

혈소판 및 Na^+ , K^+ -ATPase, cyclicAMP 포스포디에스테라제에 대한 해양천연물질의 작용

박영현[#] · 장성근* · 김인규** · 서영완*** · 신중헌***

순천향대학교 식품영양학과, *화학과, **성균관대학교 화학과, ***한국해양연구소

(Received January 31, 1997)

Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase, cyclicAMP Phosphodiesterase and Platelet Activation by Secondary Metabolites from Marine Organisms

Young-Hyun Park[#], Sung-Keun Chang*, In-Kyu Kim**,
Young-Wan Seo*** and Jong-Heon Shin***

Department of Food Science and Nutrition, *Department of Chemistry,
Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

**Department of Chemistry, Sungkyunkwan University, Suwon 400-746, Korea

***Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 425-600, Korea

Abstract—The purpose of this investigation was to determine the inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase, cyclicAMP phosphodiesterase and platelet activation by secondary metabolites isolated from marine organisms. The secondary metabolites were isolated and identified as six diterpenoids(1: astrogorgin, 2: ophirin, 3: calicophirin B, 4, 5, and 6: cladiellin) from the dichloromethane extract of *Muricella* sp., four ceramides(1, 2, 3, and 4) from *Acabaria undulata* and three anthraquinones(1, 2: crysophanol, and 3: physcion) from *Urechis unicinctus*. The results demonstrated that diterpenoids(2, 3, and 4) showed the inhibition of cyclicAMP phosphodiesterase, and ceramides(1, 3, and 4) showed the inhibition of cyclicAMP phosphodiesterase and thrombin(0.1 units/ml)-induced aggregation of washed rabbit platelet, and anthraquinones((1, 2, and 3) showed the inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase. Among the anthraquinones, 1, 2-dimethoxy-3-methyl-8-hydroxy-anthraquinone(1) showed the inhibition of collagen (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)-induced aggregation in a concentration-dependent manner with IC_{50} value of 42.8 μM .

Keywords □ Marine secondary metabolite, Platelet aggregation, Na^+ , K^+ -ATPase, cyclicAMP phosphodiesterase.

현재 50만종의 다양한 해양생물이 서식하는 해양은 지구의 표면적의 약 71%로 에너지, 광물, 식량 등의 자원 보고로 주목받고 있다. 특히, 해양생물은 육상생물에 비교하면 매우 다른 환경인 염농도가 높은 폐쇄된 환경에 살고 있고, 수심에 의해 높은 압력과 온도 변화가 비교적 적고, 체표면의 대부분이 직접 해수와 접하여 있다. 이러한 특이한 환경에서 서식하는 해양생물의 대사

계 또는 생체방어계에서 생산하는 2차 대사물질은 독특한 화학구조로 해양천연물화학 분야의 연구대상이 되고 있다.¹⁻⁴⁾

이러한 2차 대사물질은 세포막 수용체, 이온 channel, 세포내 기능조절단백질 등에 특이적으로 작용하는 새로운 생리활성이 발견되어 세포내 정보전달 기능을 해석하는데 크게 공헌할 뿐만 아니라 의약품 자원으로 기대되고 있다.^{5, 6)} 예를들면 ciguatera식중독의 원인생물인 와편모조 *Gambierdiscus toxicus*에서 분리한 mai-totoxin은 세포막 Ca^{2+} channel에 특이적으로 작용하

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0418-530-1259 (팩스) 0418-530-1264

여 세포의 Ca²⁺ 유입을 증가시켜 흥분성 근세포의 수축이나 비흥분성 혈소판의 응집을 유도하며⁷⁻¹¹, 카리브산명개 *Eudistoma olivaceum*에서 분리한 eudistomin D 유도체는 Ca²⁺ 유리 촉진작용이 caffeine의 1000배로 작용하여 caffeine 생리기능 해석에 유용한 생화학 및 약리학 도구(tool)로 인식되고 있다.¹²⁻¹⁵ 해양생물은 채집 및 분류상의 어려운 점이 있지만 미량물질 분리 및 분석 기술로 1~2 mg에서도 화학구조가 밝혀지고 있다. 분리된 2차 대사물질의 생리작용 및 검색방법으로 배양세포독성(cytotoxicity)이 주로 활용되고 있지만 저자는 혈소판 및 세포내 Ca²⁺ 또는 cyclicAMP을 증가시키는 Na⁺, K⁺-ATPase, cyclicAMP phosphodiesterase의 작용¹⁶⁻¹⁸)을 보고자 한다. 현재 흥분성세포인 심근 및 평활근의 수축제어에 대한 세포내 정보전달 연구는 매우 활발하다. 그러나, 비흥분성 혈소판 세포의 형태변형 및 응집에 관한 세포내 기능의 해석은 미약하여 생화학 및 약리학 도구를 해양천연물에서 찾고자 한다.

한국 연근해에서 채집한 산호충류(*Muricella* sp.와 *Acabaria undulata*) 및 개불(*Urechis unicintus*)에서 분리한 2차 대사물질들(diterpenoid 6종, ceramide 4종, anthraquinone 3종)을 혈소판 및 Na⁺, K⁺-ATPase, cyclicAMP phosphodiesterase에 대한 작용을 검색하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 - 빨산호(*Muricella* sp.), 연적색 빨산호(*Acabaria undulata*), 개불(*Urechis unicintus*) 3종을 제주도, 거문도, 몽산포에서 채집하였다. 각 시료의 CH₂Cl₂추출물을 silica gel flash column에서 hexane과

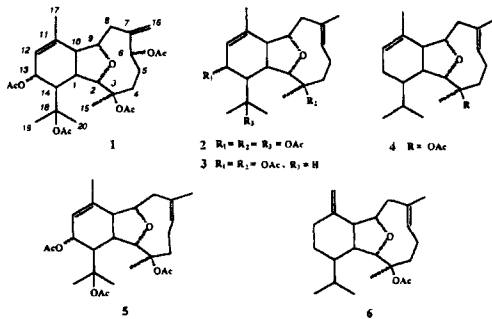
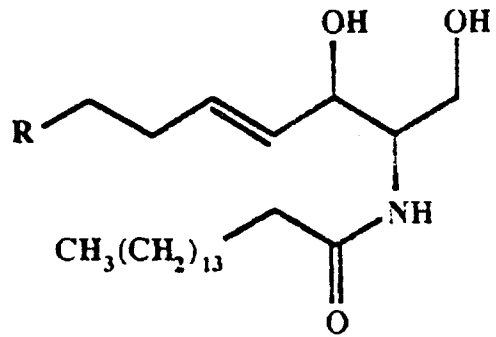


Fig. 1 - Chemical structures of diterpenoids isolated from the Gorgonian *Muricella* sp.

ethylacetate의 용매 순서로 용출하였다. CH₂Cl₂추출물에서 용출한 빨산호 분획은 다시 Sephadex LH-20 column에서 용매(hexane/CH₂Cl₂/ethanol=2:3:0.05)로 용출한 분획을 최종적으로 C₁₈역상 HPLC로 정제하여 diterpenoid (1)-(6)을 분리하였다(Fig. 1). CH₂Cl₂추출물에서 용출한 연적색 빨산호 분획은 최종적으로 semi-prep. C₁₈역상 HPLC(YMC ODS column, 10×250 mm, 100% MeOH)로 정제하여 ceramide (1)-(4)을 분리하였다(Fig. 2). CH₂Cl₂추출물에서 용출한 개불 분획은 다시 silica gel flash column에서 용매(hexane/ethylacetate=1:1)로 용출한 분획을 최종적으로 C₁₈역상 HPLC(Shimadzu ODS column, 20×250 mm, 90% MeOH)로 정제하여 anthraquinone (1)-(3)을 분리하였다(Fig. 3). 이와같이 분리 정제한 2차 대사물질은 용매(MeOH 또는 DMSO)에 녹여 최종농도가 10 µg/ml되도록 조절하였다. 용매는 최종농도가 0.1%로 조절하였다.



1. R=CH₃(CH₂)₈CH=CH·
2. R=CH₃(CH₂)₆CH=CH·CH=CH
3. R=(CH₃)₂CH(CH₂)₇·CH=CH·
4. R=CH₃(CH₂)₁₀·

Fig. 2 - Chemical structures of ceramides isolated from the Gorgonian *Acabaria undulata*

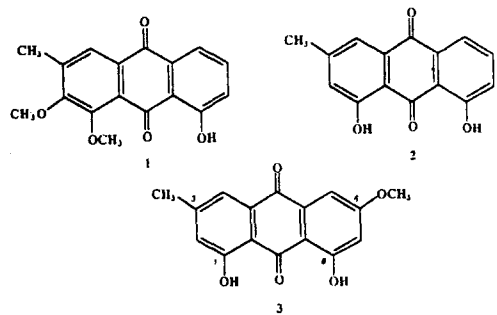


Fig. 3 - Chemical structures of anthraquinones isolated from the Echiuran *Urechis unicintus*

토끼 washed platelet 활성측정 - 토끼 혈액을 citrate-dextrose용액(혈액량의 1/6 : 65 mM citric acid, 85 mM trisodium citrate, 2% dextrose, pH 4.5)에 채혈한 후, 250×g로 10분간 원심분리하였다. 상등액(platelet-rich plasma)을 분리한 후, 다시 650×g로 10분간 원심분리하였다. 침전물(platelet-rich pellet)을 Tyrode-HEPES(pH 6.35)용액으로 두번 세척한 후, 마지막에 Tyrode-HEPES(pH 7.35) 용액으로 혈소판수가 5×10⁸ cells/ml되도록 희석하였다. 모든 조작은 실온에서 실시하였다. Tyrode-HEPES용액의 조성은 138.3 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.048 mM MgCl₂·6H₂O, 4.0 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0.1% dextrose, 0.35% albumin등이다. 혈소판 형태변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 흡광도 측정장치(Whole-Blood Aggregometer, Chrono-log Co.)를 사용하였다.^{19,20} 혈소판 부유액(platelet-rich plasma)을 250 μl 취하여 1200 rpm에서 교반하면서 37°C에서 3분간 incubation 시킨 후 CaCl₂ 1 mM을 가하였다. 다시 3분후에 시료를 2.5 μl를 가하고 3분 후 혈소판 활성화물질로 자극하여 응집을 유도하였으며, 5분간 측정 한 후, 최대 응집점을 잡아 억제되는 정도를 계산하였다. 혈소판 활성화물질은 collagen(1.0 μg/ml), thrombin(0.1 units/ml)을 대조군(A)으로 사용하였으며, 억제율(%)은 다음의 식과 같이 구했다.

$$\text{Inhibition\%} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : control aggregation %

B : aggregation %

Na⁺, K⁺-ATPase와 cyclicAMP phosphodiesterase 활성측정 - Na⁺, K⁺-ATPase(Porcine Cerebral Cortex, Sigma)는 최종농도가 0.02 units/ml로 하여, 130 mM NaCl, 20 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 445 μl를 넣어 5분간 37°C에서 incubation하였다. 5분 후에 시료 5 μl를 넣고, 다시 5분 후에 2 mM ATP 50 μl를 넣어 15분간 반응한 후 5% trichloroacetic acid 500 μl로 효소반응을 정지하였다. 그리고, cyclicAMP phosphodiesterase(Bovine Heart, Sigma)는 최종농도가 0.015 units/ml로 하여, 0.7 units/ml 5'-nucleotidase(Snake Venom, Sig-

ma), 2 mM MgCl₂, 40 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 890 μl를 넣어 5분간 37°C에서 incubation하였다. 5분 후에 시료 10 μl를 넣고, 다시 5분 후에 2 mM cyclicAMP 100 μl를 넣어 20분간 반응한 후 5% trichloroacetic acid 100 μl로 반응을 정지시켰다. 정지된 각 효소반응액의 인산은 Martin-Doty법에 따라 720 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁸⁾ 각효소 활성의 inhibition %는 다음의 식과 같이 구했다. Na⁺, K⁺이 없는 Na⁺, K⁺-ATPase완충용액과 5분간 열탕한 cyclicAMP phosphodiesterase를 각각 back ground로 하였다.

$$\text{Inhibition\%} = \frac{C-S}{C-BG} \times 100$$

C : control 흡광도

BG : back ground의 흡광도

S : sample의 흡광도

결과 및 고찰

해양천연물 연구는 Weinheimer³⁾가 카리브해 산호충류에서 대량 prostaglandin유도체의 분리하면서 시작되었다. 해양생물에서 의약품 신소재로 병원성균이나 바이러스 억제물질, 항종양활성물질이 탐색되고 있지만, 실용화된 것은 kainic acid, nereistoxin, holotoxin 등에 불과하다.⁴⁻⁶⁾ 그러나, 해양생물의 2차대사물질은 신기하고 다채로운 화학구조로 인한 생리 및 독성 작용은 세포내 생리기능 해석에 유용한 도구¹⁻⁴⁾로 인식되고 있다. 한국 연근해에서 채집한 산호충류 *Muricella* sp.와 *Acabaria undulata*은 분류학적으로 강장동물(Coelenterata), 산호충강(Anthozoa), 팔방산호아강(Octocorallia), 뿔산호과(Gorgonacea)에 속한다. 해양천연물질의 32%가 강장동물에서 유래되고, 분리된 2차대사물질은 대부분 terpenoid 구조를 가지고 있다고 한다.²¹⁾ *Muricella* sp.에서 분리된 2차 대사물질도 diterpenoid 구조로 astrogorgin(1)과 calicophirin B(3)은 *Astrogorgia* sp.와 *Calicogorgia* sp.에서, ophirin(2)은 *Muricella* sp.와 *Astrogorgia* sp.에서, cladielin(6)은 *Cladiella* sp. 등에서 이미 분리 확인되었고²¹⁾, (4)와 (5)는 처음으로 분리되었다(Fig. 1). *Acabaria undulata*에서 분리된 2차 대사물질인 ceramide 구조는 (1), (2) 그리고 (3)은 처음으로 분리되었고²²⁾, (4)은 소

비장이나 합성으로 이미 확인되었다(Fig. 2). 몽산포에서 채집한 개불(*Urechis unicinctus*)은 분류학적으로 환형동물(Annelida), 의충동물(Echiurida), 개불류(*Urechis*)에 속한다. 개불에서 분리된 2차 대사물질은 모두 황색색소의 anthraquinone구조로 확인되었다(Fig. 3). (1)은 처음으로 분리된 1,2-dimethoxy-3-methyl-8-hydroxy-anthraquinone 구조로 확인되었다. 해양생물 생태화학에서의 anthraquinone구조는 매우 특이하다고 하겠다.²³⁾ 그러나, (2)과 (3)은 약용식물인 대황(*Rheum* sp.)에서 chrysophanol과 physcion로 이미 확인되었다.²⁴⁾

해양생물은 식량으로서는 인류와 연관이 깊기 때문에 복어독(tetrotoxin), 조개독(saxitoxin, okadaic acid), 적조독(brevetoxin), ciguatera(ciguatoxin, maitotoxin) 등의 해양생물독에 대한 연구의 역사는 상당히 오래되었다. 최근, 이러한 해양생물독의 원인생물은 외편모조류로 강장동물이나 해면동물 등에 공생 미생물로 존재하거나, 먹이연쇄로 인하여 어패류에 축적되어 식중독의 원인으로 보고되고 있고⁷⁻⁹⁾, 또한, 2차 대사물질을 생산하여 해양생물간의 생태 및 행동에 영향을 주는 화학물질로 해수를 매체로하여 정보가 전달되는 화학적 신호(chemical signal)로 보고 있다.²⁵⁾ 해양생물간의 화학신호물질은 흥분성(심근, 평활근) 또는 비흥분성(혈소판, 암) 생체세포에도 작용하여 수축제

어, 형태변형, 응집, 증식, 분화 등의 생리기능을 나타내어 생체 세포내 정보전달(signal transduction)을 해석하는 도구로 그 활용도가 증가되고 있다. 이러한 관점에서 기존의 검색법(항균성, 항진균성, 항염증성, 항종양성)보다는 세포내 정보전달 도구로서 보다 선택성이 크고 간편한 생리작용 및 검색방법이 중요하다고 하겠다. 혈소판은 뇌 및 심혈관질환의 원인 세포이고 원관형 무핵세포로 분리가 용이하고, 생체 세포의 모델로써 세포막단백질, 세포내 Ca동태, arachidonic acid 대사 등²⁶⁾의 연구 방법 및 대상으로 이용되기 때문이다. 혈소판 및 Na⁺, K⁺-ATPase, cyclicAMP phosphodiesterase에 대한 해양생물유래의 2차대사물질의 작용을 관찰해 보면 다음과 같다. Table I에서 collagen과 thrombin의 혈소판 응집작용에 대한 *Muricella* sp.에서 분리된 diterpenoid구조는 억제작용이 관찰되지 않았고, *Acabaria undulata*에서 분리된 ceramide구조중 (1), (3) 그리고 (4)는 thrombin에 대하여 약간의 억제작용이 관찰되었다. 개불에서 분리한 anthraquinone은 collagen과 thrombin의 응집작용에 대하여 억제작용이 관찰되었다. Fig. 4(A)에서 anthraquinone의 구조적 특성에 따라서 collagen의 혈소판 응집작용에 대하여 1,2-dimethoxy-3-methyl-8-hydroxy-anthraquinone(1), chrysophanol(2), physcion(3)의 IC₅₀은 각각 42.8 μM, 201.7 μM, 159.3 μM로 나타났

Table I—Inhibitory effects of the marine secondary metabolites on the aggregation of washed rabbit platelets induced by collagen and thrombin

Compound	Collagen (1.0 μg/ml)		Thrombin (0.1 units/ml)	
	(%) ¹	IC ₅₀ (μM)	(%) ¹	IC ₅₀ (μM)
Diterpenoids				
1	1.4		10.7	
2	4.7		3.6	
3	4.7		8.9	
4	10.9		1.8	
5	9.4		1.8	
6	6.3		2.0	
Ceramides				
1	5.7		27.7	
2	1.4		13.0	104.8
3	10.0		24.2	
4	8.6		27.7	127.1
Anthraquinones				112.3
1	35.0	42.8	11.1	
2	13.3	201.7	22.2	94.2
3	16.6	159.3	8.3	
Aspirin	82.0	16.0	11.7	183.0

¹Data are mean values of triplicate experiments, and are expressed as percentage of inhibition at a sample concentration of 10 μg/ml.

다. Table II에서 cyclicAMP phosphodiesterase에 대한 해양생물유래 2차대사물질의 작용은 *Muricella* sp.에서 분리된 diterpenoid중 (2), (3) 그리고 (4)구조가 억제작용이 관찰되었고, *Acabaria undulata*에서 분리된 ceramide중 (1), (3) 그리고 (4)구조가 약간의 억제작용이 관찰되었다. Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 억제작용은 diterpenoid 구조와 ceramide 구조에서는 비교적 활성 관계가 없다고 하겠다. 개불(*Urechia uncinatus*)에서 분리한 anthraquinone은 Na⁺, K⁺-

ATPase 억제작용이 관찰되었다. Fig. 5에서 (1), (2) 그리고 (3)의 anthraquinone 구조는 Na⁺, K⁺-ATPase에 대하여 용량의존적으로 억제되고, IC₅₀은 각각 13.2 μM, 22.4 μM 그리고 17.1 μM로 나타났다. 그리고, 기준약물인 aspirin(arachidonic acid대사 억제제), ouabain(Na⁺, K⁺-ATPase 억제로 인한 세포내 Ca⁺⁺축적), papaverine(cyclicAMP phosphodiesterase 억제로 인한 평활근 이완)등과 비교하여 2차대사물질의 구조적 특성에 따라 억제작용이 있는 것으로

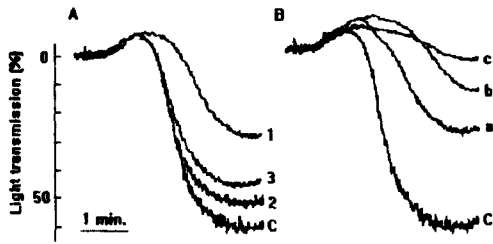


Fig. 4—Effect of anthraquinones(A) on platelet aggregation induced by collagen(1.0 g/ml). (1) 1,2-dimethoxy-3-methyl-8-hydroxy-anthraquinone; (2) 1,8-dihydroxy-3-methyl-anthraquinone; (3) 1,8-dihydroxy-3-methyl-6-dimethoxy-anthraquinone; (C) control. The dose-dependent curves(B) was inhibited by each final concentration of (1). a: 10 μg/ml, b: 20 μg/ml, c: 30 μg/ml.

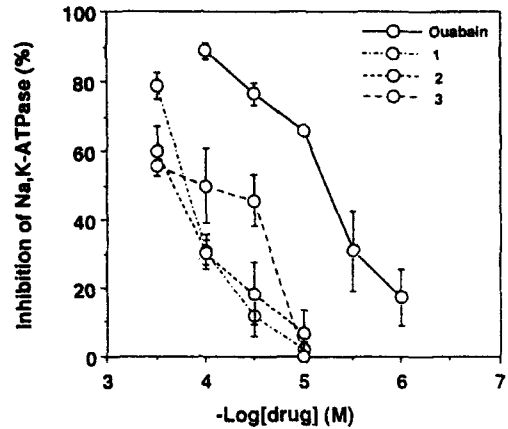


Fig. 5—Effects of anthraquinones, isolated from *Echium uncinatus*, on inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase

Table II—Inhibitory effects of the marine secondary metabolites on Na⁺, K⁺-ATPase and cyclic AMP phosphodiesterase

Compound	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase Inhibitory effect		cAMP PDE Inhibitory effect	
	(%) ¹	IC ₅₀ (μM)	(%) ¹	IC ₅₀ (μM)
Diterpenoids				
1	2.0		9.8	291
2	0.9		36.9	350
3	2.5		30.6	357
4	4.7		36.3	
5	7.9		5.6	
6	6.0		21.1	
Ceramides				
1	6.3		21.3	307
2	5.0		7.8	
3	2.2		16.9	321
4	2.2		20.1	294
Anthraquinones				
1	12.0	13.2	9.8	485
2	28.6	22.4	5.7	
3	45.7	17.1	3.2	
Ouabain	58.7	8.4		
Papaverine			24.5	69

¹Data are mean values of triplicate experiments, and are expressed as percentage of inhibition at a sample concentration of 10 μg/ml.

사려된다. 이상과 같이 ceramide와 anthraquinone구조의 생리활성은 비홍분성 세포에도 작용하여 세포내 정보전달(signal transduction)의 생명현상을 해석하는 생화학 및 약리학 도구(tool)로 이용이 가능하리라고 기대된다. 이러한 2차 대사물질의 혈소판 응집 억제작용이 세포내 Ca^{++} , 이온 channel, 세포내 기능조절 인산단백질 등과의 관련성에 관한 연구는 앞으로 수행하고자 한다.

결 론

한국 연근해에서 채집한 해양생물중 강장동물인 별산호(*Muricella* sp.)와 연적색 별산호(*Acabaria undulata*) 그리고 환형동물인 개불(*Urechis unicintus*)에서 분리한 13개의 2차 대사물질(diterpenoid 6개, ceramide 4개, anthraquinone 3개)의 collagen과 thrombin의 혈소판 응집작용 및 Na^+ , K^+ -ATPase, cyclicAMP phosphodiesterase 효소에 대한 억제작용을 비교, 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) *Muricella* sp.에서 분리한 diterpenoid 구조(2), (3) 그리고 (4)는 cyclicAMP phosphodiesterase에 대하여 억제작용을 나타내었다.

2) *Acabaria undulata*에서 분리한 ceramide 구조(1), (3) 그리고 (4)는 thrombin과 cyclicAMP phosphodiesterase에 대하여 억제작용을 나타내었다.

3) *Urechis unicintus*에서 분리한 (1), (2) 그리고 (3)는 collagen과 Na^+ , K^+ -ATPase에 대하여 억제작용을 나타내었다.

감사의 말씀

본 논문은 1995년도 한국과학재단 특정기초연구비(95-0403-21-01-3)와 1996년도 교육부 기초과학 학술연구조성비(BSRI-96-3447)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Scheuer, P. J. : Bioorganic marine chemistry. Ed. Springer-Verlag, Heiderberg, Vol. 1-6 (1987-1992).
- 2) Shimizu, H. : Chemical and biological perspectives. In *Marine Natural Products*, Ed. (Scheuer, P.J. ed.) Academic Press, New York, pp. 1-42 (1978).
- 3) 北川 勳 : 海洋天然物化學. 化學增刊 **111**, 化學同人, (1987).
- 4) Kobayashi J. and Ishibashi M. : Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganism. *Chem. Rev.* **93**, 1753 (1993).
- 5) 北川 勳 : 海洋天然物質의 醫療應用. *BIOMedica*, **7**, 1472 (1992).
- 6) 安元 健 : 化學で探る海洋生物の謎. 化學增刊 **121**, 化學同人, (1992).
- 7) Shimizu, Y. : Microalgal metabolites. *Chem. Rev.* **93**, 1685 (1993).
- 8) Yasumoto, T. and Murata, M. : Marine toxins. *Chem. Rev.* **93**, 1897 (1993).
- 9) Yasumoto, T., Nakajima, I., Oshima, Y., and Bagnis, R. : A new toxic dinoflagellate found in association with ciguatera. In *Toxic Dinoflagellate Blooms*, Ed. (Taylor, D.L., and Seliger, H. eds.) Elsevier North Holland Inc, New York, pp 65-77 (1979).
- 10) Murata, M., Iwashita, T., Yokoyama, A., Sasaki, M., and Yasumoto, T. : Partial structures of maitotoxin from dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6594 (1992).
- 11) Park, Y. H. : Effect of marine toxins on the rabbits. *J. Fd. Hyg. Safety*. **10**, 73 (1995).
- 12) Fang, Y. I., Adachi, M., Kobayashi, J. and Ohizumi, Y. : High affinity binding of 9-[3H]methyl-7-bromo-eu distomin D to the caffeine-binding site of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**, 18622 (1993).
- 13) Adachi, M., Fang, Y. I., Kobayashi, J., Yamakuni, T. and Ohizumi, Y. : Properties of the binding sites of [3H]9-methyl-7-bromo-eu distomin D in bovine aortic smooth muscle microsomes. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 771 (1994).
- 14) Adachi, M., Kakubari, M. and Ohizumi, Y. : Tissue- and subcellular-distribution of the binding site of [3H]9-methyl-7-bromo-eu distomin D, a potent caffeine-like Ca^{2+} releaser. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 774 (1994).
- 15) Adachi, M., Kakubari, M. and Ohizumi, Y. : The specific binding site of 9[3H]methyl-7-bromo-eu distomin D, a caffeine-like Ca^{2+} releaser.

- in liver microsomes is distinct from that in skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**, 183(1994).
- 16) Rho, M. C., Park, Y. H., Sasaki, S., Ishibashi, M., Kondo, K., Kobayashi, J. and Ohizumi, Y. : The mode of rabbit platelet shape change and aggregation induced by theonezolid-A, a novel polyketide macrolide, isolated from the Okinawan marine sponge *Theonella sp.*, *Can J. Physiol. Pharmacol.* **74**, 193 (1996).
- 17) Watanabe, A., Ishida, Y., Honda, H., Kobayashi, M., and Ohizumi, Y. : Ca²⁺-dependent aggregation of rabbit platelets induced by matotoxin, a potent marine toxin, isolated from a dinoflagellate. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 29 (1993).
- 18) Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y. and Nikaïdo, T. : Steroidal saponins from *Allium chinensis* and their inhibitory activities on cyclic AMP phosphodiesterase and Na⁺, K⁺-ATPase. *Phytochemistry* **40**, 1071 (1995).
- 19) Born, G. V. R. : Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **194**, 927 (1962).
- 20) Milton, J. G., and Frojmovic, M. M. : Turbidometric evaluations of platelet aggregation: relative contributions of measured shape change, volume, and early aggregation. *J. Pharmacol. Meth.* **9**, 101 (1982).
- 21) Yajima, H., Shioiri, T. and Ohizumi, Y. : Marine resources for drug discovery I, The 2nd series of pharmaceutical research and development. Vol. 10, Ed. Hirokawa Co., (1993).
- 22) Shin, J. H. and Seo, Y. W. : Isolation of new ceramides from the gorgonian *Acabaria undulata*. *J. Nat. Prod.* **58**, 948 (1995).
- 23) Park, Y. H., Chang, S. K. and Kim, I. K. : Isolation of anthraquinones from the Echiuran *Urechia unicinctus*. *J. Nat. Prod.*, in press.
- 24) Munavu, R. M., Mudamba, L. O. and Ogur, J. A. : Isolation and characterization of the major anthraquinone pigments from *Rumex abyssinica*. *Planta Medica* **50**, 111 (1984).
- 25) 北川 勳, 伏谷 伸宏 : 海洋生物のchemical signal. 講談社, (1989).
- 26) Rink, T. J., and Sage, S. O. : Calcium signaling in human platelets. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 431 (1990).