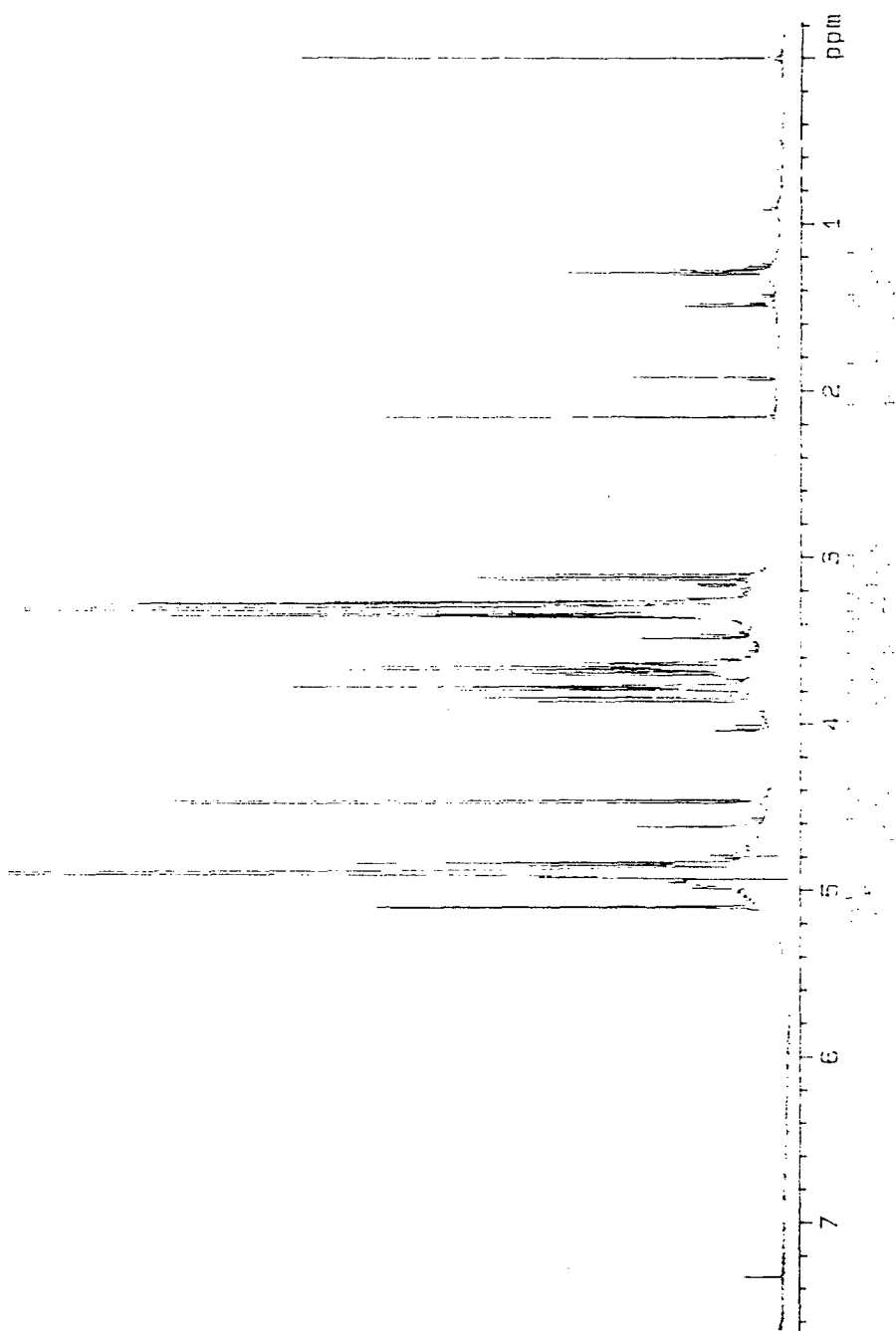


Fig. 3-5-14. Proton NMR spectrum of AF1-A.

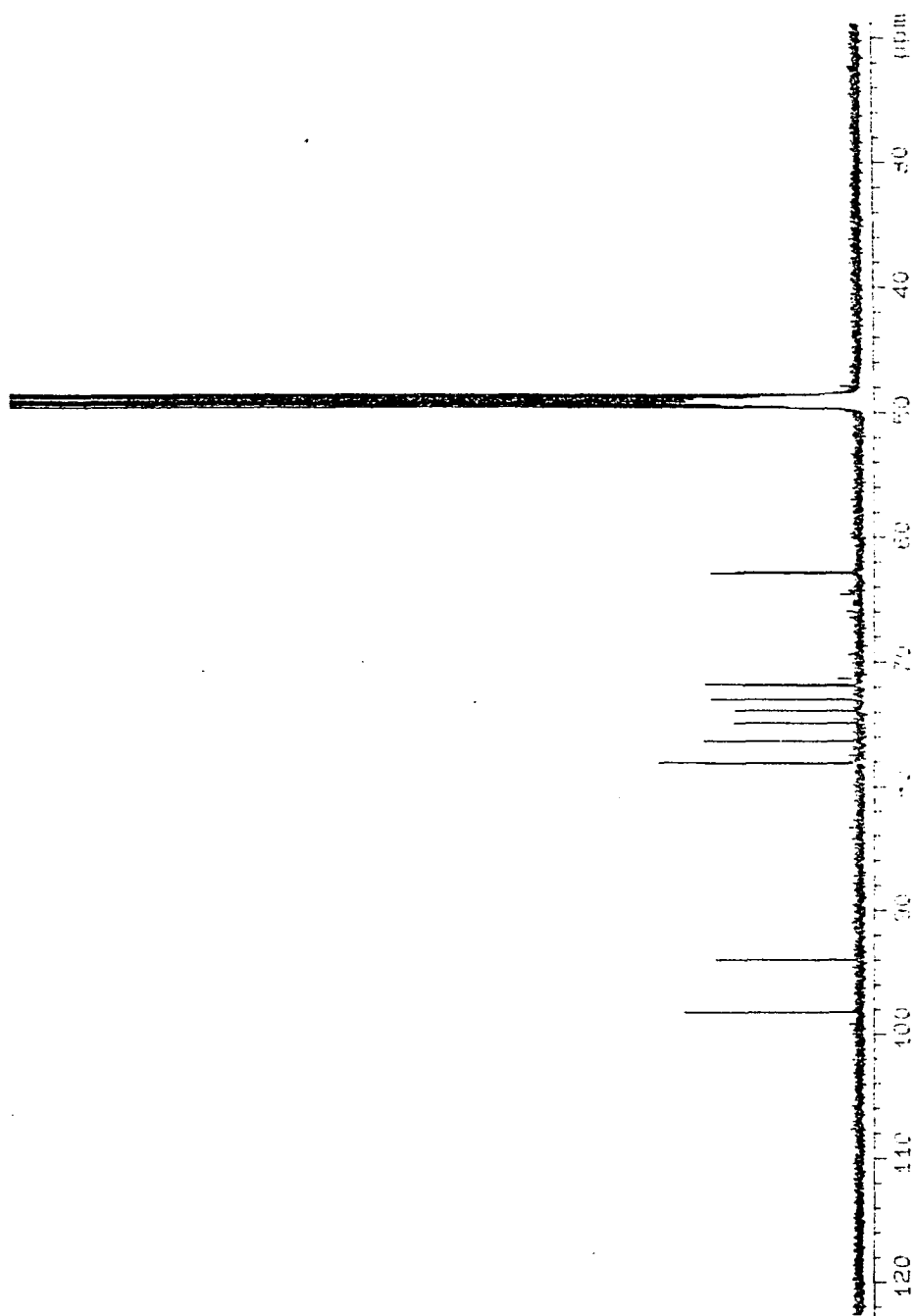


Fig. 3-5-15. Carbon NMR spectrum of AF1-A.

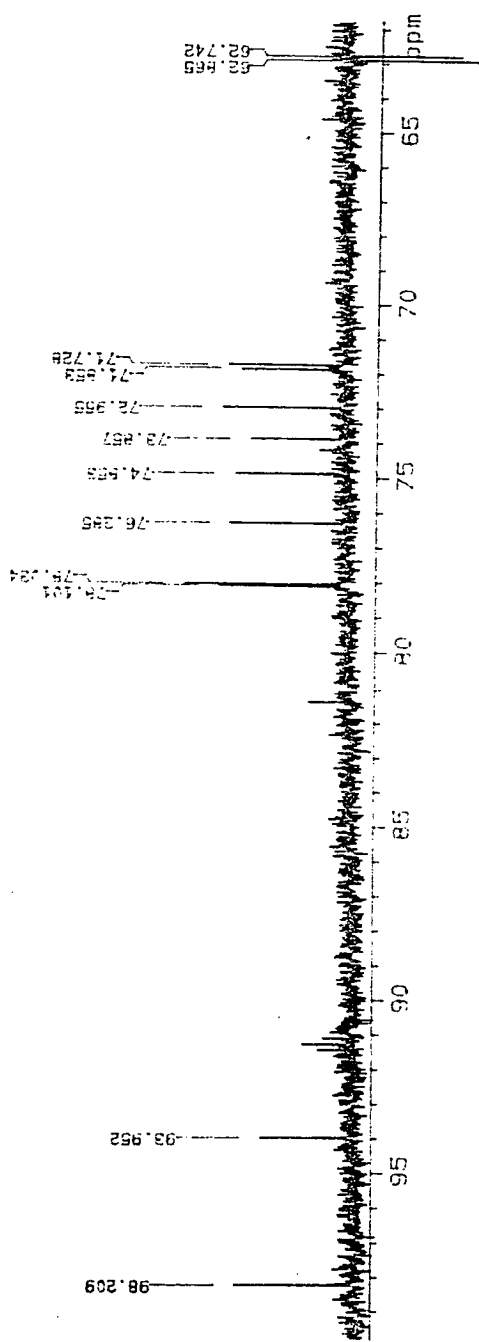


Fig. 3-5-16. DEPT (135°) NMR spectrum of AF1-A.

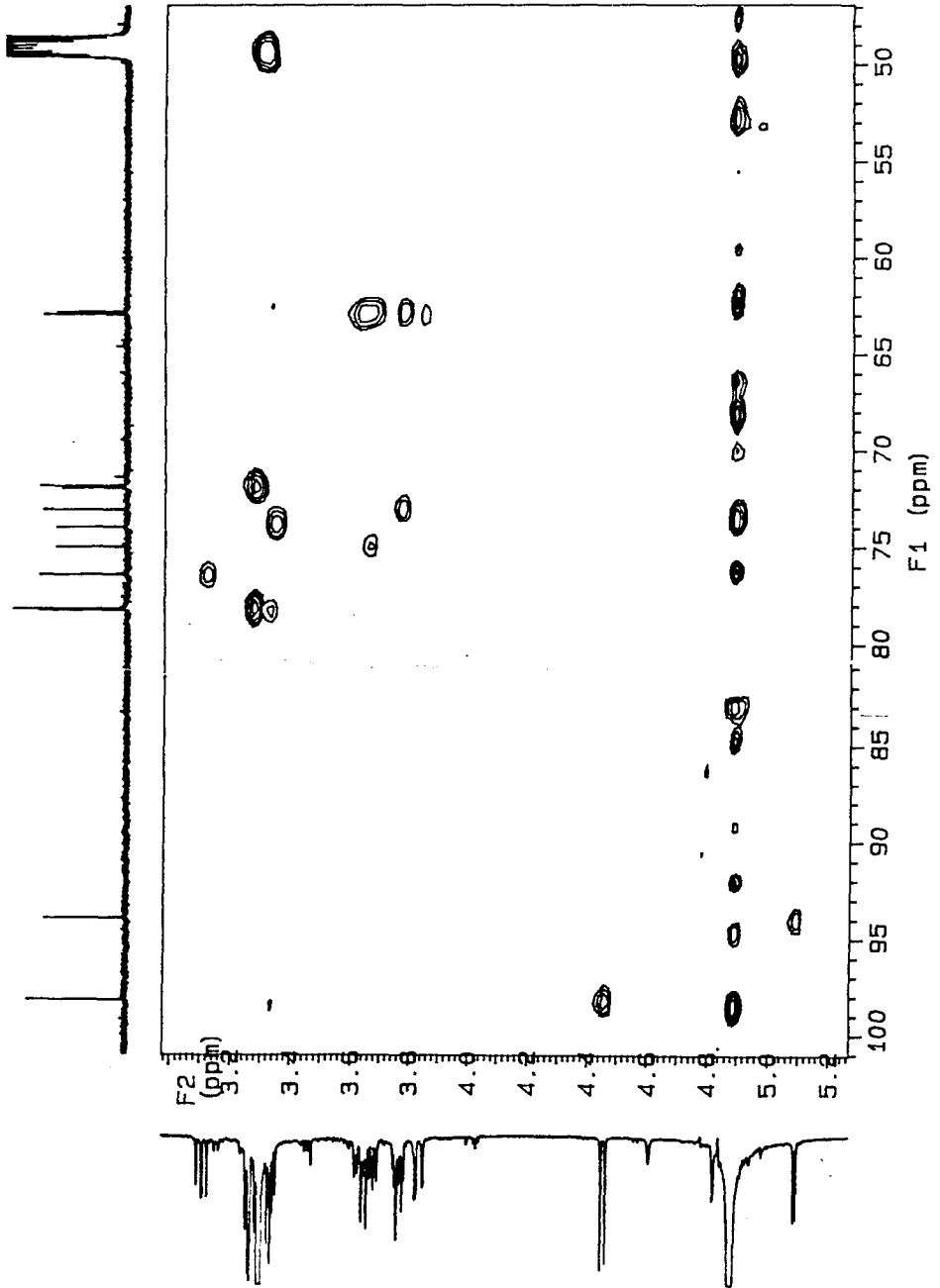


Fig. 3-5-17. HMQC spectrum of AF1-A.

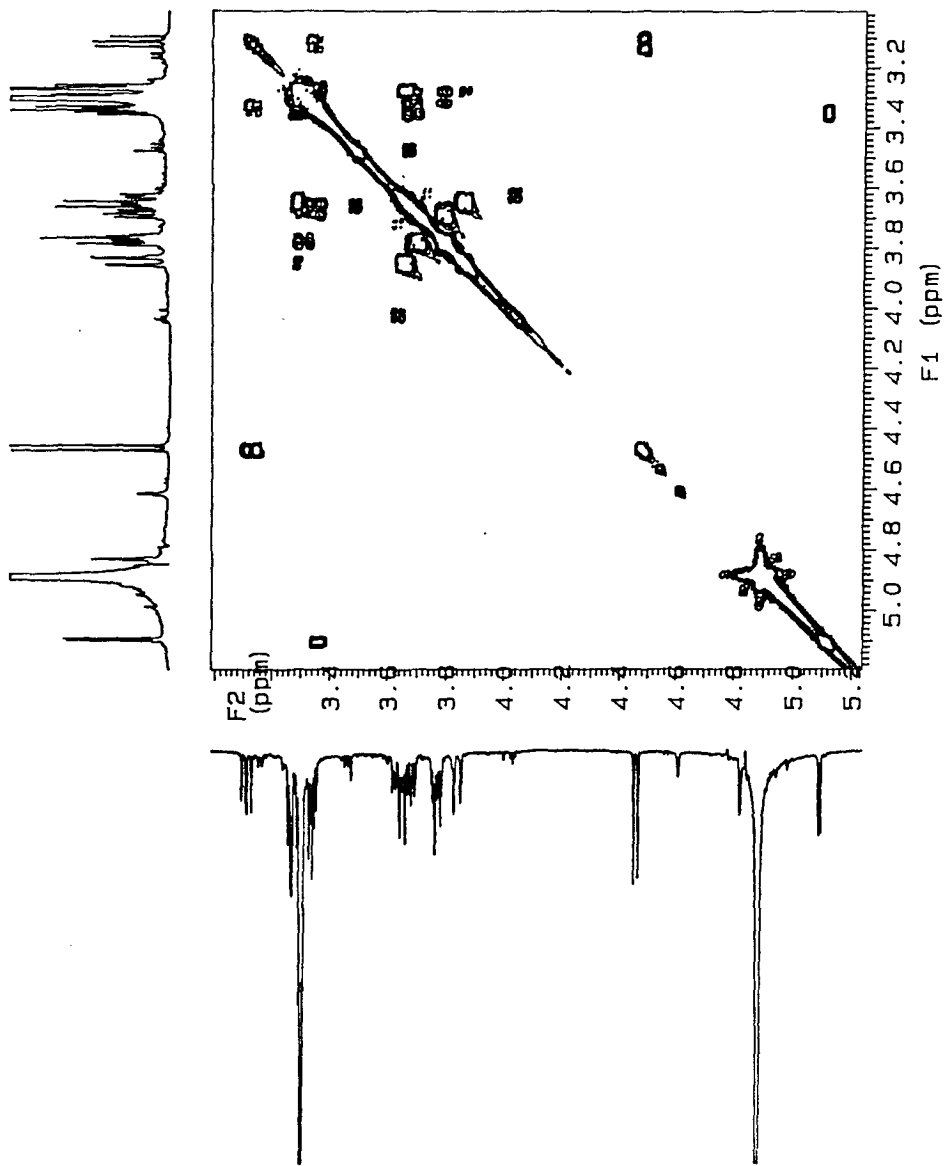


Fig. 3-5-18. Proton COSY spectrum of AF1-A.

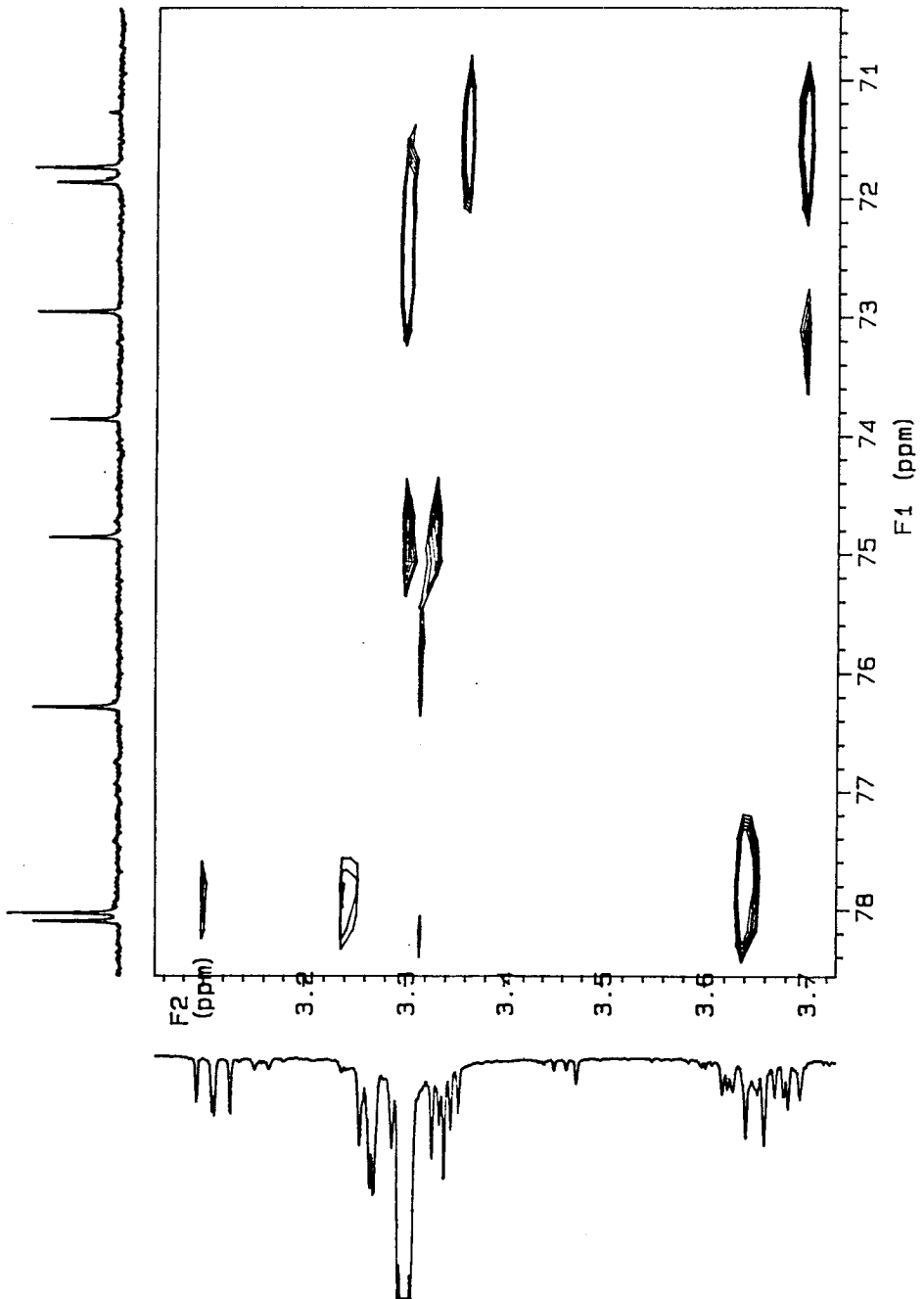


Fig. 3-5-19. HMBC spectrum of AF1-A.

3. 6. 선별균주 8095A와 AF-1의 동정 및 생화학적 특성

3. 6. 1. Valinomycin을 생성하는 방선균주 8095A의 특성

항암물질의 탐색을 위하여 암세포에 대하여 세포독성능을 나타내는 물질을 해양유래 방선균을 대상으로 screening하였고 이중 P388D1 과 DLD1 cell line에 대해 세포독성능이 우수한 방선균주 8095A를 선별하였다. 8095A가 생성하는 물질은 균체에 포함되어 있는 것으로 밝혀졌고 물질을 정제하기 위하여 균체의 methanol extract를 silica vacuum flash chromatography로 분획한 후 활성분획에 대하여 silica HPLC, RP HPLC를 이용하여 분리, 정제하였다. 정제된 물질의 구조분석결과 활성물질이 valinomycin임이 밝혀졌다.

8095A의 세포벽은 화학분석적인 결과 L-form의 DAP을 가지고 있으며 특정의 당을 포함하고 있지 않는 cell wall type I 형에 속하는 것으로 밝혀졌다(Table 3-6-1, Figure 3-6-1, 3-6-2).

변형된 Zobelle 배지에서 흰색의 기중균사와 노란색의 기질균사를 형성하고 수용성색소는 생성하지 않았으며 기중균사의 형태는 straight형에 가까운 것으로 나타났다(Table 3-6-2). 기중균사체의 형태는 여러가지 배지에서의 성장특성을 관찰하였을때 ISP 1, ISP 2, ISP 5에서는 yellow의 기중균사체를 형성하였고 ISP 4, ISP 6, ISP 7에서는 white의 기중균사체를 형성하였다. 특히 ISP 7 배지에서의 melanin 색소 생성능은 나타나지 않았으나 ISP 1, ISP 6에서는 brown의 soluble pigment를 생성하였다. 조사한 조건중 최적생장은 중성의 pH에서 25°C이상에서 배양할 때이며 염도에 대하여는 10% 정도의 농도에서도 내염성을 나타내지 않았다(Table 3-6-3). 생리 및 생화학적인 특성으로서는 유일한 탄소 및 질소원으로서

glucose, fructose, xylose, mannitol, serine, arginine, glycine등을 이용하여 성장할 수 있었으며 arabinose, rhamnase, inositol, leucine, lysine, alanine 등은 이용하지 못하였다. 또한 0.01%의 potassium tellulite에 저항성을 나타냈으며 항생제 감수성에 대해서는 novobiocin, chloramphenicol 등에는 감수성을 나타냈으나 penicillin G, bacitracin, nalidixic acid, erythromycin 등에는 저항성을 나타내었다. Tyrosine, starch 등을 분해할 수 있었으나 urea 는 분해하지 못하였고 lipase, protease 활성이 있는 것으로 나타났다. 이 밖에 nitrate를 환원하지 못하였고 catalase 와 H₂S 생성능이 있는 것으로 밝혀졌다(Table 3-6-4). 이러한 특성을 종합하여 볼때 방선균주 8095A 는 *Streptomyces* species의 일종으로 생각된다. Valinomycin의 생산균주로 알려진 *Streptomyces fulvissimus*와 (Heisey, 1987) 방선균주 8095A의 특성을 조사하여 비교한 결과 valinomycin의 생산균주인 *S. fulvissimus*와 는 colony의 색상과 기중균사의 형태 등에서 차이를 나타내는 것으로 밝혀졌다(Table 3-6-5).

Table 3-6-1. Chemotaxonomic characteristics of strain 8095A.

cell wall components	8095A
DAP isomer	L-form
sugar	none

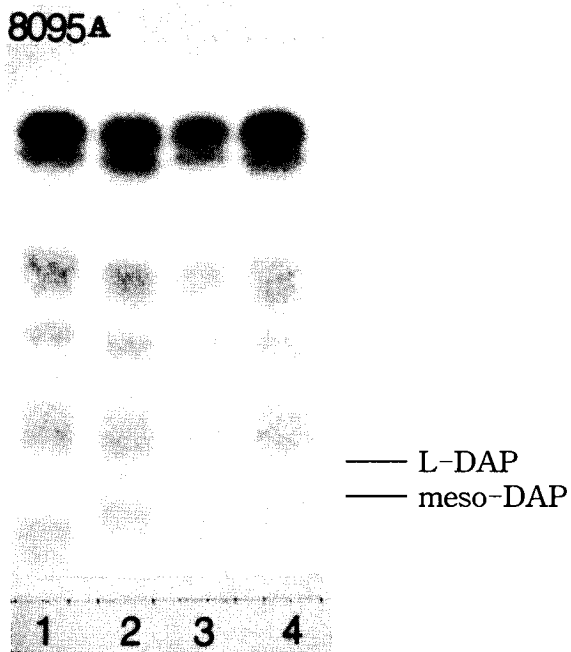


Fig. 3-6-1. TLC analysis of DAP isomer of strain 8095A.

1. *M. olivasterospora*
2. 8095A,
3. *N. asteroides*
4. *S. griseus*

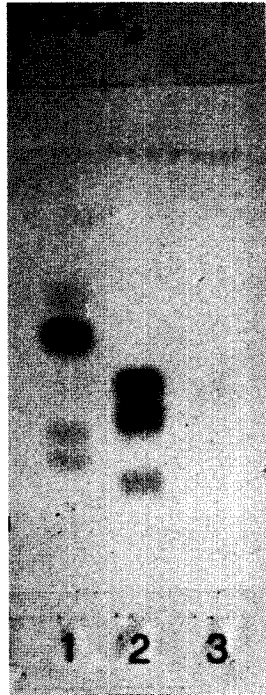


Fig. 3-6-2. TLC analysis of sugar from whole cell hydrolysate of strain 8095A.

1. standard (Glu, Man, Rib, Rham)
2. standard (Gal, Ara, Xyl)
3. 8095A

Table 3-6-2. Morphological characteristics of strain 8095A.

character \ media	ZoBelle	ISP1	ISP4	ISP6	ISP7
color of					
aerial mycelium	white	yellow	white	white	white
substrate mycelium	yellow	yellow	yellow	Y-B*	yellow
soluble pigment	none	brown	none	brown	none
spore bearing hyphae		straight**			

* YB : yellow-brown.

** cultivated on ZoBelle media.

Table 3-6-3. Effects of cultural conditions on the growth of strain 8095A.

pH		salt(%)		temperature(°C)	
5.0	no growth	5.0	slight growth	10	slight growth
7.0	growth	10.0	no growth	25	growth
9.0	growth	15.0	no growth	30	growth
				35	growth

Table 3-6-4. Biochemical characteristics of strain 8095A.

Characteristics	Strain 8095A
sugar as sole carbone source (1%)	growth : glucose, galactose, fructose, mannose, trehalose, ribose, maltose, xylose, mannitol no growth : arabinose, lactose, rhamnose, raffinose, saccharose, inositol
amino acid as sole nitrogen source (0.1%)	growth : serine, asparagine, glutamic acid, arginine, cysteine, glycine no growth : leucine, lysine, phenyl alanine, orhithine
resistance to chemical inhibitor	growth : potassium tellulite (0.01%) no growth : crystal violet(0.0001%), phenol(0.1%), sodium azide(0.01%)
resistance to antibiotics	growth : penicillin G, nalidixic acid, bacitracin, sulfisoxazole, erythromycin, streptomycin no growth : novobiocin, chloramphenicol, tetracycline
degradation activity	+ : tyrosine, starch, tween 80, skim milk - : urea
enzyme activity	+ : nitrate reductase, catalase
H ₂ S production	+

Table 3-6-5. Comparison of strain 8095A with *S. fulvissimus*.

characteristics	strain	
	<i>S. fulvissimus</i> **	8095A
spore chain	rectaflexibiles	straight
color of		
aerial mycelium	red or gray	white or yellow
substrate mycelium	yellow brown	yellow
soluble pigment	sometimes produced	brown on ISP 1,6
melanin pigment	+	-
antibiotics sensitivity	oleandomycin(100µg/ml)	NT*
	neomycin (50µg/ml)	NT*

* NT ; not tested.

** data from Bergey's manual(Locci, 1989).

3. 6. 2. Topoisomerase I 저해활성을 나타내는 방선균주 AFI의 특성

진핵세포 유래의 topoisomerase I 의 활성저해제를 해양유래의 방선균들을 대상으로하여 탐색하였고 이중 활성이 강한 방선균주 AFI를 선별하였다.

방선균주 AFI의 형태학적 특성은 변형된 ZoBelle 배지에서 노란색의 기증균사와 갈색의 기질균사를 형성하였고 기준균사의 형태는 flexibilis로 밝혀졌다. 화학분석적인 특성에 의해 L-form의 DAP(그림 3-6-3)과 특징적인 sugar를 포함하고 있지 않은(그림 3-6-4) cell wall type I 형에 속하는 것으로 나타났다. 생리적인 특성으로는 lactose, rhamnose, raffinose, saccharose, maltose, inositol, cystein을 제외한 대부분의 당과 아미노산을 유일한 영양원으로서 이용하여 성장하였으며 100 µg/ml의 novobiocin, chloramphenicol, tetracycline 에 감수성을 나타내었고 penicillin G, nalidixic acid, bacitracin, erythromycin 등에는 저항성을 나타내었다. 그 외의 특성으로서는 protease, lipase의 활성이 있고 starch와 tyrosine등의 분해능을 나타내었으나 urea 분해능과 H₂S 생성능은 없는것으로 밝혀졌다. 따라서 방선균 AFI은 *Streptomyces species*의 일종인 것으로 추정된다. AF-1의 형태학적 특성 및 생리 생화학적 특성은 표 3-6-6 에 요약하였다.

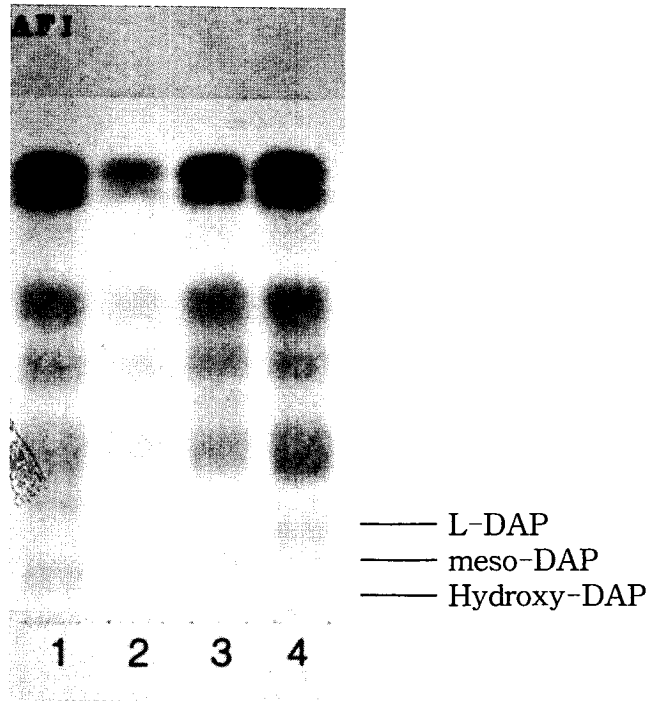


Fig. 3-6-3. TLC pattern of DAP isomer of strain AF-1.

1. *M. olivasterospora*
2. AF-1
3. *N. asteroides*
4. *S. griseus*



Fig. 3-6-4. TLC analysis of sugars from whole hydrolysate of strain AF-1.

1. standard (Glu, Man, Rib, Rham)
2. standard (Gal, Ara, Xyl)
3. AF-1 whole cell hydrolysate

Table 3-6-6. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of strain AF-1.

morphology	aerial mycelium : yellow, substrate mycelium : yellow-brown, soluble pigment : none, melanin pigment : none, aerial hypha : <i>flexibilis</i>
pH	pH 5 : no growth, pH 7 : good growth pH 9 : good growth
salt	5% : slightly growth, 10% : slightly growth 15% : no growth
temperature	10°C : slightly growth, 25°C : good growth 30°C : good growth, 35°C : good growth
sugar as sole carbon source (1%)	growth : glucose, galactose, fructose, arabinose, mannose, trehalose, ribose, xylose, mannitol no growth : lactose, rhamnose, saccharose, maltose, raffinose
amino acid as sole nitrogen source (0.1%)	growth : serine, asparagine, glutamic acid, ornithine, arginine, leucine, lysine, glycine, phenyl alanine no growth : cysteine
resistance to chemical inhibitor	growth : phenol(0.1%) no growth : crystal violet(0.0001%), potassium tellurite(0.01%), sodium azide(0.01%)
resistance to antibiotics	growth : penicillin G, nalidixic acid, bacitracin, sulfisoxazole, erythromycin, streptomycin no growth : novobiocin, chloramphenicol, tetracycline
degradation activity	+ : tyrosine, starch, tween 80, skim milk - : urea
enzyme activity	nitrate reductase : - catalase : +
H ₂ S production	-

3. 7. Topoisomerase 저해제물질(문헌중심)

DNA topoisomerase는 20년전 James Wang에 의해 *Esherichia coli*로부터 발견되어 omega protein이라 명명된후 지금은 여러가지 cell type(human, plant, bacteria등)에서 발견되고 있다(Alberts, 1989). 생물체의 유전형질을 보존하고 있는 DNA는 이중나선(double helix)구조이고, 세포에서 발견되는 대부분의 DNA는 환상분자(closed circular form)로 핵내에 histone과 결합된 염색질(chromatin)의 상태로 존재한다. 또한 핵내에서 DNA는 supercoling된 상태로 존재하게 되는데 untwisting은 negative supercoiling(left-handed direction)을 overtwisting은 positive supercoiling(right handed direction)을 유도하게 된다. 실제로 모든 세포내 DNA는 이중나선의 방향(right handed direction)과 반대방향인 negative supercoiling 상태로 존재한다(Silverman, 1992). 이 supercoiling상태의 DNA는 다시 relaxed DNA의 형태로 전환되기도 하는데 이러한 과정을 촉매해주는 세포내 효소가 topoisomerase이다. 이 topoisomerase는 DNA형태의 위상학적인 전환(topological convert)뿐만아니라 DNA복제(Replication), 전사(transcription), 재조합(recombination)들의 과정에서 발생하는 overwinding과 underwinding, catenation과 decatenation, knotting과 unknotting등과 같은 위상학적인 문제(topological problem)들을 해결하는 역할을 수행한다(Silverman, 1992; Liu, 1989). 진핵세포에 있어서 topoisomerase는 그 작용기작에 따라 I형과 II형으로 나뉜다. Topoisomerase I (Topo I)은 DNA의 두가닥중 한가닥에 nick를 형성하고 이에 상보적인 가닥을 축으로 하여 회전함으로써 DNA의 supercoiling을 제거한다. 인간의 Topo I은 monomeric protein(100kd)으로서 다른 진핵세포의 Topo I과 같이 positive supercoil과 negative supercoil의 DNA를 이

완(relexation)시키며 이 과정에 있어서 ATP를 필요로 하지는 않는다. Topoisomerase II (Topo II)의 경우는 DNA 가닥이 nick된 다른 가닥을 통과할때 ATP를 필요로 하는데(Liu, 1989), Topo II는 동시에 DNA의 두가닥 모두가 절단되어 일시적인 통로를 형성한다음 이 통로를 통하여 다른 DNA가닥이 통과함으로써 DNA의 supercoiling을 제거한다(D'Arpa and Liu 1989).

이와같이 topoisomerase는 DNA의 대사에서 중요한 역할을 수행함으로 세포주기에 있어서 DNA의 대사가 활발한 상태에서 혹은 세포증식능이 왕성한 조직이나 세포에서 그 활성이 높을 것으로 예상된다. Topo I의 경우 mouse embryo fibroblast cell에서의 실험에서 증식할 때의 활성이 비증식할 때의 활성에 비해 4배가량 증가하는 것이 관찰되었다(Tricoli et al. 1985). 인간 암의 경우 colon adenocarcinoma나(Giovanella et al., 1989) 다른 악성종양(Potmesil et al. 1988)이 한창 진전된 상태의 경우 그 양이 과다하게 생산되지만 정상세포에서는 그렇지 않음이 보고되었다. 또한 Topo II 역시 활발히 자라는 세포에서 그 양이 증가된다고 알려져 있으며, 활성도는 cell cycle이나 증식상태에 따라 변화된다고 보고되었다(Hsiang et al. 1988). Topo II가 S-phase에서는 그 양이 급격히 증가하고 G1 phase에서는 감소하는 반면, Topo I은 S-phase에서는 그 양이 2배정도증가하고 분열하지 않는 세포에서도 존재한다고 보고되었다(Heck et al., 1988). 임상치료 시 이러한 Topo II 활성도의 변화는 다른 항암제를 투여하여 cell cycle이 저해되어 천천히 증식하는 암세포에는 그 효과가 떨어질 수 있다(Hecht et al., 1994). 반면 Topo I은 그 활성도가 상대적으로 일정하기 때문에 cell cycle이나 growth rate의 변화에도 불구하고 천천히 증식하는 암세포의 좋은 target이 될 수 있다(Hsiang et al., 1988).

세포독성이 강한 임상치료물질인 doxorubicin과 etoposide같은 epipodophyllotoxin은 topoisomerase을 저해한다고 밝혀졌는데 지금까지 발견된 대표적인 진핵세포의 Topo II저해제로는 coumermycin A1(coumarin 계), m-AMSA(acridine계), 5-iminodaunorubicin(anthracycline계), ellipticines, epipodophyllo toxin계 물질들이 있으며 bacterial gyrase inhibitor로는 novobiocin, nalidixic acid 등이 있다(Andoh et al. 1991).

Topo I의 저해제는 Topo II의 저해제에 비해 발견된 것이 훨씬 적는데 camptothecin(CAM, NSC 94600)이 대표적인 저해제이다. Camptothecin은 식물 *Camptothecin acuminata* 에서 1966년에 처음 분리된 alkaloid로서 (Wall et al., 1966) colon, gastric adenocarcinoma 등 소화기암에 유효하다 (Wall et al., 1966; Perdue et al.,1970). 1970년대 초기에는 camptothecin sodium salt로 1, 2차 임상시험을 진행하였으나(Moertel et al., 1972) 본격적인 관심은 1985년 Hsiang 등에 의해 포유동물의 topoisomerase I의 저해기작이 있다고 밝혀지면서이다(Hsinag et al., 1985; Hsiang and Liu, 1988). 이 물질의 세포에 대한 작용효과는 DNA 및 RNA 합성을 저해하고 DNA의 절편화를 유도한다(Fig. 3-7-1). 또한 camptothecin은 세포의 특정시기에 작용을 나타내는데 세포주기중 S phase에 해당하는 세포에 더 효과적인 작용을 하는 것으로 보고되어 있다(Bino, 1991). 그러나 물질 자체는 DNA와 상호작용을 하지 않으며 topoisomerase I에 의한 DNA cleavage를 유도하게 된다. 즉 camptothecin은 DNA와 topoisomerase 간에 형성되는 일시적인 enzyme-DNA complex(cleavable complex)에 결합을 하고(Hsinag et al. 1985, Hertzberg et al. 1989), 이 결합 자체를 안정화시키기 때문에 세포독성을 나타내며 그 기작 중에 하나는 그림 3-7-1에 도식한 바와 같이 DNA 복제 과정에서 replication fork의 이동이

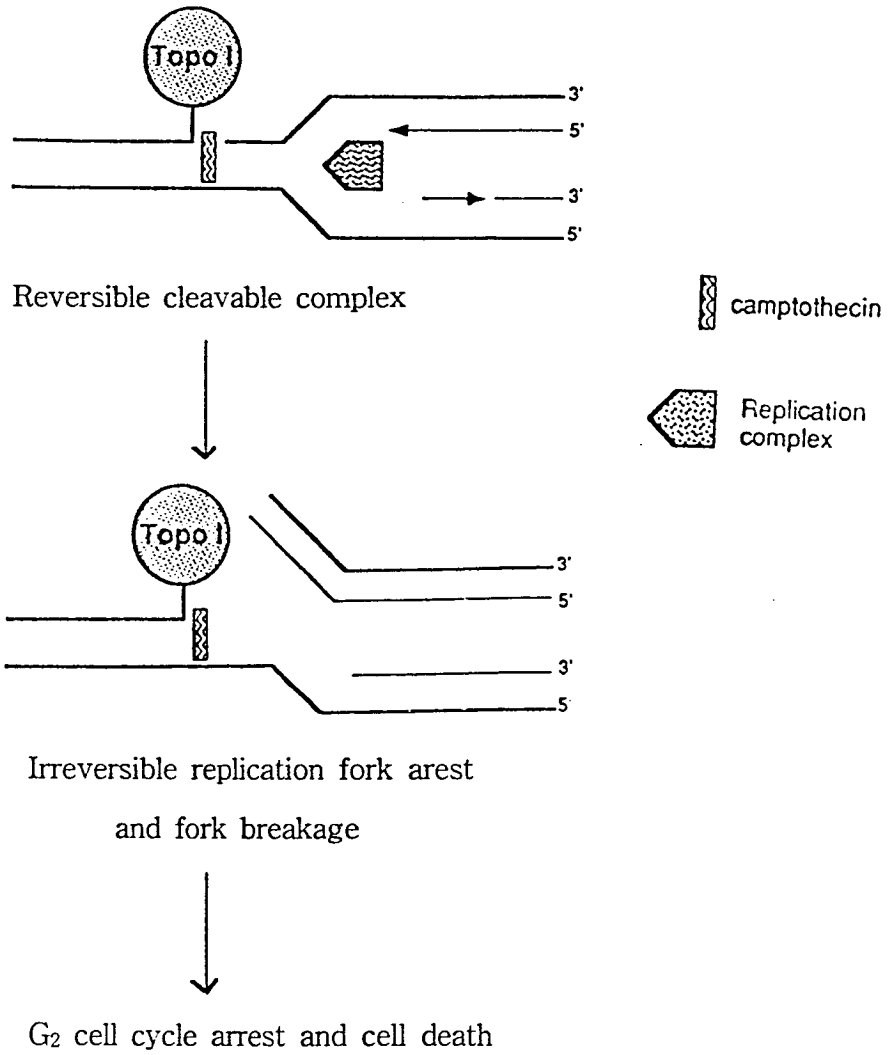
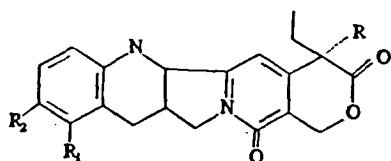
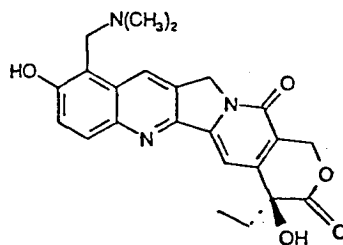


Fig. 3-7-1. Mechanism of cell killing by camptothecin.

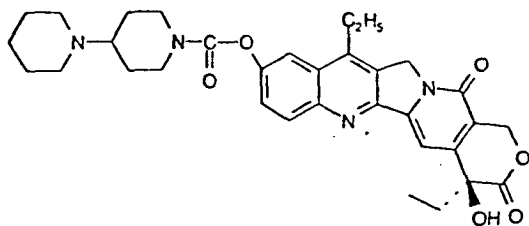
camptothecin에 의해 안정화 된 cleavable complex와 충돌함으로써 DNA의 절편화를 초래하는 것으로 알려져 있다(Hsiang et al. 1989). 1980년말에 들어와서 Topo I 저해제 개발연구가 활발해 지면서 그동안 유일한 저해물질로 알려진 Camptothecin에 대한 관심도가 급증하였으며 아울러 그 유도체의 개발에 관심을 기울이게 되어 erbstatin, tyrphostin 유도체, intoplicine, naphthacenecarboxamide 유도체 등 새로운 물질들이 지속적으로 발견되고 있다. 1991년에는 "International Symposium of DNA Topoisomereses in Chemotherapy" 가 개최될 정도로 topo에 대한 분자생물학적 연구에도 많은 진전이 있었다(Andoh et al., 1991). Topo I의 구조에 대한 연구, Topo I과 DNA간의 상호결합에 대한 연구의 진전이 생긴다면 앞으로 이 효소의 저해물질을 디자인하는 것도 가능해질 것으로 기대된다. 지금까지 밝혀진 Topo I의 특성 및 camptothecin의 작용기작을 기반으로 여러 연구진에서 assay system을 구축하여 동식물, 미생물을 대상으로 스크리닝하여왔거나(Bae et al., 1993; Hecht et al., 1994) 많은 유도체들이 발견 또는 합성되어왔다(Potmesil and Pinedo, 1995). 그동안 Topo I의 유도체로 개발된 물질 중 topotecan (NSC 609699), 9-amino-20-(S)-camptothecin (9-AC, NSC 603071), CPT-II (irinotecan) 등은 phase II 시험이 종료된 상태로 adriamycin 이래 우수한 항암제로 평가받고 있다(Andoh et al. 1994; Potmesil and Pinedo, 1995). 이외에 지금까지 발견된 topoisomerase 저해제 중에서 preclinical system에서도 활성능이 우수하다고 평가된 물질들은 DU-6596, DU-6888 같은 camptothecin 유도체와 etopophos, NK-611 같은 etoposide 계열물질 외에도 amonafide, azatoxin, clerocidin, datelliptium, psorex, sobuzoxane 등이 있으며(Dunn, 1994) 그 구조식은 그림 3-7-2에 요약하였다.



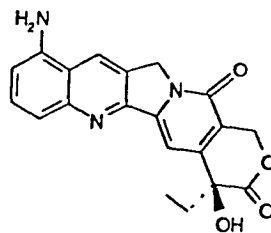
Camptothecin



Topotecan

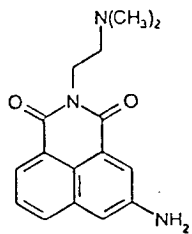


Irinotecan(CPT-II)

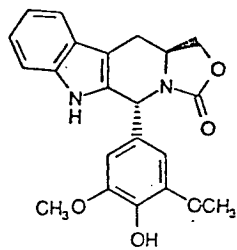


9-amino-20S-camptothecin

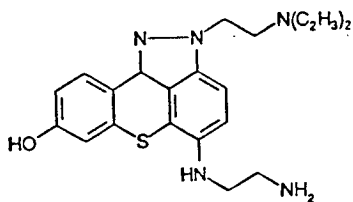
Figure 3-7-2. Chemical structure of topoisomerase inhibitors.



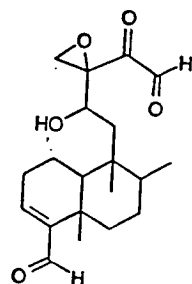
Amonafide



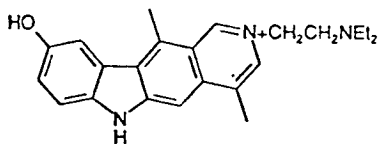
Azatoxin



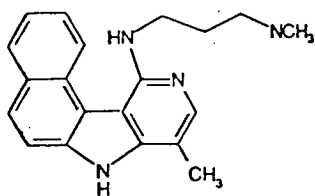
CI-958



Clerocidin

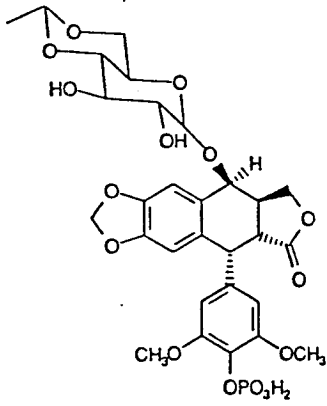


Datelliptium

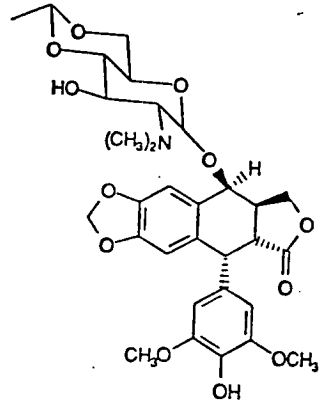


Intopicine

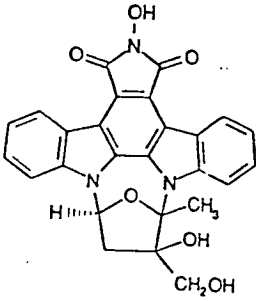
Figure 3-7-2. Continued.



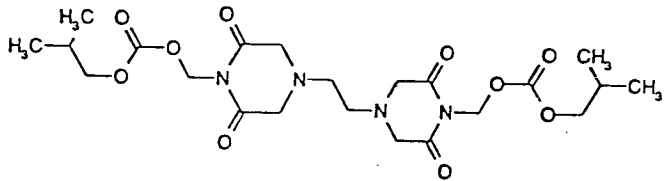
Etopophos



NK-611



KT6528



Sobuzoxane

Figure 3-7-2. Continued.

Camptothecin은 고행암에 대한 항암활성 등으로 관심을 끌어 왔으나 독성 문제로 약으로 개발되지 못했지만 Topo I저해기작이 밝혀짐에 따라 독성 문제를 해결할 수 있는 유도체의 개발이 활발하게 진행되어 왔다(Potmesil and Pinedo, 1995). 현재 임상단계에 있는 유도체들은 camptothecin의 A와 B링을 치환하여 반합성한 물질들이 대부분이다. 임상2/3 단계에 있는 topo I 저해제인 topotecan(SKf 104864)은 수용성으로 폐암이나 난소암 같은 고행암에 약효가 우수하다고 밝혀진 9-(dimethylamino)methyl-10-hydroxy camptothecin 으로 irinotecan보다 약효는 우수하지 않으나 독성이 적다고 밝혀졌다. Irinotecan (CPT-II)은 topo I 저해제로 수용성물질이며 일본에서 Yacult회사가 개발하여 Daiichi와 함께 미국에서 임상 2단계를 거쳤다. 활성형은 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38)로 약에 대한 내성이 강한 직장암과 경부암에 효과가 좋으며 현재 Upjohn에서 개발 및 판매에 관한 모든 권한을 갖고 있다. 식물성 알칼로이드인 20(S)-camptothecin의 유도체인 9-nitro-20(S)-camptothecin (9NC)와 9-amino-20(S)-camptothecin (9AC)는 여러종류의 human xenograft tumour에 대하여 저해효과가 있다고 밝혀졌다. Camptothecin의 4-aminomethyl analogue인 DU-6596과 DU-6888이 인체 gastric adenocarcinoma에 대해 항암효과가 우수하다고 밝혀졌다.

Topo II의 경우 많은 intercalate 약물들의 표적이 되고 있는데 이미 시판 중인 antracycline, anthracenedione, acridine, actinomycin 및 ellipticine계 항암제들이 Topo II저해효과가 있다고 보고되었지만 약물과 효소와의 상호작용은 완전히 규명되지는 못하였다. Amonafide는 Topo II저해제로 유방암에 대하여 임상 2단계 시험중이다. Azatoxin(NSC 640737)은 Topo II저해제로 합성된 물질로 NCI에서 45가지의 인체 암세포주에 대하여 in vitro 시험 결과 세포독성능이 우수한 물질로 판명되었는데, 이 때 세포주

의 감수도는 Topo II 의 저해제보다 tubule 저해제와 더 상관관계가 높음이 밝혀졌다. 즉 azatoxicn은 topo II를 저해할 수 있는 농도보다 훨씬 낮은 농도에서 tubulin polymerization을 저해하여 결과적으로 세포분열을 저해한다. 합성물질인 4-0-butanoyl-4' demethyl-podophyllotoxin (BN 58705)은 통상적으로 사용하는 약물에 대하여 내성이 있거나 또는 민감한 여러종류의 인체암세포에 대하여 세포독성능을 나타내며, 독성농도가 doxorubicin이나 cisplatin보다 100분의 1 에서 1000분의 1 정도 낮다. 이 물질은 DNA의 절편화를 초래하지는 않으나 vinca alkaloid처럼 체세포분열시기에 저해작용을 나타낸다고 알려졌다. 임상초기단계에 있는 CI-958은 benzothiopyranoindazole로 mitoxantrone과 유사한 DNA intercalator이다. Clerocidin은 미생물 유래의 terpenoid로 Topo II 저해효과가 있는데 DNA에 붙거나 intercalate하지 않아서 상대적으로 독성이 낮은 물질로 현재 전임상단계에 있다. Datelliptium은 ellipticine유도체의 하나인 Topo II 저해물질로 임상2단계 시험에서 유방암치료에 효과가 우수함을 나타냈다. Topo I과 Topo II의 저해제인 intoplicine(RPR)은 유럽에서는 임상초기단계에 있다. Etoposide 유도체로 임상단계에 있는 물질로는 Bristol-Meyers Squibb에서 개발하여 현재 임상2단계에 있는 etopophos와 Nippon Kayaku에서 개발하여 임상2단계에 있는 NK-611이 있다. Kyowa Hakko Kogyo에서 indolocarbazole계열의 항생제 K252a로 부터 합성한 KT 6006과 KT6528은 Topo I 저해효과가 있는데 KT6528은 DNA를 intercalate하는데 protein kinase C를 저해하기도하여 세포주기에 다른 영향을 미친다. 현재 전임상단계에 있다. Soburaxane은 Topo II의 저해제인데 절단된 DNA를 안정화시키거나 핵산에 결합하거나 하지않아 상대적으로 낮은 독성을 보이는데 성인 백혈병이나 non-Hodgkin's lymphoma에 대하여 활성이 좋으며 현재 일본에서는 임상시험 중이다. Pedophyllotoxin의 유도체인 GL-331,

GP-II의 경우도 Topo II에 대한 저해능이 있는 물질로 현재 임상단계에 있다. 지금까지 언급한 물질들은 임상단계에 있는 물질들로 주로 합성된 유도체들이다. 독성이 적고 작용기작이 기존에 밝혀진 물질과는 다른 저해제들을 찾기위해 여러 연구진들이 동식물, 미생물을 대상으로 탐색작업을 진행하고 있다. *Sanguisorba officinalis*에서 분리한 ellagitannin의 일종인 sanguin H-6은 HeLa Topo I과 Topo II를 저해하는데 IC50는 각각 5 μ M과 10 μ M이며 HeLa cell에 대한 ED50는 12 μ M이다. Andoh그룹이 *Flexibacter topostinus* sp. nov.로부터 분리한 topostin은 Topo I 저해제로 topostin A1, A2, B의 유도체가 있으며 specific activity는 각각 16,000u/mg 와 20,000u/mg이다. 분자량 553 정도의 물질로 DNA와 결합하지 않고 topo와 결합하여 효소의 촉매작용을 저해한다. 해면에서 분리한 xestoquinone(XTQ)과 halenaquinone (HNQ)의 경우 쥐의 leukemia cell L1210에서 분리한 Topo I에 대한 저해효과가 있음이 밝혀졌다(Bae et. al., 1993). Hoechst에서 개발한 Ho33342의 경우 camptothecin에 대하여 내성이 높은 암에 대하여도 효과가 좋은데 CPT-K5세포와 MDRI가 과다 발현되는 KB V1 세포에 대하여도 세포독성이 낮아 주목을 받고 있다. Camptothecin에 대하여 내성이 강한 돌연변이형 Topo I의 경우 G363C, D53G, N722S 및 T729A(인체암), G505S(DC3F/C-10 cell)의 부위가 효소의 촉매작용에 절대적으로 중요한 부위로 camptothecin와 결합하는 부위라고 추정할 수 있다(Gupa et al, 1988). 앞으로도 독성이 없고 camptothecin에 대한 내성형 Topo I의 저해제를 계속 발견하기 위해서는 저항성의 Topo I의 기작, 특히 효소의 반응부위와 Topo I 유전자에 대한 연구가 진행이 되고 이를 기초로 적합한 탐색방법의 구축, 다양한 생물자원을 대상으로 스크리닝을 통한 선도물질 개발, 유도체 합성, 약효검색, 전임상단계의 실험 등의 분야에서 각각 발전이 있어야 한 것이다.

제 4 장 결 론

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

해수, 해양저질층, 어류와 저서동물의 내장, 남극시료 등에서 분리한 세균 5,000주와 해양방선균, 극지방방선균을 포함한 방선균 5,000주를 확보하여 -80 °C에 보존하였다. 러시아의 오흐츠크해역, 태평양 심해저, 남극, Palau 해역 등에서 채취한 시료에서 분리한 세균도 동일한 방법으로 보존하였다. 3차년도에는 해양세균 1,000여주와 방선균 700여주를 배양하여 그 배양액은 유기용매로 추출하여 시료를 조제하여 생리활성능을 조사하였다.

생리활성 검색방법으로는 mouse spleen의 lymphocyte에 대한 세포독성능 조사, mouse erythrocyte에 대한 haemolytic activity조사 DLD-1(human colon)와 p388 세포를 대상으로한 세포독성능을 1차적으로 조사하였다. Herpes simplex virus (HSV-1, HSV-2)에 대한 항바이러스 효과도 조사하였다. 항종양 검색체계를 이용하여 5,000여 시료를 처리하고 세포독성을 나타낸 것 중 Topoisomerase I 저해효과를 나타내는 물질을 선별하였다. 암세포에 대하여 세포독성능을 나타낸 시료 중 mouse lymphocyte에 대하여 독성이 적고 mouse erythrocyte에 대하여 haemolytic activity를 나타내지 않은 시료를 선별하였는데 균주 8095A, 8265, 8273A, 8273, 7499, 8301, 7914, 8072A, 8321, 7798가 선별되었다. 물질을 분리 정제하여 구조분석을

한 결과 균주중 8095A가 valinomycin을 생산하고 있음이 밝혀졌는데 균주 8095A의 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 *Streptomyces* sp. 라고 동정되었다. 현재 순수 분리 및 구조분석중인 시료는 Topo I 저해효과가 있는 방선균 AF-1, 해양방선균 8441, 8032B, 7798와 세포독성능이 강한 남극방선균 8273A, 8273 균주 등으로 생리활성성분은 hemolytic activity가 없으며 actinomycin계열의 물질이 아니라고 분석되었다.

신물질 여부를 신속히 판단하기위한 자료를 구축하고자 1차년도에는 해양미생물의 대사물질 및 항바이러스성 해양유래 생리활성물질에 대한 자료 수집, 정리하였으며(한국해양연구소, 1993b) 2차년도에는 해양생물유래 생리활성물질 중 세포독성능이 강하며 항암효과가 있는 대표적인 물질 200여 가지에 대하여 생물의 종류, 물질의 구조상의 특징 및 생리활성도에 따라 분류하였고 대표적인 물질에 관해서는 분리방법, 구조적 특징, 생리활성도, 전합성 및 생합성, 산업적 이용 방안 등에 대한 자료를 정리하였다(한국해양연구소, 1994). 생리활성물질에 대한 신물질 여부의 결정과 신물질인 경우 기존물질과의 구조적 유사성을 측정하기 위하여 chemical abstracts에 직접 접근이 가능한 STN express software를 도입하여 이용하고 있다. 또한 미국 Scripps 해양연구소의 Fenical group과의 연계하여 그들이 보유하고 있는 보다 광범위한 Database를 통한 간접 search망 또한 이용이 가능하게 되었다.

해양미생물로부터 생리활성선도물질을 발견하기 위해서는 위의 선별 균주의 생산물질의 분리 정제 및 구조분석 작업이 계속 이루어져야 하며 새로 부닐한 균주에 대하여도 지속적인 탐색작업이 요구된다.

제 5 장 참 고 문 헌

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

한국해양연구소. 1992. 생리활성물질 탐색을 위한 방선균의 분리,분류 및 보전체계 확립에 관한 연구. BSPE 00244-443-7.

한국해양연구소. 1993a. 호염성 방선균의 특성에 관한 연구. BSPE 00310-587-3.

한국해양연구소. 1993b. 해양미생물을 이용한 생리활성 선도물질 탐색기술개발(I). BSPN 00219-620-3. 과학기술처.

한국해양연구소. 1994. 해양미생물을 이용한 생리활성 선도물질 탐색기술개발(II). BSPN 00248-750-3. 과학기술처.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1989. Molecular biology of the cell. second ed. pp236-239. Gerland Publishing. New York.

Andoh, T., H. Ikeda, and M. Oguro. 1991. Molecular biology of DNA topoisomerases and its application to chemotherapy - Prodeedings of the International Symposium on DNA Topoisomerases in

- Chemotherapy, Nagoya, Japan, November 18-20, 1991. CRC Press, Boca Raton.
- Bae, M.-A. et al. 1993. Inhibition of mammalian topoisomerase I by xestoquinone and halenaquinone. *Biosc. Biotech. Biochem.* **57**(2): 330-331.
- Bino, G. D., P. Lassota, and Z. Darzynkiewicz. 1991. The S-phase cytotoxicity of camptothecin. *Experimental Cell Research*, **193**:27-35.
- Brockmann, H. and G. Schmidt-Kastner. 1955. *Chem. Ber.*, **88**: 57.
- Cross, T. 1989. Growth and examination of Actinomycetes—some guidelines. In S. J. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology* vol. 4. eds. pp 2340-2343.
- D'Arpa, P. and L. F. Liu. 1989. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochem. et Biophys. Acta*, **989**, 163-177.
- Dory, Y. L., J. M. Mellor, and J. F. McAleer. 1989. *Tetrahedron Lett.*, **30**:1695.
- Dunn, C. D. R. 1994. *Scripts 1994 review of cancer chemotherapy*. Chap.

4. New hopes in cancer chemotherapy. PJB Publications Ltd. pp. 129-209.

Easwaran, K. R. K. 1985. *Met. Ions Biol. Syst.*, **19**:109.

Giovanella, B. C., J. S. Stehlin, M. E. Wall, M. C. Wani, A. W. Nicholas, L. F. Liu, R. Silber, and M. Potmesil. 1989. DNA topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science*, **246**:1046.

Gupta. R. S., Gupta. R., et al. 1988. Camptothecin-resistant mutants of chinese hamster ovary cells containing a resistant form of topoisomerase I. *Cancer Res.* **48**:6404-6410.

Hecht, S. M., D. E. Berry, L. J. Mackenzie, E. A. Shultis, and J. A. Chan. 1994. A strategy for identifying novel inhibitors of DNA topoisomerase I. *In* F. A. Valeriote, T. H. Corbett, L. H. Baker(eds.), *Anticancer drug discovery and development: natural products and new molecular models*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Heck, M. M., W. N. Hittelman, and W. C. Earnshaw. 1988. Differential expression of DNA topoisomerase I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**:1086-1090.

Heisey, R. M. et al. 1987. Production of herbicidal and insecticidal metabolites by soil microorganisms. *In* G. C. Horace (ed.), *Biologically active compounds.* pp 65-78.

Hertzberg. R. P., M. J. Caranfa., and S. M. Hecht. 1989. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: Evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry.* **28**:4629-4638.

Hsiang, Y-H., R. Hetsberg, S. Hecht, L. F. Liu. 1985. Camptothecin induced protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**:14873-14878.

Hsiang. Y-H., M. G. Lihou. and L. F. Liu. 1989. Arrest of replication forks by Drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* **49**:5077-5082.

Hsiang. Y-H. and L. F. Liu. 1988. Identification of mammalian topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res.* **48**:1722.

Hsiang. Y-H., H. Y. Wu, and L. F. Liu. 1988. Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Res.* **48**:3230-3235.

- 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., B. R. Copp, M. P. Foster, L. A. McDonald, D. C. Radisky, and J. C. Swersey. 1993. Biomedical potential of marine natural products. *In*: D. H. Attaway and O. R. Zaborsky (ed.), *Marine Biotechnology* vol. I. pharmaceutical and bioactive natural products. Plenum Press. New York. pp 1-44.
- Lechevalier, H. A. 1989. A practical guide to generic identification of Actinomycetes. *In* S. J. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology* vol. 4. pp 2344-2347.
- Liu, L. F. 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 351-375.
- Locci, R. 1989. Streptomyces and related genera. *In* S. J. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. vol 4. 1989. pp 2451-2492.
- Moertel, C. G., A. J. Schutt, R. J. Reitmeier, and R. G. Hahn. 1972. Phase II study of camptothecin(NSC-100880) in the treatment of

advanced gastrointestinal cancer, *Cancer Chemother. Rep.* **56**:95.

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. Rossmore (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.

Perdue, R. E., R. L. Jr. Smith, M. E. Wall, J. L. Hartwell, and B. J. Abbott. 1970. *Camptotheca acuminata* Decaisne (*Nyssaceae*), source of camptothecin, an antileukemic alkaloid, Technical bulletin, No. 1415, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, D.C.

Potmesil, M., Y. H. Hsiang, L. F. Liu, B. Bank, H. Grossberg, S. Kirschenbaum, T. J. Forlenzer, A. Penziner, D. Kangnis, D. Knowles, F. Traganos, and R. Silber. 1988. Resistance of human

leukemia and normal lymphocytes to drug-induced DNA cleavage and low levels of DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* **48**:3537.

Potmesil, M. and H. Pinedo. 1995. Camptothecins: new anticancer agents. CRC Press.

Pressman, B. C., E. J. Harris, W. S. Jagger, and J. H. Johnson. 1967. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**:1949.

Reid, R. T., D. H. Live, D. J. Faulkner, and A. Butler. 1993. *Nature*, **366**:455.

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.

Schmitz, F. J., B. F. Bowden, and S. I. Toch. 1993. Antitumor and

- cytotoxic compounds from marine organisms. *In*: D. H. Attaway and O. R. Zaborsky (ed.), *Marine Biotechnology* vol. I. pharmaceutical and bioactive natural products. Plenum Press. New York. pp 197-308.
- Shemyakin, M. M., N. A. Aldanova, E. I. Vinogradova, and M. Y. Feigina. 1963. *Tetrahedron Lett.*, 1921.
- Silverman, R. B. 1992. The organic chemistry of drug design and drug action. Academic Press. pp 220-276.
- Tricoli. J. V., Sahai. B. M., et al. 1985. DNA topoisomerase I and II activities during cell proliferation and the cell cycle in cultured mouse embryo fibroblast(C3H 10T1/2) cells. *Experimental Cell Res.* **158**:1-14.
- Turnes, S., M. E. Hay, W. Fenical. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus, *Science*, **240**:116-118.
- Wall, M. E., M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, and G. A. Sim. 1966. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloid leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **88**:3888.

Ward, J. B. 1990. Cell Wall Structure and Function, *In* C. Hansch, P. G. Sammes, and J. B. Taylor (eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. II. pp 598.

제 6 장 위탁연구과제

최종보고서

연구과제명: 항바이러스 약효검색

연구기간: 1994. 10. 1 - 1995. 7. 31

연구기관명: 한국화학연구소

스크리닝부

연구책임자 : 이 종교

연구원 : 김 지현

김 해수

피 미경

요 약 문

I. 제목

항바이러스 약효검색

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양미생물로 부터 부작용이 적고 지속적인 치유효과를 가지는 항바이러스물질을 발견함을 목적으로 한다. 대량검색이 가능한 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 일차로 조사하고, 독성이 적으면서도 항바이러스효과를 나타내는 시료에 대해서는 cytomegalovirus와 varicella-zoster virus에 대한 약효를 조사하여 광범위 herpes치료물질을 발견함을 최우선으로 한다. 미생물은 짧은 시간에 다양한 시료를 제공할 수 있고 물질분리가 용이하며, 대량생산가능성이 높다는 장점들을 가진다. 이는 아직까지 개발된 치료제 수가 많지 않으며, 부작용이 적으면서 치료효과가 뛰어난 약은 거의 없는 바이러스치료제개발연구에 큰 공헌을 하리라 여겨진다. 특히 항바이러스 대량 약효검색이 비교적 최근에서야 가능하여졌으므로 해양미생물에 대한 항바이러스제 개발연구는 국제경쟁력이 크다하겠고, 우리 자원의 생리활성물질보유여부에 대한 정보축적이란 점에서도 의의가 크다하겠다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

해양미생물로부터 분리된 물질들을 가지고 세포배양체계를 이용하여 일차로 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성을 함께 조사한다. 독성이 적으면서도 항바이러스효과가 큰 시료들은 추가로 varicella virus와 cytomegalovirus에 대한 약효를 검색하여 human herpesvirus에 대해 광범위 효과를 나타내는 물질을 발견하려한다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 관한 건의

방선균을 포함하여 새로이 총 34개의 해양미생물 균주에서 분리한 102개에 대한 시료들에 대한 항herpes simplex virus 약효검색이 일,이차년도에 이어 Vero세포체계에서 이루어졌다. Selectivity index가 그다지 높지는 않으나 독성이 적으면서도 herpes simplex virus type 1과 type 2에 약효를 나타내어 확인 실험이 요구되는 시료가 몇 개 발견되었다. 확인 실험으로서 좀더 정밀한 세포독성 검색과, cytomegalovirus와 varicella-zoster virus 등의 다른 herpesvirus 종류에 대한 약효검색을 수행이 요구된다. 그 결과에 의거하여 시료의 순수분리의 타당성이 결정되어야 하겠다. 한편, 좀 더 좋은 후보물질의 발견을 위하여 새로운 시료에 대한 지속적인 약효검색이 요구된다.

목 차

제 1 장	서론	105
제 2 장	연구추진방법	107
제 1 절	연구내용	107
제 2 절	실험재료 및 방법	109
제 3 장	연구결과 및 고찰	113
제 4 장	결론	120
제 5 장	참고문헌	121

제 1 장 서론

이제까지 공인된 바이러스질환 치료제는 주로 herpesvirus와 AIDS치료제이고 대부분이 바이러스 유전자 합성기작을 저해하는 핵산 유도체들이다.^(1,2,3) 최근에 바이러스 증식기작에 관한 새로운 지식과 정보 공급에 힘입어 바이러스 특이기작 저해를 목적으로 하는 물질 개발에 대한 시도가 많아졌고, 다른 구조와 기능을 가진 물질 개발에 대한 관심이 높아지고 있으나 아직도 대량 검색에 의한 새로운 물질 발견 가능성이 더 큰 편이고, 적합한 in vitro 약효검색법이 확립된 바이러스 질병에 대한 치료제 개발에 더 중점을 두고 있다.

사람에게 감염하는 human herpesvirus (HHV)는 현재 7가지가 알려져 있는데, 가장 최근에 밝혀진 HHV type 7 (HHV-7)^(4,5) 제외하고는 모두 다양한 질병을 유발하고 잠복감염력이 있다. 이들중 herpes simplex virus (HSV) type 1 (HSV-1)과 HSV type 2 (HSV-2)와 varicella-zoster virus (VZV)와 Epstein-Barr virus와 cytomegalovirus (CMV)는 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 cofactor일 가능성이 큰 것으로 알려져 있다.⁽⁸⁾ HHV-7은 HIV와 receptor를 함께 이용하여 HIV감염저해에 이용될 가능성도 조사되고 있다. 최근에 Kaposi's sarcoma에 걸린 AIDS 환자와 일반환자에게서 새로운 HHV로 추측되는 herpesvirus와 유사한 바이러스 DNA가 확인되어^(9,10) 이 질병의 원인균으로 추정되고 있다. 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-1과 HSV-2와 VZV감염에만 이용되고 있고 최근에 이들 바이러스에 의한 이차로 감염된 AIDS환자수의 급증으로 약물내성균주출현도 급증하고 있다. 그리고 CMV 치료제로 공인된 Foscarnet (phosphonoformic acid, sodium salt)나 Ganciclovir의 경우 독성 때문에 AIDS나 면역저하 환자에게만 치료하도록 허가되어 있고 치료 효과도 일시적일 뿐이다. 따라서 부작용이 적고 지속적인 치료효과를 지닌 물질의 발견이 시급하다. 미생물로 부터 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 생리활성물질보유정도에 대한 정보축적이란 점에서 의의가 크다 할 수 있겠다. 본 보고서에서는 해양미생물로 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 구입한 Vero세포 (African green monkey kidney cell) (ATCC CCL 81)를 사용하였다.

2. 바이러스

시험에 사용된 human herpesvirus들은 ATCC로부터 구입하였으며 다음과 같다.

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

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

3. 시험물질 및 표준약물

시험물질은 한국해양연구소에서 분리한 해양미생물 배양액의 추출물들이었다. 시료의 종류는 추출방법에 의하여 3가지 종류로 분류되었다 (그림1). 즉, 5 ml의 균 배양액을 원심분리하여 균침전물을 0.5 ml methyl alcohol (M-OH)에 녹인 것과 (시료이름으로 균주번호 뒤에 C 또는 M이라고 붙임), 상등액에 동량의 ethyl acetate (EA)를 첨가하여 물층과 EA층으로 분리하여서 물층은 그자체로서 (시료이름, W), EA층은 건조 시킨 후 0.5 ml M-OH에 녹인 것이다 (시료이름, 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.

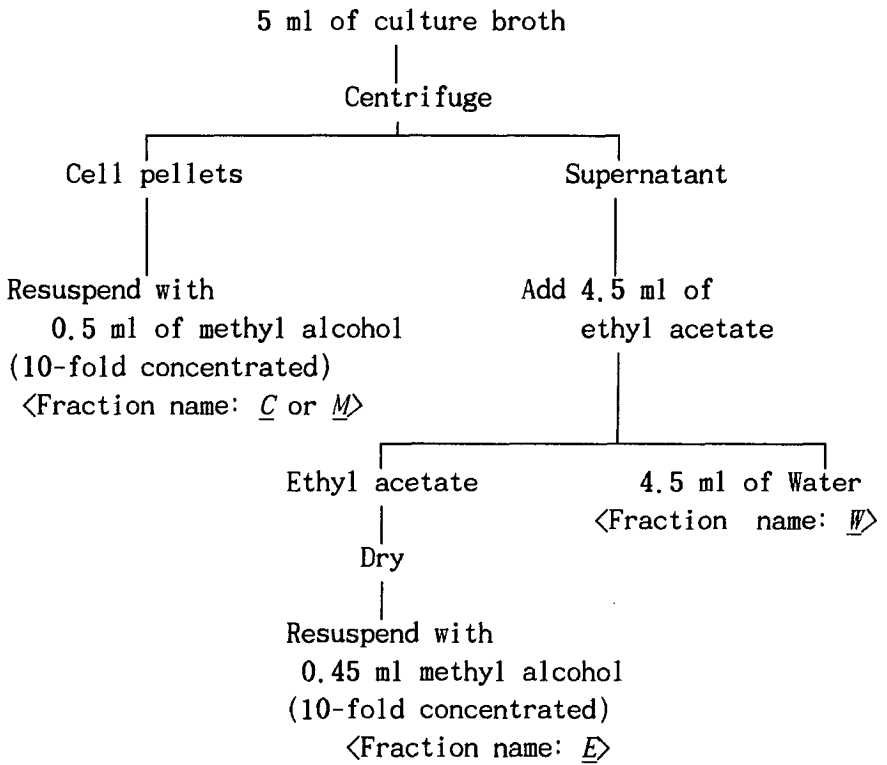


Fig. 6-1. Fractionation scheme of microbial culture broth and preparation of samples for antiviral testing

제 2 절 실험방법

1. 세포배양

Vero세포를 지름 10 cm petri dish에 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin (Gm) (Sigma)과 5%의 열처리된 fetal bovine serum (FBS) (Gibco)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle (DME) (Gibco)배지(DME/5 % FBS)로 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 증식시켰다. 접종 후 3 - 4 일이 지나 세포단층이 형성되면 trypsin처리를 하여 세포를 1:4로 쪼개어 계대하였다.

2. 바이러스의 증식

HSV-1과 HSV-2를 Vero세포에서 증식시켰다. 즉, T75-flask (배양면적 75 cm²)에 Vero세포단층이 형성되면 배양액을 제거하고, 바이러스를 DME/2 % FBS 에 희석하여 1.5 ml 바이러스 희석액에 세포 한개마다 0.1 M.O.I (multiplicity of infection)가 되도록 접종하였다. 37 °C, CO₂ 배양기에서 1 시간 동안 흡착시킨 다음 배양액을 제거하므로써 세포에 흡착되지 못한 바이러스들을 제거하였다. DME/2 % FBS 를 6 ml 첨가한 다음 70 %의 세포가 CPE (cytopathic effect) 를 나타낼 때까지 계속 배양하였다. 세포와 배양액을 회수하여 시험관에 넣은 다음, -70 °C에서 얼리고 37 °C에서 녹이는 작업을 삼회 거

친 후 4 °C, 5000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상등액을 소량 씩 용기에 분주한 후 -70 °C에 바이러스 종균액으로 보관하고 실험에 이용되기 직전에 바이러스를 37°C에서 신속히 녹여 사용하였다.

3. 바이러스 역가측정

바이러스종균액의 역가를 알기위하여 DME/2% FBS 배양액으로 1:10으로 연속희석한 다음 Vero 세포의 완전한 단층이 형성된 96-well plate에 well당 100 ul씩 접종하였다. 한 시간 동안 배양한 다음 흡착되지 못한 바이러스액은 제거하였다. 새로이 100 ul 배양액을 첨가하고, 3일간 37 °C CO₂ 배양기에서 배양하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromide)방법 (실험 방법, 5항 참조)을 이용하여 바이러스역가를 측정하였다.

4. 항herpes simplex virus 약효검색

약효검색은 virus-induced cytopathic effect (CPE) 저해법을 이용하였다. 즉, 바이러스접종 3일 전에 96-well plate에 Vero세포를 준비하여 세포단층이 형성되도록 하고, DME/2 % FBS 배양액으로 희석된 바이러스를 각 well에 접종량이 100 CCID₅₀ (50% cell culture inhibitory dose)가 되도록 100 μl씩 접종하였다. 한시간 동안 37°C에서 흡착시킨 다음, 배양액을 제거하였다. 각 농도로 희석된 약물을 duplicate로 각 well에 100 ul씩 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 결

정하였다. 약효평가지 약물의 독성에 의한 영향을 알 수 있도록 바이러스 접종시 바이러스가 첨가되지 않은 100 ul 배양액이 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 CC_{50} (50% cytotoxic concentration)로 결정하였다.

5. MTT검색법

이 검색법은 살아남은 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 노란색을 띠는 MTT를 보라색을 띠는 formazan으로 환원시키고, 이 생성물을 유기용매로 녹여 흡광도를 측정하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 상대적으로 비교하는 것이다.⁽¹¹⁾ 배양이 끝난 Vero세포의 배양액을 제거하고 DME/2% FBS에 3 mg/ml로 희석된 MTT (Sigma) 액을 96-well plate의 well당 50 ul씩 넣어준 후 37°C CO₂ 배양기에서 두시간 동안 배양하였다. 산성화된 isopropanol/6% triton X-100액을 100 ul 씩 각 well에 넣어준 후 교반기를 이용하여서 formazan결정들이 완전히 녹도록 하였다. Microplate reader (Vmax, Molecular Devices)를 이용하여 540 nm와 690 nm에서의 흡광도를 읽었다. A_{540} 과 A_{690} 의 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 EC_{50} 와 세포독성 값으로 부터 CC_{50} 를 구한 후 selectivity index (SI) (CC_{50}/EC_{50}) 를 구하였다.

제 3 장 연구결과 및 고찰

총 34개 균주에서 분리된 102개 시료에 대한 항HSV-1과 항HSV-2약 효검색이 수행되었다. 실험재료 및 방법의 그림 1에 기술한 바와 같이 조성을 알 수 없는 다양한 물질을 함유하고 있는 해양미생물 배양액을 일차 추출하는 과정 (실험재료 3항 그림 6-1 참조)에서 파생된 시료들이 검색의 되었는데, 3가지 종류로 분류되었다: 1) 균체시료. 즉, 5 ml의 균 배양액을 원심분리하여 균침전물을 0.5 ml methyl alcohol (M-OH)에 녹인 것 (시료이름으로 균주번호 뒤에 C 또는 M이라고 붙임)으로 원액에 비하여 10 배 농축되었다; 2) 균체가 제거된 상등액을 ethyl acetate (EA)로 추출할 때 분리되는 물층시료 (시료이름, W). 즉, 상등액에 동량의 EA를 첨가하여 분리된 물층; 3) 균체가 제거된 상등액을 EA로 추출할 때 분리되는 EA층 시료 (시료이름, E)로서 분리한 EA층을 건조 시킨 후 0.5 ml M-OH에 녹인 것으로, 원액에 비하여 10 배 농축되었다. 짧은 시간에 가급적 많은 시료를 검색하기 위하여 일차검색으로 각 시료를 5%, 1.67 %, 0.59%의 세가지 농도로 희석하여, 실험방법 4항과 5항에 설명한 것과 같이 항HSV-1과 항HSV-2약효를 duplicate로 실험하였고, mock-infected (바이러스는 첨가하지 않고 약물만 첨가)도 병행하여 약물의 세포독성에 의한 항바이러스약효에의 영향도 함께 관찰하였다. 약물에 의한 항바이러스 효과가 10 % 이상이면 미약한 효과가 있는 것으로 판정하였고, 50% 이상일 경우에는 EC₅₀값을 구하였다. HSV-1과 HSV-2에 모두 효과를 나타낼 경우에는 가급적 재실험을 하였고, 가장 낮은 농도에서도 나타난 독성 때문에 약효를 판독하기 어려운 경우에는 시험농도를 더 낮추어 다시 실험하였다. 의뢰된 시료들의 약효 및 독성을 간략히 표 1에 요약하였다. 약물의 독

성은 주로 fraction (Fr) E, Fr M (또는 C) 순서로 관찰되었으며, Fr W에서는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 관찰된 독성은 성장이 끝난 세포를 죽이는 작용 (cytotoxic effect)이므로 분열하거나 성장하는 세포에 끼치는 독성 (cytostatic effect)에 비해 대체적으로 미약하게 나타나므로, 약효확인 실험에는 별도의 실험을 통하여 cytostatic effect가 조사 되어야 하겠다. 항바이러스약효는 대부분의 시료에서 관찰되지 않았다. 그러나 비특 selectivity index는 높지 않으나 시료 5826 Fr E (표 6-2, 그림 6-2 참조)와 5841 Fr E와 Fr M (표 6-3, 그림 6-3 참조) 등에서 확인실험이 요구될 정도의 약효가 관찰되었다. 한단계 더 순수분리된 시료들에 대한 약효검색과 아울러 정밀한 세포독성시험이나 항CMV나 항VZV약효평가가 실험이 요구된다. 아울러 개발가치가 있는 물질을 발견하기 위하여 지속적인 약효검색연구가 이루어져야 하겠다.

Table 6-1. Summary of anti-herpes simplex virus activity in Vero cell culture system.

Name	Fraction E			Fraction C or M			Fraction W		
	CT (%)	AV (%)		CT (%)	AV (%)		CT (%)	AV (%)	
	Mock	HSV1	HSV2	Mock	HSV1	HSV2	Mock	HSV1	HSV2
4242	0.05	*	*	0.24	*	*	>5	NA	NA
4293	0.04	*	*	0.21	*	NA	>5	NA	NA
4308	>5	***	NA	3.24	***	*	>5	NA	NA
4347	5-1.7	NA	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
4398	0.05	**	*	0.37	***	*	1.07	**	*
4437	0.03	NA	NA	0.27	*	*	>5	*	NA
4454	0.34	**	NA	1.37	*	NA	>5	NA	NA
4456	>5	*	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
4835	<0.05	*	*	0.6	*	NA	>5	NA	NA
5047	0.05	*	*	0.42	*	*	>5	NA	NA
5065	2.9	NA	NA	3.01	*	*	2.87	NA	NA
5369	>5	NA	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
5503	<0.02	CT	CT	0.56	NA	*	>5	NA	NA
5826	2.23	***	**	>5	**	NA	>5	*	NA
5841	3.3	***	**	>5	**	*	>5	NA	NA
5854	>5	NA	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
5943	1.7-5	NA	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
6003	>5	NA	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
6008	>5	**	NA	>5	**	NA	>5	NA	NA
6009	>5	NA	NA	>5	NA	NA	>5	*	NA
6020	>5	*	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
6022	>5	NA	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
6102	>5	NA	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
6137	>5	**	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
6173	>5	*	NA	>5	NA	NA	>5	NA	NA
6199	0.13	NA	NA	>5	*	NA	>5	*	NA
6205	0.2	*	*	>5	*	NA	5	*	*
6222	0.11	*	NA	1.16	*	*	>5	*	NA
6237	0.04	NA	*	>5	NA	NA	>5	NA	NA
6255	0.013	*	*	>0.2	NA	NA	>5	NA	NA
6269	2.19	**	**	>5	NA	NA	>5	*	NA
6336	>5	**	NA	>5	*	NA	>5	NA	NA
6343A	<0.02	CT	CT	2.81	NA	*	>5	NA	NA
6345	0.05	*	*	<0.6	*	*	>5	**	NA

CT (%): Cytotoxicity caused by the sample itself

The data represent the % concentration at which 50 % cytotoxicity observed

>5: up to 5%, less than 50% cytotoxicity observed.

<0.6: down to 0.6%, higher than 50% cytotoxicity observed.

AV (%): antiviral activity (AV) measured by using CPE inhibition method .

NA: no antiviral activity observed

*: higher than 10% AV observed at one among the tested concentrations.

** : higher than 10% AV observed at two among the tested concentrations.

***: higher than 10% AV observed at three among the tested concentrations.

CT: antiviral activity could not be measured because of the strong cytotoxicity

Table 6-2. Antiviral activity of 5826.

Fraction	Exp.No.	Concent. (%)	% viability			Selectivity index	
			Mock	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
E	94H45	5	43.4	33.3	38.3	>2.6	<1
		1.67	69.2	51.7	4.1		
		0.56	85.8	25.4	0		
	CC50 or EC50 (%)	3.8	1.5	>3.8			
	94H49	5	27.8	17.7	28.5		
1.67		57.6	45.3	52.1			
0.56		82.8	52.6	1.2			
CC50 or EC50 (%)	>5	0.5	1.5	>10	>3.3		
M	94H45	5	80.9	25.4	0	<1	<1
		1.67	105.4	10.6	0		
		0.56	96.3	2.6	0		
CC50 or EC50 (%)	>5	>5	>5				
W	94H45	5	103.8	10.2	1.4		
		1.67	111.4	4.9	0		
		0.56	107.5	3.1	0		
	CC50 or EC50 (%)	>5	>5	>5			

Cell: Vero

Virus: herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain F
herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain MS

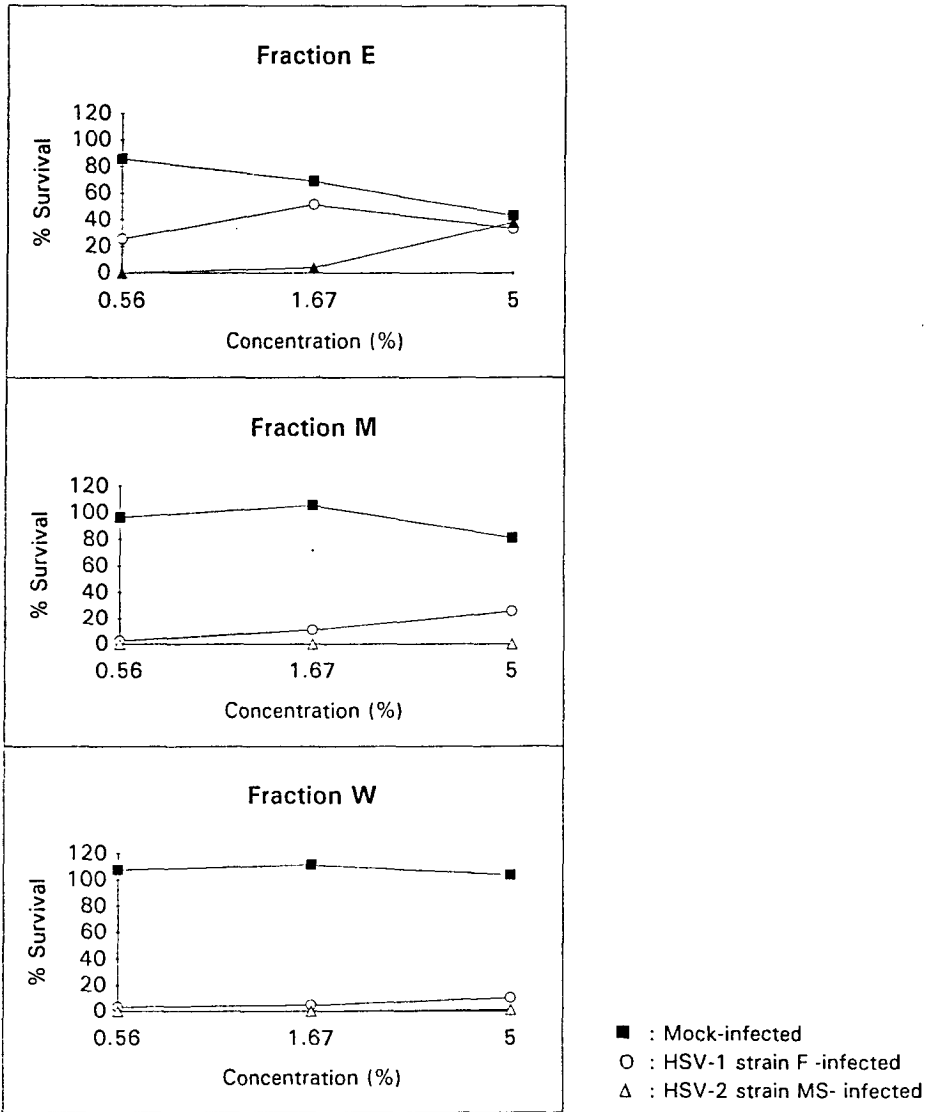


Fig. 6-2. Dose response curve for the fraction of 5826 against HSV-1 and HSV-2 replication in Vero cell culture.

Table 6-3. Antiviral activity of 5841.

Fraction	Exp.No.	Concent. (%)	% viability			Selectivity index	
			Mock	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
E	94H45	5	37.2	23.5	29.7		
		1.67	78.3	68.4	43.1		
		0.56	99.2	29.9	0		
	CC50 or EC50 (%)		3.6	1.2	>3.6	3	<1
	95H49	5	32.2	20.8	30.3		
1.67		77.1	63.5	67.1			
0.56		104.1	47.5	0.7			
CC50 or EC50 (%)		>5	1.2	1.3	>4.2	>3.8	
M	94H45	5	95.5	76.1	1.1		
		1.67	95.2	6.9	0		
		0.56	99.1	2.1	0		
	CC50 or EC50 (%)		>5	2.7	>5	>1.8	<1
	95H49	5	98.7	79.9	10.3		
1.67		98.9	32.6	0.3			
0.56		102.3	9.4	0			
CC50 or EC50 (%)		>5	2	>5	>2.5	<1	
W	94H45	5	111.5	8.6	0.5		
		1.67	106.5	7.5	0		
		0.56	102.6	9.9	0		
	CC50 or EC50 (%)		>5	>5	>5	<1	<1

Cell: Vero

Virus: herpes simplex virus type 1 (HSV-1) strain F

herpes simplex virus type 2 (HSV-2) strain MS

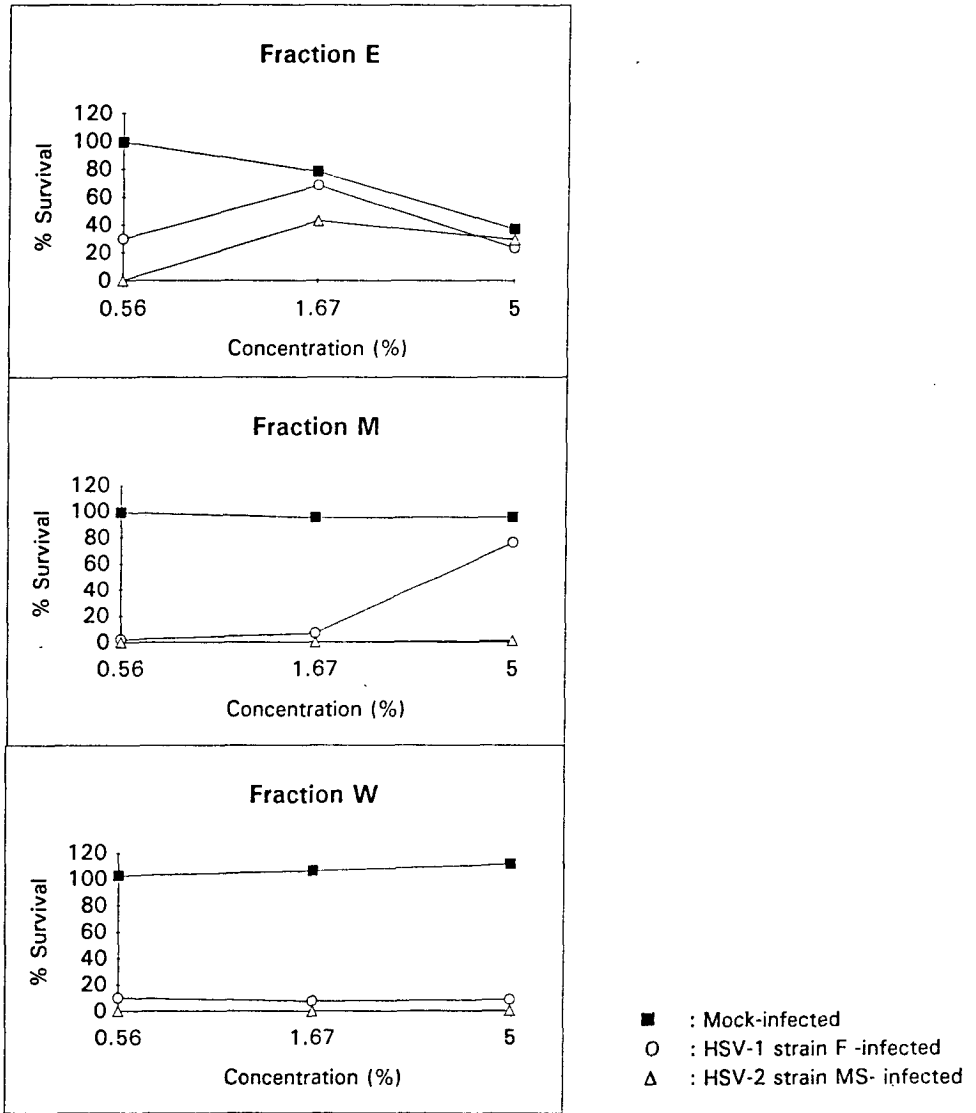


Fig. 6-3. Dose response curve for the fraction of 5841 against HSV-1 and HSV-2 replication in Vero cell cultures.

제 4 장 결론

해양미생물로 부터 부작용이 적고 지속적인 치유효과를 가지는 항 herpes바이러스물질을 발견하기 위하여 대량검색이 가능한 herpes simplex virus type 1과 type 2에 대한 in vitro 항바이러스효과와 시료자체의 세포에 대한 독성이 Vero세포체계에서 3 년 동안 조사되었다. 방선균을 포함한 총 397 개 균주에서 분리한 시료들에 대한 검색이 수행되었다 (1차년도 207균주, 2차년도 156균주, 3차년도 34균주). 약효검색시 시료의 최고농도는 5%로 하였는데, selectivity index가 그다지 높지는 않으나 독성이 적으면서도 두 균주에 모두 효과를 나타내어 확인 실험이 요구되는 시료를 몇 개 발견하였다. 확인을 위하여 효과를 나타내는 시료 fraction의 순수분리가 수행되어야 할 것이며, 좀 더 정밀한 세포독성 검색과, cytomegalovirus 와 varicella-zoster virus 등의 다른 herpesvirus 종류에 대한 약효검색 등이 요구되는데, 그 결과에 따라 시료의 최종 순수분리 필요성이 결정되어질 것이다. 그러나 한편으로는 좀 더 좋은 후보물질의 발견을 위하여 새로운 시료에 대한 지속적인 약효검색수행이 요구된다.

제 5 장 참고문헌

1. Prusoff, WH, T-S Lin, and M Zucker. Potential targets for antiviral chemotherapy. *Antiviral Res* 6:311-328, 1986.
2. De Clercq, E. New acquisitions in the chemotherapy of viral infections. *Verhandelingen Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie* 52:69-99, 1990.
3. Lee, C-K. Present trends in the development of antiviral agents. *Pharma News* 2(1): 2-21, 1992.
4. Frenkel, N, EC Schirmer, LS Wyatt, G Katsafanas, E Roffman, RM Danovich and CH June. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:748-752, 1990.
5. Wyatt, LS, WJ Rodriguez, N Balachandran, N Frenkel: Human herpesvirus 7. antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol* 65:6260-6265, 1991.
6. Mills, J and H Masur. AIDS-related infections. *Scient American*:32-39, August, 1990.
7. Nelson, JA, P Ghazal and CA Wiley. Role of opportunistic viral infections in AIDS. *AIDS* 4:1-10, 1990.
8. Lusso, P, A De Maria, M Malnati, F Lori, SE DeRocco, M Baseler and RC Gallo. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 349:533-535, 1991.
9. Chang, Y, E Cesarman, MS Pessin, F Lee, J Culpepper, DM

Knowles and PS Moore. Identification of herpes-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266:1865-1869, 1994

10. Dupin, N, M Grandadam, V Calvez, I Gorin, JT Aubin, S Havard, F Lamy, M Leibowitch, JM Huraux, JP Escande and H Agut. Herpes-like DNA sequences in patients with Mediterranean Kaposi's sarcoma. *Lancet* 345: 761-762, 1995
11. Pauwels, R, J Balzarini J, M Baba, R Snoeck, D Schols, P Herdewijn, J Desmyter J and E De Clercq E. Rapid and automated-tetrazolium -based colorimetric assay for the detection of anti HIV compounds. *J Virol Methods* 20:309-321, 1988.