TSPM15050-066-3

양극해 해양생물유래 신규대사물질 발굴연구

Isolation of New Secondary Metabolites from the Marine Sources of Polar Ocean



원광대학교 산학협력단



극지연구소장 귀하

본 보고서를 "양극해 미래자원 탐사 및 활용기술 개발"과제의 위탁연구 "양극해 해양생물 유래 신규대사물질 발굴연구"과제의 최종보고서로 제출합니다.



요 약 문

I.제 목

■ 양극해 해양생물유래 신규대사물질 발굴연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

- 양극해 해양생물자원으로부터 생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴을 목표로 극지생물 유래 추출물의 제조하고 대사체 추출물 유래 분획물 라이브러리 구축하여 생리활성 대사 체의 분리 연구를 진행한다. 또한 활성 대사체의 구조 분석 및 활성 기작 검토하여 신규 바이오소재개발을 위한 기초 자료로 제공한다.
- 육상생물로부터의 신물질 개발은 이미 한계에 도달하였으므로, 21세기 암, 에이즈, 노화 치료 등의 신물질 및 신의약품 개발사업은 해양생물을 이용한 첨단 산업이 가장 가능성 이 높다고 예상된다.
- 실질적으로 해양생물의 제품화 비율은 1/6,000로서 육상생물(1/13,000)에 비해 신물질 개 발 성공가능성이 매우 높다.
- 양극해에 서식하는 해양생물은 생리활성 물질탐색의 대상으로서 거의 연구가 이루어지지
 않은 미지의 생물자원이다.
- 또한 극한해양환경에 적응하고 진화해온 극지환경 생물 자원의 특성상 현재까지 발굴된 이차대사물질과는 상이한 화학구조 및 생리 활성을 가지는 이차대사물질이 발굴될 가능 성이 매우 높으며 이는 약 스크리닝시 중요한 요소로 인식되는 분자구조의 다양성구축면 에서 장점을 지니고 있다.
- 따라서 이상과 같이 신규 의약 소재 및 기타 기능성 소재의 원천재료로서의 무한한 잠재 가치를 가지는 양극해 해양생물 유래 이차대사물질을 효과적으로 분리하고 관련 기초자 료를 제공하기 위하여 본 연구를 수행하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

연구개발 목표 양 극해 해양생물자원으로부터 생리활성을 지닌			닌	이차대사물질을 발굴	
세부 연구개발 목표			세부 연구개발 내용		연구범위
극지생물 유래 추출물의 제조		0	극지생물을 대상으로 methanol을 이 용 저분자 추출물 시료 추출 및 농 축	0	10종 이상의 해양생물 유래 추출물 확보
대사체 추출물 유래 분획물 라이브러리 구축		0	효과적이고 규격화된 분획물 제조법 을 수립하고 이를 적용한 분획물 라 이브러리 제작	0	10종 이상의 추출물 에 대한 분획물 라이브러리 구축
생리활성 대사체의 분리		0	활성 추적 법을 이용한 생리활성 물 질의 분리 각종 크로마토그래피 기법을 적용	0	5종 이상의 생리활성 metabolite 분리 여부
활성 대사체의 분석 및 활성 검토	리 구조 기작	0	2종이상의 생리활성 검색법 운용 분리된 이차대사물질에 대한 분광학 적 자료검토를 통한 구조규명	0	2종의 검색법 운영 3종의 화합물 구조규명

극지연구소

Ⅳ. 연구개발결과

연 차	연구 내용	연구 결과
	극지생물 시료	- 총 20종의 극지생물 및 극지생물 유래 미생물 시료에 대한
	들 이용하여	EtOAc 주출물을 제작 완료. (연구개발 주요내용의 [별점
	MeOH 주줄물	
	제작	- <u>당해연도 목표(20종) 달성</u> .
	확 보 된	- 총 20종의 극지생물 유래 미생물 EtOAc 추출물을 대상으로,
	MeOH/EtOAc 초초묘 이제	C18 덕성 실업크도마도그대퍼럽을 적용, 적적 0중의 군획물 을 제조. [별첨1-2]
	수물물 휴대	- 당해연도 목표(20종 이상)의 220% (총 44종) 초과 달성.
	문획줄 다이므	- 확보된 분획물 라이브러리를 이용해 생리활성 대사체 분리
	더니 구죽	연구 및 구조분석, 활성 기작 검토 연구를 수행함.
		- 3차년도 확보 추출물 1종 유래 분획물(SF6390)에서 <u>8종 활</u>
5차년도	확보된 분획물 에서 활성 대 사체 분리 연	<u>성 후보 대사체 분리</u> . [별첨1-3-1]
		- 3차년도 확보 추출물 1종 유래 분획물(SF6354)에서 <u>1종 활</u>
		성 후보 대사체 분리. [별첨1-3-2]
		- 4차년도 확보 추출물 1종 유래 분획물(SF6789)에서 <u>1종 활</u>
	7	성 후보 대사체 분리. [별첨1-3-3]
		- 당해연도 목표(3종 이상)의 333.3% (총 10종) 초과 달성.
		- 분리된 10종 활성 후보 대사체 가운데 <u>5종 구조 분석 완료.</u>
	브리하 화서	- 당해연도 목표(3종 이상)의 166.6% (총 5종) 초과 달성.[별
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	첨1-3-4] 시간 구소
	내가제커 ㅜ소	- 3차년도 분리된 후보 대사체 가운데 총 5종의 대사체 에서 우
	문식 및 활성	수한 활성 기작을 확인 할 수 있었음. [별첨1-4-1,2,3,4]
	기작 검토	- 당해연도 목표(3종 이상)의 166.6% (총 5종) 초과 달성.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구에서 확인된 항염, 뇌세포보호효과 및 PTP1B 저해화합물들은 물질특허 획득이 가능하며 향후 추가적인 활성 확인을 통하여 기능성소재나 기타 의약품으로의 개발 가 능성을 타진해 볼 수 있다.
- 또한 만약 단일 물질로서 의약품으로 개발 등이 불가능해도 chemical probe로서 다양한 생명과학의 분야에서 고가의 연구용 소재로서 상업적으로 개발해도 전망이 밝다고 사료 된다.
- 따라서 향후에 후속 연구로서 본 연구에서 사용된 소재로부터 물질을 대량 확보 하고 이를 활용하여 세포 및 실험동물수준에서 관련 활성을 검증 등의 추가 연구가 필요하다 고 사료된다.



SUMMARY

Purpose	Isolation of various secondary metabolites from relatively untapped marine sources of polar ocean, employing bioassay-guide fractionation investigation
Contents	 Conducting various in vitro assays targeting anti- neuroprotective, anti-diabetic, anti-inflammatory, and anti-obesity agents Isolation of secondary metabolites from extracts of marine sources of polar ocean Isolation of secondary metabolites from marine organisms by various chromatographic methods Structure elucidation of isolated metabolites by spectroscopic and chemical methods Evaluation of biological activities of identified metabolites by a number of biochemical methods
Expected Contribution	 Contribute to the bio-active secondary metabolites depository Collection of marine sources of polar ocean database Provide lead compounds for the developments of drugs and/or other functional agents

CONTENTS

1.	Introduction	9
2.	Trends in research	12
3.	Research results	14
4.	Research achievements and impacts	94
5.	Perspective on the application of research results	96
6.	References 국지연구소	97

목 차

제	1	장	서론
제	2	장	국내외 기술개발 현황
제	3	장	연구개발 수행 내용 및 결과
제	4	장	연구개발 목표 달성도 및 대외기여도94
제	5	장	연구개발결과의 활용계획
제	6	장	^{참고문헌} 97 극지연구소

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

- 양극해 해양생물자원으로부터 생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴을 목표로 극지생물 유래 추출물의 제조하고 대사체 추출물 유래 분획물 라이브러리 구축하여 생리활성 대사 체의 분리 연구를 진행한다. 또한 활성 대사체의 구조 분석 및 활성 기작 검토하여 신규 바이오소재개발을 위한 기초 자료로 제공한다.
- 위 목표달성을 위하여 본 연구에서는 다음과 같은 연구내용을 수행하고자 한다.
 -양극해 유래 해양생물자원 유래 대사체 추출물 확보
 -약물타겟 효소검정법을 이용한 검색계 운영
 -표준화된 분획 방법을 적용하여 대사체 추출물로부터 혼합물의 성분을 특정 할 수 있는 대사체 분획물 라이브러리 확보
 -활성 및 성분 추적법을 적용하여 이차대사물질 발굴 및 생리활성 검정

극지연구소

제 2절 연구개발의 필요성

■ 기술적 측면

- 대사산물 중 많은 것이 생리활성물질로서 신약 개발에서 많은 장점을 가지고 있음에도 불구하고, 1990초 조합화학과 초고속대량탐색기술이라는 새로운 기술이 등장함에 따라 생 리활성물질은 신약 개발 분야에서 쇠퇴하였으나 이후 10 여년 동안 많은 제약회사가 신 기술을 적용하여 합성화합물에 의한 신약 개발에 힘써 왔지만 새로운 신약은 지속적으로 감소하였다. 이러한 사실은 신약개발에서 screening을 위한 library 구축에 있어서 보유 하고 있는 화합물의 수가 중요한 것이 아니고, 보유하고 있는 화합물의 구조적 특징 및 화학구조를 형성하는 골격의 다양성이 중요하다는 사실을 시사하고 있다.
- 따라서 천연자원 유래의 이차대사물질에 대한 신약개발프로그램에서 가지는 중요성은
 재 부각 되고 있다고 할 수 있으며 이때 요구되어 다양한 골격의 화학적 다양성을 천연

자원유래 이차대사물질로부터 제공 받기 위해서는 이미 상대적으로 활발하게 생리활성물 질 탐색연구가 진행된 육상생물에 대한 연구보다는 아직까지 많은 연구가 진행되지 않은 자원에 대한 연구가 최근 관심의 대상이 되고 있다.

- 실질적으로 해양생물의 제품화 비율은 1/6,000로서 육상생물(1/13,000)에 비해 신물질 개 발 성공가능성이 매우 높다.
- 예를 들면, 약 250,000 종의 식물체에 대한 생리활성 천연물 연구가 이루어진 반면 해양 생물에 대한 체계적인 연구는 이제 막 시작 단계라고 할 수 있으며 특히 해양환경에 존 재하는 생물의 다양성 및 해양환경의 특성상 많은 해양 생물체들이 자기방어의 수단으 로 다양한 이차대사물질을 생산하는 전략을 가지고 있음을 고려할 경우 해양생물이 가지 는 생리활성 천연물의 자원으로서 가지는 잠재력은 막대하다고 할 수 있다.
- 체계적인 해양생물을 대상으로 한 연구는 식물 등 육상 생물계에 대한 연구에 비해 상당 히 늦은 1970년대 중반에 시작 되었으며 약 2500 여종의 새로운 물질 1977-1987년 사이 에 이 해양생물로 부터 분리된바 있으며 이는 해양생물체가 주요한 신물질의 보고로서 가치고 가지고 있음을 보여주는 증거라 볼 수 있다.
- 해양유래의 천연물은 그 구조가 육상에서 분리되는 물질과 상이한 경우가 많음으로 신약
 스크리닝시 중요한 요소로 인식되는 분자구조의 다양성구축면에서 장점을 지니고 있다고 판단된다.
- 양극해에 서식하는 해양생물은 생리활성 물질탐색의 대상으로서 거의 연구가 이루어지지
 않은 미지의 생물자원이다.
- 특히 양극해 지방에 서식하는 해양생물은 위에서 언급한 해양생물자원으로서 가지는 특징에 추가적으로 양극지방의 독특한 극한환경 및 생태환경이 추가적으로 양극환경에 서식하는 해양생물의 이차대사물질 생합성 과정에 영향을 주었을 것으로 예상되므로 매우 독특한 생물자원으로 인식 될 수 있다.

■ 경제·산업적측면

 양극해 해양생물 유래의 생리활성 metabolite의 확보는 현재 제약 및 보건의약산업의 신 의약 제품의 개발 시 필수적으로 이룩해야 하는 새로운 구조 및 의약활성을 갖는 선도화합물 의 확보에 관련되어 있다. 제약 산업에서 새로운 의약품의 개발은 질병의 원인과 발병기작에 근거하여 목표기작을 설정하여 선도물질의 탐색에서 시작된다. 이와 같은 관점에서 생리활성 을 가지는 신규 화합물을 자연계로부터 개발하는 기술은 전 분야의 의약품개발을 위한 기반 적 기술로 활용할 수 있다.

■ 사회·문화적측면

- 우리나라도 고도산업 사회로의 발전과 소득수준의 향상에 따른 식생활 양식의 서구화와, 보건의료의 증진에 의한 수명연장에 따른 필연적 수반 질병인 암과 성인형 질환의 발병
 및 이에 따른 치료제 수요의 급속한 증가는 불가피할 것이다. 따라서 국내의 시장성은 더욱 신장할 것이며 이에 따른 새로운 의약품의 개발이 필연적으로 요구되고 있다.
- 육상생물로부터의 신물질 개발은 이미 한계에 도달하였으므로, 21세기 암, 에이즈, 노화 치료 등의 신물질 및 신의약품 개발사업은 해양생물을 이용한 첨단 산업이 가장 가능성 이 높다고 예상된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

세계적 수준에서 보았을 때 개념 정립의 단계로 연구에 대한 관심이 증가하고 있음

- 선진국들은 쇄빙선, 대륙기지 및 남북극권 국가 간의 공동연구를 통하여 극지 해양생물에 대한 자원탐사를 실시하고 있으며, 현재에도 과학 활동의 명목으로 미답지역의 생물자원을 확 보하고 있음.
- SCAR 내 EBA(Evolution and Biodiversity in the Antarctic) 프로그램에서는 남극생물의 진화, 적응, 생태적 서식처의 다양성, 다양성의 예측 등에 대한 연구를 진행.
- 영국은 LTMS (Long-term Monitoring and Survey) 장기 모니터링 및 관측 프로그램은 별도로 운영하고 있으며, 국립해양센터를 중심으로 해양 생물다양성 조사(Census of Marine Life)를 실시하여 남극해에 서식하는 생물종과 환경을 보고하였으며, 해양생명공학의 소재로 특유의 방어 기작을 지닌 극지 저서동물 연구를 확대하고 있음.
- 호주의 남극연구소는 영국의 남극연구소와 공동으로 30년 가까이 약 5년 단위의 장기 프로 그램을 통해 남극 수산자원과 해양생태계 변동과정 연구를 지속적 수행 중
- 중국은 '중국 극지연구소' 주도하에 '극지표본자원 공유 플랫홈' 사업을 통하여 남극지역을 대상으로 자원 활용이 가능한 남극 광물, 생물자원을 수집하고 있음
- 국지생물다양성, 생물계통·진화, 스트레스반응 등에 대한 연구를 위해 2007/2008 IPY를 통하여 국제공동연구 체계가 이루어지고 있으며, 이외 저온효소 등의 신규 생물소재 연구를 공식적으로 보고
- 뉴질랜드의 캔터베리 대학의 연구진은 지난 수년간 남극해양유래의 해양생물을 대상으로
 한 이차대사물질을 지속적으로 수행하고 있으며 대표적으로 강력한 CDK 저해제인
 variolins를 분리하였음
- 미국 Univ. of South Florida의 연구진은 남극유래의 Tunicate로부터 항암세포 사멸효과
 를 가지는 palmerolide A 라는 신규 macarolide형 대사체를 분리하였음

제 2 절 국내 기술개발 현황

- 국내의 해양천연물에 대한 관심은 증가하고 있으나 관련 연구 인프라 및 기술개발수준은
 아직 선진국 수준에 미치지 못하고 있는 실정 임
- 1985년 이후 물질특허제의 도입과 함께 천연물 과학 분야에 대한 관심이 높아져 한국생명 공학연구원, 한국과학기술원, 한국화학연구원, 한국해양연구원 등을 중심으로 천연물 성분 연구에 대한 관심이 증대하고 있음
- 최근 한국과학기술연구원은 강릉에 천연물연구소 분원을 설립하였고 각 지방자치단체에서 도 거의 대부분이 천연물을 활용한 바이오산업을 목표로 하고 있어 천연물과학 분야의 연 구에 대한 관심이 증대하고 있음을 알 수 있다.
- 그동안 우리나라는 천연물관련 연구개발 투자가 미흡한 편 이었으나 1995년 과학기술부의 선도기술개발 사업 이후 정부차원의 연구비가 점차증대하고 있으며 특히 최근 과학기술부 에 의해 시행되고 있는 23개의 프런티어연구개발 사업 중 8개의 사업단이 생명과학분야이 고 이들 대부분이 천연물을 소재로 하고 있다. 또한 국토해양부에서도 2004년도부터 마린 바이오21 사업을 수행하고 있음
- 그러나 국내의 경우 천연물신약개발에 기초가 되는 천연물 생리활성 탐색기술과 약리작용
 및 독성연구 등에 대한 기초연구가 아직 미흡한 편이며 이에 따라 대부분의 천연물 성분
 및 생리활성 연구가 지속적, 조직적, 효율적, 체계적으로 이루어지지 못하고 있음
- 특히 양극해 해양생물 관련 연구의 경우 양극해 의 독특한 극한환경으로 인한 자원 확보
 의 어려움이 존재하므로 해양생물자원 활용 연구 및 산업화의 저변확대를 위해서는 제한생물자원의 체계적인 확보 및 관리를 위한 국토해양부차원의 지원정책이 필요함
- 우리나라의 극지연구소는 극지바이오 연구 활성화를 위하여 극지생물 DB 구축/운영, 극한
 환경 적응기작, 대사체 확보 및 활용연구를 진행하고 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 범위 및 연구 수행 방법

여구범위	연구수행방법
	(이론적·실험적 접근 방법)
	○극지 연구소로부터 극지유래 양극해 해양생물 소재를 제공받고 각
	생물체의 특성에 맞춰 적절한 조 추출물을 확보
	○극지 생물, 극지생물 유래 미생물, Ross해 연안에서 채취한 해양생물
극지 생물 유해	들 의 극지생물 유래 시료에 대한 MeOH/EtOAc 추출물을 제작
추출물 제조 및	○각 추출물로부터 생리활성 물질을 탐색하기 위하여 건조된 시료로부
표준화된 분획과정을	터 MeOH/EtOAc(1L)를 이용하여 3일간 추출을 두 번 진행
적용한 대사체 추출물	○얻어진 MeOH/EtoAc 추출물에 대하여 C₁8-functionalized silica gel
유래 분획물	flash column chromatography를 수행 하였으며, 용출 용매로는 단계
라이브러리 구축 연구	적 기울기 용리법을 사용 [20%, 40%, 60%, 80%, and 100% (v/v)
	MeOH in H_2O (500ml each)].
	○크로마토그래피를 통해 얻어진 분획물들에 대한 NMR data 분석을
	통해 우선 연구 진행 후보 분획물 선정
	○각 분획물에 대한 1차적인 생리 활성 검색을 진행하며, 이때 2가지
	이상의 검색 방법 이용 🔄 🥂
	○기본적으로 항염증 활성(Nitrite 생성 억제), 뇌세포 보호 효과
	(glutamate 독성 유발)를 탐색
	○각 분획물에 대한 생리 활성 결과와 ¹ H NMR 측정 및 연구책임자의
	다양한 구조분석 경험을 토대로 한 해석을 통하여 초기단계에서 추
	출물에 함유된 성분의 형태를 예상하고 이를 기초로 우선 연구 대상
	선정
생리 활성 대사체	○탐색대상으로부터 검정계에 의해 선정된 시료는 활성 대사체의 분리,
분리/구조분석 연구 및	정제를 시행하며, 활성 대사체가 존재하는 분획을 적당한 이동상으로
활성 기작 분석 연구	column chromatography (CC)를 실시하여 활성 대사체를 분리 정제
	하며 칼럼 크로마토그라피는 필요에 따라 순상 실리카겔, 역상 실리
	카겔, Sephadex LH-20, Cellulose 등의 고정상을 이용하여 실행
	○분리된 활성 대사체은 NMR, Mass, IR, UV 흡수파장분석 등의 기기
	분석을 통하여 구조를 규명하고 구조의 특이성과 생리 활성도를 비
	교 및 활성 작용 기작 분석 진행
	○분리된 활성 대사체는 항염증 기전, 뇌세포 보호 기전, 간세포 보호
	기전, 항암 기전 등 다양한 활성 기작 분석을 통해 대사체가 갖는 새
	로운 생리 활성을 탐색하는 연구 진행

제 2 절 극지생물 유래 추출물의 제조 연구

연구 내용	연구 결과
극지생물 시료를 이용하여 MeOH/EtOAc 추출물 제작	 각 추출물로부터 생리활성 물질을 탐색하기 위하여 고체배양 균사체로부터 터 EtOAc를 이용하여 3일간 추출을 두 번 진행하였음. 양극해 해양생물 유래 진균 <u>총 44종</u>의 극지생물 유래 시료에 대한 EtOAc 추출물을 제작 완료. [별첨1-1] 당해연도 목표(20종) 달성

[별첨1-1] 극지생물 유래 미생물 시료를 이용한 추출물 제작 목록

NO	Sample ID	유래 소재	추출용매	추출물 무게
1	SF6192	극지생물 유래 미생물	EtOAc	916.9mg
2	SF6215	극지생물 유래 미생물	EtOAc	708.6mg
3	SF6338	극지생물 유래 미생물	EtOAc	1191.1mg
4	SF6408	극지생물 유래 미생물	EtOAc	1042.8mg
5	SF6505	극지생물 유래 미생물	EtOAc	1469.8mg
6	SF6515	극지생물 유래 미생물	EtOAc	1519.8mg
7	SF6538	극지생물 유래 미생물	EtOAc	1218.2mg
8	SF6600	극지생물 유래 미생물	EtOAc	1163.8mg
9	SF6604	극지생물 유래 미생물	EtOAc	523.9mg
10	SF6611	극지생물 유래 미생물	EtOAc	662.3mg
11	2015RS2 #ST20-BC-BS-2	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	53.5g
12	2015RS2 #ST56-DR-BS-1	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	106g
13	2015RS2 #ST56-DR-BS-2	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	18.2g
14	2015RS2 #ST56-DR-BS-3	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	2.75g
15	2015RS2 #ST56-DR-BS-4	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	37.2g
16	2015RS2 #ST56-DR-BS-5	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	37.8g
17	2015RS2 #ST56-DR-BS-6	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	3g
18	2015RS2 #ST56-DR-BS-7	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	75.6g
19	2015RS2 #ST56-DR-BS-96	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	18g
20	2015RS2 #ST56-DR-BS-97	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	46.1g
21	2015RS2 #ST56-DR-BS-98	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	11.9g

22	2015RS2	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	8.35g
23	#S160-DR-BS-1 2015RS2 #STC0_DB_BS_7	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	19.7g
24	#S160-DR-BS-7 2015RS2	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	66.4g
25	#5160-DR-BS-9 2015RS2	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	24g
26	#S160-DR-BS-10 2015RS2	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	15.6g
27	#S161-RD-BS-1 2015RS2 #ST66_DD_DS_1	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	14.3g
28	#S100-DR-BS-1 2015RS2 #ST66-DD-PS-4	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	64.3g
29	2015RS2 #ST66-DR-BS-2	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	3.2g
30	2015RS2 #ST66-DR-BS-5	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	5g
31	2015RS2 #ST73-DR-BS-1	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	12.5g
32	2015RS2 #ST21-DR-BS-55	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	7.15g
33	2015RS2 #ST21-DR-BS-51	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	86g
34	2015RS2 #ST21-DR-BS-54	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	3.1g
35	2015RS2 #ST21-DR-BS-52	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	13.3g
36	2015RS2 #ST21-DR-BS-46	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	31g
37	2015RS2 #ST21-DR-BS-48	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	40.8g
38	2015RS2 #ST73-DR-BS-42	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	16.6g
39	2015RS2 #ST21-DR-BS-47	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	23.8g
40	2015RS2 #ST73-DR-BS-5	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	44g
41	2015RS2 #ST73-DR-BS-4	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	28.6g
42	2015RS2 #ST66-DR-BS-모듬1 1	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	49.7g
43	2015RS2 #ST73-DR-BS-3	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	8.1g
44	2015RS2 #ST73-DR-BS-6	남극 Ross해 유래 해양생물	EtOAc	9.4g

제 3 절 대사체 추출물 유래 분획물 라이브러리 구축 연구

연구내용	연구결과
확보된 추출물 유래 분획물 제조 방법 연구	 확보한 해양진균우래 EtoAc 추출물에 대하여 C₁₈-functionalized silica gel flash column chromatography를 수행 하였으며, 용출 용매로는 단계적 기울 기 용리법을 사용함 [20%, 40%, 60%, 80%, and 100% (v/v) MeOH in H₂O (500 ml each)] 크로마토그래피를 통해 얻어진 분획물들에 대한 NMR data 분석을 통해 우선 연구 진행 후보 분획물을 선정함
확보된 MeOH/EtoAc 추출물 유래 분획물 라이브러리 구축	 총 20종의 극지생물 유래 미생물 EtOAc 추출물을 이용하여, 각각 6종의 분획 물을 제조하였음. 당해연도 <u>목표(20종 이상)의 100% (총 20종) 달성.</u> [별첨 1-2] 확보된 분획물 라이브러리를 이용해 생리활성 대사체 분리 연구 및 구조분석, 활성 기작 검토 연구를 수행함.

[별첨1-2] 극지생물 유례 미생물 EtOAc 추출물을 이용한 분획물 제조 결과

NO	Sample ID	추출용매	추출물 무게	제조된 분획물 개수
1	SF6192	EtOAc	916.9mg	6
2	SF6215	EtOAc	708.6mg	6
3	SF6338	EtOAc	1191.1mg	6
4	SF6408	EtOAc	1042.8mg	6
5	SF6505	EtOAc	1469.8mg	6
6	SF6515	EtOAc	1519.8mg	6
7	SF6538	EtOAc	1218.2mg	6
8	SF6600	EtOAc	1163.8mg	6
9	SF6604	EtOAc	523.9mg	6
10	SF6611	EtOAc	662.3mg	6
11	SF6379	EtOAc	550mg	6
12	SF6796	EtOAc	1030mg	6
13	SF6428	EtOAc	644mg	6
14	SF6340	EtOAc	980mg	6
15	SF5929	EtOAc	1050mg	6
16	SF5934	EtOAc	700mg	6
17	SF6291	EtOAc	682mg	6
18	SF6340(2)	EtOAc	2.27 g	6
19	SF5859V	EtOAc	2.17 g	6
20	SF6796V	EtOAc	5.15 g	6

제 4 절 생리활성 대사체의 분리 연구 및 구조 분석 연구

연구내용	연구결과
확보된 분획물에서 활성 대사체 분리 연구	 - 3차년도(전년도) 확보 추출물 1종 유래 분획물에서 <u>10종 활성 후보 대사체</u> <u>분리</u>. - 당해연도 목표(3종 이상)의 333.3% (총 10종) 초과 달성 완료.
 극지생물 유 래 미생물로 제조 된 후보 분획물에 서 활성 대사체 분리 연구 	 3차년도(전년도) 확보한 극지생물 유래 미생물 SF6390로부터 제조된 분획 물에서 활성 대사체 분리 연구 : <u>활성 후보 대사체 8종</u> 분리. [별첨1-3-1] 3차년도(전년도) 확보한 극지생물 유래 미생물 SF6354로부터 제조된 분획 물에서 활성 대사체 분리 연구 : <u>활성 후보 대사체 1종</u> 분리. [별첨1-3-2] 4차년도(전년도) 확보한 극지생물 유래 미생물 SF6789로부터 제조된 분획 물에서 활성 대사체 분리 연구 : <u>활성 후보 대사체 1종</u> 분리. [별첨1-3-3]
2. 분리한 활성 대사체의 구조 분 석	- 확보 추출물 3종 유래 분획물에서 10종 활성 후보 대사체 분리 . - 분리된 10종 활성 후보 대사체 가운데 <u>5종 구조 분석 완료.</u> [별첨1-3-4] - 당해연도 <u>목표(3종 이상)의 166.6% (총 5종) 초과 달성 완료.</u>



[별첨1-3-1] 극지생물 유래 미생물 SF6390으로부터 제조된 분획물에서 활성 대사체 분리 연구

1-3-1. 추출 및 분리

극지 해양 유래 미생물로부터 생리 활성 물질을 탐색하기 위하여 배양된 시료 SF6390의 EtO Ac 추출물 1876.9mg을 C₁₈-functionalized silica gel flash column chromatography를 수행하였 고, 이 때 용출 용매로는 단계적 기울기 용리법을 사용하였다[20%, 40%, 60%, 80%, 100% (v/ v) MeOH in H₂O (500 mL each)]. 80%의 메탄올 분획물 (738.3 mg)에 대하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (CH2Cl2:MeOH=80:1 to 1:10)을 통해 16개의 소분획물 SF6390-4-1~16을 얻었 고 이 중 SF6390-4-11 (14.6 mg)은 순수한 화합물로 확인되었다. 이 후 SF6390-4-5에 대하 여 C₁₈-functionalized silica gel column chromatography [MeOH:H₂O=1:2 to 20:1]를 수행하여 8개의 소분획물 SF6390-4-5-1~8을 얻었고 이 중 SF6390-4-5-1을 semi-preparative reversed phase HPLC [90% MeOH→97% MeOH(with H₂O+0.1% Formic acid), in 30 min] 이용하여, 순수한 화합물인 SF6390-4-5-1-2(4.6 mg)과 SF6390-4-5-1-3(2.8mg)로 분리하였다. 소분획 물 6390-4-9 (33.4 mg)에 대하여 semi-preparative reversed phase HPLC [70% MeOH→99% MeOH(with H₂O+0.1%Formic acid), in 30min]을 이용하여 3개의 소분획물 SF6390-4-9-1~3을 얻었고 이 중 SF6390-4-9-2 (16.4mg)을 다시 한 번 semi-preparative reversed phase HPLC [70% ACN→80% ACN (with H₂O+0.1% Formic acid), in 30 min] 이용하여 3 개의 소분획물 SF6390-4-9-2-1~3을 얻었고 이 중 SF6390-4-9-2-1 (12.1 mg)을 다시 한번 semi-preparative reversed phase HPLC [50% ACN→70% ACN (with H₂O+0.1% Formic acid), in 30 min] 을 이용하여 소분획물 SF6390-4-9-2-1-1~3을 얻었고, 이 중 SF6390-4-9-2-1-2 (11.1mg) 에 대 하여 추가 분리 계획이다. 그리고 SF6390-4-10 (36.9mg) 에 대하여 semi-preparative reversed phase HPLC [60% MeOH→80% MeOH(with H₂O+0.1%Formic acid), in 30 min]을 이용하여 7개의 소분획물 SF6390-4-10-1~7을 얻었고 이 중 SF6390-4-10-2 (2.1mg), SF6390-4-10-3 (4.1mg), SF6390-4-10-6 (8.2mg) 이 순수한 화합물로 확인되었다. SF6390-4-10-5 (7.3mg)은 다시 한번 semi-preparative reversed phase HPLC [60% MeOH→80% MeOH(with H₂O+0.1% Formic acid), in 30 min]을 이용하여 순수한 화합물인 SF6390-4-10-5-1 (5.1mg)로 분리되었 다. 100%의 메탄올 분획물인 SF6390-5 (237.0mg) 를 Sephadex LH-20 column chromatograp hv [CH₂Cl₂:Acetone=50:1 to MeOH 100%]를 이용하여 8 개의 소분획물 SF6390-5-1~8 을 얻 었고 이 중 SF6390-5-1 (120.5mg)에 대하여 Silicagel column chromatography [Hexane:CH₂Cl 2=1:1 to CH₂Cl₂:MeOH=30:1]을 수행하여 3 개의 소분획물 SF6390-5-1-1~3을 얻었다. 이 중 S F6390-5-1-3 (60.3mg)을 MeOH에 넣어 원심분리기를 이용하여 MeOH에 녹는 부분과 녹지 않 는 부분으로 분리하여 SF6390-5-1-3-1과 SF6390-5-1-3-2를 얻었다. 이 중 MeOH에 녹는 부 분인 SF6390-5-1-3-1 (49.1mg)에 대하여 semi-preparative reversed phase HPLC [80% MeO H→92% MeOH(with H₂O+0.1%Formic acid), in 30 min]을 이용하여 순수한 화합물인 SF6390 -5-1-3-1-3 (18.2 mg)을 얻었다.



Figure 1. 진균 SF6390으로부터 분리된 단일화합물의 분리도

[별첨1-3-2] 극지생물 유래 미생물 SF6354로부터 제조된 분획물에서 활성 대사체 분리 연구

1-3-2. 추출 및 분리

극지 해양 유래 미생물로부터 생리 활성 물질을 탐색하기 위하여 배양된 시료 SF6354의 EtO
Ac 추출물 563.5mg을 C₁₈-functionalized silica gel flash column chromatography를 수행하였고, 이 때 용출 용매로는 단계적 기울기 용리법을 사용하였다[20%, 40%, 60%, 80%, 100% (v/v)
v) MeOH in H₂O (250mL each)]. 80%의 메탄을 분획물 151.2mg에 대하여 C₁₈-functionalized silica gel coloumn chromatography [MeOH:H₂O=3:1]를 수행하여 7개 소분획물 SF6354-4-1^{~7}
을 얻었다. 그리고 소분획물 SF6354-4-4 (19.6mg)를 semi-preparative reversed phase HPLC [60% MeOH→63% MeOH(with H₂O+0.1% Formic acid), in 60min] 이용하여 SF6354-4-4^{-1[~]}
6, 6개의 소분획물을 얻었고 이 중 SF6354-4-4⁻2 (2.3mg), SF6354-4⁻4⁻3 (2.1mg)이 화합물 로 분리되었다.



Figure 2. 진균 SF6354로부터 분리된 단일화합물의 분리도

[별첨1-3-3] 극지생물 유래 미생물 SF6789로부터 제조된 분획물에서 활성 대사체 분리 연구

1-3-3. 추출 및 분리

극지 해양 유래 미생물로부터 생리 활성 물질을 탐색하기 위하여 배양된 시료 SF6789의 EtO
Ac 추출물 966.9mg을 C₁₈-functionalized silica gel flash column chromatography를 수행하였고, 이 때 용출 용매로는 단계적 기울기 용리법을 사용하였다[20%, 40%, 60%, 80%, 100% (v/v)
v) MeOH in H₂O (500mL each)]. 80%의 메탄올 분획물 7.5mg에 대하여 semi-preparative re versed phase HPLC [50% MeOH→100% MeOH (with H₂O+0.1Formic acid), in 60min] 이용 하여 SF6789-4-1~4, 4개의 소분획물을 얻었는데 이 중 SF6789-4-3 (0.8mg)이 화합물로 분리 되었다.



Figure 3. 진균 SF6789로부터 분리된 단일화합물의 분리도

[별첨1-3-4] 양극해 해양생물 유래 진균으로부터 분리된 이차대사물질의 구조

- 확보한 추출물 3종 유래 분획물에서 총 10종의 대사체를 분리하였음.
- 분리된 2종 활성 후보 대사체 가운데 <u>5종 구조 분석 완료.</u>



0 구조 결정

SF6354-4-4-2는 노란색을 띄는 분말로 분리되었다. ¹³C-NMR 스펙트라를 통해 15개의 탄 소 signal을 확인 할 수 있었다.탄소의 개수에 비해 상대적으로 적은 수소의 개수를 통해 3개 의 고리 구조가 연결 되어있는 구조인 것을 추측 할 수 있었다. 이를 토대로 문헌을 조사하여 이미 보고된 바 있는 TMC-256C1이 SF6354-4-4-2와 같은 NMR 스펙트라를 갖고 있다는 것 을 확인하였고 따라서 SF6354-4-4-2의 구조를 결정 하였다 [1].



Figure 4. SF6354-4-4-2의 구조

Table 1. SF6354-4-4-2의 ¹H and ¹³C-NMR data

Position	δc ^{a,b}	$\delta H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
2	167.5	
3	109.7	6.46 (1H, s)
4	182.1	
5	155.5	티스
5-OH		12.87 (1H, s)
6	104.2	6.77 (1H, s)
7	101.1	6.61 (1H, d, 2.1)
8	160.0	
9	97.4	6.47 (1H, d, 2.1)
10	159.1	
11	155.5	
12	107.4	
13	140.8	
14	103.0	
2-CH ₃	20.0	2.45 (3H, s)
10-OCH ₃	55.9	3.93(3H, s)

^aRecorded in DMSO-d₆, ^b100 MHz, ^c400MHz.



Figure 5. 1 H-NMR spectrum of SF6354-4-4-2



Figure 6. ^{13}C -NMR spectrum of SF6354-4-4-2

O 구조 결정

화합물 SF6390-4-11은 분자식 C₁₅H₁₂O₅로 확인 하였는데 이는, high-resolution ESI-MS 결 과에서 m/z 271.0602 ion peak를 확인하여 알 수 있었다 (계산된 분자량 271.0606). ¹H-NMR 스펙트럼에서 δH 6.99, 6.62, 6.41, 6.12 ppm과 A methoxy signal 인 δH 3.85 ppm, a methyl signal 인 δH 2.50 ppm 을 확인 할 수 있었다.. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 하나의 carbonyl 탄 소와 12 개의 olefine 탄소, 1개의 methoxy 탄소를 포함하는 15 개의 신호를 확인 할 수 있었 다. 문헌조사를 통해 NMR 데이터를 비교한 결과 이 화합물이 TMC-256A1 과 같은 구조임을 확인 하였다 [1].



Figure 7. SF6390-4-11의 구조

Table 2. SF6390-4-11의	^{1}H	and	¹³ C-NMR	data
-----------------------	---------	-----	---------------------	------

Position	δc ^{a,b}	$\delta_{H}^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1		
2	168.4	
3	106.5	6.12, s
4	183.6	! イエ
5	162.3	
6	160.6	
7	97.5	6.41, s
8	160.1	
9	101.1	6.62, s
10	99.8	6.99, s
11	152.4	
12	102.8	
13	106.5	
14	140.9	
CH ₃	20.1	2.50, s
OCH ₃	55.7	3.85, s

^aRecorded in DMSO-d₆, ^b100 MHz, ^c400MHz.





Figure 9. $^{\rm 13}\text{C-NMR}$ spectrum of SF6390--4--11

O 구조 결정

화합물 SF6390-4-5-1-2은 분자식 C₁₃H₁₂NO₃로 확인 하였는데 이는, high-resolution ESI-MS 결과에서 m/z 230.0819 ion peak를 확인하여 알 수 있었다. (C₁₃H₁₂NO₃ 의 계산된 분자량 230.0817). ¹H-NMR 스펙트럼에서 5 개의 phenyl proton 인 67.24 (2H), 7.36 (2H), 7.32 (1H) 와, 2 개의 aromatic proton 인 68.72 (s, 1H) 와 6.25 (s, 1H), 2 개의 methylene proton인 δ 3.89 (s, 2H)를 확인하였다. ¹³C-NMR, DEPT 스펙트럼에서 2 개의 carbonyl 탄소와 2 개의 quaternary 탄소, 7 개의 methylene 탄소, 1 개의 methyl 을 포함하는 13 개의 신호를 확인 할 수 있었다. 문헌조사를 통해 NMR 데이터를 비교한 결과 이 화합물이 carbonarones A 과 같 은 구조임을 확인 하였다 [2].



Figure 10. SF6390-4-5-1-2의 구조

Table	3. SF6390-	-4-5-1-2-	의 ¹ H and ¹	³ C-NMR	data
_	Position	δc ^{a,b}	$\delta H^{a,c}$ (mult.,	J in Hz)	
_	1	TIO		\prec	
	2	162.1	8.72 (1H	, brs)	
	3	119.5			
	4	178.3			
	5	116.2	6.25 (1H	H, s)	
	6	169.0			
	7	39.8	3.88 (21	H, s)	
	8	133.9			
	9	129.3	7.24 over	apped	
	10	129.3	7.36 over	apped	
	11	128.0	7.32 over	apped	
	12	129.3	7.36 over	apped	
	13	129.3	7.24 over	apped	
	14	164.1			
_	14-NH ₂		9.05 (brs), 3	5.75(brs)	

^aRecorded in CDCl₃-d ^b100 MHz, ^c400MHz.







Figure 12. 13 C-NMR spectrum of SF6390-4-5-1-2

O 구조 결정

화합물 SF6390-4-5-1-3은 분자식 C₁₃H₁₂NO₃로 확인 하였는데 이는, high-resolution ESI-MS 결과에서 m/z 230.0824 ion peak를 확인하여 알 수 있었다. (C₁₃H₁₂NO₃ 의 계산된 분자량 230.0817). ¹H-NMR 스펙트럼에서 1 개의 hydroxy proton 인 δ13.67 (brs, 1H), 1 개의 amide proton 인 δ11.86 (brs, 1H), 1 개의 aldehyde proton 인 δ10.07 (s, 1H) 와, 5 개의 phenyl proton 인 δ7.35 (d, 2H), 7.27 (2H) 와 7.30 (1H), 1 개의 vinyl proton인 δ5.79 (s, 1H), 2 개 의 methylene proton 인 δ3.86 (s, 2H) 를 확인하였다. ¹³C-NMR, DEPT 스펙트럼에서 1 개의 aldehyde 탄소와 1 개의 carbonyl 탄소, 6 개의 methine 탄소, 4 개의 quarternary 탄소, 1 개 의 methylene 을 포함하는 13 개의 신호를 확인 할 수 있었다. 문헌조사를 통해 NMR 데이터 를 비교한 결과 이 화합물이 Carbonarones B 과 같은 구조임을 확인 하였다 [2].



Figure 13. SF6390-4-5-1-3의 구조

Table	4.	SF6390	-4-5-	-1-3의	¹ H ar	nd ¹³	C-NMR	data

Position	δC ^{a,b}	$\delta H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1		11.21 (1H, brs)
2	165.3	
3	106.2	
4	175.1	
5	100.0	5.79 (1H, s)
6	157.2	
7	40.2	3.86 (2H, s)
8	134.5	
9	129.4	7.27 overapped
10	129.4	7.35 overapped
11	128.1	7.30 overapped
12	129.4	7.35 overapped
13	129.4	7.27 overapped
14	194.2	10.05 (1H, s)
4-OH		13.69 brs

^aRecorded in CDCl₃-d ^b100 MHz, ^c400MHz.



Figure 14. 1 H-NMR spectrum of SF6390-4-5-1-3



Figure 15. 13 C-NMR spectrum of SF6390-4-5-1-3

1-3-4-5. SF6390-5-1-3-1-3

O 구조 결정

화합물 SF6390-5-1-3-1-3은 분자식 C₂₃H₃₉N₅O₅S₂로 확인 하였는데 이는, high-resolution ESI-MS 결과에서 m/z 529.2392 ion peak를 확인하여 알 수 있었다. (C₂₃H₃₉N₅O₅S₂ 의 계산된 분자량 529.2393). ¹H-NMR 스펙트럼에서 5 개의 amide proton (NH) 인 δ8.85, 8.60, 7.96, 7.38, 7.11과 5 개의 α-methine proton 을 δ4.72, 4.47, 3.99, 3.93, 3.87에서 확인 할 수 있었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서 5 개의 carbonyl 탄소인 δ174.0 (Cys 1), 173.1 (Cys 2), 172.8 (Ile), 170.6 (Leu), 169.7 (Val) 과 5 개의 α 탄소 δ58.8 (Val), 58.0 (Ile), 52.9 (Cys 1), 52.4 (Cys 2), 50.3 (Leu) 를 확인하였다. 위의 NMR 스펙트럼을 통해 5 개의 아미노산을 갖는 구조임을 확 인하였고, 문헌조사를 통해 NMR 데이터를 비교한 결과 이 화합물이 malformin A₁ 과 같은 구조임을 확인 하였다 [3].



Figure 16. SF6390-5-1-3-1-3의 구조

Position	$\delta c^{a,b}$	$\delta H^{a,c}$ (mult., J in Hz)
1	58.8	3.99 (1H, dd, $J = 6.8$, 3.2 Hz)
2	26.8	2.04 (1H, m)
3	19.7	0.79~0.90 (m)
4	18.7	0.79~0.90 (m)
5	170.6	
6	50.3	4.47 (1H, ddd, J=15.5,9.6,6.4 Hz)
7	40.9	1.31~1.58 (2H, m)
8	24.5	1.13 (1H, m)
9	22.7	0.79~0.90 (m)
10	21.8	0.79~0.90 (m)
11	173.1	
12	58.0	3.87(1H, dd, J = 10.6, 6.9 Hz)
13	34.0	1.70 (1H,m)
14	24.8	1.31~1.58 (2H, m)
15	10.0	0.79~0.90 (m)
16	15.0	0.79~0.90 (m)
17	172.8	
18	52.4	3.93 (1H, dd, $J = 14.4$, 9.0 Hz)
19	46.2	3.12~3.28 (2H, m)
20	174.0	
21	52.9	4.72 (1H, ddd, $J = 15.6$, 11.5, 4.1 Hz)
22	45.2	3.12~3.28 (2H, m)
23	169.7	

Table 4. SF6390-5-1-3-1-3의 1 H and 13 C-NMR data

^aRecorded in DMSO-d₆ ^b100 MHz, ^c400MHz.



Figure 17. $^1\mathrm{H-NMR}$ spectrum of SF6390--5--1--3--1--3



Figure 18. 13 C-NMR spectrum of SF6390-5-1-3-1-3

제 5 절 분리된 대사체의 활성 기작 검토 연구

연구내용	연구결과
분리된 활성 대사체의 활성 기작 검토 연구	 당해연도 분리된 10종 활성 후보 대사체를 이용하여 항염증, 뇌세포 보호 활성 기작 검토 연구를 진행함. 3차년도 분리된 활성 후보 대사체 중 5종에서 우수한 활성 기작을 확인 할 수 있었음. 당해연도 목표(3종 이상)의 166.6% (총 5종) 이상 초과 달성.
1. 극지생물 유래 미생물 SF6354로부터 분리한 대사체의 활성 검토	 - 국지생물 유래 미생물 SF6354로부터 제조된 분획물에서 분리된 1종의 대사체를 대상으로 활성 기작을 검토함. - 화합물 TMC-256C1는 BV2 세포에서 유발한 염증 반응을 억제하는 효 과가 우수하여 기전 연구를 진행함. [별첨 1-4-1] - 또한 화합물 TMC-256C1는 HT22 세포에서 글루타메이트로 유발한 산 화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과가 우수하게 나타났음. [별첨 1-4-2]
2. 극지생물 유래 미생물 SF6013로부터 분리한 대사체의 활성 검토	 - 극지생물 유래 미생물 SF6013로부터 제조된 분획물에서 분리된 1종의 대사체를 대상으로 활성 기작을 검토함. - 화합물 6013-231-2는 RAW264.7 세포와 BV2 세포에서 유발한 염증 반응을 억제하는 효과가 우수하여 기전 연구를 진행함. [별첨 1-4-3]
3. 극지생물 유래 미생물 SF5976로부터 분리한 대사체의 활성 검토	 고려대학교 이동호 교수님이 대량 배양한 극지생물 유래 미생물 SF5976로부터 분리된 2종의 대사체를 대상으로 활성 기작을 검토함. 그 가운데 화합물 JY2-131-19, JY2-131-20는 마우스 대식세포 유래 RAW264.7 세포와 BV2 세포에서 유발한 염증 반응을 억제하는 효과가 우수하게 나타났음. [별첨 1-4-4], [별첨 1-4-5]

[별첨1-4-1] 양극해 해양생물 유래 진균 SF6354로부터 분리된 이차대사물질 TMC-256C1 의 항염증 활성 효과

- 전 단계에서 극지생물 유래 미생물 SF6354 로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 TMC-256C1의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과 항염 효과가 우수하게 나타났으 며, 추후에 마우스 microglial 유래의 BV2 세포에서 항염증 관련 기전 연구를 탐색하였음.
- TMC-256C1는 NMR 결과를 바탕으로 구조를 동정 하였으며, BV2 세포에서 화합물 단 독 처리 시 나타내는 세포 독성이 40 μM 까지 보이지 않아 추후 실험은 40 μM 를 최고 농도로 진행함.



Figure 1. Chemical structure of TMC-256C1 (A), and effect of TMC-256C1 on cell viability (B).

극지연구소

 TMC-256C1는 BV2 세포에서 LPS로 유발한 TNF-α (A), IL-6 (C), IL-12 (D) 생성을 현저하게 감소시키는 효과가 있었지만, IL-1β (B) 생성은 감소시키지 않음.



Figure 2. Effects of TMC-256C1 on mRNA expression levels of TNF-α (A), IL-1β (B), IL-6 (C), and IL-12 (D) in BV2 cells stimulated with LPS.

○ TMC-256C1는 BV2 세포에서 LPS로 유발한 nitrite와 PGE₂ 생성을 현저하게 감소시키 는 효과가 있었음. 또한 LPS로 유발된 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 감소시켰음.



- **Figure 3.** Effects of TMC-256C1 on the production of NO (A) and PGE₂ (B) and the protein expression levels of iNOS and COX-2 (C) in BV2 cells stimulated with LPS.
- TMC-256C1의 항염증 효과 기전을 탐색하기 위하여 다음 연구를 진행하였음. 먼저 iNOS, COX-2 발현을 시키는 상위 signal 에 해당되는 nuclear factor кВ (NF-кВ) pathways 를 억제하는 효과가 있었음.



Figure 4. Effects of TMC-256C1 on the protein expression level of IκB degradation (A), phosphorylation (A), cyotosol and nuclear p65, p50 (B) and NF-κB DNA binding activity (C) in LPS stimulated BV2 cells. TMC-256C1는 BV2 세포에서 HO-1를 과발현시키고 HO-1의 발현을 조절하는 것으로 알려진 상위 전사인자인 nuclear translocation of nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2)를 핵 내로 전사시키는 효과가 있었음.



- Figure 5. Effects of TMC-256C1 on heme oxygenase (HO)-1 expression (A,B) and the nuclear translocation of nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2) (C) in BV2 cells.
- TMC-256C1의 HO-1에 의한 항염증 효과를 확인하기 위해서 HO의 활성 억제제인 SnPP를 전처리 시에 TMC-256C1에 의한 항염증 효과가 역전되는 것을 확인하여 HO-1 의 발현이 TMC-256C1의 항염증 효과에 관여할 것으로 예상함.



Figure 6. Effects of tin protoporphyrin (SnPP) on inhibition of nitrate (A), PGE₂ (B), IL-6 (C), TNF-a (D) and IL-12 (E) production by TMC-256C1 pre-treatment of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 cells. TMC-256C1의 다른 항염증 활성 기전을 탐색하고자 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways에 미치는 영향에 대해 연구를 진행함. MAPK 크게 세 가지 경로로 나눠지는데, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), p38이 있음. TMC-256C1이 MAPK에 미치는 영향을 알아보았으며, 그 결과 TMC-256C1이 시간별로 처리 되었을 때, p38 MAPK를 활성화시키는 것을 확인하였음. 또한 각각의 inhibitor를 사용하여, TMC-256C1의 HO-1 발현에 p38 MAPK pathway가 관여하는 것을 확인함.



Figure 7. Effects of TMC-256C1 on ERK, JNK, and p38 MAPK expression (A), and p38 activation induced by TMC-256C1 on HO-1 expression (B) in BV2 cells.

 TMC-256C1에 의한 HO-1발현의 기전으로 PI3K/Akt 의 경로가 관여하는지 실험을 진 행함. 그 결과 TMC-256C1이 PI3K/Akt의 경로를 활성화 시키고, PI3K/Akt inhibitor를 사용하였을 때 TMC-256C1에 의한 HO-1의 발현에 PI3K/Akt가 관여하는 것을 확인함.



- Figure 8. Effects of TMC-256C1 on HO-1 expression through the PI3K/Akt cascade in BV2 cells (A, B).
- 이와 같은 결과를 통해 분리된 화합물인 **TMC-256C1**이 마우스 microglial 유래의 BV2 세포에서 MAPK, NF-κB경로를 억제함으로써 우수한 항염증 활성을 갖는다는 것을 확인

하였고, PI3K/Akt와 Nrf2 기전을 통한 HO-1의 발현이 항염증 활성에 관여하는 것도 밝 혀 낼 수 있었음.



[별첨1-4-2] 양극해 해양생물 유래 진균 SF6354로부터 분리된 이차대사물질 TMC-256C1 의 뇌세포 보호 효과

- 전 단계에서 극지생물 유래 미생물 SF6354 로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 TMC-256C1의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과, 뇌에 존재하는 해마세포인 마 우스 유래 HT22 cell에서 glutamate로 유발한 산화적 스트레스를 억제하는 효과가 나타 났으며, HT22 세포에서 뇌세포 보호 효과 관련 기전 연구를 탐색하였음.
- TMC-256C1는 NMR 결과를 바탕으로 구조를 동정 하였으며, HT22 세포에서 화합물 단 독 처리 시 나타내는 세포 독성이 40 μM 까지 보이지 않아 추후 실험은 40 μM 를 최고 농도로 진행함.



Figure 9. Chemical structure of TMC-256C1 (A), and effect of TMC-256C1 on cell viability (B).

TMC-256C1는 HT22 세포에서 glutamte로 유발한 산화적 스트레스에 대하여 세포 생존 율을 증가 시키는 세포 보호 효과를 나타내었고 (A), 또한 산화적 스트레스로 인한 ROS 의 생성을 현저하게 감소시키는 효과가 있음을 확인함 (B).



Figure 10. Effects of TMC-256C1 on glutamate-induced oxidative neurotoxicity (A), and generation of reactive oxygen species (B).

TMC-256C1는 HT22 세포에서 HO-1를 과발현시키고 (A,B), HO-1의 발현을 조절하는 것으로 알려진 상위 전사인자인 nuclear translocation of nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2)를 전사시키는 효과가 있었음 (C).



- Figure 11. Effects of TMC-256C1 on heme oxygenase (HO)-1 expression (A,B) and the nuclear translocation of nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2) (C) in HT22 cells.
- TMC-256C1의 HO-1에 의한 세포 보호 효과를 확인하기 위해서 HO의 활성 억제제인 SnPP를 전처리 시에 TMC-256C1에 의한 세포 보호 효과와 ROS 생성 억제 효과가 역 전되는 것을 확인하여 HO-1의 발현이 TMC-256C1의 항염증 효과에 관여할 것으로 예 상함.



- Figure 12. Effects of TMC-256C1 on glutamate-induced oxidative neurotoxicity (A) and reactive oxygen species generation (B) in pre-treated tin protoporphyrin (SnPP) HT22 cells.
- TMC-256C1의 다른 항염증 활성 기전을 탐색하고자 mitogen-activated protein kinase
 (MAPK) signaling pathways에 미치는 영향에 대해 연구를 진행함. MAPK 크게 세 가지

경로로 나눠지는데, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), p38이 있음. TMC-256C1이 MAPK에 미치는 영향을 알아보았으며, 그 결과 TMC-256C1이 시간별로 처리 되었을 때, p38 MAPK를 활성화시키는 것을 확인하였음. 또한 각각의 inhibitor를 사용하여, TMC-256C1의 HO-1 발현에 p38 MAPK pathway가 관여하는 것을 확인함.





Figure 13. Effects of TMC-256C1 on ERK, JNK, and p38 MAPK expression (A), and p38 activation induced by TMC-256C1 on HO-1 expression (B) in HT22 cells.

 TMC-256C1에 의한 HO-1발현의 기전으로 PI3K/Akt 의 경로가 관여하는지 실험을 진 행함. 그 결과 TMC-256C1이 PI3K/Akt의 경로를 활성화 시키고, PI3K/Akt inhibitor를 사용하였을 때 TMC-256C1에 의한 HO-1의 발현에 PI3K/Akt가 관여하는 것을 확인함.



- Figure 14. Effects of TMC-256C1 on HO-1 expression through the PI3K/Akt cascade in BV2 cells (A, B).
- 이와 같은 결과를 통해 분리된 화합물인 TMC-256C1이 마우스 유래의 해마세포인 HT22 세포에서 p38, Nrf2와 PI3K/Akt경로에 의한 HO-1의 발현을 통해서 우수한 뇌세포 보호 활성을 갖는다는 것을 확인하였음.

[별첨1-4-3] 양극해 해양생물 유래 진균 SF6013로부터 분리된 이차대사물질의 항염증 활성 효과

- 전 단계에서 극지생물 유래 미생물 SF6013 로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된
 6013-231-2 의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과 항염 효과가 우수하게 나타났으
 며, 뇌에 존재하는 면역세포인 미세아교세포(microglia)와 마우스 유래 대식세포 (macrophage)에서 항염증 관련 기전 연구를 탐색하였음.
- 6013-231-2 (compound 1)는 NMR 결과를 바탕으로 구조를 동정 하였으며, RAW264.7
 (A)와 BV2 (B) 세포에서 화합물 단독 처리 시 나타내는 세포 독성이 40 μM 까지 보이지 않아 추후 실험은 40 μM 를 최고 농도로 진행함.



Figure 15. Chemical structure of compound (1) (A) and effects of compound (1) on cell viability (B, C).

6013-231-2 (compound 1)는 RAW264.7과 BV2 세포에서 LPS로 유발한 NO (A), PGE₂
 (B)의 생성을 현저하게 감소시켰고, iNOS와 COX-2의 발현을 억제시키는 것을 확인함 (C, D).



- Figure 16. The effects of compound (1) on production levels of nitrite (A) and PGE₂ (B), and the expression of iNOS and COX-2 protein (C, D) in RAW264.7 and BV2 cells stimulated with LPS.
- 6013-231-2 (compound 1)는 RAW264.7세포에서 LPS로 유발된 IL-1β와 IL-6의 mRNA 발현을 현저히 억제시키는 효과가 있었음. 그러나 TNF-α의 mRNA 발현은 억제시키지 않음. BV2세포에서는 IL-1β의 mRNA 발현을 억제시키는 효과를 나타내었으나 IL-6와 TNF-α의 mRNA 발현은 억제시키지 않음.



Figure 17. The effects of compound (1) on IL-1β (*Il1b*) (A), IL-6 (*Il6*) (B), and TNF-α (*Tnf*) (C) mRNA expression levels in RAW264.7 and BV2 cells.

 6013-231-2 (compound 1)의 항염증 효과 기전을 탐색하기 위하여 다음 연구를 진행하 였음. 먼저 iNOS, COX-2 발현을 시키는 상위 signal 에 해당되는 nuclear factor кВ (NF-кВ) pathways에서 IкВа의 phosphorylation과 degradation를 억제하고 p50, p65의 핵 내로의 전사를 억제하였으며, NF-кВ의 binding activity 또한 억제하는 효과가 있었음.



- Figure 18. The effects of compound (1) on IκBα phosphorylation and degradation (A,C), NF-κB activation (p65 and p50) (B,D), and NF-κB DNA binding activity (E) in RAW264.7 and BV2 cells.
- 6013-231-2 (compound 1)의 다른 항염증 활성 기전을 탐색하고자 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways에 미치는 영향에 대해 연구를 진행함. MAPK는 NF-кB와 더불어 염증을 조절하는 주요한 인자라고 알려져 있음. MAPK 크게 세 가지 경로로 나눠지는데, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK), p38이 있음. Compound 1이 RAW264.7, BV2세포에서 MAPK 에 미치는 영향을 알아보았으며, 그 결과 LPS로 활성되는 ERK, JNK, and p38 MAPK 인산화가 compound 1이 농도별로 처리 되었을 때, JNK의 인산화를 억제함을 확인하였음.



Figure 19. Effects of compound (1) on JNK (A,D), ERK (B,E), and p38 (C,F) phosphorylation in RAW264.7 and BV2 cells.

6013-231-2 (compound 1)는 RAW264.7과 BV2 세포에서 HO-1를 과발현시키고 HO-1
 의 발현을 조절하는 것으로 알려진 상위 전사인자인 nuclear translocation of nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2)를 핵 내로 전사시키는 효과가 있었음.



Figure 20. Effects of compound (1) on HO-1 expression (A,D) and Effects of compound (1) on nuclear translocation of Nrf2 (B,C,E,F).

 6013-231-2 (compound 1)의 HO-1에 의한 RAW364.7과 BV2 세포에서의 항염증 효과를 확인하기 위해서 HO의 활성 억제제인 SnPP를 전처리 시에 compound 1에 의한 항염증 효과가 역전되는 것을 확인하여 HO-1의 발현이 compound 1의 항염증 효과에 관여할 것 으로 예상함.



Figure 21. HO-1 mediates the suppressive effect of compound (1) on LPS-stimulated pro-inflammatory mediator production in RAW264.7 (A - D) and BV2 cells (E - G).

 이와 같은 결과를 통해 분리된 화합물인 6013-231-2 (compound 1)이 마우스 유래 대식 세포인 RAW264.7 세포와 마우스 microglial 유래의 BV2 세포에서 MAPK, NF-кB경로를 억제함으로써 우수한 항염증 활성을 갖는다는 것을 확인하였고, Nrf2 기전을 통한 HO-1 의 발현이 항염증 활성에 관여하는 것도 밝혀 낼 수 있었음.

[별첨1-4-4] 양극해 해양생물 유래 진균 SF5976으로부터 분리된 이차대사물질 JY2-131-19의 항염증 활성 효과

- 고려대학교 이동호 교수님이 대량 배양한 극지생물 유래 미생물 SF5976 으로부터 분리 한 화합물 가운데 구조가 확인된 JY2-131-19 의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결 과 항염 효과가 우수하게 나타났으며, 추후에 마우스 macrophage 유래의 RAW264.7 세포 와, microglial 유래의 BV2 세포에서 항염증 관련 기전 연구를 탐색하였음.
- JY2-131-19 는 NMR 결과를 바탕으로 구조를 동정 하였으며, RAW264.7 세포와 BV2 세포에서 화합물 단독 처리 시 나타내는 세포 독성이 80 μM 까지 보이지 않아 추후 실험 은 80 μM 를 최고 농도로 진행함.



Figure 22. Chemical structure of JY2-131-19 (A), and effect of JY2-131-19 on cell viability in RAW264.7 (B) and BV2 cells (C).

 JY2-131-19 는 RAW264.7 과 BV2 세포에서 LPS로 유발한 nitrite와 PGE₂ 생성을 현저 하게 감소시키는 효과가 있었음. 또한 LPS로 유발한 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 감 소시켰음.



Figure 23. Effects of JY2-131-19 on the production of NO (A) and PGE₂ (B) and the protein expression levels of iNOS and COX-2 (C) in RAW264.7 cells stimulated with LPS.



Figure 24. Effects of JY2-131-19 on the production of NO (A) and PGE₂ (B) and the protein expression levels of iNOS and COX-2 (C) in BV2 cells stimulated with LPS.

[별첨1-4-5] 양극해 해양생물 유래 진균 SF5976으로부터 분리된 이차대사물질 JY2-131-20의 항염증 활성 효과

- 고려대학교 이동호 교수님이 대량 배양한 극지생물 유래 미생물 SF5976 으로부터 분리 한 화합물 가운데 구조가 확인된 JY2-131-20 의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결 과 항염 효과가 나타났으며, 추후에 마우스 macrophage 유래의 RAW264.7 세포와, microglial 유래의 BV2 세포에서 항염증 관련 기전 연구를 탐색하였음.
- JY2-131-20 는 NMR 결과를 바탕으로 구조를 동정 하였으며, RAW264.7 세포와 BV2 세포에서 화합물 단독 처리 시 나타내는 세포 독성이 80 μM 까지 보이지 않아 추후 실험 은 80 μM 를 최고 농도로 진행함.



Figure 25. Chemical structure of JY2-131-20 (A), and effect of JY2-131-19 on cell viability in RAW264.7 (B) and BV2 cells (C).

 JY2-131-20 는 RAW264.7 세포에서 LPS로 유발한 nitrite의 생성을 소량 감소시켰으나, PGE₂ 생성을 감소시키는 효과가 없었음. 또한, LPS로 유발한 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 감소시키지 않음. 그러나, BV2 세포에서는 LPS로 유발한 nitrite와 PGE₂ 생성을 현저하게 감소시키는 효과가 있었음. 또한 LPS로 유발한 iNOS와 COX-2 단백질의 발현 을 감소시켰음.



Figure 26. Effects of JY2-131-20 on the production of NO (A) and PGE₂ (B) and the protein expression levels of iNOS and COX-2 (C) in RAW264.7 cells stimulated with LPS.



Figure 27. Effects of JY2-131-20 on the production of NO (A) and PGE₂ (B) and the protein expression levels of iNOS and COX-2 (C) in BV2 cells stimulated with LPS.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발 목표 달성도

1. 연구개발 수행 진도율



2. 연구개발 목표의 달성도

목표	달 성 도	LH &
	(%)	Ч O
○ 극지 생물 유래 추출 물의 제조 : 총 20종 목표	100	 양극해 해양생물 유래 진균 <u>총 20종</u>의 극지생물 유래 시료에 대 한 EtOAc 추출물을 제작 완료. 당해연도 목표(20종)의 100% (총 20종)를 제작 달성.
 표준화된 분획과정을 적용한 대사체 추출물 유래 분획물 라이브러 리 구축 : 총 20종 목표 	100	 총 20종의 극지생물 유래 미생물 EtOAc 추출물을 이용하여, 각 각 6종의 분획물을 제조하였음. 당해연도 목표(20종 이상)의 100% (총20종) 제작 달성.
○ 생리활성 대사체 분리 : 총 3종 목표	100	 3차년도 확보 추출물 1종 유래 분획물에서 <u>8종 활성 후보 대사</u><u>체 분리</u>. 3차년도 확보 추출물 1종 유래 분획물에서 <u>1종 활성 후보 대사</u><u>체 분리</u>. 4차년도 확보 추출물 1종 유래 분획물에서 <u>1종 활성 후보 대사</u><u>체 분리</u>. 당해연도 <u>목표(3종 이상)의 333.3% (총 10종) 초과 달성</u>.
 > 활성 대사체 구조분석 및 활성기작 분석 : 총 3종 목표 	100) 분리된 10종 활성 후보 대사체 가운데 <u>5종 구조 분석 완료.</u>) 당해연도 목표(<u>3종 이상)의 166.6% (총 5종) 초과 달성</u>.) 3차년도 확보 활성 후보 대사체 가운데 <u>5종의 대사체</u>에서 우수 한 활성 기작을 확인할 수 있었음.) 당해연도 목표(<u>3종 이상)의 166.6% (총 5종) 초과 달성</u>.
		히연구소

제 2 절 대외 기여도

1. 기술적 측면

- 세계적으로 생명자원 확보경쟁이 치열해지는 상황에서 "양극해양자원의 확보 및 보존

 → 가치 발굴 및 정보화 → 활용 및 산업화의 운영체계 구축"이라는 양극유래 해양생명
 자원의 선순환 구조를 위한 거시적 구도 하에서 양극해 유래 해양생물자원의 이차대사
 물질 탐색 연구는 양극해양 생명자원의 가치 발굴 및 정보화 단계를 촉진시키는 촉매의
 역할을 할 것으로 기대된다.
- 발굴되는 생리활성 물질은 직접 의약품 또는 기능성 소재로의 개발을 위한 후속 연구개 발에 활용되거나 의약품의 합성 연구 등에 선도물질이나 모델화합물로의 역할을 할 것으 로 기대된다.
- 2. 경제·산업적 측면



KOPR

- 새로운 물질의 제조나 생산에 대한 관련 특허의 확보가 가능하여 물질특허 외에도 이의 활용에 의한 수입도 가능하다.
- 국내에서 최종 상품화에 성공하면 관련 식품의약산업이나 제약산업의 성장과 활성화에 획기적인 전기를 마련할 수 있다.
- 최종 상업화에 성공하는 경우는 앞서 기술한 연구의 필요성 중 경제 산업적 측면에서 밝 힌 구체적인 시장성을 감안하여 국내시장 및 수출에 의한 상당한 경제적 가치를 창출할 수 있다.

제 3 절 연구개발 추진전략 및 방법

여그버의	연구수행방법
	(이론적·실험적 접근 방법)
극지 생물 유해 추출물 제조 및 표준화된 분획과정을 적용한 대사체 추출물 유래 분획물 라이브러리 구축 연구	 즉지 연구소로부터 극지유래 양극해 해양생물 소재를 제공받고 각 생물체의 특성에 맞춰 적절한 조 추출물을 확보 즉지 생물, 극지생물 유래 미생물, Ross해 연안에서 채취한 해양생물들의 극지생물 유래 시료에 대한 MeOH/EtOAc 추출물을 제작 각 추출물로부터 생리활성 물질을 탐색하기 위하여 건조된 시료로부터 MeOH/EtOAc(1L)를 이용하여 3일간 추출을 두 번 진행 얻어진 MeOH/EtoAc 추출물에 대하여 C₁₈-functionalized silica gel flash column chromatography를 수행 하였으며, 용출 용매로는 단계적 기울기 용리법을 사용 [20%, 40%, 60%, 80%, and 100% (v/v) MeOH in H₂O (500ml each)]. 크로마토그래피를 통해 얻어진 분획물들에 대한 NMR data 분석을 통해 우선 연구 진행 후보 분획물 선정
생리 활성 대사체 분리/구조분석 연구 및 활성 기작 분석 연구	 각 분획물에 대한 1차적인 생리 활성 검색을 진행하며, 이때 2가지 이상 의 검색 방법 이용 기본적으로 항염증 활성(Nitrite 생성 억제), 뇌세포 보호 효과(glutamate 독성 유발)를 탐색 각 분획물에 대한 생리 활성 결과와 ¹H-NMR 측정 및 연구책임자의 다 양한 구조분석 경험을 토대로 한 해석을 통하여 초기단계에서 추출물에 함유된 성분의 형태를 예상하고 이를 기초로 우선 연구 대상 선정 탐색대상으로부터 검정계에 의해 선정된 시료는 활성 대사체의 분리, 정 제를 시행하며, 활성 대사체가 존재하는 분획을 적당한 이동상으로 column chromatography (CC)를 실시하여 활성 대사체를 분리 정제하 며 칼럼 크로마토그라피는 필요에 따라 순상 실리카겔, 역상 실리카겔, Sephadex LH-20, Cellulose 등의 고정상을 이용하여 실행 분리된 활성 대사체은 NMR, Mass, IR, UV 흡수파장분석 등의 기기분석 을 통하여 구조를 규명하고 구조의 특이성과 생리 활성도를 비교 및 활 성 작용 기작 분석 진행 분리된 활성 대사체는 항염증 기전, 뇌세포 보호 기전, 간세포 보호 기 진, 항암 기전 등 다양한 활성 기작 분석을 통해 대사체가 갖는 새로운 생리 활성을 탐색하는 연구 진행

[별첨5]

자체평가 의견서

1. 과제현황

과제코드									
사 업 명		연구	고장비	개발	및 인프라	구축	사업		
과 제 명		양극해	미래	자원 '	탐사 및 활	身フ	술 개혁	발	
연구기관	원	광대학교		연	구 책 임 :	자		오현철	
	연 차	기 간	정 출 (부 견 금	기 업 부 담 금	정 출	부 외 연 금	계	
	1차연도	2011.12.29.~2 012.11.28							
연 구 기 간	2차연도	2012.12.01.~2 013.11.28	12.12.01.~2 3.11.28 60,000					60,000	
연 구 비 (천원)	3차연도	2013.12.01.~2 014.11.28	^{01.~2} 3 70,000					70,000	
	4차연도	2014.12.01.~2 015.06.30	70,	000	2			70,000	
	5차연도	2015.07.01.~2 016.05.31	79,	620				79,620	
	계	2011.12.29.~2 016.06.30	279	,620	1			279,620	
참 여 기 업									
상 대 국		상대국 연구기관							

2. 작 성 일 : 2016.06.24.

3. 연구책임자

소 속	직 위	성 명
원광대학교	부교수	오현철

4. 연구책임자 확인

본인은 평가대상 과제의 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 이 자료가 전문가 및 전문기관 평가시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성 및 창의성

본 연구는 양극해 해양생물자원으로부터 생리활성을 지닌 이차대사물질 발굴을 목표로 극 지생물 추출물을 제조하고 추출물 유래 분획물 라이브러리 구축하여 생리활성 대사체의 분 리 및 활성 대사체의 구조 분석 및 활성 기작 검토 연구를 진행 하였다. 당해 연도 연구 진행 결과 추출물 및 분획물 라이브러리 20종 확보, 활성 대사체 10종 확보, 기작연구 5종 진행 등 기존 목표를 초과달성 하였으며, 이는 연구 목표에 충분히 부합하는 연구 성과라 고 판단된다.

2. 연구개발결과의 파급효과

양극해에 서식하는 해양생물은 생리활성 물질탐색의 대상으로서 거의 연구가 이루어지지 않은 미지의 생물자원이다. 또한 극한해양환경에 적응하고 진화해온 극지환경 생물자원의 특성상 현재까지 발굴된 이차대사물질과는 상이한 화학구조 및 생리 활성을 가지는 이차대 사물질이 발굴될 가능성이 매우 높으며 이는 분자구조의 다양성구축면에서 장점을 지니고 있다. 따라서 본 연구 결과 확보한 극지 생물 유래 추출물 및 분획물 라이브러리, 분리된 활성 대사체는 신규 의약 소재 및 기타 기능성 소재의 원천재료로서의 무한한 잠재가치를 가지는 연구 성과물이라고 판단된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

본 연구를 통해 도출된 극지 생물 유래 추출물 및 분획물 라이브러리와 분리된 활성 대사 체, 그 기작 연구 결과들은 현재 우수성을 인정받아 특허 출원 및 국제저널에 논문 게재 등의 성과를 올리고 있으며, 이들의 세부적인 기작 연구를 통해 신규 의약 소재 및 기타 기능성 소재의 원천재료로서의 활용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

본 연구는 당해 연도 계획서 상의 목표를 모두 100% 달성 하였으며, 모든 연구 목표 부분 에서 110 ~ 300% 까지 초과 달성하는 성과를 얻었다. 또한, 차기 년도의 연구 목표인 활성 기작 검토 관련 연구 부분도 미리 진행 하여 수행 중에 있다. 활성 기작 연구에서도 검색 법을 최대 4가지까지 활용하여 연구 중이며, 이러한 부분을 종합적으로 고려할 때 본 연구 의 연구 개발 수행 노력의 성실도는 매우 우수하다고 판단된다. 5. 공개발표된 연구개발성과(논문·지적재산권·발표회 개최 등)

■ 논문발표실적

 Dihydroisocoumarin Derivatives from Marine-Derived Fungal Isolates and Their Anti-inflammatory Effects in Lipopolysaccharide-Induced BV2 Microglia.
 Kim DC, Quang TH, Ngan NT, Yoon CS, Sohn JH, Yim JH, Feng Y, Che Y, Kim YC, Oh H. (*J Nat Prod.* 2015, *78*, 2948-2955).

 Anti-Inflammatory and Cytoprotective Effects of TMC-256C1 from Marine-Derived Fungus Aspergillus sp. SF-6354 via up-Regulation of Heme Oxygenase-1 in Murine Hippocampal and Microglial Cell Lines. Kim DC, Cho KH, Ko W, Yoon CS, Sohn JH, Yim JH, Kim YC, Oh H. (*Int J Mol Sci.* 2016, *17*, E529).

Ⅱ. 연구목표 달성도

번호	세부연구목표	달 성 내 용	달성도(%)
1	극지 생물 유래 추출물의 제조	당해연도 <u>목표(20종)</u> 달성함.	100
2	표준화된 분획과정을 적용한 분획물 라이브러리 구축	당해연도 <u>목표(20종)</u> 달성함.	100
3	생리활성 대사체 분리	당해연도 <u>목표(3종 이상)의 333.3%</u> <u>(총 10종) 초과</u> 달성함.	100
4	활성 대사체 구조분석	당해연도 <u>목표(3종 이상)의 166.66%</u> <u>(총 5종) 초과</u> 달성함.	100
5	활성기작 분석	당해연도 <u>목표(3종 이상)의 166.66%</u> <u>(총 5종) 초과</u> 달성함.	100

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 양극해 해양생물자원으로부터 생리활성을 지닌 이차대사물질을 발굴을 목표로 당해 연도 연구 개발 결과 계획서 상의 모든 세부 목표를 100% 상회 초과달성 하였으며, 연구 결과물을 이용하여 SCI(E)급 국제학술지 논문 투고 및 특허 출원 등의 연구 성과를 얻었다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때, 현재 까지 목표에 충분히 부합하는 연구가 진행 중이며, 5차년도 연구에 진입함에 따라 다량 확보한 연구 결과들을 활용한 논문, 지적재산 권 등의 확보가 지속적으로 증가 할 것으로 판단된다. 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 원래 연구 계획서 상의 모든 세부목표를 100%를 상회하는 결과를 얻었다. 또한, 지속적인 논문 투고 및 지적 재산권 확보를 통해 연구 성과의 우수성과 창의성을 알리는데 노력을 하고 있다. 또한 5차년도 연구에 진입함으로 그간의 결과물들을 이용하여 더욱 많 은 연구 성과물이 도출 될 것으로 판단된다. 이러한 종합적인 부분들을 고려하여서 평가 시 참고 되길 희망하며, 본 연구 책임자는 추후에도 당초 연구 계획에 충실하고 성실하게 연구하도록 노력 하려고자 한다.

3. 연구개발결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구 결과 확보한 극지 생물 유래 추출물 및 분획물 라이브러리, 분리된 활성 대사체는 신규 의약 소재 및 기타 기능성 소재의 개발에 있어서 원천재료로 기반이 될 수 있을 것으 로 판단된다. 향후 연구 결과 얻은 우수한 활성 후보 소재는 제조 방법의 균일화, 대량생산 가능의 여부, 제조 공정의 단순화, 품질의 안정성 및 소재의 안전성 부분에 관련된 연구를 주관 기관과 긴밀히 협력하여 진행 할 것이다.

Ⅳ. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견	
특이사항 없음	
2. 연구기관 자체의 검토결과 📩 🕇 🚺 🖊	
특이사항 없음 ~	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 생리활성물질탐색의 미개척분야인 양극해 서식 해양생물자원 활용을 위한 화학성분 및 생리활성 DB 구축의 기초자료로 활용이 가능할 것이다.
- 구축되는 대사체 분획물 라이브러리는 향후 관련 연구자와의 공동연구의 연구소재로 추 가 활용이 가능할 것이다.
- 발굴된 대사체의 생리활성을 기초로 하여 미지의 생명현상 규명 또는 질병현상 규명과
 관련된 연구 분야에 chemical probe 으로도 활용이 가능하다.
- 발굴되는 생리활성 물질은 의약품의 합성연구 등에 선도물질이나 모델화합물로의 역할이 가능하다.
- 신규 소재로서 물질특허를 획득하여 독점적 활용 권에 의한 물질특허 사용료나 양도료로 서 막대한 수입을 기대할 수 있다.
 극지연구소

 새로운 물질의 제조나 생산에 대한 관련 특허의 확보가 가능하여 물질특허 외에도 이의 활용에 의한 수입도 가능하다.

- 국내에서 최종 상품화에 성공하면 관련 식품의약산업이나 제약 산업의 성장과 활성화에 획기적인 전기를 마련 할 수 있다.
- 최종 상업화에 성공하는 경우는 앞서 기술한 연구의 필요성 중 경제 산업적 측면에서 밝힌 구체적인 시장성을 감안하여 국내시장 및 수출에 의한 상당한 경제적 가치를 창출할 수 있다.

제 6 장 참고문헌

- 1. Maaki Sakurai, Jun Kohno, Kouzou Yamatomo, Toru Okuda, Makinishio, Kimio Kawano and Tetsuo Ohnuki, TMC-256A1 and C1, New Inhibitors of IL-4 Signal Transduction Produced by *Aspergillus niger* var niger TC 1629. *The Journal of Antibiotics*, **2002**, *55*, 685-692.
- Yapeng Zhang, Tianjiao Zhu, Yuchun Fang, Hongbing Liu, Qianqun Gu and Weiming Zhu. Carbonarones A and B, New Bioactive –Pyrone and –Pyridone Derivatives from the Marine–derived Fungus Aspergillus carbonarius. The Journal of Antibiotics, 2007, 60, 153–157.
- 3. Kun-Woo Kim, Fumio Sugawara, Shigeo Yoshida, Noboru Murofushi, Nobutaka Takahashi, Roy Curtis W.Structure of Malformin A, a Phytotoxic Metabolite Produced by *Aspergillus niger. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1993**, *57*, 240–243.



