

낙동강 남조류에서 Microcystin의 정제와 생화학적 특성

고신대학교 의학부 생화학교실

곽충근, 정인철, 조무연

Purification and biochemical characterization of microcystin from blue-green algae in Nakdong River

Choong Keun Kwak, In Cheol Jeong, Moo Youn Cho

Department of Biochemistry, Kosin Medical College

— Abstract —

The sample were obtained in July and August 1996 from fresh bloom materials composed predominantly of *Microcystis* spp. The blue-green algae samples was identified to be a *Microcystis aeruginosa*. The algae samples were harvested, lyophilized, and purification of the microcystin-type toxin were carried out by using Ultrogel AcA 202 column (elution solvent : 20% methanol, flow rate : 0.6ml/min, detector wavelength : 238nm) LC. Qualitative analysis was detected to be a microcystin-type toxin. A peak shape and elution time of amino acid analyzer chromatogram of a purified material were identical to those of physiological fluid standard. The amino acid analysis of the physiological fluid standard and the purified field sample did exhibit five amino acid in common, and the same elution time. Presumably, the toxin was identified to be a microcystin-LR type toxin, closely related to microcystin-LR. LC_{50} value of the microcystin-LR type toxin was in the range from 0.4 to 0.8mg dry weight/ml by human lymphoblast NC-37 cell toxicity test. To investigate genomic change in c-myc gene by a hepatotoxin microcystin-LR, human lymphoblast NC-37 cells exposed with microcystin (0.8mg dried cell/ml) was evaluated by the methods of quantitative polymerase chain reaction. When the DNA isolated from NC-37 cells exposed to 0.8mg dried cell/ml of microcystin were amplified by polymerase chain reaction using a primer containing c-myc exon II, the resulting DNA was appeared to be decrease in microcystin treated cells than in the microcystin untreated control groups. However, the RNA expression in Northern blot hy-

bridization was identical in the control, microcystin treated cells. These results indicate that microcystin induces changes in the exon II in human c-myc gene, may lead to a transformation of the cell.

*** Key Words :** *Microcystis aeruginosa*, Microcystin-LR, c-myc, polymerase chain reaction

서 론

최근 남조류는 수질 오염이 심한 담수역에 전 세계적으로 분포되어 있으며, 이에 많은 문제를 일으키고 있다.^{10,40)} 특히 부영양화가 진행되어 있어 수중에 질소, 인과 같은 영양염류의 농도가 높은 수계에서 온도가 높은 여름철에 남조류는 수면에 scum을 형성한다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 이들은 시각적인 면은 물론이고 불쾌한 맛과 냄새를 유발시키고 있으며, 인간에게 해를 주는 독성물질을 생산하고 있어 수계에서 남조류의 번식은 음용수로 사용하는 경우 더욱 문제시 된다. 국내의 몇몇 부영양화된 하천이나 호소에서 *Microcystis*속에 의한 수화가 보고되고 있다.²⁹⁾ 1870년대 호주에서 *Nodularia*에 의한 동물의 폐사에 대한 보고¹²⁾를 처음으로 미국, 캐나다, 영국, 일본 등 많은 나라에서 유독 남조류의 수화에 의한 동물의 피해가 보고되고 있다.⁹⁾ 그 중에서도 특히 오염된 수역에서 주로 수화를 발생시키는 *Microcystis*에 의한 급성 독성 피해가 많이 보고되고 있으며 그 원인 독성 물질은 microcystin이라고 하는 환상 펩타이드로 밝혀졌다.^{24,31)}

남조류가 생산하는 급성 독성물질은 크게 신경독성물질(neurotoxic alkaloids)과 간장독성물질(hepatotoxin peptide)로 분류된다.^{13,25)} 이 중에서 hepatotoxin peptide는 그 구조에 따라 nodularin과 microcystin으로 나누어진다. *Nodularia*에 의해 생산되는 nodularin은 5개의 아미노산이 펩타이드 고리로 구성되며 그 구조에 따라 10여 가지로 분류된다.^{28,30)} Microcystin은 분자량이 952-1067 dalton의 heptapeptide로서 7개의 아미노산이 펩타이드 고리를 이루며 구성되는데, 이 중 5개의 아미노산은 공통이며, 나머지 2개의 L-amino acid의 조합에 따라 분류된다.

이에 따라 50여 가지의 microcystin이 현재까지 조사되어 있다.^{5,13,18,21,30)} 그 공통적 구조는 D-alanine (Ala), γ -linked D-glutamic acid (Glu), β -linked D-erythro- β -methyl-D-aspartic acid (β -Me-Asp), N-methyldehydroalanine (Mdha) 및 탄소원자 20개로 이루어진 아미노산인 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2, 6, 8-trimethyl-4, 6-decadien acid (Adda)의 5종류의 구성 아미노산을 공통 골격으로 가지고 있고, 성분에 의해 변화하는 2종의 L-amino acid(R1,R2)의 총 7개의 아미노산으로 이루어진 환상 펩타이드이다 (Fig. 1).³⁹⁾

독성물질을 생산하는 남조류 중 가장 흔한 종은 *Microcystis aeruginosa*(이하 *M. aeruginosa*)이고, 분자량이 654-19,400 범위인 독성물질을 생산한다. 특히 1-3시간내 쥐를 죽이는 fast death factor인 microcystin을 생산하기도 하고, 한 개 이상의 cyclic polypeptide구조를 이루어 16개의 아미노산을 함유하는 독성물질을 생산하기도 한다.¹⁵⁾ 이러한 microcystin을 생성하는 남조류는 *Microcystis viridis*, *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria agardhii*, *Nostoc* sp. 등이 있다.^{13,28,32,35)} Nodularin과 microcystin은 protein phosphatase 1, 2A의 활동을 저해시켜서 간암을 유발시키는 것으로 알려져 있다.^{18,23,27,33,34)} 쥐에게 치사량 만큼의 microcystin을 복강내 투여하면 1-2시간 내에 죽으며, 이 시간 동안에 쥐의 체중당 간 중량은 대조군의 4-6%에서, microcystin을 복강내 투여시킨 쥐의 간 중량은 10% 정도 증가했다.^{5,32,33)} Hepatotoxin의 독성정도는 성분에 따라 다르지만 microcystin과 nodularin의 LD₅₀이 각각 50-600 μ g/kg,³⁵⁾ 50-2,000 μ g/kg으로 조사되어 있다.³⁰⁾ 남조류가 생산하는 neurotoxin에는 *Aphanizomenon flos-aquae*로부터 생성되는 aphanizomenon (saxitoxin, neosaxitoxin),

*Anabaena flos-aquae*로부터 나오는 anatoxin-a와 anatoxin-a(s)의 세가지가 알려져 있다. Anatoxin-a는 alkaloid의 화학적 구조를 가지는 것으로 밝혀졌고, anatoxin-a(s)는 cyclic n-hydroxy guanidine의 phosphate ester구조를 가지고 *Anabaena flos-aquae*가 생산하는 것으로 알려져 있다.^{10,13)}

최근의 실제 *M. aeruginosa*의 분포에 의한 피해 사례를 보면 미국에서 20마리의 소가 식욕부진, 탈수 등의 증상을 나타내는 중독 증세 및 치사된 보고가 있다. 중국의 경우 해마다 약 100,000명의 간암 환자가 발생하고 있는데 *Microcystis*의 대분포가 일어나는 호수의 물을 식수로 취하는 사람들의 간암 유발율이 그렇지 않은 사람들에 비해 훨씬 높다고 발표하여 primary liver cancer(PLC)와 microcystin과의 상관성을 시사하고 있다.^{10,34)}

현재까지 낙동강 수계를 비롯한 우리나라의 전체 수계에서 남조류 독성에 의한 피해 사례는 보고된 바 없다. 최근 낙동강 하류에서 발생(번식)하고 있는 종은 남조류의 일종인 *M. aeruginosa*로 보고된 바 있다.¹¹⁾ *M. aeruginosa*는 microcystin이라는 독성물질을 함유하고 있는 것으로 최근 국내 논문에서 발표되었다.¹⁾

이에 본 연구에서는 남조류 세포에서의 microcystin의 분리, 정제 및 정성분석을 실행하고 사람 림프아(human lymphoblast) NC-37세포에서의 세포독성을 관찰하며, microcystin을 투여하여 배양한 사람 림프아 NC-37세포에서 microcystin이 유전자 수준에서 미치는 영향과 그 유해성을 규명하고자 한다.

실험 재료 및 방법

1. 시료의 채취

낙동강 유역의 수온이 25°C이상 상승하는 7월 말부터 9월 초순까지 녹조현상이 가장 심한 서낙동강의 녹산지역을 선정하여, 수면에 부유하여 있는 scum을 채수기를 사용하여 조류의 밀도가 높은 표층수를 채수하였다.

2. 조류의 형태학적 분류

Nikon AFX-IIA 광학현미경으로 10×100배의 배율로 관찰하고, 동정하기 위해 사진촬영을 하였다. 조류의 동정은 한국담수조류도감²⁾을 따라 동정하였다.

3. Microcystin의 분리와 동정

1) Microcystin-type 물질의 분리

Microcystin을 분리하기 위하여 1차적으로 여과지로 여과하여 농축한 후 동결 건조기로 남조류 세포를 동결 건조하여 -70°C의 deep freezer에 동결보관 하였다. 건조중량 200mg의 시료를 멸균된 증류수에 녹여 광학현미경으로 세포가 완전히 파괴된 것이 확인될 때까지 homogenizer와 ultrasonicator로 파쇄하였다. 세포 파쇄액은 5% 1-butanol : 20% methanol : 75% 증류수가 함유된 용액으로 만들고, 이 용액에서 microcystin을 얻기 위해서 4°C가 유지되는 냉장고 속에서 자석교반기를 사용하여 2시간 동안 교반하여, Sorvall RC-5B centrifuge SS-34 rotor로 20,000×g에서 15분간 원심하여 상층액을 회수하였다. 이 상층액을 freeze dryer (Sargent-welch Scientific Co.)로 48시간 동안 동결건조로 농축시켰으며, 이 시료를 20% methanol에 용해하고 0.45μm millipore membrane으로 여과한 후 gel filtration에 사용하였다. LKB 2152 LC controller, UV-VIS Detector LKB 2138 uvicord SII system을 이용하여 20% methanol로 평형시킨 Ultrogel AcA 202 (LKB Co.) column (2.5×20cm)에 시료 전체를 3ml의 20% methanol에 녹여 넣고 용출용매는 20% methanol을 사용하여 분당 0.6ml의 속도로 238nm에서 흘려주어 microcystin-type 물질의 분획을 얻었으며, 이들 분획에서 아미노산의 조성을 분석하였다.

2) 아미노산 조성 분석

상기 실험에서 얻어진 microcystin-type 분획은 6N HCl을 첨가하여 110°C에서 21시간 끓여 가수분해하였으며, 7.5N sodium hydroxide로 약 pH 2.0으로 맞춘 후 loading buffer (pH 2.2)로 시료를 최종 volume까지 희석시킨 뒤 0.22μm membrane으로 여과하여 LKB amino acid analyzer-Alpha Plus를 사용하여 아미노산 조성을 정성 분석하였다. 표준 아미노산

시료는 physiological fluid standard (10nmol of most amino acid) 용액을 분석에 사용하였다.

4. Microcystin의 세포독성 검사

동결건조된 남조류 세포의 건조중량 200mg을 증류수 10ml에 넣어 10분간 sonicate한 후 5% 1-butanol : 20% methanol : 75% 증류수가 함유된 용액으로 만들고, 이 용액을 2시간 동안 교반하여 독소를 추출하였다. 이 추출액을 20,000×g에서 15분간 원심침하여 상층액을 0.45μm millipore membrane으로 여과하였다. 세포독성 검사를 시행하기 위하여 상기 과정에서 얻어진 추출물을, 사람 림프아 NC-37세포를 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 25cm²의 flask에 ml당 3.4×10⁴의 세포를 접종시켜 5% CO₂가 공급되고 37°C를 유지하는 배양기에서 배양하면서 분리된 추출액(20mg dry weight/ml)을 각각의 flask에 농도별(0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg dried cell/ml)로 투여하여 7일간 배양한 후, methanol로 세포를 고정하고 10% Giemsa용액으로 염색한 뒤 각 flask의 살아있는 세포의 수를 계산하여 microcystin-type 물질의 세포독성을 비교 관찰하였다.

5. Microcystin을 투여한 사람 림프아 NC-37 세포에서 microcystin에 의한 c-myc부위의 유전자 변화

1) DNA 분리

상기 방법에서 냉동보관 하였던 microcystin을 투여치 않은 NC-37세포의 정상대조군과 0.8mg dried cell /ml 농도의 microcystin을 투여한 NC-37세포 실험군의 세포에 5ml의 차게한 phosphate-buffered saline (PBS)을 넣어 세척하고 extraction buffer(10mM Tris-HCl(pH8.0), 0.1M EDTA (pH 8.0), 20μg/ml pancreatic RNase, 0.5% SDS)로 다시 현탁시켰다. 이 현탁액을 37°C 항온 수조에서 1시간 동안 반응시킨 후, proteinase-K(100μg/ml)를 가하여 50°C 항온 수조에서 3시간 반응시켰다. 여기에 phenol을 가하여 추출하고, CHCl₃로 두번 더 추출한 다음 100% ethanol로 침전시켜 분리하였다.²⁾

2) 중합효소 연쇄반응

위의 각각의 시료로부터 얻어진 template DNA를 가지고 정량적 중합효소 연쇄반응에 의한 c-myc의 promotor 부위와 exon II를 포함하고 있는 c-myc 절편을 합성하여 c-myc 상의 유전자 변화를 확인하기 위해 DNA증폭을 실시하였다. 중합효소 연쇄반응은 PreMix-Top(주, 바이오니아) 20μl reaction kit를 사용하여 template DNA 1μg, 0.005μg, 0.0025μg를 넣고 양 방향의 primer를 각각 20 pmol 첨가하여 전체 부피를 20μl로 하여 혼합한 후 증발을 막기 위해 mineral oil을 두 방울 넣고 thermocycler(Techne 회사제품, USA)에서 반응시켰다. primer는 Table. 1에 표시하였다. 반응온도는 세단계로 나누어 1 단계는 94°C에서 5분간 변성시키고, 62°C에서 1분간 annealing 한 후, 72°C에서 1분간 중합시키고, 2단계에서는 94°C에서 1분, 62°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 연속 35회 반응시켰고, 3단계는 94°C 1분, 62°C 1분, 72°C 10분간 실시하여 증폭하였다.

3) Northern blot

Microcystin에 의한 RNA 발현 정도를 비교하기 위하여 분리한 RNA 시료를 formaldehyde가 포함된 1% agarose gel 를 사용하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동된 RNA의 transfer 방법은 우선 증류수에 담궈서 formaldehyde 를 제거한 후 20×SSC 용액을 사용하여 transfer 하였다.³⁾

*Probe 제조

사람 c-myc 유전자를 가지고 있는 plasmid를 중합효소 연쇄반응에 의해 exon II를 포함하고 있는 약 1Kb의 DNA절편을 합성하여 electroelution하여 분리하고 ³²P-dCTP를 첨가한 multiprime DNA labelling 방법으로 ³²P-labeled probe를 제조하여 hybridization에 사용하였다.

*hybridization과 autoradiography

Northern blot한 nylon membrane에 prehybridize solution (50% formamide, 5×SSC, 5×Denhardt's solution, 50mM sodium phosphate buffer ; pH 6.5, 200μg/ml salmon sperm DNA)에 담궈서 42°C의

배양기 내에서 서서히 흔들어주면서 4시간 동안 전처리 한 후 hybridization 용액(50% formamide, 5× SSC, 1×Denhardt's solution, 20mM sodium phosphate buffer ; pH6.5, 100μg/ml Salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate)에 labelled c-myc probe를 첨가하여 hybridize 하였고, 세척조건은 0.5×SSC/0.1% SDS 용액으로 실온에서 30분간 씻고, 다시 같은 용액으로 30분 처리한 후 0.1×SSC/0.1% SDS 용액으로 42°C에서 1시간 처리하고, 같은 농도의 용액으로 68°C에서 1시간 씻은 다음, 자연건조 시키고 UV cross linker를 사용하여 RNA를 고정시킨 후 Hyperfilm-MP (Amersham co.)를 사용하여 -70°C에서 autoradiography하였다.

결 과

1. 조류의 형태학적 분류

채취된 조류는 한국담수조류도감,²⁾ 일본담수조류도감⁴⁾ 및 J. Komarek의 분류체계¹⁷⁾를 따라서 동정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *M. aeruginosa*로 밝혀졌다.

2. Microcystin의 분리와 동정

1) Microcystin-type 독성물질의 분리

채취한 남조류(*M. aeruginosa*)세포로부터 추출용매로 독소 추출물을 얻어 column chromatography (column ; Ultrogel AcA 202, elution solvent ; 20% methanol, 0.6ml/min, 238nm)를 실시하였다(Fig. 3). Fig. 3에서 보는 바와 같이 Ultrogel AcA 202 (1,000-15,000) gel filtration을 실행하였을 때 Harada의 연구¹³⁾에서 microcystin은 분자량이 952-1067 dalton의 heptapeptide라고 한 것과 같이 늦게 용출된 분획을 얻었으며 이 분획을 사용하여 아미노산 분석을 실시하였다.

2) 아미노산 조성 분석

남조류 세포에서 분리한 microcystin-type 독성물질에 대한 아미노산 조성 분석을 위하여 위의 각각의 분획별로 6N HCl을 첨가하여 110°C에서 21

시간 동안 가열하여 가수분해시켜 펩타이드 결합을 분리하였고, 전처리 과정을 실시한 다음 microcystin-type 독성물질을 40μl 주입하여 LKB amino acid analyzer-Alpha Plus를 사용하여 아미노산 조성을 정성 분석하였다(Fig. 4). 그 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 표준 아미노산 시료와 시료의 chromatogram의 결과는 거의 완전한 일치를 보여 주었다. 50번 분획에서는 ammonia peak만 나타났고, 44번 분획의 peak는 aspartic acid는 32분, glutamic acid는 49분, alanine은 68분, leucine은 103분, arginine은 192분에 나타났다. 그러므로 낙동강 남조류가 생산하는 microcystin-type 독성물질은 microcystin-LR형으로 관찰되었다.

3. Microcystin의 세포독성 검사

이 실험에서 복합용매의 농도가 NC-37세포의 생육에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각각 농도별로 복합용매는 배양액 ml당 0.1%로부터 점차 증가시켜 7일간 배양시켜 살아있는 세포를 계산한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 약 0.4%에서는 생육과정에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. Microcystin에 의한 NC-37 세포의 세포독성을 확인하기 위하여, 독성물질을 추출할 때 사용한 복합용매를 NC-37세포에 투여한 정상군, microcystin-type 독성물질 0.1mg dried cell/ml 투여군, microcystin-type 독성물질 0.2mg dried cell/ml 투여군, microcystin-type 독성물질 0.4mg dried cell/ml 투여군, microcystin-type 독성물질 0.8mg dried cell/ml 투여군에서 NC-37 세포의 생존능력 또는 microcystin의 세포독성을 관찰하기 위해 7일간 배양시켜 살아있는 세포를 계산한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 정상군을 100%로 하였을 때, 0.1mg dried cell/ml 투여군은 89.63% (± S.D. 2.68), 0.2mg dried cell/ml 투여군은 85.91% (± S.D. 8.41), 0.4mg dried cell/ml 투여군은 68.41% (± S.D. 5.68), 0.8mg dried cell/ml 투여군은 29.82% (± S.D. 0.67)의 생존률을 보였다. 따라서 cell이 50% 줄어드는 LC₅₀이 0.4-0.8mg dry weight/ml 로서 나타내었다.

4. Microcystin을 투여한 사람 림프아 NC-37 세포에서 microcystin에 의한 c-myc 부위의 유전자 변화

Microcystin에 의한 NC-37세포의 c-myc 위치의 유전자 변화를 규명하기 위하여, microcystin 없이 용매만 투여한 정상 NC-37 세포군, microcystin-LR type 0.8mg dried cell/ml 투여군에서 c-myc DNA의 변화를 관찰하였다. 위 조건으로 세포를 배양하고 DNA를 분리하여 정량적인 중합효소 연쇄반응을 실시하여 c-myc 부위의 유전자를 증폭시켰다. primer (table. 1.)를 사용하여 증폭시킨 유전자(398 bp)를 전기영동으로 확인한 결과(Fig. 7.), 중합효소 연쇄반응의 증폭수율이 0.005 μ g농도(lane 2, 5)에서는 정상군과 microcystin투여군의 양군에서 증폭의 차이를 발견할 수 없었지만, 0.0025 μ g농도(lane 3, 6)에서는 microcystin투여군에서 정상군에 비해 증폭이 감소되는 것을 볼 수 있었다. c-myc의 발현 정도를 측정하기 위하여 Northern blot (Fig. 8)을 실시한 결과에서는 microcystin을 투여치 않은 정상군(lane 1)과 microcystin 투여군(lane 2, 3, 4) 모두에서 발현의 차이를 발견할 수 없었다.

고 찰

구조와 기능이 알려진 담수산 남조류의 독소는 독성기작과 구조에 따라 신경독성물질(neurotoxin)과 간독성물질(hepatotoxin), lipopolysaccharide 등으로 분류한다.⁸⁾ 독소를 생성하는 남조류 중에서 가장 먼저 알려진 종은 *M. aeruginosa*이었는데, 그 독소는 고리 형태의 펩타이드 구조를 가지는 간독임이 밝혀졌으며 microcystin이라고 명명 되었다.⁶⁾

Microcystin은 모두 7개의 펩타이드가 고리를 이룬 공통된 구조적 특성을 가지고 있으며 그 공통적 구조는 D-alanine(Ala), γ -linked D-glutamic acid(Glu), β -linked D-erythro- β -methyl-D-aspartic acid(β -Me-Asp), N-methyldehydroalanine(Mdha) 및 탄소원자 20개로 이루어진 아미노산인 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2, 6, 8-trimethyl-4, 6-decadien acid(Adda)의 5종류의 구성 아미노산을 공통골격으로 가지고 있

고, 5개의 공통 아미노산 외에 2개의 L-amino acid의 조합의 차이와 dehydroalanine이나 aspartic acid의 methyl기의 유무에 따라 현재까지 40가지 이상의 성분이 알려져 있다.^{13,19)} 최근 Namikoshi 등²⁶⁾은 자연 상태의 *Microcystis*로부터 12종류의 microcystin을 추출하였다. 추출된 microcystin의 독성은 microcystin의 성분에 따라 다르며 microcystin-LR과 -YR의 LD₅₀이 70 μ g/kg 전후였고 -RR은 600 μ g/kg 이었다.³⁷⁾ 일본의 경우 동물에 피해를 나타내는 남조류는 주로 *Microcystis*속이었으며 흔히 발생하는 독소는 microcystin-RR, -YR, -LR로 밝혀졌다.^{20,36)} 지금까지 보고된 결과를 보면 일본과 중국의 경우 *Microcystis*에서 생산되는 microcystin중 microcystin-RR이 주요 toxin으로 보고되고 있어^{16,41)} 우리나라와 유사한 결과를 보이고 있으나, 아프리카 등에서의 결과를 보면 microcystin-LR, -YR, -LA, -YA를 주로 생산하며 -RR은 전혀 생산되지 않는 것으로 나타나³⁹⁾ 지역에 따라서 *Microcystis*가 생산하는 독소의 종류에도 많은 차이가 있음을 알 수 있다.

본 연구에서는 채취한 시료를 현미경을 통한 형태학적 관찰과 분류^{24,17)}를 하였다. 낙동강에서 채취한 남조류는 *M. aeruginosa*로 밝혀졌다. 이 결과는 박동¹⁾과도 같은 결과이다.

Lawton등²²⁾은 microcystin-LR, -LY, -LW, -LF 등을 이용하여 추출용액에 따른 추출 효율을 조사하였다. butanol, methanol과 water을 5:20:75(V/V/V)로 한 혼합용매를 이용한 방법, 5% acetic acid를 이용한 방법중 혼합용매를 이용한 방법의 효율이 가장 좋게 나타났다. 다음으로 acetic acid를 이용한 방법이 추출 효율이 좋게 나타났다.

본 연구에서는 시료에서 microcystin을 추출할 때 butanol: methanol: water의 부피비가 5:20:75로 만든 혼합용매를 사용하였다.

Microcystin-type의 독성물질을 추출 및 정제 하기 위해서 Ultrogel AcA 202 gel(1,000-15,000)을 사용하였다. Microcystin은 분자량이 952-1067 dalton의 heptapeptide이므로 23번 분획 이전의 peak는 분자량이 20,000이상되는 protein일 가능성이 매우 높기 때문에 그 이전의 peak들은 의미가 없고, microcys-

stin-type 독성물질이 포함된 분획에서 peak가 나타났다.

본 연구에서는 독성물질의 존재여부(정성분석)만을 확인하였고, 독성물질의 함량(정량분석)조사는 실시하지 않았다. Microcystin-type 독성물질에 대한 아미노산 조성 분석을 위하여 가수분해시켜 펩타이드 결합을 분리하였고, 전처리 과정을 실시한 다음 amino acid analyzer-Alpha Plus를 사용하여 아미노산 조성을 분석하였다. 44번 분획에서 leucine과 arginine의 peak가 각각 103분과 192분에 나타나므로 남조류에서 분리한 독성물질이 microcystin-LR type으로 조사되었다. 그런데 채취한 시료에서 추출한 microcystin-type의 amino acid analyzer의 peak를 보면 toxin peak 주변에 serine, glycine등의 여러 peak가 나타나고 있어 다른 종류의 microcystin을 생산할 가능성을 배제할 수 없으므로 NMR, FAB 질량 분석계 등을 이용한 구조 규명 연구를 통해 새로운 toxin의 존재를 확인할 필요가 있다.

일반적으로 남조류의 독성물질의 독성평가에는 mouse acute toxicity test가 가장 많이 사용되는 기법이다. 그러나 사람 세포를 대상으로 하여 세포 독성검사를 조사한 사례는 전혀 없다. 그래서 microcystin이 사람 세포에 대해서 어느 정도의 독성을 나타내는지를 확인하기 위해서 본 연구에서는 복합용매가 0.4%에서는 생육과정에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하여서 용매에 의한 영향은 배제하였다. Microcystin에 의한 NC-37 세포 독성을 확인한 결과, LC_{50} 이 0.4-0.8mg dry weight/ml로 나타났다.

이 결과는 박동¹⁾과도 같은 결과를 보여 주는 것이다. 이 정도의 결과를 LD_{50} 을 기준으로 보고된 자료와 비교해 보면 영국, 남아프리카의 경우보다는 30배, 5배 정도 적은 값이나, 일본의 Suwa호수의 경우보다 3배 정도 높고 스코틀랜드 보다는 5배 정도 많은 양이다. 따라서 독성물질의 농도가 높을수록 세포 생존율이 떨어지므로 사람 림프아 NC-37 세포가 microcystin에 의해서 생육과정에 큰 영향을 받는 것을 알 수 있다.

원암유전자(protooncogene) 및 암 유전자의 DNA 염기배열 순서와 분자구조 그리고 이들로부터 합

성되는 단백질의 구조에 대한 정보가 많이 보고되어 있으나 세포에서 일어나는 생명현상의 과정은 복잡하고 다양하다. 최근 연구 보고에 의하면 c-myc 원암유전자는 암발생 및 유지에 관여하고 있으며, 화학발암물질에 유도된 c-myc 유전자의 전사가 증가되었다고 보고하였다. 따라서 c-myc 유전자의 발암성은 여러 가지 요인에 의해 발생할 수 있을 것으로 생각되며 c-myc발현의 증가는 c-myc유전자 주위에 유전자의 증폭, 전위 또는 결손 등에 의해 일어나고 있다.³⁾ 본 연구에서는 간 독성물질인 microcystin에 의해 NC-37세포의 DNA에 변화가 있는지 확인하기 위해, microcystin을 투여한 조건에서 세포를 배양하여 그 세포의 DNA를 분리해 PCR기법으로 c-myc유전자 부위를 증폭시켰다. 그 결과 0.005 μ g농도(lane 2, 5)에서는 정상군과 microcystin 투여군의 양군에서 증폭의 차이를 발견할 수 없었지만, 0.0025 μ g농도(lane 3, 6)에서는 microcystin투여군에서 정상군에 비해 증폭이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 그러므로 c-myc 유전자의 형질전환에 microcystin이 영향을 주는 것으로 사료된다. 그러나 c-myc의 발현 정도는 정상군과 microcystin 투여군의 양군에서 발현의 차이를 발견할 수 없었다.

따라서 앞으로 분자 수준에서 생체내 microcystin의 작용기전에 관한 연구가 계속적으로 진행되어야 할 것이다.

결 론

낙동강의 녹조현상을 일으키는 남조류(*M. aeruginosa*)에서 column chromatography를 이용한 microcystin의 분리와 amino acid analyzer 분석으로 microcystin-type을 결정(동정)하며, 사람 림프아 NC-37세포에 microcystin을 농도별로 투여하여 배양해 세포 독성검사를 실시하였고, 간 독성물질에 의한 DNA의 변화를 관찰하기 위해 microcystin을 투여한 사람 림프아 NC-37 세포에서 c-myc 유전자의 변화를 중합효소 연쇄반응과 Northern blot으로 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 낙동강에서 채취한 남조류는 *Microcystis aerugi-*

nosa로 조사되었다.

2. Microcystin-type의 독성물질들을 추출 및 정제하기 위해서 butanol : methanol : water의 부피비가 5 : 20 : 75로 만든 혼합용매를 사용하여 column chromatography를 한 결과 peak를 나타내는 분획들을 얻었다.
3. Amino acid analyzer를 사용하여 microcystin-type의 독성물질의 아미노산 조성을 정성 분석한 결과 검출된 독성물질은 microcystin-LR type으로 조사되었다.
4. Microcystin에 의한 NC-37 세포의 세포 독성을 확인한 결과 LC_{50} 이 0.4-0.8mg dry weight/ml로 나타났다.
5. 0.8mg dried cell/ml농도의 microcystin을 투여한 NC-37세포에서 분리한 DNA를 c-myc을 포함하는 primer를 사용하여 증폭효소 연쇄반응의 정량적 기법으로 증폭하였을 때 증폭수율이 microcystin을 투여치 않은 정상대조군에 비해 감소되었다. 그러나 c-myc의 발현 정도는 정상군과 투여군의 양군에서 발현의 차이를 발견할 수 없었다.

이상의 결과로써 낙동강의 남조류는 *Microcystis aeruginosa*이며 microcystin-LR을 생산하고 사람 림프아 NC-37 세포에서 LC_{50} 0.4-0.8mg dry weight/ml의 독성을 보였고, microcystin-LR에 의한 NC-37세포의 c-myc 유전자의 변화가 있음을 알았다.

참 고 문 헌

1. 박미정, 서낙동강의 남조류가 생산하는 독성물질에 관한 연구, 인제대학교 대학원 석사논문, 1996
2. 정 준, 한국담수조류도감, 서울, 아카데미서적, 1993
3. 하봉준, Benzo(a)pyrene 독성에 의한 사람 림프아 세포(NC-37)의 c-myc 유전자 변화, 고신대학교 대학원 석사논문, 1994
4. 廣路弘幸 : 日本淡水藻圖鑑, 東京, 内田老鶴圃, 1981
5. Azevedo SMFO, Evans WR, Carmichael WW, Namikoshi M : First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. J Appl Phycol 6 : 261-265, 1994
6. Bishop CT, Anet EFL, Gorham PR : Isolation and identification of the fast death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. Can J Biochem Physiol 37 : 453-471, 1959
7. Blin N, Stafford DW : A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acid Res 3 : 2303-2308, 1976
8. Carmichael WW : Toxins of freshwater algae, In A.T.Tu(ed), New York, Marcel Dekker, 1988, 121-147
9. Carmichael WW, Saffermann RS : A status report on planktonic cyanobacteria (blue green algae) and their toxins. EPA 600 : 79-92, 1992
10. Carmichael WW : The toxins of cyanobacteria. Sci Am 270 : 78-86, 1994
11. Cho KJ, Chung IK, Lee JA : Seasonal dynamics of phytoplankton community in the Nakdong River Estuary, Korea. Korean J Phycol 8 : 15-28, 1993
12. Francis G : Poisonous Australian lake. Nature 18 : 11-12, 1878
13. Harada KI, Ogawa K, Matsuura K, Nagai H, Murata H, Suzuki M, Itezonmo Y, Nakayama N, Shirai M, Nakanq M : Isolation of the toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. Toxicon 29 : 479-489, 1991
14. Hermansky SJ, Stohs SJ, Eldeen ZM, Roche VF : Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. J Appl Toxicol 11 : 65-74, 1991
15. Jinno H, Ando M, Matsui S, Takeda M : Isolation of toxins from natural blue-green algae and unicellular cultured *Microcystis aeruginosa*. Env Toxi Chem 8 : 493-498, 1989
16. Kaya K, Watanabe MM : Microcystin composition

- of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *M. viridis*-containing waterblooms in Japanese freshwaters. J Appl Phycol 2 : 173-178, 1990
17. Komarek J : A review of waterbloom forming *Microcystis* species with regard to populations from Japan. Algological studies 64, Suppl. Bd. 92, Archiv f. Hydrobiologie, 1991, 115-127
18. Kondo F, Ikai Y, Oka H, Okumura M, Ishikawa N, Harada KI, Matsuura K, Murata H, Suzuki M : Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. Chem Res Toxicol 5 : 591-596, 1992
19. Krishnamurthy TL, Szafraniec DF, Hunt J, Shabanowitz JRY, Hauer CR, Chrmichael WW, Skulberg O, Codd GA, Missler S : Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue green algae by tandom mass spectrometry. Proc Natl Acid Sci U.S.A 86 : 770-774, 1989
20. Kungsuwan A, Noguchi T, Matsunaga S, Watanabe MF, Watanabe S, Hashimoto K : Properties of two toxins isolated from the blue green algae *Microcystis aeruginosa*. Toxicon 26 : 199-225, 1988
21. Lanaras T, Cook CM : Toxin extraction from an *Anabarenopsis milleri* dominated bloom. Sci Tot Env 142 : 163-169, 1994
22. Lawton LA, Edwards C, Codd GA : Extraction and Highperformance Liquid Chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated waters. Analyst 119 : 1525-1530, 1994
23. Lin JR, Chu FS : In vitro neutralization of the inhibitory effect of microcystin-LR to protein phosphatase 2A by antibody against the toxin. Toxicon 32 : 605-613, 1994
24. Luukkainen R, Sivonen K, Namikoshi M, Fardig M, Rinehart KL, Niemela SI : Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. Appl Environ Microbiol 59 : 2204-2209, 1993
25. Luukkainen R, Namikoshi M, Sivonen K, Rinehart K, Niemela SI : Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis* spp. structure of a new hepatotoxin. Toxicon 32 : 133-139, 1994
26. Namikoshi M, Reinhart KL, Sakai R, Stotts RR, Dahlem AM, Beasley VR, Carmichael WW, Evans WR : Identification of 12 hepatotoxins from Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and its cardiovascular effect. Environ Res 40 : 8-524, 1992
27. Namikoshi M, Rinerhart KL, Sakai R : Identification of *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis* and *Microcystis wesenbergii* : nine new microcystins. J Org Chem 57 : 866-872, 1992
28. Park HD, Watanabe MF, Harada KI, Nagai H, Suzuki M, Watanabe H, Hayashi H : Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strain of cyanobacteria from Japanese freshwaters. Nat Toxins 1 : 353-360, 1993
29. Park HK, Cheon SE, Park SE, Lee MH : Seasonal succession of phytoplankton in some artificial lakes of Korea. J KSWPRC 8 : 150-158, 1992
30. Rinehart K, Namikoshi M, Choi BW : Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). J Appl Phycol 6 : 159-176, 1994
31. Sivonen K, Carmichael WW, Namikoshi M, Rinehart KL, Dahlem AM, Niemela SI : Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. Appl Environ Microbiol 58 : 2495-2500, 1992
32. Sivonen K, Skulberg OM, Namikoshi M, Evans WR, Carmichael WW, Rinerhart KL : Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. Toxicon 30 : 1465-1471,

1992

33. Takenaka S, Tanaka Y : Decomposition of cyanobacterial microcystin by iron(III) chloride. Chemo 30 : 1-8, 1995
34. Tsuji K, Naito S, Kondo F, Ishikawa N, Watanabe MF, Suzuki M, Harada KI : Stability of microcystins from cyanobacteria effect of light on decomposition and isomerization. Environ Sci Technol 28 : 173-177, 1994a
35. Tsuji K, Naito S, Kondo F, Watanabe MF, Suzuki S, Nakazawa H, Suzuki M, Shimada T, Harada KI : A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. Toxicon 32 : 1251-1259, 1994b
36. Watanabe MF, Oishi S, Watanabe Y, Watanabe M : Strong probability of lethal toxicity in the blue green algae *Microcystis viridis*. Lemmermann. J Phycol 22 : 552-556, 1986
37. Watanabe MF, Harada KI, Matsura K, Oishi S, Watanabe Y, Suzuki M : Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species. Toxicity Assessment 4 : 487-497, 1989
38. Watanabe M, Harada KI, Hugi H : Waterblooms-Its appearance and toxins. Uni of Tokyo Press, 1994
39. Wicks RJ, Thiel PG : Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic African reservoir. Environ Sci Technol 24 : 1413-1418, 1990
40. Yagi O, Ohkubo N, Tomioka N, Okada M : Effect of irradiance and temperature on photosynthetic activity of the cyanobacterium *Microcystis* spp. Env Tech 15 : 389-394, 1994
41. Zhang Q, Carmichael WW, Yu M, Minjuan L, Li S : Cyclic peptide hepatotoxins from freshwater cyanobacterial waterblooms collected in Central China. Environ Toxicol Chem 10 : 313-321, 1991

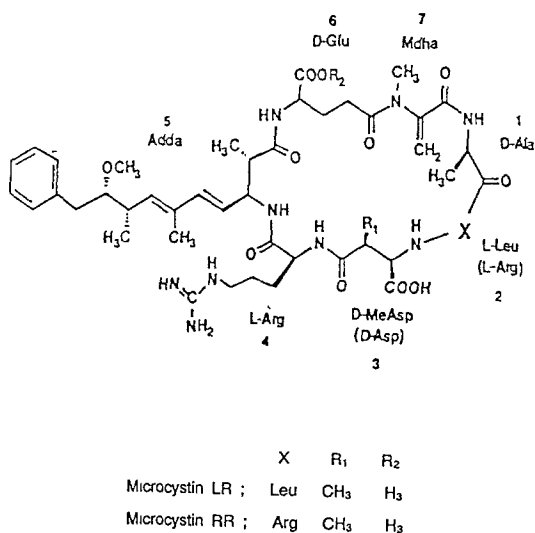


Fig. 1. Chemical structure of microcystin.

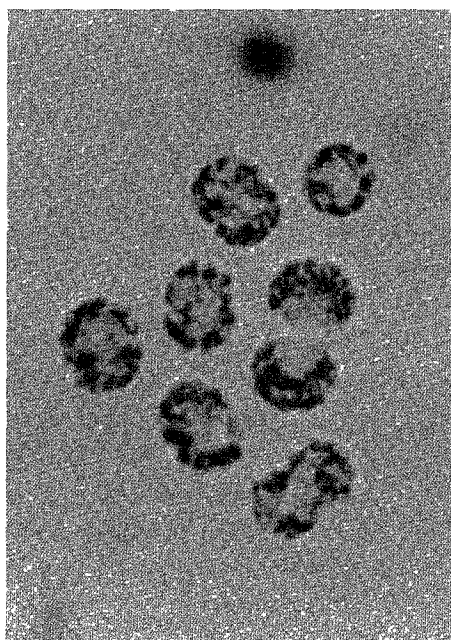


Fig. 2. The morphology of *Microcystis aeruginosa*. Nikon AFX-IIA microscope(10×100).

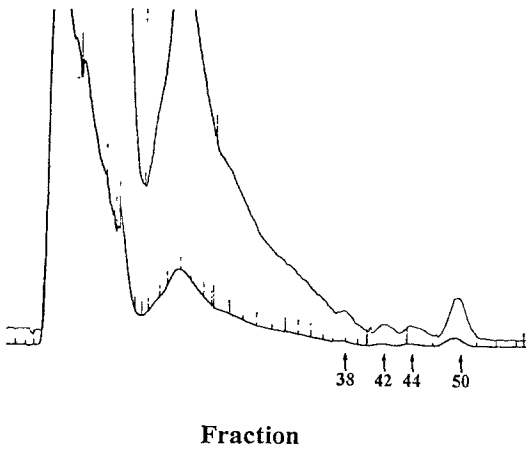


Fig. 3. Liquid chromatograms of extracts from toxin strains. column, Ultrogel AcA 202; elution solvent, 20% methanol; flow rate, 0.6ml/min; detector wavelength, 238 nm

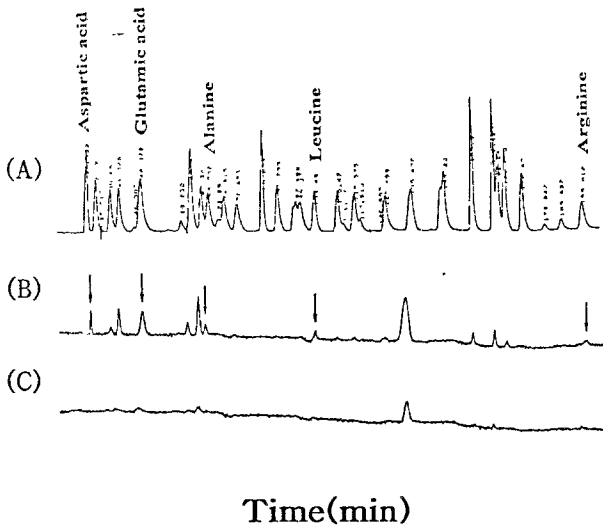


Fig. 4. Amino acid analysis chromatograms of physiological fluid standard(10nmols of most amino acid) and microcystin-type fraction. (A) physiological fluid standard(10nmols of most amino acid); (B) microcystin-type fraction 44; (C) microcystin-type fraction 50

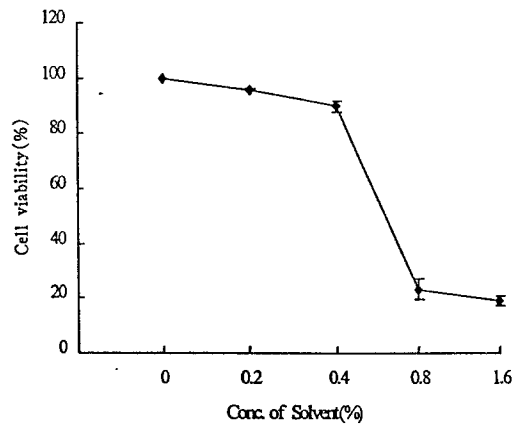


Fig. 5. The growth inhibitory effect of solvent mixture on NC-37 cell lines. Cells were suspended in complete medium at a levels of 1×10^3 cells/ml and exposed for 7 days to different concentrations of solvent mixture. solvent mixture; 1-butanol : methanol : D.W; 5% : 20% : 75% Each groups are mean $\pm$ S.D. of three independent determinations, expressed as a percentage of untreated control cells.

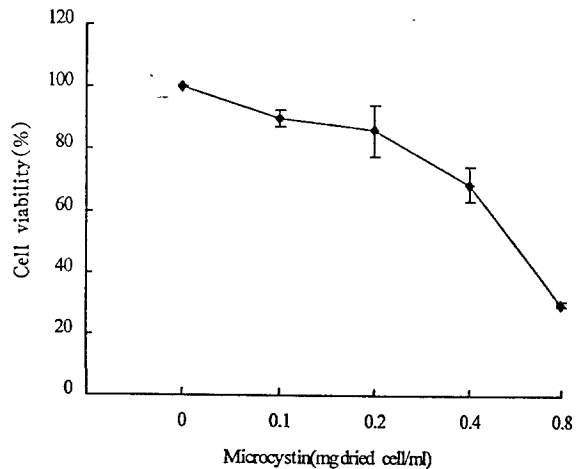


Fig. 6. The growth effect of various concentrations of microcystin on NC-37 cell lines. Cells were suspended in complete medium at a levels of 1×10^3 cells/ml and exposed for 7 days to different concentrations of microcystin. Each groups are mean $\pm$ S.D. of three independent determinations, expressed as a percentage of untreated control cells.

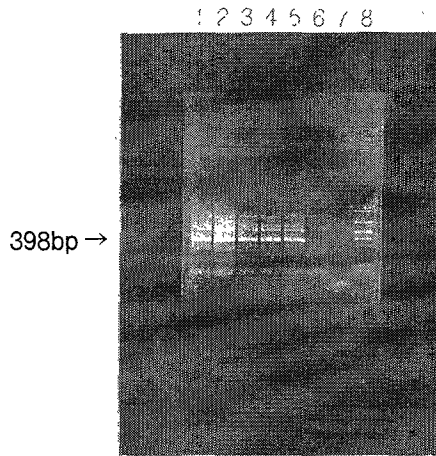


Fig. 7. PCR amplification of c-myc DNA of NC-37 cells treated with microcystin.

The amplified product was analyzed by electrophoresis through 1.2% agarose gel. Lane 1, control($1\mu\text{g}$) ; lane 2, control($0.005\mu\text{g}$) ; lane 3, control($0.0025\mu\text{g}$) ; lane 4, microcystin treated($1\mu\text{g}$) ; lane 5, microcystin treated($0.005\mu\text{g}$) ; lane 6, microcystin treated($0.0025\mu\text{g}$) ; lane 7, negative control ; lane 8, 1kb DNA ladder

Table 1. The sequence of primer used in this study

Primer set	Sequences(5'→3')	Product size
Sence	ATAAGCGCCCCTCCGGGTT	(398bp)
Antisense	TATTCGCTCCGGAGCTCCCT	

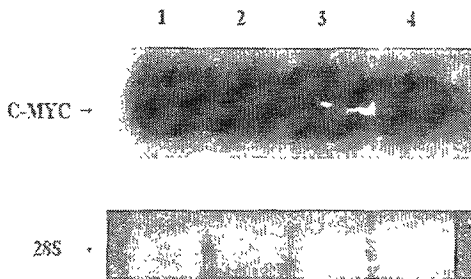


Fig. 8. Northern blot analysis of cytoplasmic RNA of NC-37 cells treated with microcystin.

The experiments were performed as described in "Materials and Methods". lane 1, Control RNA ; lane 2, microcystin($0.5\mu\text{g/ml}$) ; lane 3, microcystin($1\mu\text{g/ml}$) ; lane 4, microcystin($2\mu\text{g/ml}$)