약학회지 제40권 제6호 690~696(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 6

F9 기형암종 세포에 대한 해양천연물질의 분화 유도 작용

김리라 · 백진현 · 조용진* · 손병화* · 최홍대** · 김규원#
부산대학교 분자생물학과, *부산수산대학교 화학과, **동의대학교 화학과

(Received October 20, 1996)

Differentiation Effect of Marine Natural Compounds on F9 Teratocarcinoma Stem Cells

Li La Kim, Jin Hyen Baek , Yong Jin Cho*, Byung Wha Son*, Hong Dae Choi** and Kyu-Won Kim#
Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
**Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea*
***Department of Chemistry, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea*

Abstract—It has been known that many kinds of cancer are caused by continued proliferation or abnormal differentiation. Thus, recent approaches to anticancer therapy have been focused on developing drugs that induce differentiation of cancer cells to normal cells. A typical differentiation agent, all *trans*-retinoic acid, is unsuitable for anticancer drug because all *trans*-retinoic acid produces unfavorable side effects and cytotoxicity in normal cells. Therefore, we have screened some new differentiation- inducing compounds obtained from marine organisms using F9 teratocarcinoma stem cells as a model system. We observed that fatty acid, glycolipid, saponin, sphingosine and sterol compounds of marine organisms had differentiation-inducing activity in F9 cells, were determined by morphological changes and Northern blot analysis. The expression of differentiation marker genes, such as laminin B1, type IV collagen and retinoic acid receptor β were induced by treatment with those compounds.

Keywords □ differentiation, F9 teratocarcinoma stem cell, marine natural compounds.

많은 종류의 암들이 세포의 비정상적인 분화 혹은 분화의 중지에 의해 발생되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 암의 특성을 이용한 암 치료법들이 현재 개발되어 임상에 적용되고 있다. 즉 미분화상태인 암세포의 분화를 유도하여 암을 치료할려는 암세포 분화제의 개발 연구가 활발히 진행이 되고 있다. 그러나 현재까지 알려진 대부분의 분화제들은 항암효과 외에 정상세포에 대한 세포독성 등의 부작용이 매우 강한 것으로 알려져 있다. 대표적인 분화제인 all-*trans*-retinoic acid도 부작용이 매우 강하여, 비교적 부작용이 적은 유도체들에 대한 연구가 심도있게 추진되고 있다. 따라서 암세포에 대한 분화유도 효과는 뛰어나면서 부작용이 적은 새로운 암세포 분화제의 탐색이 필요한 상태이다.

해양생물은 50만종 이상의 풍부한 종류와 해수라는 특이한 환경에 적응하여 생존하므로 암세포의 분화유도 효과를 가지는 새로운 천연물의 개발연구에 좋은 대상이 되고 있다. 즉 해양생물은 그 진화 과정에서 육상생물과는 극히 다른 대사계 혹은 생체 방어계를 가지며 육상생물이 갖지 않은 많은 천연화합물을 보유하고 있다. 지금까지 해양생물로부터 4,000종류 이상의 새로운 화합물이 발견되었으며[1], 이들 중 고리상 펩티드인 didemnin B[2]는 뛰어난 항암효과를 보여 새로운 항암제로 주목받는 해양 천연화합물이다.

한편 F9 teratocarcinoma stem 세포는 암세포 분화제를 검색하는 연구에 좋은 모델이다. 분화가 유도된

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 051-510-2277 (팩스) 051-513-9258

F9 세포는 미분화 상태에 비해 뚜렷한 형태적인 변화와 특정 단백질들의 발현 변화가 두드러지게 나타난다. retinoic acid(RA) 만을 단독으로 처리하면 primitive endoderm과 유사한 세포로 분화되며, RA와 cyclic AMP를 함께 처리하면 parietal endoderm 유사 세포로 분화된다.[3] 이 과정에서 기초막(basement membrane) 단백질인 laminin B1과 type IV collagen, plasminogen activator, H-2 antigen, 그리고 성장인자 수용체등 여러 종류의 단백질 합성이 현저하게 증가됨이 보고되어 있다.[4,5,6,7,8] 이러한 F9 세포의 분화과정에 수반되는 비가역적인 형태변화와 특정 단백질의 발현증가를 지표로 하여 F9 세포에 대한 분화유도 효과를 갖는 물질들을 검색할 수 있다.[9]

본 연구에서는 분화에 따른 F9 세포의 형태 변화와 laminin B1 및 type IV collagen 등 분화관련 유전자의 발현을 표식자로 하고 해양생물로부터 분리한 시료를 대상으로 하여 새로운 분화인자를 검색하였다. 또 검색한 분화인자들의 분화유도 기작을 규명하기 위하여 세포내에 존재하는 retinoic acid receptor(RAR) β[10]와 glucocorticoid receptor(GR)와의 관련성을 조사하였다.

실험 재료 및 방법

시약 및 기구 - F9 teratocarcinoma stem cell은 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS) 및 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 Gibco BRL에서 구입하였고, 배양용기는 Corning, 제한효소는 Promega에서 구입하였다. 그리고 [α-^{32}P] dCTP는 Amersham에서 구입하였고, 다른 시약들은 Sigma Chemical Co. 에서 구입하였다.

실험재료 - 여수(예교), 충무(장도 및 필도), 진해(안골) 및 거제도(지세포) 근해에서 채집한 해조류(2종), 극피동물(2종) 및 연체동물(2종)의 각 시료를 세절한 후, 아세톤 및 메탄올로 실온에서 24시간 냉침하여 얻은 엑스를 EtOAc과 H_2O로 분배하여 지용성 분획(EtOAc 엑스)과 수용성 분획을 얻었다. 수용성 분획을 다시 *n*-BuOH로서 추출하여 *n*-BuOH엑스를 조제하였고, 이렇게 조제된 각 엑스를 silica gel column chromatography로 분획 후 분리 정제하여, 홍조 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*)로부터 지방산(GV-4)[11], 당지질(GV-5, GV-6)[11,12], 당-아미노산 분획(GV-B-9, GV-B-11)을, 갈조 지충이(*Sargassum thunbergii*)로부터 지방산(ST-3)과 당지질(ST-6)[13]을, 극피동물인 해삼(*Stichopus japonicus*)으로부터 당-아미노산 분획(HA-2, HA-3) 및 사포닌 분획(SJ-P)을, 별불가사리(*Asterina pectinifera*) 로부터 사포닌 분획(AP-B-2)을, 연체동물 진주담치(*Mytilus edulis*)로부터 sphingosine분획(ME-B) 및 sterol(ME-EA-S)을, 피조개(*Anadara broughtonii*)로부터 sterol [AB-EA-S(1), AB-EA-S(2)]를 각각 얻었다.

F9 세포의 배양조건 - F9 세포는 10% FBS을 첨가한 DMEM에 1% Penicillin- Streptomycin을 첨가한 배지에서 배양하였다. 배양용기는 0.3% gelatin으로 2시간 이상 표면처리 한 후 사용하였고, 37°C 포화습도로 유지되는 5% CO_2 배양기에서 단층배양하면서 0.05% trypsin-EDTA로 3일마다 계대배양하였다. Passage가 높으면 자발적인 분화가 일어나므로 passage가 5 이하인 세포만 사용하였다. 이렇게 배양한 F9 세포는 2~3일에 한번씩 배지를 교환하였으며, 시료가 처리된 경우 배지를 교환할 때마다 시료와 cyclic AMP를 동시에 다시 처리하였다. 이러한 방법으로 6~7일간 배양하여 F9 세포의 분화유도여부를 위상차 현미경을 통해 관찰하였다.

해양천연물질의 F9 세포에 대한 형태적 분화유도 작용 검색 - 12 well 배양 플라스크에 2×10^4개/m*l*의 비율로 세포를 키운 다음, well당 2 m*l*의 배지를 첨가하고, 검색 할 시료를 여러 농도구배로 F9 세포에 처리하여 CO_2 배양기에서 배양하면서 그 형태변화를 위상차 현미경 하에서 관찰하였다. 세포의 모양관찰에 의해 분화유도 효과가 예상되는 물질을 대상으로 각 물질의 효과가 관찰된 농도에서 dibutyl cyclic AMP와 theophylline(CT) 을 동시에 처리하여 분화를 촉진시켰다. CT 자체로는 F9세포에 대하여 분화유도 작용이 없으나 RA에 의한 분화를 촉진하여 결과적으로 세포의 형태변화를 보다 더 명확하게 관찰할 수 있다. 따라서 RA와 CT에 의한 F9 세포의 분화를 지표로 하여 해양천연물과 CT를 동시에 처리한 F9 세포의 형태변화를 관찰하므로써 분화유도 활성을 갖는 물질들을 검색하였다.

해양천연 물질을 처리한 F9 세포로부터 전체 RNA의 분리 - 12 well 배양 플라스크에서 효과가 있다고 예상되는 물질은 T75 배양플라스크(75 mm^2)에서 6~7일간 배양한 뒤 Acid-Guanidine-Phenol-Chloroform 방법[14]에 따라 total cellular RNA를 분리하였다.

분화 표지 유전자의 발현을 위한 Northern Hybridization 실시 – 분리한 RNA는 260 nm에서 30 μg의 농도로 정량한 다음 3.3배의 65% deionized formamide, 8.1% formamide, 8.1% formaldehyde 및 1.3×MOPS(3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid)를 포함한 완충액에 섞어 65°C에서 5분 동안 변성시켰다. 그리고 1% formaldehyde-agarose 겔(6.2% formaldehyde, 1×MOPS running buffer 및 ethidium bromide를 포함한 겔) 상에서 전기영동을 행하였다. 전기영동은 1×MOPS 완충액 조건에서 80 mA로 3시간 동안 실시하였다. 그런 다음, nylon membrane에 transfer하여 random primer labeling 방법[15]으로 ^{32}P-dCTP를 이용해 표지한 cDNA를 표식자로 하여 유전자 발현에 대한 Northern 분석을 하였다.

분화에 따른 laminin B1과 type IV collagen 등 분화 표지 유전자의 발현을 조사하기 위하여 laminin B1[16] cDNA의 464 bp *Eco RI* fragment와 2 kb *Eco RI* fragment의 type IV collagen16)(α2) cDNA를 표식자로 사용하였고, RARβ 및 GR 유전자들의 발현을 조사하기 위하여 1.2 kb *Sma* I-*Eco RI* fragment의 RAR*b* cDNA, 2 kb *Kpn* I- *Pst* I fragment의 glucocorticoid receptorα (GRα) cDNA 표식자를 이용하였다. 대조군으로 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 발현도 함께 분석하였다.

결 과

F9세포에 대한 해양천연물질의 분화유도 작용 및 형태변화 – F9 세포의 분화모델을 이용하여 해양생물에서 분리된 천연화합물의 분화유도 효과를 검색하였다. F9 세포에 분화제를 처리하지 않을 경우 세포모양은 불규칙하고 조밀한 콜로니 상태를 유지하나(Fig. 1A), 분화제인 all *trans*-retinoic acid 와 CT를 처리할 경우 잘 분화된 둥근형의 parietal endoderm과 유사한 세포로 분화되었다(Fig. 1B).

해양생물에서 분리된 천연화합물과 250 μM dibutyryl cyclic AMP-250 μM theophylline(CT)을 함께 처리한 후 F9 세포의 형태변화를 관찰하여 분화유도 효과를 검색한 결과 Table I과 같이 홍조(꼬시래기)의 당지질 GV-4(37.5 μg/m*l*), GV-5(11 μg/m*l*), GV-6(5 μg/m*l*), GV-B-9(17 μg/m*l*), GV-9-11(37.5 μg/m*l*)에서 분화유도 효과가 관찰되었다. 그리고 갈

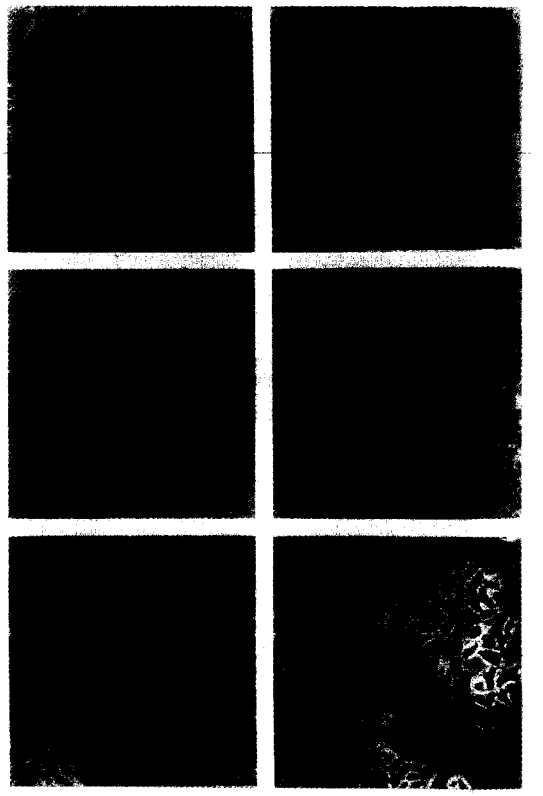

Fig. 1 — Induction of morphological changes in F9 cells following treatment with the marine natural compounds. Phase-contrast photomicrographs of F9 cells 7 days after seeding 1×10^4 cells/cm^3. A, undifferentiated F9 stem cells; B, differentiated F9 cells induced by RA (1 μM) + CT (250 μM); C, GV-6 (5 μg/m*l*) + CT (250 μM); D, HA-2 (3.5 μg/m*l*) + CT (250 μM); E, HA-3 (100 μg/m*l*) + CT (250 μM); F, ST-6 (40 μg/m*l*) + CT (250 μM).

조(지충이)의 분획물인 지방산 ST-3(2 μg/m*l*)과 당지질 ST-6(40 μg/m*l*)에서도 형태적 분화유도 효과가 관찰되었으며, 극피동물(해삼)의 당-아미노산 분획물인 HA-2(3.5 μg/m*l*) 와 HA-3(100 μg/m*l*), 그리고 사포닌 분획물인 SJ-P(150 μg/m*l*)에서도 분화유도 효과가 관찰되었다. 극피동물(별불가사리)의 사포닌 분획 AP-B-2(3 μg/m*l*) 그리고 연체동물(진주담치)의 지질분획 ME-B(5.25 μg/m*l*) 와 ME-EA-S(40 μg/m*l*)에서 분화유도 효과가 관찰되었다. 그외 피조개에서 분리한 sterol AB-EA-S(1)(20 μg/m*l*)에서는 분화유도 효과가 관찰되었나 같은 피조개에서 분리한 sterol AB-EA-S(2)에서는 F9 세포의 형태적 분화유도 효과가 없는 것으로 관찰되었다. 이중 F9 세포의 형태변화가 뚜

Table I — Concentration and property of the marine natural compounds screened by F9 teratocarcinoma cell as a model system

marine natural compounds	source	concentration	property
GV-4	*Gracilaria verrucosa*	37.5 μg/m*l*	a mixture of fatty acids
GV-5	〃	11 μg/m*l*	glycolipid
GV-6	〃	5 μg/m*l*	glycolipid
GV-B-9	〃	17 μg/m*l*	sugar-amino acid fraction
GV-B-11	〃	37.3 μg/m*l*	sugar-amino acid fraction
ST-3	*Sargassum thunbergii*	2 μg/m*l*	a mixture of fatty acids
ST-6	〃	40 μg/m*l*	glycolipid
HA-2	*Stichopus japonicus*	3.5 μg/m*l*	sugar-amino acid fraction
HA-3	〃	100 μg/m*l*	sugar-amino acid fraction
SJ-P	〃	150 μg/m*l*	saponin fraction
AP-B-2	*Asterina pectinifera*	3 μg/m*l*	saponin fraction
ME-B	*Mytilus edulis*	5.25 μg/m*l*	sphingosine fraction
ME-EA-S	〃	40 μg/m*l*	sterol
AB-EA-S(1)	*Anadara broughtonii*	25 μg/m*l*	sterol
AB-EA-S(2)	〃	17 μg/m*l*	sterol

렸하게 나타나는 GV-6, HA-2, HA-3, ST-6의 형태변화 결과는 Figure 1C-F와 같다.

Northern blot 분석에 의한 유전자 수준에서의 분화유도 효과 확인 - 일반적으로 F9 세포의 경우 분화가 진행되면서 기초막 구성 단백질인 laminin B1과 type IV collagen의 유전자 발현이 증가한다고 알려있다. 따라서 F9 세포의 형태적 분화유도 효과가 확인된 해양천연물을 대상으로 하여 분화관련 유전자들의 발현을 조사하므로써 유전자 수준에서 분화유도 효과를 확인하였다. 즉 해양천연화합물이 처리된 F9 세포로부터 전체 RNA를 분리하여 Northern blot 분석으로 laminin B1과 type IV collagen 유전자들의 발현정도를 분석하였다.

분화제가 처리되지 않은 세포에 비해 ST-6, HA-3, SJ-P, GV-B-9, GV-B-11 각각이 처리된 세포에서 laminin B1 유전자의 발현이 현저히 증가하였고(Fig. 2A, 2B), GV-6, HA-2, ME-B, ME-EA-S가 처리된 세포에서는 유전자의 발현이 처리하지 않은 세포에 비해 약간 증가하였다(Fig. 2A, 2B). 그러나 GV-5, ST-3, AP-B-2, AB-EA-S(1)의 경우는 laminin B1 유전자의 발현증가가 처리되지 않은 세포에 비해 거의 변화가 없었다. 그리고 type IV collagen 유전자의 발현은 Figure 3과 같이 HA-3이 처리된 세포에서 가장 많이 증가하였고 GV-5, ST-6이 처리된 세포에서도 약간 증가하였으나, 나머지 해양천연물에서는 변화가 없었다.

이상의 결과에 의해, 해삼에서 분리한 당-아미노산 성분인 HA-3이 분화 표지 유전자인 laminin B1과 type IV collagen 둘 다를 강하게 발현시켜 가장 좋은 분화유도 효과를 나타내었으며, ST-6도 이들 두 유전자의 발현을 증가시키므로 분화유도 효과가 좋은 것으로 확인되었다. 그외 GV-6, HA-2, ME-B, ME-EA-S, GV-B-9, GV-B-11은 laminin B1의 발현을 증가시키고, GV-5인 경우는 type IV collagen의 발현을 증가시키므로 어느 정도의 분화유도 효과가 있는 것으로 추정이 된다.

Nuclear receptor 발현의 증가에 의한 분화유도기작의 조사 - 형태적 변화와 분화표지 유전자의 발현증가에 의해 분화유도 효과가 확인된 해양천연물을 대상으로 분화 유도 기작을 조사하기 위하여 세포의 분화에 관련되는 핵 수용체들의 유전자 발현을 Northern blot 분석으로 조사하였다. 각 해양천연물과 CT를 함께 처리한 세포로부터 전체 RNA를 분리하고 분화를 촉진한다고 알려진 핵 수용체인 RARβ(retinoic acid receptor β), GR(glucocorticoid receptor) 들의 cDNA를 표식자로 이들 유전자의 발현정도를 확인하였다.

해양천연물 중 ST-6, HA-2, HA-3, SJ-P 들은 RAR 유전자의 발현을 대조군에 비해 현저히 증가시키나, 나머지 해양천연물들은 RAR 유전자 발현을 크게 증가시키지 않았다(Fig. 3A). 그리고 glucocorticoid에 의해 활성화되어 핵으로 이동 후 분화에 관련된 유전자의 발현을 증가시켜 분화를 유도한다고 알려진 GR의 경우 HA-2, ME-B가 처리된 세포에서 발현이 증가되었으며, 대조군으로 glucocorticoid의 일종인 dexamethasone (Dexa)을 처리한 세포에서 GR의 발현이 현저히 증가됨

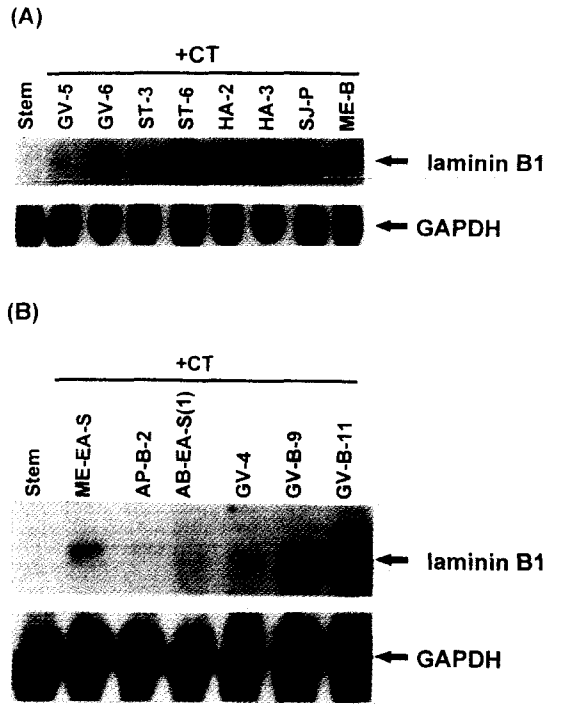

Fig. 2 — Comparison of differentiation-specific gene expression in F9 cells after exposure to the marine natural compounds. 30 μg of total RNAs were separated, transferred, and hybridized with laminin B1 cDNA probes. (A), F9 cells were treated with GV-5 (11 μg/ml), GV-6 (5 μg/ml), ST-3 (2 μg/ml), ST-6 (40 μg/ml), HA-2 (3.5 μg/ml), HA-3 (100 μg/ml), SJ-P (150 μg/ml) or ME-B (5.25 μg/ml) with CT (250 μM); (B), ME-EA-S (40 μg/ml), AP-B-2 (3 μg/ml), AB-EA-S(1) (25 μg/ml), GV-4 (37.5 μg/ml), GV-B-9 (17 μg/ml) or GV-B-11 (37.5 μg/ml) with CT (250 μM). GAPDH was used as a RNA loading control.

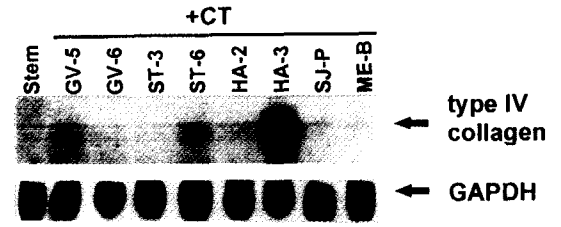

Fig. 3 — Expression of type IV collagen mRNA after exposure to the marine natural compounds. F9 cells were treated with GV-5 (11 μg/ml), GV-6 (5 μg/ml), ST-3 (2 μg/ml), ST-6 (40 μg/ml), HA-2 (3.5 μg/ml), HA-3 (100 μg/ml), SJ-P (150 μg/ml) or ME-B (5.25 μg/ml) with CT (250 μM/ml). GAPDH was used as a RNA loading control.

이 관찰되었다(Fig. 3B). 특히 HA-2인 경우는 RAR과 GR 유전자의 발현이 동시에 증가하는 흥미로운 결과를

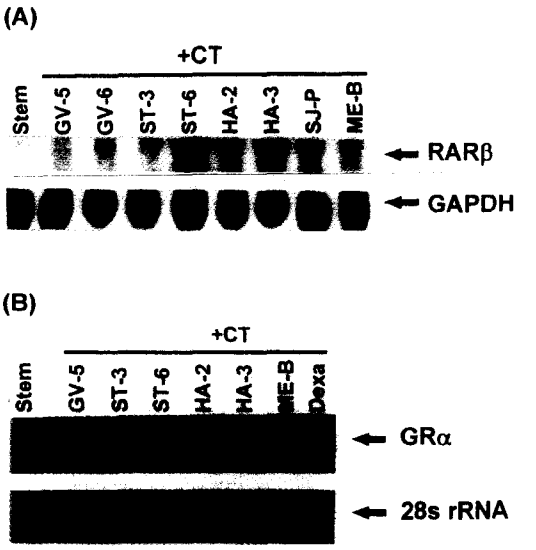

Fig. 4 — Expression of RAR-β and GR(α) genes in F9 cells treated with the marine natural compounds. (A), F9 cells were treated with GV-5 (11 μg/ml), GV-6 (5 μg/ml), ST-3 (2 μg/ml), ST-6 (40 μg/ml), HA-2 (3.5 μg/ml), HA-3 (100 μg/ml), SJ-P (150 μg/ml) or ME-B (5.25 μg/ml) with CT (250 μM/ml); (B), GV-5 (11 μg/ml), ST-3 (2 μg/ml), ST-6 (40 μg/ml), HA-2 (3.5 μg/ml), HA-3 (100 μg/ml), ME-B (5.25 μg/ml) or Dexa (25 μM) with CT (250 μM/ml). As a positive control, Dexa was treated on F9 cells, and GAPDH and 28s rRNA were used as a RNA loading control.

얻었다. 따라서 HA-2에 의한 F9 세포의 분화유도과정에 RAR과 GR이 동시에 작용할 가능성이 있으며, HA-3, ST-6, SJ-P에 의한 F9 세포의 분화에서는 RAR이, ME-B에 의한 F9 세포의 분화에서는 GR이 중요한 기능을 담당할 것으로 생각되나, 나머지 해양천연물에 의한 F9세포의 분화는 RAR과 GR 이외의 다른 인자들이 F9세포의 분화를 유도할 것으로 추정이 된다.

고 찰

본 연구는 해양생물로부터 분리한 여러 가지 시료로부터 새로운 암세포 분화인자의 검색을 시도하였으며 검색된 분화인자들의 작용 기작을 규명하고자 하였다. 그 결과 해삼의 당-아미노산 분획인 HA-3이 F9 기형암종세포에 대해 분화유도 작용이 가장 강한 것으로 나타났으며, 갈조 지충이의 당지질인 ST-6도 비교적 분화유도 효과가 높은 것으로 관찰되었다. 그리고 그 작용

기작은 HA-3과 ST-6인 경우는 세포내 RAR과 결합하여 분화관련 유전자들의 발현을 증가시켜 분화를 유도하는 것으로 추정이 된다. 그외 GV-5, GV-6, GV-B-11, HA-2, SJ-P, ME-EA-S도 F9 세포의 형태변화를 유도하고 분화에 관련된 laminin B1 또는 type IV collagen의 생성을 증가시키므로 어느정도 분화유도 효과가 있을 것으로 예상이 된다. 이중 해삼의 당-아미노산 분획인 HA-2인 경우 RAR과 GR 유전자의 발현을 동시에 증가시키므로 이들 두가지 핵 수용체들이 HA-2에 의한 F9 암세포 분화유도 기전에 관여할 것으로 예측이 된다.

그리고 한 가지 특징적인 사실은 분화작용이 있는 물질로 검색된 성분의 대부분이 지질로 분류되는 물질군으로 이들 화합물에는 소수성의 지방산 부분과 친수성의 polyhydroxyl 혹은 carboxyl기를 동시에 가지고 있어서 세포막을 통과하여 세포질 내에 있는 RAR 또는 GR과 같은 세포내 핵 수용체와 결합함으로써 분화를 유도하는 것으로 추측 할 수 있다. 이와 같은 특이한 현상은 스테로이드 홀몬의 작용 과정에서도 유사하게 나타난다. 따라서, 이들 화합물을 모화합물로 한 새로운 암세포 분화유도제의 개발이 해양생물로부터 가능할 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 1994~95년도 한국과학재단 핵심전문연구지원비(과제번호 : 941-0700-053-2)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Fusetani, N. : Studies on exploitation of marine biochemical resources. *Nippon Suisan Gakkaishi* **60**, 13 (1994).
2) Rinehart, K. L., Kishore, V., Bible, K. C., Sakai, R., Sullins, D. W. and Li, K. -M. : Didemnins and tunichlorin : novel natural products from the marine tunicate *Trididemnum solidum*. *J. Nat. Prod.* **51**, 1 (1988).
3) Sporn, M. B. and Roberts, A. B. : Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Research* **43**, 3034(1983).
4) Strickland, S. : Mouse teratocarcinoma cells : prospects for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell* **24**, 277 (1981).
5) Strickland, S., Smith, K. K. and Marotti, K. R. : Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells : generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell* **21**, 347 (1980).
6) Wang, S. Y. and Gudas, L. J. : Isolation of cDNA clones specific for collagen IV and laminin from mouse teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5880 (1983).
7) Grover, A. and Adamson, E. D. : Evidence for the existence of an early common biochemical pathway in the differentiation of F9 cells into visceral or parietal endoderm : modulation by cyclic AMP. *Dev. Biol.* **114**, 492 (1986).
8) Oikawa, T., Sayama, K., Matsuda, Y., Fujimoto, Y., Iwaguchi, T. and Matsuzawa A. : Characterization of two possible forms of type IV collagen from human kidney cortex. *Cancer Letters* **48**, 157 (1989).
9) Grippo, G. F. and Gudas, L. J. : The effect of dibutyryl cyclic AMP and butyrate on F9 teratocarcinoma cellular retinoic acid-binding protein activity. *J. Biol. Chem.* **262**, 4492 (1987).
10) Hu, L. and Gudas, L.J. : Cyclic AMP analogs and retinoic acid influence the expression of retinoic acid receptor alpha, beta, and gamma mRNAs in F9 teratocarcinoma cells. *Mol. Cell. Bio.* **10**, 391 (1990).
11) Son, B. W. : Glycolipid from the Korean marine red alga *Gracilaria verrucosa*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **9**, 264 (1988).
12) Son, B. W. : Glycolipids from *Gracilaria verrucosa*. *Photochemistry* **29**, 307 (1990).
13) Son, B. W., Cho, Y. J., Kim, N. K. and Choi, H. D. : New glyceroglycolipids from the brown alga *Sargassum thunbergii*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **13**, 584 (1992).
14) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1987).
15) Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. : Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease

fragments to high specifec activity. *Anal. Biochem.* **137**, 255 (1984).

16) Kim, K. W. and Choi, K. S. : Preparation of Laminin B1 specific cDNA probe.es. *Korean. J. Genet.* **11**, 105 (1989).

17) Kurkinen, M., Barlow, D. P., Heifman, D. M., William, J. G. and Hogan, B. L. : Isolation of cDNA clones for basal lamina components : type IV procollagen. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6199 (1983).