

해조류 내 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 측정

유 종 수* · 천 명 수¹ · 김 남 길²

한국해양대학교 해양과학기술연구소,
¹가톨릭의과대학 의과학연구원 암연구소, ²경상대학교 양식학과

Determination of Na^+ Channel Blocker in Seaweed

Jong Su Yoo*, Byeung Soo Cheun¹ and Nam-Gil Kim²

Research Institute of Marine Science and Technology, Korea Maritime University,
Pusan 606-791, Korea, ¹Catholic Research Institute of Medical Science,
Research Institute of Cancer, Catholic University, Seoul 137-701, Korea, ²Department of Aquaculture,
Gyeongsang National University, Tongyoung, Kyongnam 650-160, Korea

Abstract – A tissue biosensor was developed for the continuous determination of Na^+ channel blockers. The proposed sensor was applied to the determination of Na^+ channel blockers in seaweed. It was found that Na^+ channel blocker content displayed seasonal variation; it was high from February to April and decreased thereafter (May~August). From these results the present proposed method may be used for high sensitive determination of Na^+ channel blockers contained in the seaweed organisms and environments. Therefore, it may be important to monitor Na^+ channel blocker content of seaweed throughout the year.

Key words : Seaweed, Na^+ channel blocker, Biosensor

서 론

바다에 생육하고 있는 해조류에는 지구상에 알려진 많은 원소들이 축적되어 있다고 알려져 있다. 특히 해조류는 이들 원소를 표면 전체로부터 흡수하여 수배에서 수만배에 이르기까지 농축함으로 미네랄의 보고라고도 불려지고 있다(Ikegami *et al.* 1979).

일반적으로 해조류는 β -carotene보다도 많은 황성산소를 가지며, 소독 작용이 있어 항암 효과가 강한 것으로 보고되고 있다. 또한 해조류 특유의 점질 다당류는

수용성 섬유질로서 적은 양이라도 생리 활성이 높고, 아르진산, 미네랄, 특히 나트륨이온을 섭취 할 경우 해조류에 포함된 아르진산이 나트륨이온을 흡착시켜 배설시켜 주므로 혈압 상승을 억제한다. 아르진산은 임상적으로 자혈작용과 소화관 상피 세포 보호에까지 널리 쓰이고 있다(Shiomi *et al.* 1982).

조직센서(Biosensor)를 이용한 Na^+ 채널 차단물질의 측정에 관한 연구는 복어, 패류 등 유용 어패류의 독성 검사, 유독플랑크톤에 의한 독화기작 해석, 한약 재료에 대한 Na^+ 채널 차단 생리활성 물질의 탐색에 대한 연구가 있으며, 해조류에 관한 연구는 방사무늬 김(*Porphyra yezoensis*)의 Na^+ 채널 차단 생리활성 물질의 존재에 대한 연구가 있을 뿐이다(Cheun *et al.* 1997, 1998a, b, c;

*Corresponding author: Jong Su Yoo, Tel. 051-410-4107,
Fax. 051-404-3538, E-mail. jsyoo@hanara.kmaritime.ac.kr

Lee *et al.* 2000). 이러한 Na^+ 채널 차단 생리활성 물질 등은 단지 유독생물이 먹이연쇄에 의해 비펩티드성 신경성 독으로 Na^+ 채널에 특수하게 작용 한 것으로만 보고되었지만(Nagashima *et al.* 1988), 우리 선조들은 예전부터 이러한 독성분들을 이용해서 신경성 약으로 사용해 왔으며, 본 연구진은 생물체에 존재하는 미량 성분들의 추적에 많은 관심을 갖게 되었다. 최근에는 국내외적으로 자연에서 채취한 TTX(tetrodotoxin), STX(saxitoxin), GTX(gonyautoxin) 등의 독성분을 이용한 신경성 신약 개발 뿐 아니라 해양생물로부터 신물질 및 유용물질 개발에 활발한 연구가 진행 중에 있다(KORDI 1997). 따라서 본 연구는 해조류 내 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 존재를 확인함으로써 해조류를 이용한 신성분 개발의 기초자료를 확보할 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

본 연구는 1998년에서 1999년 사이에 일본 千葉縣(Chiba-ken)의 千倉(Chikura)와 館山(Tateyama), 靜岡縣(Shizuoka-ken)의 下田(Simoda), 新潟縣 Niigata-ken의 栗島(Awasima), 福井縣(Fukui-ken)의 三國(Mikuni), 京都(Kyoto), 佐賀縣(Saga-ken), 沖繩縣(Okinawa-ken)의 奄美大島(Amamioosima)와 沖繩 본섬 등 9개 지역에서 채집된 해조류를 냉장 운반 후 실험실에서 종을 동정, 분리하여 분석에 이용하였다(Fig. 1). 분석에 사용한 해조류는 녹조류 13종, 갈조류 42종, 홍조류 36종으로 총 91종이었다(Table I).

1. Chiba-ken Chikura
2. Chiba-ken Tateyama
3. Shizuoka-ken Simoda
4. Niigata-ken Awasima
5. Fukui-ken Mikuni
6. Kyoto
7. Saga-ken
8. Okinawa-ken Amamioosima
9. Okinawa-ken



Fig. 1. Map showing the sampling stations in Japan.

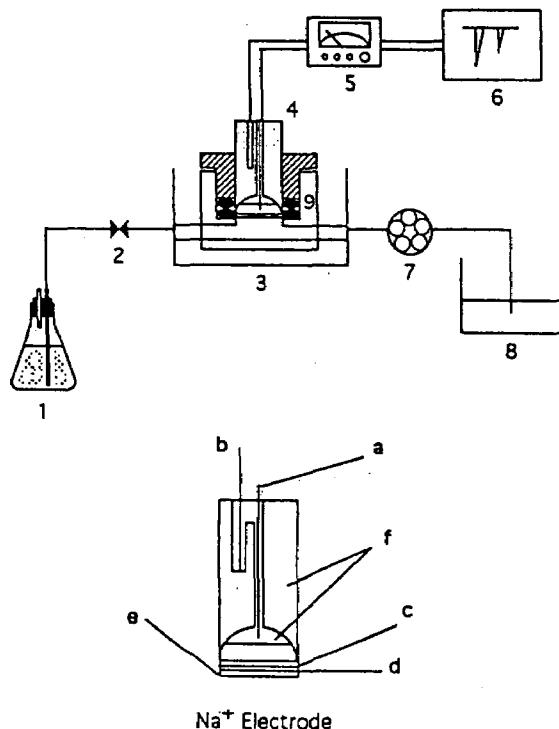


Fig. 2. Schematic diagram of the tissue biosensor flow system used for determination of GTX, STX and TTX toxicity. 1, 8% NaCl (pH 4.8) tank; 2, injection port; 3, thermostatically controlled bath; 4, Na^+ electrode; 5, electrometer; 6, recorder; 7, peristaltic pump; 8, 10 N NaOH reservoir. a, working electrode; b, reference electrode; c, cellulose acetate membrane; d, frog bladder membrane; e, cellulose acetate membrane; f, 1 N NH_4Cl .

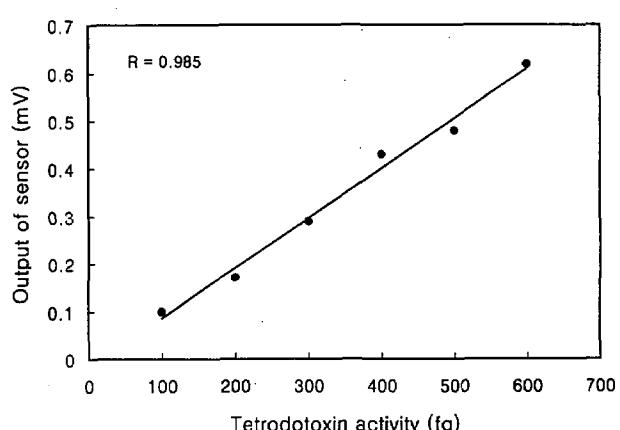
Table 1. A list of marine algal species detected Na^+ channel blocker

CHLOROPHYTA (13)	Myagropsis myagroides Myelophycus simplex Pachydictyon coriaceum Padina arborescens Padina minor Punctaria latifolia Sarcodina ceylanica Scytosiphon lomentaria Sphaerotrichia divaricata Spatoglossum crassum Spatoglossum pacificum Undaria peterseniana Undaria pinnatifida Sargassum confusum Sargassum hemiphyllum Sargassum horneri Sargassum kjellmanianum Sargassum micracanthum Sargassum nigri folium Sargassum nipponicum Sargassum patens Sargassum pilulariferum Sargassum ringgoldianum Sargassum serratifolium Sargassum yamadae Sargassum yamamotoi Sargassum yendoi	Ceratodicyon spongiosum Chondracanthus tenellus Chondrus crispus Chondrus elatus Chondrus ocellatus Chondrus verrucosus Cladophoropsis vaucheriaeformis Galaxaura falcata Galaxaura fastigiata Galaxaura subfruticulosa Gelidium elegans Gelidium pacificum Gracilaria incurvata Gracilaria textorii Grateloupia filicina Grateloupia livida Grateloupia sparsa Hypnea charoides Hypnea pannosa Hypnea saidana Laurencia okamurae Laurencia undulata Liagora caenomyce Liagora farinosa Liagora japonica Lomentaria catenata Martensia denticulata Mastocarpus mamillosus Meristotheca papulosa Pachymeniopsis lanceolata Pseudogloioptoea okamurae Scinaia japonica Solieria pacifica
PHAEOPHYTA (42)	RHODOPHYTA (36)	Actinotrichia fragilis Ahnfeltiopsis paradoxa Carpopeltis prolifera

한편 성장 시기에 따른 해조류 내 Na^+ 채널 차단 생리 활성물질의 함유량 차이를 파악하기 위하여 千葉縣 千倉에서 유용 해조류인 감태 (*Ecklonia cava*), 대황 (*Eisenia bicyclis*), 톳 (*Hizikia fusiformis*), 진두발 (*Chondrus ocellatus*), 가는참우뭇가사리 (*Gelidium elegans*)를 대상으로 2월, 4월, 5월, 6월에 채집 분석하였다.

해조류 시료 조정법은 해조류를 종별로 1g씩 측정 분리해서, 하나는 500 ml 비이커에 넣어 반복해서 약 5시간 정도 인공해수에 잘 씻은 것과, 다른 시료는 현장에서 운반된 상태로 비이커에 담았다. 각 시료에 0.1 N HCl 용액 26 ml씩 넣고 100°C에서 10분간 가열한 후 실온에 냉각시켰다. 시료는 센서의 이송 용액 (NaCl 8%)과 똑같은 농도로 조절 한 뒤 이것을 다시 4,000 rpm으로 5분간 원심분리해서 10 N KOH 용액으로 pH를 이송 액 (pH 4.8)과 똑같이 조절한 것을 사용했다 (Cheun et al. 1998b).

Na^+ 채널 차단 물질 센서 제작에서 개구리 방광막 처리, Na^+ 전극 및 Na^+ 채널 차단 물질 측정용 센서 등의 제작에서 센서의 영향이 있는 측정 조건은 Cheun et al.

**Fig. 3.** Standard calibration curve for determination of tetrodotoxin (TTX) in the tissue biosensor.

(1997)의 방법을 따랐다. Na^+ 채널 차단 생리활성물질 측정용 시스템으로는 NaCl 용액용기, 개구리 방광막을 장착시킨 Na^+ 전극, 페리스타펌프, 레코더 등으로 구성되어 있다 (Fig. 2). 8% NaCl 용액을 이송한 후 출력이

안정된 상태에서 시료를 50 μl 주입시킨 다음, 센서 출력 변화량으로 Na^+ 채널 차단 생리활성 물질을 측정해서 pg wet g^{-1} 로 나타냈다.

실험에 사용한 해조류의 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 측정은 TTX 검출선을 기준으로 온도 30°C, pH 4.8, 유속 0.8 ml/min, NaCl 농도 8%의 조건하에서 측정하였다(Fig. 3).

결과 및 고찰

분석에 사용된 해조류 중에서 본 센서에 전혀 반응이 없었던 종은 녹조류 2종(*Enteromorpha linza*, *Valoniopsis pachynema*), 갈조류 14종(*Chnoospora implexa*, *Chorda filum*, *Colpomenia bulbosa*, *Petalonia binghamiae*, *Eckonia stolonifera*, *Eisenia bicyclis*, *Myelophycus simplex*, *Pachydictyon coriaceum*, *Scytoniphon lomentaria*, *Undaria peterseniana*, *Sargassum confusum*, *S. kjellianum*, *S. nipponicum*, *S. yendoi*), 홍조류 18종(*Ahnfeltiopsis paradoxa*, *Chondrus crispus*, *C. elatus*, *C. verrucosus*, *Gracilaria incurvata*, *G. textorii*, *G. livida*, *Hypnea charoides*, *H. pannosa*, *H. saidana*, *Laurencia okamurae*, *L. undulata*, *Liagora caenomyce*, *Lomentaria catenata*, *Martensia denticulata*, *Mastocarpus mamillosus*, *Pseudogloioiploea ikamurae*, *Solieria pacifica*)으로 총 34종이었다. Na^+ 채널 차단 생리활성물질이 30 pg wet g^{-1} 이상 검출된 종은 갈조류 2종(*Hizikia fusiformis*, *Undaria pinnatifida*)과 홍조류 1종(*Gelidium ele-*

gans)으로 총 3종이었고, 5 pg wet g^{-1} 이상 검출된 종은 녹조류 7종, 갈조류 18종, 홍조류 10종으로 총 35종이었다(Fig. 4). 한편, 현장에서 채집한 시료를 바로 사용한 것과 인공해수에서 세정한 시료의 비교 실험에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났는데, 이 결과로 미루어 볼 때 해조류 내 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 존재가 유독 플랑크톤 또는 박테리아와 같은 생물의 부착으로 발생한 결과가 아니라 해조류의 구성성분 또는 물질대사 과정에서 만들어진 것임을 알 수 있었다.

비교적 많은 양이 검출된 미역(*Undaria pinnatifida*)과 톳(*Hizikia fusiformis*)에는 아라기돈산이 주성분인데, 아라기돈산은 Na^+ 채널 차단에는 직접적으로 관여하지 않는 것으로 볼 때, 다른 어떤 성분이 Na^+ 채널에 작용할 가능성이 있다고 생각된다. 해조류는 인간의 영양과정에서 다량의 Na^+ 이온을 흡착시켜 배설함으로 혈압상승을 억제시킨다고 보고된 바 있는데(Shiomii et al. 1997), 만일 해조류가 Na^+ 채널 차단물질에 가역적으로 작용한다면 해조류를 이용한 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 추출은 보전의약적으로 중요한 의미를 갖게 된다.

본 연구에서 Na^+ 채널 차단 생리활성 물질이 측정된 해조류 내 농도는 인간의 식생활에 무해한 극미량의 농도이지만, 간접적으로 인체의 생리활성에 긍정적인 영향을 줄 수도 있어 건강식 개발 등에도 이용 가치가 높은 것으로 생각된다.

한편, 성장시기에 따른 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 차이는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 감태(*Ecklonia*

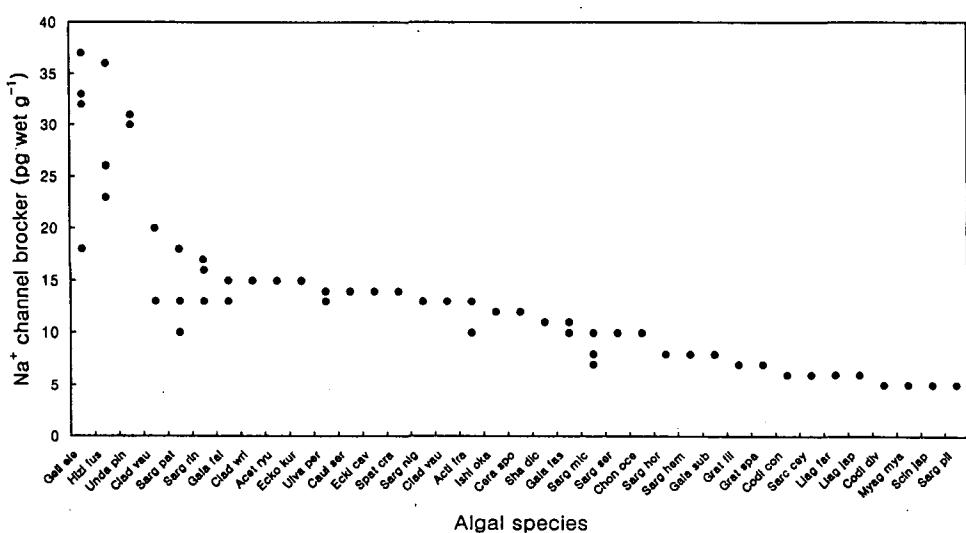


Fig. 4. The Na^+ channel blocker contents in the seaweed collected in all study sites (Chiba-ken Chikura, Chiba-ken Tateyama, Shizuoka-ken Simoda, Niigata-ken Awasima, Fukui-ken Mikuni, Kyoto, Saga-ken, Okinawa-ken Amamiosima, Okinawa-ken in Japan).

cava)와 대황 (*Eisenia bicyclis*)은 10 pg wet g^{-1} 전후로 시기별 차이는 거의 없었고, 가는참우뭇가사리 (*Gelidium elegans*)는 조사시기별로 20~40 pg wet g^{-1} 높은 값을 보였으며, 톳 (*Hizikia fusiformis*)과 진두발 (*Chondrus ocellatus*)은 2월에 30 pg wet g^{-1} 전후로 높았으나 4월, 5월, 6월로 가면서 낮아지는 경향을 보였다. 이상의 결과에서 2~4월은 다른 시기에 비하여 해조류의 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 양이 대체로 높은 것으로 나타났는데, 이는 일반적으로 이러한 시기에 해조류가 최대로 성장한 후 성숙하여 생식세포를 형성한다고 하는 것과 높은 상관성이 있을 것으로 생각된다 (Hori 1993a, b). 이

와 같이 계절에 따른 해조류 생리활성 물질의 양 변화는 해양 생태계에서 해조류의 종족유지를 위한 생리적 방어물질로 포식자에 대한 종 보호 기구로서 작용할 수 있음을 나타내며 (Shiraishi et al. 1990, 1991a, b, 1992), 이는 Taniguchi et al. (1992a, b)에 의해서도 확인되고 있다. 또 한편으로 번식시기에 생식세포를 만들기 위한 특수 영양성분의 물질을 축적시키기 위한 것으로도 해석되고 있는데, 해조류의 생식세포 형성, 방출기에 다양으로 존재하는 생리활성물질의 양과 시기별 변동은 생리 활성물질 연구의 중요한 과제로 생각된다.

해조류의 Na^+ 채널 차단 생리활성 물질 연구에 본 Na^+ 채널 차단물질 측정용 조직센서를 이용한다면, 해조류 중 Na^+ 채널에 특이하게 작용하는 생리활성 물질의 미량 성분 탐색에 중요한 역할을 하리라 생각한다. 특히 포자번식이 일어날 때 해조류는 양분 축적에 생리적 변화를 일으킬 것으로 예상된다. 한편 선박에 의한 중유 유출 사고가 있었던 福井縣 三國에서 유류오염 직후에 채집·측정한 해조류에서는 종별로 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 범위가 3~32 pg wet g^{-1} 전로 기타 지역과 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보아 유류오염에 대한 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 변화는 없는 것으로 보인다.

Na^+ 채널 차단 생리활성물질은 녹조류보다 갈조류, 홍조류에서 많이 검출되었는데, 특히 녹조류의 대다디말류 (*Cladophora*), 갈조류의 미역 (*Undaria pinnatifida*), 톳 (*Hizikia fusiformis*), 감태류 (*Ecklonia*), 모자반류 (*Sargassum*) 그리고 홍조류에서는 가는참우뭇가사리 (*Gelidium elegans*), 갈라가리류 (*Galaxaura*) 등에서 상대적으로 높은 농도가 함유되어 있음을 알 수 있었다. 이로 미루어 볼 때 Na^+ 채널 차단 생리활성물질이 많은 해조류는 조하대 또는 조간대 하부에 주로 생육하는 종으로 해수와의 물질교환이 활발한 환경에 있는 것과 무관하지 않으며, 각 종의 성장 시기와도 깊은 관계가 있는 것으로 생각된다. 따라서 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 변화를 보다 정확히 파악하기 위해서는 대상 종의 전 생활사를 통한 변동 주기와 서식 환경요인 등에 대한 상관성을 보다 정확히 파악하는 연구가 필요하다. 또한 해조류의 어떤 성분이 Na^+ 채널을 차단하는가 하는 것을 구명하는 일은 해조류 생체내 포함된 생리활성물질을 이용하는데 가장 중요한 연구 분야로 생각된다.

적 요

조직센서는 극 미량의 Na^+ 채널 차단 물질을 측정하기 위해 개발된 고감도 측정 장치로 해조류 내 Na^+ 채

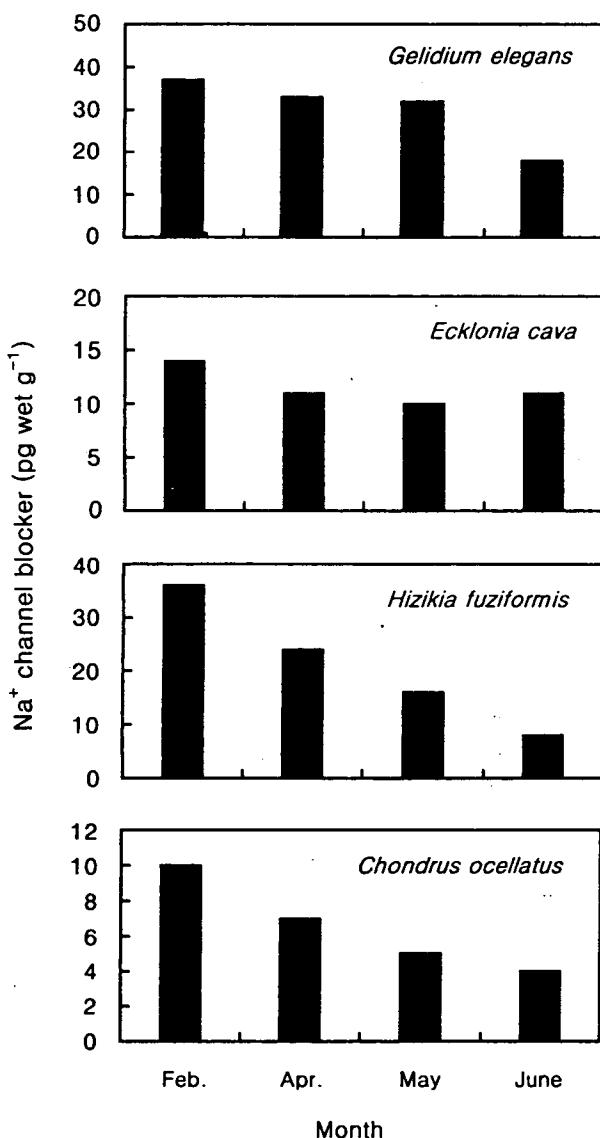


Fig. 5. Monthly fluctuation of the Na^+ channel blocker (pg wet g^{-1}) in the seaweed from Chiba-ken Chi-kura.

널 차단 생리활성물질의 양을 측정하기에 적합하였다. 본 연구는 해조류 내 Na^+ 채널 차단 생리활성물질의 존재를 확인 함으로써 해조류를 이용한 신성분 개발의 기초자료를 확보할 목적으로 수행되었다. 분석에 사용된 해조류는 총 92종으로 녹조류 13종, 갈조류 42종, 홍조류 37종으로, 주요 해조류 내 Na^+ 채널 차단 생리활성물질은 대체로 수온이 낮은 시기에 더 높은 값을 나타내었다. 이 결과로 볼 때 종특성과 환경이 생리활성물질의 농도에 영향을 주는 것으로 생각되고, 각 종에 대한 생활사 변화와 환경특성에 대한 상관성 연구가 필요한 것을 나타났다.

인용 문헌

- Cheun BS, H Endo, T Hayashi, KS Kim and E Watanabe. 1997. Storage conditions of the frog bladder membrane on using for the Na^+ channel blocker sensor. *Fisheries Science* 63:616-620.
- Cheun BS, JS Yoo, T Suzuki and E Watanabe. 1998c. Tissue biosensor for determination of Na^+ channel blocker in Chinese drug and seaweed (*Porphyra yezoensis* Ueda). *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13:1-6. (in Korean).
- Cheun BS, M Loughran, T Hayashi, Y Nagashima and E Watanabe. 1998a. Use of a channel biosensor for the assay of paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 36:1371-1381.
- Cheun BS, S Takagi, Y Nagashima, T Hayashi and E Watanabe. 1998b. Determination of Na^+ channel blockers in paralytic shellfish toxins and pufferfish toxins with a tissue biosensor. *J. Natural Toxins* 7:109-120.
- Hori T. 1993a. An Illustrated Atlas of the Life History of Algae. Vol. 1. Green Algae. Uchida Rokakuho Publ. Co. Ltd., Tokyo. 367pp.
- Hori T. 1993b. An Illustrated Atlas of the Life History of Algae. Vol. 2. Brown and Red Algae. Uchida Rokakuho Publ. Co. Ltd., Tokyo. 345pp.
- Ikegami C, TT Kato, K Toto. 1979. Use Value of Marine Organism. Kaiso Kagaishi shupan Co. pp. 41-80.
- KORDI. 1997. A Study on the Development of Novel and Biomedically Available Substances from Marine Organisms. BSPN 00317-952-4. 318pp. (in Korean)
- Lee HO, BS Cheun, E Watanabe and MS Han. 2000. Comparison of HPLC analysis and a channel biosensor in the Detection of PSP toxin in natural *Alexandrium tamarense* population. *Algae* 15:61-64.
- Nagashima Y, Y Noguchi and K Hasimoto. 1988. Detection of paralytic shellfish poisons by HPLC. pp.311-318. In *Mycotoxins and Phycotoxins* (Natori S, K Hashimoto and Y Ueno eds.). Elsevier. Amsterdam.
- Shioi K, H Inaoka, H Yamanak and T Kikuchi. 1982. Occurrence of a large amount of gonyautoxins in a xanthid crab *Atergatis floridus* from Chiba. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48:1407-1410.
- Shiraishi K, K Taniguchi, K Kurata and M Suzuki. 1990. Effects of methanol extracts from the brown alga *Dilophus okamurae* on avoidance behavior of young abalone (*Haliotis discus hannai*). *Bull. Tohoku Natl. Fish. Res. Inst.* 52:13-15. (in Japanese)
- Shiraishi K, K Taniguchi, K Kurata and M Suzuki. 1991a. Effects of methanol extracts from the brown alga *Dictyopteris divaricata* on feeding by the sea urchin *Strongylocentrotus nudus* and the abalone *Haliotis discus hannai*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57:1945-1948. (in Japanese)
- Shiraishi K, K Taniguchi, K Kurata and M Suzuki. 1991b. Feeding-detergent effects of methanol extract from the brown alga *Dilophus okamurae* against the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57:1591-1595. (in Japanese)
- Shiraishi K, K Taniguchi, K Kurata and M Suzuki. 1992. Feeding-detergent effects of methanol extract from the brown alga *Dictyopteris divaricata* against two herbivorous snails. *Bull. Tohoku Natl. Fish. Res. Inst.* 52: 103-106. (in Japanese)
- Taniguchi K, K Kurata, and M Suzuki. 1992b. Feeding-detergent activity of some Laminariaceous brown alga against the Ezo-abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 577-581. (in Japanese)
- Taniguchi K, Y Akimoto, K Kurata and M Suzuki. 1992a. Chemical defense mechanism of the brown alga *Eisenia bicyclis* against marine herbivores. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58:571-575. (in Japanese)

(Received 20 February 2001, accepted 6 April 2001)