

## *Pseudomonas* sp. 960903에 의한 acetylcholinesterase 억제제의 생산 및 정제

김 경 자  
순천향대학교 생명과학부

**Production and Purification of Acetylcholinesterase Inhibitor from *Pseudomonas* sp. 960903. Kim, Kyoung-Ja.** Dept. of Life Science, Soonchunhyang University, Onyang, P.O. Box 97, Korea – To screen agent for the treatment of Alzheimer's Disease several strains of bacteria producing acetylcholinesterase inhibitor were isolated from soil. Strain 960903 showed strong acetylcholinesterase inhibitory activity and low butyrylcholinesterase inhibitory activity. The strain 960903 was identified as *Pseudomonas* sp. Acetylcholinesterase inhibitor was highly achieved in fermentation medium containing soluble starch 3.0%, glycerol 1.0%, pharmamedia 0.5%, KCl 0.3%, CaCO<sub>3</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05% (pH 6.5) at 30°C for 4 days. Acetylcholinesterase inhibitor was purified by Diaion WA-30 (OH) column chromatography and cellulose column chromatography. Acetylcholinesterase inhibitor showed the maximum wavelength at 205 nm and was soluble in water, acetic acid, ethanol, methanol and dimethyl sulfoxide. The concentration of 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of inhibitor against acetylcholinesterase was 25 µg/ml. The inhibitor was inactivated on heating at 100°C for 15 min and more stable in acidic region than alkaline region.

**Key words:** *Pseudomonas* sp., Acetylcholinesterase inhibitor, Alzheimer's disease

뇌의 퇴행성 질환 중의 하나인 알츠하이머병 [Alzheimer Disease(AD)]에 대한 관심이 최근 10년 동안에 급격히 증가하였다 [13-16]. AD는 중추신경계의 퇴행성 질병으로 기억력 감퇴, 인식력 및 지능 퇴화 등으로 나타난다 [9,10,12]. 선진국에서 노령 인구가 점차로 증가함에 따라, 비가역적으로 치매가 진행되며, 특히 노령 인구에 많이 나타나는 이 질환에 대한 관심이 증가하고 있다. 알츠하이머병으로 알려지고 있는 노인성 치매증은 노인 인구가 급증하고 있는 현재, 최대의 노화질환일 뿐만 아니라, 앞으로 21세기에는 인류가 당면할 최대의 보건 문제로 등장하고 있다. 이미 미국에서는 400만명이상의 환자에 사망률의 제 4위를 차지하고 있으며, 2000년대 중반까지는 1500만명의 환자가 발생되리라 예견되고 있다. 현재 서구 사회에서는 65세 이상 인구의 약 10%, 80세 이상 인구의 약 40-50%에서 알츠하이머병이 발생하고 있으며 이웃 일본에서도 혈관성 치매에 비해 해마다 알츠하이머병 발생 빈도가 증가하고 있어 큰 사회문제를 야기하고 있다. 우리 나라에서도 앞으로 평균수명이 증가할수록 이 병이 큰 사회적 문제를 야기하리라 예상되고 있으며, 인간이 태초부터 갈망하던 장수에 가장 큰 장애가 되고 있다[36,42]. 치매라는 것은 정신

기능의 전반적인 장애의 증후군을 말하며, 원인 또한 다양하다 [28,29,30]. 알츠하이머병은 그 단독으로나, 혈관계 질환과 병합되어, 치매의 흔한 원인이 되고 있다[33,34,35]. 기억력 감퇴, 인식력 및 지능 퇴화가 뇌에서 acetylcholine 생성 속도의 감소와 연관이 있다는 것으로 밝혀졌으므로[2,7,32] synaptic 기능을 회복하기 위하여 acetylcholine의 가수분해를 억제하는 것이 유효하다[3,6,37]. 선택적인 acetylcholine-sterase(AChE)와 비선택적인 AChE 억제제의 임상적 자료에서 볼때 [4,15,25,40] 말초 부작용은 butyrylcholinesterase(BuChE)의 억제와 관련된 것으로 보인다 [32,18,19]. 그러므로 BuChE에는 거의 작용하지 않고 AChE에 선택적으로 작용하는 억제제[1,6,23,31]를 screening하여 AD의 치료제로 개발하고자 하였다. 현재까지 보고된 acetylcholinesterase 억제제 [38,39]로는 Calaba bean에서 분리된 physostigmine, *Penicillium* sp.[21,24]에서 분리된 arisugacin[26], territrems B와 C[27], *Streptomyces* sp.에서 분리된 cyclophostin[22]등이 있다. 본 연구에서는 토양에서 분리한 균들로부터 AChE 억제제를 생산하는 균주들을 1차 screening[5,8]하여 그 중에서 BChE 억제 활성이 가장 적은 균주를 골라 균주의 특성을 조사하고, AChE 억제제 생산의 최적조건 및 AChE 억제물질의 유기 용매 추출성, 온도, pH 안정성, 수지 흡착성등을 조사한 후 억제제를 분리하여 그 특성을 조사하여 보고하는 바이다.

\*Corresponding author  
Tel. 041-530-1352, Fax. 041-530-1350  
E-mail: kyoungjakim@hotmail.com

## 재료 및 방법

### Acetylcholinesterase inhibitor 생산균의 분리 및 특성 조사

Acetylcholinesterase inhibitor 생산균을 분리하기 위하여 실험실에 보관중인 여러가지 토양균과 층남 일대의 토양에서 분리한 균주들을 순수 분리후 acetylcholinesterase inhibitor 생산배지에 배양하여 상등액을 취해 silica gel TLC plate 방법[17]에 의거하여 1차 screening하였다. 이 중에서 효소 억제 활성을 나타내는 균주들을 선택하여 Sigma사의 Dia-gnostic cholinesterase assay kit를 이용하여 활성을 측정하였다[41]. Acetylcholinesterase 억제 활성이 높은 균주들 중에서 butyrylcholinesterase 억제 활성이 낮은 균주 960903을 선별하였다. 최종 선별된 균주의 분류학적 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology[20] 및 Manual of methods for general bacteriology[11]의 방법에 따라 형태, 배양학적 특성 및 생리, 생화학적 특성을 조사하였고, 아울러 API test kit를 이용하여 동정하였으며 전자 현미경으로 모양과 크기를 조사하였다.

### Acetylcholinesterase inhibitor 생산 조건

Soluble starch 3.0%, glycerol 1.0%, pharmamedia 0.5%, KCl 0.3%, CaCO<sub>3</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05% (pH 6.5)를 억제제 생산배지로 사용하였으며, 탄소원을 glycerol 대신 glucose, fructose, maltose, mannose, raffinose, rhamnose, arabinose, sucrose, galactose, lactose 등을 첨가하여 억제제 생산의 최적 탄소원을 조사하였다. 또한 soluble starch를 첨가하지 않고 glucose만을 첨가하기도 하였다. 질소원으로는 pharmamedia 대신 proflo, bacto peptone, yeast extract, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>등을 첨가하여 억제제 생산의 최적 조건을 조사하였다. 온도 및 배지의 pH를 변화시켜 억제제 생산의 최적 조건을 조사하였다.

### Acetylcholinesterase 억제제의 분리 및 특성 연구

우선 acetylcholinesterase 억제물질이 균체내와 외에 어느정도 존재하는지의 여부를 알기 위하여 배양액을 8,500 × g에서 15분간 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하였다. 0.85% NaCl로 3회 세척 및 원심분리한 균체에 대하여 1배 부피의 acetone을 첨가하여 추출 및 여과하였다. Acetone 추출 후 감압농축하여 소량의 물에 녹인 시료의 억제 활성을 조사하였다. 원심분리한 상등액의 유기 용매 추출성을 조사하기 위하여 상등액의 pH를 2, 7, 10으로 조절하고 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol 을 사용하여 3 회씩 추출하여 나온 유기 용매층과 증화시킨 수층의 억제 활성을 조사하였다. 또한 상등액의 온도와 pH 에 대한 안정성을 조사하였다. 상등액의 흡착제 및 이온교환수지에 대한 흡착 여부를 조사하기 위하여 Diaion WA-30, Diaion WK-20, Diaion HP-20을 각각 5 ml씩 취하고 상등액을 등

량 섞은 후 4°C에서 4시간 후에 흡착 여부를 상등액에서 조사하였다. 흡착여부를 조사한 후에 Diaion WA-30의 경우는 2 N NH<sub>4</sub>OH로 용출시키고 용출액을 감압 건조후 물에 녹여 sephadex G-25 로 탈염 과정을 거치고 활성분획을 모아 동결 건조한 후에 cellulose column chromatography 를 실시하였으며 용출용매로는 butanol:acetic acid (10:1) 100 ml에 증류수를 gradient로 섞어 사용하였다. 활성 분획을 모아 감압건조하였다.

### Acetylcholinesterase inhibitor 활성 측정법[41]

Acetylcholinesterase에 의해 acetylcholine 으로부터 생성된 acetic acid가 acid-base indicator인 *m*-nitrophenol의 색을 변화시키는 원리를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정함으로써 acetylcholinesterase의 억제활성을 측정할 수 있다. Sigma의 Diagnostic cholinesterase assay kit를 이용하여 활성을 측정하였다. 40 µl NaCl 용액(0.15 mol/l), 40 µl acetylcholinesterase (10 mg/0.6 ml H<sub>2</sub>O, 0.47 U/mg solid), 20 µl 균주 상등액을 섞고 30°C에서 10 분간 preincubation을 한 다음 30°C로 미리 가온한 0.6 ml의 증류수, 0.4 ml의 *m*-nitrophenol, 40 µl의 acetylcholine (750 mg/5 ml 증류수)를 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후에 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 control로는 효소를 60°C에서 10 분간 가온후 첨가한 것과 균주 상등액 대신에 배지 상등액을 첨가한 것을 이용하였다. 이때 억제 활성은

$$\text{inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{con}} - A_{\text{samp}}}{A_{\text{con}} - A_{\text{susp}}}\right) \times 100 \text{ 으로 계산하였다}$$

$A_{\text{con}}$  = 효소를 60°C에서 10 분간 가온후 첨가한 것

$A_{\text{susp}}$  = 균주상등액 대신에 배지 상등액을 첨가한 것

$A_{\text{samp}}$  = 균주상등액을 첨가한 것

### Butyryl cholinesterase 억제 활성 측정 [41]

Acetyl cholinesterase 억제 활성과 같은 방법으로 활성을 측정하였으며, acetyl cholinesterase 대신 butyryl cholinesterase를 사용하고 기질로 acetyl choline 대신 butyryl choline 을 사용하여 butyryl cholinesterase 억제 활성을 측정하였다.

### Acetylcholinesterase 억제제의 pH 안정성 조사

정제된 억제 물질을 50 µg/ml 농도로 pH 1~11 까지의 용액에 녹인 후 4°C에서 20시간 둔 후 증화하여 억제 활성을 조사하였다.

### Acetylcholinesterase 억제제의 dose-response curve

정제된 억제 물질을 평량하여 1.0 µg에서 1,000 µg까지 변화시켜 acetylcholinesterase 억제활성을 측정하여 억제제의 양에 따른 억제 활성 정도를 dose-response curve로 작

성하였다.

**결과 및 고찰**

**Acetylcholinesterase 억제제 생산 균주의 동정**

분리된 토양균의 acetylcholinesterase(AChE)과 butyrylcholinesterase(BuChE) 억제 활성을 조사한 결과는 Table 1과 같

**Table 1. Acetylcholinesterase(AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory activity of selected strains**

Strains	AChE inhibitory activity(%)	BuChE inhibitory activity (%)
960903	82	5
970805	65	54
V-8	55	65
D-2	50	35
980302	50	55
T-5	45	60
X-5	40	45
M-4	40	35

**Table 2. Taxonomical properties of the strain 960903**

Morphological	
Gram stain	negative
Shape	rod
Cell size	0.5 × 1.75 μm
Motility	-
Spore formation	-
Physiological	
Optimum temperature	30°C
Oxidase	+
Catalase	+
Urease	-
Diffusible pigment	-
Methyl red test	-
Voges-Proskauer reaction	+
Indole test	-
Casein hydrolysis	+
Starch hydrolysis	-
Tyrosine hydrolysis	-
H <sub>2</sub> S production	+
Gelatin liquefaction	+
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Denitrification	+
Growth at 40°C	+
Gas (Acid) production from	
glucose	- (+)
lactose	+ (+)
maltose	- (+)
galactose	- (-)
sucrose	+ (+)

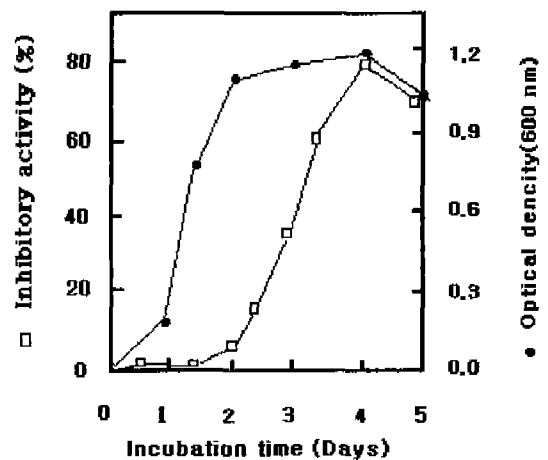
으며 AChE 억제 활성이 가장 높고 BuChE 억제 활성이 낮은 균주로 판명된 균주 960903의 전자 현미경 관찰은 Fig. 1과 같고, 균체의 크기는 0.5 μm × 1.75 μm이었으며 배양학적, 생리, 생화학적 특성을 Table 2에 나타내었다. 아울러 API test kit를 이용한 동정을 병행하였다. 이를 Bergey's manual of systematic bacteriology 및 Manual of methods for general bacteriology와 API kit의 반응 결과를 토대로 검토한 결과 억제제 생산 균주 960903은 *Pseudomonas mallei*이거나 그 근연종일 것으로 추정되었다.

**Acetylcholinesterase inhibitor 생산 배지의 최적 조건 확립**

억제제 생산 배지의 최적 조건은 Table 3에서 보는 바와 같이 최적의 탄소원으로는 soluble starch와 glycerol로 나타났다으며 soluble starch 없이 glucose만 첨가한 경우에는 억제제 생산이 되지 않는 것으로 나타났다. 또한 Table 4에서 보는 바와 같이 질소원으로는 pharmedia를 첨가한 경우에 억제제 생산이 가장 높은 것으로 나타났으며 유기



**Fig. 1. Transmission electron micrograph of the isolated strain 960903. Bar represents 1 μm.**



**Fig. 2. Relationship of growth and acetylcholinesterase inhibitor production of *Pseudomonas* sp. 960903.**

**Table 3. Effect of carbon sources on the inhibitor production by strain 960903**

Carbon sources#	Inhibitory activity (%)
Arabinose	73
Cellobiose	70
Fructose	83
Galactose	75
Glucose	73
Glycerol	85
Inositol	75
Maltose	73
Mannitol	70
Lactose	75
Sorbitol	75
Sucrose	78
Xylose	70
Glucose without soluble starch	0

# + Soluble starch 3%

\* Nitrogen source: phammamedia 0.5%

**Table 4. Effect of nitrogen sources on the inhibitor production by strain 960903**

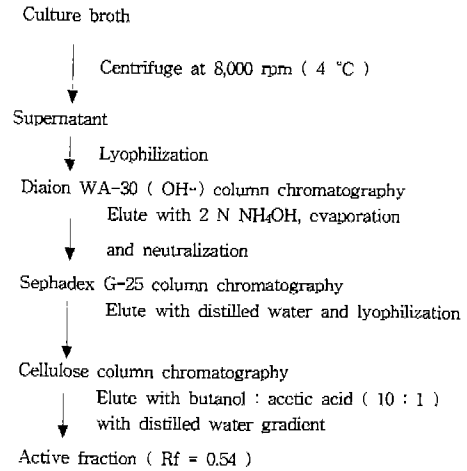
Nitrogen compounds	Inhibitory activity (%)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	70
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	70
NH <sub>4</sub> Cl	72
Urea	73
NaNO <sub>3</sub>	70
Casein	75
Malt extract	80
Beef extract	80
Phammamedia	85
Peptone	80
Proflo	83
Yeast extract	80

\*Carbon source : soluble starch 3.0% + glycerol 1.0%

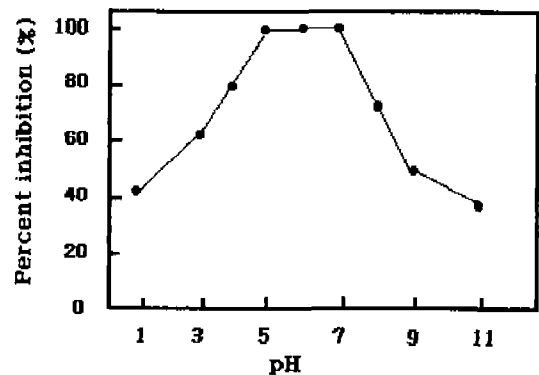
질소원을 첨가한 경우가 무기 질소원을 첨가한 것에 비하여 억제 활성이 높은 것으로 나타났다. 배지의 pH와 균주의 배양 온도별로 억제제 생산의 최적 조건을 조사한 결과 pH 6.5와 30°C가 최적으로 나타났다(Data not shown). 배양 시간에 따른 억제제의 최적 조건은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 4일째 억제제의 생산이 가장 높은 것으로 나타났다. 억제제 생산의 최적 배지 조건으로는 soluble starch 3.0%, glycerol 1.0%, phammamedia 0.5%, KCl 0.3%, CaCO<sub>3</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05% (pH 6.5)을 함유한 배지로 30°C에서 4일간 배양한 경우로 나타났다.

**Acetylcholinesterase 억제제의 분리 및 정제**

균주의 배양 상등액에서만 AChE 억제 활성이 나타났으



**Fig. 3. Purification steps of acetylcholinesterase inhibitor from *Pseudomonas* sp. 960903.**



**Fig. 4. pH stability of the acetylcholinesterase inhibitor of *Pseudomonas* sp. 960903.**

Acetylcholinesterase inhibitors in concentration of 50 µg/ml at various pH values were incubated for 20 hr at 4°C. After adjustment of pH 7.0, the inhibitory activities were assayed by the standard method. 100% represent inhibition activity at pH 7.0.

며 균체를 acetone으로 추출한 경우에는 억제 활성이 나타나지 않았다. 균주 배양 상등액의 효소 억제제가 유기 용매로 추출성 되는지 여부를 조사한 결과, 유기 용매에는 추출되지 않는 수용성 물질인 것으로 나타났다.

수용성인 억제제의 이온 교환수지에 대한 흡착성 여부를 조사한 결과 음이온 교환 수지인 Diaion WA-30에만 흡착되는 것으로 나타났다. 이와 같은 예비 실험 결과를 바탕으로 억제제를 Fig. 3의 과정에 따라 분리하여 silica gel TLC판에 점적하여 butanol:acetic acid:증류수 (4:1:1) 로 전개하여 ninhydrin 발색시약으로 발색시킨 결과, R<sub>f</sub>치가 0.54인 단일 물질로 나타났다. 열에 대한 안정성은 100°C에서 15분간 처리시 50%로 활성이 감소되었으며, pH에 대한 안정성을 조사한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 5-7에서는 안정한 것으로 나타났으며 pH 10에서는 pH 7에 비해 40%의 활성을 보였다. 억제제의 용해도를 조사한 결

**Table 5. Physicochemical properties of acetylcholinesterase inhibitor from strain 960903**

Nature	White powder
TLC R <sub>f</sub> value*	0.542
UV λ <sub>max</sub>	205 nm (in H <sub>2</sub> O)
Solubility	
soluble	Water, acetic acid, DMSO, methanol, ethanol
insoluble	Acetonitrile, butanol, acetone, chloroform, hexane, ethyl acetate

\*precoated silica gel plate (Merck)  
solvent system : butanol : acetic acid : dist. water (4:1:1)

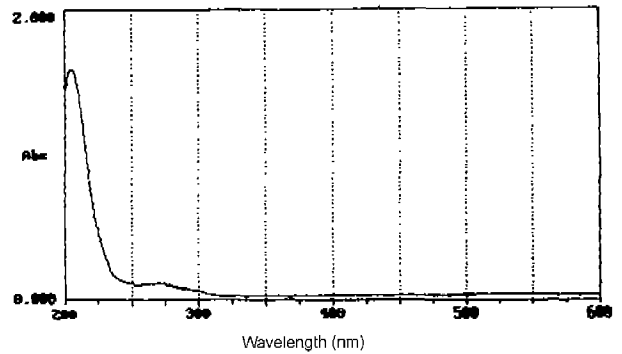
**Table 6. Results of visualization method of the acetylcholinesterase inhibitor from strain 960903**

Reagent	Result
Sulfuric acid	brown
Vanilline-sulfuric acid	negative
Hydrazine sulfate	positive
Ninhydrin	pink red
Vanilline-potassium hydroxide	positive
Anthrone	brown
Phenol-sulfuric acid	brown
Orcinol	negative
O-Dianisidine	brown
O-Phenylenediamine	positive

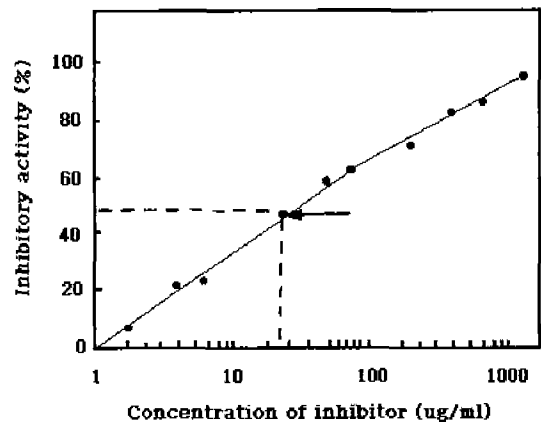
과, 증류수, acetic acid, DMSO, methanol과 ethanol에는 녹고 butanol, chloroform, ethyl acetate, acetone, acetonitril, hexane등에는 녹지 않는 것으로 나타났다(Table 5). 이 억제제를 UV scanning한 결과 205 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다 (Fig. 5). 또한 여러 가지 발색 시약으로 조사한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 hydrazine sulfate와 o-dianisidine에서 발색되어 aldehyde기나 ketone기가 있을 것으로 추정하고, anthrone과 phenol-sulfuric acid에 발색되어 당이 있을 것으로 추정하였으나 orcinol에서 발색이 되지 않아 당의 존재 여부는 명확하지 않았다. o-phenylenediamine에 발색되어 keto acid기가 있을 것으로 생각되고 vanilline-KOH와 ninhydrin에 발색되어 amino기가 있을 것으로 추정하고 있다. 이러한 특성으로 미루어 억제제를 아미노산 계열의 물질로 추정하고 있다. 분리된 억제제의 dose-response curve를 Fig. 6에 나타내었으며, 억제제의 양에 따라 80 µg/ml까지는 효소 억제 활성이 비례적으로 증가되었으며 IC<sub>50</sub>는 25 µg/ml로 나타났다.

**요 약**

치매 치료제 개발의 일환으로 acetylcholinesterase 억제제를 생산하는 균주를 토양균으로부터 분리하여 균주의 특성을 조사한 결과, *Pseudomonas* sp. 로 판명되었다. 효소



**Fig. 5. UV scanning spectrum of the purified acetylcholinesterase inhibitor produced by *Pseudomonas* sp. 960903.**



**Fig. 6. Dose response curve of acetylcholinesterase inhibitor of *Pseudomonas* sp. 960903.**

Different concentration of inhibitor was added in the acetylcholinesterase inhibitor assay mixture and the inhibitory activity was measured. The arrow shows IC<sub>50</sub> value of acetylcholinesterase inhibitor of *Pseudomonas* sp. 960903.

억제제의 최적 생산 조건은 soluble starch 3.0%, glycerol 1.0 %, pharmamedia 0.5%, KCl 0.3%, CaCO<sub>3</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05% (pH 6.5)을 함유한 배지에서 30°C, 4일간 배양한 경우로 나타났다. 균주 배양 상등액에서 Diaion WA-30 (OH-) column chromatography와 cellulose column chromatography를 이용하여 억제제를 분리하였다. 억제제의 최대 파장은 λ<sub>max</sub> 205 nm이었고, 물, 초산, ethanol, methanol, dimethyl sulfoxide에서 용해되는 것으로 나타났다. 분리된 억제제는 열에는 불안정한 물질로 나타났으며 산성과 증성에서 안정한 물질로 효소의 50% 저해 농도 (IC<sub>50</sub>)는 25 µg/ml이었다.

**감사의 글**

본 연구는 1999년도 순천향대학교 교육개혁 추진 의료, 정보신기술 개발 연구비로 수행된 연구로 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Arvanov, V. L., K. H. Ling, R. -C. Chen, and M. -C. Tsai. 1993. Effect of territrem-B on cholinergic responses of snail neuron. *Neurosci. Lett.* **152**: 69–71.
2. Bowen, D. M., C. B. Smith, P. White, and A. N. Davison. 1976. Neurotransmitter related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. **99**: 459–96.
3. Coyel, J. T., D. L. Price, and M. R. Long. 1983. Alzheimer's disease; A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. **219**: 1184–1189.
4. Davis, K. L., R. C. Mohs, J. R. Tinklenberg, G. A. Pfefferbaum, L. E. Hollister and B. S. Kopell. 1978. Physostigmine; Improvement of long term memory processes in normal humans. *Science*. **201**: 272–4.
5. Doctor, B. P., L. Tokar, E. Roth and I. Silman. 1987. Microtiter assay for acetylcholinesterase. *Anal. Biochem.* **166**: 399–403.
6. Dowd, P. F., F. C. Peng, J. W. Chen, and K. H. Ling. 1992. Toxicity and anticholinesterase activity of the fungal metabolites territrems to the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Entomol. Exp. Appl.* **65**: 57–64.
7. Elble, R., E. Giavobini, and G. F. Scarsella. 1987. Cholinesterase in cerebrospinal fluid. A longitudinal study in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **44**: 403–407.
8. Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Anders and R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88–95.
9. Ferrier I. N., A. J. Cross, J. A. Johnson, G. W. Roberts, T. J. Crow, J. Corsellis, Y. C. Lee, T. E. Adrian, G. P. McGergor, A. J. Baracese-Hamilton and S. R. Bloom 1983. Neuropeptides in Alzheimer type dementia. *J. Neurol. Sci.* **62**: 159–70.
10. Fibiger, H. C. 1982. The organisation of some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Res. Rev.* **4**: 327–88.
11. Gerhardt, P. G., G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Philips, 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington.
12. Glenner, G. 1983. Alzheimer's disease: The commonest form of amyloidosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **107**: 281–282.
13. Goldgaber, D., M. I. Lerman, W. McBride, U. Saffiotti and D. C. Gajdusek. 1987. Characterization and chromosomal localization of a cDNA ending brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*. **235**: 877–880.
14. Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, M. J. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Muller-Hill 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature*. **325**: 733–736.
15. Kaye, W. H., N. Sitaram, H. Weingartner, M. H. Ebert, S. Smallberg and G. Gillin. 1982. Modest facilitation of memory in dementia with combined lecithin and anticholinesterase treatment. *Biol. Psych.* **17**: 275–80.
16. Khachaturian, Z. S. 1985. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **42**: 1097–1105.
17. Kiely, J. S., W.H. Moos, M. R. Pavia, R. D. Schwarz and G. L. Woodard. 1991. A silica gel plate-based acetylcholinesterase activity: A mass method to screen for potential inhibitors. *Anal. Biochem.* **196**: 439–442.
18. Kitaguchi N, Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri and H. Ito. 1988. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*. **331**: 530–532.
19. Kowall, N. W., M. F. Beal, J. Busciglio, L. K. Duffy, and B. A. Yankner 1991. An in vivo model for the neurodegenerative effects of amyloid and protection by substance P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7247–7251.
20. Krieg, N. R. and J. C. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
21. Kuno, F., K. Otoguro, K. Shiomi, Y. Iwai and S. Omura. 1996. Arisugacins A and B, Novel and Selective Acetylcholinesterase Inhibitors from *Penicillium* sp. FO-4259. *J. Antibiot.* **49(8)**: 742–747.
22. Kurokawa, T., K. Suzuki, T. Hayaoka and T. Nakagawa. 1993. Cyclophostin acetylcholinesterase inhibitor from *Streptomyces lavendulae*. *J. Antibiotics*. **46**: 1315–1318.
23. Ling, K. H., C.-K. Yang, F.-T. Peng. 1979. Territrems, tremorgenic mycotoxins of *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 355–357.
24. Mohammed, Y. S., and M. Luckner. 1963. The structure of cyclophenin and cyclophenol, metabolic products from *Penicillium cyclopium* Westling and *Penicillium viridicatum* Westling. *Tetrahedron Lett.* **28**: 1953–1958.
25. Mohs, R. C. and K. L. Davis. 1982. A signal detectability analysis of the effect of physostigmine on memory in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **3**: 105–110.
26. Omura, S., F. Kuno, K. Otoguro, T. Sunazuka, K. Shiomi, R. Masuma and Y. Iwai. 1995. Arisugacin, a novel and selective inhibitor of acetylcholinesterase from *Penicillium* sp. FO-4259. *J. Antibiot.* **48**: 745–746.
27. Peng, F. C. 1995. Acetylcholinesterase inhibition by territrem B derivatives. *J. Natural Products*. **58**: 857–862.
28. Perry, E. K., R. H. Perry, G. Blessed and B. E. Tomlinson. 1977. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* **I**: 189.
29. Perry, E. K., B. E. Tomlinson, G. Blessed, K. Bergmann, P. H. Gibson, and R. H. Perry 1978. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* **II**: 1457–1459.
30. Ponte P, P. Gonzalez-DeWhitt, J. Schilling, J. Miller, D. Hsu, B. Greenberg, K. Davis, W. Wallace, I. Lieberburg, F. Fuller, and B. Cordell. 1988. A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine protease inhibitors. *Nature*. **331**: 525–527.
31. Relman, A. S. 1991. Tacrine as a treatment for Alzheimer's

- dementia. *N. Engl. J. Med.* **324**: 349–352.
32. Thomsen, T., B. Zendeh, J. P. Fisher and H. Kewitz. 1991. In vitro effects of various cholinesterase inhibitors on acetyl- and butyrylcholinesterase of healthy volunteers. *Biochem. Pharmacol.* **41**: 139–141.
  33. Roberts, G. W., T. J. Crow and J. M. Polak. 1985. Location of neuronal tangles in somatostatin neurones in Alzheimer's disease. *Nature.* **314**: 92–94.
  34. Rossor, M. N. 1982. Neurotransmitters and C.N.S. disease-Dementia. *Lancet.* **II**: 1200–04.
  35. Rossor, M. N., L. L. Iversen, G. P. Reynolds, C. Q. Mountjoy and M. Roth 1984. Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease. *Br. Med. J.* **288**: 961–4.
  36. Sitaran, N., H. Weingartner, and J. C. Gillin. 1978. Human serial learning : Enhancement with arecoline and impairment with scopolamine. *Science* **201**: 274–6.
  37. Smith, E. 1978. Choline in Alzheimer's disease. *Lancet.* **I**: 42–48.
  38. Summers, W. K., L. V. Majovski, G. M. Marsh, K. Tachiki and A. Kling. 1986. Oral tetrahydroaminoacridine in long term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *N. Engl. J. Med.* **315**: 1241–1245.
  39. Taylor, P. 1991. The cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **266**: 4025–4028.
  40. Thomsen, T., U. Bickel, J. P. Fischer and H. Kewitz. 1990. Galanthamine hydrobromide in a long-term treatment of Alzheimer's disease. *Dementia.* **1**: 46–51.
  41. Thomsen, T. and H. Kewitz. 1990. Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine in vitro and in vivo. *Life. Sci.* **46**: 1553–1558.
  42. Thomsen, T. and H. Kewitz., O. Pleul. 1990. A suitable methods to monitor inhibition of cholinesterase activities in tissues as induced by reversible enzyme inhibitors. *Enzyme.* **42**: 219–224.

(Received November 21, 2000)