

토양으로부터 HIV 바이러스에 항바이러스 활성을 나타내는 미생물의 탐색

김성욱* · 이상한 · 정태숙 · 문석식¹
이종교² · 이항우 · 이원영³ · 복성해

한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물소재연구그룹, ¹공주대학교 화학과
²한국화학연구소 의약활성연구실, ³연세대학교 의과대학 미생물학교실

Screening of Microorganisms having Antiviral Activity against HIV Virus from Soil

Kim, Sung Uk*, Sang Han Lee, Tae Sook Jeong, Surk Sik Moon¹,
Chong Kyo Lee², Hang Woo Lee, Won Young Lee³ and Song Hae Bok

Bioproducts R.G. Genetic Engineering Research Institute,
KIST, P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea

¹Dept. of Chemistry, Kong-Ju National Univ.,

²Pharmaceutical Screening Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
Daejeon 305-606, Korea

³Lab. of Microbiology, Medical School, Yonsei Univ., Seoul 120-749, Korea

Abstract— For screening of the antiviral agent from soil, about 520 strains of microorganisms were evaluated for their antiviral activity. About 6.9% of strains showed more than 95% antiviral activity against Herpes Simples Virus (HSV)-1. Two strains among 30 strains active against HSV-1 virus showed a quite strong activity against human immunodeficiency virus.

페니실린이 1940년대 초반 도입된 이후 임상에서는 세균성 질환에 대해 일대 전환기를 맞이하게 되었으나 그 후 50여년이 지나도록 각종 바이러스 질환에 효과적인 약물은 아직도 발견되지 않고 있다(1). 이러한 항바이러스제의 개발이 지연되고 있는 것은 바이러스가 세균과 달리 숙주세포내에서만 증식이 가능하고 숙주의 종류에 따라 바이러스의 종류도 달라지기 때문에 한가지 종류의 약물로 각종 바이러스 질환을 치료하는 것이 매우 어렵기 때문이다.

바이러스 질환의 화학요법은 1960년대 초반까지만 해도 바이러스만을 선택적으로 공격하는 것이 거의 불가능한 것으로 생각되어 바이러스 질환을 제어하기 위한 주된 전략으로 백신의 개발 쪽으로 주력하여 왔다. 이러한 노력의 댓가로 많은 백신이 개발되어

현재 임상에서도 널리 이용되고 있으나 백신은 직접 바이러스들을 공격하는 것이 아니라 미리 체내의 면역체계를 활성화시켜 감염을 예방하기 때문에 항원의 빈번한 돌연변이와 백신에 의한 체내의 부작용 등이 문제로 대두되게 되었다(2). 그동안 바이러스 질환 연구가 활성화되지 못한 근본적인 원인 중의 하나는 스크리닝 체계의 확립이 곤란하였다는 점이다. 바이러스 자체가 숙주에 기생하여 증식이 일어나기 때문에 바이러스를 저해하는 물질은 세포에도 또한 독성을 나타낼 확률이 높고 바이러스가 주변 환경의 변화에 민감하게 작용하여 변이를 일으키기 때문에 스크리닝 체계의 확립이 매우 어려운 실정이었다(3-5). 그러나 지난 10여년 사이에 분자생물학의 발전으로 바이러스 복제에 특이적인 기작과 관련 효소 등이 알려져 이것을 억제하는 항바이러스제의 효과적인 검색과 개발이 시도되고 있으나 항바이러스제로 공인되어 임상적으로 사용되고 있는 항바이러스제는 매우 적고

Key words: Herpes simplex virus, reverse transcriptase, HIV virus

*Corresponding author

이들 약물 또한 대부분 독성과 부작용을 나타내고 있다. 따라서 본 연구에서는 미생물의 다양성에 커다란 기대를 걸고 바이러스에 효과적인 화합물을 탐색하고 개발하기 위하여 국내 각지의 토양으로부터 분리된 균주를 대상으로 항바이러스 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

전국 각지에서 채취한 토양을 전처리한 후 starch-nitrate agar(6)와 humic acid agar(7, 8)를 사용하여 방선균을 분리하였고, starch 2%, soybean meal 2.5%, glucose 0.05%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, polypeptone 0.1%, $CaCl_2$ 0.1%, NaCl 0.3%인 발효 배지를 이용하여 28°C에서 4일간 배양한 후 상등액을 0.2 μm membrane filter로 여과하여 활성검색에 이용하였다.

세포와 바이러스

세포는 Vero 세포(African green monkey kidney cell)를 이용하여 DME(Dulbeco's modified medium) 배지에 10% fetal bovine serum을 첨가하여 confluent monolayer를 이루도록 배양하였으며 trypsin 처리를 하여 계대배양하였다. 또한 HIV 검정시에 이용한 T4 lymphocyte인 MT-4나 Hut-78 세포는 fetal bovine serum을 10% 첨가한 RPMI 1640 배양액에 접종한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 증식시키고 3~4일간격으로 재배양하였다.

바이러스는 herpes simplex virus type I(HSV-1) strain F(ATCC VR 73)와 herpes simplex virus type II(HSV-2) strain G(ATCC VR-734)는 국립보건원에서 분양받아 사용하였으며 HIV-1(strain HTLV-IIIB)와 HIV-2(strain LAV-ROD)는 벨기에의 Rega 연구소에서 계대배양하여 보관중인 것을 사용하였다.

항바이러스 활성의 검색

바이러스 활성검색은 plaque reduction assay(9)를 이용하여 세포의 confluent monolayer에 multiplicity of infection(MOI)이 24 well plate의 well당 100~200 pfu가 되는 virus 희석액 0.1 ml를 접종하고 1시간 동안 흡착시킨 후 미생물 발효액과 중층배지 1 ml를 첨가하였다. 37°C에서 3일간 배양하고 세포를 고정시킨 후 염색하여 plaque 수를 계산하였다.

감소된 plaque 수(%) =

$$\frac{\text{virus 대조구의 plaque 수} - \text{처리한 시료의 plaque 수}}{\text{virus 대조구의 plaque 수}} \times 100$$

면역형광측정법

HIV에 감염된 Molt-4 세포를 10% fetal calf serum이 함유된 MEM 배지에서 배양한 후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 1%의 BSA(bovine serum albumin)이 함유되어 있는 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 1×10^6 cell/ml이 되도록 현탁하였다. Well glass slide에 1×10^4 cell/ml을 loading 하고 acetone-MeOH(1:1)을 사용하여 실온에서 고정하였다. 고정후 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 10% normal goat serum으로 37°C에서 30분 처리하고 1% BSA가 함유된 PBS 완충용액으로 3번 수세한 후 바이러스에 대한 단일 클론 항체를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 0.25% Triton X-100이 함유되어 있는 PBS 완충용액으로 3회 수세한 후 FITC(fluorescein-isothiocyanate)-Goat anti-mouse IgG로 표지하고 PBS 용액으로 수세하였다. 수세후 50% glycerol로 mounting한 후 형광현미경으로 관찰하여 형광을 나타내는 세포를 positive 세포로 나타내었으며 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

Inhibition % =

$$1 - \frac{\text{positive cell number of sample}}{\text{positive cell number of control}} \times 100$$

역전사 효소의 역가 측정

역전사 효소의 역가 측정(10, 17)은 6 mM $MgCl_2$, 40 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mg/ml bovine serum albumin이 포함되어 있는 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.3)에 1 mM dGTP, 5 $\mu g/ml$ 의 oligo(dG)₁₂₋₁₈, 3H-dGTP(1 μCi), 발효액 및 0.5 units/ml의 AMV(Avian Myeloblastosis virus) 역전사 효소와 증류수를 첨가하여 잘 혼합한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 합성된 DNA는 10% TCA(Trichloroacetic acid) 용액으로 침전시키고 whatman GF/C 여과지에 모은 후 1 mM sodium pyrophosphate가 함유된 5% TCA 용액으로 세척하여 미합성된 동위원소를 제거하였다. 세척된 여과지를 차가운 ethanol로 다시 한번 세척한 후 건조하고 toluene based scintillation cocktail로 동위원소 양을 측정하였다.

세포독성검사

24 well plate의 각 well에 1.5×10^6 의 Vero cell $450 \mu\text{l}$ 와 $50 \mu\text{l}$ 의 시료를 혼합하여 시료가 첨가되지 않은 대조구 세포가 confluent monolayer를 형성할 때까지 3일간 37°C , 5% CO_2 배양기에서 배양한 후 배지를 제거하였다. 각 well의 세포를 trypsin 처리하고 trypan blue로 염색하여 염색되지 않은 세포수와 살아있는 세포수를 계산하여 대조구와 비교하였다.

세포 독성(%) =

$$\frac{\text{대조구의 세포수} - \text{처리한 시료의 세포수}}{\text{대조구의 세포수}} \times 100$$

HIV에 대한 항바이러스 활성의 측정

항 HIV 검사는 microtiter plate에 항 HIV 효과를 위해 virus에 감염된 MT-4 세포와 약물의 세포독성 검사를 위해 MT-4 세포(mock)만을 각 농도의 시험약물과 함께 배양한 후, MTT 방법(12)을 이용하였다.

시료를 RPMI 1640/10% FBS에 시험농도의 2배로 희석시키고, 96-well plate의 각 well에 $100 \mu\text{l}$ 씩 6개의 well에 첨가하고 cell control, virus control과 blank를 위한 well들에는 배양액만 담았다. 10^6 cell/ml로 자란 MT-4 세포를 항 HIV용과 mock용으로 분리하여 시험관에 넣은 후, 1000 rpm에서 5분간 원심분리시키고 침전된 세포들을 mock는 그대로, HIV용은 100 CCID_{50} (50% cell culture inhibition dose)의 virus 종균액을 넣어준 후, RPMI 1640/10% FBS를 더하여 3×10^5 cells/ml로 희석하였다. Blank를 제외한 모든 well에 세포만, 또는 HIV에 감염된 세포들을 $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C , CO_2 배양기에서 5일간 배양하고 $20 \mu\text{l}$ 의 MTT액을 각 well에 첨가한 후 37°C 에서 1시간 동안 배양을 하였다. 상등액 $150 \mu\text{l}$ 를 조심스럽게 제거한 후 6% Triton X-100이 포함된 산성화된 isopropanol $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 microplate shaker(Flow Laboratories)를 이용하여 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 용해후 형광 분석기(Multiskan MCC, Flow

Laboratories)를 이용하여 $690 \text{ nm}(A_{690})$ 와 $540 \text{ nm}(A_{540})$ 의 흡광도를 조사하여 각 well의 흡광 편차($A_{540} - A_{690}$)을 구하고 blank의 $A_{540} - A_{690}$ 을 다시 뺀 후, 각 농도에서의 3 well의 항 HIV값과 3 well의 세포독성값의 평균치를 계산하였다.

항 HIV 효과는

$$\frac{(A_T)_{\text{HIV}} - (A_C)_{\text{HIV}}}{(A_T)_{\text{mock}} - (A_C)_{\text{HIV}}} \times 100(\%) \text{로서,}$$

세포독성은

$$\frac{1 - (A_T)_{\text{mock}}}{(A_C)_{\text{mock}}} \times 100(\%) \text{로 구하였다.}$$

항 HIV값으로부터 EC_{50} (50% effective concentration)과 세포독성값으로부터 CC_{50} (50% cytotoxic concentration)을 구한 후 SI(Selectivity index = $\text{CC}_{50} \div \text{EC}_{50}$)를 구하였다.

결과 및 고찰

항바이러스 활성을 나타내는 미생물의 선별

전국 각지로부터 수집한 토양으로부터 분리한 미생물중 520여 각종 미생물을 대상으로 herpes simplex virus(HSV)와 reverse transcriptase를 대상으로 항 바이러스 활성을 조사하였다(Table 1). 그 결과 520여 시료중 HSV-1에 대해 95% 이상의 저해 활성을 나타낸 것이 6.9%이었으며, 95% 이상 HSV-1에 활성을 나타내는 시료를 다시 HSV-2를 대상으로 활성을 조사한 결과 62.1%의 활성을 나타내었다. 그러나 RT 활성 검색에서는 95% 이상 저해를 나타낸 것이 0.7%에 불과해 HSV 활성과는 좋은 대조를 나타내었다.

HIV 항원의 발현에 미치는 화합물의 영향

HIV 바이러스에 감염됨에 따라 바이러스 항원이 숙주세포에서 발현되는지의 여부를 관찰하여 바이러스 복제에 미치는 영향을 검토하기 위하여 형광

Table 1. Incidence of isolates having antiviral activity from various types of soils

Assay Methods	Division	Dilution rate	Sample No. treated	Inhibition(%)			
				95>	95-50	<50	CT
Plaque reduction assay	HSV-1	1/24	520	6.9	37.5	52.0	3.6
	HSV-2	1/24	29	62.1	24.1	10.3	3.5
RT assay		1/24	321	0.7	71.6	27.7	-

물질로 단일 클론 항체를 표지하여 숙주 세포의 감염 여부 및 바이러스 항원의 발현을 조사하였다(Table 2). 표에 나타난 수치는 숙주세포 10³당 바이러스 항원이 발현되는 세포의 수를 시료에 대한 대조군의 백분율로 나타내었다. 시료의 희석 배율이 증가함에 따라 바이러스 단백질 항원의 발현 비율이 증가되는 경향을 나타내는 것을 양성으로 하여 3개의 후보물질(S-164, 245, 301)을 선별하였으며 선별된 3균주 모두 전형적인 방선균의 형태를 나타내어 *Streptomyces* 속으로 추정되었으나 자세한 것은 더욱 더 조사하여야 할 것으로 생각되었다.

역전사 효소의 저해 활성

HIV와 같은 retrovirus의 경우 생활사를 생각해 볼

Table 2. Effect of fermentation broths on HIV antigen expression (inhibition %)

Strain No.	Dilution				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
S-495	55.6	112.5	114.0	93.8	101.1
S-3185	102.3	97.3	111.1	137.4	134.2
*S-164	45.4	59.6	59.6	105.6	96.7
S-2725	60.8	74.3	63.9	115.6	100.8
*S-245	31.3	73.5	86.9	85.5	116.9
S-691	72.2	55.8	77.8	89.0	100.4
S-947	47.7	58.7	81.5	72.5	73.7
*S-301	27.5	55.3	60.6	82.7	79.4
S-1359	90.2	93.9	84.7	83.2	88.4
H-12	13.0	45.6	38.4	64.7	87.0
H-13	70.7	59.6	83.3	81.2	93.0

때 그 증식을 억제하는 방법은 여러 단계에서 고려될 수 있으나 가장 효과적이며 특이한 단계는 역전사 효소를 저해하여 바이러스의 RNA가 DNA로 복제되는 것을 방지하는 초기단계라 생각된다. 이러한 역전사 효소를 선택적으로 저해하는 물질은 우수한 항바이러스 물질로 기대되며 실제 이 방법을 이용하여 탐색된 새로운 저해제가 보고되고 있다(13-15). 따라서 본 연구에서도 역전사 효소에 대한 저해 활성을 검토하여 80% 이상의 저해 활성을 나타낸 3개의 시료 S-245, S-301, S-1359를 선별하였다(Table 3). 특히 S-245와 S-301 시료는 HIV 항원 발현 시험에서도 비교적 좋은 결과를 나타내어 HIV 바이러스에 대한 저해활성을 더욱 더 조사하였다.

HIV 바이러스에 대한 저해 활성

HSV-1과 HSV-2 바이러스에 높은 활성을 나타내는 시료 30여개 중 80% 이상 역전사 효소에 저해 활성을 나타내고 항원 발현시험에서도 비교적 좋은 결과를 나타낸 2종류의 방선균 발효액 No. 245와 No. 301을 선별하여 HIV 바이러스에 대한 예방 효과를 조사하였다(Table 4).

Table 4에 나타난 바와 같이 두 시료 모두 HIV 바이러스에 활성을 나타내었으나 8S-245 시료는 균체를 methanol로 처리한 8S-245M 시료보다 바이러스에 대한 예방 효과가 높은 반면 8S-301에서는 상등액과 균체추출액의 항바이러스 활성에 커다란 차이를 나타내지 않았으며 두 시료중 8S-301이 전반적으로 8S-245보다 HIV-1, 2 바이러스에 대한 예방 효과가 더 높았다.

Table 3. Inhibitory activity of reverse transcriptase by fermentation broths

Strain No.	Dilution 10 ⁰		Dilution 10 ⁻¹	
	count(cpm)	Inhibition(%)	count(cpm)	Inhibition(%)
S-495	15073	19.8	14863	20.9
S-164	21427	0	18947	0
S-3185	20319	0	17744	5.5
S-245	2907	84.5	18034	4.0
S-691	15877	15.5	20738	0
S-947	16710	11.0	18862	0
S-301	2184	88.4	15030	20.0
S-1359	2900	84.6	12937	31.1
H-12	22024	0	25394	0
H-13	15455	17.7	22356	0

Table 4. Antiviral activity of fermentation broths against HIV-1 and HIV-2 virus

Strain No.	Dilution rate	Virus (Strain)			
		HIV-1 (HTLV-III _B)		HIV-2 (LAV-ROD)	
		cytotoxicity(%)	protection(%)	cytotoxicity(%)	protection(%)
8S-245	0.125(1/8)	86	4	92	-8
	0.0625(1/16)	13	69	26	70
	0.0313(1/32)	-6	77	-31	87
	0.0156(1/64)	-3	24	-14	37
	CC ₅₀ or IC ₅₀	0.0888	0.0218	0.0805	0.0187
8S-245M*	0.125	101	3	92	-8
	0.0625	33	27	89	70
	0.0313	17	6	19	87
	0.0156	8	10	15	37
	CC ₅₀ or IC ₅₀	0.0744	0.125	>0.0426	>0.0625
8S-301	0.125	91	-3	93	-3
	0.0625	8	85	33	69
	0.0313	-42	119	-37	58
	0.0156	-16	31	-12	47
	CC ₅₀ or IC ₅₀	0.0887	0.0182	0.0758	0.0190
8S-301M*	0.125	7	79	48	60
	0.0625	-41	94	-58	75
	0.0313	-43	31	-31	33
	0.0156	-12	13	-12	20
	CC ₅₀ or IC ₅₀	0.125	0.0384	>0.125	0.0146

*These Samples were extracted cell pellets with MeOH.

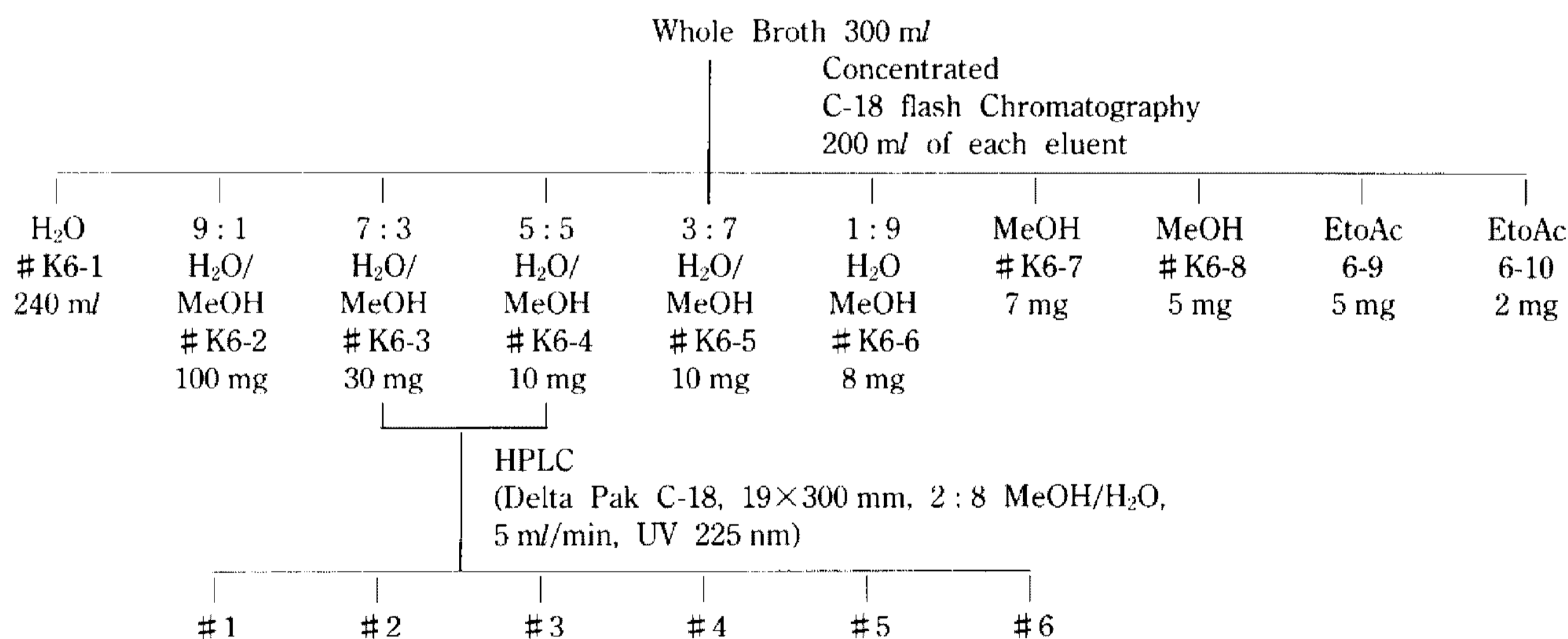


Fig. 1. Isolation of compounds appearing antiviral activity from Strain No. 301 fermentation broth.

항 HIV 활성 물질의 분리정제

두 종류의 시료 8S-245와 8S-301을 polarity에 따른 항 바이러스 활성 변화와 재현성을 검토하기 위

하여 두 미생물을 다시 배양하고 항 바이러스 활성 유무를 재조사하였다. 먼저 8S-301 발효액을 농축하고 methanol과 물을 조합하여 Fig. 1과 같이 분획하였으

Table 5. Antiviral activity of various fractionated samples against HIV-1 virus

Strain No.	Sample No.	Antiviral activity HIV-1, IC-50($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Cytotoxic activity CC-50($\mu\text{g}/\text{ml}$)
# 301	K6-1	>250	>250
	K6-2	>250	>250
	K6-3	171	>250
	K6-4	84	>250
	K6-5	>250	>250
	K6-6	>250	>250
	K6-7	>125	>125
	K6-8	>250	>250
	K6-9	>250	>250
	K6-10	>250	>250
# 245	K7-1	191	191
	K7-2	>250	>250
	K7-3	>250	>250
	K7-4	116	>116
	K7-5	21	21
	K7-6	139	>250
	K7-7	>250	>250
	K7-8	>250	>250
	K7-9	100	>100
	K7-10	>250	>250

Table 6. Antiviral activity of various fractionated samples derived from Strain No. 301 fermentation broth against HIV-1 virus (unit: $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Fraction	IC50(%)	CC50(%)	SI	IC90(%)	Protection(%)
KRI/KA134-1	>5.0000	> 5.00	X 1	> 5.0000	25
KRI/KA134-2	= 4.0219	> 5.00	> 1	> 5.0000	56
KRI/KA134-3	= 4.3238	>10.00	> 2	>10.0000	89
KRI/KA134-3	= 2.5433	> 5.00	> 2	> 5.0000	80
KRI/KA134-4	= 9.2077	>10.00	> 1	>10.0000	52
KRI/KA134-4	>5.0000	> 5.00	X 1	> 5.0000	18
KRI/KA134-5	= 3.9794	>10.00	> 3	= 8.4502	99
KRI/KA134-5	= 0.7941	> 5.00	> 6	= 4.9462	90
KRI/KA134-6	= 0.2019	>10.00	>50	>10.0000	79
KRI/KA134-6	= 0.3832	> 5.00	>13	> 5.0000	89

*Virus: HIV-1(IIIB/LAI)

Cell line; MT-4

Assay: CPE/MTT day 5 post infection

며, 8S-245 발효액도 동일한 방법으로 분획한 후 두 시료 모두 HIV-1 바이러스에 대해 활성을 조사하였다 (Table 5).

Table 5에 나타낸 바와 같이 8S-301 발효액의 K6-3과 K6-4 분획들은 HIV 바이러스에 대해 강한 저해

효과를 나타낸 반면 8S-245 발효액의 분획 K7-1~K7-10 시료들은 항바이러스 활성을 나타내었으나 동시에 세포독성을 나타내어 8S-245 발효액의 항바이러스 활성은 대부분 세포독성에 기인되는 것으로 생각되었다.

이 결과를 바탕으로 HIV 바이러스에 활성을 나타내는 물질을 더욱 더 분리정제 하기 위하여 8S-301 발효액으로부터 얻은 K6-3과 K6-4 분획들을 혼합하고 HPLC를 행하였다. 먼저 5~10분 간격으로 연속적으로 용출된 분획을 #1~#5로 나누고, column 내에 흡착된 물질의 methanol 용출액을 분획 #6으로 나눈후 각각의 분획에 대한 HIV 활성을 조사하고 그 결과를 Table 6에 나타내었다. HIV-1 바이러스에 대한 저해 활성은 #3, 5, 6 분획에서 모두 나타났으나 selectivity index(SI)가 #6, 5, 3의 순서로 나타나 앞으로 HIV-1 바이러스에 강한 저해 활성을 나타낸 #5, 6 분획을 분리함과 동시에 적절한 column을 선택하여 더욱 더 정제한 후 구조결정을 행하고 신규성 여부를 조사하려고 한다.

요 약

토양으로부터 분리한 520여 각종 미생물을 대상으로 항 바이러스 활성을 조사한 결과 HSV-1 바이러스에 95% 이상의 저해 활성을 나타낸 것이 6.9%이었으며, 이 시료들은 HSV-2 바이러스에서도 62.1%가 95% 이상의 활성을 나타내었다. 이들중 HIV 항원의 발현이 양성이고 80% 이상의 역전사 효소 활성 저해를 나타내는 2개의 시료를 대상으로 HIV 바이러스에 대한 저해 활성을 조사하여 HIV 바이러스에 강한 저해 활성을 나타내는 8S-301 시료를 선별하였다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업비의 지원을 받아 수행되었으며 관계자 여러분에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Hirsch, M.S. and J.C. Kaplan. 1987. Antiviral therapy. *Scientific American*. **256**: 66-75.
2. Chou, S. and T.C. Merigan. 1985. *Virology*, Pp. 323. Raven press, N.Y.
3. Alarcon, B., J.C. Lacal, J.M. Fernandez-sousa and L. Carrasco. 1984. Screening for new compounds with antiherpes activity. *Antiviral Res.* **4**:

- 231-243.
4. McLaren, C., M.N. Ellis and G. A. Hunter. 1983. A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. *Antiviral Res.* **3**: 223-234.
5. Freestone, D.S. 1985. The need for new antiviral agents. *Antiviral Res.* **5**: 307-324.
6. Kuster, E., and S. T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature* **202**: 928-929.
7. Hayakawa, M. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-Vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment Technol.* **65**: 501-509.
8. Hayakawa, M. and H. Nonomura. 1987. Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**: 609-616.
9. 지옥표외 1992. 신규 의약품 스크리닝 기술개발에 관한 연구(III). Pp. 203. 과학기술처.
10. Nishio, M., A. Kuroda, M. Suzuki, K. Ishimaru, S. Nakamura and R. Nomi. 1983. Retrostatin, a new specific enzyme inhibitor against avian myeloblastosis virus reverse transcriptase. *J. Antibiot.* **36**: 761-769.
11. Hanajima, S., K. Ishimaru, K. Sakano, S. Kumar Roy, Y. Inouye and S. Nakamura. 1985. Inhibition of reverse transcriptase by limocrocin. *J. Antibiot.* **38**: 803-805.
12. Pauwels, R., E. De clerq, J. Desmyter, J. Balzarins, P. Goubau, P. Herdewijin, H. Vanderhaeghe and M. Vandeputte. 1988. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J. virological methods*, **20**: 309-321.
13. Inouye, Y., H. Okada, S. K. Roy, T. Miyasaka, S. Hibino, N. Tanaka and S. Nakamura. 1985. Biological properties of Streptonigrin derivatives. *J. Antibiot.* **38**: 1429-1432.
14. Inouye, Y., H. Okada, J. Uno, T. Arai and S. Nakamura. 1986. Effects of Streptonigrin derivatives and Sakyomicin A on the respiration of isolated rat liver mitochondria. *J. Antibiot.* **39**: 550-556.
15. Tanka, N., T. Okabe, N. Tanaka, Y. Take, Y. Inouye, S. Nakamura, H. Nakashima and N. Yamamoto. 1986. Inhibition by Sakyomicin A of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and proliferation of AIDS-associated virus (HTLV-III/LAV). *Japan J. Cancer Res.* **77**: 324-326.

(Received August 14, 1993)