

팔방산호충류에서 분리한 해양 스테롤 화합물의 혈소판 응집 억제작용

박영현* · 장성근* · 서영원** · 신종헌**
순천향대학교 식품영양학과, *화학과, **한국해양연구소
(Received July 21, 1997)

Inhibition of Platelet Activation by Marine Sterols from Octocorals

Young-Hyun Park[#], Sung-Keun Chang^{*}, Youngwan Seo^{**}
and Jongheon Shin^{**}

Department of Food Science and Nutrition, *Department of Chemistry,
Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

**Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 425-600, Korea

Abstract—The purpose of this investigation was to determine the inhibition on Na^+ , K^+ -ATPase, cyclic AMP phosphodiesterase and platelet activation by marine sterols isolated from octocorals. Three marine polyhydroxysterols, 7α , 8α -epoxy- 3β , 5α , 6α -trihydroxycholestane (1), 24 -methyl- 7α , 8α -epoxy- 3β , 5α , 6α -trihydroxycholest-22-ene (2), and 7α , 8α -epoxy- 3β , 5α , 6α -trihydroxycholest-22-ene (3), were isolated from the Gorgonian *Acartia undulata*. Five marine sterols (compound 4, 5, 6, 7, 8) were isolated from the soft coral *Alcyonium gracillimum*. Three marine polyhydroxysterols (1, 2, 3) and pregna-1, 20-diene-3-one (8) exhibit a potent inhibitory effect on rabbit platelet aggregation induced by collagen and thrombin. Those polyhydroxysterols also exhibit a potent inhibitory effect on cyclic AMP phosphodiesterase. Compound 6 with an unusual cyclic enolether exhibit a inhibitory effect on Na^+ , K^+ -ATPase.

Keywords □ Marine sterols, Platelet aggregation, Na^+ , K^+ -ATPase, cyclic AMP phosphodiesterase.

해양생물은 육상생물과 비교하면 염농도가 높은 폐쇄된 환경에 살며 수심에 의해 높은 압력과 온도 변화가 비교적 적고, 체표면의 대부분이 직접 해수와 접하고 있는 환경으로 인하여 해양생물의 대사계 또는 생체방어계에서 생산하는 2차 대사물질은 독특한 화학구조로 해양천연물 화학분야에서 연구대상이 되고 있다.¹⁻⁴⁾

해양 2차 대사물질이 세포막 수용체, 이온 channel, 세포내 기능조절단백질에 특이적인 작용을 갖는 생리활성이 발견되어 세포내 정보전달 기능을 해명하는 데 크게 공헌하고 있다. 예를 들면, 설사형 조개독의 원인생물 *Dinophysis* sp.에서 분리한 okadaic acid는 평활근 세포

의 탈인산화효소를 억제하여 평활근 수축제어계의 해석을 보다 명확하게 나타내며⁵⁻⁶⁾, ciguatera 식중독의 원인생물인 와편모조 *Gambierdiscus toxicus*에서 분리한 maitotoxin 또는 okadaic acid는 세포막 Ca^{2+} channel에 특이적인 작용으로 세포의 Ca^{2+} 유입을 증가시켜 흥분성 또는 비흥분성 세포에 수축 및 응집작용을 나타내고⁷⁻⁸⁾, 카리브산 멧개 *Eudistoma olivaceum*에서 분리한 eudistomin D 유도체는 세포내 Ca^{2+} 유리 촉진작용이 caffeine의 1000배로 작용하여 caffeine 생리 기능 해석에 유용한 생화학 및 약리학적 도구(tool)로 인식되고 있다.⁹⁻¹¹⁾ 현재 2천 종류 이상이 분리된 해양 sterol은 세포막 인지질의 구성성분으로 막유동성을 유지하는 역할을 하지만 생리적 기능은 잘 알려져 있지 않다.¹²⁾ 최근 혈소판 세포의 생리작용에서 세포막 구성성분이 세포내

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0418-530-1259 (팩스) 0418-530-1264

정보전달에 중요한 역할을 한다고 한다.¹³⁻¹⁴⁾

그래서, 팔방산호충류에서 분리한 새로운 해양 sterol의 생리적 기능을 보고자, 비홍분성 세포인 혈소판 작용과 세포내 Ca^{2+} 또는 cyclicAMP에 관련된 Na^+ , K^+ -ATPase과 cyclicAMP phosphodiesterase 효소의 활성작용을 검토하였다. 한국 연근해에서 빨산호 (*Acabaria undulata*)와 연산호(*Alcyonium gracillimum*)의 팔방산호충류를 채집하여, 분리, 정제한 해양 sterol 화학구조에 대한 혈소판 및 Na^+ , K^+ -ATPase과 cyclicAMP phosphodiesterase의 생리활성 상관성을 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 - 팔방산호류에 속하는 *Acabaria undulata* (Gorgonacea, 빨산호)와 *Alcyonium gracillimum* (Alcyonacea, 연산호) 2종을 거문도에서 채집하였다. 빨산호의 CH_2Cl_2 추출물을 silica vaccum flash chromatography에서 용매(80~100% EtOAc in hexane)로 용출하였다. 이 분획을 다시 Sephadex LH-20 column chromatography에서 용매(CH_2Cl_2 /acetone/EtOH=2:3:0.05)로 용출한 분획을 최종적으로 semi-prep C_{18} 역상 HPLC(YMC ODS column, 1 cm×25 cm, 60% MeOH in CH_3CN)로 정제하여 polyhydroxysterol(1, 2, 3)을 분리하였다(Fig. 1).¹⁵⁾ 연산호의 MeOH과 CH_2Cl_2 혼합용매 추출물을 n-BuOH로 용매분획하고, n-BuOH 분획물을 silica vaccum flash chromatography에서 용매(10~20% EtOAc in hexane)로 용출한 분획을 최종적으로 silica 또는 ODS column을 이용한 HPLC로 정제하여 sterol(4, 5, 6, 7, 8)을 분리하였다(Fig. 2).¹⁶⁾ 각 시료는 용매(MeOH 또는 DMSO)에 녹여 최종농도

가 10 $\mu g/ml$ 되도록 조절하였고, 용매의 최종농도는 0.1%로 조절하였다.

토끼 washed platelet 활성 측정 - 토끼 혈액을 citrate-dextrose용액(혈액량의 1/6 : 65 mM citric acid, 85 mM trisodium citrate, 2% dextrose, pH 4.5)에 채혈한 후, 250×g로 10분간 원심분리하였다. 상등액(platelet-rich plasma)을 분리한 후, 다시 650×g로 10분간 원심분리하였다. 침전물(platelet-rich pellet)을 Tyrode-HEPES(pH 6.35)용액으로 두번 세척한 후, 마지막에 Tyrode-HEPES(pH 7.35)용액으로 혈소판수가 5×10^8 cells/ml 되도록 희석하였다. 모든 조작은 실온에서 실시하였다. Tyrode-HEPES용액의 조성은 138.3 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.048 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 4.0 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 0.1% dextrose, 0.35% albumin 등이다. 혈소판 형태변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 흡광도 측정장치(Whole-Blood Aggregometer, Chrono-log Co.)를 사용하였다.¹⁷⁾ 혈소판 부유액(platelet-rich plasma)을 250 μl 취하여 1200 rpm에서 교반하면서 37°C에서 3분간 incubation 시킨 후 $CaCl_2$ 1 mM을 가하였다. 다시 3분후에 시료 2.5 μl 를 가하고 3분 후 혈소판 활성화물질로 자극하여 응집을 유도하였으며, 5분간 측정된 후, 최대 응집점을 잡아 억제되는 정도를 계산하였다. 혈소판 활성화물질은 collagen(1.0 $\mu g/ml$), thrombin(0.1 units/ml)을 대조군(A)으로 사용하였으며, 억제율(%)은 다음의 식과 같이 구했다.

$$\text{Inhibition \%} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : control aggregation %

B : aggregation %

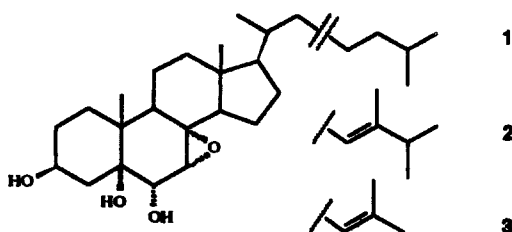


Fig. 1— Chemical structures of marine polyhydroxysterols isolated from the Gorgonian *Acabaria undulata*.

Na^+ , K^+ -ATPase와 cyclicAMP phosphodiesterase 활성 측정 - Na^+ , K^+ -ATPase (Porcine Cerebral Cortex, Sigma)는 최종농도가 0.02 units/ml로 하여, 130 mM NaCl, 20 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 445 μl 를 넣어 5분간 37°C에서 incubation하였다. 5분 후에 시료 5 μl 를 넣고, 다시 5분 후에 2 mM ATP 50 μl 를 넣어 15분간 반응한 후 5% trichloroacetic acid 500 μl 로 반응을 정지시켰다. 그리고, cyclic AMP phosphodiesterase

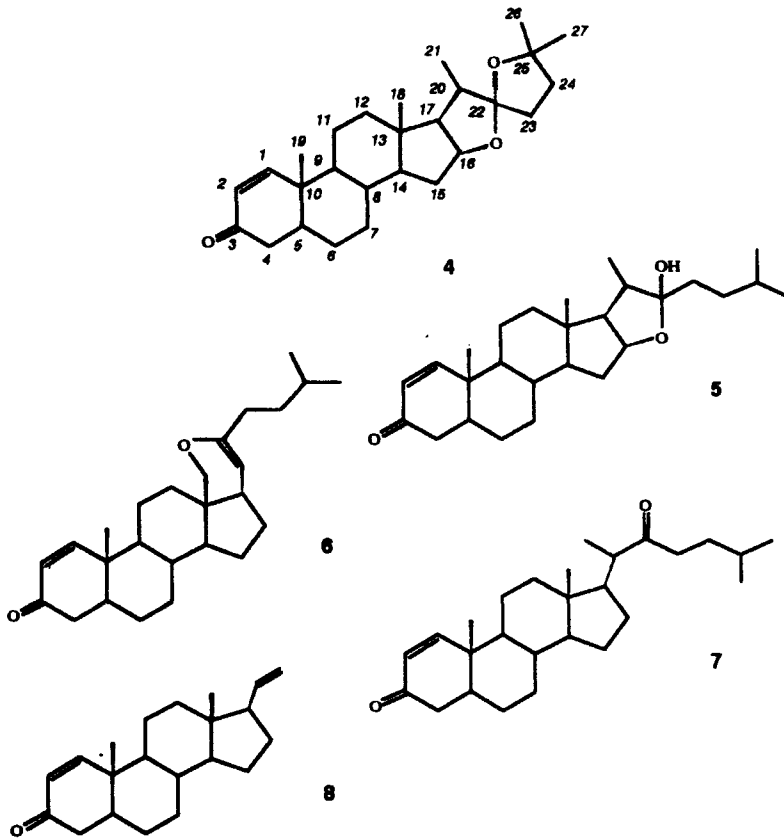


Fig. 2 — Chemical structures of marine sterols isolated from the soft Coral *Alcyonium gracillimum*.

(Bovine Heart, Sigma)는 최종농도가 0.015 units/ml로 하여, 0.7 units/ml 5'-nucleotidase(Snake Venom, Sigma), 2 mM MgCl₂, 40 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 890 μl를 넣어 5분간 37°C에서 incubation하였다. 5분 후에 시료 10 μl를 넣고, 다시 5분 후에 2 mM cyclicAMP 100 μl를 넣어 20분간 반응한 후 5% trichloroacetic acid 100 μl로 반응을 정지시켰다. 정지된 각 효소반응액의 인산은 Martin-Doty법에 따라 720 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁸⁾ 각효소 활성의 inhibition %는 다음의 식과 같이 구했다. Na⁺, K⁺이 없는 Na⁺, K⁺-ATPase완충용액과 5분간 열탕한 cyclicAMP phosphodiesterase를 각각 back ground로 하였다.

$$\text{Inhibition\%} = \frac{C-S}{C-BG} \times 100$$

C : control 흡광도

BG : back ground의 흡광도

S : sample의 흡광도

결과 및 고찰

팔방산호충류는 강장동물로 미소한 유기물을 여과하여 영양분을 섭취하는 고차생물로 태평양 산호초해역에서 널리 분포 발달되어 있다. 한국 연근해에서 채집한 *Acabaria undulata*는 해양류(Gorgonacea, 빨산호)로, *Alcyonium gracillimum*는 바다맨드라미류(Alcyonacea, 연산호)로 분류하며 모두 팔방산호충류에 속한다.¹⁹⁾ 지금까지 해양생물에서 분리된 2차 대사물질들은 대부분 강장동물에서 유래되고, 육상생물과 다른 특이한 화학구조를 갖는 terpene과 sterol이 많다.²⁰⁾ *Acabaria undulata* (Gorgonacea, 빨산호류)에서 3개의 polyhydroxysterol(1, 2, 3)을 분리하였다(Fig. 1). 화학구조는 7α, 8α-epoxy-3β, 5α, 6α-trihydroxycholestane(1), 24-methyl-7α, 8α-epoxy-3β, 5α, 6α-trihydroxycholest-22-ene(2), 7α, 8α-epoxy-3β, 5α, 6α-trihydroxy-

droxycholest-22-ene(3)로 밝혀졌다.¹⁵⁾ *Alcyonium gracillimum*(Alcyonacea, 연산호류)에서 분리한 해양 sterol은 furospirostan 계열에 spiroketal기(4), hemiketal기(5), cyclic enolether기(6)를 갖는 화학구조와 diketone기의 C₂₇ steroid(7), pregnandienone 계열의 pregna-1, 20-diene-3-one(8)의 특이한 화학구조를 갖고 있다(Fig. 2).¹⁶⁾

해양 sterol은 현재 2천 종류 이상이 분리되었고, 그 구조의 다양성 때문에 화학적 분류도구(chemotaxonomic tool)로 이용되고 있다.^{12, 21, 22)} Goad씨²³⁾는 해양 무척추동물에 존재하는 다양한 sterol의 생합성 대사경로로 4가지 가능성을 제시하고 있다. 그 가능성은 새로운 생합성 경로, 공생미생물(미세조류, 세균, 곰팡이 등)로 인한 생합성 경로, 섭취한 sterol의 대사(식이 sterol)경로 그리고 식이 sterol의 이화학적변화 등에 의해서 존재한다고 주장하였다. 세포막의 구성성분인 해양 sterol은 cholesterol보다 낮은 용해도로 인하여 세포막 모델의 막유동성에 영향을 주는 역할을 하지만 생리적 기능은 잘 알려져 있지 않다. 최근 세포막 구성성분이 세포내에서 Ca²⁺ 및 cyclicAMP의 정보전달에 중요한 역할을 한다고 한다. 해양 2차 대사물질 중에 matotoin은 세포막 Ca²⁺ channel에 특이적인 작용으로, eudistomin D 유도체는 세포내 Ca²⁺ 유리 촉진작용으로, okadaic acid는 평활근 세포내 탈인산화효소의 억제작용으로 세포내 정보전달 기능을 해명하는 데 크게 공헌하고 있다.^{5-11, 24, 25)}

혈소판은 지혈작용에 필수세포이지만 내피세포의 기능장애로 인한 혈관내 혈전을 형성하여 뇌경색 또는 심근경색의 원인세포이다. 그래서, 혈전증 예방 및 재발 방지를 위하여 혈소판 기능을 제어하는 생리활성물질 연구가 활발하다. 그러나, 해양생리활성물질의 혈소판 기능에 관한 연구는 홍분성 세포(심근, 평활근)와 비교하면 미약하다고 하겠다. 비홍분성 세포인 혈소판은 collagen 또는 thrombin에 의해 활성화되어, 초기반응으로 원판형에서 구형으로의 형태변형에 이어 응집반응을 일어난다. 이러한 생리작용에 세포내 전달물질로 Ca²⁺ 또는 cyclicAMP가 중심적인 역할을 한다.²⁶⁻²⁷⁾ 세포내 Ca²⁺은 calmodulin과 결합하여 myosin light-chain kinase을 인산화하여 혈소판의 방출과 응집작용이 일어난다. 세포내 cyclicAMP는 cyclicAMP-dependent protein kinase을 활성화하여 세포내 Ca²⁺의 농도를 감소시켜 응집반응을 억제한다. 이와같이 세

Table I— Effects of marine sterols on the platelet aggregation induced by collagen and thrombin

Sample	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Aggregation (%)	
		Collagen	Thrombin
Control		66.5 \pm 6.6	61.1 \pm 3.5
1	10	23.8 \pm 3.5**	50.1 \pm 2.5**
2	10	50.2 \pm 3.1**	51.8 \pm 3.0**
3	10	43.1 \pm 2.0**	20.7 \pm 6.9**
4	10	66.7 \pm 4.7	51.0 \pm 4.1
5	10	56.8 \pm 2.8	48.5 \pm 6.2
6	10	67.4 \pm 1.3	72.3 \pm 2.9
7	10	64.5 \pm 6.7	53.8 \pm 4.9
8	10	53.9 \pm 2.4*	40.1 \pm 3.0**
Aspirin	5	11.9 \pm 10.6**	53.9 \pm 9.6*
Indomethacin	10	36.5 \pm 7.9**	57.5 \pm 8.2*

Washed rabbit platelets were preincubated with DMSO(0.1%, control) or sample($\mu\text{g}/\text{ml}$) at 37°C for 3 min before the addition of collagen(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or thrombin(0.1 unit/ml). Percent aggregations are presented as mean \pm S.E.(n=3).

*p<0.05, **p<0.01 as compared with the respective control.

포내 전달물질의 변화가 혈소판 기능에 중요한 역할을 한다고 한다. 혈소판내 cyclicAMP phosphodiesterase III형은 adenylyclase에 의해 증가된 cyclicAMP를 분해하여 지혈 및 혈전의 혈소판 기능을 조절한다고 한다.²⁸⁾

해양 sterol에 대한 혈소판 작용을 보면, polyhydroxysterol(1, 2, 3)과 pregna-1, 20-diene-3-one(8) 화학구조는 collagen 또는 thrombin의 응집작용을 억제하였지만, cyclic enolether기(6) 화학구조는 반대로 약간 증가하였다(Table I). 해양 sterol의 화학구조에 따른 활성상관성은 collagen의 응집작용을 6 \ll 4 \leq 7 \leq 5 \leq 8 \ll 3 \ll 2 \ll 1 순서로 억제하였고, thrombin의 응집작용을 6 \ll 4 \leq 7 \leq 5 \leq 2 \ll 8 \ll 1 \ll 3 순서로 억제하였다. collagen에 대한 응집 억제작용은 7 α , 8 α -epoxy-3 β , 5 α , 6 α -trihydroxycholestane(1)의 IC₅₀ 값이 6.7 μM 이고, thrombin에 대한 응집 억제작용은 7 α , 8 α -epoxy-3 β , 5 α , 6 α -trihydroxy-cholest-22-ene(3)의 IC₅₀ 값이 15.9 μM 이다(Fig. 3).

해양 sterol에 대한 Na⁺, K⁺-ATPase활성 억제작용은 cyclic enolether기(6) 화학구조에서 약간 증가하였지만, 다른 화학구조는 유의성이 없다(Table II). Cyclic enolether환(6)은 세포내 Ca²⁺ 축적으로 인한 ouabain 감심작용²⁹⁾과 활성 상관성을 갖는 C-17 위치에 불포화 lactone환과 비슷한 화학구조를 갖고 있어 반대로 응집작용이 약간 증가하였다고 사료된다.

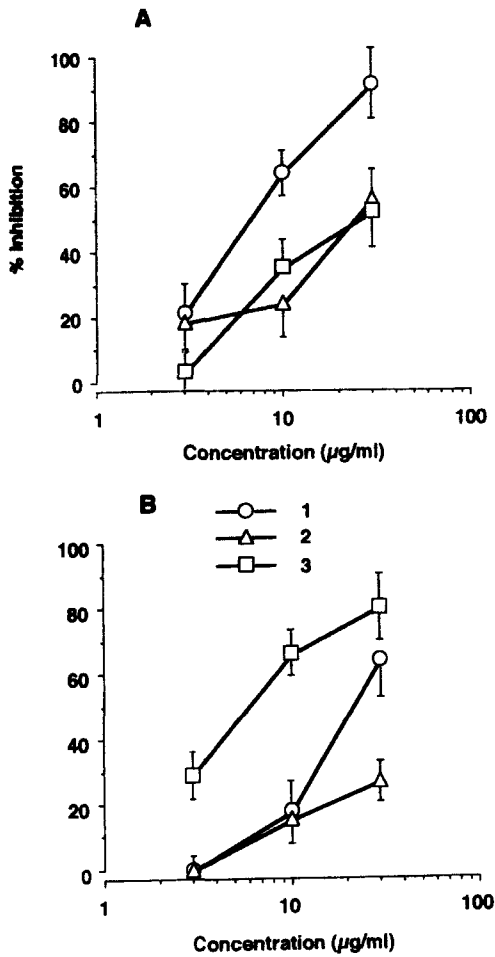


Fig. 3—Effects of three polyhydroxysterols isolated from the Gorgonian on the aggregation of washed rabbit platelets induced by collagen (A) and thrombin (B). Platelets were preincubated with various concentrations of polyhydroxysterols for 3 min before the addition of collagen (1.0 µg/ml) and thrombin (0.1 unit/ml). Percent inhibitions are presented as mean±S.E. (n=3). 7α, 8α-epoxy-3β, 5α, 6α-trihydroxycholestane (1), 24-methyl-7α, 8α-epoxy-3β, 5α, 6α-trihydroxycholest-22-ene (2), 7α, 8α-epoxy-3β, 5α, 6α-trihydroxycholest-22-ene (3).

해양 sterol에 대한 cyclicAMP phosphodiesterase활성은 polyhydroxysterol 화학구조에서 3 < 2 < 1 순서로 억제작용을 나타내었다(Table III). 7α, 8α-epoxy-3β, 5α, 6α-trihydroxycholest-22-ene(3)은 IC₅₀ 값이 44 µM로 papaverine(IC₅₀=69 µM)보다 활성 억제작용이 강하다고 하겠다. Polyhydroxysterol의 혈소판 응집억제작용은 세포내 cyclicAMP와 관련성이

Table II—Inhibitory effects of marine sterols on Na⁺ K⁺-ATPase

Sample	Concentration (µg/ml)	Absorbance	Inhibition (%)
BG		0.09±0.04	
Control		0.45±0.08	
1	10	0.41±0.03	8.5
2	10	0.44±0.02	0.6
3	10	0.43±0.04	3.5
4	10	0.43±0.05	6.5
5	10	0.40±0.06	10.8
6	10	0.36±0.04*	20.6
7	10	0.49±0.07	-7.6
8	10	0.51±0.06	-11.2
Ouabain	10	0.26±0.09**	58.7

Absorbances are presented as mean±S.E. (n=3).

* p<0.05, ** p<0.01 as compared with the respective control.

Table 3—Inhibitory effects of marine sterols on cyclicAMP phosphodiesterase

Sample	Concentration (µg/ml)	Absorbance	Inhibition (%)	IC ₅₀ (µM)
BG		0.02±0.01		
Control		0.33±0.04		
1	10	0.24±0.03*	27.8	94.0
2	10	0.25±0.02**	25.1	47.1
3	10	0.23±0.04**	30.8	44.3
4	10	0.31±0.05	5.4	
5	10	0.26±0.04	19.2	
6	10	0.28±0.07	13.2	
7	10	0.29±0.04	12.6	
8	10	0.28±0.08	13.9	
Papaverine	10	0.24±0.06**	24.5	69.0

IC₅₀ is the concentration of sample showing 50% inhibition of enzyme activity estimated from the least squares regression line of the plots of the logarithm of the concentration versus remaining activity.

Absorbances are presented as mean±S. E. (n=3)

* p<0.05, ** p<0.01 as compared with the respective control.

있다고 사료된다. 그러나, 해양 polyhydroxysterol의 혈소판 기능이 cyclicAMP phosphodiesterase III형으로 인한 세포내 cyclicAMP 증가 또는 세포내 Ca²⁺과의 관련성에 대하여 앞으로 많은 연구가 필요하다.

결론

한국 연근해에서 채집한 팔방산호류 *Acabaria undulata*(Gorgonacea, 빨산호)에서 분리,정제한 3개의 polyhydroxysterols, α, 8α-epoxy-3β, 5α, 6α-trihydroxycholestane(1), 24-methyl-7α, 8α-

epoxy-3 β , 5 α , 6 α -trihydroxycholest-22-ene(2), 7 α , 8 α -epoxy-3 β , 5 α , 6 α -trihydroxycholest-22-ene(3)과 *Alcyonium gracillimum*(Alcyonacea, 연산호)에서 분리.정제한 furospirostan 계열에 spiroketal기(4), hemiketal기(5), cyclic enolether기(6)를 갖는 화학구조와 diketone기의 C₂₇ steroid(7), pregnandienone 계열의 pregna- 1, 20-diene-3-one(8)에 대한 혈소판 작용을 비교 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 해양 polyhydroxysterol(1, 2, 3)과 pregna-1, 20-diene-3-one(8) 화학구조들은 collagen 또는 thrombin의 응집작용을 농도의존적으로 억제하였다.

2) 해양 polyhydroxysterol(1, 2, 3)은 cyclicAMP phosphodiesterase 활성 억제작용을 나타내었다.

3) Cyclic enolether기(6) 화학구조는 thrombin의 응집작용을 약간 증가시켰다. Polyhydroxysterol의 혈소판 응집 억제작용은 세포내 cyclicAMP와 관련성이 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 논문은 1995년도 한국과학재단 특정기초연구비(95-0403-21-01-3)와 1997년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비(BSRI-97-3447)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Scheuer, P. J. : Bioorganic marine chemistry. Ed. Springer-Verlag, Heiderberg, Vol. 1 (1987-1992).
- 2) 北川 勳, 伏谷 伸宏 : 海洋生物의 chemical signal. 講談社, (1989).
- 3) 安元 健 : 化學で探る海洋生物의 謎. 化學增刊 121, 化學同人, (1992).
- 4) Kobayashi, J. and Ishibashi, M. : Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganism. *Chem. Rev.* 93, 1753 (1993).
- 5) Yasumoto, T. and Murata, M. : Marine toxins. *Chem. Rev.* 93, 1897 (1993).
- 6) Mauco, G., Artcanuthurry, V., Pidard, D., Grelac, F., Maclouf, J., and Levytoledano, S. : Total inhibition of phospholipase C and phosphatidylinositol 3-kinase by okadaic acid in thrombin-stimulated platelets. *Cellular Signalling* 9, 117 (1997)
- 7) Park, Y. H. : Effect of marine toxins on the rabbit platelets. *J. Fd. Hyg. Safety* 10, 73 (1995).
- 8) Murata, M., Iwashita, T., Yokoyama, A., Sasaki, M. and Yasumoto, T. : Partial structures of maitotoxin from dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 6594 (1992).
- 9) Fang, Y. I., Adachi, M., Kobayashi, J. and Ohizumi, Y. : High affinity binding of 9-^{[3}H] methyl-7-bromo eu distomin D to the caffeine-binding site of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 268, 18622 (1993).
- 10) Adachi, M., Fang, Y. I., Kobayashi, J., Yamakuni, T. and Ohizumi, Y. : Properties of the binding sites of [³H] 9-methyl-7-bromo eu distomin D in bovine aortic smooth muscle microsomes. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 771 (1994).
- 11) Adachi, M., Kakubari, M. and Ohizumi, Y. : Tissue-and subcellular-distribution of the binding site of [³H] 9-methyl-7-bromo eu distomin D, a potent caffeine-like Ca²⁺ releaser. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 774 (1994).
- 12) Kerr, R. G. and Baker, B. J. : Marine sterols. *Natural Product Reports*, 465 (1991).
- 13) Dean, W. L. and Quinton T. M. : Distribution of plasma membrane Ca²⁺-ATPase and inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in human platelet membranes. *Cell Calcium* 17, 65 (1995)
- 14) Pasquet, J. M., Dacharyprigent, J. and Nurden, A. T. : Calcium influx is a determining factors of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur. J. Biochem.* 239, 647 (1996)
- 15) Shin, J., Seo, Y., Rho, J. -R., and Cho, K. W. : Isolation of polyhydroxysteroids from the gorgonian *Acabaria undulata*. *J. Nat. Prod.*, 59, 679 (1996).
- 16) Seo, Y., Jung, J. H., Rho, J. -R., Shin, J., and Song, J. -R. : Isolation of novel bioactive steroids from the soft coral *Alcyonium gracillimum*. *Tetrahedron* 51, 2497 (1995).
- 17) Born, G. V. R. : Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194, 927 (1962).

- 18) Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y. and Nikaïdo, T. : Steroidal saponins from *Allium chinensis* and their inhibitory activities on cyclic AMP phosphodiesterase and Na⁺, K⁺-ATPase. *Phytochemistry* **40**, 1071 (1995).
- 19) 北川 勳, 伏谷 伸宏 : 海洋生物のchemical signal. 講談社, (1989).
- 20) Yajima, H., Shioiri, T. and Ohizumi, Y. : Marine resources for drug discovery I. The 2nd series of pharmaceutical research and development. Vol. 10, Ed. Hirokawa Co., (1993).
- 21) Kokke, W. C. M. C., Fenical, W. and Djerassi, C. : Sterols with unusual nuclear unsaturation from three cultured marine dinoflagellates. *Phytochemistry* **20**, 127 (1981).
- 22) Lee, R. H., Papkoff, J. S. and Slate, D. L. : Inhibitors of protein tyrosine kinase pp60 : Sterol sulfates from the brittle star *Ophiarachna incrassata*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1591 (1994).
- 23) Goad, L. J. : Marine Natural Products. Vol. 2, Ed. Scheuer, P. J., Academic Press, New York, (1978).
- 24) Watanabe, A., Ishida, Y., Honda, H., Kobayashi, M., and Ohizumi, Y. : Ca²⁺-dependent aggregation of rabbit platelets induced by maitotoxin, a potent marine toxin, isolated from a dinoflagellate. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 29 (1993).
- 25) Rho, M. C., Park, Y. H., Sasaki, S., Ishibashi, M., Kondo, K., Kobayashi, J. and Ohizumi, Y. : The mode of rabbit platelet shape change and aggregation induced by theonezolid-A, a novel polyketide macrolide, isolated from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp., *Can J. Physiol. Pharmacol.* **74**, 193 (1996).
- 26) Milton, J.G., and Frojmovic, M. M. : Turbidometric evaluations of platelet aggregation : relative contributions of measured shape change, volume, and early aggregation. *J. Pharmacol. Meth.* **9**, 101 (1982).
- 27) Rink, T. J., and Sage, S. O. : Calcium signaling in human platelets. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 431 (1990).
- 28) Kimura, Y. : Selective type III phosphodiesterase inhibitor as an antithrombotic agent. *Folia Pharmacol. Jpn.* **106**, 205 (1995)
- 29) Gilman G. A. and Gilman, L. S. : The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th. Macmillan Co. (1996).