

식물생장조절물질 말포민 A동족체의 화학구조 및 생리활성
김 건 우*

Chemical Structures and Physiological Activities of
Plant Growth Substance, Malformin A's

Kim K.W.*

ABSTRACT

Four malformin A's produced by *Aspergillus niger* van Tiegh. were separated by HPLC equipped with C₁₈ reversed-phase column and subjected to structural determination. Amino acid analyses and mass spectra data of the compounds indicate that they structurally resemble the cyclic pentapeptide malformin A₁. Their structures were deduced by two dimensional NMR and MS/MS experiments as *cyclo-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Ile* for A₁, *cyclo-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Val* for A₂, *cyclo-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Leu* for A₃, and *cyclo-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Ile-L-Val* for A₄. Among the mal-formin A's, the structure of A₃ was identical to that of malformin C, which was produced by *A. niger* strain AN-1. All the malformin A's caused severe curvatures of corn(*Zea mays* L.) roots and the activities of the malformin A's with molecular weight 529 were greater than those with molecular weight 515. Malformin A₁ caused the corn root curvature by 83% at a concentration of 0.25 μM. In the mung bean(*Phaseolus aureus* Roxb.) hypocotyl segment test, however, the molecular weight of malformin A's was not a factor influencing the physiological activities. Malformin A₁ stimulated the growth of mung bean hypocotyles by 165% at a 0.1 μM concentration.

Key words : Malformin A's, cyclic pentapeptide, root curvature, growth stimulation, *Aspergillus niger*

서 언

1958년에 Curtis는 옥수수(*Zea mays* L.)의 *Aspergillus ear rot*병 및 면화(*Gossypium barbadens* L. var. *maritima* Watt.)의 Black boll rot병 병원균¹⁸⁾인 *Aspergillus niger* van Tiegh.의 배양여액 중에 콩과식물의 줄기와 엽병에 기형(malforma-

tion)을 유발하며⁶⁾, 옥수수 뿌리에 극단적 굴곡⁷⁾을 일으키는 물질이 존재한다는 사실을 발견하였다. 1961년에는 Takahashi 등²¹⁾이 *A. niger*의 균주 56-39로부터 후일 말포민(malformin) A₁으로 밝혀진 활성물질을 단리하여 말포민으로 명명하고 valine/leucine/isoleucine/cysteine의 4종 아미노산이 1/1/1/2의 몰비로 조성되어진

* 한국화학연구소(KRICT, P. O. Box 107, Yusong, Taejeon, 305-606, Korea)

<1994. 11. 23. 접수>

펩티드성 화합물임을 보고하였다. 1967년 Takeuchi 등²⁰⁾은 *A. niger*의 균주 58-883으로부터 말포민 A₁ 및 A₂를 단리하고 이들의 아미노산 조성과 분자량을 밝혔다. 그러나 말포민의 화학구조에 관한 연구의 진전은 쉽사리 이루어지지 않았으며, 1974년에 이르러서야 Bodanszky 등^{3,4)}이 선택적 부분가수분해법, 화학합성 및 생물검정 등을 병용하여 말포민 A₁의 화학구조를 최초로 확정지었다.

한편, 말포민의 생물활성에 관해서도 다양한 각도에서 추구되어져 각종 식물생리활성 뿐만 아니라 세균에 대한 항균활성¹⁹⁾ 등, 다수의 연구 보고가 존재한다. 특히, 말포민의 식물생리활성에 관해서는 발견 당시의 생리활성 이외에도 옥수수 근모와 측근의 형성 촉진¹⁴⁾ 및 강남채두(*Phaseolus vulgaris* L.)에 있어서 부정근형성의 억제⁸⁾와 에틸렌과 파이토크롬이 관련된 생리반응의 유도⁹⁾가 알려져 있으며, 녹두(*Phaseolus aureus* Roxb.)유묘의 상배축절편에 대한 신장 촉진¹⁰⁾과 탈리(이층 형성)의 촉진¹¹⁾ 등이 보고되어 있다.

이와 같이 말포민의 발견 이래 많은 연구자들에 의해 말포민의 다양한 생리활성에 관한 철저한 연구가 있었지만, 피검시료로 제공된 말포민이 A₁과 A₂를 주성분으로 하는 혼합물이었으므로 정량적인 활성의 평가가 곤란하였으며, A₁과 A₂ 중 어느 쪽이 활성형인지 아니면 동등한 활성을 가지는지 불명인 채로 말포민의 구조와 활성에 따른 관련 자료가 전무한 실정이었다. 뿐만 아니라, 말포민이 일으키는 생리현상의 작용기작을 분자수준에서 조사하기 위한 정밀한 생화학적 실험에는 화합물의 순도가 미흡하여 연구의 진전에 있어서 장애를 초래하였다.

본 연구를 착수한 시점까지 5종의 말포민 동족체들이 보고^{1,3,4,20)}되었으나, 화학구조가 확정된 말포민은 A₁^{3,4)}과 C¹⁾뿐으로서 그 나머지는 화학구조가 여전히 불명확한 상태로 남아 있었다. 또한, 말포민류가 5개의 아미노산 잔기의 조합에 의해 구성되어진 환상펩티드라는 사실을 고려하면 이들 이외에도 새로운 말포

민 동족체가 존재할 가능성도 배제할 수 없으며, 실제로 신규의 말포민류를 발견할 경우에는 말포민류의 구조·활성 상관에 대한 많은 정보를 축적할 수 있다. 상기와 같은 배경으로부터, 말포민류에 관한 연구의 새로운 전개를 위하여 먼저 순수한 말포민 동족체를 확보하고 그 화학구조를 구명함과 동시에 말포민류의 생리작용 발현기구를 해명하기 위한 구조·활성상관도 함께 추구하는 것을 본 연구의 과제로 하였다.

재료 및 방법

1. 말포민 A₁의 HPLC에 의한 단리 및 정제

시료를 DMSO(Dimethyl sulfoxide)용액으로 하여 Capcell Pak C₁₈(10×250mm, Shiseido)칼럼이 부착된 HPLC장치에 주입하였다. 분석 조건은 용출용매계 MeOH-H₂O-TFA(Trifluoroacetic acid)(70 : 30 : 0.5)를 유속 2ml/min로 하였으며, 용출시료의 검출은 UV(254nm)와 RI로 하였다. 분취HPLC의 분리 조건은 동일한 칼럼에 TFA 0.1%가 첨가된 MeOH-H₂O(65 : 35)를 유속 2ml/min로 적용하였으며, peak의 검출 및 R_t치의 결정에는 UV 검출기(254nm)를 사용하였다. 얻어진 각 분획은 감압하에서 메타놀 및 TFA를 유거한 다음, 농축된 수용액을 동결건조하였으며, 그 결과 분말상의 말포민이 획득되었다.

2. 말포민 A 동족체의 산 가수분해

6N HCl에 녹인 각 시료 5μmol을 N₂를 채운 시료관에 넣고 밀봉하여 110°C에서 20시간 동안 가열하였다. 실온에서 냉각 후, 시료관을 개봉하여 감압하 데시케이터 안에서 건조시켰다. 분말상의 산 가수분해물을 100μl의 증류수에 용해시켜 아미노산 분석용 시료로 삼았다²¹⁾.

3. F₁ 유도체

5μmol의 시료를 6N HCl에 용해시켜 N₂로 채운 봉관 중에서 110°C, 20시간 가열하였다. 데시케이터 중에서 진공건조 후, 100μl의 증류수

로 녹여 3.6 μ M FDAA(1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide)와 1M NaHCO₃용액 10 μ l를 가하였다. 40 $^{\circ}$ C로 1시간 동안 가열·교반한 후, 반응용액을 실온에서 냉각하여 10 μ l의 2M HCl을 가하고 수분간 교반하였다. 감압건조 후, 반응혼합물을 100 μ l DMSO에 용해시켜 HPLC용 분석시료로 하였다. 각 시료는 MeOH-H₂O-AcOH(70 : 30 : 0.1)의 용매계를 유속 2ml/min로 하여 Senshu Pak ODS H-3151(10 \times 250 mm, Senshu科學)칼럼에 주입하였으며, 분리된 각 피크는 UV 340nm에서 검출하였다. 구성 아미노산의 광학활성은 관측된 각 피크의 Rt를 표준 아미노산의 FDAA 유도체의 Rt와 대조하여 결정하였다¹⁶⁾.

FDAA 유도체의 HPLC

말포민 A₁. Rt(min) :

6.10(L-Val), 7.67(L-Ile), 15.83(D-Leu)

말포민 A₂. Rt(min) :

6.19(L-Val), 16.21(D-Leu)

4. 기기 분석

NMR스펙트럼은 JEOL JNM GSX400과 GX 500에 의해 측정하였다. 용매로서 DMSO-*d*₆를 사용하였으며, 피크위치(chemical shift)값은 내부표준인 TMS(tetramethylsilane)를 기준으로 하여 δ (ppm)으로 표시되었다. COSY(correlation spectroscopy), HOHAHA(homonuclear Hartmann-Hahn spectrum), NOESY(nuclear Overhauser and exchange spectroscopy) 및 HMBC(¹H-detected multiple-bond hetero nuclear multiple quantum coherence spectrum) 등의 2차원NMR 실험은 JEOL GX400에 의해 수행하였다. Mass스펙트럼은 Finnigan MAT INCOS 50 및 HITACHI M-80(HRMS : high resolution mass spectrometry)을 사용하여 얻었다. LC/MS/MS의 측정에는 Finnigan Mat TSP 70B를 사용하였으며, FAB/MS/MS의 data는 Finnigan Mat TSQ-700형 질량 분석기에 의해 얻었다. 그리고 아미노산의 분석은 Hitachi 835형 아미노산분석기에 의해 수행하였다.

말포민 A₁(1).

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) : δ 8.87(1H, d, *J*=4.03Hz), 8.61(1H, d, *J*=6.60Hz), 7.96(1H, d, *J*=8.79Hz), 7.41(1H, d, *J*=9.16Hz), 7.13(1H, d, *J*=10.99Hz), 4.74(1H, dt, *J*=4.40, 10.99Hz), 4.49(1H, dt, *J*=6.23, 9.16Hz), 4.01(1H, dt, *J*=3.67, 6.60Hz), 3.95(1H, d, *J*=9.16Hz), 3.90(1H, dd, *J*=6.60, 10.26Hz), 3.53(1H, dd, *J*=3.30, 14.65Hz), 3.28(2H, m), 3.17(1H, dd, *J*=3.30, 14.29Hz), 2.06(1H, m), 1.72(1H, m), 1.58(1H, m), 1.54(1H, m), 1.40(2H, m), 1.17(1H, m), 0.92-0.79(18H, m)

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆) : δ 173.7, 172.7, 172.4, 170.4, 169.6, 58.6, 57.8, 52.8, 52.3, 50.3, 46.1, 45.0, 40.6, 34.0, 26.8, 24.6, 24.3, 22.5, 21.6, 19.4, 18.4, 14.7, 9.8

LC/MS : *m/z* 547.2(MNH₄⁺), 530.1(MH⁺), 498.1, 464.2, 369.1, 324.1, 209.1

MH⁺의 MS/MS : *m/z* 530.1(MH⁺), 501.9, 417.1, 372.3, 343.8, 304.3, 227.1, 213.3, 199.2

HRMS *m/z*(M⁺) : C₂₃H₃₉N₅O₅S₂, 이론치 529.2392, 실측치 529.2411

말포민 A₂(2).

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) : δ 8.75(1H, d, *J*=4.28Hz), 8.46(1H, d, *J*=6.71Hz), 7.73(1H, d, *J*=8.54Hz), 7.43(1H, d, *J*=9.15Hz), 7.15(1H, d, *J*=10.99Hz), 4.73(1H, dt, *J*=4.89, 10.99Hz), 4.47(1H, dt, *J*=6.72, 9.15Hz), 3.99(1H, dt, *J*=3.66, 7.32Hz), 3.94(1H, dd, *J*=9.15, 9.77Hz), 3.82(1H, dd, *J*=7.32, 9.77Hz), 3.52(1H, m), 3.25(2H, m), 3.20(1H, m), 2.04(1H, m), 1.86(1H, m), 1.60(1H, m), 1.41(2H, m), 0.92(3H, d, *J*=4.88Hz), 0.90(3H, d, *J*=6.71Hz), 0.89(3H, d, *J*=6.11Hz), 0.85(3H, d, *J*=6.72Hz), 0.84(3H, d, *J*=6.71Hz)

LC/MS : *m/z* 533.1(MNH₄⁺), 516.2(MH⁺), 484.1, 454.2, 355.1, 310.1, 256.1, 215.2, 195.1, 153.1

MH⁺의 MS/MS : *m/z* 516.0(MH⁺), 459.1, 417.2, 371.7, 304.4, 260.4, 221.8, 213.2, 185.2

HRMS *m/z*(M⁺) : C₂₂H₃₇N₅O₅S₂, 이론치 515.2235, 실측치 515.2227

말포민 A₃ (3).

¹H-NMR(DMSO-*d*₆) : δ 8.76(1H, d, *J*=3.66Hz),

8.45(1H, d, $J=6.1$ Hz), 7.69(1H, d, $J=8.85$ Hz), 7.37(1H, d, $J=8.85$ Hz), 7.13(1H, d, $J=10.99$ Hz), 4.74(1H, dt, $J=5.19, 10.07$ Hz), 4.44(1H, dt, $J=5.79, 9.15$ Hz), 4.20(1H, d, $J=8.85$ Hz), 3.95-3.90(2H, m), 3.52(1H, dd, $J=3.05, 14.95$ Hz), 3.35-3.25(2H, m), 3.23(1H, m), 2.03(1H, m), 1.60(2H, m), 1.51(1H, m), 1.42(2H, m), 1.37(1H, m), 0.92-0.80(18H, m)

FAB/MS : m/z 638.3($MC_3H_9O_2S^+$), 530.3(MH^+), 433.9, 337.0, 293.0, 224.8, 207.0

MH^+ 의 MS/MS : m/z 530.3(MH^+), 502.1, 434.0, 417.1, 389.1, 372.0, 344.1, 318.1, 304.0, 259.0, 231.1, 199.1, 185.1

HRMS $m/z(MH^+)$: $C_{23}H_{39}N_5O_5S_2$, 이론치 529.2392, 실측치 529.2387

말포민 **A₄**(4).

1H -NMR(DMSO- d_6) : δ 8.95(1H, d, $J=3.67$ Hz), 8.61(1H, d, $J=6.41$ Hz), 8.39(1H, d, $J=8.24$ Hz), 7.25(1H, d, $J=9.15$ Hz), 6.95(1H, d, $J=11.6$ Hz), 4.72(1H, dt, $J=4.57, 11.9$ Hz), 4.20(1H, dd, $J=7.93, 8.85$ Hz), 4.00(1H, m), 3.97(1H, dd, $J=9.15, 10.69$ Hz), 3.93(1H, dd, $J=6.1, 9.76$ Hz), 3.56(1H, m), 3.34(2H, m), 3.17(1H, m), 2.07(1H, m), 1.77(1H, m), 1.73(1H, m), 1.54(1H, m), 1.21(1H, m), 0.90-0.77(18H, m)

FAB/MS : m/z 624.3($MC_3H_9O_2S^+$), 516.3(MH^+), 434.0, 337.1, 277.2, 224.8, 207.0

MH^+ 의 MS/MS : m/z 516.3(MH^+), 488.4, 462.3, 417.2, 403.1, 372.0, 358.1, 318.0, 304.0, 276.0, 259.0, 230.9, 199.1, 185.1, 171.2

HRMS $m/z(MH^+)$: $C_{22}H_{37}N_5O_5S_2$, 이론치 515.2235, 실측치 515.2218

5. 식물생리활성 검증

옥수수의 근부글곡활성

시료를 소량의 DMSO에 용해시킨 후, 증류수를 가하여 일정 농도로 조제하였다. 이 용액으로부터 희석한 농도별 수용액(6ml)을 여지(Advantec No. 1, Toyo)를 간 특수 페트리디쉬(10×50mm)에 주입한 다음, 여지상에 옥수수 종자(골덴크로스반담 70, 坂田種苗) 60립을 파종

하고 파라필름으로 밀봉하여 28℃의 암소에 24시간 동안 두어 발아시켰다. 그 후, 동일 농도의 시료액(3ml)으로 처리한 페트리디쉬(9×20mm)안의 여지(Advantec No. 1, Toyo)상에 균일하게 발아된 종자를 각각 10립씩, 3반복으로 치상하였다. 파라필름으로 봉한 페트리디쉬는 28℃의 암소에 48시간 동안 정치한 후, 뿌리의 생장을 관찰하였다⁷⁾.

녹두 상배측의 신장활성

녹두 종자(블랙머펫)를 버미콜라이트에 파종 후 29℃, 13,000 lux 연속광하의 항온생장실에서 6일간 육성하였다. 균일한 유묘를 선발하여 정아의 기부로부터 7cm의 위치에서 절단한 다음, 농도별로 조제된 6ml의 시료용액을 넣어 둔 20ml 관병에 12개의 상배측절편을 담구어 전기 조건에서 2일간 생육시킨 후, 상배측절편의 신장증가분을 측정하였다¹⁰⁾.

결과 및 고찰

구조 분석

본 연구에 사용된 말포민류의 시료는 미국

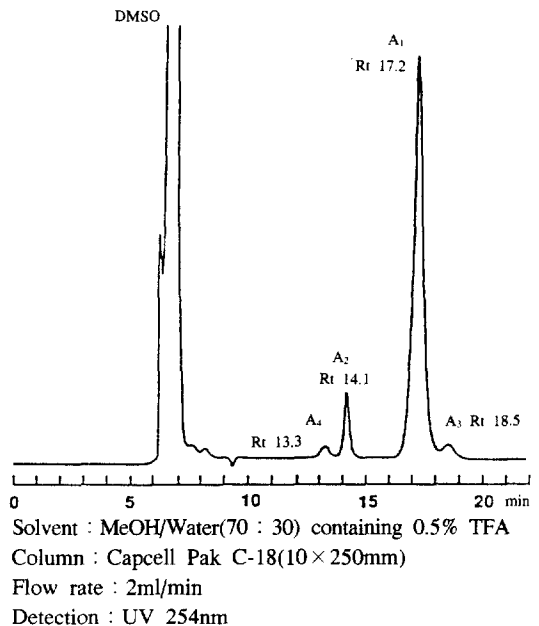


Fig. 1. Analysis of crude malformin A by reversed-phase HPLC.

Table 1. Results of amino acid analyses and molecular weights of malformin A's

Malformin	Amino acid	M ^r	Molecular formula
A ₁ (1)	Val (1) : Leu (1) : Ile (1) : Cys (2)	529	C ₂₃ H ₃₉ N ₅ O ₅ S ₂
A ₂ (2)	Val (2) : Leu (1) : Cys (2)	515	C ₂₂ H ₃₇ N ₅ O ₅ S ₂
A ₃ (3)	Val (1) : Leu (2) : Cys (2)	529	C ₂₃ H ₃₉ N ₅ O ₅ S ₂
A ₄ (4)	Val (2) : Ile (1) : Cys (2)	515	C ₂₂ H ₃₇ N ₅ O ₅ S ₂

Table 2. Partial proton NMR assignments for malformin A's by ¹H-¹H COSY experiments

Amino acid	NH	CHCO	CH or CH ₂ of side chain
A₁ (1)			
Cys 2	8.87	4.01	3.53(CH _{2a}), 3.17(CH _{2b})
Ile	8.61	3.90	1.72(CH), 1.54(CH _{2a}), 1.17(CH _{2b})
Val	7.96	3.95	2.06(CH)
Leu	7.41	4.49	1.58(CH), 1.40(CH ₂)
Cys 1	7.13	4.74	3.28(CH ₂)
A₁ (2)			
Cys 2	8.75	3.99	3.52(CH _{2a}), 3.20(CH _{2b})
Val 2	8.46	3.82	1.86(CH)
Val 1	7.73	3.94	2.04(CH ₂)
Leu	7.43	4.47	1.60(CH), 1.41(CH ₂)
Cys 1	7.15	4.73	3.25(CH ₂)
A₁ (3)			
Cys 2	8.76	3.95—3.90	3.52(CH _{2a}), 3.23(CH _{2b})
Leu 2	8.45	4.20	1.6(CH), 1.51(CH _{2a}), 1.37(CH _{2b})
Val	7.69	3.95—3.90	2.03(CH)
Leu 1	7.37	4.44	1.60(CH), 1.42(CH ₂)
Cys 1	7.13	4.74	3.35—3.25(CH ₂)
A₁ (4)			
Cys 2	8.95	4.00	3.56(CH _{2a}), 3.17(CH _{2b})
Val 2	8.61	3.93	1.73(CH)
Val 1	8.39	3.97	2.07(CH)
Ile	7.25	4.20	1.77(CH), 1.54(CH _{2a}), 1.21(CH _{2b})
Cys 1	6.95	4.72	3.34(CH ₂)

Chemical shifts are expressed as δ ppm from TMS in DMSO-*d*₆.

Purdue대학의 Curtis 교수로부터 공여받았으며, 당시의 화학분석 기술의 미발달로 인해 해결되지 못했던 문제점들의 극복을 위하여 조말포민 A의 정제공정²¹⁾을 검토하였다. 그 결과, 조말포민 A를 DMSO 용액으로 하여 역상ODS 칼럼을 사용한 분취HPLC에 적용하면 효율 높은 정제가 가능한 것으로 나타났다(그림 1). 그림 1의 HPLC분석에서, 조말포민 A는 4개의 성분으로 분리되었다. 88 : 12로 혼합되어 있다고 보고²⁰⁾된 바 있는 말포민 동족체들은 Rt 17.2의 A₁ 및 Rt 14.1의 A₂인 것으로 판명되었으며, 말포민 A₁, A₂, A₃ 및 A₄의 존재비는 피크면적비

로부터 각각 84 : 11 : 4 : 1로 산출되었다.

단리된 각 성분의 mass스펙트럼으로부터 A₁과 A₂는 각각 이미 발표된 것들의 분자량과 동일한 *m/z* 529, *m/z* 515의 분자이온을 보여주었다. 또한, 새로운 말포민으로 밝혀진 A₃는 *m/z* 529, A₄는 *m/z* 515의 분자량을 가지는 것으로 확인되어 말포민 A동족체는 분자량 529와 515의 2종으로 대별될 수 있음을 알게 되었다.

다음으로 각 말포민 A동족체의 산 가수분해를 실시한 후, 아미노산분석기에 의해 이들의 아미노산 조성을 조사하였다. 앞선 연구들^{17,21)}에서 말포민에는 2개의 cysteine 잔기가 포함되

어 있음이 판명되었으므로, cysteine의 분석은 제외하였다. 표 1에 단리된 말포민들의 아미노산 조성과 분자량 그리고 HRMS에 의해 유도된 분자식을 나타내었다.

말포민 A₁(1)

최근, 환상펩티드 화합물의 구조결정에 있어서 NMR스펙트럼의 해석이 유력한 수단¹²⁾이 되고 있으므로 이미 화학합성에 의해 그 구조가 확정되어 있는 말포민 A₁(1)을 NMR 실험에 적용하였다. ¹H-NMR스펙트럼으로부터, δ 7.13, 7.41, 7.96, 8.61 및 8.87의 저자장 영역에서 5개의 amide수소(NH)유래의 2중선이 관측되었다. 또한, α-methine수소(CHCO)에 기인한 5개의 수소가 δ 3.90, 3.95, 4.01, 4.49 및 4.74에서 나타났다. ¹H-¹H COSY 실험으로부터, 각 아미노산 잔기내의 amide수소는 α-탄소의 methine수소와 결합하고 있는 것으로 확인되었다. 모든 수소피크들은 NH←CHCO←CH←CH₃와 같은 상호 관계에 의해 귀속되었으며 이를 표 2에 정리하였다. 동일한 아미노산 잔기가 복수로 존재하는 경우, amide수소의 피크위치(chemical shift)값이 작은 쪽을 1(Cys 1), 큰 쪽을 2(Cys 2)로 표기하였다. δ 4.74(CHCO)의 피크는 δ 7.13(NH) 및 δ 3.28(SCH₂)과 상관피크를 나타냈으며, 마찬가지로 δ 4.01(CHCO)과 δ 8.87(NH)사이의 수소 및 δ 3.17과 δ 3.53(SCH₂)의 methylene수소들 사이에서도 상관피크가 관측되었다. 이들 결합에 의해 2개의 cysteine 잔기의 존재를 확인할 수 있었다. Valine 잔기유래의 상관피크들은 δ 3.95(CHCO)와 δ 7.96(NH)간, δ 3.95(CHCO)와 δ 2.06(CH₃CHCH₃)간 및 δ 2.06(CH₃CHCH₃)과 methyl수소들(CH₃CHCH₃) 사이에서 관측되었다. 또, δ 4.49(CHCO)의 δ 7.41(NH) 및 δ 1.40(COCHCH₂)과의 상관피크, δ 1.40(COCHCH₂)의 δ 1.58(CH₃CHCH₃)과의 상관피크, δ 1.58(CH₃CHCH₃)의 methyl수소와의 상관피크들에 의해 leucine 잔기가 확인되었다. Isoleucine 잔기의 경우는 δ 3.90(CHCO)의 δ 8.61(NH) 및 δ 1.72(CH₃CHC₂H₅)와의 스피ن결합과 δ 1.72(CH₃CHC₂H₅)의 methyl 및 ethyl 수소와의 스피ن결합에 의해 결정되어졌다. HOHAHA

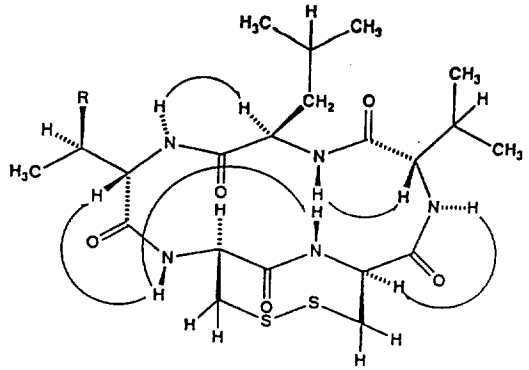


Fig. 2. Structure of malformin A₁ and A₂. (A₁, R = CH₂CH₃; A₂, R = CH₃). Arrows represent the observed NOE in the NOESY spectra of A₁ and A₂.

스펙트럼에서는 구성 아미노산 잔기의 NH로부터 4개의 화학결합(Cys : SCH₂, Val : CHMe₂, Ile : CH, Leu : CH₂)까지의 연결이 관측되었다. 이와 같은 결과는 ¹H-NMR실험에 의해 5종의 아미노산 잔기의 존재가 완전하게 밝혀져진 것을 의미하며, ¹³C broad-band스펙트럼, ¹H-¹³C COSY, HMBC의 해석에서도 상기의 결과가 지지되어졌다. 5개의 carbonyl탄소피크들이 δ 169.6(Val), δ 170.4(Leu), δ 172.4(Ile), δ 172.7(Cys 2) 및 δ 173.7(Cys 1)에서 나타났으며, 5개의 α-탄소피크들은 δ 50.3(Leu), δ 52.3(Cys 2), δ 52.8(Cys 1), δ 57.7(Ile) 및 δ 58.6(Val)에서 관측되었다. 그리고 δ 9.8(Ile-δ CH₃), 14.7(Leu-δ CH₃), 18.4(Leu-δ CH₃), 19.4(Val-γ CH₃), 21.6(Val-γ CH₃), 22.5(Ile-γ CH₃), 24.3(Leu-γ CH), 24.6(Ile-γ CH₂), 26.8(Val-β CH), 34.0(Ile-β CH), 40.6(Leu-β CH₂), 45.0(Cys 2-SCH₂) 및 46.1(Cys 1-SCH₂)에서 alkyl탄소들의 피크가 관측되었다. 말포민 A₁의 아미노산 배열은 공간적으로 근접한 위치 관계에 있는 수소들을 확인할 수 있는 2차원NOESY(그림 2)에 의해 결정되었다. 측정 결과, Cys 2의 amide수소(δ 8.87)와 Ile의 α-methine수소(δ 3.90)간, Ile의 amide수소(δ 8.61)와 Leu의 α-methine수소(δ 4.49)간, Leu의 amide수소(δ 7.41)와 Val의 α-methine수소(δ 3.95)간, Val의 amide수소(δ 7.96)와 Cys 1의 α-methine수소(δ 4.74)간, Cys 2의

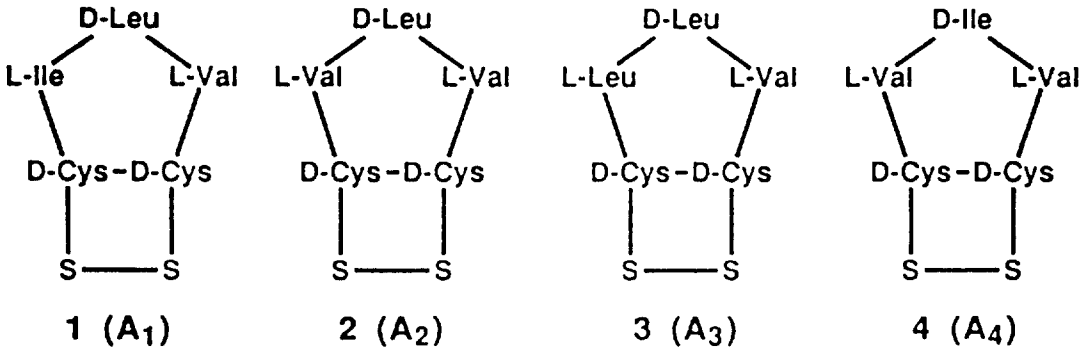


Fig. 3. Structures of malformin A₁(1), A₂(2), A₃(3), and A₄(4)

amide수소(δ 8.87)와 Cys 1의 amide수소(δ 7.13) 간 및 Cys 1의 methylene수소(δ 3.28)와 Cys 2의 methylene수소(δ 3.17, 3.53)간에서 상관피크들이 관측되어, 말포민 A₁(1)은 둘다 D체¹⁷⁾인 Cys 2와 Cys 1의 -S-S-가교구조를 포함하면서 이들 구성 아미노산 잔기들이 환상으로 결합된 화합물로 밝혀졌다. 따라서 말포민 A₁(1)의 화학구조는 *cyclo*-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Ile으로 결정되었다(그림 3). 말포민 A₁(1)의 입체화학의 보다 확실한 파악을 위해 A₁(1)을 가수분해한 후, FDAA에 의한 아미노산 유도체화법¹⁶⁾을 적용하여 구성 아미노산의 광학활성을 조사하였다. 그 결과, NOE효과의 해석에 의한 상기 절대구조의 정확성이 입증되었다.

전술한 NMR 해석 등의 각종 분석 수단이 말포민 A₁(1)의 구조 해명에 유효하다는 사실이 확인되었으므로 신규 말포민의 구조결정에 상기의 수법을 구사하기로 하였다.

말포민 A₂(2)

말포민 A₂(2)는 아미노산 분석 및 FDAA 유도체에 의한 입체화학의 조사를 통해 2개의 L-Val, 1개의 D-Leu 및 2개의 D-Cys으로 구성되어 있는 것으로 판명되었다. 단리한 A₂(2)의 ¹H-NMR 및 ¹H-¹H COSY스펙트럼의 해석을 통하여 각 아미노산 잔기의 수소들이 귀속되었으며, 이 결과를 표 2에 나타내었다. A₂(2)의 아미노산 배열은 2차원NOESY(그림 2)에 의해 결정되었다. Cys 2의 amide수소(δ 8.75)와 Val 2의 α -methine수소(δ 3.82)간, Val 2의 amide수소(δ 8.46)와 Leu의 α -methine수소(δ 4.47)간,

Leu의 amide수소(δ 7.43)와 Val 1의 α -methine수소(δ 3.94)간 및 Val 1의 amide수소(δ 7.73)와 Cys 1의 α -methine수소(δ 4.73)간으로부터 상관피크가 관측되었으며, A₁(1)과 마찬가지로 Cys 2(δ 8.75)와 Cys 1(δ 7.15)의 amide수소 상호간에서 상관피크가 인정되었다. 이와 같은 결과에 의해 말포민 A₂(2)의 구조는 *cyclo*-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Val으로 결정되었다(그림 3).

말포민 A₃(3)

말포민 A₃(3)는 아미노산 분석에 의해 1개의 Val 및 2개씩의 Leu과 Cys으로 구성되어 있는 것으로 나타났다. A₃(3)의 ¹H-NMR스펙트럼의 구성 아미노산 잔기의 각 시그널 역시 ¹H-¹H COSY스펙트럼의 해석으로부터 용이하게 귀속되었다(표 2). 이들 결과는 A₃(3)의 아미노산 배열이 *cyclo*-Cys-Cys-Val-Leu-Leu이라는 것을 시사하였지만, 시료량의 제한 때문에 다른 NMR 실험에 적용할 수가 없었다. 그러나, A₃(3)의 아미노산 조성, 분자량, HPLC상의 거동 및 NMR스펙트럼 등이 말포민 B의 주성분인 B_{1b}¹⁵⁾의 data와 일치하였으므로, 입체화학의 NMR 해석은 B_{1b}를 사용하여 수행하였다. 2차원NOESY의 측정 결과, Cys 2의 amide수소(δ 8.76)와 Leu 2의 α -methine수소(δ 4.20)간, Leu 2의 amide수소(δ 8.45)와 Leu 1의 α -methine수소(δ 4.44)간, Leu 1의 amide수소(δ 7.37)와 Val의 α -methine수소(δ 3.90-3.95)간, Val의 amide수소(δ 7.69)와 Cys 1의 α -methine수소(δ 4.74)간에서 상관피크들이 나타났으며, Cys 2(δ

8.76)와 Cys 1(δ 7.13)의 amide수소 상호간의 상관피크도 다른 동족체들에서처럼 관측되었다. 이와 같은 관측 결과는 말포민 A₃(3)가 *cyclo*-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Leu의 구조(그림 3)를 가진다는 것을 의미하였다. 이 구조는 *A. niger*의 균주 AN-1이 생산하는 말포민 C¹⁾의 구조와 일치하여 말포민 A₃(3)와 말포민 C는 동일한 화합물로서 판명되어졌으며, 말포민 C가 *A. niger*의 균주 56-39의 배양액에서도 존재한다는 사실이 처음으로 확인되었다.

말포민 A₄(4)

아미노산 분석을 통해 말포민 A₄(4)는 2개의 Val, 1개의 Ile 및 2개의 Cys를 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다. A₄(4)의 ¹H-NMR 및 ¹H-¹H COSY스펙트럼의 해석에 의해 아미노산 잔기들의 수소를 귀속(표 2)한 결과, 이 화합물은 A₂(2)의 Leu이 Ile으로 바뀐 구조일 것으로 추정되었다. 아미노산 배열의 조사를 위한 2차원 NOESY 실험은 시료량의 부족때문에 수행되어질 수 없었다. 그러나, 말포민류의 ¹H-NMR스펙트럼의 해석 결과, amide수소의 피크위치(chemical shift)는 각 구성 아미노산의 분자내 공간적 배열에 의존한다는 사실을 알 수 있었다. 즉, 아미노산 배열을 *cyclo*-D-Cys 1-AA 1-AA -

2-AA 3-D-Cys 2로 표기할 경우, 각 amide수소의 피크위치는 예외 없이 D-Cys 2 > AA 3 > AA 1 > AA 2 > D-Cys 1의 순으로 관측되었다. 이와 같은 배열은 후술의 MS/MS 실험에서도 입증되었다. 또한, 총합분자계산시스템인 MOLGRAPH(Daikin)을 사용한 분자역학계산의 결과(미발표 자료), 안정한 입체화학적 3차원 구조를 취하기 위한 각 아미노산의 광학활성은 AA 1 및 AA 3이 L체, AA 2가 D체인 것으로 나타났다. 상기 결과들로부터 말포민 A₄(4)의 구조로서 *cyclo*-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Ile-L-Val이 유도되었다(그림 3).

말포민 동족체의 MS/MS 실험

말포민류의 구조결정을 위해서 MS/MS 실험을 수행하였으며, 각 말포민의 분자이온(MH⁺)의 CID(collision induced dissociation)스펙트럼으로부터 1개의 아미노산씩 연이어 개열된 것(m/z 113 : Leu, Ile)/(m/z 99 : Val)을 의미하는 2개의 현저한 daughter이온들을 관측하였다. 말포민 A₁과 A₂의 LC/MS/MS스펙트럼에서, A₁(MH⁺ m/z 530)의 경우는 m/z 417(MH⁺ - Ile) 및 m/z 304(MH⁺ - Ile - Leu), A₂(MH⁺ m/z 516)의 경우는 m/z 417(MH⁺ - Val) 및 m/z 304(MH⁺ - Val - Leu)의 daughter이온들이 출현하였다. 한

Table 3. Partial assignment of the fragmentation from MS/MS experiments.

Malformin	MH ⁺	m/z (-AA 3)	m/z (-AA 2)
A ₁ (1)	530	417 (-Ile)	304 (-Leu)
A ₂ (2)	516	417 (-Val)	304 (-Leu)
A ₃ (3)	530	417 (-Leu)	304 (-Leu)
A ₄ (4)	516	417 (-Val)	304 (-Ile)

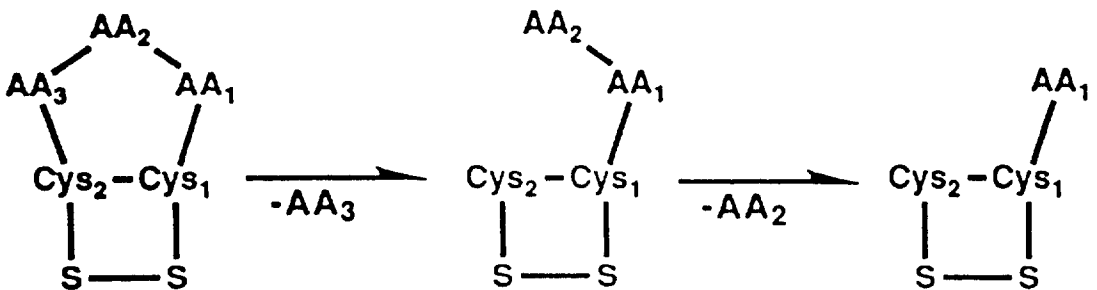


Fig. 4. Possible interpretation of the fragmentation of malformin A's in the MS/MS experiments.

편, A₃와 A₄에 대한 FAB/MS/MS실험의 결과, A₃(MH⁺ m/z 530)는 m/z 417(MH⁺-Leu) 및 m/z 304(MH⁺-Leu-Leu), A₄(MH⁺ m/z 516)는 m/z 417(MH⁺-Val) 및 m/z 304(MH⁺-Val-Ile)의 daughter이온들을 보여주었다(표 3). 이들 MS/MS스펙트럼으로부터, 말포민류에서는 Cys 2와 AA 3사이의 화학결합에서 개열이 시작되어 AA 3 및 AA 2의 연이은 개열이 일어난다는 것을 알 수 있었다(그림 4). 따라서, 전술한 각종 NMR 및 MS/MS실험 등에서 얻어진 결과의 해석에 의해 말포민 A동족체들의 화학구조가 완전히 해명되었다.

식물생리활성

Curtis는 말포민 A가 옥수수 근부의 굴곡⁷⁾ 및 녹두 상배축절편의 신장¹⁰⁾을 촉진한다는 사실을 발견한 바 있으며, 이후 이들 식물생리활성은 말포민류의 연구에 있어서 널리 사용되어져 왔다. 본 연구에서도 단리한 말포민 A동족체들의 생리활성을 조사하여 말포민류의 특징적인 환상펩티드 구조와 식물생리활성 발현 기구와의 인과관계를 해명하기 위한 생리활성 점정의 지표로서 이들 활성을 이용하였다.

말포민 동족체의 옥수수 근부굴곡활성

활성 점정은, 각 말포민 동족체를 농도별로 조제한 시료액 중의 옥수수 종자를 28°C, 압조전에 1일간 정치하여 발아시킨 후, 균일한 발아종자를 선발하여 동일조건하에서 2일간 생육시키는 방법에 의하였다. 활성의 평가는, 뿌리가 90° 이상의 굴곡각을 갖는 유묘의 출현율을 지표로 하였다. 그림 5에 전형적인 활성의 발현 양상을 나타내었다.

검정 결과, 공시한 모든 말포민 동족체가 옥수수의 발아단계에 있어서 근부의 굴곡활성을 보여주었다. 그러나, 이들의 생리활성곡선(그림 6)은 동족체에 따라 활성의 발현 농도가 미묘하게 다르다는 것을 시사한다. 일반적으로 분자량 529의 동족체가 분자량 515의 동족체보다 높은 활성을 나타내는 경향이였다. 분자량이 529인 A₁과 A₃가 10⁻⁶M 이하에서 높은 근부굴곡활성을 보여주는데 대해서, 분자량 515

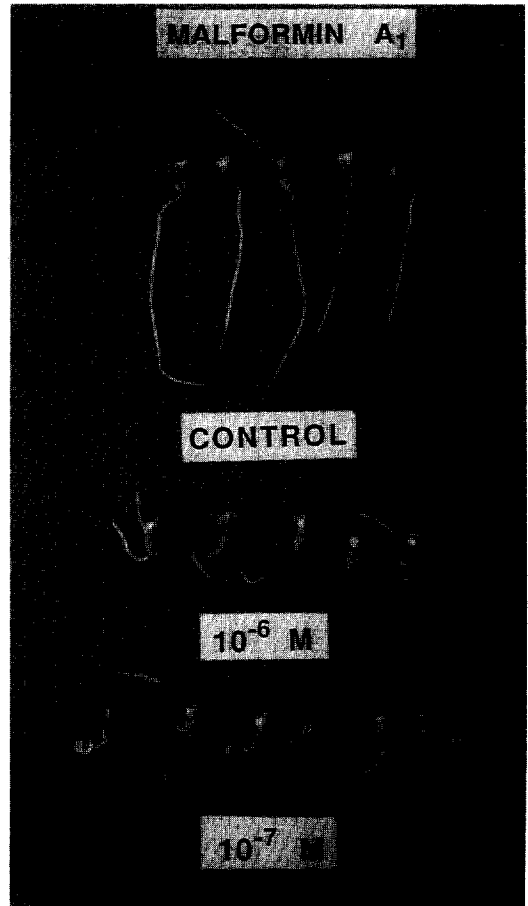


Fig. 5. Corn root curvatures induced by malformin A₁.

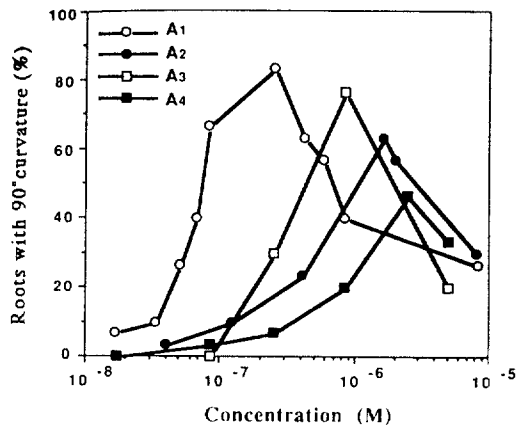


Fig. 6. Effect of malformin A's on corn root curvature. Seeds were germinated on filter paper moistened with the test solutions at 28°C for 3 days.

인 A₂와 A₄는 10⁻⁶M 이상의 농도를 필요로 하면서도 전군의 굴곡 발현을 증가하지는 못하였다. 말포민의 분자량과 HPLC의 retention time 간에는 일정한 상관관계가 있으며, 고활성을 보여준 동족체는 retention time이 긴 부류에 속하였다. 이는 말포민 분자전체의 극성이 근부 굴곡활성에 대해서 영향을 준다는 사실을 의미한다.

이와 같은 활성 결과를 각 동족체의 구조와 비교하여 고찰하면, 이들의 구성 아미노산의 구조 및 배열에 대한 말포민 수용부위의 인식 양식을 해석할 수 있다. 말포민 A₁의 제4-제5 아미노산 잔기인 D-Leu-L-Ile배열이 유사한 지용성기의 분포를 가지는 A₃의 D-Leu-L-Leu배열로 바뀌면 유의한 활성 저하가 인정되어진다. 제1~제3 아미노산 잔기인 D-Cys-D-Cys-L-Val배열은 모든 말포민류에 있어서 공통적인 구조단위이므로 옥수수 근부의 말포민 수용부의 경우, 제4-제5 아미노산 잔기의 구조 변화를 민감하게 인식하는 것으로 여겨진다. 이 원인으로, 측쇄구조가 상이한 leucine과 isoleucine의 조합이 제4-제5 아미노산 잔기에 존재할 시는 말포민 분자가 수용체와 결합하기 위한 최적 형상을 취할 수 있지만, D-Leu-L-Leu배열과 같이 동일한 측쇄구조가 연결되어 있을 시는 최적 형상을 유지할 수 없다는 것을 시사하고 있다. Bodanszky 등⁵⁾은 A₁의 제3·제5 아미노산 잔기가 서로 바뀐 배열을 가진 allomalformin(cyclo-D-Cys-D-Cys-L-Ile-D-Leu-L-Val)을 합성하여 그 생리활성이 A₁과 동등하며, 입체배좌(ORD, CD스펙트럼) 및 HPLC상의 retention time도 동일하다고 보고한 바 있다. 이와 같은 사실은, allomalformin이 A₁과 마찬가지로 상이한 아미노산 잔기의 배열(L-Ile-D-Leu)을 가질 뿐만 아니라, 분자 전체의 극성이 같으며, 3차원적으로 유사한 부분을 수용부에 접근시킬 수 있기 때문이라고 해석되어진다.

한편, 말포민 A₁의 -S-S-가교구조를 환원적으로 개열시키거나^{2,13)}, 2개의 cysteine이 격리된 -S-S-가교구조(cyclo-D-Cys-L-Val-D-Cys-D-Leu-L-Ile)를 합성^{3,13)}한 것은 불활성화된다고 알려져

있다. 이 사실들은 인접한 2개의 cysteine이 -S-S-가교구조를 형성함에 의해서 말포민의 환상구조가 활성형으로 고정된다는 것을 암시하고 있다. 따라서, 말포민류가 활성을 나타내기 위해서 -S-S-가교구조 역시 중요한 요인이라는 것을 알 수 있다.

말포민 동족체의 녹두 상배축신장활성

녹두 상배축절편을 이용한 말포민류의 생리 활성 검정은, 녹두 종자를 29°C, 연속광하에서 6일간 생육시킨 균일한 유묘를 7cm 길이로 절단하여 검정재료로써 사용하였다. 이 유묘의 상배축절편을 각 농도의 시료수용액 중에 담구어 전기 조건에서 2일간 육성한 후, 상배축의 신장증가분을 측정하였다. 그림 7에 전형적인 말포민의 활성 양상을 나타내었다.

이 검정의 결과, 말포민 A₁의 활성은 최적농도인 10⁻⁷M에서 상배축의 신장을 무처리구의 1.65배 정도로 촉진하였다(그림 8). 그림 8로부터, 말포민 A₂이외는 10⁻⁷M에서 최고의 신장촉진활성을 나타낸 사실 및 대부분의 말포민 동족체가 10⁻⁵M에서 생장이 저해되는 경향을 읽을 수 있다. 한편, 이들 동족체의 분자량과 활성의 관련성에 있어서는 옥수수 근부굴곡활성의 결과와 상이한 것으로 밝혀져, 상배축신장활성은 말포민 분자전체의 극성에 의한 영향을 받지 않는다는 사실을 알 수 있었다. 또, 말포민 A₄와 같이 제4 아미노산 잔기가 D-Ile일 경우에는 현저한 활성의 저하를 가져오는 것으로 추정된다.

높은 상배축신장활성을 보여주는 말포민 A₁

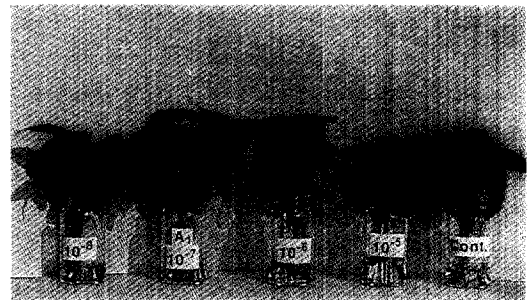


Fig. 7. Growth stimulation of mung bean segments by malformin A₁.

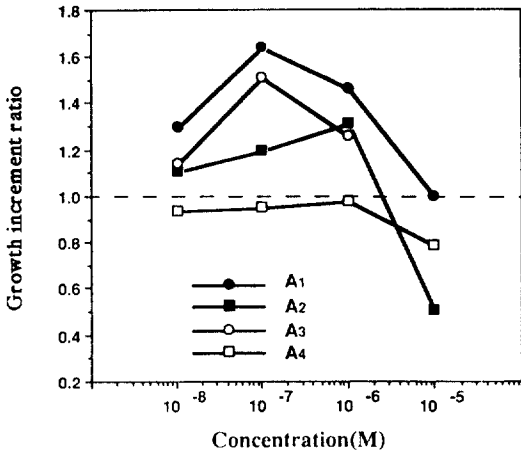


Fig. 8. Effect of malformin A's on the growth stimulation of mung bean segments. The segments were incubated in test solutions at 29°C for 2 days.

및 A₃는 제4-제5 아미노산 잔기의 배열이 각각 D-Leu-L-Ile, D-Leu-L-Leu으로, 여기에는 단순한 규칙성이 인정되지 않았다. 그러나, 제4 아미노산 잔기로서 D-Leu을 포함하는 말포민 A₁, A₂ 및 A₃를 비교해 본 결과, 제5 아미노산 잔기가 L-Ile이나 D-Leu일 경우, 상배축신장활성의 발현기구에 있어서 최적의 수용조건임을 알 수 있었다.

말포민의 존재가 알려진 이래, 말포민에 대한 수많은 화학적·식물생리학적 연구가 수행되었다. 그 결과, 식물생리학적 측면에서는 말포민류가 다양한 생리반응의 발현에 관여한다는 사실이 인정되었다. 그러나, 구조해석 연구에 있어서는, 말포민류는 통상의 용매에 난용이며 물성도 불안정하여 순수한 화합물로 단리할 수 없었다. 따라서, 혼합물 상태로 제공되어진 시료를 사용한 종래의 식물생리 연구에서는 정량적인 생리활성의 평가가 곤란하였을 뿐만 아니라, 말포민에 대한 분자수준에서의 작용기작 연구에는 부적합하였다. 본 연구를 통해 말포민 A동족체들이 순수하게 단리되었으며, 최신 기기분석 방법들의 적용에 의해 화학구조상의 문제점들도 일소되었다. 또한, 획득된 A동족체들에 대해서 실시한 생물검정에서 얻어진 구조·활성상관에 관한 자료

는, 말포민류가 일으키는 생리작용의 발현기구를 해명하는데 있어서 도움이 되리라 여겨지며, 금후의 연구 전개가 기대되어진다.

적 요

종래의 말포민류에 대한 화학구조 연구에 있어서의 난제들이 최신의 각종 기기분석 및 새로운 정제 방법의 적용에 의해 해결되어졌으며, 이 결과 말포민 A로부터 신규의 A₄를 포함한 4종의 A동족체들이 단리·구조결정되었다. 본 연구에 의해 말포민 A동족체의 화학구조는, A₁(1)이 *cyclo*-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Ile, A₂(2)가 *cyclo*-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Val, A₃(3)가 *cyclo*-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Leu-L-Leu, A₄(4)가 *cyclo*-D-Cys-D-Cys-L-Val-D-Ile-L-Val으로서 확정되었다. 이들 중, 말포민 A₃(3)는 말포민 C¹⁾와 동일한 화합물로 확인되었다.

단리된 말포민 A동족체에 대해서 옥수수 근부굴곡활성과 녹두 상배축신장활성을 지표로 하여 생물검정을 실시하였다. 옥수수 근부굴곡활성의 검정으로부터, 모든 A동족체가 활성을 나타내었으며, 특히 분자량 529의 동족체는 분자량 515의 동족체보다 높은 활성을 보여주었다. 그러나, 녹두 상배축신장활성의 검정에서는 분자량에 따른 차이가 인정되지 않았으며, 이들 중 말포민 A₄는 활성형이 아닌 것으로 확인되었다. 양검정법에서 모두 최고 수준의 활성을 나타낸 말포민 A₁은, 0.25 μM에서 83%의 옥수수 근부굴곡활성을 나타냈으며, 녹두 상배축신장활성의 경우, 0.1 μM에서 대조구에 비해 165%의 신장축진을 보였다.

인 용 문 헌

1. Anderegg, R.J., K. Biemann, G. Büchi, and M. Cushman. 1975. Malformin C, a new-metabolite of *Aspergillus niger*. J. Amer. Chem. Soc. 98 : 3365-3370.
2. Anzai, K. and R.W. Curtis. 1965. Chemical studies on malformin-III. Structure of malfo-

- min A. *Phytochemistry* 4 : 263-271.
3. Bodanszky, M. and G.L. Stahl. 1974. The structure and synthesis of malformin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71 : 2791-2794.
 4. Bodanszky, M. and G.L. Stahl. 1974. Structure and synthesis of malformin A₁. *Bioorg. Chem.* 4 : 93-105.
 5. Bodanszky, M., M.A. Bednarek, A.E. Yiotakis, and R.W. Curtis. 1982. Allomalformin. *Int. J. Peptide Protein Res.* 20 : 16-25.
 6. Curtis, R.W. 1958. Curvatures and malformations in bean plants caused by culture filtrate of *Aspergillus niger*. *Plant Physiol.* 33 : 17-22.
 7. Curtis, R.W. 1958. Root curvatures induced by Culture filtrates of *Aspergillus niger*. *Science* 128 : 661-662.
 8. Curtis, R.W. and G. Fellenberg. 1972. Effect of malformin on adventitious root formation and metabolism of indolacetic acid-2-¹⁴C by *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 13 : 715-726.
 9. Curtis, R.W. and W.W. John. 1975. Effect of malformin on phytochrome- and ethrel-mediated responses. *Plant Cell Physiol.* 16 : 719-728.
 10. Curtis, R.W. 1976. A mung bean assay for malformin-induced growth stimulation. *Plant Physiol.* 57 : 365-368.
 11. Curtis, R.W. 1977. Studies on the stimulation of abscission by malformin on cuttings of *Phaseolus aureus* Roxb. *Plant Cell Physiol.* 18 : 1331-1334.
 12. Isogai, A., N. Fukuchi, S. Yamashita, K. Suyama, and A. Suzuki. 1989. Syringostatin, novel phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Agric. Biol. Chem.* 53 : 3117-3119.
 13. Isono, K. and R.W. Curtis. 1964. Chemical studies on malformin-II. Synthesis of cyclic pentapeptides related to malformin A. *Phytochemistry* 3 : 277-287.
 14. Izahar, S., J.M. Bevington, and R.W. Curtis. 1969. Effect of malformin on root growth. *Plant Cell Physiol.* 10 : 687-698.
 15. Kim, K.W., F. Sugawara, J. Uzawa, S. Yoshida, N. Murofushi, N. Takahashi, R.W. Curtis, and M. Kanai. 1991. Structure of malformin B, phytotoxic metabolites produced by *Aspergillus niger*. *Tetrahedron Lett.* 32 : 6715-6718.
 16. Marfey, P. 1984. Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Carlsberg Res. Commun.* 49 : 591-596.
 17. Marumo, S. and R.W. Curtis. 1961. Chemical studies on malformin.
 1. Malformin A. *Phytochemistry* 1 : 245-257.
 18. Nyvall, R.F. 1979. *Field Crop Diseases Handbook*. The AVI Publishing Company, Inc. Westport. Connecticut. pp.59-60. pp.91-92. p.166.
 19. Suda, S. and R.W. Curtis. 1966. Antibiotic properties of malformin. *Appl. Microbiol.* 14 : 475-476.
 20. Takeuchi, S., M. Senn, R.W. Curtis, and F.W. McLafferty. 1967. Chemical studies on malformin-V. Malformin B₁ and B₂. *Phytochemistry* 6 : 287-292.
 21. Takahashi, N. and R.W. Curtis. 1961. Isolation and characterization of malformin. *Plant Physiol.* 36 : 30-36.