

## Ginsenosides에 의한 F9 기형암종세포의 분화유도 과정에서 cAMP의 작용

이열남<sup>1</sup> · 이호영<sup>1</sup> · 이유미<sup>1</sup> · 김신일<sup>2</sup> · 김영숙<sup>2</sup> · 김규원<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 분자생물학과, <sup>2</sup>한국인삼연초연구원  
(1996년 12월 28일 접수)

### Effect of cAMP on the Differentiation of F9 Teratocarcinoma Stem Cells Induced by Ginsenosides

Youl-Nam Lee<sup>1</sup>, Ho-Young Lee<sup>1</sup>, You Mie Lee<sup>1</sup>, Shin-Il Kim<sup>2</sup>,  
Young-Sook Kim<sup>2</sup> and Kyu-Won Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735,

<sup>2</sup>Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon, 305-345, Korea

(Received December 28, 1996)

**Abstract :** The role of cAMP in the differentiation process of F9 cells induced by ginsenosides was examined by performing transient transfection assay with CRE-luciferase reporter plasmid, GR transactivation assay with GRE-luciferase activity with or without treatment of cAMP and forskolin, an activator of adenylate cyclase, and protein kinase A assay in the presence of ginsenosides. Ginsenosides had no effect on CRE-transactivation activity, whereas retinoic acid induced the activity. When cAMP or forskolin was treated with ginsenosides, GRE-luciferase activity was further augmented by them. In addition, ginsenosides induced protein kinase A activity in the presence of cAMP. These results suggest that ginsenosides activate cAMP-dependent protein kinase A which, in turn, increase GR activity in F9 cells.

**Key words :** Ginsenosides, differentiation, F9 teratocarcinoma cells, cAMP.

## 서 론

F9 기형암종세포는 여러 종류의 세포로 분화될 수 있는 특성을 가지고 있어 초기 배발생과정이나 분화과정, 세포분화와 암화과정간의 상관관계, 분화인자들의 작용기작에 관한 모델시스템으로 사용이 가능하다. 최근 암세포의 성장을 억제하거나, 분화를 유도하는 분화유도 인자들은 이형성세포들의 분화를 유도하여 정상세포로 변화시킴으로서 새로운 항암물질로 기대되고 있다. Ginsenosides는 *Panax Ginseng* C. A. Meyer로 부터 추출한 물질로서 쥐의 간과 신장에서 RNA와 단백질 합성을 촉진하고, 정상조직의 여러 가

지 대사과정을 활성화 시킨다는 보고가 있다.<sup>1,2</sup> 그리고 Morris hepatoma cell인 MHC1세포에 인삼의 ginsenoside를 처리하면 reverse transformation이 일어난 정상세포들이 발견되며, 특히 ginsenoside Rh1과 Rh2가 B16 melanoma 세포의 분화를 유도함이 연구되었다.<sup>3</sup> 또한 본 실험실에서도 ginsenosides가 F9 기형암종세포의 분화를 유도하는 작용이 있음을 발표하였다.<sup>4</sup> 인삼의 여러 가지 성분중에서 특히 ginsenoside Rh1과 Rh2가 분화효과가 뛰어난 것을 확인하였고, 이러한 분화과정에서 glucocorticoid receptor(GR)와의 상호작용이 존재함을 제시하였다. 즉 ginsenosides가 glucocorticoid hormone과 구조적

유사성을 가지고 있음에 착안하여 glucocorticoid가 세포내에서 GR과 결합하여 핵내에서 목표 유전자의 발현을 조절하는 기작을 가지는 것과 마찬가지로 F9 세포의 분화과정에서 ginsenosides와 GR이 상호작용하여 분화관련 유전자의 발현을 조절하는 기작이 관여할 것이라는 가능성을 제시하였다. 그러나 GR과의 상호작용외에도, cyclic AMP(cAMP)를 ginsenosides와 함께 처리하면 F9 세포가 parietal endoderm과 유사한 세포로 분화되므로 cAMP에 의한 신호전달 과정이 ginsenosides에 의한 분화유도에 관여할 가능성이 있다. 따라서 cAMP와 ginsenosides에 의한 F9 세포의 분화 유도에 있어서 cAMP의 상관관계를 규명할 필요가 있다. 실제로 cAMP는 세포내 신호전달 과정에서 중요한 신호전달 물질로서 protein kinase A(PKA)를 경유한 인산화에 의한 조절작용뿐 아니라 촉진유전자 부위에 cAMP response element (CRE)를 가지고 있는 유전자들의 발현을 조절함으로써 여러 가지 세포내 현상들에 관여한다고 알려져 있다.<sup>6, 7</sup> 또한 GR의 활성화 과정에 cAMP를 통한 신호전달 과정이 관여한다는 보고도 있다.<sup>8, 12)</sup> 따라서 이러한 보고들을 근거로 본 연구에서는 CRE-transactivation을 조사함으로써 cAMP에 의한 유전자 발현조절이 ginsenosides에 의해 유도되는 F9 세포의 분화과정에 관여하는지 알아보고자 한다. 또한 ginsenosides에 의한 GR의 활성화 과정에 cAMP에 의한 신호전달이 관여하는지를 조사하기 위하여 PKA의 활성제를 처리하여 GR의 transactivation activity를 측정하고, ginsenosides가 PKA의 활성화에 영향을 주고, PKA의 활성화의 증가가 GR의 활성화와 상호 관련성이 있는지를 PKA assay를 통해 조사해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 재료

F9 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였다. Retinoic acid (RA)와 cyclic AMP(cAMP)는 Sigma사에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), antibiotics는 Gibco Laboratories로 부터 구입하여 사용하였다. Tissue culture flasks는 Costar에서 구입하였고, 그외 다른 시약

및 재료들은 Sigma사 또는 Bio-Rad, Bethesda Research Laboratories에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 세포주와 세포배양

F9 기형암종 세포는 멸균 Millipore filter로 여과된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% 열변성 fetal bovine serum(FBS), 4.5 g glucose, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 44 mM sodium bicarbonate, penicillin(100 units/ml)과 streptomycin(100 µg/ml)을 포함한 배지에서 배양하였다. 배양조건은 H<sub>2</sub>O로 포화된 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하며, trypsin/EDTA를 처리하여 매 2~3일 마다 계대배양하고, passage는 15회 이하의 것을 사용하였다.

### 3. F9 세포의 분화유도 및 조건

F9 세포의 분화를 유도하기 위해 50 µM의 ginsenoside Rh1 또는 Rh2를 배양액에 가한다. 이 때 분화를 더욱 진행시키기 위해 500 µM의 dibutyl cyclic AMP(C) 및 250 µM의 theophylline(T)을 같이 넣어준다. 분화 과정중에는 2일 간격으로 새배지로 교체하면서 상기 시약을 함께 넣어준다.

### 4. GR expression vector를 이용한 Luciferase Assay

#### (1) Transient transfection

F9 세포를 배양하여 60 mm dish에 계대배양한 뒤, 2시간 이내에 calcium phosphate방법<sup>13)</sup>을 이용하여 GR 발현 벡터와 리포터 벡터로 GRE(glucocorticoid response element)-luciferase 발현 벡터를 함께 transfection하거나, CRE(cAMP response element)-luciferase 리포터 벡터를 단독으로 transfection 한다. 리포터 벡터로 사용한 GRE-luciferase 발현 벡터와 CRE-luciferase 발현 벡터는 서울대 약대 이승기 교수로부터 제공받아 사용한 것으로 pGL2라는 모핵 벡터에 각각 클로닝되어 있고 그 구조는 Fig. 1과 같다. Transfection된 세포는 18~24시간 뒤에 배지를 갈아준 뒤, 50 µM의 ginsenoside Rh1 또는 Rh2를 처리하거나, protein kinase A의 활성제인 cAMP와 forskolin 등을 처리한 다음 24~48시간 뒤에 다음과 같은 방법으로 luciferase assay를 실시한다.

#### (2) Luciferase assay

Luciferase assay는 luciferase assay system (Promega)를 이용한다. Transfection 시킨 뒤, 상기

시약을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포로부터 배지를 제거하고, PBS로 씻어준 뒤, 60 mm culture dish에 250  $\mu$ l 정도의 cell culture lysis reagent를 첨가하고, 10~15분 동안 상온에서 배양한다. 그런 다음 배양용기에 붙어 있는 세포들을 긁어 내고 원심분리하여 상층액을 튜브에 옮긴다. 20  $\mu$ l의 cell extracts와 100  $\mu$ l의 luciferase assay 시약을 상온에서 섞고, luminometer로 10초에서 5분동안 나오는 광을 측정한다.<sup>11)</sup>

**5. PKA assay<sup>15)</sup>**

**(1) Cell extracts preparation**

F9 stem 세포 및 50 M의 ginsenoside Rh1 또는 Rh2를 처리한 F9 세포를 PBS로 씻어내고, extraction buffer(5mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.5)를 처리한다. 그런다음 세포를 긁어모으고, 2분동안 최고 속도로 미세원심분리기로 원심분리한 후 상층액을 취하여 분석에 사용한다.

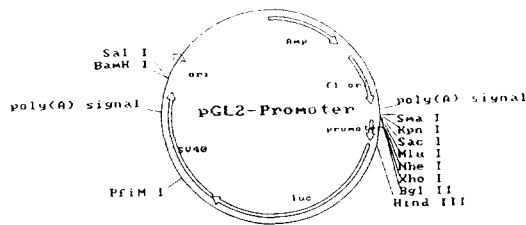
**(2) PKA assay**

Assay는 GIBCO BRL PKA assay system을 사용하여 수행한다. 먼저 PKA substrate에 tracer로 작용할 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP를 20~25  $\mu$ Ci/ml되게 첨가한다. 그런다음 cell extracts 10  $\mu$ l와 PKA 활성제 또는 저해제를 단독으로 첨가하거나, 함께 첨가한 뒤, 각 반응 튜브에 10  $\mu$ l <sup>32</sup>P/substrate를 첨가하여 30°C에서 5분간 반응시킨다. 반응한 시료중에서 20  $\mu$ l를 취하여 phosphocellulose 디스크에 집적한 뒤 1%(V/V)

phosphoric acid로 2~3회 씻어낸다. 마지막으로 디스크를 증류수로 2회 세척한 다음 scintillation vial에 옮기고 cocktail 용액을 첨가하여 liquid scintillation counter로 측정한다.

**결과 및 고찰**

세포내 이차 전령인 cAMP의 농도가 증가하면, 세포 및 바이러스의 프로모터들의 전사활성에 현저한 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이러한 프로모터들의 경우에 cAMP에 의한 전사조절은 CRE 라고 하는 cis-acting DNA 서열을 통해서 매개 된다. 따라서 ginsenosides에 의한 F9 세포의 분화과정에 cAMP에 의한 신호전달과정이 관여하는지를 알기위하여 CRE를 경유한 유전자의 전사조절을 조사하였다. 즉 F9 세포에 CRE-luciferase 리포터 벡터를 transfection한 후 ginsenosides를 단독 처리하거나 cAMP를 함께 처리하여 luciferase 활성을 비교해 보았다. 지금까지 보고된 바에 의하면 미분화상태의 F9 세포에서는 cAMP에 저항성을 나타내지만, retinoic acid



**Upstream Sequence of Luciferase Reporter Constructs**

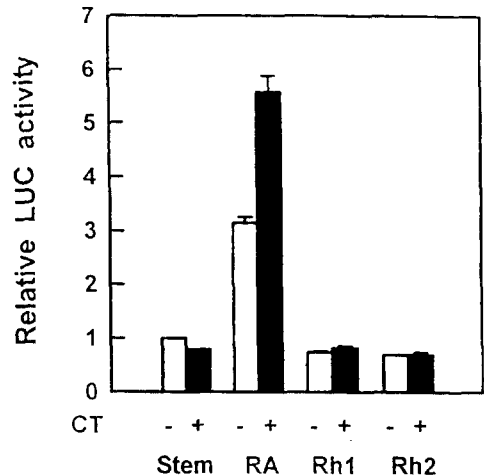
5'...ATCAATGATCTTATGGTACTGTAACTGAGCTAACATAACCGGGA\*GGTACCGAGC\*  
 Bgl II  
 CTTACGGTGCTAGCTCG#AGATCTAAGTAAGCTTGGCCATTCGGTACTGTTGGTAAA  
 Kpn I  
 ATGGAAGACGCCAAAACCATAAAGAAAG 3'

**inserts (synthetic oligonucleotides)**

\*CRE: 5'-GATCTCCTGGCTGACGTCAGAGAGA-3'

#GRE: 5'-CTGTACAGGATGTTCTAGCTACGGTAC-3'

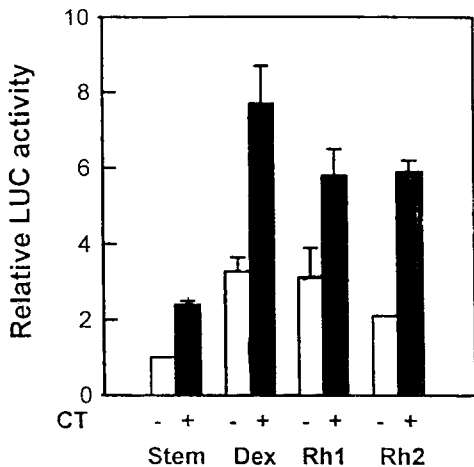
**Fig. 1.** Structures of reporter vectors used in transfection assay.



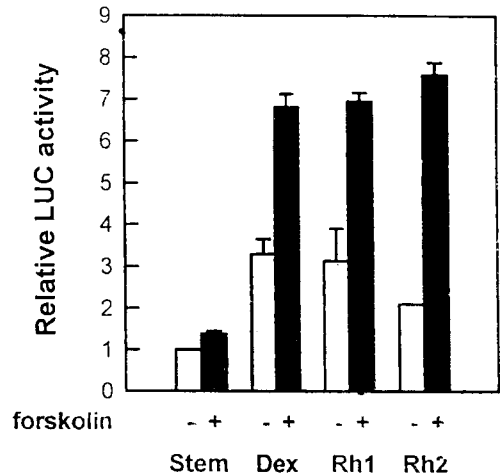
**Fig. 2.** Effect of ginsenosides on the CRE activation. F9 cells were transfected with 5  $\mu$ g CRE-luciferase plasmid (pGL2-CRE). The transfected cells were treated with 50  $\mu$ M ginsenosides (Rh1 or Rh2) or 1  $\mu$ M RA as a positive control alone or with, 500  $\mu$ M dbcAMP and 250 M theophylline (CT) for 36 hr. Luciferase activities are presented as fold activation relative to those of the untreated F9 stem cells (Stem).

(RA)에 의해 분화가 유도되면 cAMP에 반응성을 가진다고 한다.<sup>16-18)</sup> 따라서 RA를 양성대조군으로 사용하여 실험한 결과, Fig. 2에서 보는 것 처럼 RA는 단독처리시 약 3배 증가된 luciferase활성을 나타내었고, cAMP와 함께 처리했을 경우는 약 6배 증가된 활성을 보였으나, ginsenoside Rh1과 Rh2는 cAMP의 존재 유무에 상관없이 CRE에 의한 luciferase 활성을 나타내지 않았다. 이러한 결과로서 ginsenosides는 CRE를 경유하는 유전자 활성화에 관여하지 않으며, ginsenosides에 의해 유도되는 F9 세포의 분화과정에서 GR의 활성화에 의한 유전자 발현의 조절이 cAMP에 의해 활성화되는 인자들과 상호작용에 의한 것이 아니라는 것을 알 수 있었다. 최근 PKA에 의한 활성화가 호르몬에 의해 활성화된 에스트로젠 수용체와<sup>19)</sup> RA 수용체<sup>20)</sup>의 전사 활성을 증가시킨다는 보고가 있다. 다른 스테로이드 수용체들과 같이 GR도 인산단백질로서 그 활성의 조절이 인산화에 의해 매개되며 이것은 glucocorticoid 반응의 경로와 인산화에 의한 신호전달 메커니즘이 연결될 가능성을 제시한다. 실제로 PKA에 의해 직접적으로 GR이 인산화

되어 GR의 DNA 결합 능력이 증가되었다는 보고가 있다.<sup>21)</sup> 따라서 cAMP가 ginsenosides Rh1과 Rh2에 의한 GR의 활성화에 영향을 주는지 조사해 보기 위하여 F9 세포에 GR 발현 벡터와 GRE-luciferase 리포터 벡터를 함께 transfection시킨 후, 50 µM Rh1 또는 Rh2를 단독 처리한 것과 cAMP를 함께 처리한 경우의 luciferase 활성을 비교하였다. Fig. 3에서 보는 것 처럼 Rh1 또는 Rh2를 단독 처리했을 경우에 luciferase 활성이 약 2~3배 증가함에 비해서 cAMP를 함께 처리한 경우에서는 단독처리한 경우의 활성에 비해서 2배 이상의 증가가 관찰되었다. 이것은 양성대조군으로 사용한 dexamethasone (Dex)에 비해 다소 낮은 경향을 나타내었다. 또한 cAMP를 단독 처리했을 때는 아무것도 처리하지 않은 F9 세포보다 2배 정도 증가된 활성이 관찰되었다. cAMP에 의한 상승효과를 좀 더 자세히 살펴보기 위하여 cAMP의 합성에 관여하는 adenylate cyclase의 촉진제인 forskolin을 처리하여 간접적으로 cAMP의 양을 증가시킨 후 luciferase 활성을 조사해 보았다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 것처럼, forskolin을 처리한 경우



**Fig. 3.** Effect of cAMP on the GR transactivation induced by ginsenosides. F9 cells were cotransfected with 5 µg GRE-luciferase vector (pGL2-GRE) and 5 µg GR expression plasmid (pRShGR $\alpha$ ). The transfected cells were treated with 50 µM ginsenosides Rh1, Rh2, or 25 µM Dex alone or with 500 µM dbcAMP and 250 µM theophylline (CT) for 30 hr. Dex was used as a positive control. Luciferase activities are presented as fold activation relative to those of the untreated F9 stem cells (Stem).



**Fig. 4.** Effect of forskolin on the GR transactivation induced by ginsenosides. F9 cells were cotransfected with 5 µg GRE-luciferase vector (pGL2-GRE) and 5 µg GR expression plasmid (pRShGR $\alpha$ ). The transfected cells were treated with 50 µM ginsenosides Rh1, Rh2, or 25 µM Dex alone or with 25 µM forskolin for 30 hr. Luciferase activities are presented as fold activation relative to those of the untreated F9 stem cells (Stem).

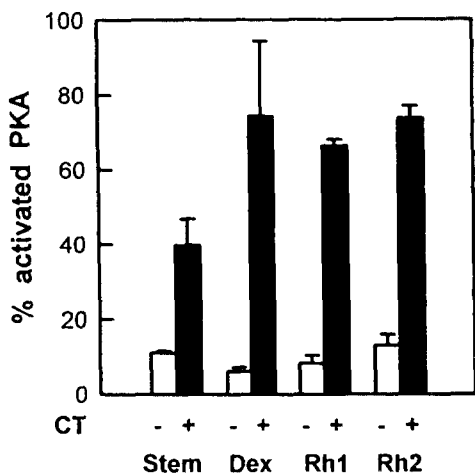
에서 ginsenosides에 의한 GR의 활성화 효과가 더욱 증가한 것을 관찰할 수 있었다. Forskolin에 의한 활성화 증가폭은 cAMP에 의한 증가보다 더 높은 경향을 나타내었다. 이러한 실험들에서 PKA의 촉진제인 cAMP와 forskolin이 ginsenosides에 의해 유도되는 GR의 활성화를 더욱 증가시킴을 알 수 있었다.

다음으로 cAMP가 ginsenosides에 의한 GR의 활성화에 상승효과를 나타내는 이유가 PKA를 직접적으로 경유함으로써 일어나는지를 조사해 보기 위하여 ginsenosides를 단독 처리하거나 cAMP와 함께 처리한 다음 PKA assay를 수행하였다. 그 결과 ginsenosides 또는 cAMP를 단독 처리한 경우에 비해 ginsenoside Rh1 또는 Rh2를 cAMP와 함께 처리한 경우에 PKA 활성이 더욱 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 이러한 증가는 Dex의 경우에도 거의 유사하였다(Fig. 5). 이러한 결과로부터 cAMP의 존재하에 ginsenosides가 PKA의 활성을 증가시킬 수 있으며 이렇게 활성화된 PKA가 ginsenosides에 의한 F9 세포의 분화과정에서 GR의 활성을 조절하는 것으로 추정된다. 이것은 Panax ginseng C. A. Meyer에서

분리된 ginsenosides가 cAMP 분해 효소인 phosphodiesterase의 저해제로 밝혀진 보고에 의해 설명되어 질 수 있다.<sup>22,23</sup> 따라서 ginsenosides가 세포내 cAMP의 농도를 증가시키고 이것이 다시 cAMP에 의한 protein kinase 신호전달 경로를 활성화 하는 것으로 추정이 된다. 요약해 보면 ginsenosides에 의해 유도되는 GR의 활성화는 cAMP에 의한 protein kinase 활성의 증가에 의해 유도되어지며 이것은 F9 세포에서 작용하는 GR의 양적인 조절에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 사려된다.

## 요 약

Ginsenosides에 의해 유도되는 F9 세포의 분화과정에서 cAMP의 역할을 조사하기 위하여 CRE(cAMP response element)-luciferase 리포터 유전자를 이용한 transfection 실험을 수행하였다. 그 결과 ginsenosides는 CRE-luciferase 활성화에 영향을 주지 않았고, 이로서 cAMP에 의한 유전자 발현조절이 F9 세포의 분화과정에 관여하지 않음을 알 수 있었다. 다음으로 cAMP가 ginsenosides에 의해 유도되는 GR(glucocorticoid receptor)의 활성화에 관여하는지를 GR 발현 벡터와 GRE(glucocorticoid response element)-luciferase 리포터 벡터를 이용한 transfection 실험을 통하여 조사하였다. 즉 cAMP를 ginsenosides와 함께 처리하여 GRE-luciferase 활성을 조사해 본 결과 ginsenosides를 단독처리한 경우보다 활성이 증가되었다. 또한 cAMP를 합성하는 adenylate cyclase의 촉진제로서 알려져 있는 forskolin을 함께 처리한 경우에서도 GRE-luciferase 활성이 더욱 증가함이 관찰되었다. 다음으로 이러한 cAMP의 효과가 protein kinase A에 의한 신호전달 과정을 경유하는지를 ginsenosides에 의한 protein kinase A 활성을 protein kinase A assay를 통하여 조사해 보았다. 그 결과 cAMP의 존재하에서 ginsenosides가 protein kinase A를 활성화 시키는 것이 관찰되었다. 이상의 결과로서 ginsenosides에 의한 F9 세포의 분화과정에서 cAMP가 ginsenosides에 의한 GR의 활성화를 더욱 유도하는 것을 알 수 있고, 이것은 ginsenosides가 cAMP-dependent protein kinase A를 활성화 시킴으로써 궁극적으로 GR의 활성화를 조절하는 것으로 예상된다.



**Fig. 5.** Effect of ginsenosides on the PKA activation. Cell extracts were prepared from the F9 stem cells (Stem), F9 cells treated with 50  $\mu$ M ginsenosides Rh1, Rh2, or 25  $\mu$ M dexamethasone (Dex) alone or with 500  $\mu$ M dbcAMP and 250  $\mu$ M theophylline (CT) for 24 hr. PKA assay was performed as described in "Materials and Methods". PKA activities are presented as % activation relative to those of the untreated F9 stem cells.

## 감사의 말씀

본 연구는 고려인삼학회와 한국담배인삼공사의 1994년도 연구지원사업에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다. 본 연구를 위해서 리포터 유전자인 GRE-luciferase와 CRE-luciferase 발현 벡터를 제공하여 주신 서울대학교 약학대학 이 승기 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

## 인 용 문 헌

1. Yamamoto, H., Katano, M. and Matsunaga, H. : *Korean J. Ginseng Sci.* **14**, 244 (1990).
2. Fujikawa-Yamamoto, K., Ota, T., Odashima, S., Abe, H. and Arichi, S. : *Cancer J.* **1**, 349 (1987).
3. Odashima, S., Nakyatu, Y., Hinjo, N. and Arichi, S. : *European J. Cancer* **15**, 885 (1979).
4. Lee, Y. N., Lee, H. Y., Chung, H. Y., Kim, S. I., Lee, S. K., Park, B. C. and Kim, K. W. : *European J. Cancer* **32**, 1420 (1996).
5. Rehfuss, R. P., Walton, K. M., Loriaux, M. M. and Goodman, R. H. : *J. Biol. Chem.* **266**, 18431 (1991).
6. Abrahamsen, M. S., Li, R. S., Dietrich-Goetz, W. and Morris, D. R. : *J. Biol. Chem.* **267**, 18866 (1992).
7. Kurie, J. M., Allopenna, J. and Dmitrovsky, E. : *Biochim. Biophys. Acta.* **1222**, 88 (1994).
8. Gruol, D. J., Campbell, N. F. and Bourgeois S. : *J. Biol. Chem.* **261**, 4909 (1986).
9. Lai, E., Rosen, O. M. and Rubin C. S. : *J. Biol. Chem.* **257**, 6691 (1982).
10. Elks, M. L., Manganiello, V. C. and Vaughan M. : *J. Biol. Chem.* **258**, 8582 (1983).
11. Tashima, Y., Terui, M., Itoh, H., Mizunuma, H., Kobayashi, R. and Marumo F. : *J. Biochem.* **108**, 271 (1990).
12. Singh, V. B. and Moudgil, V. K. : *J. Biol. Chem.* **260**, 3684 (1985).
13. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor, NY, 16.30 (1989).
14. Helmborg, A., Auphan, N., Caelles, C. and Karin M. : *EMBO J.* **14**, 452 (1995).
15. Gruol, D. J., Cambell, N. F. and Bourgeois S. : *J. Biol. Chem.* **261**, 4909 (1986).
16. Martin, G. R. : *Cell* **5**, 229 (1975).
17. Stanton, L. W. and Mahdavi V. : *Cell* **15**, 393 (1978).
18. Strickland, S., Smith, K. K. and Marotti, K. R. : *Cell* **21**, 347 (1980).
19. Cho, H. and Katzenellenbogen, B. S. : *Mol. Endocrinol.* **7**, 441 (1993).
20. Huggenvik, J. I., Collard, M. W., Kim, Y. W. and Sharma R. P. : *Mol. Endocrinol.* **7**, 543 (1993).
21. Rangarajan, P. N., Umesono, K. and Evans, R. M. : *Mol. Endocrinol.* **6**, 1451 (1992).
22. Hiai, S., Sasaki, S. and Oura, H. : *Planta Medica* **37**, 15 (1979).
23. Nikaido, T., Ohmoto, T., Sankawan, U., Tanaka, O., Kasai, R., Shoji, J., Sanada, S., Hiai, S., Sasaki, S., Yokoyama, H., Oura, H. and Kawashima Y. : *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1477 (1984).