

(뒷면)

(앞면)

	<p>해면동물의 암세포독성 물질 개발 연구</p> <p>2 0 0 3</p> <p>해 양 수 산 부</p>	<p>해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업 연 구 보 고 서</p> <p>해면동물의 암세포독성물질 개발연구</p> <p>2003. 12. 3.</p> <p>부산대학교 SG연구사업단</p> <p>해 양 수 산 부</p>
<p>주 의 (편집순서 8)</p> <p>14포인트, 고딕체</p>		

※ 글자체는 고딕체로 하되 글자크기는 작성자 조정

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “해면동물의 암세포독성물질 개발연구” 과제의 최종보고서
로 제출합니다.

2003 년 12 월 3 일

대학(교)명 : 부산대학교
사업단장 : 이승건
연구팀장 : 정지형
참여교수 : 김남득

목 차

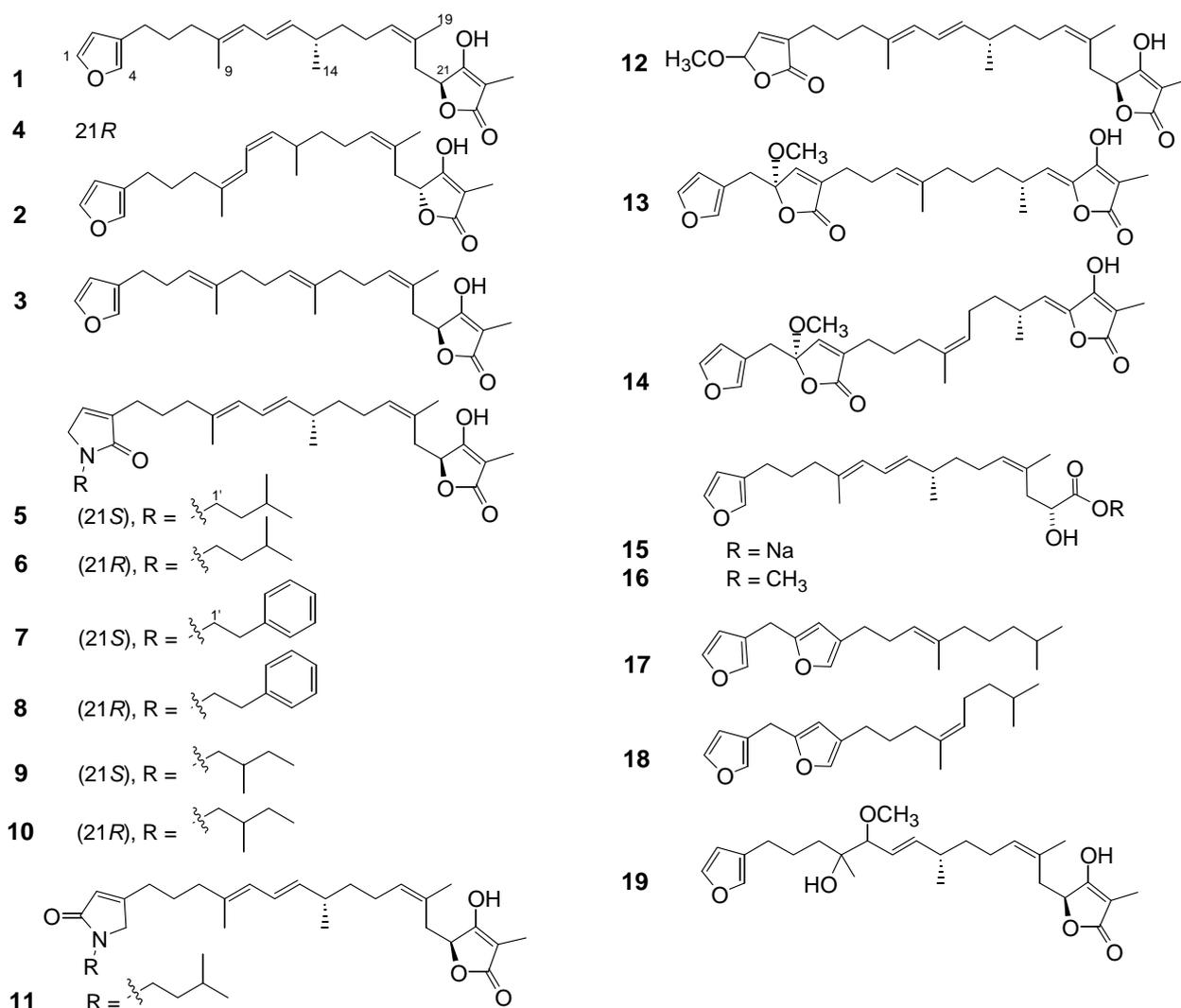
요약문

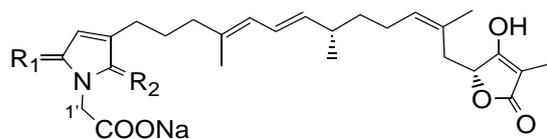
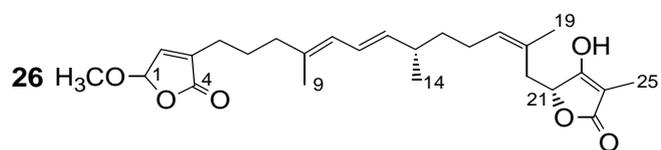
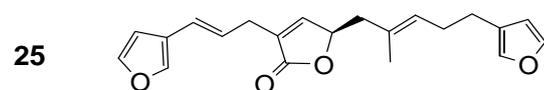
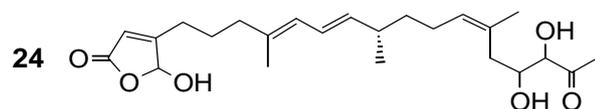
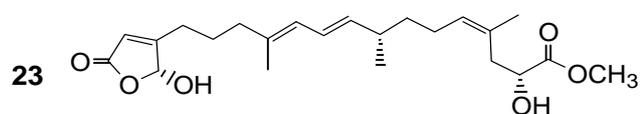
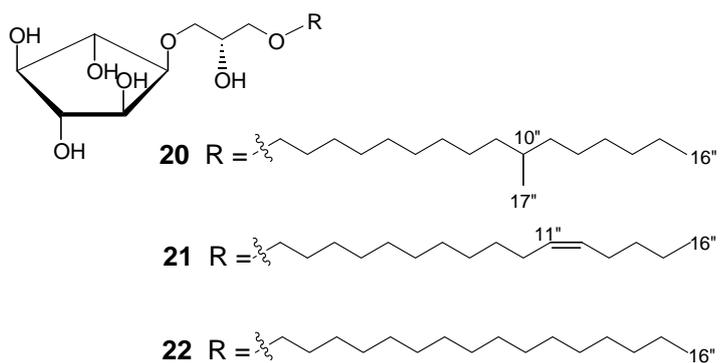
제 1 장 서론	1
1. 연구의 목적	1
2. 연구의 필요성 (과제신청 이유 등)	1
제 2 장 국내외 연구개발 현황	2
1. 과제관련 국내외 동향	2
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	4
1. 연구개발 수행내용	4
2. 연구수행 결과	6
1) 해면(Sarcotragus sp.)으로부터 항암활성물질 분리	6
2) 5종 인체암세포에 대한 활성검색	25
3) 해면(Sarcotragus sp.)에서 분리한 ircinin-1의 인체간암세포 HepG2와 Hep3B에 대한 독성효과 연구	27
4) 해면(Petrosia sp.)에서 분리한 petrotetrayndiol A의 인체피부암세포 SK-MEL-2에 대한 독성효과 연구	31
5) Petrotetrayndiol A에 의한 G2/M arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사	39
6) Ircinin-1에 의한 G1 arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사	46
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	52
1. 연구개발목표의 달성도	52
2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가	53
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	57

SUMMARY

(영문요약문)

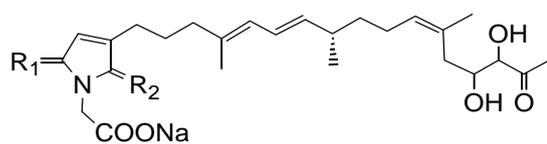
In our continuing study on antitumor constituents of the marine sponge *Sarcotragus* sp., 23 new furano- or pyrroloesterterpenes (**5-19**, **23-30**) and two new cyclitol derivatives (**21**, **22**) were isolated. Cytotoxicity of the new compounds against five human cancer cell lines was evaluated. Ircinin-I was one of the most potent compound among its congeners. Mode of the action of ircinin-I was studied employing SK-MEL-2, HepG2, and Hep3B cells. Petrotetrayndiol A from a sponge *Petrosia* sp. was also subjected to biological study.





27 R₁ = H₂, R₂ = O

28 R₁ = O, R₂ = H₂



29 R₁ = H₂, R₂ = O

30 R₁ = O, R₂ = H₂

CONTENTS

(영 문 목 차)

Summary

Chapter 1. Introduction	1
1. Aim of Study	1
2. Background of Study	1
Chapter 2. Status of the Research	2
1. Trends of Related Study	2
Chapter 3. Results and Discussion	4
1. Experimental	4
2. Results	6
1) Isolated Compounds	6
2) Cytotoxicity Assay	25
3) Cytotoxicity Study of Ircinin-1 against HepG2 and Hep3B	27
4) Cytotoxicity Study of Petrotetrayndiol A against SK-MEL-2	31
5) Mode of Action of Petrotetrayndiol A	39
6) Mode of Action of Ircinin-1	46
Chapter 4. Achievement and Contribution	52
1. Achievement	52
2. Contribution	53
Chapter 5. Application of the Results	57

제 1 장 서 론

1. 연구의 목적

본 연구의 목적은 국내산 해면으로부터 암세포에 세포독성 또는 선택적으로 암세포의 세포주기를 억제하여 항암작용을 나타내는 **선도물질**을 도출하는 것이다.

2. 연구의 필요성 (과제신청 이유 등)

지구상의 다양한 생물은 인간이 상상하지 못하는 새로운 구조의 각종 화합물을 생산하므로 신의약품 개발의 원천자원 또는 선도물질 자원으로서 꾸준히 탐색의 대상이 되어왔다. 그러나 그동안의 탐색연구는 주로 용이하게 접근할 수 있는 육상자원에 치중되어 왔으며 그 결과 주변에서 쉽게 접할 수 있는 천연자원에 대해서는 연구되지 않은 생물종이 별로 없을 정도이다. 그리하여 최근에는 비교적 탐색의 손길에서 벗어나 있던 **해양생물자원**이 크게 각광을 받고 있으며 실제로 육상자원과는 전혀 다른 새로운 구조의 화합물들이 속속 발견되고 있다. 우리 나라에서도 그 동안 해양자원에 대한 연구는 꾸준히 해왔으나 주로 양식자원, 수산식량, 건강보조식품 등의 개발에 초점이 맞추어져 왔다. 그러나 이제는 선진국처럼 **고부가 가치 신물질 개발**에 연구투자를 강화해야 할 필요성이 고조되고 있다.

본 연구팀에서의 선행연구 (KSGP 1년차) 결과 국내산 *Sarcotragus* sp.의 추출물에서 유의성 있는 세포독성 성분을 분리하여 그 정체를 규명하였으며 인체폐암세포 (A549), 인체난소암세포 (SK-OV-3), 인체피부암세포 (SK-MEL-2), 인체중추신경계암세포 (XF498), 및 인체결장암세포 (HCT15) 등 5종의 인체고형암세포에 대한 항암활성을 확인하였으며 또한 활성물질은 인체결장암세포를 대상으로 시험했을 때 **세포주기를 선택적으로 억제**하여 항암작용을 나타내는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 이미 확보된 *Sarcotragus* sp.의 활성물질에 대하여 구체적인 작용기전을 연구하여 그 이용 가능성을 검토하고 이와 병행하여 암세포 독성이 확인된 국내산 공생해면의 세포독성 성분을 추적하여 순수분리하고 그 구조를 규명한다.

제 2 장 국내외 연구개발 현황

1. 과제관련 국내외 동향

○ 산업수요 측면

해양자원 개발의 선진국인 미국, 일본의 경우, ‘해양으로부터의 의약품 개발’이라는 기치 아래 산·학·연 협동연구로 광범위하여 연구가 수행되고 있으며 제약업계의 참여가 활발하다. 미국의 경우를 예로 들자면 우선 가장 기초적인 단계인 선도물질의 탐색 및 도출 연구를 대학 연구소에서 주로 수행하고 여기서 도출된 선도물질 및 그 연구결과를 venture 제약회사 또는 소규모 제약회사에서 royalty를 지급하고 사들이게 된다. 그 후 각종 동물시험 및 임상시험 또는 임상 초기 단계의 연구를 수행하여 선도물질의 유용성을 확인하고 제품가치를 격상시키면 최종적으로 다국적 제약기업에서 그 연구결과를 사들이거나 회사를 인수한 후 임상시험을 거쳐 최종 제품개발 및 시판을 담당하는 효율적인 체제로 이루어지고 있다. 이러한 전 과정은 상당한 자본과 시간이 소요되므로 산·학·연의 유기적인 협조 및 역할분담이 특히 중요한 요소로 작용한다. 이러한 신의약품을 개발에 대한 FDA의 허가조건이 상당히 까다롭고 장기간에 걸친 연구가 필요하였으나 최근에 정책이 바뀌어 천연자원으로부터 치료의약품의 전 단계인 **보조의약** 또는 **대체의약** (CAM: Complementary and Alternative Medicine)의 개념이 확립되면서 이러한 보조의약 또는 대체의약의 개발에 관한 요건은 치료의약품 개발에 비하여 상당히 간단하고 완화되어 여러 제약업체들이 앞다투어 이 분야에 연구 투자를 시작하고 있다. 치료 의약품에 비하여 개발기간 및 개발비가 적게 소요되므로 제약 선진국에 비해 자본 및 기술력이 아직 취약한 국내에서도 특히 이 분야의 연구투자가 활발해 질 것으로 예측된다. 이러한 일련의 신물질 개발이 효율적으로 진행되기 위해서는 기초단계인 선도물질의 탐색 및 도출의 과정에서 대학연구소 및 정부연구소가 그 역할을 충실히 담당해 주어야 할 것이다.

○ 연구수행 측면

천연물로부터의 신규 생리활성물질 탐색은 그 동안 주로 육상자원 (특히 고등식물 및 미생물) 에 치중되어 연구되어 왔다. 이는 인류가 태고적부터 많은 육상식물자원을 민간약으로 사용해 왔으며 특히 동양권에서는 체계적이고 광범위하게 약용자원으로 사용해왔기 때문에 그 기록이 풍부하게 축적되어 있으며, 또한 손쉽게 원료자원의 대량 확보 및 생산이 가능하기 때문일 것이다.

한편 육상미생물은 일관된 공정으로 미생물을 대량 배양하여 경제적으로 원료물질을 생

산할 수 있다는 장점 때문에 산업적으로 이용개발에 대한 많은 연구와 투자가 이루어져 왔다. 그리하여 최근까지 육상 동식물 및 미생물자원에 대해서는 광범위하게 연구가 수행되어 우리나라의 경우만 하더라도 이제는 연구대상이 되지 않은 생물종이 별로 없을 정도이다. 이러한 상황에서 선진국에서는 벌써부터 그 동안 미개척 분야였던 해양생태계에 눈을 돌려 연구투자를 해오기 시작했다. 최근에는 채집기술, 양식기술 및 분석기술의 발달과 함께 관련분야 학문의 진보에 힘입어 해양자원으로부터 새로운 의약품을 개발하고자 하는 연구가 더욱 활발히 진행되고 있다. 국내의 연구진들도 이러한 첨단분야의 연구에 초창기에 신속히 투입되어 선진국과 대등한 수준의 기술력 확보의 기회로 삼아야 할 것이다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

1. 연구개발 수행내용

1) 정지형 교수

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
암세포 독성물질 분리정제	생리활성추적 분획법	<ul style="list-style-type: none"> ● 조추출물에 대한 5종 인체암세포 억제효과 검색 ● Brine shrimp assay를 이용한 활성추적
	Chromatography를 이용한 분리정제	<ul style="list-style-type: none"> ● Flash column, MPLC, HPLC 등을 이용한 분리정제 ● Si-gel, ODS, NH₂, CN 등의 고정상을 이용한 분리정제 ● Chromatotron, Prep TLC 등을 이용한 분리정제
암세포 독성물질의 구조규명	IR, UV, NMR, MS 등을 이용한 구조분석	<ul style="list-style-type: none"> ● 각종기기분석을 통한 구조분석 ● 2D NMR, FAB-CID MS/MS, ESIMS 등을 이용한 분석
	유도체합성을 통한 구조분석	<ul style="list-style-type: none"> ● MTPA, PGME, TMS 등 각종 유도체를 합성하여 구조분석 및 입체화학 결정
	DB 검색을 통한 신물질 및 특허여부확인	<ul style="list-style-type: none"> ● SCI Finder, STN 등의 service를 이용하여 DB검색 ● 신물질여부 및 특허여부 검색 ● 신규화합물 25종의 구조규명
5종 인체암세포에 대한 활성물질의 억제활성 평가	난치성 인체 고형암세포에 대한 억제효과 검색	<ul style="list-style-type: none"> ● 화학연구소에 의뢰하여 in vitro 항암효과 검색
	구조-활성 상관관계 검토	<ul style="list-style-type: none"> ● 분리된 다양한 analogs의 구조-활성 상관관계 검토

2) 김남득 교수

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
암세포주기 억제효과 검색	간암세포들(HepG2와 Hep3B)에 대한 ircinin-1의 세포주기 조절 및 성장 억제 효과 조사	<ul style="list-style-type: none"> ● P53 유전자를 가진 HepG2 간암세포와 p53 유전자를 가지지 않은 Hep3B 간암세포에 미치는 ircinin-1의 세포주기 조절 및 독성효과를 검사한 결과 p53 유전자를 가진 HepG2 간암세포에 ircinin-1이 효과적인 암세포성장 억제 및 세포주기 조절 효과를 보여줌
	SK-MEL-2 피부암세포에 대한 petrotetrayndiol A (C ₄₆)의 세포주기 억제효과 조사	<ul style="list-style-type: none"> ● Petrotetrayndiol A는 농도 의존적으로 피부암세포의 증식을 억제하였고 세포주기 억제 및 apoptosis를 유도함. Bax 단백질의 증가를 통해 PARP 단백질의 분해 등을 유도함. 그리고 p53 유전자와는 무관하게 p21 단백질 증가를 유도함.
활성물질의 작용기전 연구	Petrotetrayndiol A에 의한 G2/M arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사	<ul style="list-style-type: none"> ● petrotetrayndiol A는 G2/M기 전이를 억제하였으며, 이에 p53 비의존적 p21의 발현이 중요함. 또한 petrotetrayndiol A에 의한 암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며 이는 Bcl-2 family의 발현교란에 의한 caspase 활성화와 직접 연관 있음.
	Ircinin-1에 의한 G1 arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사	<ul style="list-style-type: none"> ● ircinin-1는 G1기 전이를 억제하였으며, 이에 p53 비의존적 p21의 발현이 중요한 역할을 함. 또한 ircinin-1에 의한 암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며 이는 Bcl-2 family의 발현교란에 의한 caspase 활성화와 직접 연관 있음.

2. 연구수행 결과

1) 해면(*Sarcotragus* sp.)으로부터 항암활성물질 분리

본 과제는 사실상 2000년도 ‘국내산 각질해면 (*Sarcotragus* sp.)로부터 선택적 세포주기 억제물질 도출’의 연속과제이다. 2001년도 10월부터 개시된 본 연구 과제에서는 동일해면 및 추가로 제주해역에서 채집된 같은 *Sarcotragus* 속 해면의 세포독성 물질을 추적한 결과 23종의 새로운 pyrroloesterterpene (5-11, 27-30) furanosesterterpene (12-19, 23-26) 및 2종의 새로운 cyclitol 유도체 (21, 22)를 분리하였다. 이들 물질의 1차원적인 구조는 1D NMR 및 COSY, HMQC, HMBC (Tables 1-4, 6-8, 10), MS, IR 등 각종 기기분석 방법을 이용하여 규명하였으며 absolute stereochemistry는 CD spectroscopy, optical rotation, MTPA ester의 NMR data 비교분석 등으로 규명하였다. Tetronic acid moiety를 포함하고 있는 sesterterpene의 C-21의 입체구조는 CD spectroscopy를 이용하여 규명하였다.

Compound 1의 경우 positive $\pi-\pi^*$ transition을 그리고 negative $n-\pi^*$ transition을 나타내었다. 그러므로 관련문헌에 근거하여 21S의 입체구조로 결정하였다. 한편 compound 4는 기타 NMR 및 MS data는 1과 거의 일치하였으나 CD spectrum이 4와 반대되는 방향의 Cotton effect를 나타내었다 (Figure 1). 이는 tetronic acid의 입체구조가 다르다는 것을 의미하여 21R의 입체구조로 결정하였다. Pyrroloesterterpene에서도 stereochemistry가 서로 반대인 epimer가 동시에 분리되었는데 (Figure 3) 이 같은 현상은 아마도 tetronic acid 부분이 쉽게 개열되어 다시 lactone을 형성하는 과정에서 epimerization이 일어나는 것으로 추정된다.

Pyrroloesterterpene (5-11, 27-30)은 곰팡이를 사용하여 furanosesterterpene을 생물공학적으로 변형시켜 얻어진 예가 있으나 천연에서는 흔치 않은 물질군이다. 이번에 분리된 pyrroloesterterpene이 천연상태에서 존재하는 물질인지 또는 추출, 분리 과정에서 인위적으로 생성된 유도체인지는 확실치 않다. Pyrrolone ring을 포함한 부분구조는 COSY, HMBC 등의 data 해석에 의해 규명되었다 (Figure 2). 생합성적으로는 furanosesterterpene과 leucine(5, 6), phenylalanine (7, 8), isoleucine (9, 10), glycine(27-30) 등의 amino acid에서 유도된 unit이 결합하여 생성될 것으로 추정된다. Amino acid unit이 치환되는 방향에 따라 2가지의 이성체가 생성될 수 있는데 5와 11, 27과 28, 29와 30이 각각 이러한 이성체들이다. 이러한 이성체들은 COSY 및 HMBC data의 분석으로 구별될 수 있었다 (Figure 7).

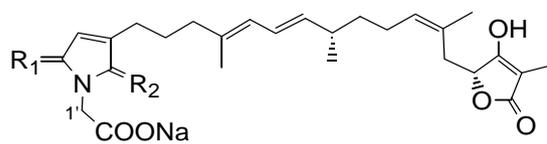
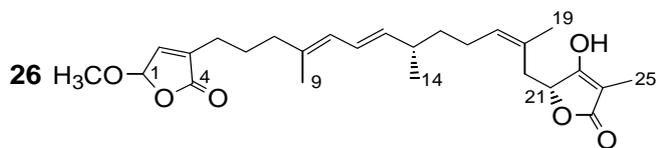
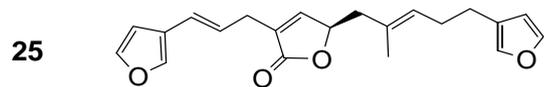
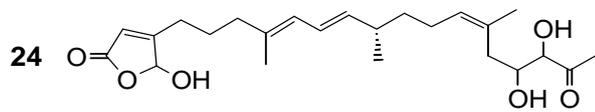
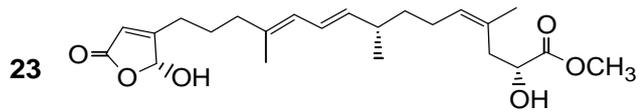
Furan ring은 화학적으로 산소와 반응하여 쉽게 산화되는데 compound 12-14, 23, 24, 26 등은 이러한 과정으로 유도된 oxidized furan 유도체로 추정된다. Compound 23과 24는 lactone ring이 극성용매에서는 쉽게 epimerize 되는 것으로 추정되었다. 이는 manolide 계통의 화합물에서도 관찰되는 현상이다. Compound 23의 major epimer의 입체구조는 CD spectroscopy에 의해 4R 로 규명되었다.

Compound **15**의 hydroxyl group의 입체화학은 PGME 유도체를 합성하여 분석하였다 (**Figure 5**). C-21 hydroxyl group을 MTPA chloride와 반응시켜 ester를 합성하려 시도했으나 반응물이 불안정하여 분해되었다. 그래서 다른 방법으로 carboxyl group과 phenylglycine methyl ester를 반응시켜 amide를 형성하고 이의 NMR data를 분석하여 입체구조를 결정하였다.

Compound **25**는 기존의 알려진 화합물 kurosongin과 NMR 및 MS data가 일치하였다. 하지만 optical rotation의 방향이 서로 반대로 나타나 다른 확인방법으로 CD spectroscopy로 분석한 결과 negative $\pi-\pi^*$ transition과 positive $n-\pi^*$ transition을 나타내었다. 그러므로 compound **25**는 기존의 kurosongin과 입체화학이 반대인 epimer로 확인되었다. Compound **24**, **29**, **30**에서 관찰되는 α,β -dihydroxy ketone group은 해양 sesterterpene 중에서는 처음 발견되는 functional group이다. 이 functional group의 구조는 COSY 및 HMBC data의 해석에 의해 밝혀졌다 (**Figure 6**)

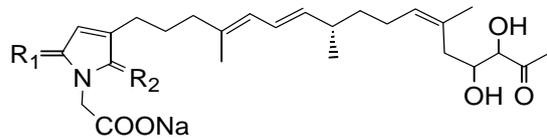
Cyclitol 계열의 화합물 (**20**, **21**)은 FAB-CID tandem mass를 이용하여 2중 결합 및 methyl branching의 위치를 결정하였다. Compound **21**의 FAB-CID tandem mass에서는 특징적인 allylic cleavage가 m/z 371 및 425에서 관찰되어 2중결합의 위치가 결정되었다 (**Figure 9**).

이들 신물질의 분리 및 구조규명 그리고 항암활성에 관한 내용은 *J. Nat. Prod.* (SCI, 3편 인쇄) 및 *Bull. Korean Chem. Soc.* (SCI, 1편 인쇄)에 발표하였다.



27 $R_1 = H_2, R_2 = O$

28 $R_1 = O, R_2 = H_2$



29 $R_1 = H_2, R_2 = O$

30 $R_1 = O, R_2 = H_2$

2) 5종 인체암세포에 대한 활성검색

본 연구에서 해면으로부터 분리된 신규물질에 대해서는 최종적으로 5종의 인체 고형암 세포에 대한 활성을 평가 하였다 (Tables 5, 9, 11). 대부분의 sesterterpene류와 cyclitol류는 유의성 있는 항암활성을 보였다. Pyrlosesterterpene 중에서는 carboxyl function을 함유한 유도체들 (27-30)은 상대적으로 활성이 약했다. Furanosesterterpene 중에서도 carboxyl function을 가진 유도체들 (15, 16, 23)은 상대적으로 약한 활성을 나타내었다. 가장 유의성 있는 활성을 나타내었던 기지물질 ircinin-1 및 또 다른 해면 *Petrosia* sp.에서 분리되었던 C₄₆ polyacetylene 계열의 petrotetrayndiol A에 대해서는 참여연구 교수팀에서 구체적인 세포독성 작용기전을 연구하였다.

3) 해면(*Sarcotragus* sp.)에서 분리한 ircinin-1의 인체간암세포 HepG2와 Hep3B에 대한 독성효과 연구

동일해면(*Sarcotragus* sp.)에서 전년도에 분리한 ircinin-1 (Figure 10)을 이용하여 한국인에 다발하는 간암세포 중 대표적인 간암세포주 HepG2와 Hep3B에 미치는 영향을 분석하기 위하여 p53 wild type HepG2 세포주와 p53 유전자 결손 Hep3B 세포주를 사용했으며, 이들 세포주들의 apoptosis와 세포분열 주기에 미치는 영향을 조사하였다.

전반적으로 간암세포에 대하여 현저한 세포독성 효과를 보였으며 농도 의존적인 세포 독성 효과를 보였다 (Figure 11). 그리고 이들 암세포들의 MTT 실험 결과 wild type p53 유전자를 가진 HepG2 간암세포에 대한 성장 억제 농도인 IC₅₀ 값은 약 20 μ g/ml이었다. 이에 비해 p53 유전자를 가지지 않은 Hep3B 간암세포에 대해서는 IC₅₀ 값이 약 40 μ g/ml 농도였다. 그리고 ircinin-1 존재 하에서는 많은 세포들이 성장을 하지 않았거나 세포독성의 결과 수가 감소하였다. 그리고 일부 암세포들에서는 apoptosis의 결과라고 생각되는 apoptotic body 등을 동반한 구조물이 관찰되기도 하였다 (Figure 12, 13). Ircinin-1의 존재 하에서 세포들의 형태가 control에 비해 매우 다양하게 변화하였으며 apoptosis의 과정에 나타나는 cell의 크기 변화, dead cell의 증가 등이 관찰되었다.

그리고 HepG2 간암세포 성장의 억제 및 apoptosis 유도여부를 확인하기 위해 유세포 분석기(flow cytometry)로 세포주기 및 apoptosis 비율을 조사한 결과 10 μ g/ml의 ircinin-1를 처리하고 12, 24, 48, 72시간 동안 배양한 뒤 이들 세포를 채취하고 유세포분석기로 분석한 결과 apoptosis 분획이 시간 의존적으로 증가함을 확인하였다 (Figure 14). 최대 72시간까지 배양한 결과 apoptosis가 발생한 sub G1 분획이 대조군 1.3%에 비해 5.1%까지 증가한 것으로 보아 비교적 적은 농도인 10 μ g/ml의 ircinin-1이 약 4배의 apoptosis를 유도한 것으로 사료되었다. 그리고 비교적 높은 농도인 30 μ g/ml의 ircinin-1을 처리한 결과 72시간 경과 시 대부분의 암세포들이 apoptosis로 사망한 것으로 확인되었다 (Table 12).

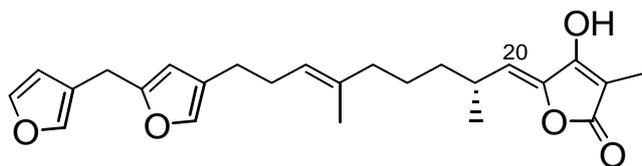


Figure 10. Structure of ircinin-1.

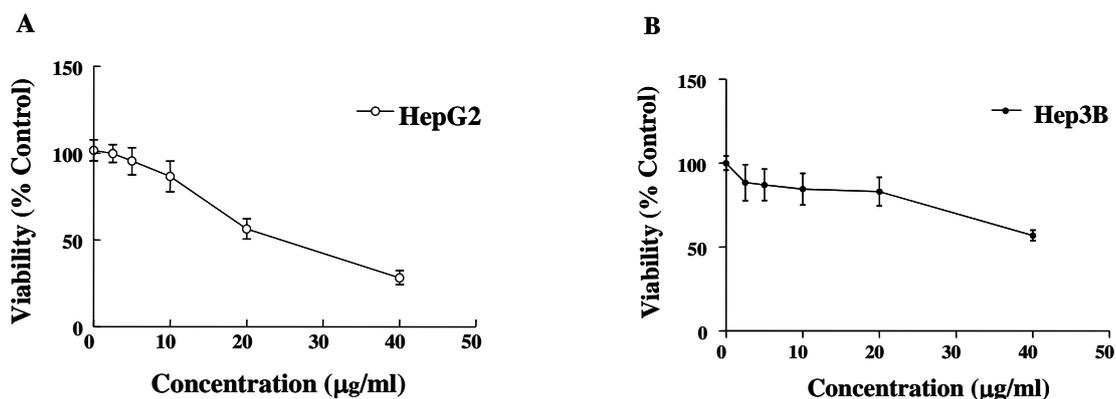


Figure 11. Cytotoxicity of ircinin-1 on HepG2 (A) and Hep3B (B) human hepatocellular carcinoma cells assessed by MTT assay

Cells were treated with different concentration of ircinin-1 for 48 hrs and the effects of ircinin on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

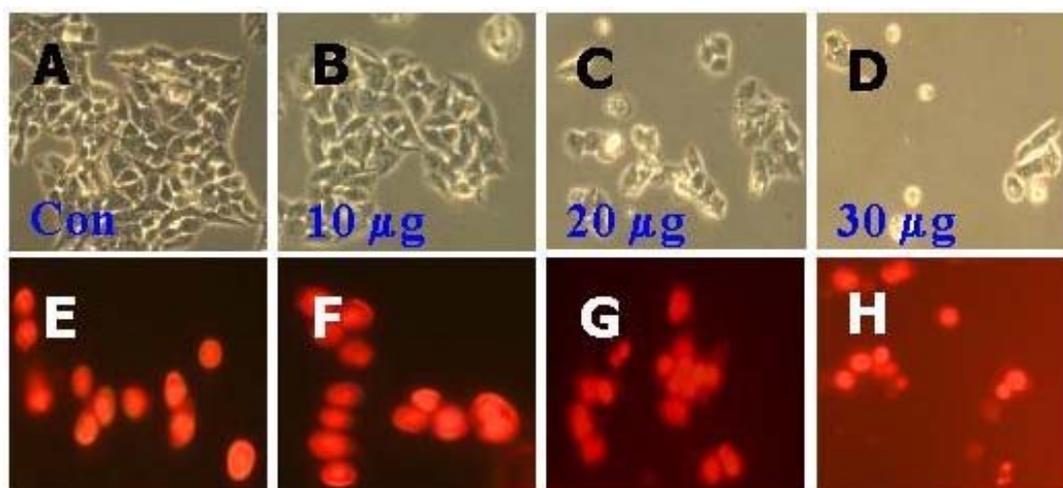


Figure 12. Microphotographs of ircinin-1 treated HepG2 cells were determined by light microscopy. Cells were treated with ircinin-1 for 48 hrs. Cells were stained with PI after treatment with ircinin. A and E, control; B and F, 10 $\mu\text{g/ml}$ ircinin-1 treated HepG2 cells; C and G, 20 $\mu\text{g/ml}$ ircinin-1 treated HepG2 cells; D and F, 30 $\mu\text{g/ml}$ treated HepG2 cells. Apoptotic body and fragments with small, solid spheres of condensed DNA were shown in the pannel H.

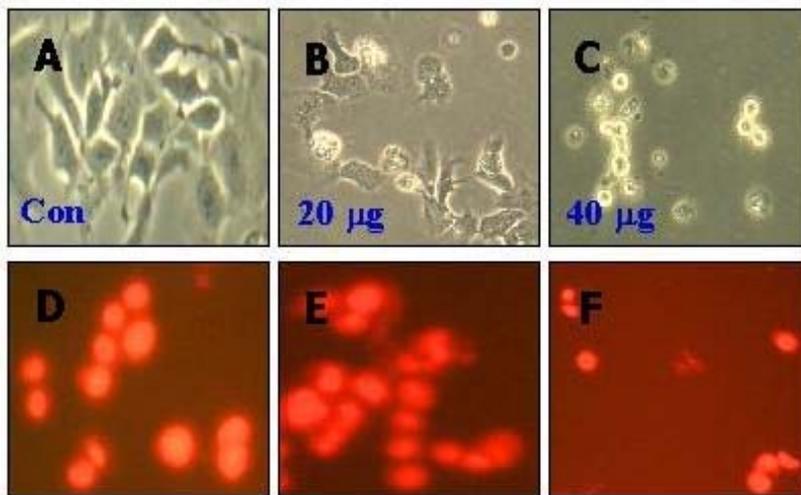


Figure 13. Microphotographs of iricinin-1 treated Hep3B cells were determined by light microscopy. Cells were treated with iricinin-1 for 48 hrs. Cells were stained with PI after treatment with iricinin-1. A and D, control; B and E, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ iricinin-1 treated Hep3B cells; C and F, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ iricinin-1 treated Hep3B cells. Apoptotic body and fragments with small, solid spheres of condensed DNA were shown in the panel F.

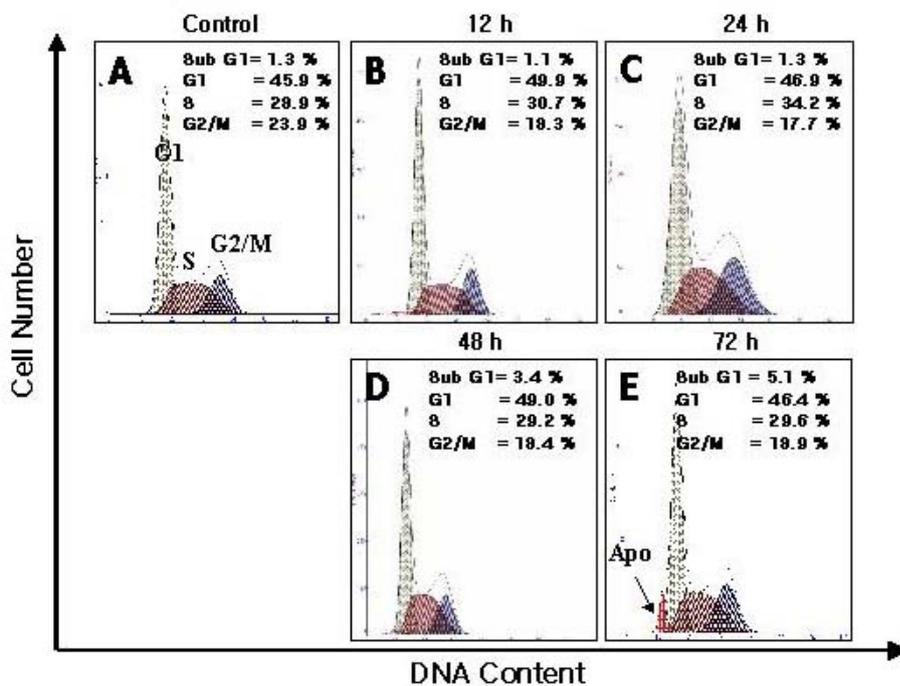


Figure 14. Cell cycle analysis of HepG2 cells treated with iricinin-1. With time in culture with the treatment of iricinin-1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 12, 24, 48 and 73 h, the population of apoptotic cells at the sub-G1 fraction was increased.

Table 12. Fractions of cell populations (%) after treatment with 10 $\mu\text{g/ml}$ (A) and 30 $\mu\text{g/ml}$ (B) of ircinin-1 on HepG2 cells for 12, 24, 48, and 72 hours. Sub G1 fractions represent the population of apoptotic cells.

A

Time (h)	% of cells			
	Sub G1	G1	S	G2/M
Con	1.3	45.9	28.9	23.9
12	1.3	46.9	34.2	17.7
24	1.1	49.9	30.7	18.3
48	3.4	49	29.2	18.4
72	5.1	46.4	29.6	18.9

B

Time (h)	% of cells			
	Sub G1	G1	S	G2/M
Con	2.2	26.4	22.8	48.6
12	3.5	27.5	35.2	33.6
24	5.8	44.9	19.5	29.8
48	11.2	28.8	35.6	24.4
72	98.4	1.08	0.49	0.03

4) 해면(*Petrosia* sp.)에서 분리한 petrotetrayndiol A의 인체피부암세포 SK-MEL-2에 대한 독성효과 연구

본 연구에서는 해면 *Petrosia* sp.로부터 분리한 petrotetrayndiol A의 인체피부암세포에 미치는 영향을 분석하기 위하여 p53 mutant type SK-MEL-2 세포주를 사용했으며, 이 세포주의 apoptosis와 세포분열 주기상에 미치는 영향을 조사하였다. 전반적으로 피부암세포에 농도 의존적으로 현저한 세포독성효과를 보였다 (Figure 15). 그리고 이들 암세포들의 MTT 실험 결과 암세포 성장 억제 농도인 IC₅₀ 값은 약 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 본 연구에서는 petrotetrayndiol A에 의하여 피부 암세포에서 apoptosis가 일어나는지 조사하였다 (Figure 16). Petrotetrayndiol A이 처리된 것과 처리되지 않은 배지에서 자란 세포 핵의 형태적인 비교를 형광현미경을 이용하여 조사한 것으로서, petrotetrayndiol A가 처리되지 않은 대조군에서는 암세포 핵들이 정상적인 둥근 모습이었으나 petrotetrayndiol A가 처리된 세포들에서는 핵의 모양이 불규칙하며 부분적인 응집화가 일어나고 있음을 보여 주었다.

그리고 세포 성장의 억제 및 apoptosis 유도 여부를 확인하기 위해 유세포분석기 (flow cytometry)로 세포 주기 및 apoptosis 비율을 조사한 결과 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 petrotetrayndiol A을 처리하고 24 및 48 시간 동안 배양한 뒤 이들 세포를 채취하고 유세포분석기로 분석한 결과 apoptosis 분획이 시간 의존적으로 증가함을 확인하였고 (Figure 17), 또한 Table 9에서 보여지는 바와 같이 apoptosis 과정에 관여하는 단백질 중 Bax와 Bcl-2의 발현 양상을 검토한 결과 pro-apoptotic protein인 Bax는 petrotetrayndiol A의 농도 증가에 따라 현저하게 증가하는 경향을 보였고 anti-apoptotic protein인 Bcl-2는 petrotetrayndiol A의 증가에 따라 감소하는 경향을 보여 주었다 (Figure 18). 따라서 Bax 단백질의 발현 증가와 Bcl-2 단백질의 발현 감소는 apoptosis 분획의 증가가 일치함을 보여 주는 것이다.

그리고 apoptosis 과정에서 단백질 분해 효소들에 의해 세포질과 핵내 주요 단백질의 파괴에 관여하는 caspase-3 단백질 발현을 살펴본 결과 pro-caspase-3 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 19). 또한, DNA repair에 관여하는 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질의 파괴 여부를 western blot으로 확인한 결과 petrotetrayndiol A의 농도가 증가할수록 PARP 단백질이 본래 116 kD의 크기에서 85 kD로 잘려짐을 확인할 수 있었다 (Figure 20).

Petrotetrayndiol A의 세포분열 주기상에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 petrotetrayndiol A를 처리하지 않은 대조군 및 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 petrotetrayndiol A을 0, 24, 48 hrs 동안 처리한 세포들을 대상으로 세포주기 분석을 실시한 결과 Table 13과 같다. 결과에서 보는바와 같이 SK-MEL-2 세포에서 대조군의 경우, G1기에 해당하는 세포는 약 52.7% 정도였으며, S 및 G2/Mr1에 해당하는 세포는 각각 30% 및 17.6% 정도의 분포를 보였다. Petrotetrayndiol A을 24, 48 hrs 동안 처리된 세포에서는 G2/M기에서 대조군보다 1.5배 정도

에 해당하는 28.2% 정도로 G2/M기에 성장 억제를 보여 주었음을 알 수 있다. Petrotetrayndiol A의 세포주기 조절기전을 연구하기 위해 세포조절에 중요한 역할을 하는 p21, p53 western blot를 실시하였다. Cell cycle 조절 인자 중 apoptosis 및 세포주기 G1 arrest에 관여하는 단백질은 p53과 p21 단백질이 중요하다. 그러나 SK-MEL-2 암세포의 경우 p53 단백질이 mutant type이기 때문에 본 실험에서는 p53 단백질의 발현 변화가 큰 의미가 없다. 하지만 petrotetrayndiol A의 처리를 통해 p53 발현 변화를 관찰한 결과 petrotetrayndiol A의 농도가 증가할수록 mutant p53 단백질 발현이 증가함을 확인하였다. 그리고 mutant p53과 관련 없이 G2/M arrest에 관여하는 p21 단백질의 경우도 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다(Figure 17). 이것은 petrotetrayndiol A에 의한 apoptosis 유도 작용이 p53-independent 유도작용 결과로 생각된다(Figure 21).

세포분열에는 여러 종류의 cyclin들과 cdk들 및 그들의 저해제에 해당하는 CKI들 외 여러 종류의 전사인자들이 관여하고 있는데, 특히 G2/Mr1에 중요한 역할을 하는 cyclin 및 cdk는 cyclin B 및 cdc2이며, G1기의 경우는 D-type cyclin과 cdk2, cdk4 및 pRB 등이다.

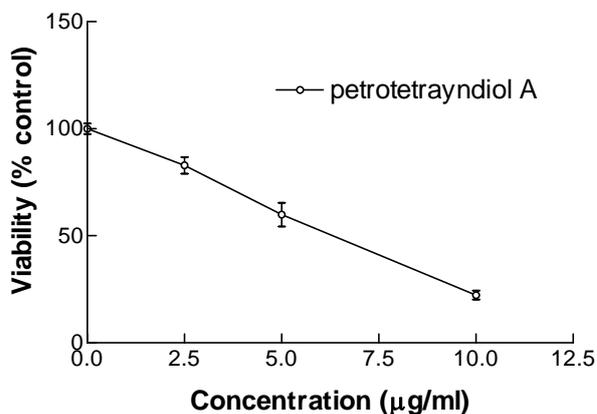


Figure 15. Cytotoxicity of petrotetrayndiol A assessed by MTT assay. Cells were treated with different concentration of petrotetrayndiol A for 48 hrs and the effects of petrotetrayndiol A on cell growth was examined by MTT assay. Results are means \pm S.D. of three experiments.

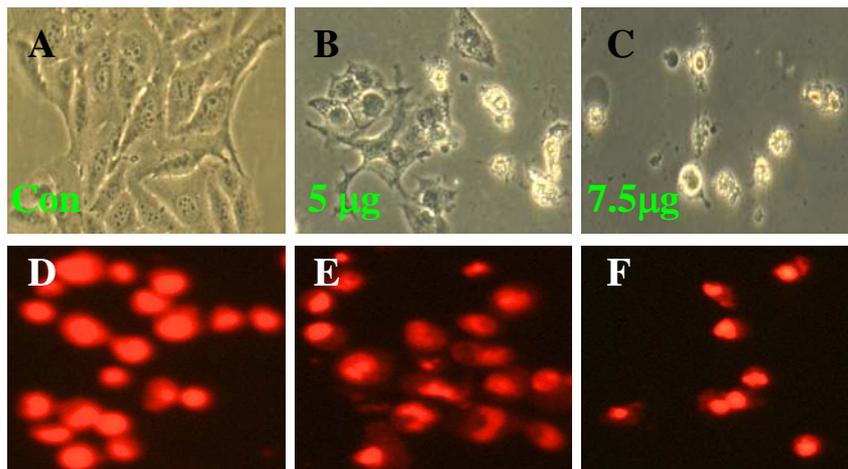


Figure 16. Morphological analysis

of petrotetrayndiol A treated SK-MEL-2 cells by the DNA specific fluorescent dye PI. Cells were treated with petrotetrayndiol A for 48 hrs. Cells were stained with PI after treatment with petrotetrayndiol A. A and D, control; B and E, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ petrotetrayndiol A treated SK-MEL-2 cells; C and F, 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ petrotetrayndiol A treated SK-MEL-2 cells apoptotic body and fragments with small, solid spheres of condensed DNA were shown in the pannel F.

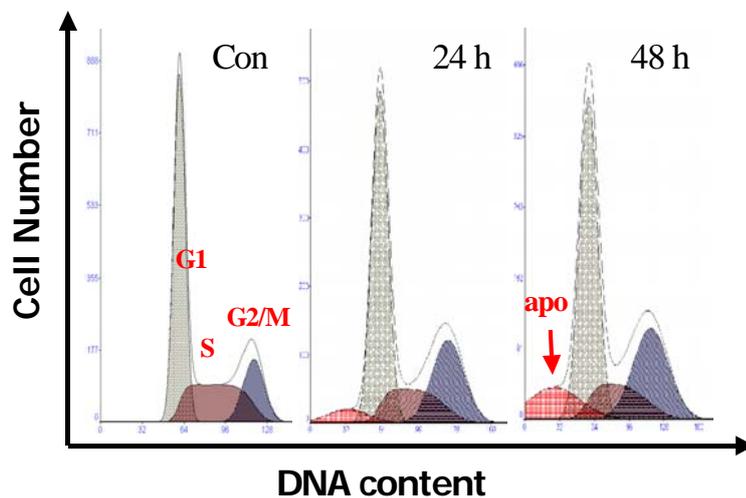


Figure 17. Cell cycle analysis of petrotetrayndiol A in SK-MEL-2 cells by flow cytometry. Cells were treated without or with low dose of petrotetrayndiol A (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 and 48 h.

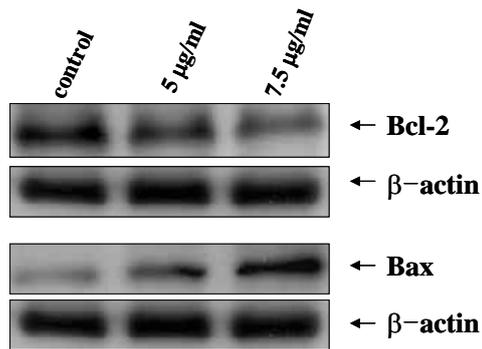


Figure 18. Western blot analysis of Bcl-2 and Bax. The protein levels were determined by western blotting in SK-MEL-2 cells. The expression level of Bcl-2 was down-regulated and the Bax was up-regulated after treatment with petrotetrayndiol A.

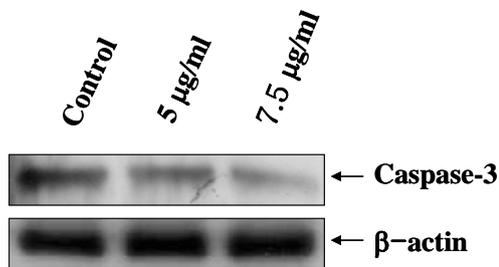


Figure 19. Western blot analysis of caspase-3. Activation of caspase-3 on petrotetrayndiol A-treated SK-MEL-2 cells. The protein levels were determined by Western blotting. After treatment with petrotetrayndiol A, caspase-3 was decreased in pro-caspase-3 on SK-MEL-2 cells after treatment with petrotetrayndiol A.

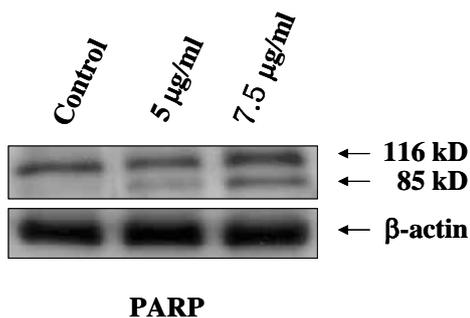


Figure 20. Western blot analysis of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). Specific cleavage of PARP on petrotetrayndiol A-treated SK-MEL-2 cells. The protein levels were determined by western blotting. After treatment with petrotetrayndiol A, PARP (116 kD) was cleaved into 85 kD fragment on SK-MEL-2 cells after treatment with petrotetrayndiol A.

Table 13. Effect of petrotetrayndiol A on the cell cycle distribution in human skin cancer SK-MEL-2 cells. DNA flow cytometric cell cycle analysis was performed comparing untreated control cells with those treated in petrotetrayndiol A for 24 and 48 h.

Time (h)	% of cells			
	Sub G1	G1	S	G2/M
Con	0.23	52.7	29.7	17.6
24	3.2	47.1	22.7	26.9
48	13.4	45.0	14.2	28.2

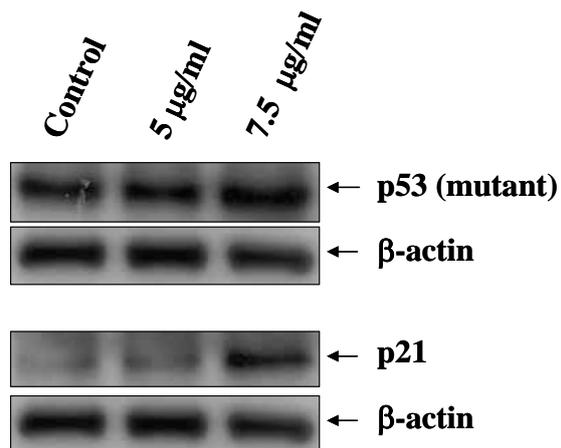


Figure 21. Western blot analysis of p53 and p21^{WIP/CIP1}. The protein levels were determined by western blotting in SK-MEL-2 cells. The expression levels of p53 and p21^{WIP/CIP1} proteins were up-regulated after treatment with petrotetrayndiol A.

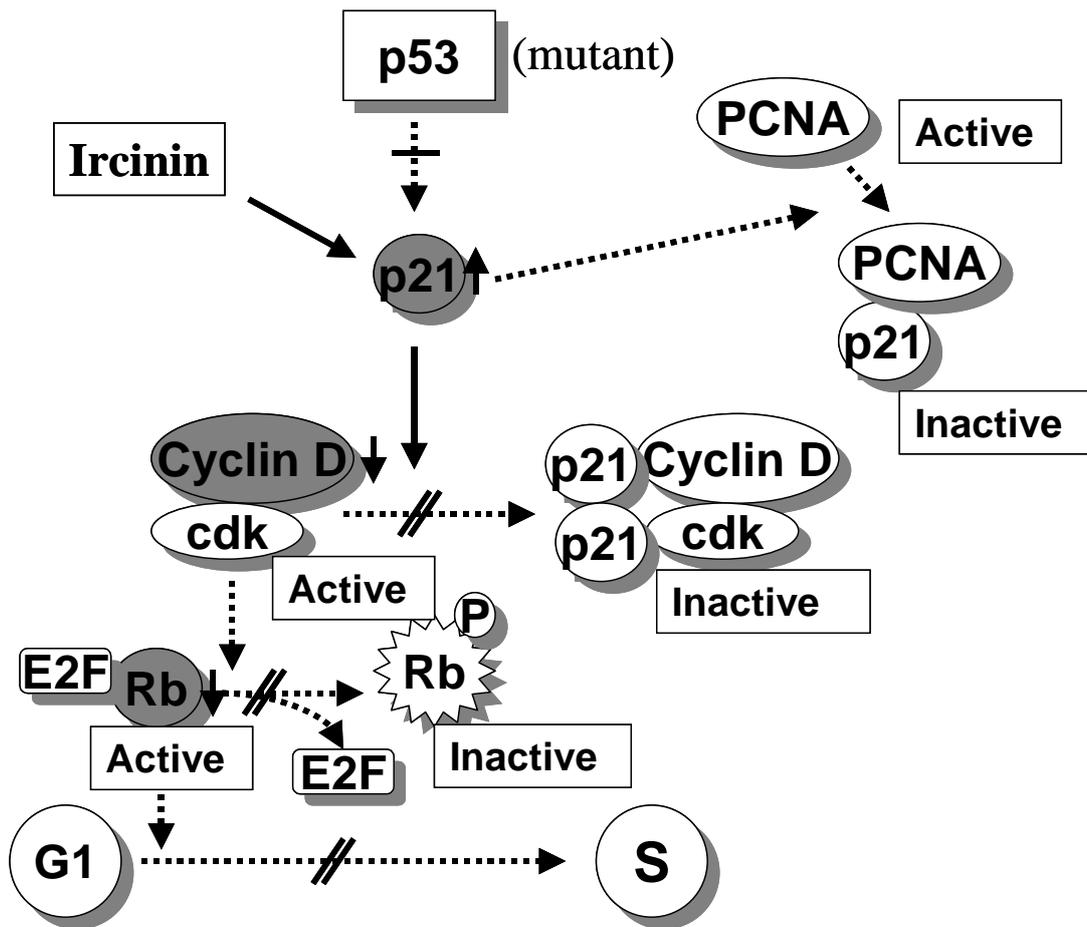


Figure 22. Proposed action mechanism of irlcinin-1 in SK-MEL-2 cells. It is possible that irlcinin-1 may induce cell cycle regulation and apoptosis via a p53-independent p21^{WIP/CIP1} up-regulation. The up-regulated p21^{WIP/CIP1} protein stop the activation of cyclin D-cdk4 complex. Therefore, the E2F-Rb complex could not be activated through the phosphorylation of Rb protein. Moreover, the expression level of Rb protein was also down-regulated after the treatment of irlcinin.

실험재료 및 방법

1. 세포주 배양 조건 및 검색 시료

인체 간암세포주 HepG2와 Hep3B, 인체피부암세포주인 SK-MEL-2 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 이 세포는 10% fetal bovine serum 및 50 mg/ml gentamycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 등이 혼합된 RPMI 1640 배지 (GibcoBRL Grand Island, NY, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 검색 시료 중 ircinin-1은 *Sarcotragus* sp.에서, petrotetrayndiol A는 *Petrosia* sp.에서 부산대학교 약학과 정지형 교수 연구실에서 분리한 것을 제공 받아서 ice-EtOH에 적정 농도로 희석하여 냉동 보관하면서 사용하였다.

2. 항체

Western blot analysis나 immunoprecipitation를 위해 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA; cyclin A, cyclin D1, cyclin E, cdk 2, 4, p21, p27, p53, bax 및 PARP), PharMingen (San Diego, CA, USA; Rb) 및 American Life Science (Arlington Heights, IL, USA; peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin)에서 구입하였다.

3. 성장억제 평가

1) MTT assay

세포에 대한 독성을 보기 위하여 96 well plat에 9.6×10^3 cells/ml을 깔고 각 세포에 원하는 농도로 물질을 가하여 24 시간 동안 배양한 후, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma] 용액을 가하여 4시간 동안 반응시킨 후 상등액을 걸어내고 DMSO : EtOH = 1 : 1 용액을 각 well에 가해 형성된 formazan을 용해하여 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Trypan blue exclusion

세포의 성장 억제 실험을 위해 시료처리군과 대조군을 일정 기간 배양한 뒤 trypsin 처리 후 암세포를 채취하고 생존한 세포의 수를 0.5% trypan blue in 0.85% saline 용액과 1:1로 희석하고 hemocytometer를 이용하여 세포 수를 계수하였다.

4. 형태학적 평가

1) 광학현미경

세포를 4% paraformaldehyde로 고정하고 4 g/ml Hoechst 33342로 30분간 염색 하여 핵의 모양 변화를 형광현미경으로 관찰하였다.

2) PI 염색

준비된 세포들을 PBS로 2회 수세한 후 70% EtOH 고정액으로 10분간 고정하였다. 고정 후, 세포들을 수세한 후 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase-free RNase에 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석된 propidium iodide (PI, Sigma) 용액으로 4°C 암하에서 염색하였다. 이를 다시 PBS로 수세하여 건조시킨 후 형광현미경 하에서 핵의 형태를 비교하였다.

5. 암 세포주기 분석

정상 및 Fg 6563111 (*sarcotragus sp.*)이 처리된 배지에서 배양한 암 세포들을 0.02% EDTA가 함유된 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세한 후, 4°C에서 30분간 70% ethanol에 고정시키고 1% bovine serum albumin (BSA)-PBS로 washing하였다. RNase A를 포함한 PBS로 다시 suspension해서 4°C, 30분간 처리하고 PBS로 washing한 다음 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, Sigma) 용액을 가해 암소에서 4°C, 30분간 배양한 뒤 다시 PBS로 washing하고 Nytex mesh를 이용하여 filter하였다. 그리고 DNA content는 flow cytometry를 이용해서 분석하였다.

6. Western blot analysis

정상 및 *sarcotragus sp.*이 처리된 SK-MEL-2 세포를 PBS 용액으로 씻은 후, 4°C에서 TNN lysis buffer [40 mM Tris (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.1 mM sodium orrthovanadate, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin]를 이용하여 세포를 용해한 후, 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포내 잔사물을 분리시켰으며, 단백질 농도는 BCA reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 동일량의 단백질을 12, 13 또는 15% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시킨 후 electroblotting으로 nitrocellulose membrane (Scheicher & Schull, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. TNE buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM EDTA) 및 5% 무지방 우유가 함유된 TNE를 이용하여 항체들과의 반응과 수세를 반복하였으며, 특정 단백질을 enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham)을 이용하여 검출하였다. 일차항체로는 anti-cyclin D polyclonal antibody, anti-cdk2 polyclonal antibody, anti-cdk4 polyclonal antibody, anti-p21 monoclonal antibody, anti-pRb monoclonal antibody 외에 여러 가지 first antibody를 사용하였다.

5) Petrotetrayndiol A에 의한 G2/M arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사

본 연구에서는 petrotetrayndiol A이 처리된 인체 피부암 세포주에 대한 apoptosis와 세포주기 억제효과에 따른 작용기전을 조사하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 petrotetrayndiol A를 24 시간 동안 처리한 후 genomic DNA를 분리하여 핵 내 DNA의 단편화 여부를 조사하였다. Figure 23A에서 볼 수 있듯이 정상조건에서 자란 핵 내 DNA에 비하여 petrotetrayndiol A이 처리된 세포에서 분리된 DNA는 처리 농도 의존적으로 단편화가 유도되었음을 알 수 있었다. 또한, Figure 23B에서와 같이 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 조사한 결과 시간 의존적으로 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도가 증가되었다.

다음은 apoptosis 유발에 핵심적인 역할을 하는 caspase의 활성화를 조사한 결과에서 처리 농도 의존적으로 caspase-3, -9의 활성이 동시에 증가됨을 확인할 수 있었다. 특히 caspase-9보다 caspase-3의 활성이 2배 정도 강하게 나타났다 (Figure 24). 한편 caspase의 활성 조절인자인 IAPs 단백질은 caspase와 직접적인 결합을 통하여 그들의 활성을 억제할 수 있는데 Figure 25A에서 볼 수 있듯이 cIAP-1의 특이적인 농도 의존적인 감소를 관찰할 수 있었다 (Figure 25B). 또한 caspase 표적단백질 중의 하나인 PLC- γ 1의 단백질의 파괴 여부를 Western blot으로 확인한 결과 petrotetrayndiol A의 농도가 증가할수록 PLC- γ 1이 200 kD의 크기에서 약 62 kD으로 잘려짐을 확인할 수 있었다 (Figure 26).

진핵세포의 세포분열은 여러종류의 cyclin들과 Cdk들 및 그들의 저해제에 해당하는 CKI들의 여러 종류의 전사 인자들이 관여하고 있는데, 특히 G2/M기에 중요한 역할을 하는 cyclin B1 및 Cdc2이 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 준비된 대조군 및 petrotetrayndiol A이 처리된 배지에서 자란 암세포들로부터 동량의 단백질을 전기영동으로 분리한 다음 특정 항체를 사용하여 Western blot analysis를 실시하였다. Figure 27A의 결과에서 볼 수 있듯이 cyclin B1과 Cdc2의 단백질 수준이 petrotetrayndiol A의 처리 농도에 따라 점차 감소함을 볼 수 있었다. 이는 RT-PCR의 결과에서 알 수 있듯이 전사수준에서 조절됨을 확인하였다 (Figure 27B). 또한 immunoprecipitation assay를 이용하여 Cdk 2 및 Cdc2의 활성을 조사한 결과 petrotetrayndiol A에 의해 유도된 p21 단백질이 Cdk2 및 Cdc2와 강하게 결합되어 있음을 확인하였다 (Figure 28A, B). 즉 petrotetrayndiol A에 의한 p21의 발현 증가가 Cdk의 활성을 저해함으로써 암세포 증식이 억제되었음을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 petrotetrayndiol A는 G2/M기 전이를 억제하였으며, 이는 p53 비의존적 p21의 발현이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 또한 petrotetrayndiol A에 의한 암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며 이는 Bcl-2 family의 발현 교란에 의한 caspase 활성화와 직접 연관있음을 알 수 있었다 (Figure 29).

실험재료 및 방법

1. 세포주 배양 조건 및 검색 시료

인체피부암세포주인 SK-MEL-2 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 이 세포는 10% fetal bovine serum 및 50 mg/ml gentamycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 등이 혼합된 RPMI 1640 배지(GibcoBRL Grand Island, NY, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 검색시료 중 petrotetrayndiol A는 부산대학교 약학과 정지형 교수 연구실에서 분리한 것을 제공 받아서 ice-EtOH에 적정 농도로 희석하여 냉동 보관하면서 사용하였다.

2. 항체

Western blot analysis나 immunoprecipitation를 위해 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA; cyclin B1, cdc2, PLC- γ 1, p21, cIAP-1, cIAP-2) 및 American Life Science (Arlington Heights, IL, USA; peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin)에서 구입하였다.

3. Western blot analysis

정상 및 petrotetrayndiol A이 처리된 SK-MEL-2 세포를 PBS 용액으로 씻은 후, 4°C에서 TNN lysis buffer [40 mM Tris (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.1 mM sodium orrthovanadate, 2 μ g/ml aprotinin]를 이용하여 세포를 용해한 후, 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포내 잔사물을 분리시켰으며, 단백질 농도는 BCA reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시킨 후 electroblotting으로 nitrocellulose membrane (Scheicher & Schull, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. TNE buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM EDTA) 및 5% 무지방 우유가 함유된 TNE를 이용하여 항체들과의 반응과 수세를 반복하였으며, 특정 단백질을 enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham)을 이용하여 검출하였다.

4. DNA fragmentation analysis

정상 및 petrotetrayndiol A이 처리된 암세포를 수집하여 2,000 rpm에서 6분간 2회 PBS로 수세한 다음 상층액을 버린 나머지 pellet에 0.8 ml의 lysis buffer [1 M tris buffer (pH 7.4), 0.5 M EDTA (pH 8.0), TRITON X-100 (T8787, Sigma)]를 첨가한 후 실온에서 1 시간동안 방치하였다. 4°C에서 14,000 rpm으로 20 분간 원심분리 한 후 상층액에 proteinase K (final con. of 0.5 mg/ml)를 넣고 50°C에서 3 시간동안 incubation하였다. 그 후

phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Sigma)을 넣고 아래위로 흔들어서 뿌옇게 되도록 섞는다. 상온 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 새 e-tube에 옮겨 담고 5 M NaCl과 100% isopropanol 넣고 잘 섞어 준 다음 -20°C 1 시간동안 incubation 한 다음 4°C 14,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 분리된 DNA을 1.5% agarose gel에 loading 하여 전기영동한 후 EtBr로 염색하고 UV하에서 DNA fragmentation을 관찰하였다.

5. 암 세포주기 분석

정상 및 petrotetrayndiol A이 처리된 배지에서 배양된 암 세포들을 0.02% EDTA가 함유된 PBS 용액으로 수세한 후, 4°C에서 30분간 70% ethanol에 고정시키고 1% bovine serum albumin (BSA)-PBS로 수세하였다. RNase A를 포함한 PBS로 다시 suspension해서 4°C, 30분간 처리하고 PBS로 수세한 다음 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, Sigma) 용액을 가해 암소에서 4°C, 30분간 배양한 뒤 다시 PBS로 수세하고 Nytex mesh를 이용하여 filter 하였다. 그리고 DNA content는 flow cytometry를 이용해서 분석하였다.

6. RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

정상 및 petrotetrayndiol A이 처리된 암세포를 PBS로 수세하고 TRIzol reagent (Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1 시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 정량한 RNA를 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10 \times buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 *Taq* DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위해 1 \times TAE buffer로 만든 1% agarose gel 전기영동 한 후 EtBr (Sigma)에 염색하여 UV하에서 확인하였다.

7. Immunoprecipitation assay

정상 및 petrotetrayndiol A가 처리된 세포들을 수집한 다음 protein을 정량한 후, protein A-Sepharose (Sigma)를 넣고 4°C에서 4 시간 동안 rotary shaker를 이용하여 incubation시켰다. 1,000 rpm에서 2분간 spindown 시킨다음 상층액을 버린 후 4회 수세한 다음 1,000 rpm에서 2 분간 다시 spindown 시켰다. 마지막 상층액을 버리고 1 \times SDS를 30 μ l을 넣어 가열 후 전기영동과 Western blot analysis를 실시하였다.

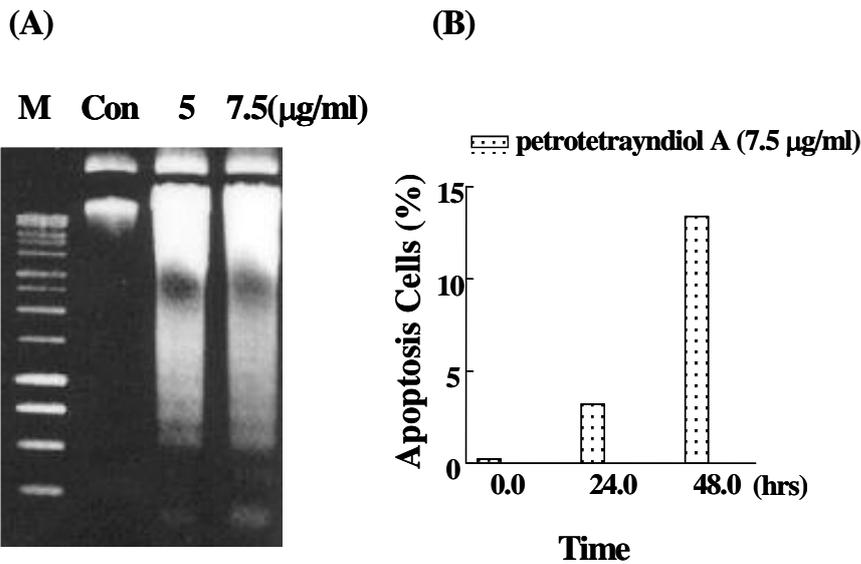


Figure 23. Induction of apoptosis by petrotetrayndiol A treatment in SK-MEL-2 cells. Cells were treated with different concentration of petrotetrayndiol A as indicated for 24 h. DNA was isolated and separated on a 1.5% agarose gel (A). Cells were treated with petrotetrayndiol A for indicated times. Cells were then fixed and stained with PI. Apoptotic sub-G1 cells were determined by a DNA flow cytometry (B).

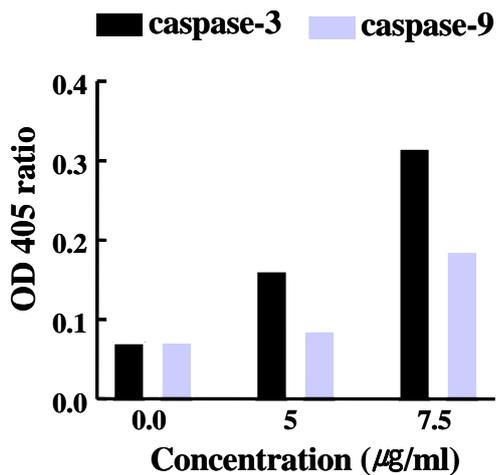


Figure 24. Activation of caspase-3 and -9 by petrotetrayndiol A treatment in SK-MEL-2 cells. The graph represents the increase of in vitro caspase-3 and caspase-9 activity after treatment with petrotetrayndiol A. Each point represents the means of two independent experiments.

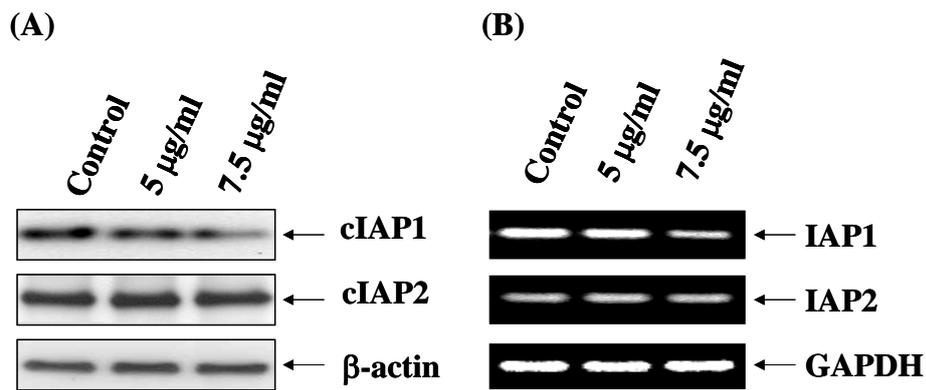


Figure 25. Effect of petrotetrayndiol A on cIAP-1 and cIAP-2 proteins and mRNA expression in SK-MEL-2. (A) Cells were incubated with petrotetrayndiol A for 24 h, lysed and cellular protein were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. The membranes were probed with the anti-IAPs antibodies. Protein were visualized using ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed using cIAP-1 and cIAP-2 primer. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

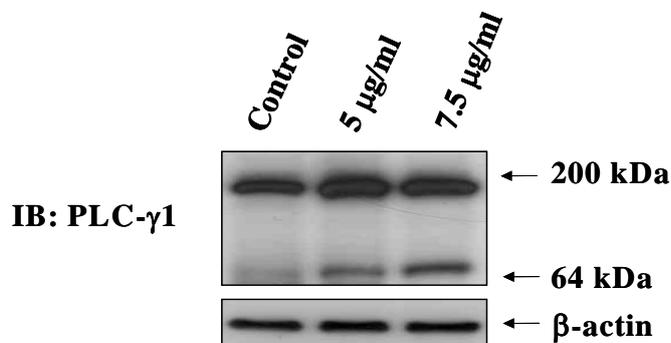


Figure 26. Cleavage of PLC-1 protein during petrotetrayndiol A-mediated apoptosis in SK-MEL-2. Following treatment with different concentration of petrotetrayndiol A for 24 h, equal intracellular proteins were resolved on 12% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were visualized by Western blotting using anti-PLC-γ1 antibodies and ECL detection. Actin was used as an internal control.

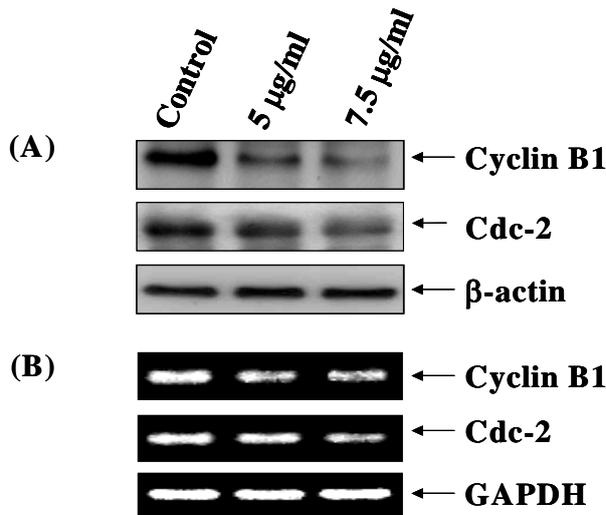


Figure 27. Effect of petrotetrayndiol A on cyclin B1 and cdc-2 proteins and mRNA expression in SK-MEL-2. (A) Cells were incubated with petrotetrayndiol A for 24 h, lysed and cellular protein were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. The membranes were probed with the anti-cyclin B1 and anti-cdc-2 antibodies. Protein were visualized using ECL detection system. (B) Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed using cyclin B1 and Cdc2 primer. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

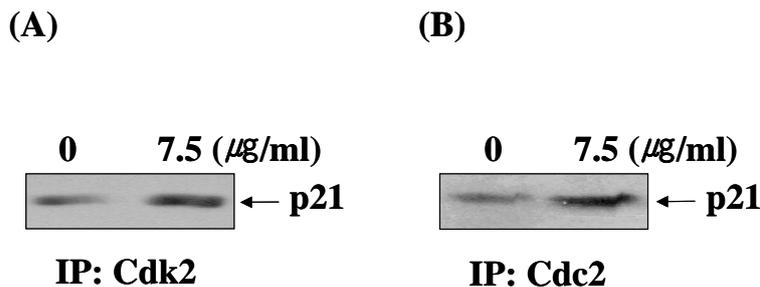


Figure 28. Enhanced association of Cdks and p21 by petrotetrayndiol A treatment in SK-MEL-2 cells. Total cell lysates (0.5 mg of protein) from control cells and cells treated with petrotetrayndiol A for 24 hr were immunoprecipitated with anti-Cdk 2 antibody and anti-Cdc 2 antibody. Immunocomplex were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto nitrocellulose membrane. p21^{WAF1/CIP1} protein levels were detected with anti-p21^{WAF1/CIP1} antibody and ECL detection system.

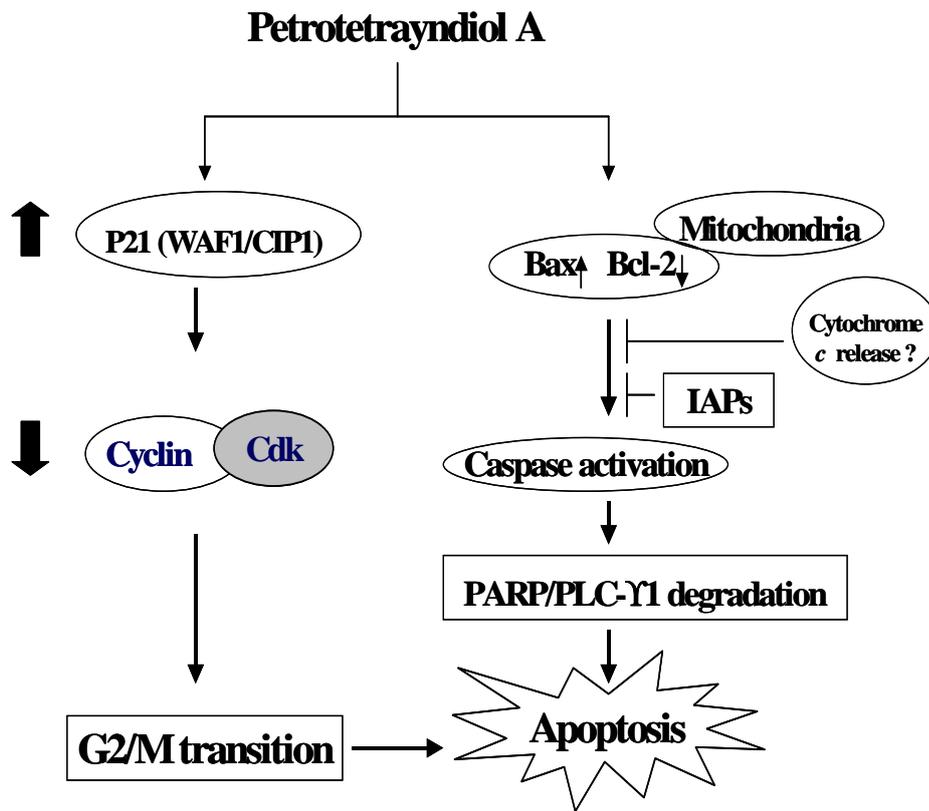


Figure 29. Proposed schematic model for petrotetrayndiol A-mediated growth inhibition and apoptosis in SK-MEL-2 cells.

6) Ircinin-1에 의한 G1 arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사

본 연구에서는 ircinin-1이 처리된 인체 피부암 세포주에 대한 apoptosis와 세포주기 억제효과에 따른 작용기전을 조사하였다. 이를 위하여 다양한 농도의 ircinin-1를 24 시간 동안 처리한 후 genomic DNA를 분리하여 핵 내 DNA의 단편화 여부를 조사하였다. Figure 30A에서 볼 수 있듯이 정상조건에서 자란 핵 내 DNA에 비하여 ircinin-1이 처리된 세포에서 분리된 DNA는 처리 농도 의존적으로 단편화가 유도되었음을 알 수 있었다. 또한, Figure 30B에서와 같이 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 조사한 결과 시간 의존적으로 sub-G1 기에 속하는 세포들의 빈도가 증가되었다.

다음은 apoptosis 유발에 핵심적인 역할을 하는 caspase의 활성화를 조사한 결과에서 처리 농도 의존적으로 caspase-3, -9의 활성이 동시에 증가됨을 확인할 수 있었다 (Figure 31A). 특히 caspase-9보다 caspase-3의 활성이 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 2배 정도 강하게 나타났다 (Figure 31B). 한편 caspase의 활성 조절인자인 IAPs 단백질은 caspase와 직접적인 결합을 통하여 그들의 활성을 억제할 수 있는데 Figure 32A에서 볼 수 있듯이 cIAP-1의 특이적인 농도 의존적인 감소를 관찰할 수 있었다 (Figure 32B).

진핵세포의 세포분열은 여러종류의 cyclin들과 Cdk들 및 그들의 저해제에 해당하는 CKI들의 여러 종류의 전사 인자들이 관여하고 있는데, 특히 G1기에 중요한 역할을 하는 cyclins 및 Cdk이 미치는 영향을 RT-PCR를 이용하여 전사 수준에서 조사한 결과 Figure 33에 나타난 바와 같이 cyclinD1과 Cdk2, Cdk4 그리고 Cdk6 가 ircinin-1를 처리한 농도에 따라 점차 감소함을 볼 수 있었다. 또한 immunoprecipitation assay를 이용하여 E2F1 및 PCNA의 활성을 조사한 결과 ircinin-1에 의해 억제된 pRb 인산화는 전사조절인자인 E2F1과 강한 결합을 함으로서 S기 진입에 연관된 유전자 발현이 억제될 것으로 생각되어진다 (Figure 34A, B). 그리고 ircinin-1에 의해 유도된 p21은 세포증식조절에 중요한 PCNA와 강하게 결합하여 PCNA의 역할을 억제한다 (Figure 34C, D).

이상의 결과에서 알 수 있듯이 ircinin-1는 G1기 전이를 억제하였으며, 이에 p53 비의존적 p21의 발현이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 또한 ircinin-1에 의한 암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며 이는 Bcl-2 family의 발현교란에 의한 caspase 활성화와 직접 연관있음을 알 수 있었다.

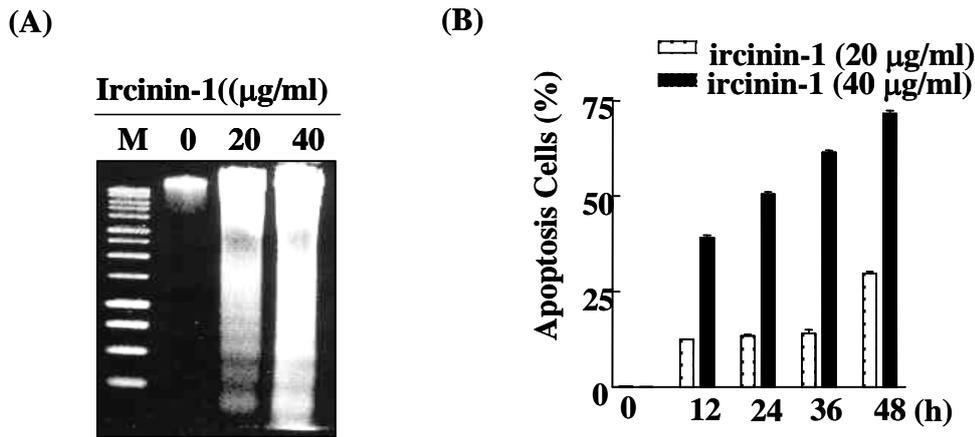


Figure 30. Induction of apoptosis by ircinin-1 treatment in SK-MEL-2 cells. Cells were treated with different concentration of ircinin-1 as indicated for 24 h. DNA was isolated and separated on a 1.5% agarose gel (A). Cells were treated with ircinin-1 for indicated times. Cells were then fixed and stained with PI. Apoptotic sub-G1 cells were determined by a DNA flow cytometry (B).

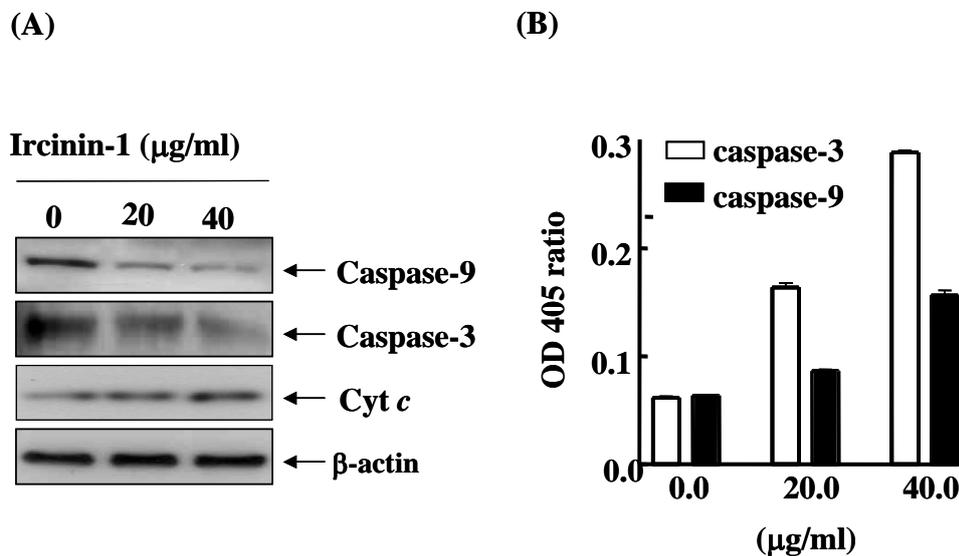


Figure 31.

Activity of caspase-3, caspase-9 and expression levels of apoptosis related proteins in SK-MEL-2 cells. Expression of caspase-3, caspase-9, and *cyt c*, were analyzed by Western blot. Cell lines treated with the respective 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ dose of ircinin-1 for 24 h. *In vitro* activity of caspase-3 and caspase-9 in SK-MEL-2 cells was increased. Values represent means \pm SD of triplicate.

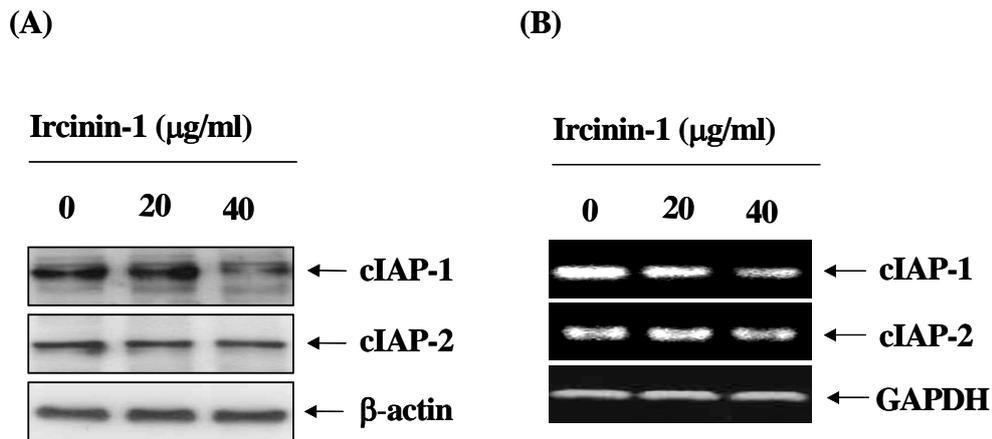


Figure 32. Effect of irdinin-1 on cIAP-1 and cIAP-2 proteins and mRNA expression in SK-MEL-2. (A) Cells were incubated with irdinin-1 for 24 h, lysed and cellular protein were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. The membranes were probed with the anti-IAPs antibodies. Protein were visualized using ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed using cIAP-1 and cIAP-2 primer. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

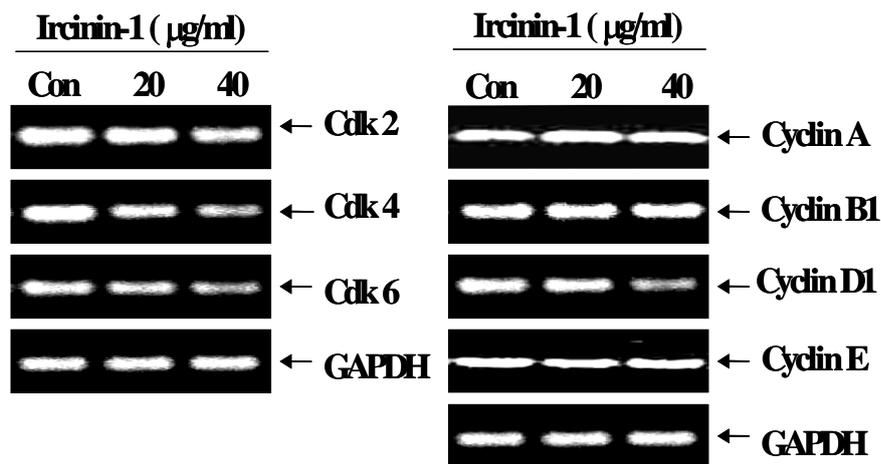


Figure 33. Effect of irdinin-1 on mRNA expression of Cdk and cyclins in SK-MEL-2 cells. (A, B) Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed using Cdk and cyclins primer. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

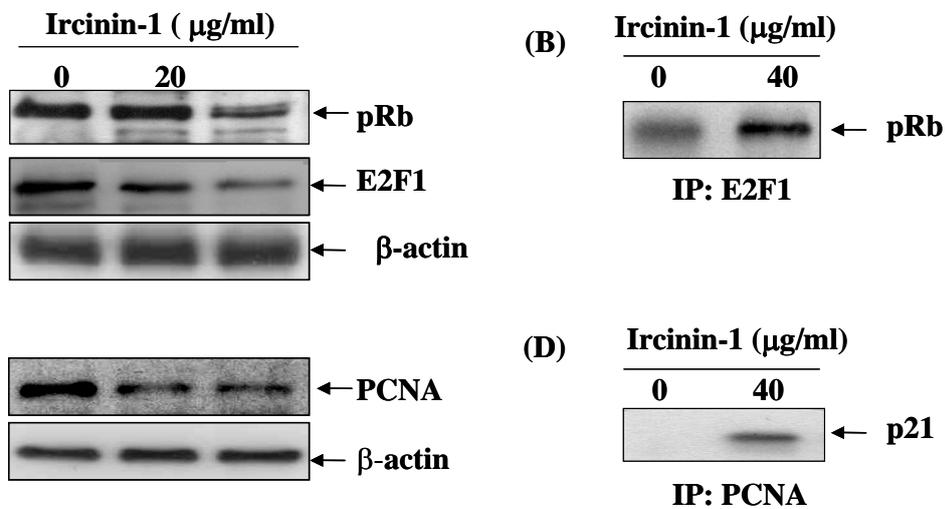


Figure 34. Effect of ircinin-1 on the levels of pRb, E2F1 and PCNA protein in SK-MEL-2 cells. Cells were incubated with ircinin-1 for 24 h, lysed and cellular protein were separated by 12 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membrane. The membranes were probed with the (A, C) anti-pRb, anti-E2F1 and anti-PCNA antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B, D) Total cell lysates (0.5 mg of protein) from control cells and cells treated with ircinin-1 for 24 hr were immunoprecipitated with anti-E2F-1 antibody and anti PCNA antibody. Immunocomplex were separated by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and probed with anti-pRb and anti-p21 antibody. Protein were detected by ECL detection.

실험재료 및 방법

1. 세포주 배양 조건 및 검색 시료

인체피부암세포주인 SK-MEL-2 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 이 세포는 10% fetal bovine serum 및 50 mg/ml gentamycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) 등이 혼합된 RPMI 1640 배지(GibcoBRL Grand Island, NY, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 검색시료 중 petrotetrayndiol A는 부산대학교 약학과 정지형 교수 연구실에서 분리한 것을 제공 받아서 ice-EtOH에 적정 농도로 희석하여 냉동 보관하면서 사용하였다.

2. 항체

Western blot analysis나 immunoprecipitation를 위해 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA; cyclin A, -B1, -D1, -E, Cdk2, Cdk4, Cdk6, PCNA, E2F1, pRB, cIAP-1, cIAP-2) 및 American Life Science (Arlington Heights, IL, USA; peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin)에서 구입하였다.

3. Western blot analysis

정상 및 ircinin-1이 처리된 SK-MEL-2 세포를 PBS 용액으로 씻은 후, 4°C에서 TNN lysis buffer [40 mM Tris (pH 8.0), 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.1 mM sodium orrthovanadate, 2 µg/ml aprotinin]를 이용하여 세포를 용해한 후, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포내 잔사물을 분리시켰으며, 단백질 농도는 BCA reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 동일량의 단백질을 sodium dodecyl sulfat (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시킨 후 electroblotting으로 nitrocellulose membrane (Scheicher & Schull, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. TNE buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM EDTA) 및 5% 무지방 우유가 함유된 TNE를 이용하여 항체들과의 반응과 수세를 반복하였으며, 특정 단백질을 enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham)을 이용하여 검출하였다.

4. DNA fragmentation analysis

정상 및 ircini-1이 처리된 암세포를 수집하여 2,000 rpm에서 6분간 2회 PBS로 수세한 다음 상층액을 버린 나머지 pellet에 0.8 ml의 lysis buffer [1 M tris buffer (pH 7.4), 0.5 M EDTA (pH 8.0), TRITON X-100 (T8787, Sigma)]를 첨가한 후 실온에서 1 시간동안 방치하였다. 4°C에서 14,000 rpm으로 20 분간 원심분리 한 후 상층액에 proteinase K (final con. of 0.5 mg/ml)를 넣고 50°C에서 3 시간동안 incubation하였다. 그 후 phenol:chloroform:isoamyl

alcohol (Sigma)을 넣고 아래위로 흔들어서 뿌옇게 되도록 섞는다. 상온 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 새 e-tube에 옮겨 담고 5 M NaCl과 100% isopropanol 넣고 잘 섞어 준 다음 -20°C 1 시간동안 incubation 한 다음 4°C 14,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 분리된 DNA를 1.5% agarose gel에 loading 하여 전기영동한 후 EtBr로 염색하고 UV하에서 DNA fragmentation을 관찰하였다.

5. 암 세포주기 분석

정상 및 ircinin-1이 처리된 배지에서 배양된 암 세포들을 0.02% EDTA가 함유된 PBS 용액으로 수세한 후, 4°C에서 30분간 70% ethanol에 고정시키고 1% bovine serum albumin (BSA)-PBS로 수세하였다. RNase A를 포함한 PBS로 다시 suspension해서 4°C, 30분간 처리하고 PBS로 수세한 다음 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, Sigma) 용액을 가해 암소에서 4°C, 30분간 배양한 뒤 다시 PBS로 수세하고 Nytex mesh를 이용하여 filter하였다. 그리고 DNA content는 flow cytometry를 이용해서 분석하였다.

6. RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

정상 및 ircinin-1이 처리된 암세포를 PBS로 수세하고 TRIzol reagent (Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1 시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 정량한 RNA를 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10 \times buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)로 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위해 1 \times TAE buffer로 만든 1% agarose gel 전기영동한 후 EtBr (Sigma)에 염색하여 UV하에서 확인하였다.

7. Immunoprecipitation assay

정상 및 ircinin-1이 처리된 세포들을 수집한 다음 protein을 정량한 후, protein A-Sepharose (Sigma)를 넣고 4°C에서 4 시간 동안 rotary shaker를 이용하여 incubation시켰다. 1,000 rpm에서 2분간 spindown 시킨다음 상층액을 버린 후 4회 수세한 다음 1,000 rpm에서 2 분간 다시 spindown 시켰다. 마지막 상층액을 버리고 1 \times SDS를 30 μ l을 넣어 가열 후 전기영동과 Western blot analysis를 실시하였다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

1. 연구개발목표의 달성도

목 표	달 성 도(%)	내 용
● 암세포 독성물질 5종 이상 분리정제	100	25종의 신규활성물질 분리
● 암세포 독성물질의 구조규명	100	25종 신규활성물질 구조규명 완료
● 5종 인체암세포에 대한 활성물질의 억제활성 평가	100	인체 폐암, 중추신경계암, 결장암, 피부암, 난소암에 대한 활성평가 완료
● Ircinin-1의 HepG2 및 Hep3B에 대한 세포주기 조절효과 평가	100	조절효과 평가완료
● Petrotetrayndiol A의 SK-MEL-2 에 대한 세포주기 억제효과 조사	100	억제효과 검색완료
● Petrotetrayndiol A에 의한 G2/M arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사	100	조사완료
● Ircinin-1에 의한 G1 arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사	100	조사완료

2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
암세포독성물질 5종 이상 분리여부	우수
활성물질 구조규명 완료여부	우수
5종 인체암 활성평가 완료여부	우수
HepG2 및 Hep3B 조절효과평가 여부	우수
SK-MEL-2 억제효과 검색여부	우수
Petrotetrayndiol A에 의한 G2/M arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사	우수
Ircinin-1에 의한 G1 arrest와 apoptosis 유발에 대한 작용 메커니즘 연구와 mRNA 발현의 조사	양호

⑤ 국내외 전문학술지 논문게재(전문학술지명을 세부적으로 전부(건별로)기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록)-본 연구과제 수행결과로서 발표하거나 게재한 것만 기재할 것

- 1) Yonghong Liu, Bok Hee Bae, Naseer Alam, Jongki Hong, Chung Ja Sim, Chong-O. Lee, Kwang Sik Im, and Jee H. Jung (2001) New Cytotoxic Sesterterpenes from the Sponge *Sarcotragus* species, *J. Nat. Prod.* (미국) 64, 1301-1304 (SCI)
- 2) Liu, Y.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Im, K. S.; Kim, N. D.; Choi, J. S.; Jung, J. H. (2002) Cytotoxic Pyrrolo- and Furanosesterterpenoids from the Sponge *Sarcotragus* Species, *J. Nat. Prod.* (미국) 65, 1307-1314 (SCI),
- 3) Liu, Y.; Lee, C.-O.; Hong, J.; Kim, N. D.; Jung, J. H. (2002) Cyclitol Derivatives from the Sponge *Sarcotragus* Species, *Bull. Korean Chem. Soc.* 23, 1467-1469 (SCI)
- 4) Liu, Y.; Mansoor, T. A.; Hong, J. K.; Lee, C.-O.; Sim, C. J.; Im, K. S.; Kim, N. D.; Jung, J. H., New cytotoxic sesterterpenoids and norseserteprenoids from two sponges of the genus *Sarcotragus*, *J. Nat. Prod.*, 2003, 66, published on web.

⑥ 학술회의 논문발표(학술회의명을 세부적으로 전부(건별로)기록하고, 국외인 경우 반드시 국명을 기록)-본 연구과제 수행결과로서 발표한 것만 기재할 것

국외

- 1) Liu, Y.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Im, K. S.; Kim, N. D.; Choi, J. S.; Jung, J. H., Cytotoxic Terpenoids from the Marine Sponge *Sarcotragus* Species, 2002, 7, Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, New Brunswick, U.S.A.
- 2) Choi Hye Joung, Choi Young Hyun, Jung, J. H., Kim Nam Deuk
Ircinin-1 from the sponge *sarcotragus* sp. induces of apoptosis and cell proliferation in SK-MEL-2 cells. 2003, 9월 25-27 p243, Sixty-Second Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, Japan.

국내

- 1) Liu, Y.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Im, K. S.; Jung, J. H., Cytotoxic Pyrrolo- and Furano-sesterterpenes from the Sponge *Sarcotragus* species, 2001, 10. 추계약학회, 숙명여대, 서울.
- 2) Jung, J. H., Bioactive Compounds from Korean Marine Invertebrates, 천연물화학

심포지움, 2001, 11, 경희대, 서울.

- 3) Liu, Y.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Im, K. S.; Kim, N. D.; Choi, J. S.; Jung, J. H., Furanosesterterpene and Lipids from *Sarcotragus* Sponge, 2002, 4, 춘계약학회, 충북대.
- 4) Liu, Y.; Hong, J.; Lee, C.-O.; Im, K. S.; Kim, N. D.; Choi, J. S.; Jung, J. H., New Cytotoxic Terpenoids from the Marine Sponge *Sarcotragus* Species, 2002, 8, 한중일 심포지움, 롯데호텔, 대전.
- 5) Im Eun Ok, Choi Hye Joung, Jung Jee Hyung, Choi Young Hyun, and Kim Nam Deuk (2001) New acetylene compound, montiporyne A, from the stony coral *Montipora* sp. induced apoptosis in human skin cancer cells. Proceedings of the Pharmaceutical Society of Korea 2: 143, 2001. 2001. 10. 17-19. 서울 숙명여자대학교, 포스트 발표(초록)
- 6) Choi Hye Joung, Yee Su Bog, Park Hwa Sun, Chung Sang-Woon, Park Sangeun, Jung Jee Hyung, and Kim Nam Deuk (2002) Ircinin-1 from the sponge *Sarcotragus* species induces cell proliferation and apoptosis in the human skin cancer cells. Proceedings of the Pharmaceutical Society of Korea 3, 2002. 10. 17-19. 오송국제바이오엑스포, 청주,
- 7) Choi Hye Joung, Yee Su-Bog, Park HwaSun, Chung Sang-Woon, Park Sangeun, Jung Jee Hyung, and Kim Nam Deuk (2002) Suppression of Human Skin Cancer Cell Growth by Ircinin-1 from the Sponge *Sarcotragus* Species via Inhibition of pRB Phosphorylation and Induction of Cdk Inhibitor p21. Proceedings of the Korean Society of Medical Biochemist교 & Molecular Biology. 2002. 10. 24-25. 서울 한국과학기술회관,
- 8) Choi Hye Joung, Yee Su-Bog, Chung Sang-Woon, Park Sangeun, Choi Yung Hyun, Jung Jee Hyung, and Kim Nam Deuk. Ircinin-1 from the Sponge *Sarcotragus* sp. Induces of Apoptosis in SK-MEL-2 Human Skin Cancer Cells. 대한약학회 초록집, 2003, 4월 17-18일, (1) p230.
- 9) Choi Hye Joung, Park Cheol, Choi Yung Hyun, Jung, J. H., Kim Nam Deuk. Suppression of human skin cancer cell growth by ircinin-1 from the sponge *sarcotragus* sp. 한국분자 생화학학회, 2003, 5월 14-16일 p308

- 10) Choi Hye Joung, Park Cheol, Choi Yung Hyun, Jung, J. H., Kim Nam Deuk.
Cell Cycle Arrest of Skin Cancer Cells by Ircinin-1 from the Sponge
Sarcotragus sp. 대한 암예방학회 초록집, 2003, 7월4일 p23

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

1. 본 연구결과를 생리활성 선도물질 개발의 기초자료로 활용
2. 기왕에 분리된 물질들에 대하여 항염활성, telomerase에 대한 예비실험에서 유의성 있는 결과가 얻어졌으므로 추가적인 연구의 필요성이 있다.

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 “해양한국발전프로그램 (KSGP)연구개발사업”의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 “해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업 ” 의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발비 사용실적 총괄표

(단위 : 원)

구분 비목	당초계획	집행액	증감	증감사유
1. 인건비 2. 직접경비 가. 여비 나. 연구기자재 및 시설비 다. 기술정보활동비 라. 산업재산권처리비 마. 재료및 전산처리비 바. 시제품제작비 사. 수용비 및 수수료 3. 연구관리비				
합계				

2. 과제별 연구개발비 집행명세서

과제명 :

사업단장 : 직위 (), 성명 () (인)

연구팀장 : 직위 (), 성명 () (인)

(단위 : 원)

비 목 \ 구 분	당 초 계 획	집 행 액	증 감	증 감 사 유
1. 인 건 비				
2. 직접경비				
가. 여비				
나. 연구기자재 및 시설비				
다. 기술정보활동비				
라. 산업재산권처리비				
마. 재료및 전산처리비				
바. 시제품제작비				
사. 수용비 및 수수료				
3. 연구 관리 비				
합 계				

진도보고서

과제명	(국문)			
	(영문)			
사업단명	(국문) OO대학교 SG연구사업단			
	(영문) OO Sea Grant Office(OOUniversity)			
사업단장	소속	OO대학교 OO학과	직위	
	성명		주민등록번호	
연구팀장	소속	OO대학교 OO학과	직위	
	성명		주민등록번호	
연구개발비	천원	참여연구인력수(명)		
<p>가. 연구수행내용 ○ 간략하게 연구수행내용을 기재</p> <p>나. 연구 진척도 ○ 당초 계획서상의 진도계획과 비교하여 간략하게 작성</p> <p>다. 연구수행에 따른 문제점 및 개선방향 ○ 당초계획보다 진도상의 미흡한 부분에 대한 원인과 대책 등을 기술</p> <p>라. 연구비 집행내역 ○ 세부비목에 의해 작성</p> <p style="text-align: right;">(단위 : 원)</p>				
비목	당초연구비	집행액	잔액	
○ 인건비				
○ 직접경비				
- 여비				
- 연구기자재 및 시설비				
- 기술정보활동비				
- 산업재산권처리비				
- 재료 및 전산처리비				
- 시제품제작비				
- 수용비 및 수수료				
○ 연구관리비				
계				
<p>마. 중요 연구변경사항 ○ 연구의 목표, 연구책임자 등 주요 계약변경사항을 간략히 기재</p> <p>바. 기타 건의사항</p>				

KSGP 연구과제 자체평가 의견서

과제명	해면동물의 암세포독성물질 개발연구			
사업단명	국문 : 부산대학교 SG연구사업단 영문 : Pusan Sea Grant Office(Pusan National University)			
사업단장	소속	부산대학교 조선공학과	직 위	교수
	성명	이승건	주민등록번호	560107-
연구팀장	소속	부산대학교 약학과	직 위	부교수
	성명	정지형	주민등록번호	579527-
완료과제에 대한 자체평가 의견				
연구목표 달성도	대상 연구시료로부터 23종의 sesterterpenoids를 비롯하여 2종의 cyclitol 유도체 등 신물질을 분리하여 구조를 규명하였으며 5종 인체암세포에 대한 항암활성 검색을 완료하였다. 대표적인 유효 화합물인 ircinin-1에 대하여 cell cycle 미치는 영향을 조사하였으며 작용기전을 탐구하였다.			
연구결과의 우수성	당초의 연구목표를 충분히 초과달성하였으며 이러한 연구 결과를 4편의 SCI 논문으로 발표하였다. 추가로 2편의 SCI 논문을 투고 준비 중에 있다.			
연구결과 기대효과	본 연구결과를 생리활성 물질 개발의 기초자료로 활용하여 유기 합성의 model compound 제공, 각종 생리활성 탐색 및 작용기전 연구 등에 활용할 수 있다.			
2003년 12월 3일				
연구책임자 부산대학교 정지형 (인)				

학술지 게재시 논문 표기원칙

○ 국문표기(예시) : 이 논문은 해양수산부 해양한국발전프로그램의 지원에 의해 연구되었음

(MOMAF - 2000 - ○○○ - ○○○○○)
지원년도 사업코드 과제번호

○ 영문표기(예시) : This work was supported by 『Korea Sea Grant Program』 of the Ministry of Maritime Affairs and Fisheries

(MOMAF - 2000 - ○○○ - ○○○○○)
지원년도 사업코드 과제번호

- 해양수산부가 아닌 다른 연구비 수혜기관의 일부보조 표기 또는 병기는 인정하지 않음
- 사업코드

사업명	코드번호	사업내용
○ 연구개발사업	100	
- 핵심전략연구 지원사업	101	『해양한국 21』의 효율적 추진 및 해양 수산 분야에 있어 국가적으로 긴요한 전략적 과제
- 지역현안 연구사업	102	지방자치단체 및 산업체와 연계하여 지방소재 대학을 중심으로 국민생활 향상 또는 지역 경제 발전에 크게 기여할 수 있는 지역 현안 연구과제
○ 전문인력양성사업	200	
- 우수연구원지원사업	201	
- 박사후 해외연수지원	202	

Table 5. Cytotoxicity Data of Compounds **4-19**^{a,b}

compound	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
4	12.3	9.6	5.6	9.8	6.5
5	15.1	5.3	4.1	5.5	5.0
6	4.3	4.0	3.4	3.9	3.8
7	6.3	6.7	4.3	5.2	4.9
8	16.8	13.1	4.8	10.5	5.4
9	19.0	6.9	3.8	5.4	5.3
10	27.1	26.8	15.9	25.2	22.3
11	>30	25.9	13.2	>30	21.6
12	24.1	15.2	7.6	20.1	10.5
13	9.1	10.0	5.1	7.6	7.3
14	6.7	6.8	5.9	6.3	6.1
15	24.8	23.3	25.7	25.9	23.7
16	18.1	10.0	7.8	24.3	8.7
17,18 ^c	>30	26.8	6.2	29.6	23.9
19	9.0	8.4	9.9	11.3	10.1
doxorubicin	0.02	0.16	0.02	0.13	0.06

^aData expressed in ED₅₀ values ($\mu\text{g/mL}$). A549, human lung cancer; SK-OV-3, human ovarian cancer; SK-MEL-2, human skin cancer; XF498, human CNS cancer; HCT 15, human colon cancer. ^bCompounds were assayed in several separate batches. ^cObtained as an inseparable mixture.

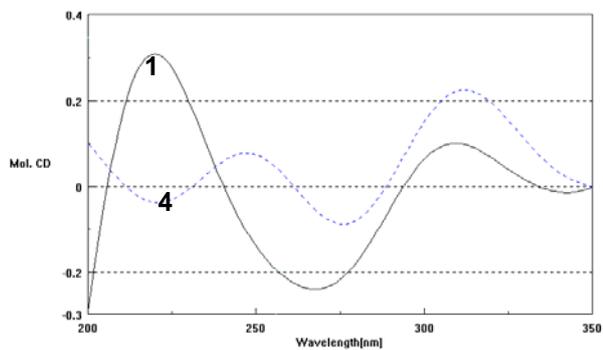


Figure 1. CD Spectra of compounds 1 and 4.

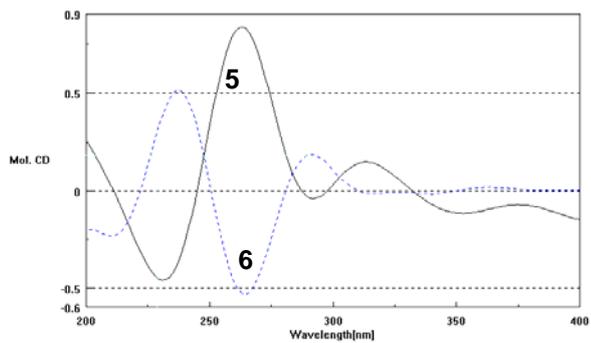


Figure 3. CD Spectra of compounds 5 and 6.

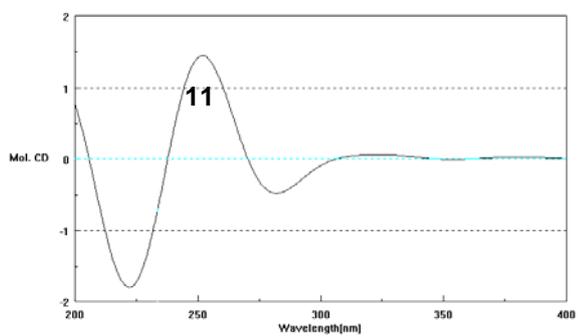


Figure 4. CD Spectrum of compound 11.

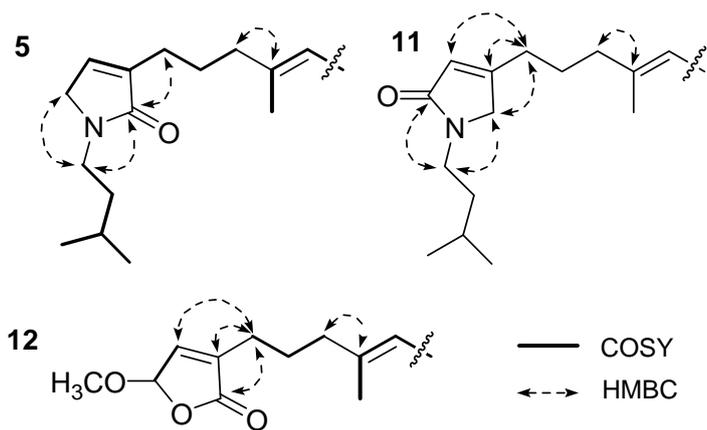


Figure 2. Key HMBC and COSY correlations of **5**, **11**, and **12**

Table 1. ¹H NMR Data of Compounds **4-11** (CD₃OD, 500 MHz)^a

position	4	5	6	7	8	9	10	11
1	7.37 (brs)	3.94 (brs)	3.94 (brs)	3.78 (brs)	3.77 (brs)	3.95 (brs)	3.98 (brs)	
2	6.29 (brs)	6.83 (brs)	6.82 (brs)	6.74 (brs)	6.74 (brs)	6.84 (brs)	6.87 (brs)	5.79 (brs)
4	7.24 (brs)							3.98 (brs)
5	2.37 (t, 8.0)	2.20 (t, 7.0)	2.20 (t, 7.0)	2.19 (t, 7.0)	2.19 (t, 7.0)	2.21 (t, 7.0)	2.24 (t, 7.0)	2.37 (t, 7.0)
6	1.66 (m)	1.66 (m)	1.66 (m)	1.66 (m)	1.65 (m)	1.67 (m)	1.68 (m)	1.66 (m)
7	2.04 (t, 7.0)	2.07 (t, 7.5)	2.07 (t, 7.5)	2.07 (t, 7.5)	2.04 (t, 7.5)	2.08 (t, 7.4)	2.10 (t, 7.5)	2.07 (t, 7.5)
9	1.70 (s)	1.70 (s)	1.69 (s)	1.70 (s)	1.70 (s)	1.71 (s)	1.72 (s)	1.73 (s)
10	5.75 (d, 11.0)	5.77 (d, 11.0)	5.76 (d, 11.0)	5.76 (d, 11.0)	5.75 (d, 11.0)	5.78 (d, 11.0)	5.79 (d, 11.0)	5.78 (d, 11.0)
11	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	6.17 (dd, 15.0, 11.0)	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	6.20 (dd, 15.0, 11.0)	6.17 (dd, 15.0, 11.0)
12	5.38 (dd, 15.0, 8.5)	5.37 (dd, 15.0, 8.5)	5.38 (dd, 15.0, 8.5)	5.37 (dd, 15.0, 8.5)	5.39 (dd, 15.0, 8.0)	5.37 (dd, 15.0, 8.5)	5.41 (dd, 15.0, 8.0)	5.39 (dd, 15.0, 8.5)
13	2.15 (m)	2.16 (m)	2.15 (m)					
14	0.99 (d, 7.0)	0.98 (d, 7.0)	0.98 (d, 6.0)	0.98 (d, 6.5)	0.98 (d, 6.5)	0.98 (d, 7.0)	1.00 (d, 7.0)	0.98 (d, 6.5)
15	1.31 (m)	1.34 (m)	1.32 (m)	1.33 (m)	1.32 (m)	1.34 (m)	1.33 (m)	1.34 (m)
16	1.99 (q, 8.0)	1.99 (q, 7.0)	2.01 (q, 7.0)	1.99 (q, 7.0)	2.00 (q, 7.5)	1.99 (q, 7.0)	2.01 (q, 7.0)	1.99 (q, 7.0)
17	5.25 (t, 7.5)	5.28 (t, 7.0)	5.25 (t, 7.0)	5.28 (t, 7.0)	5.24 (t, 7.0)	5.28 (t, 7.0)	5.27 (t, 7.0)	5.29 (t, 7.0)
19	1.76 (s)	1.75 (s)	1.76 (s)	1.76 (s)				
20	2.58 (dd, 14.5, 2.5)	2.61 (dd, 14.0, 4.0)	2.58 (dd, 14.0, 3.0)	2.60 (dd, 14.0, 3.0)	2.59 (dd, 14.5, 3.0)	2.60 (dd, 14.0, 3.0)	2.59 (dd, 14.0, 3.0)	2.60 (dd, 14.0, 3.0)
	2.17 (dd, 14.5, 9.5)	2.25 (dd, 14.0, 8.5)	2.16 (dd, 14.0, 9.5)	2.24 (dd, 14.0, 8.0)	2.18 (dd, 14.5, 9.5)	2.25 (dd, 14.0, 8.5)	2.18 (dd, 14.0, 8.0)	2.24 (dd, 14.0, 8.5)
21	4.47 (dd, 9.5, 2.5)	4.72 (dd, 8.5, 4.0)	4.52 (dd, 9.5, 3.0)	4.69 (dd, 8.0, 3.0)	4.48 (dd, 9.5, 3.0)	4.72 (dd, 8.5, 3.0)	4.46 (dd, 8.0, 3.0)	4.69 (dd, 8.5, 3.0)
25	1.57 (s)	1.64 (s)	1.57 (s)	1.62 (s)	1.57 (s)	1.64 (s)	1.59 (s)	1.64 (s)
1'		3.48 (t, 7.0)	3.47 (t, 7.5)	3.69 (t, 7.5)	3.69 (t, 7.0)	3.34 (m)	3.34 (m)	3.44 (t, 7.0)
2'		1.48 (q, 7.0)	1.48 (q, 7.0)	2.90 (t, 7.0)	2.89 (t, 7.0)	1.76 (m)	1.76 (m)	1.48 (q, 7.0)
3'		1.55 (m)	1.55 (m)			0.85 (d, 6.5)	0.87 (d, 6.0)	1.55 (m)
4'		0.94 (d, 6.5)	0.94 (d, 6.5)	7.22 (m)	7.20 (m)	1.42 (m)	1.42 (m)	0.94 (d, 6.5)
						1.17 (m)	1.17 (m)	
5'		0.94 (d, 6.5)	0.94 (d, 6.5)	7.27 (m)	7.25 (m)	0.93 (t, 6.5)	0.94 (d, 6.5)	0.94 (d, 6.5)
6'				7.22 (m)	7.20 (m)			

^aMultiplicities and coupling constants in parentheses.

Table 2. ^1H NMR Data of Compounds **12-19** (CD_3OD , 500 MHz)^a

position	12	13	14	15	16	17	18	19
1	5.83 (brs)	7.35 (brs)	7.36 (brs)	7.36 (brs)	7.37 (brs)	7.42 (brs)	7.42 (brs)	7.35 (brs)
2	6.95 (brs)	6.26 (brs)	6.27 (brs)	6.28 (brs)	6.29 (brs)	6.33 (brs)	6.33 (brs)	6.27 (brs)
4		7.30 (brs)	7.31 (brs)	7.23 (brs)	7.25 (brs)	7.33 (brs)	7.33 (brs)	7.23 (brs)
5	2.23 (t, 7.0)	3.03 (s)	3.04 (s)	2.37 (t, 7.0)	2.39 (t, 7.5)	3.73 (s)	3.73 (s)	2.39 (t, 8.0)
6	1.66 (m)			1.66 (q, 7.0)	1.65 (m)			1.58 (m)
7	2.08 (t, 7.5)	6.83 (s)	6.86 (s)	2.05 (m)	2.06 (t, 7.5)	5.95 (brs)	5.95 (brs)	1.40 (m)
9	1.71 (s)			1.71 (s)	1.71 (s)	7.15 (brs)	7.15 (brs)	1.12 (s)
10	5.78 (d, 11.0)	2.22 (t, 6.5)	2.15 (t, 6.5)	5.76 (d, 11.0)	5.76 (d, 11.0)	2.37 (t, 7.5)	2.34 (t, 7.5)	3.30 ^b
11	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	2.19 (q, 7.0)	1.49 (m)	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	6.19 (dd, 15.0, 11.0)	2.20 (m)	1.62 (m)	5.55 (dd, 15.5, 8.0)
12	5.39 (dd, 15.0, 8.5)	5.01 (t, 6.0)	1.97 (m)	5.38 (dd, 15.0, 8.0)	5.38 (dd, 15.0, 8.0)	5.15 (t, 6.6)	2.07 (m)	5.29 (dd, 15.5, 7.5)
13	2.15 (m)			2.15 (m)	2.15 (m)			2.18 (m)
14	0.98 (d, 7.0)	1.55 (s)	1.64 (s)	0.98 (d, 7.0)	0.99 (d, 6.5)	1.57 (s)	1.68 (s)	1.02 (d, 7.0)
15	1.33 (m)	1.94 (m)	5.18 (t, 7.0)	1.34 (m)	1.31 (m)	1.94 (m)	5.13 (t, 6.6)	1.37 (m)
16	1.99 (q, 7.0)	1.37 (m)	1.98 (m)	1.99 (m)	1.97 (m)	1.37 (m)	1.90 (m)	1.96 (q, 8.0)
17	5.29 (t, 7.0)	1.30 (m)	1.47 (m)	5.26 (t, 7.5)	5.25 (t, 7.0)	1.28 (m)	1.40 (m)	5.30 (t, 7.5)
			1.40 (m)				1.32 (m)	
18		2.72 (m)	2.72 (m)			1.96 (m)	1.96 (m)	
19	1.74 (s)	1.05 (d, 7.0)	1.06 (d, 7.0)	1.75 (s)	1.73 (s)	0.98 (d, 6.6)	0.97 (d, 6.6)	1.75 (s)
20	2.61 (dd, 14.0, 4.0)	5.25 (d, 9.5)	5.25 (d, 9.5)	2.43 (m)	2.44 (m)	0.98 (d, 6.6)	0.97 (d, 6.6)	2.60 (dd, 14.5, 3.5)
	2.25 (dd, 14.0, 8.5)			2.39 (m)	2.39 (m)			2.27 (dd, 14.5, 9.5)
21	4.73 (dd, 8.5, 4.0)			4.20 (t, 6.0)	4.23 (dd, 6.0, 8.0)			4.68 (dd, 9.5, 3.5)
25	1.64 (s)	1.73 (s)	1.72 (s)					1.63 (s)
OCH ₃	3.51 (s)	3.19 (s)	3.21 (s)		3.68 (s)			3.23 (s)

^a Multiplicities and coupling constants are in parentheses. ^b Overlapped with the solvent peak.

Table 3. ^{13}C NMR Data of Compounds **4-11** (CD_3OD , 50 MHz)

position	4	5	6	7	8	9	10	11
1	143.9	52.2	52.2	52.9	52.9	52.9	52.2	174.6
2	111.9	137.6	137.6	137.7	137.7	137.6	137.6	121.8
3	126.3	140.4	140.4	140.3 ^a	140.2	140.3	140.4	136.0
4	140.1	173.6	173.7	173.7	173.7	174.1	173.7	55.4
5	25.2	26.3	26.3	26.3	26.3	26.4	26.3	24.3
6	29.5	27.0 ^a	27.0 ^a	27.0 ^b	27.0 ^a	27.0 ^a	26.9 ^a	27.0 ^a
7	40.4	40.4	40.4	40.3	40.3	40.4	40.4	40.2
8	136.6	136.4	136.4	136.4	136.4	136.5	136.4	136.0
9	16.5	16.4	16.4	16.5	16.5	16.4	16.4	16.3
10	126.5 ^a	126.6 ^b	126.5 ^b	126.6 ^c	126.5 ^b	126.6 ^b	126.5 ^b	126.5 ^b
11	126.6 ^a	126.7 ^b	126.7 ^b	126.7 ^c	126.6 ^b	126.7 ^b	126.7 ^b	127.0 ^b
12	139.2	139.2	139.3	139.2	139.3	139.2	139.3	139.5
13	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.5	38.0	38.0
14	21.4	21.5	21.4	21.5	21.4	21.5	21.4	21.5
15	38.4	38.2	38.4	38.3	38.2	38.3	38.4	38.3
16	26.9	26.9 ^a	26.9 ^a	26.9 ^b	26.9 ^a	26.9 ^a	27.0 ^a	26.9 ^a
17	129.4	130.4 ^c	129.6	130.2 ^d	129.8	130.4 ^c	129.6	130.2 ^c
18	132.0	130.8 ^c	131.8	131.0 ^d	132.0	130.9 ^c	131.8	131.0 ^c
19	24.3	24.4	24.3	24.4	24.3	24.4	24.3	24.4
20	35.9	35.5	35.8	35.7 ^e	35.7 ^c	35.5	35.8	35.6
21	80.9	78.9	80.3	79.3	80.0	79.0	80.3	79.2
22	183.7	178.0	181.2	179.1	181.0	178.5	182.0	179.3
23	88.4	96.3	92.3	95.3	91.1	96.1	92.3	96.3
24	192.5	178.3	186.2	180.0	187.8	178.6	186.2	181.0
25	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	5.9
1'		41.7	41.7	45.2	45.2	49.4	49.5	41.3
2'		38.4	38.4	35.6 ^e	35.6 ^c	35.6	35.8	38.4
3'		27.0 ^a	27.0 ^a	140.2 ^a	140.2	17.2	17.0	27.0 ^a
4'		22.8	22.8	129.6	129.6	28.0	28.0	22.8
5'		22.8	22.8	129.8	129.8	11.5	11.5	22.8
6'				127.6	127.6			

^{a-e} Assignments with the same superscript in the same column may be interchanged.

Table 4. ^{13}C NMR Data of Compounds **12-19** (CD_3OD , 50 MHz)

position	12	13	14	15	16	17	18	19
1	104.4	144.0	144.0	144.1	143.9	144.1	144.1	143.9 ^a
2	144.6	113.2	113.2	111.9	111.9	112.2	112.2	111.9
3	139.5	119.0	119.0	126.4	126.5	123.0	123.0	126.4
4	173.4	142.7	142.7	140.1	140.1	140.9	140.9	140.0
5	25.6	33.9	33.9	25.2	25.2	24.8	24.8	26.3
6	26.6	110.3	110.3	29.4	29.5	155.5	155.5	24.9
7	40.2	147.3	147.0	40.3	40.3	108.3	108.1	38.6
8	136.0	139.5	139.9	136.7	136.7	127.0	127.1	75.0
9	16.4	172.7	172.7	16.5	16.5	138.7	138.7	23.4
10	126.5 ^a	26.8	25.7	126.4 ^a	126.2 ^a	26.1	25.7	90.4
11	127.0 ^a	27.0	27.0 ^a	126.7 ^a	126.5 ^a	29.5	29.4	126.0
12	139.5	124.0	32.0 ^b	139.1	140.1	125.3	32.2	143.8 ^a
13	38.0	137.7	135.9	38.0	37.9	136.5	136.3	38.0
14	21.4	16.0	23.5	21.3	21.4	16.0	23.6	21.3
15	38.2	40.4	126.6	38.5	38.5	40.7	126.2	38.6
16	27.0	26.8	26.8 ^a	26.9	26.9	26.2	26.3	27.2
17	130.4 ^b	38.6	38.6	129.7	129.8	37.3	38.1	130.1
18	130.7 ^b	31.8	31.8 ^b	131.9	131.7	31.4	31.1	131.0
19	24.4	21.1	21.1	24.8	24.0	20.1	20.0	24.3
20	35.4	115.2	115.2	37.9	37.9	20.1	20.0	35.5
21	78.9	144.9	144.9	70.7	71.0			79.2
22	177.8	165.0	165.0	177.8	176.2			179.2
23	96.5	98.1	98.1					95.7
24	178.3	173.7	174.0					180.7
25	6.0	6.1	6.1					6.0
OCH ₃	57.0	51.7	51.7		52.3			56.8

^{a,b}Assignments with the same superscript in the same column may be interchanged.

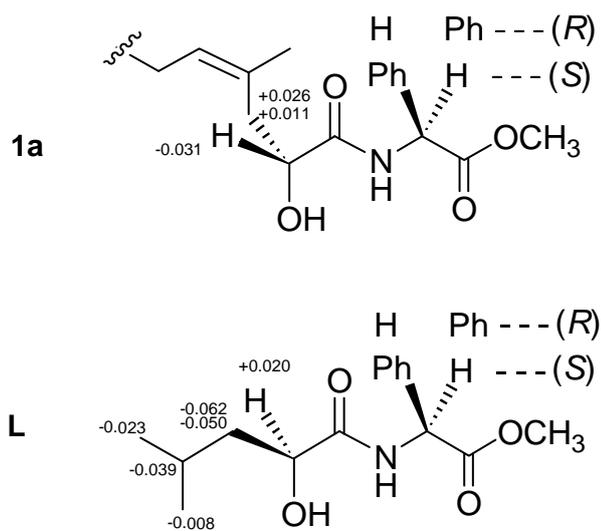


Figure 5. Conformations and $\Delta\delta$ ($\delta_S - \delta_R$) values of the PGME amides of **15(1a)** and L-leucic acid (**L**).⁹

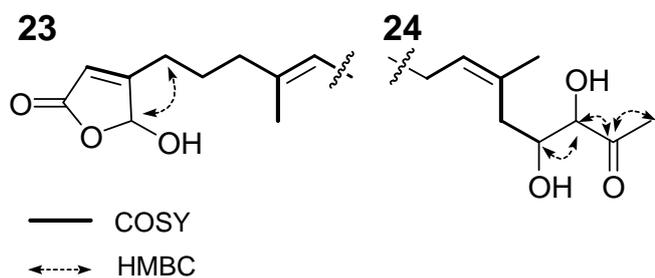


Figure 6. Key HMBC and COSY correlations of **23** and **24**.

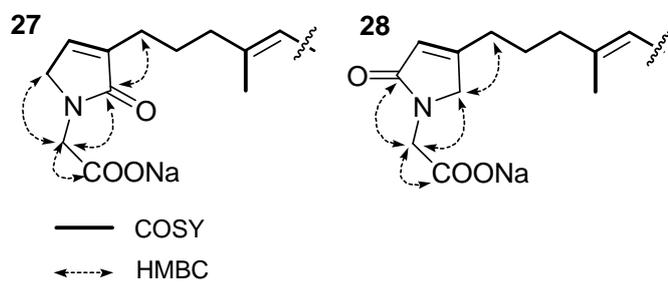


Figure 7. Key HMBC and COSY correlations of **27** and **28**.

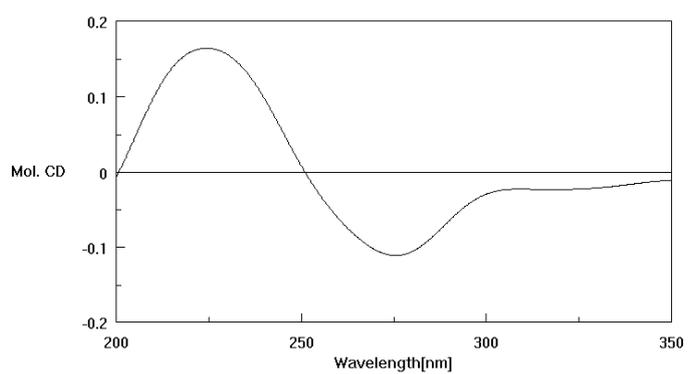


Figure 8. CD Spectrum of compound **27**.

Figure 9. Key fragmentations of the $[M + Na]^+$ ion of **21** in FAB-CID MS/MS.

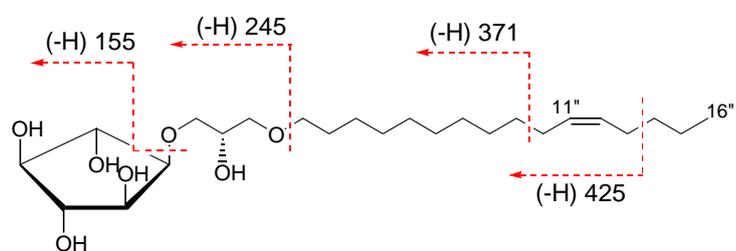


Table 6. ^1H NMR Data of Compounds **23** and **24** (CD_3OD , 500 MHz)^a

position	23	23 ^b	24 ^b
1			
2	5.90 (brs)	5.90 (s)	5.90 (brs)
4	6.04 (brs)	6.09 (s)	6.09 (brs)
5	2.39 (t, 7.5)	2.39 (t, 7.5)	2.40 (t, 7.5)
6	1.76 (m)	1.76 (m)	1.76 (m)
7	2.13 (t, 7.0)	2.15 (t, 7.0)	2.14 (m)
9	1.73 (s)	1.74 (s)	1.75 (s)
10	5.81 (d, 11.0)	5.85 (d, 11.0)	5.85 (d, 11.0)
11	6.20 (dd, 15.0, 11.0)	6.25 (dd, 15.0, 11.0)	6.25 (dd, 15.0, 11.0)
12	5.41 (dd, 15.0, 7.5)	5.46 (dd, 15.0, 7.5)	5.48 (dd, 15.0, 7.5)
13	2.19 (m)	2.19 (m)	2.19 (m)
14	0.99 (d, 7.0)	0.99 (d, 7.0)	0.99 (d, 6.5)
15	1.32 (m)	1.32 (m)	1.32 (m)
16	1.97 (q, 7.0)	1.99 (q, 7.0)	2.12 (m)
17	5.25 (t, 7.0)	5.25 (t, 7.0)	5.26 (t, 7.0)
18			
19	1.73 (s)	1.73 (s)	1.76 (s)
20	2.43 (dd, 13.0, 6.0)	2.44 (13.5, 5.5)	2.42 (dd, 13.0, 6.5)
	2.39 (dd, 13.0, 8.0)	2.41(13.5, 8.0)	2.30 (dd, 13.0, 7.5)
21	4.22 (dd, 8.0, 6.0)	4.25 (dd, 8.0, 5.5)	4.14 (t, 6.5)
22			4.00 (brs)
23			2.21 (s)
OCH ₃	3.64 (s)	3.68 (s)	

^aMultiplicities and coupling constants are in parentheses. ^bMeasured in acetone-*d*₆.

Table 7. ^{13}C NMR Data of Compounds **23**, **24**, and **26–30** (CD_3OD , 50 MHz)

position	23	24 ^c	26 ^c	27	28	29 ^c	30 ^c
1	171.4	172.0	104.0	53.1	173.8	53.1	173.6
2	117.3	117.1	144.6	137.7	121.8	137.7	121.8
3	170.0	170.0	139.5	140.0	136.5	140.2	136.0
4	99.2	99.2	173.4	172.9	55.8	173.6	55.8
5	27.6	27.5	25.6	26.3	29.8	26.3	29.5
6	25.6	25.4 ^a	26.6	27.1 ^a	27.0 ^a	27.0 ^a	27.0 ^a
7	40.0	39.7	40.2	40.5	40.2	40.4	40.2
8	135.6	135.6	136.0	136.5	136.0	136.6	136.0
9	16.0	16.0	16.4	16.5	16.4	16.4	16.3
10	126.0	126.0	126.5 ^a	126.3 ^b	126.5 ^b	126.4 ^b	126.4 ^b
11	125.2	125.2	127.0 ^a	126.7 ^b	127.0 ^b	126.6 ^b	126.6 ^b
12	139.1	139.4	139.5	139.4	140.2	140.1	139.5
13	37.7	38.1	38.0	38.0	38.0	38.1	38.1
14	21.3	20.9	21.4	21.2	21.5	21.3	21.3
15	38.4	37.6	38.2	38.5	38.5	38.2	38.3
16	26.0	25.9	27.0	26.9 ^a	26.8 ^a	26.9 ^a	26.9 ^a
17	129.0	129.0	130.4	128.9	128.9	129.6	129.6
18	131.8	132.0	130.7	132.6	132.7	132.5	132.5
19	24.2	23.8	24.4	24.3	24.3	24.3	24.3
20	37.7	36.0	36.3	36.1	36.1	35.9	35.9
21	70.4	70.5	81.0	81.4	81.4	71.9	71.9
22	175.3	79.0	182.6	187.1	183.6	80.3	80.3
23		211.0	88.0	88.4	88.0	212.3	212.3
24		25.3 ^a	192.1	193.2	193.2	25.6	25.6
25			6.0	6.0	6.0		
1'				47.1	47.0	46.8	46.8
2'				176.3	174.0	176.0	174.0
OCH ₃	52.3		56.8				

^{a,b}Assignments with the same superscript in the same column may be interchanged.

^cAssignments were supported by HMQC and HMBC experiments.

Table 9. Cytotoxicity Data of Compounds **23–30**^a

compound	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
23	19.4	>30.0	10.9	>30.0	21.7
24	6.8	14.9	3.0	11.5	4.6
25	7.9	32.3	4.5	11.8	4.2
26	>30.0	>30.0	10.9	>30.0	33.0
27	>30.0	>30.0	>30.0	>30.0	>30.0
28	>30.0	>30.0	>30.0	>30.0	>30.0
29,30 ^b	>30.0	>30.0	>30.0	>30.0	>30.0
doxorubicin	0.04	0.15	0.06	0.19	0.24

^aData expressed in ED₅₀ values ($\mu\text{g/mL}$). A549, human lung cancer; SK-OV-3, human ovarian cancer; SK-MEL-2, human skin cancer; XF498, human CNS cancer; HCT 15, human colon cancer. ^bObtained as an inseparable mixture.

Table 8. ^1H NMR Data of Compounds **16–30** (CD_3OD , 500 MHz)^a

position	26	27	28	29	30
1	5.83 (brs)	4.05 (brs)		4.04 (brs)	
2	6.96 (brs)	6.83 (brs)	5.81 (brs)	6.83 (brs)	5.83 (brs)
4			4.12 (d, 1.5)		4.11 (d, 1.5)
5	2.23 (t, 7.5)	2.22 (t, 7.5)	2.38 (t, 7.5)	2.22 (t, 7.5)	2.38 (t, 7.5)
6	1.67 (m)	1.69 (m)	1.68 (m)	1.68 (m)	1.68 (m)
7	2.07 (t, 7.5)	2.08 (t, 7.0)	2.06 (t, 7.0)	2.09 (t, 7.0)	2.06 (t, 7.0)
9	1.71 (s)	1.72 (s)	1.70 (s)	1.72 (s)	1.72 (s)
10	5.77 (d, 11.0)	5.79 (d, 11.0)	5.78 (d, 11.0)	5.79 (d, 11.0)	5.79 (d, 11.0)
11	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	6.19 (dd, 15.0, 11.0)	6.18 (dd, 15.0, 11.0)	6.19 (dd, 15.0, 11.0)	6.19 (dd, 15.0, 11.0)
12	5.40 (dd, 15.0, 8.5)	5.39 (dd, 15.0, 8.0)	5.40 (dd, 15.0, 8.0)	5.41 (dd, 15.0, 8.0)	5.41 (dd, 15.0, 8.0)
13	2.15 (m)	2.15 (m)	2.12 (m)	2.16 (m)	2.16 (m)
14	0.98 (d, 7.0)	0.98 (d, 6.0)	0.98 (d, 7.0)	0.99 (d, 7.0)	0.99 (d, 7.0)
15	1.33 (m)	1.31 (m)	1.32 (m)	1.33 (m)	1.33 (m)
16	1.99 (q, 7.0)	2.01 (q, 8.0)	2.00 (q, 8.0)	2.05 (m)	2.05 (m)
17	5.23 (t, 7.0)	5.23 (t, 7.0)	5.23 (t, 7.0)	5.27 (t, 7.0)	5.27 (t, 7.0)
19	1.76 (s)	1.76 (s)	1.76 (s)	1.75 (s)	1.75 (s)
20	2.57 (dd, 14.0, 2.5)	2.60 (dd, 14.0, 2.0)	2.58 (dd, 14.0, 2.5)	2.40 (dd, 13.5, 7.0)	2.40 (dd, 13.5, 7.0)
	2.25 (dd, 14.0, 9.5)	2.14 (dd, 14.0, 10.0)	2.14 (dd, 14.0, 10.0)	2.28 (dd, 13.5, 7.0)	2.28 (dd, 13.5, 7.0)
21	4.34 (dd, 9.5, 2.5)	4.34 (dd, 10.0, 2.0)	4.34 (dd, 10.0, 2.5)	4.05 (td, 7.0, 2.0)	4.05 (td, 7.0, 2.0)
22				3.93 (d, 2.0)	3.93 (d, 2.0)
24				2.20 (s)	2.22 (s)
25	1.54 (s)	1.54 (s)	1.54 (s)		
OCH ₃	3.51 (s)				
1'		4.01 (s)	3.97 (s)	4.02 (s)	3.98 (s)

^a Multiplicities and coupling constants are in parentheses

Table 10. ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) and ¹³C NMR Data (CD₃OD, 50 MHz) of **21**

position	δ_{H} (mult, <i>J</i>)	δ_{C}	HMBC (H to C)
1	3.72 (dd, 9.5, 3.5)	73.2	2, 3, 1'
	3.53 (dd, 9.5, 6.0)		
2	3.91 (m)	70.9	1, 3, 1'
3	3.47 (dd, 10.0, 5.0)	73.1	2, 3, 1"
	3.43 (dd, 10.0, 6.0)		
1'	3.53 (t, 7.0)	84.4	1, 2', 3', 5'
2'	3.82 (t, 5.5)	75.1	1, 1', 3'
3'	3.72 (t, 6.0)	81.9	2', 4'
4'	3.54 (t, 7.0)	81.6	3', 5'
5'	3.82 (t, 6.0)	80.0	1, 1', 4'
1"	3.45 (t, 8.0)	72.7	2, 3, 2'', 3''
2"	1.56 (quint, 7.0)	30.3 – 30.8	1'', 3''
3"	1.28 - 1.34 (m)	27.2	
4"- 7"	1.28 - 1.34 (m)	30.3 – 30.8	
8"	1.28 - 1.34 (m)	30.3 – 30.8	
9"	1.28 - 1.34 (m)	30.3 – 30.8	
10"	2.02 (m)	28.1	9'', 11'', 14''
11"	5.34 (t, 5.5)	130.8	10''
12"	5.34 (t, 5.5)	130.8	13''
13"	2.02 (m)	27.9	9'', 11'', 12''
14"	1.28 - 1.34 (m)	33.1	13'', 15''
15"	1.28 - 1.34 (m)	23.4	14'', 16''
16"	0.90 (t, 7.0)	14.3	14'', 15''

Table 11. Cytotoxicity of Compounds **20-22** against Human Solid Tumor Cells^a

compound	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
20 ^b	>10	9.5	>10	9.8	9.4
21	11.5	5.1	7.9	7.5	10.5
22	4.8	5.3	4.6	4.3	5.3
doxorubicin	0.02	0.16	0.02	0.13	0.06

^aData expressed in ED₅₀ values ($\mu\text{g}/\text{mL}$). A549, human lung cancer; SK-OV-3, human ovarian cancer; SK-MEL-2, human skin cancer; XF498, human CNS cancer; HCT 15, human colon cancer. ^bData from the reference 4.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Optical rotations were obtained using a JASCO DIP-370 digital polarimeter. CD spectra were measured using a JASCO J-715 spectropolarimeter (sensitivity 50 mdeg, resolution 0.2 nm). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AC200 and Varian Inova 500. Chemical shifts were reported with reference to the respective residual solvent peaks (δ_{H} 3.30 and δ_{C} 49.0 for CD_3OD , δ_{H} 2.05 and δ_{C} 29.8 for acetone- d_6). FABMS data were obtained on a JEOL JMS-700 double focusing (B/E configuration) instrument. HPLC was performed with an YMC ODS-H80 (semipreparative, 250×10 mm, 4 μm , 80 Å; preparative, 250×20 mm, 4 μm , 80 Å) column using a Shodex RI-71 detector.

Animal Material. The first sponge was collected in July 1998 (15–25 m in depth), off the coast of Jeju Island, Korea. The specimen was identified as *Sarcotragus* sp. (Irciniidae) by Prof. Chung Ja Sim, Hannam University. A voucher specimen (registry No. Por.33) was deposited in the Natural History Museum, Hannam University, Daejon, Korea, and has been described elsewhere.²

The second sponge was collected by hand using SCUBA (25 m in depth) during Oct. 2002 off the coast of Jeju Island, Korea. It was identified as *Sarcotragus* sp. by Prof. Chung Ja Sim. It was a massive sponge (10.5×6 cm and 4 cm thick) with oscules, (2–4 mm in diameter) irregularly scattered on the surface. The surface was a shade of gray in life and the texture was elastic. The surface was covered with sharply pointed conules (2–5 mm height and 2–6 mm apart). The heavily fasciculated primary fibers (500–700 μm in diameter) were devoid of sands. Slightly fasciculated secondary fibers (80–400 μm in diameter) were devoid of sands. Filaments (3–6 μm thick) were very tightly arranged in matrix and had terminal knobs (10–12 μm in diameter). A voucher specimen (registry No. Spo. 40) was deposited at the Natural History Museum, Hannam University, Daejon, Korea.

Extraction and Isolation. The frozen sponge (7 kg) was extracted with MeOH at room temp. The MeOH extract of the sponge displayed moderate cytotoxicities against five human tumor cell lines (ED₅₀ values for A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, and HCT15 were 19.0, 20.3, 11.8, 15.5, and 12.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). The MeOH extract was partitioned between water and CH₂Cl₂. The CH₂Cl₂ layer was further partitioned between 90% methanol and *n*-hexane to yield 90% methanol (54 g) and *n*-hexane soluble (13 g) fractions. As described in our previous report,² the 90% methanol fraction was subjected to a reversed-phase flash column chromatography (YMC Gel ODS-A, 60 Å 500/400 mesh), eluting with a solvent system of 25 to 0% H₂O/MeOH, to afford twenty fractions (Fg1–Fg20). These fractions were evaluated for activity in the brine shrimp assay, and fractions Fg6–Fg9 were found active. These fractions were combined (7.4 g) and further separated by a reversed-phase flash column chromatography (YMC Gel ODS-A, 60 Å, 500/400 mesh), eluting with 25 to 0% H₂O/MeOH, to afford ten fractions. Fractions Fg6-5–Fg6-7 (5.4 g) were combined, and the combined fraction was further separated by a reversed-phase flash column chromatography (YMC Gel ODS-A, 60 Å, 500/400 mesh), eluting with 33 to 0% H₂O/MeCN, to afford thirteen fractions. Guided by the brine shrimp assay, compound **5** (11.3 mg) was obtained by purification of fraction Fg6-5-11 by ODS HPLC. Compound **7** (2.9 mg), **9** (6.5 mg), **10** (1.1 mg), and **11** (2.7 mg) were obtained by purification of fraction Fg6-5-10 by ODS HPLC. Compound **6** (1.9 mg) and **8** (1.9 mg) were obtained by purification of the degradation mixture of **5** and **7**, respectively, by ODS HPLC. Compound **12** (11.1 mg), **14** (5.4 mg), and **16** (8.6 mg) were obtained by purification of fraction Fg6-5-3, Fg6-5-2, and Fg6-5-11, respectively, by ODS HPLC. Compound **13** (3.1 mg) and **19** (3.2 mg) were obtained by purification of fraction Fg6-5-3 by ODS HPLC. Compound **15** (44.3 mg) and the mixture of **17** and **18** (7.6 mg) were obtained by purification of fraction Fg6-5-4 by ODS HPLC. Compound **4** (1.5 mg) was obtained by purification of the degradation mixture of sarcotin A (**1**) by ODS HPLC.

The fraction Fg4 was further separated by a reversed-phase flash column chromatography (YMC Gel ODS-A, 60 Å, 500/400 mesh), eluting with 25 to 0% H₂O/MeOH, to afford 14 fractions. Compound **23** (3.5 mg) was obtained by purification of fraction Fg4-7 by ODS HPLC,

eluting with a solvent system of 75% MeOH. Compounds **24** (1.1 mg) and **25** (0.9 mg) were obtained by purification of subfraction Fg4-8 by ODS HPLC, eluting with a solvent system of 70% MeOH.

The second sponge (3 kg) was extracted with MeOH at room temperature. The MeOH extract was partitioned between water and CH₂Cl₂. The CH₂Cl₂ layer was further partitioned between 90% methanol and *n*-hexane to yield 90% methanol (26 g) and *n*-hexane soluble (6 g) fractions. The 90% methanol fraction was subjected to a reversed-phase flash column chromatography (YMC Gel ODS-A, 60 Å, 500/400 mesh), eluting with a solvent system of 25 to 0% H₂O/MeOH, to afford 13 fractions (FJ1–FJ13). Compound **26** (1.3 mg) was obtained by purification of fraction FJ4 by ODS HPLC, eluting with a solvent system of 60% MeOH. Compounds **27** (5.4 mg) and **28** (2.7 mg) were obtained by purification of fraction FJ2 by ODS HPLC, eluting with a solvent system of 50% MeOH. Compounds **29** and **30** (1.4 mg) were obtained by purification of fraction FJ3 by ODS HPLC, eluting with a solvent system of 50% MeOH. Compound **31** (2 g) was obtained by purification of fraction FJ8 by ODS HPLC, eluting with a solvent system of 85% MeOH. Compound **32** (1 g) was obtained by purification of fraction FJ7 by ODS HPLC, eluting with a solvent system of 75% MeOH. Compound **33** (10 mg) was obtained by purification of fractions FJ5 and FJ6 by ODS HPLC, eluting with a solvent system of 70% MeOH. Compounds **34** (2.0 mg) and **35** (2.1 mg) were obtained by purification of fraction FJ9 by ODS HPLC, eluting with a solvent system of 88% MeOH.

These fractions Fg6 - Fg9 were evaluated for activity in the brine shrimp assay, and were found active. Compound **1** (5.3 mg), **2** (4.7 mg), and **3** (1.2 mg) were obtained by purification of fraction Fg 6-8, Fg 6-5, and Fg 10-6, respectively, by ODS HPLC.

epi-Sarcotin A (4): light yellow oil; $[\alpha]_D^{25} +37.5^\circ$, (*c* 0.04, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 226 (4.76) nm; CD (*c* 4×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (350.3), +0.24 (312.5), 0 (289.1), -0.11 (272.4), 0 (262.6), +0.09 (248.4), 0 (232.2), -0.05 (220.1), 0 (210.4); ¹H NMR data, see Table 1; ¹³C NMR

data, see Table 3; EIMS m/z 398 $[M]^+$; FABMS m/z 443 $[M + 2Na - H]^+$ (9), 421 $[M + Na]^+$ (3), 326 (8); HRFABMS m/z 421.2318 (calcd for $C_{25}H_{34}O_4Na$, 421.2355).

Sarcotrine A (5): colorless oil; $[\alpha]_D^{21} +36.1^\circ$, (c 0.18, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 240 (4.81) nm; 1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 3; CD (c 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (332.7), +0.14 (313.6), 0 (298.6), -0.04 (292.0), 0 (286.4), +0.84 (263.6), 0 (244.9), -0.45 (230.7), 0 (211.4); FABMS m/z 484 $[M + H]^+$ (80), 482 (100), 464 (3), 370 (2), 329 (70); HRFABMS m/z 484.3410 (calcd for $C_{30}H_{46}NO_4$, 484.3427).

epi-Sarcotrine A (6): colorless oil; $[\alpha]_D^{21} +42.8^\circ$, (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 242 (4.56) nm; 1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 3; CD (c 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (310.2), +0.16 (292.0), 0 (281.0), -0.54 (265.3), 0 (250.0), +0.52 (237.8), 0 (223.3); FABMS m/z 506 $[M + Na]^+$ (50), 484 $[M + H]^+$ (25), 329 (10); HRFABMS m/z 506.3271 (calcd for $C_{30}H_{45}NO_4Na$, 506.3246).

Sarcotrine B (7): colorless oil; $[\alpha]_D^{21} +36.9^\circ$, (c 0.07, MeOH); 1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 3; CD (c 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (294.5), -0.05 (274.8), 0 (267.4), +0.16 (254.8), 0 (242.4), -0.08 (229.3), 0 (220.2); FAB-CID MS/MS m/z 518 $[M + H]^+$ (100), 404 (8), 282 (3), 200 (2); HRFABMS m/z 518.3240 (calcd for $C_{33}H_{44}NO_4$, 518.3271).

epi-Sarcotrine B (8): colorless oil; $[\alpha]_D^{21} +42.1^\circ$, (c 0.04, MeOH); 1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 3; CD (c 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (294.5), -0.13 (288.1), 0 (277.3), +0.18 (270.6), 0 (262.5), -0.05 (250.1), 0 (236.6), +0.46 (228.7), 0 (213.1); FABMS m/z 540 $[M + Na]^+$ (20), 518 $[M + H]^+$ (8), 413 (5), 329 (40); HRFABMS m/z 540.3085 (calcd for $C_{33}H_{43}NO_4Na$, 540.3090).

Sarcotrine C (9): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +19.1^\circ$, (c 0.18, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 245 (4.28) nm; 1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 3; CD (c 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (284.6), -0.28 (265.1), 0 (252.1), +0.54 (239.5), 0 (230.1), -0.55 (223.2); FABMS m/z 506 $[M + Na]^+$ (30), 484 $[M + H]^+$ (39), 329 (38), 135 (82); HRFABMS m/z 506.3248 (calcd for $C_{30}H_{45}NO_4Na$, 506.3246).

epi-Sarcotrine C (10): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +24.0^\circ$, (*c* 0.06, MeOH); ^1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 3; CD (*c* 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (277.1), +0.17 (259.0), 0 (248.5), -0.10 (240.1), 0 (230.1), +0.02 (222.9), 0 (215.6), -0.03 (209.3); FABMS *m/z* 506 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (42), 484 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (39), 329 (48); HRFABMS *m/z* 506.3228 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{NO}_4\text{Na}$, 506.3246).

Sarcotrine D (11): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +65.2^\circ$, (*c* 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 239(4.34) nm; ^1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 3; CD (*c* 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (305.8), -0.50 (281.5), 0 (269.2), +1.48 (253.6), 0 (237.4), -1.76 (222.9), 0 (208.4); FABMS *m/z* 506 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (14), 484 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (16), 329 (38); HRFABMS *m/z* 484.3429 (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{NO}_4$, 484.3427).

Sarcotin F (12): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +30.8^\circ$, (*c* 0.36, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 247 (4.95) nm; ^1H NMR data, see Table 2; ^{13}C NMR data, see Table 4; CD (*c* 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (324.8), +0.55 (308.2), 0 (293.8), -0.54 (281.4), 0 (265.3), +0.75 (250.2), 0 (231.8), -0.52 (218.2), 0 (206.8); FABMS *m/z* 467 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (14), 445 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (15), 307 (70), 136 (100); HRFABMS *m/z* 467.2402 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{Na}$, 467.2410), 445.2610 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_6$, 445.2591).

Sarcotin G (13): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +27.9^\circ$, (*c* 0.09, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 248 (4.67) nm; ^1H NMR data, see Table 2; ^{13}C NMR data, see Table 4; CD (*c* 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (376.4), +1.04 (302.8), 0 (259.1), -0.2 (230.5); FABMS *m/z* 479 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (34), 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (16), 329 (52), 307 (73), 289 (38); HRFABMS *m/z* 457.2202 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{O}_7$, 457.2226).

Sarcotin H (14): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +35.2^\circ$, (*c* 0.10, MeOH); ^1H NMR data, see Table 2; ^{13}C NMR data, see Table 4; CD (*c* 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (376.4), +1.44 (277.8), 0 (231.5); FABMS *m/z* 479 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (42), 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (8), 329 (40), 307 (30); HRFABMS *m/z* 479.2047 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_7\text{Na}$, 479.2046).

Sarcotin I (15): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +33.1^\circ$, (*c* 0.14, MeOH); IR (film) ν_{max} 2928, 2360, 2330, 1726, 1023 cm^{-1} ; ^1H NMR data, see Table 2; ^{13}C NMR data, see Table 4; FABMS *m/z* 405 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (28), 383 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (6), 325 (20), 63 (50); HRFABMS *m/z* 405.2022 (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{Na}_2$, 405.2018).

Sarcotin J (16): light yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +115.4^\circ$, (*c* 0.046, MeOH); ^1H NMR data, see Table 2; ^{13}C NMR data, see Table 4; FABMS *m/z* 397 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (100), 325 (15), 92 (20).

Sarcotin K (17) and Sarcotin L (18): yellow oil; ^1H NMR data, see Table 2; ^{13}C NMR data, see Table 4; FABMS *m/z* 323 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (9), 301 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (3), 242 (5), 199 (25), 92 (35), 63 (48); HRFABMS *m/z* 323.2005 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{Na}$, 323.1987).

Sarcotin M (19): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +26.8^\circ$, (*c* 0.02, MeOH); ^1H NMR data, see Table 2; ^{13}C NMR data, see Table 4; CD (*c* 1×10^{-4} M, MeOH), $\Delta\epsilon$, 0 (358.4), +0.28 (315.6), 0 (293.8), -0.54 (256.9), 0 (238.2), +0.76 (218.7), 0 (206.5); FABMS *m/z* 469 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (85), 447 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (9), 429 (10), 307 (40), 135 (70); HRFABMS *m/z* 469.2567 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{Na}$, 469.2566).

Oxidative Cleavage of 1, 5, and 6. To a biphasic solution of 6.4 mg (0.016 mmol) of **1** and 41.3 mg (0.192 mmol) of NaIO_4 in a mixture of 1 mL of CCl_4 , 1 mL of CH_3CN , and 1.5 mL of H_2O was added 21.5 mg (0.08 mmol) of $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. After vigorous stirring of the mixture for 2h at room temperature, the solvents were removed under vacuum. The residue was dissolved in MeOH, and then filtered. The filtrate was dried and extracted with CHCl_3 , and subjected to normal-phase HPLC (YMC Silica column, hexane: CHCl_3 = 3:1) to give 0.9 mg of (*S*)-2-methylglutaric acid: $[\alpha]_D^{20} +22^\circ$ (*c* 0.026, MeOH); ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.55 (1 H, m, H-2), 2.52 (1H, m, H-4), 2.45 (1H, m, H-4), 2.05 (1H, dtd, $J = 14.5, 9.5, 4.5$ Hz, H-3), 1.90 (1H, ddt, $J = 14.5, 7.0, 4.5$ Hz, H-3), 1.22 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3).⁶ Oxidative cleavage of **5** (4.9 mg) and **6** (1.5 mg) were performed in the same manner to give 0.8 mg and 0.4 mg of (*S*)-2-methylglutaric acid, respectively.

Sarcotin N (23): light yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +66.7^\circ$ (*c* 0.06, MeOH); CD (*c* 1×10^{-4} M, MeOH) $\Delta\epsilon$ 0 (216.4), +0.075 (228.0), 0 (240.5), -0.016 (244.0), 0 (249.2), +0.051 (262.3), 0 (284.6), -0.025 (300.1), 0 (337.5); ^1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 2; FABMS *m/z* 429 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (12), 407 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (2), 381 (5); HRFABMS *m/z* 429.2259 (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{Na}$, 429.2253).

Sarcotin O (24): colorless oil; $[\alpha]_D^{21} +13.6^\circ$ (c 0.04, MeOH); CD (c 1×10^{-4} M, MeOH) $\Delta\epsilon$ 0 (223.1), -0.025 (228.3), 0 (231.6), $+0.051$ (272.7), 0 (311.2); ^1H NMR data, see Table 1; ^{13}C NMR data, see Table 2; FABMS m/z 443 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (10), 421 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (2), 391 (2), 63 (50); HRFABMS m/z 443.2426 (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{Na}$, 443.2410).

ent-Kurospogin (25): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +33.4^\circ$ (c 0.03, CHCl_3); CD (c 1×10^{-4} M, MeOH) $\Delta\epsilon$ 0 (268.5), -0.143 (258.2), 0 (250.2), $+0.145$ (242.0), 0 (236.5), -0.614 (226.0); ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ 7.46 (1H, brs, H-1), 6.59 (1H, brs, H-2), 7.39 (1H, brs, H-4), 6.38 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-5), 6.01 (1H, dt, $J = 16.0, 7.5$ Hz, H-6), 3.08 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-7), 7.20 (1H, s, H-10), 5.10 (1H, m, H-11), 2.39 (1H, dd, $J = 14.5, 6.5$ Hz, H-12), 2.33 (1H, dd, $J = 14.5, 7.0$ Hz, H-12), 1.64 (3H, s, H-14), 5.29 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-15), 2.27 (2H, m, H-16), 2.44 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-17), 7.22 (1H, brs, H-19), 6.29 (1H, brs, H-20), 7.41 (1H, brs, H-21); ^{13}C NMR (CD_3OD , 50 MHz) δ 144.8 (CH), 108.4 (CH), 125.4 (C), 141.5 (CH), 123.6 (CH), 137.2 (CH), 29.4 (CH_2), 133.6 (C), 174.8 (C), 151.6 (CH), 82.3 (CH), 44.1 (CH_2), 131.3 (C), 16.9 (CH_3), 129.8 (CH), 29.6 (CH_2), 25.6 (CH_2), 125.4 (C), 140.2 (CH), 112.0 (CH), 143.9 (CH); FABMS m/z 361 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (5), 339 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (1), 326 (15).

Preparation of (R)- and (S)-Phenylglycine Methyl Ester (PGME) Amides of Sarcotin I (15). Compound **15** (1.4 mg) and (S)-PGME (2.4 mg) were dissolved in 1 mL of DMF and cooled to 0°C . To the solution, 6.4 mg of PyBOP [(benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate], 1.6 mg of HOBT (1-hydroxybenzotriazole), and 4 μL of *N*-methyl morpholine were added in order, and the mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. Benzene (1 mL) and EtOAc (2 mL) were then added, the mixture was washed with aqueous 5% HCl, saturated NaHCO_3 solution, and brine.⁹ Then the solvent was removed by vacuum evaporation. The residue was purified on Si gel in a Pasteur pipette eluting with *n*-hexane-EtOAc (1:1) and characterized by ^1H NMR. The (R)-PGME amide of **1** was prepared from (R)-PGME in a similar fashion.

(S)-PGME Amide of 15: yellow oil; ^1H NMR (acetone- d_6) δ 7.499–7.325 (7H, m, phenyl-, H-1 and 4), 6.357 (1H, s, H-2), 6.334 (1H, dd, $J = 15.0, 11.0$ Hz, H-11), 5.808 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-10), 5.455 (1H, dd, $J = 15.0, 8.0$ Hz, H-12), 5.257 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-17), 4.195 (1H, dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz, H-21), 3.697 (3H, s), 2.433 (1H, dd, $J = 15.0, 9.0$ Hz, H-20), 2.397 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-5), 2.194 (1H, dd, $J = 15.0, 7.0$ Hz, H-20), 2.156–1.911 (overlapped with solvent peak, m, H-7, H-13 and 16), 1.731 (3H, s, H-19), 1.725 (3H, s, H-9), 1.690 (2H, m, H-6), 1.311 (2H, m, H-15), 0.991 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-14).

(R)-PGME Amide of 15: yellow oil; ^1H NMR (acetone- d_6) δ 7.500–7.269 (7H, m, phenyl-, H-1 and 4), 6.355 (1H, s, H-2), 6.224 (1H, dd, $J = 15.0, 11.0$ Hz, H-11), 5.794 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-10), 5.428 (1H, dd, $J = 15.0, 8.0$ Hz, H-12), 5.231 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-17), 4.226 (1H, dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz), 3.697 (3H, s), 2.406 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-5), 2.386 (1H, dd, $J = 15.0, 9.0$ Hz, H-20), 2.156 (1H, dd, $J = 15.0, 7.0$ Hz, H-20), 2.156–1.918 (overlapped with solvent peak, m, H-7, 13, and 16), 1.712 (6H, s, H- 9 and 19), 1.694 (2H, m, H-6), 1.316 (2H, m, H-15), 0.968 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-14).

epi-Sarcotin F (26): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +57.7^\circ$ (c 0.04, MeOH); CD (c 1×10^{-4} M, MeOH) $\Delta\epsilon$ – 0.071 (218.1), 0 (222.2), +0.021 (229.5), 0 (233.4), –0.055 (245.1), 0 (255.6), +0.120 (270.8), 0 (312.3); ^1H NMR data, see Table 3; ^{13}C NMR data, see Table 2; ESIMS m/z 445 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Sarcotrine E (27): light yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +38.8^\circ$ (c 0.18, MeOH); CD (c 1×10^{-4} M, MeOH) $\Delta\epsilon$ 0 (201.1), +0.165 (228.2), 0 (250.1), –0.125 (275.6); ^1H NMR data, see Table 3; ^{13}C NMR data, see Table 2; FABMS m/z 538 $[\text{M} + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ (12), 516 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (7), 494 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (2), 478 (4); HRFABMS m/z 516.2352 (calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{NO}_6\text{Na}_2$, 516.2338).

Isosarcotrine E (28): light yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +33.3^\circ$ (c 0.09, MeOH); ^1H NMR data, see Table 3; ^{13}C NMR data, see Table 2; FABMS m/z 538 $[\text{M} + 2\text{Na} - \text{H}]^+$ (2), 516 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (1), 494 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (1), 478 (4).

Sarcotrine F (29) and Isosarcotrine F (30): yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +42.0^\circ$ (*c* 0.05, MeOH); ^1H NMR data, see Table 3; ^{13}C NMR data, see Table 2; FABMS *m/z* 506 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (4), 484 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (15), 460 (1), 439 (2); HRFABMS *m/z* 506.2492 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{NO}_6\text{Na}_2$, 506.2495).

Sarcotride A (20): light yellow oil; $[\alpha]_D^{21} -6^\circ$, (*c* 0.15, MeOH); FABMS *m/z* 485 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (100), 295 (2), 245 (3), 322 (15), 136 (5); HRFABMS *m/z* 485.3436 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{Na}$, 485.3454).

Sarcotride B (21): light yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +24^\circ$, (*c* 0.14, MeOH) ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; FABMS *m/z* 469 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (79), 455 (8), 371 (3), 322 (15), 245 (6), 171 (69), 164 (23), 155 (7), 132 (71), 95 (1); HRFABMS *m/z* 469.3137 (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{O}_7\text{Na}$, 469.3141).

Sarcotride C (22): light yellow oil; $[\alpha]_D^{21} +10^\circ$, (*c* 0.04, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 3.72 (1H, dd, *J* = 9.5, 3.5 Hz, H-1a), 3.53 (1H, dd, *J* = 9.5, 6.0 Hz, H-1b), 3.91 (1H, m, H-2), 3.47 (1H, dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, H-3a), 3.43 (1H, dd, *J* = 10.0, 6.0 Hz, H-3b), 3.53 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-1'), 3.82 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, H-2'), 3.72 (1H, t, *J* = 6.0 Hz, H-3'), 3.54 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-4'), 3.82 (1H, t, *J* = 6.0 Hz, H-5'), 3.45 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-1''), 1.56 (2H, quint, *J* = 7.0 Hz, H-2''), 1.26-1.36 (20H, m, H-3''-H-15''), 0.90 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-16''); ^{13}C NMR (50 MHz, CD_3OD) δ 73.3 (C-1), 70.9 (C-2), 73.1 (C-3), 84.5 (C-1'), 75.1 (C-2'), 82.0 (C-3'), 81.6 (C-4'), 80.0 (C-5'), 72.7 (C-1''), 30.5-30.8 (C-2'', C-4''-13''), 27.2 (C-3''), 33.1 (C-14''), 23.7 (C-15''), 14.4 (C-16''); FABMS *m/z* 471 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (100), 449 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (20), 307 (5), 135 (12).