

해양미생물 추출물의 동종세포반응 (Allogeneic Mixed Lymphocyte Culture) 억제효능 검색

윤금자 · 오근희¹ · 이동섭¹ · 최홍대² · 강정숙³ · 손병화*

부경대학교 화학과, ¹서울대학교 의과대학 의과학과/장기이식연구소,
²동의대학교 화학과, ³부산대학교 치과대학

Screening on Allogeneic Mixed Lymphocyte Culture Inhibitory Activity for the Extracts of Marine-Derived Microorganisms

Keumja Yun, Keunhee Oh¹, Dong-Sup Lee¹, Hong Dae Choi², Jung Sook Kang³ and Byeng Wha Son*

Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Department of Biomedical Sciences/Transplantation Research Institute, Seoul National University

College of Medicine, Seoul 110-799, Korea

²Department of Chemistry, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

³School of Dentistry, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

Abstract – In order to screen new allogeneic mixed lymphocyte culture (allo-MLR) inhibitor which is expected to be immunomodulating drug lead, we have investigated allo-MLR inhibitory activity on the marine-derived symbiotic microorganisms (1,895 strains) from the marine algae. The potent inhibitory activities (over 45% inhibition of proliferation at 10 and 2 µg/ml) without cytotoxicity were observed in the extracts of 46 strains. While, the significant stimulating activities (over 100% proliferation at 10 and 2 µg/ml) without cytotoxicity were observed in the extracts of 5 strains. In the second assay using 46 bioactive strains, 14 strains exhibited again significant allo-MLR inhibitory activity. Finally, 11 strains among the 14 strains inhibited proliferation and IFN-γ production of CD4+ T cells during the stimulation with specific antigen in the third assay. On the basis of above results, the marine algae is nice source for isolation of immunomodulating microorganism, and the marine algae-associated microorganism is also nice target for development of the new immunomodulating drug lead.

Key words – Marine algae, Marine-derived microorganism, Allogeneic mixed lymphocyte culture (allo-MLR) inhibitor, Immunomodulation

해양은 지구상에 남아있는 마지막 자원의 보고로서, 해양에 서식하고 있는 해양생물자원은 인류의 식량자원으로서 뿐만 아니라 근래에는 고부가성 정밀화학소재, 신기능성 물질소재 및 신의약소재 등 다양한 분야에 있어서 그 중요성이 인식되고 있다.^{1,2)} 특히 지구상에 존재하는 전 생물종의 약 80% (약 140만 종)가 해양생물이며 이러한 풍부하게 서식하고 있는 해양생물 중 최대의 생물다양성은 해양미생물로서, 해수 1 mL, 해양표면 1 cm³ 및 해양 퇴적물 1 cm³ 당 각각 약 백만 규주의 미생물이 분리되고 있어, 잠재적 유전자원으로서의 그 중요성은 매우 크다.³⁾

해양에 서식하고 있는 공생, 부생 혹은 기생 미생물류는

체외효소에 의한 유기물의 분해로 영양을 섭취하는 특이한 생물 군으로서, 유기물을 분해하여 환경을 유지하고 개선하여 생물의 생태계를 유지하는 중요한 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라, 특이한 분자구조와 다양한 생물활성을 발현하는 많은 종류의 2차 대사물질을 생산하여, 지금까지 보고된 생리활성 천연물의 약 25%가 미생물로부터 분리된 2차 대사산물로 알려져 있다.⁴⁾

생물활성물질을 생산하는 해양미생물군주를 개발하기 위한 기초연구로서 해양소재로부터 분리된 미생물을 대상으로 라디칼소거활성,^{5,6)} tyrosinase저해활성,⁷⁾ 항균활성⁸⁾ 및 receptor tyrosine kinase 억제활성⁹⁾을 조사하여 유의성 있는 생물활성 해양미생물군주를 개발하였다. 해조류로부터 분리한 공생, 부생 혹은 기생하는 미생물유래 신의약소재 탐색

*교신저자(E-mail): sonbw@pknu.ac.kr
(Tel): +82-51-629-5592

의 일환으로서,¹⁰⁾ 우리나라 동해안, 남해안 및 서해안에 서식하는 해조류로부터 각각 210균주, 965균주 720 균주의 해양미생물을 분리하고, 이들을 대상으로 allogeneic mixed lymphocyte culture (allo-MLR)¹¹⁾ 억제 효능을 *in vitro*에서 검색하여 면역조절물질생산 해양미생물 자원의 기초자료를 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기 – 용매 (acetone, CH₂Cl₂, MeOH, EtOAc, DMSO) 및 배지는 Sigma-Aldrich 사 (Wisconsin, U.S.A.), Acumedia (Michigan, U.S.A.) 및 (주)덕산 (안산, 경기도)의 1급 시약을 사용하였으며, 배지조성은 다음과 같다: SWS+agar 배지 (1% soluble starch, 0.1% soytone, 0.2% fish meal, 1.5% agar, 100% seawater), YPG+agar 배지 (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 1.0% glucose, 0.2% fish meal, 1.5% agar, 100% seawater), YPM 배지 (0.2% yeast extract, 0.2% peptone, 0.4% mannitol, 100% seawater). MLR media [RPMI 1640 (WelGENE, Korea) supplemented with L-glutamine (1 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), HEPES (10 mM), 10% heat-inactivated fetal bovine serum, and 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol.

해조류의 채집과 이들로부터 공생미생물의 분리 – 2000~2011년에 걸쳐 공기 중의 미생물의 혼입 가능성이 낮은 매년 1월 ~ 2월에 동해안 (울산, 포항, 울진, 강릉), 남해안 (통영, 거제도, 여수, 고흥, 완도, 진도) 및 서해안 (신안군, 무안군, 변산반도, 위도, 선유도, 태안반도)에서 해조류 (홍조류, 갈조류, 녹조류)를 채집하여 멸균한 봉지에 담아 실험실로 운반한 후 -20°C에서 보관하면서 미생물을 분리하였다.

1) 자낭과 분리

Petri dish에 여지를 깔고, 여기에 채집한 숙주재료(해조류)를 얹어놓고, 멸균해수를 가하여 27-29°C에서 15-30일간 배양한 후 현미경하에서 자낭과로부터 자낭포자를 멸균 침을 이용하여 채취한 후 배지 상에서 계대 배양하여 공생균주를 분리하였다.

2) 해조류의 표면균류 분리

숙주재료를 무균 하에서 agar 평판배지 (SWS+agar 혹은 YPG+agar) 상에 놓고, 배양한 후, 현미경하에서 순수 균사 (hyphae)를 채취하거나, 배지상의 균사를 계대 배양하여 표면 공생균주를 분리하였다.

3) 해조류의 내면균류 분리

무균 상태에서 숙주재료의 표면을 멸균 증류수, 70% 에탄올, 멸균 증류수 순으로 세척한 후, 해부용 메스 (scalpel)로 조직의 내부를 노출시킨 다음 내부조직을 채취하여 agar

평판배지 (SWS+agar 혹은 YPG+agar) 상에 놓고, 배양한 후, 현미경하에서 순수 균사 (hyphae)를 채취하거나, 배지상의 균사를 계대 배양하여 내면 공생균주를 분리하였다.

4) 균주번호

본 실험에서 분리한 균주는 미동정 균주로서, 단지 균주의 외부형태 및 실체현미경을 이용한 균사의 비교분석으로 분리하였으나 소수의 동일한 균주가 이중으로 포함되었을 가능성은 있으며, 동해안, 남해안 및 서해안에서 분리한 균주번호는 다음과 같다.

-동해안 해조류에서 분리된 균주번호: NPMB001~210

-남해안 해조류에서 분리된 균주번호: NPA001~965

-서해안 해조류에서 분리된 균주번호: NPB001~720

1차 배양 (10 mL) 및 표준시료 조제 – 분리한 균주를 각각 10 mL의 YPM배지에서 27-29°C, 15일간 배양한 후, 배양액에 같은 양 (10 mL)의 메탄올·아세톤 (1:1)을 가하여 추출한 다음, 탈지면 여과하여 얻은 추출액의 유기용매를 유거하고 남은 수용액을 HP-20 column에 주입하고, 증류수로 세척하여 탈염 처리한 후, 메탄올 및 아세톤 순으로 순차적으로 용출하여 얻은 분획의 유기용매를 유거하여 1,895 종의 추출물 (엑스) (MB001~210; A001~965; B001~720)을 조제하였다. 이들의 추출물을 시료로 이용하여 활성 억제효능 검색을 시행하였다.

In vitro cytotoxicity assay (정상세포 세포독성 분석) – Specific pathogen-free 상태로 사육한 inbred strain 마우스 C57BL/6의 비장을 적출하여 배양액에서 단일 세포로 부유시켜서 사용하였다. Cytotoxicity는 96 well plate에 시료를 일정 농도 (10, 2 µg/mL)로 가하고, 5 × 10⁵개의 splenocyte를 첨가하여 16~18시간 동안 MLR media에 배양 후 세포의 생존 여부는 CellTiter-Glo (Promega)로 세포를 용해시켜 생성된 ATP의 양을 luminometer로 측정하였다 (Infinite M200, TECAN, Mannedor, Switzerland). 세포의 사멸 정도는 시료의 용해에 사용한 DMSO 대조군을 100%로 간주하고 상대적인 비율을 계산하였으며, 80% 이하의 상대 생존율을 보이는 것을 정상세포 세포독성이 있는 것으로 간주하였다.

In vitro allo-MLR assay¹¹⁾ – C57BL/6 (H-2^b MHC haplotype)의 peripheral lymph node를 적출하고 단일 세포로 부유하여 responder로 사용하였다. Antigen-presenting cell인 stimulator로는 inbred strain^c이고 H-2^d MHC haplotype으로 C57BL/6와는 MHC와 minor histocompatibility 항원 mismatch인 BALB/c 마우스의 비장 세포를 단일세포로 부유하여 사용하였다. Stimulator는 cesium irradiator를 사용하여 3,500 rad로 조사한 후에 사용하였다. 2 × 10⁵의 B6 lymphocyte responder와 5 × 10⁵의 irradiated BALB/c splenocyte stimulator를 96 well plate에 MLR media를 넣고 4일 동안 반응시켰다. 이 때 일정 농도(10, 2 µg/mL)의

시료를 첨가하였다. 세포의 증식 정도는 CellTiter-Glo (Promega)를 사용하여 ATP의 양을 측정하였으며, 시료의 용해에 사용한 DMSO 대조군을 100%로 간주하고 상대적인 비율을 계산하였다.

2차 배양 (1 L) 및 엑스 (균사체 및 배양액) 조제 – 정상 세포에 대한 세포독성이 없이 유의성 있는 allo-MLR 억제 활성이 관찰된 46종의 균주 (% Inhibition : 45% 이상)를 YPG+F 배지에서 27°C, 30일간 1 L 규모로 배양한 후, 배양된 균사체를 거즈 (cheesecloth) 여과하여 균사체 (mycelium) 와 배양액 (broth)으로 분리하였다. 균사체는 동결건조 후 CH₂Cl₂-MeOH (1:1)로 추출하고, 배양액은 EtOAc로 추출하여, 각각 46종의 균사체 엑스 (000M) 및 46종의 배양액 엑스 (000B)를 얻었다.

Intra-cellular interferon-gamma assay, CFSE proliferation assay – H2-A^b-restriction된 ovalbumin peptide 323-339 fragment에 특이적으로 반응하는 OT II transgenic CD4+ T 림프구를 실험에 사용하였다. OT II 마우스의 peripheral lymph node를 적출하여 단일 세포로 부유하고 1.25 mM 5,6-carboxyl fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probe, Eugene, OR, USA)로 염색을 한 후에, 2×10^5 세포를 정상 C57BL/6의 비장에서 분리한 수지상세포 (2×10^4 cells) 와 0.2 μM의 ovalbumin 323-339 peptide를 사용하여 3일 동안 자극하였다. 이 때 시료를 2 μg/mL를 첨가하였다. 활성화된 세포를 모아서 다시 PMA (50 ng/mL)과 ionomycin (1 μg/mL)로 4시간동안 자극해 주었고, 마지막 두 시간 동안은 1 μg/mL의 Golgi plug를 넣어 주었다. 세포는 anti-CD4, anti-IFN-γ, anti-Vβ5 mAb로 염색하여 유세포분석기(BD FACSCalibur, San Jose, CA, USA)를 통해 분석하고 얻어진 결과는 Flowjo software (Treestar, Ashland, OR, USA)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

생활수준의 향상, 수명의 연장, 진단의학의 발달 등 사회적으로 선진화가 급속하게 이루어짐에 따라 급성 질환보다는 만성적인 질환의 이환이 빠르게 증가하고 있으며, 또한 산업화로 인한 환경오염 등으로 자가면역질환자 또한 급증하고 있는 실정이다. 말기 장기부전증의 궁극적인 치료방법은 장기 이식이 필수적이며, 현재 약 25종의 장기에 대한 동종 이식이 실시되어 삶의 질을 높이고 있으며 조직적합성 검사와 새로운 면역억제제들의 개발로 이식장기의 생존율이 상당히 향상되었다. 하지만 최근 20년 동안 이식된 장기의 단기 생존율은 두 배 가까이 증가한 반면 장기 생존율은 여전히 낮은 것이 현실이다.¹²⁾ 장기부전 대상의 환자들의 연령은 점점 낮아지고 있는 반면에 장기이식 성공에 필수적인 기존의 면역억제제 cyclosporine A 및 FK506

(Prograf) 등은 사용의 초기에는 효과가 뚜렷하지만, 면역관용에 필수적인 기전을 억제하는 약물이기 때문에 장기간 사용했을 때 전신적 면역부전에 따른 이차감염, 만성거부반응 등으로 결국 이식된 장기가 손상되는 등 질환치료제로서 많은 한계점을 보이고 있다.¹³⁾ 따라서 장기이식의 질을 획기적으로 높이기 위해서는 보다 혁신적인 면역억제제, 즉 동종장기 이식 (allograft) 후 공여자 특이 면역관용 (donor specific tolerance) 유도를 저해하지 않는 새로운 면역억제제의 개발은 장기이식의 성공 및 관련된 자가면역질환 치료에 이어 만성병 치료에 획기적인 전기를 마련하게 될 것이다. 이러한 관점에서, 면역조절물질 탐색의 일환으로 생체 내에서 이식거부반응이 일어나는 정도를 예측할 수 있고, 또한 면역세포 (T cell)를 활성화 시키는 방법이 정상적으로 생체 내에서 일어나는 방법과 유사한 동종세포반응 (allo-MLR)^{11,13)}을 이용하여 1,895균주의 해양미생물 추출물을 대상으로 면역조절물질을 검색하였다.

1,895종의 추출물을 CellTiter-Glo (Promega)를 사용하여 10 및 2 μg/mL의 농도에서 1차 검색한 결과, 동해안에서 채집한 해조류에서 분리한 210균주의 해양미생물 중 14균주의 14종의 추출물에서 대조군 (DMSO)에 비해 세포독성이 적으면서 (85~90% 이상의 생존율) 세포증식을 45% 이상으로 억제하는 allo-MLR 활성억제 효과가 관찰되었다 (Table I). 또한 남해안 해조류 및 서해안 해조류에서 분리한 965균주 및 720균주의 해양미생물 중 각각 25균주의 25 종의 추출물 및 7균주의 7종의 추출물에서 allo-MLR 활성억제 효과가 관찰된 반면, 5균주의 5종의 추출물 (A-297, A-427, A-442, B-697, B-717)에서는 세포독성이 매우 적으면서 (100% 이상의 생존율) 세포증식을 100% 이상으로 증가시키는 allo-MLR 활성촉진 효과도 관찰되었다 (Table I). 1차 선별된 allo-MLR을 억제하는 46종의 해양미생물 균주를 각각 1 L 배양하여 얻은 46종의 균사체 엑스 (000M) 및 46종의 배양액 엑스 (000B)를 대상으로 2차 allo-MLR을 억제 효능을 검색하였다. 그 결과 동해안 해조류에서 분리되어 1차 allo-MLR assay에서 억제활성이 관찰된 14균주 중 1균주 (NPMB014)에서, 그리고 남해안 및 서해안에서 분리되어 1차 allo-MLR assay에서 억제활성이 관찰된 25균주 및 7균주 중 각각 11균주 (NPA388, NPA457, NPA515, NPA696, NPA736, NPA744, NPA757, NPA816, NPA834, NPA853, NPA963) 및 2균주 (NPB180, NPB204)에서 2차적으로 allo-MLR 억제활성이 다시 확인되었다 (Fig. 1, Table II). 엑스의 종류 별로 allo-MLR을 억제하는 시료를 살펴보면 총 46종의 균사체 엑스 중 7종의 엑스 (A-457M, A-696M, A-744M, A-757M, A-816M, A-834M, B180M)에서, 그리고 총 46종의 배양액 엑스 중 12종의 엑스 (MB-014B, A-388B, A-457B, A-515B, A-696B, A-736B, A-744B, A-816B, A-853B, A-963B, B180B, B204B)에서 세포독성이

Table I. Bioactive extracts on the 1st allo-MLR assay for the total 1,895 extracts of the marine-derived microorganisms

Extract No.	Proliferation assay (%)	Proliferation assay (%)	Proliferation assay (%)	Proliferation (Ave %)	Cell viability (%)
MB-006	45.15	60.47	46.27	50.63	101.07
MB-010	30.58	46.99	34.18	37.25	91.64
MB-013	44.18	57.55	46.95	49.56	103.83
MB-014	46.92	57.16	47.91	50.66	99.19
MB-020	45.85	52.68	43.78	47.44	94.31
MB-024	53.60	49.51	34.14	45.75	94.80
MB-087	60.07	56.60	45.28	53.98	97.94
MB-088	45.18	48.04	36.66	43.29	90.72
MB-111	31.97	45.66	32.94	36.86	91.45
MB-128	31.77	36.64	49.18	39.20	92.28
MB-131	38.79	50.21	41.15	43.38	93.09
MB-136	59.24	48.65	45.04	50.98	93.82
MB-154	60.74	57.83	41.37	53.31	96.80
MB-210	54.50	57.62	53.80	55.31	94.24
A-297	148.57	139.96	140.81	143.11	116.89
A-357	19.21	42.28	39.96	33.82	92.03
A-386	26.85	32.49	31.37	30.24	100.76
A-388	32.59	35.22	27.17	31.66	102.67
A-393	36.24	43.68	43.08	41.00	108.60
A-427	194.69	93.30	116.77	134.92	122.44
A-428	26.48	59.96	58.73	48.39	103.36
A-431	8.97	32.11	33.14	24.74	93.14
A-442	211.83	154.97	138.90	168.57	155.18
A-457	41.26	48.40	32.63	40.76	110.93
A-515	48.56	53.39	35.90	45.95	101.10
A-675	9.38	25.89	34.31	23.19	100.92
A-677	11.07	31.13	44.98	29.06	90.94
A-692	44.53	42.21	52.27	46.34	100.84
A-696	.31.40	17.54	21.53	23.49	100.15
A-702	22.30	42.96	56.84	40.70	96.38
A-714	36.76	36.27	49.90	40.98	103.56
A-736	54.89	50.74	56.17	53.93	97.92
A-744	37.67	47.66	49.48	44.94	102.02
A-757	50.75	40.30	52.43	47.83	109.39
A-776	1.67	11.49	16.38	9.85	93.51
A-816	17.56	24.37	40.34	27.42	85.05
A-831	32.13	30.16	47.89	36.73	96.13
A-834	0.30	21.34	26.57	16.07	92.43
A-835	25.01	25.37	37.45	29.28	97.42
A-853	43.08	33.65	45.84	40.86	89.66
A-897	17.82	21.64	35.94	25.13	89.25
A-963	50.91	49.18	59.11	53.07	97.05
B-180	5.58	20.03	29.29	18.30	85.91
B-204	10.25	25.22	39.84	25.10	85.14
B-250	9.70	27.68	38.44	25.27	85.42
B-289	29.63	46.14	58.10	44.62	91.62
B-662	2.35	50.58	52.52	35.15	96.64
B-663	5.62	46.00	47.76	33.13	86.22
B-697	251.30	107.25	111.36	156.64	114.29
B-709	27.51	50.33	53.15	43.66	105.47
B-717	315.84	130.24	104.67	183.58	105.36

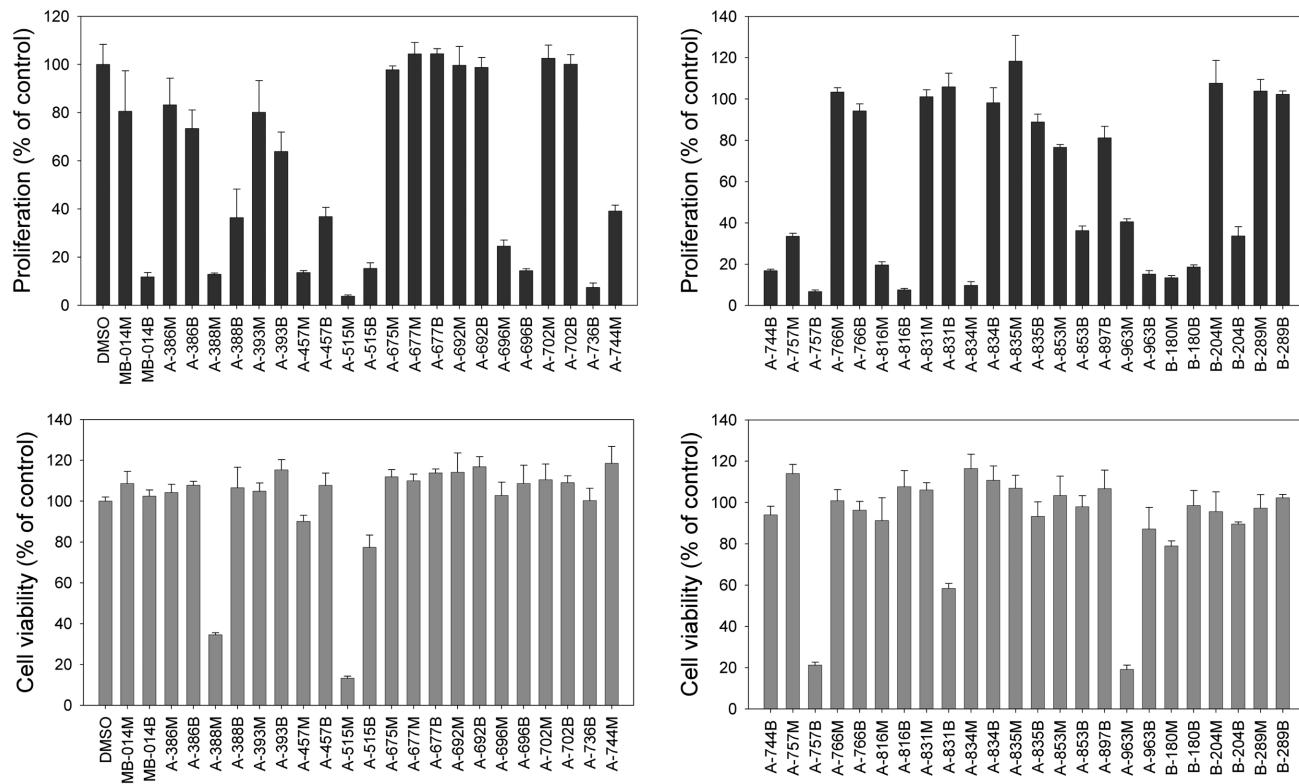


Fig. 1. Marine-derived fungal extracts inhibited proliferation of lymphocytes in the allogeneic mixed lymphocyte reaction. Lymphocytes (2×10^5) from wild-type B6 mice were incubated with irradiated plenocytes (5×10^5) from BALB/c mice in the presence of 10 μ g/mL of extracts or vehicle. After four days, cells were lysed by adding 100 μ L of CellTiter-Glo. Intensity of luminescence was measured by luminometer. To evaluate the cytotoxicity of extracts, splenocytes (5×10^5) from wild-type B6 mice were treated with 2 μ g/mL of extracts or vehicle for 16 hours. The relative intensity of luminescence was compared with DMSO control.

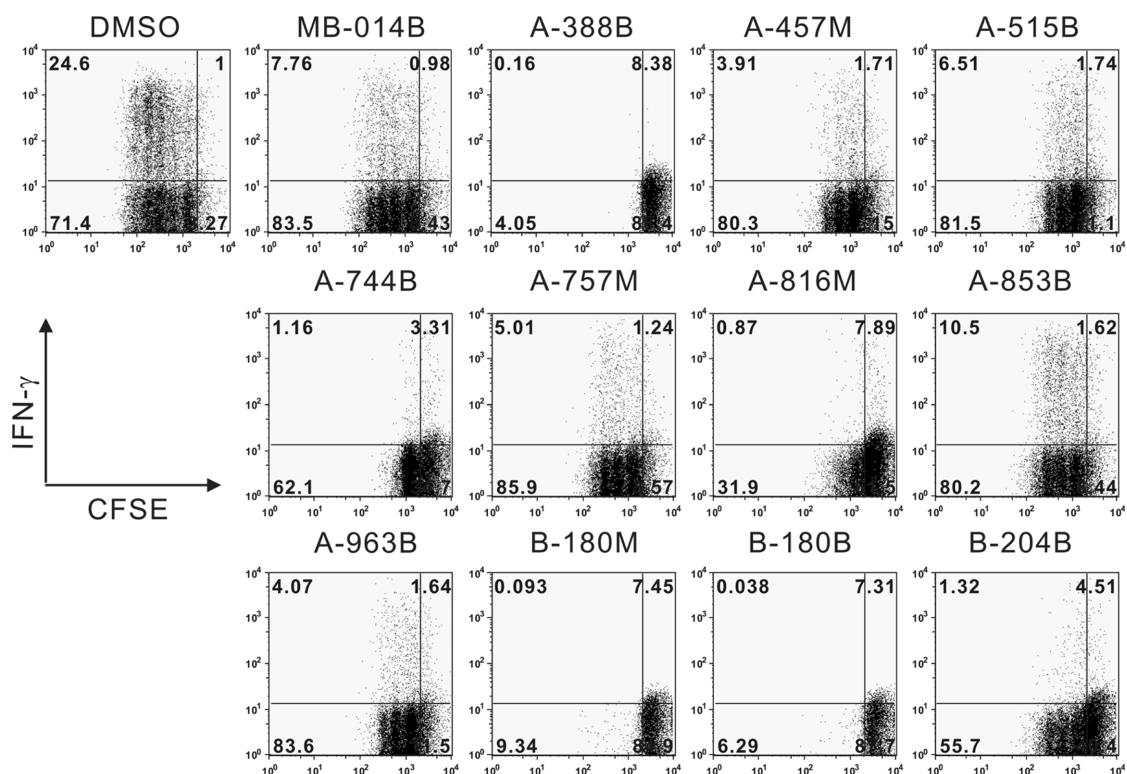
없이 allo-MLR 억제활성이 관찰되었다 (Fig. 1, Table II). 이는 1차 검색에서 allo-MLR 억제활성이 관찰된 총 46균주 중 2차 검색에서 14균주에서 allo-MLR 억제활성이 재현되어 30%의 재현성을 보였다 (Table II).

앞에서 실시한 allo-MLR과 cytotoxicity assay 외에도 싸이토카인의 생성은 면역반응에 매우 중요하게 작용한다. 세포의 증식과 함께 싸이토카인 중 IFN- γ 의 생성을 분석하였다. 일반적인 inbred strain의 마우스의 경우는 T 림프구가 매우 다양한 repertoire를 가지고 있으며 특정 항원에 대한 T 세포의 경우에도 매우 다양한 affinity의 세포군으로 구성되어 있어서 동일한 실험조건을 사용해도 일정한 정도의 면역반응이 일어나지 않게 되어 변이가 심하게 된다. 단일한 항원에 대한 단일한 affinity를 가지는 transgenic CD4+ T 림프구를 사용하게 되면 이와 같은 문제가 해결되는데, 3 차 sample 스크리닝에서는 allo-MLR assay 외에 H2-A^b-restriction된 ovalbumin peptide 323-339 fragment에 특이적으로 반응하는 OT II transgenic CD4+ T 림프구를 실험에 사용하였다. OT II 마우스의 peripheral lymph node를 적출하여 단일 세포로 부유하고 CFSE로 염색을 한 후에 C57BL/

6의 antigen presenting cell과 ovalbumin 323-339 peptide를 사용하여 activation 시켰다. CFSE의 분열을 통한 세포증식 분석을 single cell 단위로 flowcytometer로 분석하여 각각의 세포가 몇 번의 세포분열을 하는지를 분석하고 동시에 intracellular interferon gamma 염색을 하여 분열의 정도와 effector cytokine인 interferon gamma의 발현 정도를 구분하여, 림프구의 분열에 작용을 하는 활성 분획과 effector cytokine의 발현(분화)에 관여하는 활성 분획을 검색하였다. 2차 효능 검색에서 효능이 관찰된 14균주의 19종의 엑스를 대상으로 세포의 증식과 함께 싸이토카인 중 IFN- γ 의 생성 여부를 조사한 3차 효능검색에서 11균주 (NPMB014, NPA388, NPA457, NPA515, NPA744, NPA757, NPA816, NPA853, NPA963, NPB180, NPB204)의 12종의 엑스 (MB-014B, A-388B, A-457M, A-515B, A-744M, A-757M, A-816M, A-853B, A-963M, B-180M, B-180B, B-204B)에서 effector cytokine인 interferon gamma의 생성이 저해되는 것을 확인하였고, 이 중 5종의 시료 (A-388B, A-744B, A-816M, B-180M, B-180B)에서는 세포분열과 동시에 interferon gamma의 생성이 저해되었다 (Fig. 2).

Table II. allo-MLR inhibitory activity at conc. 10 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on the 2nd allo-MLR assay for the 96 extracts of the bioactive 46 strains selected from the 1st allo-MLR assay

Extract No.	Proliferation (% Inhibition) (n=3)	Cytotoxicity	Extract No.	Proliferation (% Inhibition) (n=3)	Cytotoxicity
MB-014B	88.20		A-757M	66.41	
A-388M	85.82	cytotoxic	A-757B	93.28	cytotoxic
A-388B	89.27		A-816M	80.33	
A-457M	76.06		A-816B	92.39	
A-457B	86.01		A-834M	90.21	
A-515M	85.85	cytotoxic	A-853B	41.66	
A-515B	94.50		A-963M	59.41	cytotoxic
A-696M	75.38		A-963B	94.86	
A-696B	85.61		B-180M	86.54	
A-736B	92.60		B-180B	81.36	
A-744M	60.86		B-204B	66.27	
A-744B	83.10				

**Fig. 2. Marine-derived fungal extracts inhibited proliferation and IFN- γ production of CD4+ T cells during the stimulation with specific antigen.** CFSE-labeled CD4+ T cells (2×10^5) from OT II mice were incubated with 2×10^4 splenic DC from wild-type B6 mice in the presence of 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of extracts or vehicle. After three days, cells were harvested and re-stimulated with PMA + ionomycin, followed by intracellular cytokine staining. Cell division was monitored by levels of CFSE dilution, and staining for intracellular IFN- γ was dot plotted.

이상의 결과로부터 해조류로부터 분리한 공생, 기생 혹은 부생 미생물을 대상으로 allo-MLR에 대한 활성억제 혹은 촉진 물질의 탐색 및 그 물질들의 화학적 구조 규명과, 세

포생물학적 작용 기작의 연구는 새로운 천연 유래의 작용 점-특이적 면역조절 선도물질의 개발을 위한 중요한 연구의 대상 시료로서 충분한 가치가 있다고 생각된다.

사 사

이 논문은 2010학년도 부경대학교의 지원을 받아 수행된 연구임 (PK-2010-040). 질량분석은 한국기초과학지원연구원(대전)에 의뢰하여 수행하였으며 감사드립니다.

인용문헌

1. Hester, R. E. and Harrison, R. M. (ed.) (2000) Chemistry in the Marine Environment. RSC (Royal Society of Chemistry), Cambridge, U. K.
2. Fusetani, N. (ed.) (2000) Drugs from the sea. Karger, Basal, Switzerland.
3. Tubaki, K. (1992) Marine Microorganism as Drug Resources. In Yajima, H., Shioiri, T. and Ohizumi, Y. (ed.), Marine Resources for Drug Discovery, 313-334, Hirokawa Publishing Co. Tokyo, Japan.
4. Henkel, T., Brunne, R. M., Muller, H. and Reichel, F. (1999) Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew. Chem., Int. Ed.* **38**: 643-647.
5. Choi, J. S., Lee, W. K., Son, B. W., Kim, D. -S., Choi, H. D., Choi, J. S., Jung, J. H., Im, K. S. and Choi, W. C. (2000) Screening on radical scavenging activity of marine microalgae. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 252-255.
6. Li, X., Li, Y., Nam, K. W., Kim, D. -S., Choi, H. D. and Son, B. W. (2002) Screening of radical scavenging activity from the marine-derived fungus. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 219-223.
7. Li, X., Li, Y., Jeong, J. H., Lee, K. T., Choi, H. D. and Son, B. W. (2003) Screening of tyrosinase inhibiting activity from the marine-derived fungus. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**: 138-141.
8. Li, Y., Li, X., Son, B. W. and Choi, H. D. (2003) Screening of antimicrobial activity from the marine-derived fungus. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**: 142-144.
9. Yun, K., Yang, G., Feng, Z., Nenkep, V. N., Siwe-Noundou, X., Leutou, A. S., Kim, K. -D., Cho, H., Choi, H. D. and Son, B. W. (2010) Screening on receptor tyrosine kinase inhibitory activity of marine algae-derived symbiotic microorganisms. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 43-47.
10. Yun, K., Kondempudi, C. M., Choi, H. D., Kang, J. S. and Son, B. W. (2011) Microbial mannosidation of bioactive chlorogentisyl alcohol by the marine-derived fughus *Chrysosporiumsynchroonum*. *Chem. Pharm. Bull.* **59**: 499-501.
11. Kang, H. G., Lee, J. E., Yang, S. H., Lee, S. H., Gao, W., Strom, T. B., Oh, K., Lee, D. S. and Kim, Y. S. (2010) Donor-strain-derived immature dendritic cell pre-treatment induced hyporesponsiveness against allogeneic antigens. *Immunology* **29**: 567-577.
12. Lodhi, S. A., Lamb, K. E. and Meier-Kriesche, H. U. (2011) Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success. *Am. J. Transplant.* **11**: 1226-1235.
13. Guerra, G., Srinivas, T. R. and Meier-Kriesche, H. U. (2007) Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in kidney transplantation. *Transplant International.* **20**: 813-827.

(2011. 9. 26 접수; 2011. 11. 17 심사; 2011. 11. 17 게재확정)