



Retrovirus 증식 억제인자의 탐색 (I)

Screening for Inhibitors of Reverse Transcriptase (I)

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학센터

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 생물학적 반응조절물질 (BRM) 생산기술개발의 세부과제 “Retrovirus 증식 억제 인자의 탐색 (I)” 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1990. 4.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 유전공학센터

총괄연구책임자 : 정태화 (한국과학기술연구원 유전공학센터 책임연구원)

연구책임자 : 이정준 (한국과학기술연구원 유전공학센터 책임연구원)

연구원 : 김영호 (한국과학기술연구원 유전공학센터 선임연구원)

이성우 (한국과학기술연구원 유전공학센터 연구원)

이성욱 (한국과학기술연구원 유전공학센터 연구원)

요 약 문

1. 제 목 : Retrovirus 증식억제 인자의 탐색 (I)

2. 연구개발의 목적 및 중요성

미생물과 생약에서의 생체 활성물질 탐색은 관련분야인 유전공학, 천연물화학등의 발전과 함께 그 중요성이 더욱 커져 세균감염이나 암등의 질병치료에 쓰이는 약물과 농업, 축산업에 쓰이는 수많은 화합물들이 직접 미생물 발효액과 생약으로부터 분리, 정제되어 그대로 이용되거나 화학적으로 변화시킨 유도체로 널리 이용되고 있다. 그러나 항암 및 항바이러스성 항생물질은 그 절대적 필요성과 긴박성 그리고 개발하려는 노력에 비해 성과도 적고 발전도 느린 분야이다. 바이러스에 기인한 암에 유용한 물질을 screening 하는데는 바이러스 특유의 life-cycle에 있어서 어떤 단계를 특이적으로 차단하는 약물이 바람직하다. Retrovirus는 DNA를 중간체로 하여 복제하는 RNA virus를 말하는데 복제된 DNA는 숙주세포의 chromosome에 integration되어 provirus로 존재한다. 이 virus DNA가 세포의 성장과 증식에 관여하는 어떤 유전자에 인접하여 DNA의 전사를 증진시키면 악성전환이 유발되는 것으로 생각된다.

AIDS의 원인 바이러스도 retrovirus에 속하는데, 성인 T-cell leukemia의 원인인 HTLV-I이 분리, 동정된 후 AIDS

의 원인 바이러스로서 HTLV-Ⅲ / LAV가 분리되었는데, 모두 비슷한 retrovirus로 T-림파구를 표적세포로 한다. 이런 retrovirus의 증식에 필수적인 역전사 효소(reverse transcriptase: RT)의 존재가 1970 년대에 보고되었고, 많은 retrovirus의 역전사 효소들은 성질이 유사한 것으로 알려졌다. Retrovirus의 증식을 억제하는 방법은 여러 단계가 고려될 수 있지만 가장 효과적인 단계는 역전사 효소를 저해하는, 즉 바이러스의 RNA가 DNA로 복제되는 것을 방지하는 초기 단계로 간주되고 있다. 따라서 역전사 효소를 선택적으로 저해하는 물질은 우수한 항바이러스성 화합물로 기대되고 또한 AIDS에 대한 화학요법제로도 사용될 수 있을 것이다. 역전사 효소 저해제에 의해 AIDS 바이러스의 증식을 억제하려는 시도의 최초의 예는 HPA-23을 AIDS 환자에 사용한 것이며, 그후 suramin이 *in vitro*에서 AIDS 바이러스의 감염과 표적 세포 장애효과를 억제하는데 착안하여 AIDS 환자 치료에 사용했다는 보고도 있다. 현재는 substrate analog인 AZT (3'-azido-deoxy thymidine)가 가장 유망하여 FDA의 인가도 받았지만 bone marrow의 기능을 위축시키고 T-cell을 포함한 적혈구 생산을 떨어뜨리는 등의 심각한 부작용이 있으며 반감기가 짧고 심한 두통을 동반한다고 한다.

역전사 효소를 저해하는 기존의 항생물질로는 adriamycin계와 ansamycin계의 여러종 그리고 streptonigrin 등이 보고되었는데 RNA polymerase와 DNA polymerase를 모두 저해하여 선택성이 없다.

최근에 AMV(avian myeloblastosis virus)의 역전사 효소를 model로 screening된 revistin, retrostatin, limocrocin, sakyomycin 그리고 다른 방법에 의존했지만 이 효소를 저해할 것으로 기대되는 oxetanocin 등이 보고되었다. 이중 sakyomycin과 oxetanocin은 AIDS virus의 증식을 억제하는 효과가 있음이 보고되었다.

여러종의 바이러스로부터 분리된 RT는 서로 성질이 유사한 것으로 알려져 있어 AMV RT를 첫단계의 모델 효소로 사용하여 RT저해물질을 screening하는 것은 최근 급속한 속도로 감염되고 있는 AIDS와 그와 관련된 질병을 치료하는 약물을 개발하는 첫 걸음일 수 있다.

III. 연구의 내용 및 범위

1. 토양방선균의 분리 배양 및 시료의 제조

전국 각지에서 채집한 토양시료 일정량을 생리 식염수에 현탁한 후 augmentin과 nystatin을 포함한 OMYM(Oatmeal-Malt extract-Yeast extract-Glucose) medium에 도말하여, 생육하는 방선균을 분리한 후 이를 다시 OMYM liquid medium에서 7일간 배양하고 원심분리하여 배양액을 얻었으며, 배양액 일정량을 25배 희석한 후 80℃ 수욕상에서 5분간 가열하여 각종 enzyme을 불활성화한 후 이를 시료로 하였다.

2. 생약 시료의 제조

문헌에서 항암작용이 보고된 생약을 우선으로 하여, 경동시장과 경기도 백봉에서 구입 또는 채집하여 사용하였다. 시료는 잘 건조하고 MeOH로 4시간 추출하여 감압농축한 후 20 mg/ml의 농도가 되도록 DMSO에 용해시키고, 최종농도가 80 μ g/ml이 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다.

3. 효소저해제 screening 방법

가) Reverse transcriptase inhibition assay

방선균의 배양액과 생약 추출물에 대하여 AMV(avian myeloblastosis virus)의 reverse transcriptase를 이용하여 inhibition 정도를 측정하였으며, template-primer에 대한 specificity를 보기 위해서 poly(rA)-oligo(dT)와 poly(rC)-oligo(dG)를 각각 사용하여 활성을 비교하였다.

나) DNA polymerase I inhibition assay

E. coli의 DNA polymerase I을 이용하여 reverse transcriptase에 대해 높은 저해 활성을 보인 시료들에 대하여 inhibition 정도를 측정하였으며 실험 방법은 reverse transcriptase와 동일하게 시행하였다. Template-primer로는 calf thymus DNA를 사용하였고 매번 실험전에 activation하여 사용하였다.

4. 실험결과

가) 방선균 배양액 300 종에 대해서 reverse transcriptase inhibition assay를 실시한 결과 001-017, 001-150, 001-156, 001-169, 001-297의 5개 배양액이 50% 이상의 높은 activity를 보였다. 20-50%의 활성을 보인 배양액은 전체의 18.3%이었으며 이들에 대하여 10종의 균주를 사용하여 antimicrobial activity와 MTT를 이용한 cytotoxicity test를 시행한 결과 reverse transcriptase의 활성과 antimicrobial activity 또는 cytotoxic effect와는 별다른 상관관계가 없었다.

나) 경동시장에서 구입한 180종의 한약재와 경기도 백봉에서 채집한 40종의 약용식물에 대하여 poly(rA)와 oligo(dT)를 각각 template와 primer로 하여 reverse transcriptase inhibition assay를 행한 결과 33종의 생약이 70% 이상의 inhibition activity를 나타냈다. 대체로 생약들이 방선균 배양액보다는 저해 활성을 보이는 빈도가 높았다.

Template와 primer로 poly(rC)와 oligo(dG)를 이용하여 활성 test를 해본 결과 대부분의 생약들이 비슷한 저해양상을 보였으나, 蘇子, 樺皮, 白紫仁, 桑栢皮, 赤芍藥, 피마자 등은 template-primer에 따라 30-40% 정도의 차이를 보였다. 대체로 poly(rA)와 oligo(dT)를 쓰는 경우가 상대적으로 inhibition activity가 높는데, 그 중에서 菱實, 山查, 日黃蓮등은 60% 이상의 차이를 보여 poly(rA)-oligo(dT)에 특이적으로

저해활성을 나타내었으며, poly(rC)-oligo(dG)인 경우에만 선택적으로 저해하는 생약은 없었다.

Reverse transcriptase에 대해서 높은 저해활성을 보인 생약들에 대하여 DNA polymerase I의 저해활성을 측정한 결과 대부분의 생약들이 높은 저해활성을 나타내어서 reverse transcriptase에 대해서 선택적인 활성을 나타내지는 못하였으나 팔루인, 일황련, 연자육, 산조인, 빈랑자, 정향피 등은 10-60% 정도의 낮은 inhibition을 보여 선택적으로 reverse transcriptase를 저해할수 있는 가능성을 보여주었다.

다) 활성 성분의 검색

높은 저해 활성을 나타낸 방선균 배양액에 대하여 재현성 검토와 시간에 따른 활성의 변화 및 large-scale로 배양하기 위한 배양 조건을 검토하고 있으며, 활성이 높은 생약에 대하여는 Et₂O와 n-BuOH을 이용하여 각 용매분획을 얻어 이들에 대한 활성을 검토하고 활성성분의 분리 정제를 진행중에 있다.

SUMMARY

Nowadays the prevention and cure for acquired immune deficiency syndrome(AIDS) has been the subject of the greatest scientific search in history. Despite the intense effort to develop a vaccine and to discover a cure for this almost fatal disease which destroys the victim's immune system and open the door for serious oppotunistic infection, no cure has been found. The inhibitor of reverse transcriptase, whose activity is characteristic of retrovirus such a AIDS-causing virus, HTLV-III/LAV might be a ideal candidate for development of chemotherapeutic against this disease.

This study has been initiated in the hope of finding specific inhibitors against reverse transcriptase from microbial cultured broth and oriental herbs. Reverse transcriptase originated AMV instead of HIV has been used.

In the first year of this research, the assay method of reverse transcriptase using AMV enzyme has been established.

Both poly(rA)-oligo(dT) and poly(rC)-oligo(dG) were used as template primers. Inhibitory activity against DNA polymerase I from E. coli was also studied in order to select Chinese medicines to inhibit reverse transcriptase preferentially over

DNA polymerase I.

Chinese medicines have been purchased from herbal drug market and medicinal plants were collected at the mountains near Seoul. The crude MeOH extracts of herbs were dissolved in DMSO to be 20 mg/ml and final concentration of samples were adjusted to be 80 µg/ml.

Almost twenty hundreds *Streptomyces* sp. have been isolated from OMYM-agar plate containing augmentin and nystatin. In this screening test culture broth of the organisms has diluted by 25 fold and inactivated various enzyme by heat treatment before enzymatic assay.

More than 220 herbal extracts and 300 culture broth have been tested their inhibitory activity against AMV reverse transcriptase. Generally herbal extracts show higher frequency of inhibitory activity than cultured broths. No specific inhibition against RTase has not been detected, however, several extracts show stronger inhibition to reverse transcriptase than to DNA polymerase I.

Further studies on separation and identification of active substances from microorganisms and herbal drugs are in progress.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Material and Methods	22
1. Material, Instruments and Medium	22
(1) Material and Instruments	22
(2) Medium	22
2. Isolation and Culture of <i>Streptomyces</i>	23
3. Preparation of medicinal herbs	24
(1) Materials	24
(2) Extraction and preparation of test solution...	24
4. Screening method	25
(1) Reverse transcriptase inhibition assay	25
(2) DNA polymerase I inhibition assay	28
(3) Antimicrobiol activity test	30
(4) Microculture tetrazolium assay (MTT assay)....	30
Chapter 3. Results and Discussion	32
1. Assay method	32
(1) Reverse transcriptase inhibition assay.....	32
(2) DNA polymersase I inhibition assay	32

2. Inhibitory activity against reverse transcriptase of the <i>Streptomyces</i> cultured broth	34
3. Inhibitory activity against reverse transcriptase of medicinal herbs	38
4. Search for active substances	42
Chapter 4. Conclusions and Discussion	44
References	47

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 실험 재료와 방법	22
1. 시약, 기기 및 배지	22
(1) 시약 및 기기	22
(2) 배 지	22
2. 방선균의 분리와 배양	23
3. 생약 시료의 제조	24
(1) 재 료	24
(2) 추출과 시액 조제	24
4. Screening 방법	25
(1) Reverse transcriptase inhibition assay	25
(2) DNA polymerase I inhibition assay	28
(3) Antimicrobial activity test	30
(4) 미세배양 테트라졸리움 assay	30
제 3 장 결과 및 고찰	32
1. Assay method	32
(1) Reverse transcriptase inhibition assay	32
(2) DNA polymerase I inhibition assay	32
2. 미생물 배양액의 역전사 효소 저해 활성	34

3. 생약의 역전사 효소 저해 활성	38
4. 활성성분의 검색	42
제 4 장 결론과 건의 사항	44
참 고 문 헌	47

제 1 장 서 론

Retrovirus 는 P. Rous 가 1911년 닭의 육종세포로부터 처음 분리 하였고 다른 동물들에서도 확인되었다. 그 중에서 1950년대 L. Gross 가 백혈병을 앓는 쥐로부터 포유동물의 retrovirus 를 최초로 분리하였으며, murine leukemia 와 관련되었음이 제시되었다. 숙주에 악성질환을 야기하는 retrovirus로는 gibbon ape leukemia(GaLV)와 악성 및 비악성 질환을 일으키는 feline leukemia virus(FeLV)가 있으며 실제로 retrovirus 에 의한 leukemia 에 있어 어느 정도 면역 억제 현상이 수반되는 것으로 알려져 있다.

만성진행형 질병과 관련된 retrovirus class 로 lentivirus 가 있는데 지금까지 비악성 질환, 예를 들면 encephalitis, neurological abnormalitis, arthritis, lung disease 및 hemolytic anemia 등의 원인으로 알려져 있으며 ungulates (有蹄動物)에서만 분리되었다.

그러나 lentiretrovirus 에 속하는 AIDS 의 원인 virus 로 HTLV-III 가 사람에서 발견되었고, AIDS 와 유사질환을 일으키는 Simian T-lymphotropic virus인 STLV-III가 원숭이에서 발견되었는데, 이들은 주로 T4-lymphocyte에 감염되어 치명적인 결과를 야기하는 것이 특징이다.¹⁾

AIDS의 원인인 HIV는 1983년 Montagnier 등에 의해 lym-

phadenopathy(swollen gland) 환자로부터 분리되어, lymphadenopathy-associated virus(LAV)로 명명되었다. 그러나 이 바이러스가 AIDS 원인 바이러스라는 명백한 증거는 없었는데, 1984년 Gallo 등이 Human T-lymphotropic virus III(HTLVIII)를 분리한 후 AIDS 원인 바이러스로 확인되었다.^{2),3)}

HIV는 가장 복잡한 유전자 구조를 갖는 retrovirus로 알려져 있다. 다른 retrovirus에서처럼 gag(core structural gene), env(envelope glycoprotein), pol(viral DNA polymerase)gene 과 바이러스 복제와 제어에 관련된 LTR(long terminal repeats)이 genome의 양 끝에 있다.

이외에 HIV에 특이한 tat III, art/trs, 3'-orf, sor 및 R같은 5개의 non-structural gene이 있으며 바이러스 복제에 있어 중요한 조절 기능을 갖는 것으로 알려져 있다.

HIV의 유전자 구조 및 그 기능들이 차츰 밝혀지면서 이 바이러스의 증식을 억제하는 화합물을 탐색하는데 있어 훌륭한 target들이 제공되고 있다. 이러한 target를 요약하면 table I과 같다.⁴⁾

HIV는 표면의 gp120을 통해 T세포 표면의 CD4단백과 결합함으로써 세포내로 침입한다는 것이 알려져 gp120과 CD4의 결합을 차단하는 화합물에 대한 연구가 진행되어 cytoplasm과 transmembrane domain이 없는 soluble CD4에 대한 *in-vitro* 실험에서 HIV의 결합과 표적세포에서의 복제가 저해되는 것이 알려졌다. 또한 gp120의 약 40%가 glycosylation되어 CD4

Table I. Stages in the replicative cycle of a pathogenic human retrovirus which may be targets for therapeutic intervention

Stage	Potential intervention
Binding to target cell	Antibodies to the virus or cell receptor
Early entry into target cell	Drugs that block fusion or interfere with retroviral uncoating
Transcription of RNA to DNA by reverse transcriptase	Reverse transcriptase inhibitors
Degradation of viral RNA in an RNA-DNA hybrid	Inhibitors of RNase H activity
Integration of DNA into host genome	Drugs which inhibit pol gene-mediated 'integrase' function
Expression of viral genes	'Anti-sense' constructs; Inhibitors of the tat-III protein or art/trs protein
Viral component production and assembly	Myristylation, glycosylation and protease inhibitors or modifiers
Budding of virus	Interferons

와의 결합에 중요한 역할을 하므로 glycosylation 저해제에 대한 연구도 진행되어 castanospermine 및 1-deoxynogirimycin 등이 *in vitro*에서 glycosylation을 방해하는 것이 알려졌다.⁵⁾

이외에 phosphorylation, myristylation 등을 억제하는 물질은 AIDS 치료제로 개발될 가능성도 높다. 최근 dextran sulfate와 heparin 같은 sulfated polysaccharide도 gp120과 CD4의 결합을 억제함이 밝혀졌다.⁶⁾

또한 gp120 의 일부분의 10 개 아미노산으로 된 “peptide T” 가 바이러스의 표적세포 결합을 억제한다는 보고도 있다.

HIV에는 이 바이러스 특유의 protease 가 있어 p160 gag-pol 의 전구 단백질을 가수분해하는데 관여한다. 이 protease 는 99 개의 아미노산으로 구성되어 있으며 dimer로서 효소 활성을 나타낸다. Aspartic protease 로 분류되는 이 protease 는 proline 과 aromatic 아미노산 사이를 절단하는 효소로 이 효소를 저해하면 HIV의 증식에 중요한 peptide 의 processing 이 안됨으로 해서 바이러스의 기능을 상실하게 될 것이므로 이 protease 저해제 연구도 활발하다.⁷⁾

표적세포의 수용체에 결합한 HIV는 세포안으로 들어가 viral RNA로부터 reverse transcriptase에 의해 DNA가 역전사되고 복제된 DNA는 double strand 로 된 후 chromosome에 integration되어 provirus로 존재한다.

Anti-AIDS약품개발의 표적으로 이 바이러스 특유의 reverse transcriptase가 가장 효과적인 것으로 생각되어 이 효소 저해제 개발에 많은 노력이 집중되고 있다.

많은 dideoxynucleotide 들이 세포내의 kinase에 의해 phosphorylation된 후 강력하고 선택적으로 RTase를 저해하여 HIV의 복제를 억제함이 알려졌고 그 중 AZT(3'-azido,2',3'-dideoxythymidine)가 FDA의 인가를 받아 사용되고 있으나 bone marrow 억제 및 T-cell을 포함한 적혈구 생산 감소등 심각한 부작용으로 장기간 사용에 문제가 있다.

2',3'-dideoxycytidine(ddC)는 강력한 anti-HIV nucleoside로서 phase I 실험 중에 있는데 AZT와 마찬가지로 HIV p24 antigen 을 감소시키는 작용이 있어 HIV의 복제를 억제한다는 사실이 입증되었다.

Dideoxy nucleoside 외에 reverse transcriptase를 저해하는 화합물로 pyrophosphate analog 인 phosphonoformate(일명 Foscarnet)가 *in vitro*에서 HIV 복제를 저해함이 밝혀져 임상실험중에 있고 rifamycin유도체도 전임상시험중에 있는 것으로 보고되었다.

최근 Declercq 등은 benzodiazepine계 화합물인 tetrahydro-imidazo[4,5,1-jk][1,4]-benzodiazepin-2(1H)-one 과 -thione(TIBO) 이 HIV 의 복제를 저해하며 AZT 보다 훨씬 강력하고 안정성도 좋다고 보고하였다. 이 물질도 HIV의 reverse transcriptase 를 저해할 것으로 예상하고 있다.⁸⁾

천연물로부터의 치료약품 개발을 위한 노력은 avermectin, mevacor 등의 성공 이후 다시 각광을 받아 활발하게 연구되고 있는데 AIDS 치료제 개발을 위한 screening 에서는 주로 reverse transcriptase 를 target 으로 하고 있다. 미생물 대사산물로부터 reverse transcriptase 저해제 screening 은 AMV 효소를 model 로 하여 일본에서 활발하게 진행되었다.

reverse transcriptase 를 저해하는 기지 항생물질로는 adriamycin 및 그 유도체, ansamycin 계통의 수종 그리고 streptonigrin 등이 보고되었는데, 그 중 RNA template에 결합해

서 DNA 전사를 저해하는 actinomycin D 나 adriamycin 계열, RNA polymerase에 결합하여 효소 활성을 저해하는 ansamycin 계열의 streptovaricin, geldanamycin, rifamycin SV 유도체 등은 선택성이 결여되어 문제가 되는 듯하다.

최근 AMV 역전사 효소를 model 로 screening 된 revistin⁹⁾, retrostatin¹⁰⁾, limocrociclin¹¹⁾, sakyomycin¹²⁾, oxetanocin¹³⁾ 등이 보고되었다.

한편, protoberberine과 benzophenanthridine alkaloid 중에서 fagaronine, nitidine, palmatine 등이 RNA tumor virus 의 역전사 효소를 저해한다¹⁴⁾⁻¹⁶⁾는 보고 이후 식물, 해조류 등에서의 역전사 효소 저해제 탐색도 활발하다.

Alkaloid 뿐만 아니라 tannin¹⁷⁾ 과 flavonoid¹⁸⁾ 의 역전사 효소 저해 활성에 관한 연구도 진행되어, hydrolyzable tannin이 poly(rA)-oligo(dT)를 template-primer로 해서 nitidine에 필적할만한 강한 저해작용이 있다는 것이 보고되었고, fisetin, quercetin, myricetin 등의 flavonoid도 역전사 효소에 대하여 강력한 활성을 갖고 있다고 알려졌다. tannin은 template-primer-enzyme-nucleotide complex의 형성을 저해하는 것으로 추측되나, 실제로 *in vivo*에서의 효과는 의문이며, 천연물에 대한 RT inhibition assay에서는 tannin을 우선적으로 제거한 다음에 그 활성을 보는 것이 일반적이다.

최근에는 *Anemone flaccida* 라는 식물의 근경에서 분리한 두 종류의 triterpene saponin이 역전사 효소 저해 활성을 갖고 있

는 것으로 보고되었다.¹⁹⁾ Oleanolic acid 를 aglycone 으로 하는 flaccidin B(oleanolic acid 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranoside)와 giganteaside D(oleanolic acid-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranoside)가 바로 그것인데 역전사 효소에 대한 저해활성에 있어서는 flaccidin B가 더 강하게 나타나 sugar moiety가 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다.

해조류에서도 또한 역전사 효소를 저해하는 새로운 물질이 분리, 보고되었는데²⁰⁾²¹⁾ 이 SAE(sea algal extract)는 galactose(73 %), sulfonate(20 %), 3-6-anhydrogalactose(0.65 %)로 구성된 sulfated polysaccharide로 γ -carrageenan family에 속하며, *in vitro*에서 HIV의 역전사 효소를 선택적으로 저해하는 것으로 알려져 관심을 모으고 있다.

제 2 장 실험 재료와 방법

1. 시약, 기기 및 배지

(1) 시약 및 기기

AMV reverse transcriptase와 DNA polymerase I은 Promega에서 구입하였고, [^3H]-TTP는 NEN, [^3H]-GTP는 Amersham 제품을 사용하였다. Polyadenylic acid와 oligodeoxythymidylic acid, polycytidylic acid와 oligodeoxyguanylic acid는 모두 Pharmacia에서 구입하였고, Dithiothreitol, ATP, GTP, CTP, TTP 등은 모두 Sigma 제품을 사용하였다. Scintillation cocktail로는 NEN에서 pre-mixing한 Econofluor-2를 사용하였으며, scintillation counter로는 Beckman LS-6800 Analyzer를 이용하였고, 방사균 배양을 위해서는 KSI-22L shaker를 사용하였다.

(2) 배 지

방사균의 분리와 배양을 위해서 OMYM medium²²⁾을 사용하였으며 배지의 조성은 다음과 같다.

< OMYM medium >

oatmeal	20g
malt extract	2g
yeast extract	2g
glucose	2g
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.006g
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	0.003g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.003g
FeSO ₄ ·4H ₂ O	0.003g

D.W. 1l

adjust to pH 7.0

2. 방선균의 분리와 배양

전국 각지에서 채취한 토양 시료 1g을 실온에서 2일간 방치하여 건조한 후 멸균 생리식염수 10 ml에 넣어 충분히 교반시킨 후 10^1 — 10^2 배로 희석시켜서 200 μ l를 augmentin 200 μ g/ml, nystatin 100 μ g/ml을 포함하는 OMYM plate에 도말하여 30 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양하였다. 여기에서 자라난 방선균을 분리하여 OMYM liquid medium 7ml에 접종하여 7일동안 배양하고 원심분리하여 배양액을 얻었다.

분리한 방선균 300종의 배양액을 25배 희석하여 80 $^{\circ}$ C 수욕상에서 5분간 가열하여 proteinases, DNases, RNases 등의 각종 enzyme을 불활성화한 후 시액으로 하였다.

3. 생약 시료의 제조

(1) 재 료

시중에 유통되고 있는 한약재 중에서 주로 항종양, 악성질환 치료에 쓰이거나 문헌²³⁾에서 이미 항암작용이 보고된 것을 중심으로 180종의 생약을 경동시장에서 구입하였다. 약용식물은 민간에서 쓰이는 40종의 식물을 서울 근교의 산(주로 경기도 백봉)에서 채집하여, 음지에서 말려 사용하였다.

(2) 추출과 시액 조제

건조한 시료를 methyl alcohol을 용매로 하여 4시간 열탕추출하고, 감압하에서 완전히 농축한 후 20 mg/ml의 농도가 되도록 DMSO에 녹여 stock solution으로 하였다. 이 stock solution을 증류수로 희석하여 최종농도가 80 µg/ml가 되도록 해서 시액으로 하였다.

일차 screening이 끝난 MeOH extract에 대하여 효소저해활성이 높은 9종의 시료들을 선택하여 Fig.1의 scheme에 따라 ethylether, n-butyl alcohol 등의 유기용매를 써서 각 용매분획으로 나누어 농축액을 얻은 다음, 위와 동일한 방법으로 시액으로 하였다.

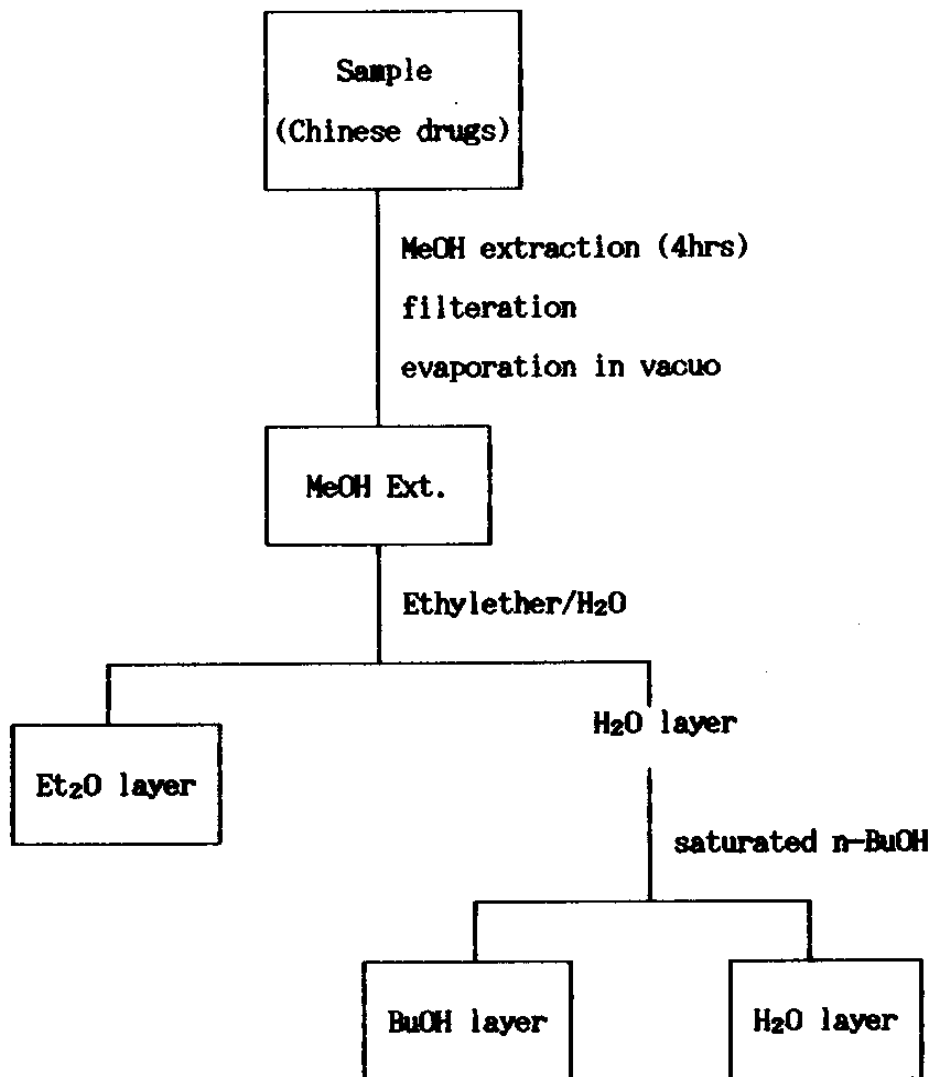


Fig. 1. Extraction and fractionation of Chinese drugs.

4. Screening 방법

(1) Reverse transcriptase inhibition assay

앞에서 제조한 시액 25 μ l에 enzyme solution 12.5 μ l

와 reaction buffer 12.5 μ l 를 가하여 균일하게 혼합한 후 Fig. 2 에서와 같이 37 $^{\circ}$ C 에서 60 분간 incubation 하였다. Ice bath 에서 반응을 중지시키고 50 μ l 의 reaction mixture 중 40 μ l 씩을 취하여 지름 2.4 cm 의 DEAE-filter paper 에 흡착시켰다. Filter paper 는 30 분동안 5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 용액으로 세 번 씻고, 이어서 물로 두 번, EtOH 로 한 번 세척한 다음 완전히 건조하여 남아있는 radioactivity 를 xylene-based scintillation cocktail 에 넣어 LSC 로 측정하였다.

Reaction mixture

- ↓ covered with parafilm.
- ↓ incubated at 37 $^{\circ}$ C for 60 min.
- ↓ reaction is terminated by placing in ice-cold water bath

40 μ l aliquot

- ↓ soaked into 2.4 cm round piece of DEAE-filter paper.
- ↓ washed 3 times with 5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ with intermittent shaking for ca. 30 min.
- ↓ rinsed twice with distilled water
- ↓ and finally with ethanol.
- ↓ air-dried until complete dryness.

DEAE-filter paper

- ↓ transferred into scintillation vial.
- ↓ fed with 10 ml xylene-based scintillation cocktail.
- ↓ radioactivity is read.

CPM/NC, PC or SAMPLE

Fig. 2. Procedure of reverse transcriptase inhibition assay.

실험에 사용한 reaction buffer 와 enzyme solution의 조성은 다음과 같다.

Reaction buffer

Content	volume(μ l)	final conc.(in 1X RM)
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
0.5mg/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 (1 mCi/ml)	12.5	6.25 μ Ci/ml
0.5mg/ml BSA	4	0.1 mg/ml
H ₂ O	181.5	
Total	500 μl	4X no enzyme reaction mixture

Enzyme solution

Reverse Transcriptase	1.2	4.5 U/ml
Dilution Buffer	46.8	
H ₂ O	452	
	500 μl	4X reaction mixture (Sample+Positive)

Template와 Primer에 따른 특이성을 보기 위해 poly(rA)-oligo(dT)와 poly(rC)-oligo(dG)를 사용하여 저해활성을 비교하였으며 positive control로는 생약 시료에 대하여 0.08% DMSO 용액과 증류수를, 미생물 배양액에 있어서는 배지원액을 25배 희석한 용액과 증류수를 각각 사용하였고, negative control은 증류수 37.5 μ l에 reaction buffer 12.5 μ l만 가하여 다른 시액들과 똑같은 조작을 거쳤다. 반응의 적정도를 확인하기 위하여 이미 RT inhibitor로 알려진 ellagic acid를 지표물질로 이용하였으며, 저해활성은 아래와 같이 inhibition percentage로 계산했다.

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

(2) DNA polymerase I inhibition assay

RT에 대하여 높은 저해활성을 보인 시료들에 대하여 DNA polymerase I inhibition assay를 하였다. 실험방법은 reverse transcriptase의 inhibition assay와 동일한 방법으로 하였으며, DNA polymerase I의 효소반응이 실온에서도 무척 신속히 진행되므로 실험 오차를 줄이기 위하여 enzyme solution을 따로 만들지 않고 reaction mixture에 합한 채 ice bath에서 최단시간내에 조작을 하였고 지표 물질로는 daunomycin을 사용하였다.

Template로 쓰이는 Calf thymus DNA는 실험 직전에 동

량의 Calf thymus DNA(0.5 mg/ml)와 DNAase(1ng/ml)를 혼합하여 37 °C에서 15분간 incubation하고, 77 °C의 water bath에서 7분간 가온한 후 ice bath에 넣어 식힘으로써 activation하여 사용하였다.

Assay solution의 조성은 다음과 같다.

Content	volume(40)	final conc.(in 1X RM)
1.0 M Tris-HCl (pH 7.5)	120	40 mM
0.3 M MgCl ₂	33.3	5.0 mM
1.0 M Dithiothreitol	1.4	0.7 mM
Activated Calf thymus DNA	200	25 µl/ml
2.0mM dATP	20	20 uM
2.0mM dGTP	20	20 uM
2.0mM dCTP	20	20 uM
2.0mM TTP	20	20 uM
[³ H]TTP (1 mCi/ml)	6.7 µl	3.3 uCi/ml
H ₂ O	558.6	
Total	1000 µl	
Negative control	-50 (25×2)	
DNA polymerase I (E.coli)	6.7	3.5U/ml

956.7 µl (for sample and positive control)

(3) Antimicrobial activity test

방선균 배양액 중에서 reverse transcriptase에 대하여 20% 이상의 저해활성을 보인 균주를 대상으로 효소 저해활성과 antimicrobial activity와의 상관관계를 조사하여 보았다.

Test organism으로는 *Alcaligenes faecalis*(AF), *Bacillus licheniformis*(BL), *Bacillus licheniformis*(Penicillin 10 µg/ml plate (BP)), *Candida albicans*(CA), *Mycobacterium phlei*(MP), *Pseudomonas aeruginosa*(L-form of cell wall defect mutant: PL), *Salmonella typhimurium* (hyper sensitive mutant: ST), *Sarcina lutea*(SL), *Staphylococcus aureus*(SA), *Staphylococcus aureus*(antibiotic multiresistant mutant: SR) 등의 10종의 균주를 대상으로 하여 paper disc method에 의하여 각 균주의 활성을 측정하였다.

(4) 미세배양 테트라졸리움 assay(MTT assay)

Reverse transcriptase에 저해활성을 보인 균주들에 대하여 P-388 mouse leukemia를 이용하여 세포독성을 조사하여 보았다. 실험방법은 Fig. 3에 나타내었다.

96 well plate

- ↓ add the culture broth (10 μ l) disposed under uv light for
- ↓ 5mins
- ↓ add P-388 mouse leukemia(1-2 \times 10⁴cells/well) in
- ↓ RPMI 1640 medium containing streptomycin and
- ↓ penicillin
- ↓ incubation at 5% CO₂ incubator for 48 hrs.
- ↓ add 50 μ l MTT solution (1mg/ml D-PBS)
- ↓ incubation for 4 hrs.
- ↓ centrifuge at 2000rpm
- ↓ discard the supernatant
- ↓ dissolve in 50 μ l DMSO

reading the observance at 595nm

Fig.3 Procedure of MTT assay.

제 3 장 결과 및 고찰

1. Assay method

(1) Reverse transcriptase inhibition assay

본 실험에서는 assay solution의 조성을 Nakamura 등이 기존에 쓰고 있던 방법을 Promega사의 standard assay condition을 참고로 하여 최종농도를 50mM Tris-HCl(pH 8.3), 6 mM MgCl₂, 1mM Dithiothreitol, 40mM KCl, 0.1mM TTP, 5.0 μg/ml poly(rA), 0.02 U/ml oligo(dT)₁₂₋₁₈, 6.25 μCi/ml [³H]TTP, 0.1mg/ml BSA, 4.5U/ml reverse transcriptase 로 변경하여 사용하였다. 여기에서 RTase 1 U는 standard assay condition에서 37 ℃로 10분간 두었을때 1mM의 dTTP가 acid insoluble form으로 혼입되도록 하는 enzyme의 양을 말한다.

매 실험의 적부를 판정하기 위해서 RTase inhibition assay의 지표물질로 사용한 ellagic acid의 농도별 저해활성은 Table II와 같으며, 이 중에서 10 μg/ml의 농도를 control로 하여 40 ± 5%의 저해활성을 보였을때 반응이 적정한 것으로 판정하였다.

(2) DNA polymerase I inhibition assay

DNA polymerase I inhibition assay에서는 적당한 반응

Table II. Inhibitory activity of reverse transcriptase by ellagic acid.

Sample	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	CPM			%inhibition
		#1	#2	Average	
Positive control		4959	5127	5043	
Negative control		172	167	169.5	
Ellagic acid	40	731	899	815	86.8
	20	1868	1297	1582.5	71.0
	10	2818	2818	2818	45.7
	5	3312	3321	3316.5	35.4
	2.5	3856	3856	3856	24.4
	1.25	3787	3783	3785	25.8
	0.63	3888	3888	3888	23.7
	0.31	3358	3625	3491.5	31.8

조건을 찾기 위하여 buffer solution 으로 0.67M Glycine-NaOH(pH 9.2) 와 1M Tris-HCl(pH 7.5) 을 각각 비교해 본 결과 1M Tris-HCl 을 사용한 때가 0.67M Glycine-NaOH 을 사용한 경우보다 enzyme activity 가 훨씬 높았다.

다시 1M Tris-HCl 을 사용하여 NEB사와 Stratagene사에서 유래한 DNA polymerase I의 활성을 비교해본 결과 NEB

유래의 DNA polymerase I 이 2 배 이상의 높은 활성을 보였다 (Table III).

한편, ellagic acid의 DNA polymerase I 에 대한 저해 활성은 RTase 에 대해서보다 훨씬 떨어져 40 μ g/ml 의 농도로 했을 때 30 % 미만이었으므로, DNA polymerase I inhibition assay 를 위한 지표물질로는 daunomycin 을 사용했다. Daunomycin 은 10 μ g/ml 의 농도로 50 % 안팎의 저해 활성을 나타냈다.

Table III. Comparison of DNA polymerase I activity from NEB and Stratagene sources.

reaction time(min)	NEB(CPM)	Stratagene(CPM)
0	145	188.5
20	1329	656
40	2309	932
60	2384	1006
80	2816	1026

2. 미생물 배양액의 역전사 효소 저해 활성

299 종의 방선균을 OMYM medium에서 배양하여 얻은 배양액을 25 배 희석하여 reverse transcriptase inhibition activity 를 조사한 결과를 Table IV 에 나타냈으며, 50 % 이상의 저해 활성을 나타낸 것은 001-017(81.1 %), 001-150(52.1 %), 0.01-157

(85 %), 001-169(55.9 %), 001-297(66.7 %)로 모두 5개이고, 20 % 이상 50 %미만의 활성을 보인 것은 49개로, 전체 배양액 중에서 이들이 차지하는 비율은 18.3 %였으며, 대부분의 방선균 배양액이 낮은 활성을 나타내었다.

Table IV. Distribution of RTase inhibitory activity from the culture broth of *Streptomyces* species.

Inhibitory Activity(%)	No. of Culture broth	Percentage(%)
> 50	5	1.7
20 - 50	49	16.6
10 - 20	91	30.4
< 10	154	51.5

Reverse transcriptase에 20 % 이상의 저해활성을 보인 균주에 대하여 MTT assay를 이용하여 측정 한 cytotoxicity와 10종의 test organisms을 사용하여 antimicrobial activity를 측정 한 결과를 Table V에 나타내었다. 높은 활성을 보인 001-157과 001-017, 001-297 등의 균주는 antimicrobial activity나 cytotoxicity를 나타내지 않았으며, 전체적으로 볼 때 역전사효소 저해활성과 항균활성이나 세포독성과는 상관관계가 없는 것으로 추정되었다.

Table V. Comparison of reverse transcriptase inhibition activity, cytotoxicity and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains.

Record #	BROTH	INHIBITION	MTT	AF	BL	BP	CA	MP	PL	ST	SL	SA	SR
1	001-003	33.4	+++	0	0	20	0	0	0	24	0	14	0
2	001-006	30.7	+++	0	11	25	20	0	0	0	18	0	0
3	001-009	21.1	+++	0	12	23	0	15	0	0	14	15	14
4	001-014	21.8	+++	0	18	30	0	22	18	12	26	23	21
5	001-017	81.1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	001-019	29.9	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	001-021	29.4	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	011-029	34.2	+	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0
9	001-030	28.5	+++	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0
10	001-033	25.5	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	001-038	20.2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	001-039	26.5	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	001-040	21.8	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	001-043	25.3	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	001-044	26.9	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	001-045	30.2	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	001-048	25.7	+++	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0
18	001-055	35.0	-	13	0	24	0	0	0	0	13	0	0
19	001-070	23.3	+++	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0
20	001-074	29.3	-	18	0	24	0	15	12	0	15	17	13
21	001-091	29.3	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	001-111	24.4	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	001-115	27.4	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	001-117	22.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	001-118	26.2	-	0	0	20	0	11	0	0	0	0	0
26	001-122	20.1	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table V. (continued)

Record #	BROTH	INHIBITION	MTT	AF	BL	BP	CA	MP	PL	ST	SL	SA	SR
27	001-125	26.9	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	001-133	27.4	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	001-134	43.1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	001-141	27.6	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	001-146	27.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	001-147	28.9	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	001-148	29.8	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	001-150	52.1	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	001-151	31.6	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	001-152	34.0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	001-154	29.1	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	001-157	85.1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	001-159	20.7	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	001-169	55.9	+++	0	0	16	0	14	0	0	0	0	0
41	001-170	22.7	-	0	0	14	13	0	0	0	0	0	0
42	001-180	20.7	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	001-180	20.7	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	001-186	27.7	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	001-188	21.2	-	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0
46	001-196	23.3	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	001-256	33.7	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	001-257	21.0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	001-269	25.2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	001-271	21.4	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	001-272	21.7	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	001-281	24.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	001-292	32.6	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	001-297	66.7	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3. 생약의 역전사 효소 저해 활성

경동시장에서 구입한 180종의 한약재와 경기도 백봉에서 채집한 40종의 약용식물에 대하여 template-primer로 poly(rA)-oligo(dT), poly(rC)-oligo(dG)를 사용하여 reverse transcriptase inhibition assay를 조사하고, 활성이 높은 생약에 대하여 DNA polymerase I에 대한 활성을 조사한 결과를 Table VI 과 Table VII에 나타내었다.

Table V. Inhibitory activity of Chinese drugs against AMV-reverse transcriptase and DNA polymerase I.

No	Chinese drugs	RTase		DNA polymerase I
		poly (rA)-oligo (dT)	poly (rC)-oligo (dG)	
1	蜈蚣(Scolopendra)	75.5	14.5	75.1
2	栝楼仁(Trichosanthis Semen)	97.3	101.4	86.8
3	白黄莲(Coptidis Rhizoma)	86.5	3.4	20.3
4	莲子肉(Nelumbonis Semen)	96.5	90.6	73.2
5	大黄(Rhei Rhizoma)	96.7	89.6	90.7

(continued)

6	菱 實(Trapae Fructus)	95.3	30.8	90.1
7	土茯苓(Smilacis Chinae Radix)	97.6	71.6	93.0
8	貫 衆(Dryopteris Rhizoma)	95.4	82.3	94.4
9	赤芍藥(Rubura Paeoniae Radix)	87.3	43.2	98.3
10	桂 枝(Cinnamomi Ramulus)	90.4	86.5	93.8
11	桑白皮(Mori Cortex)	87.8	55.1	98.8
12	厚 朴(Magnoliae Cortex)	91.3	100.7	97.0
13	蘇 木(Sappan Lignum)	92.8	81.4	99.4
14	檳榔子(Arecae Semen)	92.8	91.0	84.1
15	丁香皮(Eugeniae Cortex)	87.5	94.6	74.8
16	肉豆蔻(Myristicae Semen)	91.5	104.8	86.7
17	地 榆(Sanguisorbae Radix)	90.6	72.8	83.7
18	山 查(Crataegi Fructus)	70.9	5.8	98.6

Table VII. Inhibitory activity of medicinal plants against AMV-reverse transcriptase.

Plants	Scientific name	Used part	Inh. (%)
달맞이꽃	<i>Oenothera lamarckiana</i>	stem	91.8
물레나물	<i>Hypericum ascyron</i> <i>var. genuinum</i>	herb	92.3
소리쟁이	<i>Rumex corenus</i>	herb	91.2
좁쌀풀	<i>Lysimachia davurica</i>	herb	81.2
짚신나물	<i>Agrimonia pilosa</i> <i>var. japonica</i>	herb	93.9
큰까지수염	<i>Lysimachia chlethroides</i>	herb	89.3
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>	leaf	96.6
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>	root	81.0

Template 와 primer 에 대한 specificity 를 조사해 보기 위하여 poly(rA) 와 oligo(dT) 대신에 poly(rC) 와 oligo(dG) 를 이용하여 활성 test 를 해본 결과 (Table VIII) 대부분의 생약들이 비슷한 저해양상을 보였으나, 대체로 poly(rA) 와 oligo(dT) 를 쓰는 경우가 상대적으로 inhibition activity 가 높았다. 그 중에서 菱實, 山查, 日黃蓮 등은 60 % 이상의 차이를 보여 poly(rA)-oligo(dT) 에 특이적인 저해활성을 보이며, 蜈蚣, 蘇子, 樺皮, 白紫仁, 桑栢皮, 赤芍藥, 피마자 등은 template-primer 에 따라 30-51 % 정도의 차이를 보였으며, poly(rC) 와 oligo(dG) 인 경우에 만 선택적으로 저해하는 생약은 없었다.

Table VIII. Differentiation of RTase inhibitory activity according to tamplate-primer.

Chinese drugs	poly(rA)- oligo(dT)	poly(rC)- oligo(dG)	Δ
麥實 (Trapaе Fructus)	95.3	30.8	64.5
栝子仁 (Thujaе Orientalis Semen)	41.7	74.4	-32.7
山楂 (Crataegi Fructus)	70.9	5.8	65.1
桑栢皮 (Mori Cortex)	87.8	55.1	32.7
蘇子 (Perillae Semen)	50.0	100.6	-50.6
蜈松 (Scolopendra)	75.5	26.0	49.5
日黃蓮 (Coptidis Rhizoma)	86.5	3.4	83.1
赤芍藥 (Rubura Paeoniae Radix)	87.3	43.2	44.1
피마자 (Ricini Semen)	71.0	39.3	31.7
樺皮 (Pruni Cortex)	55.7	96.4	-40.7

$$\Delta = [\text{poly(rA)-oligo(dT)}] - [\text{poly(rC)-oligo(dG)}]$$

역전사 효소에 대해서 높은 저해 활성을 보인 생약들에 대하여 DNA polymerase I의 저해 활성을 측정한 결과 (Table VI) 대부분의 생약들은 높은 저해 활성을 나타내어서 reverse transcriptase에 대해서 선택적인 활성을 나타내지는 못하였으나 팔루인, 일황련, 연자육, 산조인, 빈랑자, 장향피 등은 10-60 % 정도의 낮은 inhibition을 보여 선택적으로 reverse transcriptase를 저해할 수 있는 가능성을 보여주었다.

4. 활성성분의 검색

Reverse transcriptase에 대하여 높은 저해활성을 나타낸 방선균 배양액에 대하여 재현성의 조사와 유효성분의 분리를 위한 발효조건에 검토는 현재 진행중에 있다.

생약으로부터 효소저해 활성성분의 분리를 위해서 1차 screening에서 80% 이상의 높은 저해활성을 나타낸 여러종의 생약중에서 우선 9종을 선택하여 MeOH로 추출하고 Et₂O와 n-BuOH을 이용하여 각 용매 분획으로 나누어 저해활성을 측정한 결과는 Table IX와 같으며 활성분획을 각종 chromatography를 이용하여 분리 정제중에 있다.

Table X. Inhibitory Activity of each fractions of Chinese medicines against AMV-reverse transcriptase.

Herbal Drugs	MeOH Ex.	Et ₂ O Ex.	BuOH Ex.	H ₂ O Ex.
<i>Smilacis Chinae Radix</i> (토복령)	97.6	86.6	84.6	86.6
<i>Rubra Paeoniae Radix</i> (적작약)	87.3	79.7	46.1	17.0
<i>Arecae Semen</i> (빈랑자)	92.8	57.9	99.6	90.7
<i>Cinnamomi Ramulus</i> (계지)	90.4	30.1	94	80.5
<i>Rubi Fructus</i> (복분자)	88.1	48.9	94.1	93.0
<i>Magnoliae Cortex</i> (후박)	91.3	47.8	92.7	98.6
<i>Eugeniae Cortex</i> (정향피)	87.5	51.9	98.0	100.8
<i>Sappan Lignum</i> (소목)	92.8	36.9	60.1	33.3
<i>Myristicae Semen</i> (육두구)	91.5	95.5	94.9	95.0

제 4 장 결론과 건의사항

Retrovirus의 증식에 필수불가결한 역전사효소(reverse transcriptase; RT)를 저해하는 물질을 screening 하기 위하여 AMV의 역전사효소를 model로 하는 reverse transcriptase inhibition assay method를 확립하였다. 동시에 template와 primer에 기인하는 시료의 specificity를 보완하기 위해서 poly(rA)와 oligo(dT) 또는 poly(rC)와 oligo(dG)를 사용하여 assay를 행하였으며, 효소의 특이성을 확인하기 위하여 E. coli 유래의 DNA polymerase I을 사용하여 DNA polymerase I inhibition assay method를 확립하였다.

토양에서 분리한 2,000여종의 방선균 배양액 중에서 일차로 300종의 방선균 배양액에 대하여 reverse transcriptase inhibition assay를 실시한 결과 50% 이상의 활성을 나타낸 균주는 5종이었으며, 20% - 50%의 활성을 나타낸 균주는 49종이었다. 효소 저해활성을 나타낸 균주에 대하여 MTT assay를 이용한 cytotoxicity test와 10종의 test organisms을 사용하여 antimicrobial activity를 조사한 결과 상관관계는 관찰되지 않았다.

한약재와 약용식물 220종에 대하여 template와 primer로 poly(rA)와 oligo(dT)를 사용한 경우 MeOH extract 상태에서 15%정도가 높은 활성을 나타내었다. Poly(rC)와 oligo

(dG)를 사용한 경우 菱實, 山査, 日黃蓮 등은 높은 선택성을 보여 주었으나 대부분의 생약은 동일한 저해양상을 나타내었다. 저해 활성이 높은 생약에 대하여 DNA polymerase I inhibition assay를 실시한 결과 대부분은 효소에 대한 선택성이 없었으나 括樓仁, 日黃蓮, 蓮子肉, 山棗仁, 檳榔子, 丁香皮 등은 10 - 60% 정도의 낮은 저해도를 보여 선택적으로 reverse transcriptase를 저해할 가능성을 보여주었다.

미생물이 생산하는 유용한 생리활성 물질 중에서 약 65%가 방선균에서 나온 것이라는 사실을 감안할 때, 배양액으로서 높은 활성을 보인 방선균들은 앞으로 대량배양을 통해서 활성성분을 분리, 정제함으로써 새로운 역전사효소 저해제를 개발할 수 있을 것이며, 나아가서 retrovirus에 관련되는 질병의 치료에도 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 높은 활성을 보인 생약들에 대해서 fatty acid나 tannin성 물질에 의한 활성은 용매분획이나 polyamide column chromatography 등의 방법을 이용하여 제거하고 각종 chromatography를 통하여 활성성분을 단리할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 AMV 유래의 reverse transcriptase를 사용하였으나, AIDS와 연관을 갖기 위해서는 HIV 유래의 reverse transcriptase를 사용하는 것이 바람직하다. 향후의 연구에서는 현재까지의 screening 결과를 바탕으로 HIV 유래의 reverse transcriptase를 이용한 enzyme assay, DNA polymerase α 와 β 에 대한 inhibition assay를 병행하여 특이적인 역전

사효소 저해제를 분리 정제하고, virus의 세포배양을 이용한 항 virus 활성 평가와 독성 측정등을 통해서 AIDS 및 retrovirus에 관련된 각종 질병에 대한 치료제의 개발도 가능할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- (1) Gallo, R.C. and H.Z. Streicher: In "AIDS, modern concepts and therapeutic challenges" ed by Border S., Marcel Dekker, New York and Basel (1986).
- (2) Gallo, R.C., S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer, M. Kaplan, B.F. Haynes, T.J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster and P.D. Markham; Science, **224**, 500 (1984).
- (3) Barre-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Danquet, C. Axler-Blin, F. Brunvezinet, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier; Science, **220**, 868 (1983).
- (4) Mitsuya H. and S. Broder; Nature, **325**, 773 (1987).
- (5) Karpas, A., G.W.J. Fleet, R.A. Dwek, S. Petursson, S.K. Namgoong, N.G. Ramsden, G.S. Jacob and T.W. Rademacher; Proc. Natl. Acad. Sci., **85**, 9229 (1988).
- (6) Nakashima, H., Y. Kido, N. Kobayashi, Y. Motoki, M. Neushul and N. Yamamoto; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **31**, 1524 (1987).
- (7) Mcquade, T.J., A.G. Tomasselli, L. Liu, V. Karacostas, B. Moss, T.K. Sawyer, R.L. Henrikson and W.G. Tarpley;

- Science, **247**, 454 (1990).
- (8) Pauwels, R., K. Andries, J. Desmyter, D. Schols, M.J. Kukla, H.J. Breslin, A. Raeymaeckers, J.V. Gelder, R. Woestenborghs, H. Heykants, K. Schellekens, M.A.C. Janssen, E.D. Clercq and P.A.J. Janssen; *Nature*, **343**, 470 (1990).
- (9) Numata M., K. Nitta, R. Utahara, K. Maeda and H. Umezawa; *J. Antibiotics*, **28**, 757 (1975).
- (10) Nishio, M., A. Kuroda, M. Suzuki, K. Ishimaru, S. Nakamura and R. Nomi; *J. Antibiotics*, **36**, 761 (1983).
- (11) Hanajima, S., K. Ishimaru, K.-I. Sakano, S.K. Roy, Y. Inouye and S. Nakamura; *J. Antibiotics*, **38**, 803 (1985).
- (12) Tanaka N., T. Okabe, N. Tanaka, Y. Take, Y. Inouye, S. Nakamura, H. Nakashima and N. Yamamoto; *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **77**, 324 (1986).
- (13) Hoshino, N., N. Shimizu, N. Shimada, T. Takita and T. Takeuchi; *J. Antibiotics*, **40**, 1077 (1987).
- (14) Sethi M.L.; *J. Pharm. Sci.*, **72**, 538 (1983).
- (15) Sethi M.L.; *J. Pharm. Sci.*, **74**, 889 (1985).
- (16) Sethi M.L.; *Phytochemistry*, **24**, 447 (1985).
- (17) Kakiuchi, N., M. Hattori, T. Namba, M. Nishizawa, T. Yamagishi and T. Okuda; *J. Nat. Prod.*, **48**, 614 (1985).

- (18) Inouye, Y., K. Yamaguchi, Y. Take and S. Nakamura;
J. Antibiotis, **42**, 1523 (1989).
- (19) Shen, Y.-L., W.-C. Ye, S.-X. Zhao, Y.-Z. Shu, M. Wataya,
N. Kakiuchi, M. Hattori, K. Matsuura and T. Namba;
Shoyakugaku Zassi, **42**, 35 (1988).
- (20) Nakashima, H., Y. Kido, N. Kobayashi, M. Neushul and
N. Yamamoto; J. Cancer Res. Clin. Oncol., **113**, 413 (1987).
- (21) Nakashima, H., Y. Kido, N. Kobayashi, Y. Motoki,
M. Neushul and N. Yamamoto; Antimicrob. Agents and
Chemother., **31**, 1524 (1987).
- (22) Nakamura, Y., E. Ono, T. Kohda and H. Shibai; J. Antibio-
tics, **42**, 7583 (1989).
- (23) 福島清吾, 川俣順一; 抗癌中薬の臨床應用, 醫齒藥出版株式會社,
1987, 東京.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.