

Streptomyces endus YP-10이 생산하는 항암활성 물질의 분리 및 정제

최성원* · 김병찬 · 최선진 · 김동섭¹ · 여의현² · 문순옥³ · 오두환
연세대학교 생명공학과, 생물산업소재연구센터, ¹밀양산업대 식품과학과,
²풀무원 기술연구소, ³수원대학교 생명과학부

Isolation and Purification of Anticancer Material Produced by *Streptomyces endus* YP-1. Choi, Sung-Won*, Byoung-Chan Kim, Sun-Jin Choi, Dong-Seob Kim¹, Ick-Hyun Yeo², Soon-Ok Moon³ and Doo-Hwan Oh. Department of Food & Biotechnology, Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, ¹Department of Food Science, Miryang National University, Kyong Nam 627-130, Korea, ²R & D center, Pulmuone Co., Seoul 120-749, Korea, ³Division of Life Science, The University of Suwon, Suwon 445-743, Korea - Sulforhodamine B (SRB) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, RNA dot blot and Northern hybridization analysis were performed to screen microorganisms for the production of anticancer agent. Among microorganisms tested, strain YP-1 was selected for its cytotoxicity and ability to reduce the level of *c-myc* RNA. Strain YP-1 was identified as *Streptomyces endus*. The anticancer material produced by *Streptomyces endus* YP-1 was sequentially purified by solvent extraction, silica gel column chromatography, preparative TLC and preparative HPLC. The cancer material identified as azalomycin B by the instrumental analyses such as ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Mass, IR and UV absorption. It was colorless amorphous powder and its molecular weight was 1025.278. Azalomycin B, produced by *Streptomyces endus* YP-1, showed anticancer activity against several human cancer cell lines and reduction of c-Myc protein level in Colo320 DM cells which was determined by Western blot analysis.

1980년대 이후 암세포발생에 관여하는 발암유전자에 대한 이해가 증가되었고 이들은 세포의 증식 및 분화를 조절하는 성장인자의 신호전달체계에서 중요한 역할을 담당하는 유전자들이 확인되었다(1). 이들 유전자들의 증폭, translocation 및 mutation 등이 암세포에서 발견되고 있으며 이와같은 변형은 암세포로의 변형에 중요한 원인이 되고 있다(2).

Polypeptide 성장인자들은 그들의 세포막 수용체에 특이적으로 결합하여 세포로 하여금 diacylglycerol(DG) 및 inositol-1,4,5-triphosphate(IP₃) 등의 second messenger를 생산하게 하며 이들은 각각 특정 protein kinase를 활성화시킴으로써 세포의 증식을 촉진한다고 알려지고 있다(3,4). 이들 kinase들의 중요한 역할중의 하나는 세포질의 신호를 핵으로 전달함으로써 *c-fos* 및 *c-myc* 등의 proto-oncogene의 전사를 촉진하는 것으로 알려지고 있다(5, 6). 최근 많은 연구자들이 세포의 암화와 직접 관련이 있는 성장인자의 신호전달체계를 target으로 효과적인 항암제를 개발하려고 노력하고 있으며(7) 이미 이 신호전달과정을 대상으로 한 몇몇의 항암제가 개발되

고 있다. 예를 들어 성장인자의 수용체의 저해제인 suramin, protein kinase C의 저해제인 bryostatins 및 staurosporin 및 inositol 신호전달을 저해하는 myo-inositol analogue 등이 여기에 속한다(7).

많은 암세포에서 translocation 및 증폭에 의하여 과다 발현되는 *c-myc* 유전자를 target으로 하여(8-10), 성장인자의 신호전달체계의 최종단계인 proto-oncogene의 발현을 억제하는 물질을 탐색함으로써 새로운 항암제를 개발하고자 하였다. *c-myc* 유전자의 변형은 이들 암세포의 발생에 중요한 원인이 된다고 알려지고 있다(8-10). 따라서 이들 암세포에서의 *c-myc* 유전자의 발현억제는 효과적인 항암효과를 나타낼 것으로 기대된다. 효과적인 항암제의 탐색을 위하여 토양에서 분리한 방선균을 항암활성에 의하여 선별한 후 *c-myc* RNA의 양을 감소시키는 활성을 가진 균주를 선별하였고, 항암물질을 분리 정제하여 그 화학구조를 확인하였으며 이 물질의 항암활성을 확인하였다.

재료 및 방법

방선균 배양추출액의 준비

본 연구에서는 생명공학연구소에서 분양받은 방선균주를 사용하였다. 방선균을 항암제 탐색배지(2.0% suc-

*Corresponding author

Tel. 82-2-361-3595, Fax. 82-2-313-5862

E-mail: ysbioamat@chollian.net

Key words: *Streptomyces endus*, Anticancer material, Azalomycin B

ose, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 를 이용하여 30°C에서 7일간 진탕배양한 후 같은 양의 acetone을 첨가하여 4°C에서 24시간 처리하였다. 원심분리에 의하여 균체를 제거한 후 상등액을 취하여 감압농축함으로써 acetone을 제거하여 배양추출액을 준비하였다.

세포배양

인체암세포인 Colo320 DM과 HSR(Colon adenocarcinoma, ATCC CCL220, 220.1), A549(lung carcinoma, ATCC CCL185) 및 HL60(promyelocytic leukemia, ATCC CCL240) 세포는 RPMI-1640에 10%(v/v) fetal bovine serum(Hyclone)을 혼합한 배지에 100 unit의 streptomycin/penicillin을 첨가한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. NIH 3T3(mouse fibroblast, ATCC CRL 1658)는 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM)에 5% bovine calf serum(Hyclone)을 첨가한 배지에서 위와 같은 조건으로 배양하였다.

MTT assay

세포를 1×10^4 /well로 96 well plate에 분주한 뒤 37°C, 5% CO_2 배양기내에서 24시간 동안 배양하였다. 10 μl 의 항암활성물질을 24시간 처리한 후 MTT solution(5 mg/ml, in Hank's balanced salt solution)을 50 μl 씩 각 well에 첨가하여 4시간을 더 배양하고 배지를 제거하였다. DMSO를 100 μl 씩 각 well에 가하고 잘 교반하여 침전물을 완전히 용해한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(11).

Northern hybridization

20 μg 의 total RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel로 전기영동한 후 positively charged nylon membrane에 transfer한 후 UV transilluminater로 고정하였다. Nylon membrane을 hybridization 용액(50% formamide, 2% blocking agent, 4% SDS, $5 \times \text{SSPE}$)으로 42°C에서 2~6시간 prehybridization시킨 후 새로운 hybridization용액에 ^{32}P 로 label된 *c-myc* probe를 가하고 42°C에서 24시간 hybridization하였다. *c-myc* probe는 human *c-myc* exon 3의 1.4 kb(*EcoRI*-*Clal*)fragment를 random primer DNA labelling kit를 이용해 α - ^{32}P -dCTP로 label하여 준비하였다. Hybridization 후 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS로 상온에서 15분간 2회 세척하고, 다시 $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS로 60°C, 15분간 2회 세척하여 XAR5(KODAK) film으로 autoradiography를 행하였다.

Western blot 분석

세포를 2×10^6 /ml로 분주하고 24시간 배양한 후 항암

활성물질을 일정시간 처리한 다음 200 g에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 모은 후 SDS sample buffer(60 mM Tris · Cl; pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 첨가하여 세포내 단백질을 녹였다. 동량의 단백질을 10% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 nitrocellulose(NC) membrane으로 electrotransfer하였다. 단백질이 blot된 NC membrane을 blocking buffer(10 mM Tris · Cl; pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 3.0% nonfat dry milk)로 1시간 처리한 후 polyclonal *c-myc* antibody(Upstate Biotechnology Incorporated)를 첨가한 binding buffer(10 mM Tris · Cl; pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% nonfat dry milk)에서 1시간 처리한 후 alkaline phosphatase가 label된 secondary antibody를 1시간 처리하였다. Alkaline phosphatase의 활성은 X-phosphate 및 nitro-blue tetrazolium(Boehringer Mannheim)을 이용한 발색반응으로 확인하였다.

선별균주의 동정

선별된 균주의 동정은 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"(12), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(13-구11), Goodfellow와 Alderson의 방법(14-구 12), Williams, Goodfellow와 Alderson 등의 방법(15, 16-구13, 14), Berd의 방법(17-구15)에 의하여 행하였다. 선별균의 동정을 위하여 세포벽의 diaminopimelic acid (DAP)분석, 아미노산 분석 그리고 세포내의 환원당을 분석하였다. 또한 균주의 형태학적 특성, 배양학적 특성 및 casein, tyrosine, xanthine, hypoxanthine, chitin, starch, gelatin분해성, 탄소원, 질소원 이용성 등을 검토하였다.

발효조건

Streptomyces endus YP-1 균주로부터 *c-myc* gene 발현 저해 항암활성물질의 생산은 sucrose 2%, soluble starch 1%, soybean meal 2.5%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.025%, CaCO_3 0.2%, beef extract 0.1%로 구성된 배지를 사용하였으며, 1 l shake flask에 150 ml씩 배지를 첨가하여 30°C, 150 rpm으로 4일간 배양한 종균을 4 l의 배지를 함유한 5 l의 발효조에서 3%(v/v)로 접종하여 통기량 1.5 vvm, 교반속도 30 rpm, 배양온도 30°C에서 7일간 배양하였다.

분리 및 정제

Streptomyces endus YP-1 배양액 4 l를 acetone 추출한 후 농축하여 acetone을 제거하고, 남은 물층을 동량의 n-BuOH로 추출하였다. n-BuOH층을 농축건조한 후, 이

를 chloroform-water(1:1)의 용매에 용해하고 chloroform층을 다시 농축하여 silica gel column을 행하였다. Silica gel column chromatography에서 CHCl₃-IPA(9:1~5:5)를 용매로 단계별로 전개시켜 활성분획을 얻고 이를 농축 건조하였다. 이를 다시 silica gel preparative TLC 상에서 CHCl₃-IPA(7:3)을 용매로 전개하여 활성분획을 모으고, 이를 preparative HPLC(silica type, cyclohexane-IPA(8:2); C₁₈ type, 60% MeCN)를 실시하여 분리 정제하였다.

항암활성물질의 구조분석

최종적으로 얻어진 정제시료로 UV scanning(BACKMAN DU-600), Infra Red spectroscopy(Perkin-Elmer 1710), Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy(Bruker-400) 및 Mass spectroscopy(VG Trio-2 spectrometer) 등을 행하였다.

항균 spectrum의 검토

선별균주가 생산하는 물질이 미생물의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 gram 양성세균 7종, gram 음성세균 6종, 효모 4종 및 곰팡이 3종을 피검균으로 하여 실험을 행하였다. 항균활성 검토를 위하여 사용한 피검균은 한국중균협회에서 분양 받아 사용하였다. 배지를 30 ml씩 petri-dish에 분주하여 굳힌 후 피검균의 배양액 혹은 포자용액과 soft agar를 혼합하여 균일하게 중층시켜 각 균주의 검정 plate를 제조하였다. *Streptomyces endus* YP-1으로부터 정제된 항암활성물질을 100% MeOH에 녹인 후 100 µl(10 µg/ml)를 paper disc에 흡착시켜 건조시킨 후 검정 plate에 올려 놓고, 세균의 경우 37°C, 효모와 곰팡이의 경우 30°C에서 배양하여 나타난 생육저지환의 크기를 측정하였다.

결과 및 고찰

균주선별

생명공학연구소에서 분양 받은 총 3214균주 배양액의 acetone 추출액을 암세포주인 A549 세포에 처리한 후 SRB assay를 통해 1차적으로 세포독성 효과가 있는 152균주를 선별하였다. 2차적으로 이 선별균주의 배양추출물을 NIH 3T3 세포에 처리하여 A549 세포에 더 강하게 작용하는 항암활성을 나타내는 균주를 선별하였다. 선별된 12개의 균주중 *c-myc* 유전자 발현에 영향을 미치는 균주를 선별하기 위하여 RNA dot blot 분석을 통하여 *c-myc* RNA양을 감소시키는 활성이 있는 strain YP-1을 선별하였다(data not shown). 선별균주의 배양추출액을 Colo320 HSR cell line에 각 50 µl/ml, 100 µl/ml, 200 µl/ml의 농도로 첨가하여 24시간 처리한 후 North-

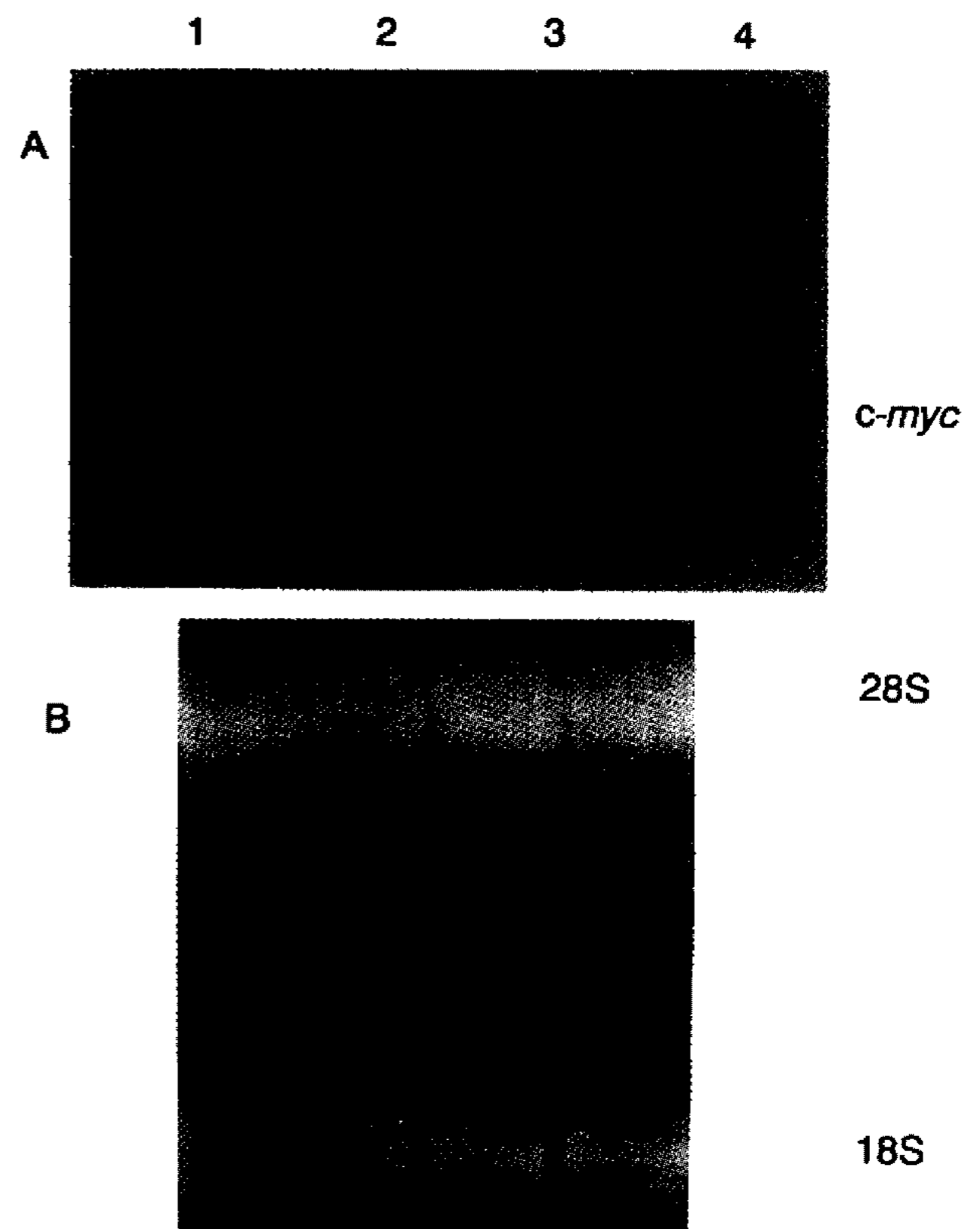


Fig. 1. Northern hybridization analysis of Colo320 HSR cell line treated with *Streptomyces endus* YP-1 culture extract.

Twenty five microgram of total RNA was loaded per lane and Northern blot hybridization was performed as described in materials and methods. A; Northern blot analysis B; gel stained by EtBr after electrophoresis 1; control, 2; 50 µl/ml, 3; 100 µl/ml, 4; 200 µl/ml of the *Streptomyces endus* YP-1 culture extract was treated.

ern hybridization을 이용하여 *c-myc* mRNA의 변화를 조사해 본 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 *c-myc* RNA 양이 감소됨을 확인할 수 있었다.

균주 동정

균주의 동정을 위하여 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"와 Berd등의 방법, Williams 등의 방법에 의거하여 결과를 종합하여 볼 때 strain YP-1은 LL-type의 DAP와 glycine으로 연결된 peptide를 가지는 peptidoglycan type A3이며 cell wall type I에 해당되고, 또한 특정한 당이 검출되지 않았으므로 sugar pattern C에 해당됨을 알 수 있었다. 또한 casein, tyrosine, xanthine, hypoxanthine의 분해능을 나타내었으므로 Berd등의 방법에 의해 *Streptomyces* 속임을 알 수 있었다(Table 1). *Streptomyces* sp. YP-1은 spore chain이 open-spiral한 형태이며 표면이 warty한 형태를 보이는 것으로 보아 *Streptomyces endus*와 동일한 것으로 동정되었다(Fig. 2).

분리 및 정제

선별된 균주의 배양액을 BuOH추출 후 농축건조하고

Table 1. Biochemical characteristics of the selected strain

		Concentration %	Growth
Carbon	Sucrose		+
	Mannitol		++
	Xylose		++
	Dextran		+
	Mannose		++
	Cellobiose		++
	Galactose		++
	Lactose		++
	Inulin		-
	Salicin		+
	Rafficin		++
	Sodium acetate		-
	Sodium citrate		-
	Sodium propionate		-
Nitrogen	Potassium nitrate		++
	L-Threonine		++
	L-Arginine		++
	L-Valine		++
	L-Methionine		-
	L-Serine		++
	L-Phenylalanine		++
	L-Histidine		++
Inhibitor	NaCl	4.0	+
		7.0	-
		10.0	-
		13.0	-
	Sodium azide	0.01	+
		0.02	-
	Phenol	0.1	-
	Crystal violet	0.1	-
Factor	Hydrolysis of		
	gelatin		+
	starch		+
	chitin		-
	casein		+
	Decomposition		
	of tyrosine		+
	of xanthine		+
of hypoxanthine		+	

이것을 water-chloroform(1:1)의 용매로 녹여 chloroform추출을 한 뒤 다시 농축건조하였다. 이를 silica gel column chromatography, preparative TLC, preparative HPLC를 행하여 8 mg의 부정형 백색분말을 정제하였고 이를 YP-1-1이라 명명하였다(Fig. 3).

Streptomyces sp. YP-10이 생산하는 항암활성물질의 항균 spectrum

선별균주가 생산하는 항생물질이 미생물의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 gram양성세균 7종, gram 음성세균 6종, 효모 4종, 곰팡이 3종을 피검균으로 하여 실험을 행하였다. 선별균주가 생산하는 항암활성물질의 각

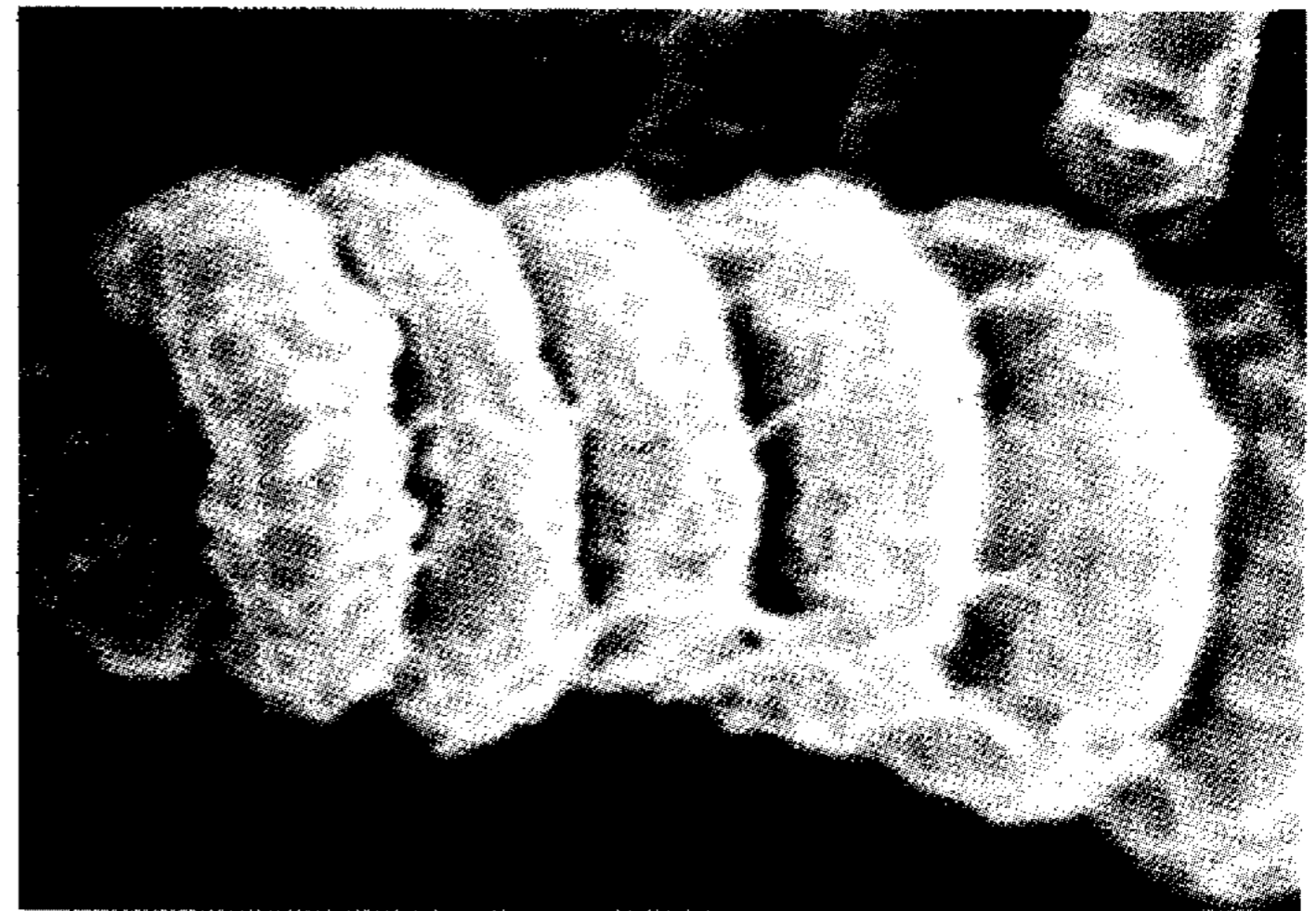


Fig. 2. Scanning electron microscopic photograph of *Streptomyces endus* YP-1 (X200,000).

종 미생물에 대한 항균 spectrum을 검토해 본 결과를 Table 2에 나타내었다. 선별균주가 생산하는 물질은 그람음성세균보다는 그람양성세균에 대하여 강한 항균활성을 보였다.

구조분석 및 물리화학적 특성

CD₂Cl₂를 용매로 하고 TMS를 표준물질로 하여 400 MHz NMR로 측정된 결과, 7~5 ppm의 signal에서 불포

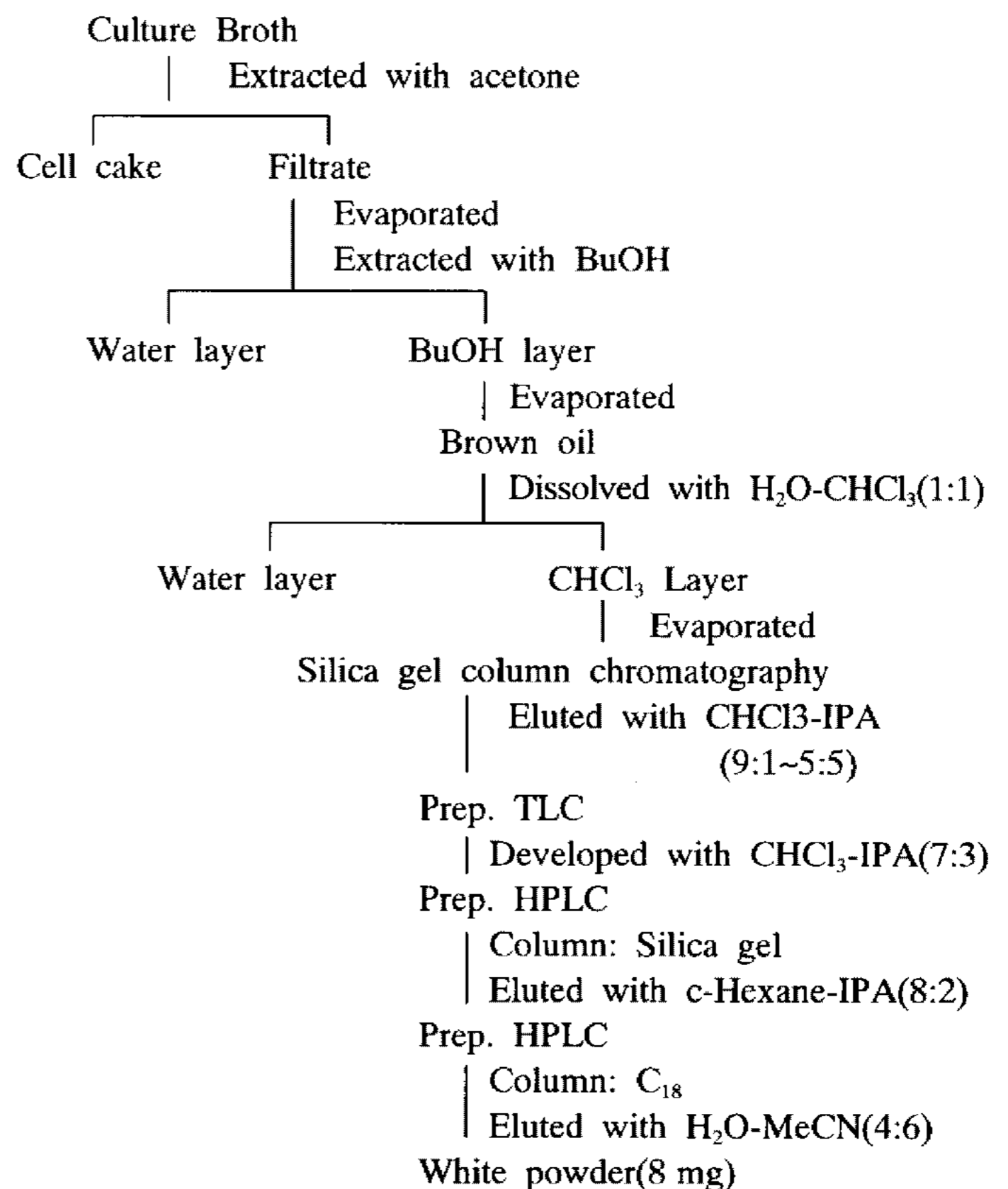


Fig. 3. Purification procedure of azalomycin B produced by *Streptomyces endus* YP-1.

Table 2. Antimicrobial spectrum of anticancer material produced by *Streptomyces endus* YP-1.

Microorganism	Inhibitory zone
Gram negative	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	+
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
Gram positive	
<i>Bacillus megaterium</i>	-
<i>Bacillus polymyxa</i>	++
<i>Bacillus subtilis</i>	+++
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	+
<i>Brevibacterium sp.</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++
<i>Staphylococcus faecalis</i>	-
Yeast	
<i>Candida krusei</i>	-
<i>Candida pseudotropicalis</i>	-
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	-
<i>Saccharomyces uvarum</i>	-
Fungi	
<i>Pirycuraria oryzae</i>	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-
<i>Boturitus cineria</i>	+

Inhibitory zone: 5~10 mm +, 11~15 mm ++, 16~20 mm +++.

화 ester system의 양상과 4, 8 ppm의 signal에서 methoxyl group의 존재를 보이는 점 등 전반적인 spectrum 양상(Fig. 4)과 $\delta 169.97$ 에서 1번 탄소와 $\delta 99.11$ 에서 11번 탄소, $\delta 93.29$ 에서 22번 탄소의 peak는 azalomycin B와 일치하였으며(Fig. 5), UV spectrum에서 253 nm에서 최대흡수를 보인 결과를 종합하여 본 물질은 *Streptomyces melanosporous*에서 처음 분리된(18) azalomycin

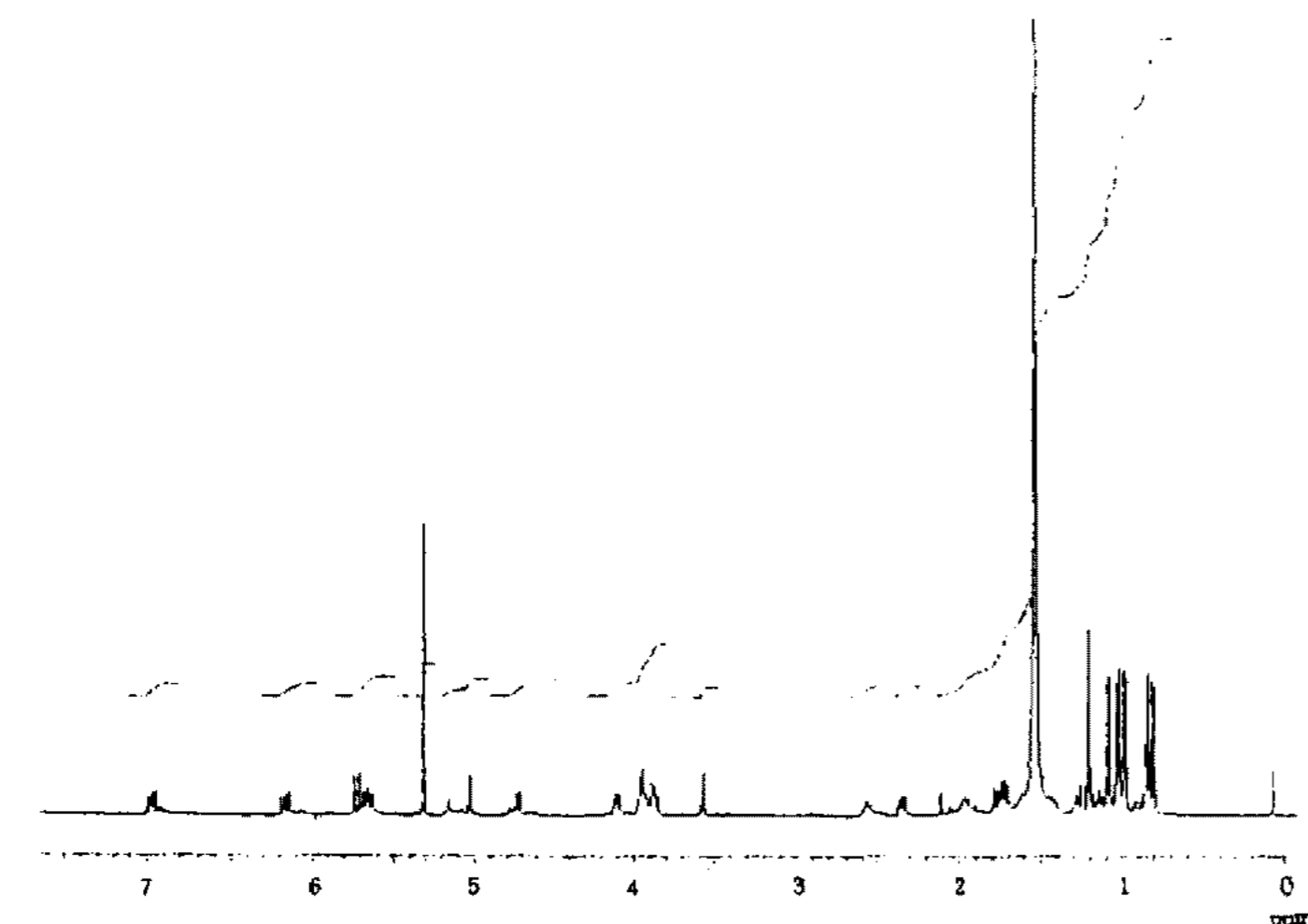


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of azalomycin B produced by *Streptomyces endus* YP-1.

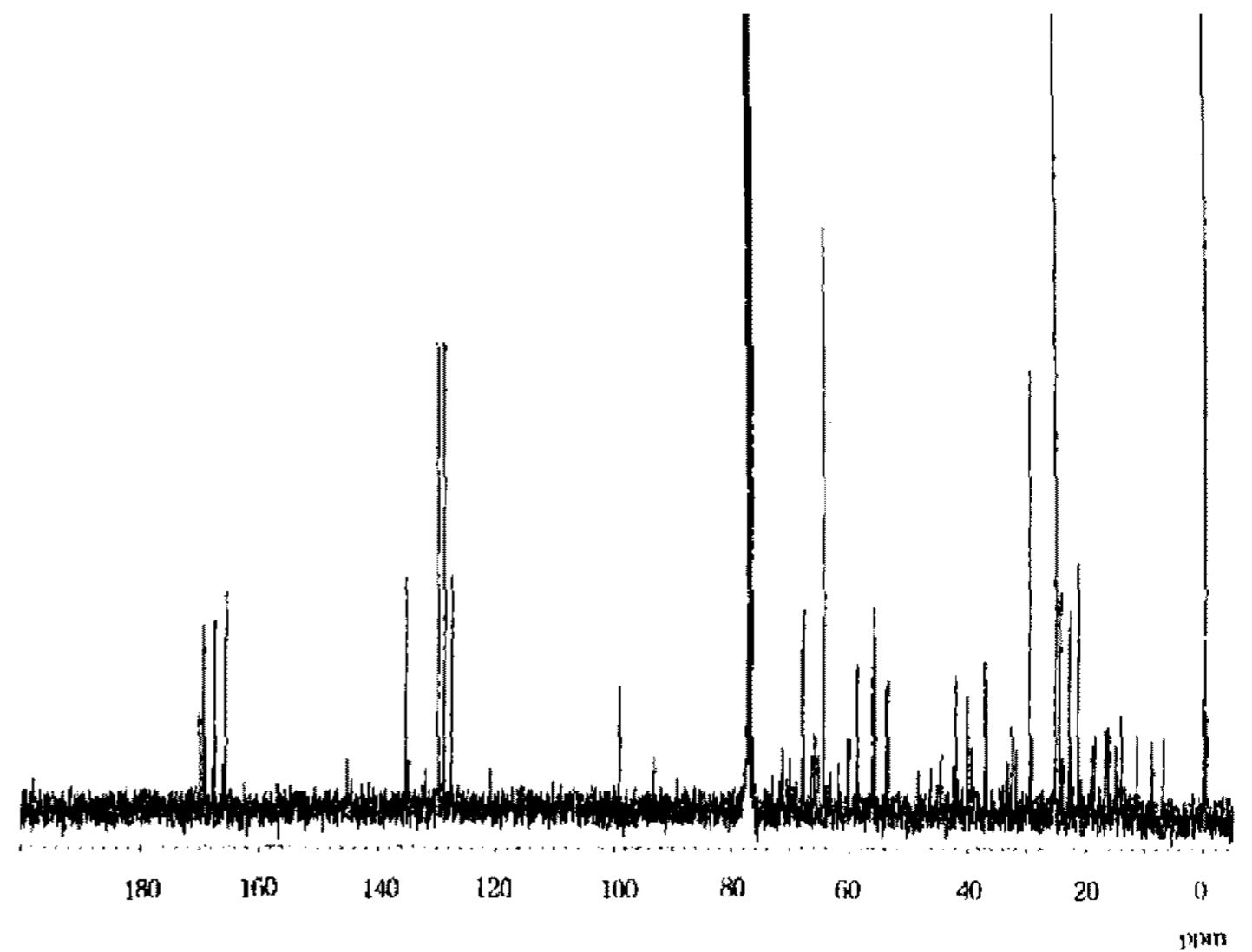


Fig. 5. ¹³C-NMR spectrum of azalomycin B produced by *Streptomyces endus* YP-1.

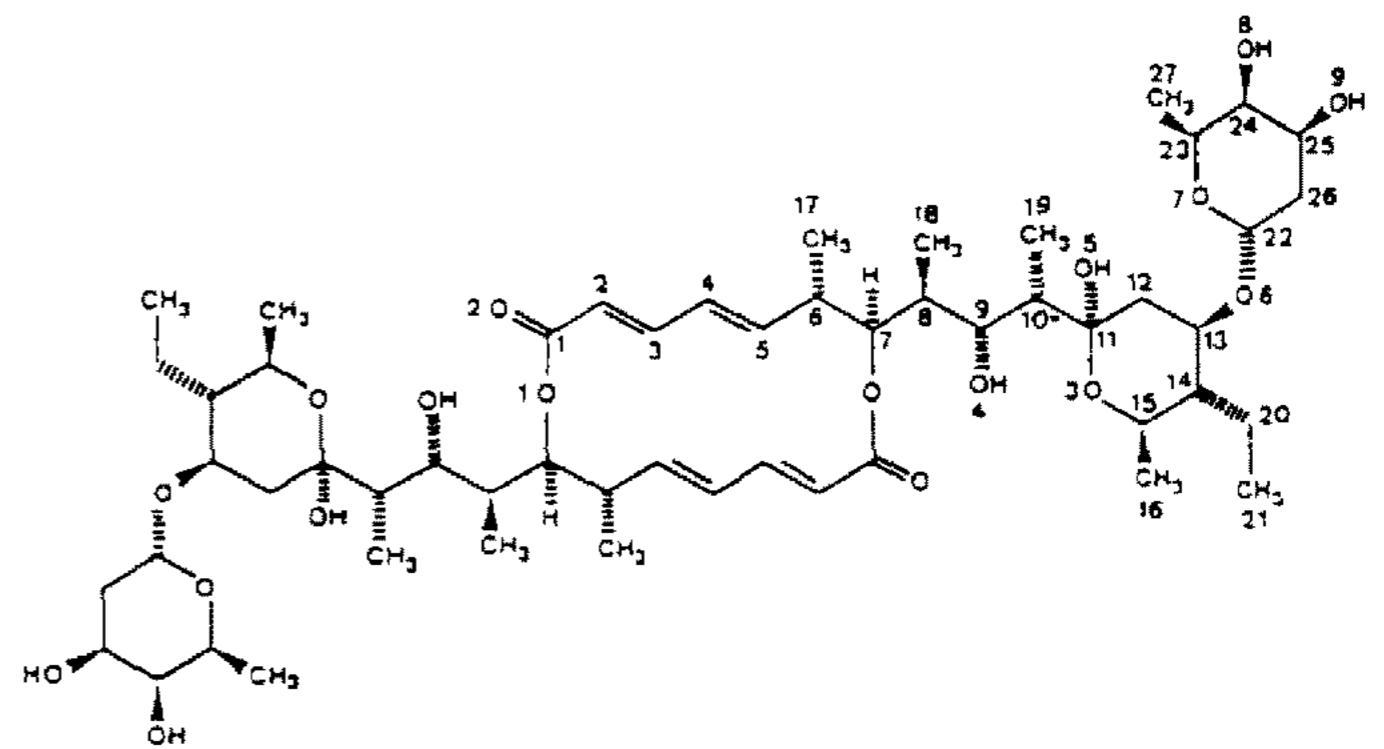


Fig. 6. Molecular structure of azalomycin B from *Streptomyces endus* YP-1.

B와 동일 물질로 확인되었다(Fig. 6). YP-1-1(azalomycin B)은 methanol, DMSO에 녹으며 benzene 및 ether에는 녹지 않는 등의 물리화학적 특성을 보였다(Table 3).

***Streptomyces endus*가 생산하는 Azalomycin B의 항암활성**

Table 3. Physico-chemical properties of azalomycin B produced by *Streptomyces endus* YP-1

Examined	Characteristics
Nature	Colorless amorphous powder
Molecular formula	C ₅₄ H ₈₈ O ₁₈
Molecular weight	1025.278
UV $\lambda_{max}^{(MeOH)}$ nm	253
IR ν_{max} cm ⁻¹	1700, 1720
MP	106-109°C
Solubility	
Soluble	DMSO, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , MeOH
Insoluble	H ₂ O, EtOAc, Hexane, Benzene

Table 4. Effect of azalomycin B on the human cancer cell lines and mouse fibroblast cell line

Cell lines	IC ₅₀ (μM)*
A549	11.70
Colo320 DM	6.69
Colo320 HSR	4.01
HL-60	5.35
NIH 3T3	17.83

*The IC₅₀ is the concentration of azalomycin B that decreases the absorbance to 50% of control in MTT assay.

Azalomycin B는 macrocyclic lactone계 항생제로서 최근에는 gastric H⁺, K⁺-ATPase 활성을 저해한다고 보고되고 있으나(19) 항암활성에 대하여는 거의 알려지고 있지 않은 실정이다. *Streptomyces endus*가 생산하는 azalomycin B가 인체 암세포 및 NIH 3T3 세포에 대한 세포독성을 MTT assay에 의하여 관찰한 결과 Colo320 HSR세포에 대하여 IC₅₀가 4.01 μM이었고, NIH 3T3에서 대하여 IC₅₀가 17.83 μM을 나타내었다(Table 4). 이 실험의 결과는 azalomycin B가 인체 암세포에 효과적으

로 작용하는 활성을 가지고 있을 가능성을 암시하고 있으나 cell lineage에 따른 다른 반응의 결과일 가능성도 배제할 수 없다. 최근, *Streptomyces* sp. MCY-846으로부터 azalomycin B와 동일한 물질이 항암활성에 의한 탐색에 의하여 정제되었다는 보고가 있었으며 정제된 물질은 NIH 3T3 세포와 ras-transform된 NIH 3T3세포에 대하여 비슷한 항암활성을 나타내었다고 보고되었다(20). 본 연구에서는 특히 c-myc RNA의 양을 감소시키는 활성을 가진 항암물질을 탐색하였으므로(Fig. 1), ras-transform된 세포 보다는 c-myc의 증폭이 발견되는 인체암세포인 Colo320 DM, Colo320 HSR 및 HL-60세포에 강한 항암활성을 보이는 것은 기대되는 결과라 할 수 있다. 이 결과는 이 물질이 c-myc의 발현과정을 저해함으로써 항암활성을 나타내었을 가능성을 암시하고 있다. 실제로 정제된 azalomycin B가 c-Myc 단백질의 발현을 저해하는 지를 알아보기 위하여 c-Myc antibody를 이용한 immunoblot을 행한 결과, Colo320 DM 세포에서 c-Myc 단백질의 양을 현저히 감소시키는 효과가 있음이 확인되었다(Fig. 7). Azalomycin B가 c-myc의 발현을 어떠한 기작에 의하여 저해하는지 또한 c-myc transform된 NIH 3T3 세포에 대하여 특이적으로 작용하는지를 밝히는 연구는 azalomycin B의 작용기작의 이해를 위하여 필요한 연구과제라 하겠다.

요 약

토양으로부터 분리된 방선균 3124 균주를 대상으로 SRB assay와 MTT assay를 이용하여 항암활성을 지니는 균주들을 1차적으로 선별하였고, 이들중 c-myc RNA 양을 감소시키는 활성이 강한 물질을 생산하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 LL-type의 DAP, glycine으로 연결된 peptide를 가지는 peptidoglycan type A3, cell wall type I에 해당되며, 또한 특정한 당이 검출되지 않으므로 sugar pattern C에 해당됨을 확인하였고 casein, tyrosine, xanthine, hypoxanthine의 분해능을 나타내고 spore chain이 open-spiral한 형태이며 표면이 warty한 형태를 보이는 것으로 보아 *Streptomyces endus*와 동일한 것으로 동정되었다. 선별된 균주로부터 항암활성물질을 용매추출법, silica gel column chromatography, prep-TLC 및 prep-HPLC를 이용하여 분리한 다음 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, LC-Mass spectrum을 통해 그 구조를 해석한 결과 Gram(+) 세균, 진균, protozoa 및 nematode 등에 저해효과를 지닌 항생제로 알려져 있는 azalomycin B와 동일한 것으로 확인하였다. 본 실험에서 정제된 azalomycin B는 여러 cell line에 세포독성을 나타내었으며 특히 c-myc이 증폭된 인체 암세포에 강한 항암활성을 나타내었으며 Colo320 DM세포에서 c-Myc 단백질

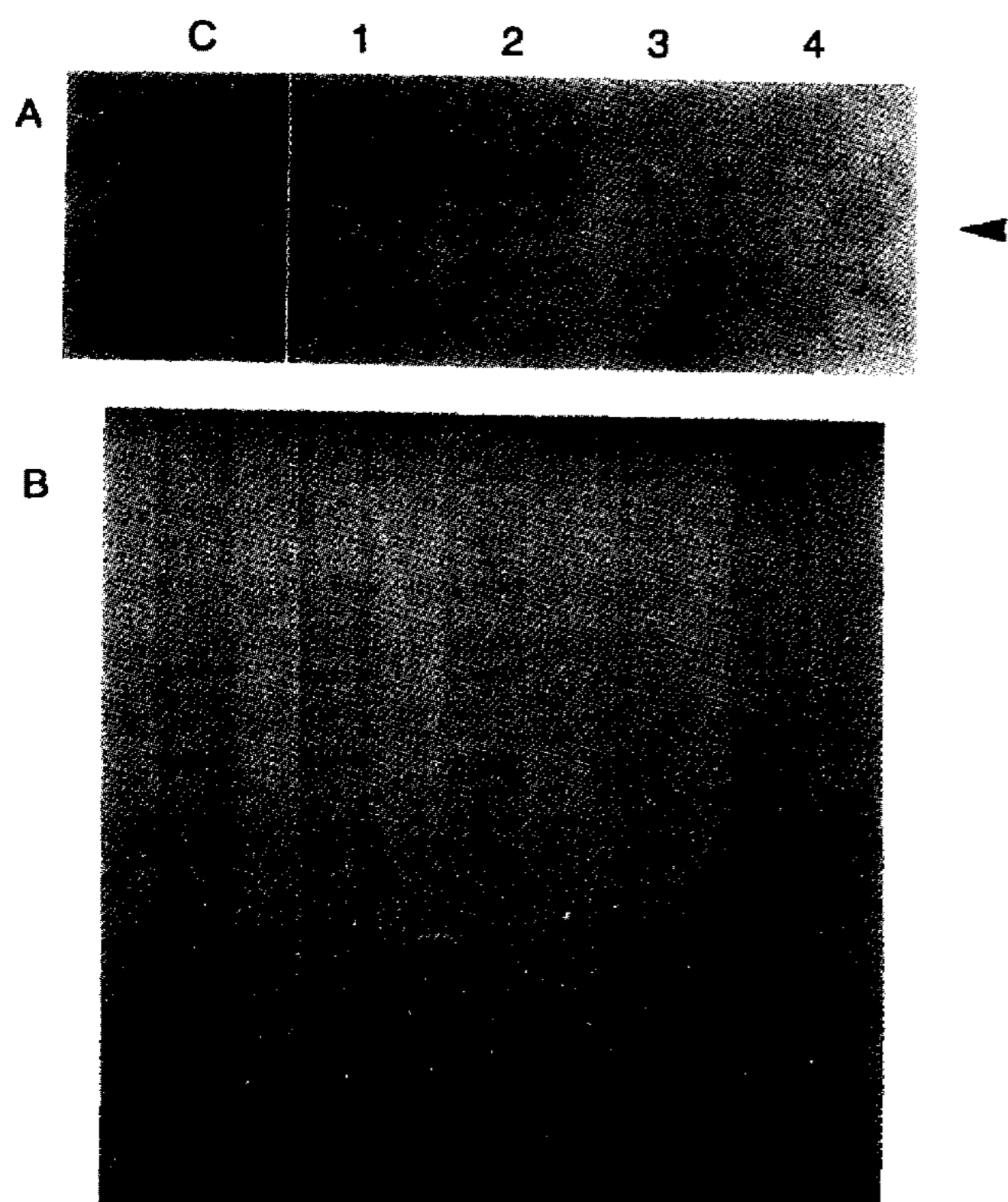


Fig. 7. Western blot analysis of Colo320 DM cells treated with Azalomycin B.

A; Cells were incubated with 2 μM of azalomycin B and total protein was prepared. 30 μg of protein was loaded per lane, electrophoresed on 10% polyacrylamide gel and western blot was performed as described in material and methods. lane C; control, lane 1; 12 hrs, lane 2; 24 hrs, lane 3; 36 hrs, lane 4; 48 hrs B; The same gel was stained with Coomassie blue R-250. Arrow heads indicate the c-Myc protein.

의 양을 급속히 감소시킴을 관찰할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 (주)풀무원과 생물산업소재연구센터의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Lewis, C. C., R. A. Kurt, C. Christopher, D. Brian, G. Andrea, K. Rosanna and S. Stephen. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, **64**: 281-302.
- Ruddon, R. W. 1989. Causes of cancer. In *Cancer biology*: 297-432. Oxford Univ. Press.
- Hrvoie, B., Z. Mirzet, D. Nullin and F. I. Robin. 1993. Nuclear diacylglycerol is increased during cell proliferation *in vivo*. *Biochem. J.* **290**: 633-636.
- Berridge, M. J. and R. F. Irvine. 1984. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**: 315-321.
- Greenberg, M. E. and E. B. Ziff. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of *c-fos* proto-oncogene. *Nature*, **311**: 433-437.
- Muller, R., R. Bravo, J. Burckardt and T. Curran. 1984. Induction of *c-fos* gene and protein factors precedes activation of *c-myc*. *Nature*, **312**: 716-720.
- Garth, P. 1991. Signalling targets for anticancer drug development. *TIPS*. **12**: 188-194.
- Kari, A., S. Manfred, C. C. Lin, E. Harold and J. M. Bishop. 1983. Homogeneously staining chromosomal regions amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (*c-myc*) in colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 1707-1711.
- Cathleen, R., S. Scanetaka, C. Paul, N. Tetsuya and B. David. 1991. Oncogene transformation frequency of non-senescent SFME cells is increased by *c-myc*. *Oncogene*. **6**: 487-489.
- Patrick, A., K. Michael and F. Wyn. 1991. *c-fos* and *c-myc* oncoprotein expression in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res.* **11**: 921-924.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*(9th ED.), Williams and Wilkins, p. 605-703.
- Williams, S. T., M. E. Sharpe and J. G. Holt. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **4**: 2334-2346, 2451-2508.
- Goodfellow, M. and G. Alderson. 1979. *J. Gen. Microbiol.*, **112**: 95-111: Numerical Taxonomy of Actinomadura and Related Actinomycetes.
- Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath and M. J. Sackin. M. J. 1983. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 1743-1813: Numerical Classification of Streptomyces and Related Genera.
- Williams, S. T., M. Goodfellow, E. M. H. Wellington, J. C. Vickers, G. Alderson, P. H. A. Sneath, M/J. Sackin and A. M. Mortimer. 1983. A Probability Matrix for Identification of some Streptomyces. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 1815-1830.
- Berd, D. 1973. Laboratory Identification of Clinically Important Aerobic Actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **25**: 665-681.
- Acarbone, F. M., C. Bertazzoli, M. Ghione and T. Scotti. 1959. Melanosporin and elaiophylin, new antibiotics from *Streptomyces melanosporus* (*sive elanosporofaciens*)n. sp. *Giorn. Microbiol.* **7**: 207-216.
- Hamagishi, Y., K. Kawano, H. Kamei and T. Oki. 1991. Inhibitory effects of Copiamycin A, a macrocyclic lactone antibiotic, on gastric H⁺, K⁺-ATPase, acid secretion and ulcer formation. *Japan. J. Pharmacol.* **55**: 283-286.
- Lee, S. Y., M. S. Kim, H. S. Kim, Y. H. Kim, S. D. Hong and J. J. Lee. 1996. Structure Determination and Biological Activities of Elaiophylin Produced by *Streptomyces* sp. MCY-846. *J. Microbiol. Biotech.* **6**: 245-249.

(Received 12 May 1997)