

Melittin-Hybrid 합성 펩타이드가 *Fusarium oxysporum*의 성장에 미치는 저해효과

이동건 · 신송엽 · 이성구 · 이명규 · 함경수*
한국과학기술연구원 생명공학연구소 펩타이드 공학 연구 그룹

Antifungal Effect of Melittin-Hybrid Synthetic Peptides for *Fusarium oxysporum*. Dong-Gun Lee, Song-Yub Shin, Sung-Gu Lee, Myung-Kyu Lee and Kyung-Soo Hahm*. Peptide Engineering Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon, 305-600, Korea — Melittin (ME) from honey-bee venom has a broad range of strong antimicrobial activity, but it has hemolytic activity against eukaryotic cells. In order to design peptides with powerful antifungal activity without cytotoxic property of ME and understand structure-antifungal activity relationships, the hybrid peptides derived from the sequences of ME and cecropin A (CA) or magainin 2 (MA), MA(10-17)ME(1-12) and CA(1-8)ME(1-12), were synthesized by solid phase method. MA(10-17)ME(1-12) showed potent antifungal activity comparable to ME against *Fusarium oxysporum* with no hemolytic activity against human red blood cells. The hybrid peptides showed strong inhibition of (1,3)- β -D-glucan synthase. This result indicates that the antifungal activity of the hybrid peptides against *Fusarium oxysporum* is attributed to the inhibition of cell wall synthesis. The results therefore showed a successful design of a peptide having antifungal activity without hemolytic property.

현재까지 곤충, 파충류 및 포유류로부터 수종의 항균펩타이드(antibacterial peptide)가 발견되어 왔다. 이들 항균펩타이드는 동물계(animal kingdom)의 숙주방어(host defense) 및 선천적 면역(innate immunity)에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(1, 2). Cecropin(3-5), magainin(MA)(6, 7) 및 melittin(ME)(8)은 cecropia moth의 hemolymph, bee venom, *Xenopus skin*으로부터 각각 분리 되었으며, 시스테인 잔기를 포함하지 않으며, 구조적으로 양쪽친화성(amphipathicity)의 α -helix를 형성하고 있음이 알려져 있다(9). Cecropin은 곤충 뿐만 아니라 pig intestine에 그 존재가 확인되어 동물계에 널리 존재한다는 것을 알 수 있다(5).

이와 같은 항균펩타이드들은 gram positive 및 gram negative bacteria에 작용하여 항균활성을 나타내고 있으며, 특히 MA은 gram negative bacteria에 대하여서는 cecropin보다는 약한 항균활성을 나타내지만, 곰팡이(fungi)에 대하여 항진균활성(antifungal activity)을 가지고 있음이 알려져 있다(6). 또한 ME는 강한 항균활성을 나타내고 있으며, 진핵세포에 대하여 세포독성(cytotoxicity)을 나타내는 위험성이 알려져 있다(10). 지금까지 ME의 유도체의 합성을 통하여 펩타이드의 진핵세포에 대한 세포독성을 줄이고 항균활성을 증가시키는 연구가 많이 진행되어지고 있다. 특히 cecropin의 N말단의 양쪽친매성을 지닌 부분과 ME의 N말단의 소수

성부분(hydrophobic region)의 아미노산 서열을 접합(hybrid)시킨 hybrid 펩타이드가 본래의 천연형의 펩타이드보다 강하거나 비슷한 항균활성을 나타내며 진핵세포에 대한 세포독성을 거의 나타내지 않는다는 것이 보고된 바 있다(11-13).

그러나 기존 항균펩타이드의 부분서열을 서로 접합시킨 hybrid 펩타이드의 항진균활성에 대하여서는 지금까지 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 펩타이드의 구조와 항진균활성과 상관관계를 검토하며, 세포독성을 가지지 않으며 보다 강한 항진균활성을 가진 hybrid 펩타이드의 설계를 시도하였다. ME의 N말단 서열에 MA의 N말단 서열을 서로 접합시킨 hybrid 펩타이드인 MA(10-17)ME(1-12)를 합성하여 항진균 활성에 대하여 검토하였다. 또한 항균활성에 대하여 연구된 바 있으나 항진균 활성에 대하여서는 아직 알려져 있지 않은 ME의 N말단 서열에 Cecropin A(CA)의 N말단 서열을 서로 접합시킨 CA(1-8)ME(1-12)도 합성하여 항진균 활성을 조사하였다.

각 hybrid 펩타이드는 CA의 특징적인 구조와 비슷한 구조를 취하게 하기 위하여 amphipathically basic-flexible-hydrophobic 구조를 취하도록 설계하였다. 각 합성 펩타이드는 인간의 적혈구 세포에 대한 세포독성을 조사하고, 식물 병원균의 대표적인 *Fusarium oxysporum*에 대한 항진균활성을 검토하였다.

재료 및 방법

*Corresponding author.

Key words: Antifungal activity, melittin, hybrid peptide, β -1.3 glucan synthase

사용 시약

각종 Fmoc(N_α -fluorophenylmethoxycarbonyl)-아미노산-Wang Resin 및 Rink Amide MBHA(4-methylbenzhydrylamine)-Resin는 Nova Biochem.(USA) 제품을 사용하였다. 각종 Fmoc-아미노산 및 펩타이드 합성용 시약들은 ABI(Applied Biosystem, USA), Nova Biochem.(Swiss) 및 Sigma chemical Co.(USA)의 제품을 사용하였다. (1,3)- β -D-glucan synthase 활성 측정에 사용된 α -amylase와 UDPG(uridine diphospho-D-glucose)는 Sigma chemical Co.(USA)의 제품을 사용하였고, UDP-[U - ^{14}C]glucose는 Amersham Co.(UK)로부터 구입하여 사용하였다. 사람의 적혈구는 한국 적십자 혈액원으로 부터 구입하였다.

펩타이드 합성

펩타이드의 합성은 본 연구실에서 개발한 펩타이드 합성 장치를 이용한 수동 합성 방법을 이용하였으며, Fmoc을 N_α -amino group의 보호기(protecting group)로 사용하는 고상합성법(solid phase method)(14)으로 합성 하였다. ME-OH, CA-OH 및 MA와 같이 카르복실말단이 -OH 형태의 펩타이드 합성인 경우는 펩타이드의 카르복실말단의 아미노산에 해당하는 Fmoc-아미노산-Wang Resin을 출발 물질로 사용하였으며, CA(1-8)ME(1-12), ME 및 MA(10-17)ME(1-12)와 같이 카르복실말단이 -NH₂ 형태의 펩타이드 합성인 경우는 Rink Amide MBHA-Resin의 Fmoc기를 20% piperidine-NMP(N-methylpyrrolidone) 용액으로 2시간 반응시켜 제거한 후 카르복실말단의 아미노산에 해당하는 Fmoc-아미노산을 도입한 Fmoc-아미노산-Rink Amide MBHA-Resin을 출발 물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 coupling에 의한 펩타이드 chain의 연장(elongation)은 N -hydroxybenzotriazole (HOBt)-Dicyclohexylcarbodiimide(DCC)법에 의하였다. 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산의 coupling이 끝난 후, 20% piperidine-NMP 용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 dichloromethane(DCM)으로 여러 번 씻어 준 다음 질소 가스로 말렸다. 여기에 TFA(trifluoroacetic acid)-anisole-phenol(95:5:5, v/v) 용액 또는 TFA-phenol-thioanisole-H₂O-triisopropylsilane(85:5:5:5:5, v/v)을 가

하고, 2~3시간 반응시켜 보호기의 제거 및 resin으로부터 펩타이드를 분리시킨 다음, 용액을 centrifuge tube에 모으고 diethylether를 가하여 펩타이드를 침전시키고 난 후, 다시 한번 diethylether로 세척하고, 하룻밤 실온에서 건조시킨 후 crude 펩타이드를 얻었다. Crude 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 acetonitrile gradient로 reverse phase(RP)-HPLC column(Delta Pak, C₁₈ 300 Å, 19.0 mm×30 cm, Waters)을 이용하여 정제하였다. 본 실험에서 사용한 합성 펩타이드의 아미노산 서열은 Fig. 1에 나타내었다.

사용균주 및 배지조성

균주는 식물병원균인 *Fusarium oxysporum*(KCTC 6084)을 사용하였으며, 각종 펩타이드의 항진균성의 측정을 위하여 YPD 완전배지(glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5%, pH 5.5)를 사용하였다.

사람의 적혈구에 대한 용혈(hemolysis)활성 측정

Alsevers용액(11)에 0.9% NaCl, 1% agarose 및 10% human red blood cell을 suspension시킨 배지 6 ml를 포함하는 sterile agarose plate에 직경 3 mm의 구멍을 낸 후 여기에 단계적으로 희석시킨 3 μ l의 펩타이드의 용액을 load하였다. 37°C에서 하룻밤 방치한 후, 생성된 clear zone의 직경을 측정하여 면적을 구하고 이 면적과 펩타이드 농도를 plot하여 적혈구를 용혈시키는 최소한의 농도를 나타내는 용혈농도(hemolytic concentration, HC)를 계산하였다.

항진균성의 활성 측정

ME 및 ME-hybrid 펩타이드가 *F. oxysporum*의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 우선 합성한 각종 펩타이드가 5 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가된 YPD 액체배지(10 ml)에 미리 준비해 둔 포자현탁액을 일정량 접종한 후, 28°C에서 3일간 140 rpm으로 진탕배양 한 후, 건조 균체량을 측정하였으며, 여기서 항진균활성을 가진 펩타이드를 선별하여 agar hole method에 의하여 항진균활성을 가시화하였다. YPD 평판배지에 우선 직경 1 cm 거리로 미리 배양한 균체 중앙에 직경 3 mm 정도의 구멍을 뚫고 여기에 항진균성 활성이 있는 합성펩타이드 10 μ l(1 mg/ml)를 주입 시킨후 28°C에서 하룻밤 배양하여 생성된 clear zone으로부터 항진균능을 측정하였다.

(1,3)- β -D-glucan synthase 활성 측정

세포막에 존재하는 (1,3)- β -D-glucan synthase(E.C.2.4.1.34 : UDP-glucose : 1,3- β -D-glucan 3- β -D-glucosyltransferase) 활성에 합성 펩타이드가 미치는 영향을 조사하기 위하여 균체로 부터 세포막을 분리하고(15), Tang과 Parr의 방법(16)을 일부 변형하여 다음과 같이

CA-OH	: KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVG QATQIAK-OH
ME-OH	: GIGAVLKVLTITGLPALISWIKRKRQQ-OH
ME	: GIGAVLKVLTITGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂
MA	: GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-NH ₂
CA(1-3)ME(1-12)	: KWKLFKNICIGAVLKVLTITG-NH ₂
MA(10-17)ME(1-12)	: KKFGKAFVIGIGAVLKVLTITG-NH ₂

Fig. 1. Amino acid sequences of parental peptides and Melittin-hybrid peptides.

(1,3)- β -D-glucan synthase 활성을 측정하였다. 반응액 (2 mg/ml α -amylase, 0.4 mM UDPG, 3.14 μ M UDP-[U- 14 C]glucose(1 μ Ci/ml), pH 7.7) 33 μ 에 세포막으로부터 분리한 막단백질을 2 mg/ml 되게 cold extraction buffer(50 mM Hepes pH 7.7, 1M Sucrose, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 0.1 mM GTP)로 희석한 용액 90 μ 를 혼합하였다. 여기에 합성 펩타이드 10 μ (1 mg/ml)를 첨가하여 실온에서 15분간 반응 시킨 후 1 ml의 5% trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 합성된 glucan을 침전시켰다. 이것을 Whatman GF/C glass microfiber filter (Whatman Int. Ltd)로 거른 후 5% TCA로 세번 세척한 후, β -scintillation counter(Beckman, U.S.A)를 이용하여 방사선량을 측정하였다.

결과 및 고찰

펩타이드 합성

합성한 펩타이드는 analytical RP-HPLC column을 이용한 용출 양상으로부터 확인한 결과 그 순도가 모두 95% 이상으로 나타났다(data not shown). 합성 펩타이드는 matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometer(17)에 의하여 분자량을 확인한 결과 측정치(observed value)와 계산치(calculated value)가 거의 일치함을 보였다(Table 1).

Table 1. The molecular weights of the synthetic peptides determined by the MALDI mass spectra.

peptides	calculated value	observed value
CA-OH	4006.1	4009.7
ME	2847.4	2850.6
ME-OH	2848.4	2849.6
MA	2467.6	2469.6
CA(1-8)ME(1-12)	2200.5	2200.8
MA(10-17)ME(1-12)	2200.5	2200.8

Table 2. Growth inhibition of the peptides for *F. oxysporum*

peptides ^a	Dry cell weight (mg/ml)
Control	9.0
CA-OH	19.1
ME	0.04
ME-OH	1.5
MA	10.0
CA(1-8)ME(1-12)	1.5
MA(10-17)ME(1-12)	0.02

^a: Each peptide concentration used was 5 μ g/ml

합성펩타이드의 항진균활성 및 용혈활성

식물병원균인 *Fusarium oxysporum*의 성장에 대한 합성펩타이드의 항진균활성을 각 펩타이드 농도 5 μ g/ml에서 조사 하였다. 그 결과 CA-OH와 MA는 *Fusarium oxysporum*의 성장에 별 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 오히려 CA-OH는 진균의 성장을 2배 정도 증가시켰다. ME-OH 및 CA(1-8)ME(1-12)는 균의 성장을 85% 정도 억제시켰으며, ME 및 MA(10-17)ME(1-12)는 균의 생육을 거의 100% 억제시키는 강한 항진균활성을 나타내었다(Table 2). 또한 ME, CA(1-8)ME(1-12) 및 MA(10-17)ME(1-12)의 균의 성장억제능을 나타내는 단위인 최저저해농도(MIC: Minimum Inhibitory Concentration)는 ME는 10 μ g/ml이며, CA(1-8)ME(1-12) 및 MA(10-17)ME(1-12)는 20 μ g/ml이었다.

ME-OH 및 ME는 강한 항진균활성을 나타내며, 강한 항진균활성을 나타내었지만(Table 2), 진핵세포에 대하여 세포독성을 나타내는 위험성이 알려져 왔다(8). 따라서 사용한 합성펩타이드들이 진핵세포에 대한 세포독성을 가지고 있는지를 알아보기 위하여 인간의 적혈구 세포에 대한 용혈현상을 검토해 본 결과, ME-OH 및 ME는 강한 용혈현상을 나타낸 반면, CA(1-8)ME(1-12), MA(10-17)ME(1-12)의 경우 1 mM 이상의 펩타이드 농도에서도 적혈구의 용혈현상이 나타나지 않는 것으로 보아 세포독성이 없다고 판단된다(Table 3). 강한 항진균성 활성을 가진 ME, CA(1-8)ME(1-12) 및 MA(10-17)ME(1-12)에 대하여 thin agar hole 방법을 이용하여 균의 성장억제능을 가시화하여 본 결과, ME, CA(1-8)ME(1-12) 및 MA(10-17)ME(1-12)는 10 μ g/well에서 성장억제능을 나타내는 clear zone이 생성되는 것을 확인 하였다(Fig. 2).

합성펩타이드가 (1,3)- β -D-glucan synthase 활성에 미치는 영향

일반적으로 많은 곰팡이들의 세포벽에는 chitin과 β -(1,3)-glucan이 주성분으로 구성되어 있다(18, 19). 지금까지 알려진 항진균성 물질들은 세포벽합성 효소인 (1,3)- β -D-glucan synthas의 활성에 영향을 주어서 항진

Table 3. Hemolytic concentration (μ M) for parental peptides and Melittin-hybrid peptides

peptides	hemolytic concentration (μ M)
CA-OH	>1000
ME	57.7
ME-OH	30.9
MA	>1000
CA(1-8)ME(1-12)	>1000
MA(10-17)ME(1-12)	>1000

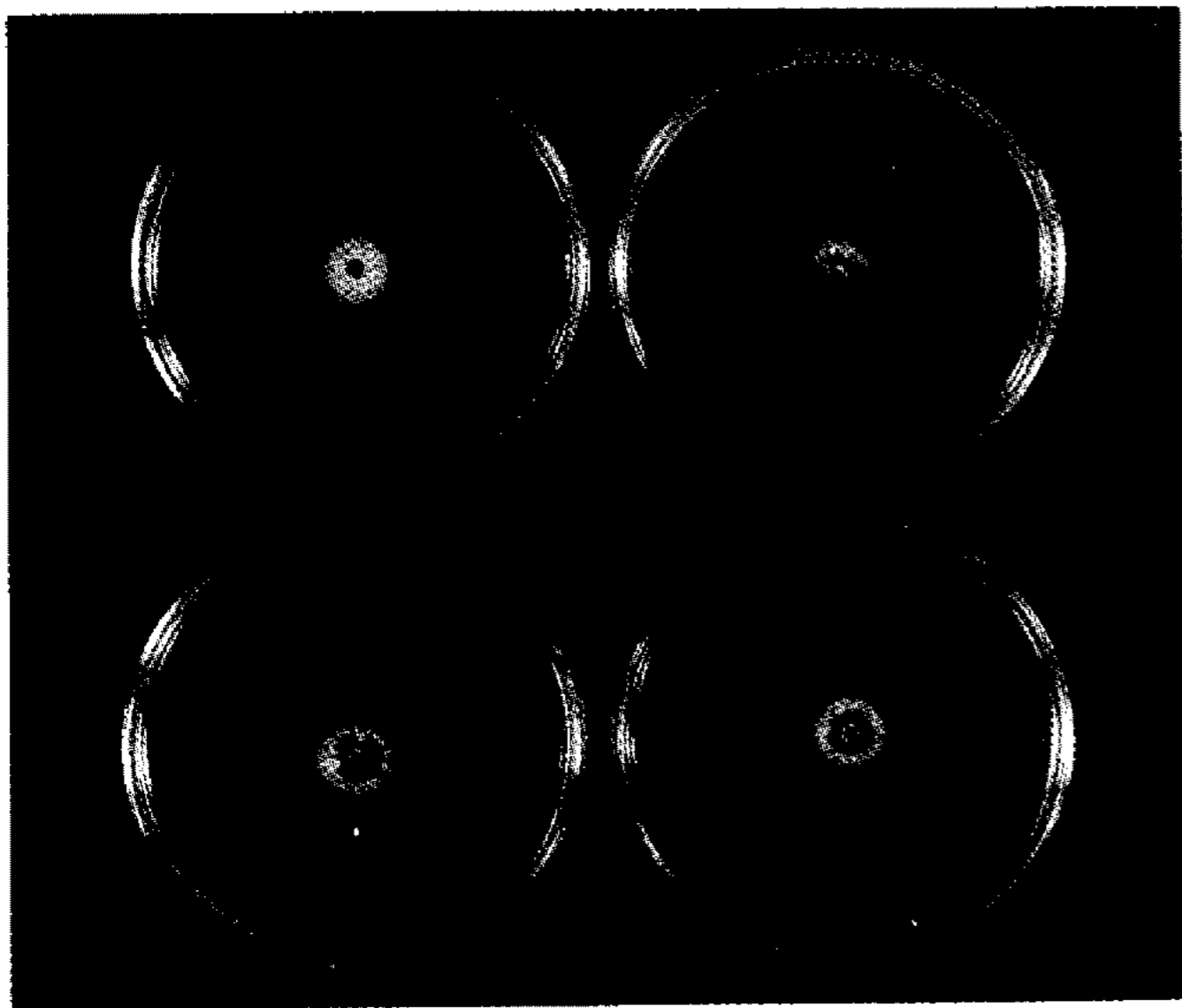


Fig. 2. Agar hole assay for antifungal activity of ME and its hybrid peptides against *Fusarium oxysporum*.

ME and its hybrid peptides (10 μ g) were loaded in the hole located at the center of the *F. oxysporum* mycelium disk on the 1% YPD agarose plate. The plate was incubated overnight at 28°C.

A: Control, B: ME, C: CA(1-8)ME(1-12), D: MA(10-17)ME(1-12)

균활성을 나타낸다는 보고가 있다(15, 16, 20-23). 따라서 항진균활성을 가지는 ME, CA(1-8)ME(1-12), MA(10-17)ME(1-12)이 (1,3)- β -D-glucan synthase 활성에 미치는 영향을 조사해 본 결과, 펩타이드 농도 1 μ g/ml에서 ME, CA(1-8)ME(1-12), MA(10-17)ME(1-12)는 각각 30.4%, 32.8%, 44.7%의 저해율을 나타내었다(Fig. 3). 이와같은 결과는 ME-hybrid 펩타이드들이 *F. oxysporum*에 대하여 가지는 항진균활성은 이 균의 세포벽합성의 억제에 의한다는 사실과 관련되어 있음을 시사한다.

ME-OH가 ME에 비하여 30배 정도의 약한 항진균활성을 나타내는 것으로 보아 펩타이드의 C-말단의 -NH₂ 형태가 펩타이드의 항진균활성에 필수적임을 나타내고 있다. CA(1-8)ME(1-12)는 천연형의 CA 및 ME보다 짧은 서열을 가지면서도 ME의 세포독성을 가지지 않으며 천연형의 펩타이드 보다 강한 항진균활성을 나타낸다고 보고하고 있다(12). *F. oxysporum*에 대한 항진균활성에서는 CA(1-8)ME(1-12)는 ME보다는 약하지만 항진균활성을 나타내었으며, 특히 MA(10-17)ME(1-12)는 ME 만큼의 강한 항진균활성을 나타내었다.

따라서 ME의 N말단이며 flexible-hydrophobic 부분에 해당하는 ME(1-12)에 MA의 amphipathically basic 부분인 MA(10-17)를 접합시킴으로서, ME의 진핵세포에 대한 세포독성을 상실하고 강한 항진균활성을 나타내는 펩타이드를 설계, 합성할 수 있었으며, 이와 같은 결과는 각종 진균에 대한 보다 강한 항진균활성을 가

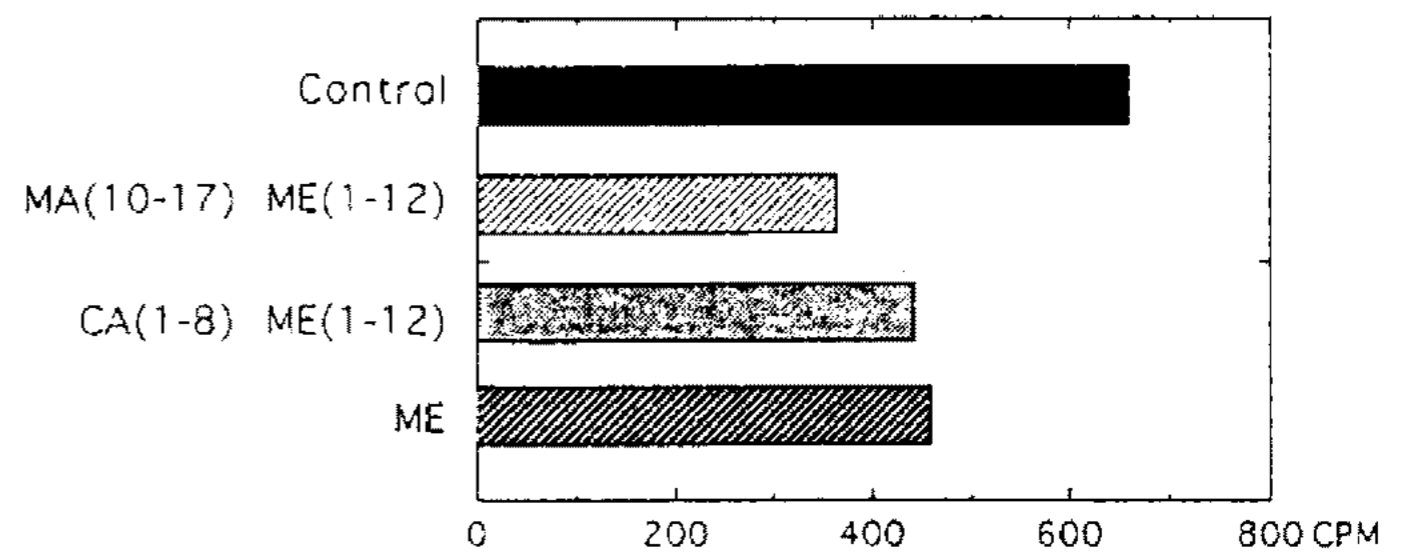


Fig. 3. Inhibition of the *Fusarium oxysporum* (1,3)- β -D-glucan synthase by ME and its hybrid peptides at 1 μ g/ml. Polymerization reaction was carried out as described in "Material and Method".

지는 펩타이드의 설계 및 항진균활성을 나타내는데 요구되는 펩타이드의 필수적인 구조를 결정하는데 이용될 수 있을 것이다.

요 약

꿀벌의 독액으로부터 분리된 ME는 강한 항진균활성을 가지나, 진핵세포에 대하여 세포독성 활성을 포함하고 있다. 본 연구에서는 구조와 항진균활성과 상관관계를 검토하며, 세포독성을 가지지 않으며 보다 강한 항진균활성을 가진 펩타이드의 디자인하기 위하여, ME와 CA 또는 MA으로 이루어진 hybrid 펩타이드인 MA(10-17)ME(1-12) 및 CA(1-8)ME(1-12)을 고상합성법에 의하여 합성 하였다. CA(1-8)ME(1-12) 및 MA(10-17)ME(1-12)는 인간의 적혈구에 대하여 용혈현상을 나타내지 않으며, *Fusarium oxysporum*에 대하여 ME 만큼의 강한 항진균활성을 나타내었다. 또한 이들 hybrid 펩타이드는 (1,3)- β -D-glucan synthase의 활성을 강하게 억제하였다. 이 결과는 *Fusarium oxysporum*에 대한 hybrid 펩타이드의 활성은 균의 세포벽의 합성의 억제에 의한 것과 관련성이 있는 것을 시사한다. 또한 본 연구의 결과는 세포독성을 가지지 않으며 강한 항진균활성을 가지는 펩타이드의 설계에 기초를 제공하였다고 생각된다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처 특정연구 개발사업(Biotech 2000)(NB110M)의 일부로 수행되었다.

참고문헌

1. Boman, H.G. 1991. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* **65**: 205-207.
2. Zasloff, M. 1992. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **4**: 3-7.
3. Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, and H.G.Boman, H. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immu-

- nity. *Nature*. **292**: 246-248.
4. von Hofsten, P., I. Faye, K. Kockum, J.Y. Lee, K.G. Xanthopoulos, L.A. Boman, H.G. Boman, A. Engstrom, D. Andreu, and R.B. Merrifield. 1985. Molecular cloning, cDNA sequencing, and chemical synthesis of cecropin B from *Hyalophora cecropia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**: 2240-2243.
 5. Lee, J.Y., A. Boman, C. Sun, M. Andersson, H. Jornvall, V. Mutt, and H.G. Boman. 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 9159-9162.
 6. Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 5449-5453.
 7. Soravia, E., G. Martini, and M. Zasloff. 1988. Antimicrobial peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett.* **228**: 337-340.
 8. Tosteson, M.T., J.J. Levy, L.H. Caporale, M. Rosenblatt, and D.C. Tosteson. 1987. Solid phase synthesis of melittin: Purification and functional characterization. *Biochemistry*. **26**: 6627-6631.
 9. Holak, T.A., A. Engstrom, P.J. Kraulis, G. Lindeberg, H. Bennich, T.A. Jones, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. 1988. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*. **27**: 7620-7626.
 10. Tosteson, M.T., S.J. Holmes, M. Razin, and D.C. Tosteson. 1985. Melittin lysis of red cells. *J. Membr. Biol.* **87**: 35-44.
 11. Boman, H.G., D. Wade, L.A. Boman, B. Wahlin, and R.B. Merrifield. 1989. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett.* **259**: 103-106.
 12. Andreu, D., J. Ubah, A. Boman, B. Wahlin, D. Wade, R.B. Merrifield, and H.G. Boman. 1992. Shortened cecropin A-melittin hybrids. *FEBS Lett.* **296**: 190-194.
 13. Wade, D., D. Andreu, S.A. Mitchell, A.M.V. Silveira, A. Boman, H.G. Boman, and R.B. Merrifield. 1992. Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin. *Int. J. Peptide Protein Res.* **40**: 429-436.
 14. Merrifield, R.B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* **232**: 341-347.
 15. Beaulieu, D., J. Tang, D.J. Zeckner, and T.R. Parr. 1993. Correlation of cilofungin in vivo efficacy with its activity against *Aspergillus fumigatus* (1,3)- β -D-glucan synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 1133-1138.
 16. Tang, J. and T.R. Parr. 1991. W-1 Solubilization and Kinetics of Inhibition by Cilofungin of *Candida albicans* (1,3)- β -D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 99-103.
 17. Hill, J.A., R.S. Annan and K. Biemann. 1991. Matrix-assisted laser desorption ionization with a magnetic mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**: 395-399.
 18. Bartnicki-Garcia, A. 1968. Cell Wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **22**: 87-108.
 19. Borgia, P.T. and C.L. Dodge. 1992. Characterization of *Aspergillus nidulans* Mutants Deficient in Cell Wall Chitin or Glucan. *J. Bacteriol.* **174**: 377-383.
 20. Sawistowska-Schroder, E.T., D. Kerridge, and H. Perry. 1984. Echinocandin inhibition of 1,3- β -D-glucan synthase from *Candida albicans*. *FEBS Lett.* **173**: 134-138.
 21. Taft, C.S., T. Stark, and C.P. Selitrennikoff. 1988. Cilofungin (LY121019) inhibits *Candida albicans* (1,3)- β -D-glucan synthase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1901-1903.
 22. Taft, C.S. and C.P. Selitrennikoff. 1988. LY121019 inhibits *Neurospora crassa* growth and (1,3)- β -D-glucan synthase activity. *J. Antibiot.* **41**: 697-701.
 23. Taft, C.S. and C.P. Selitrennikoff. 1990. Cilofungin inhibition of (1,3)- β -D-glucan synthase: the lipophilic side chain is essential for inhibition of enzyme activity. *J. Antibiot.* **43**: 433-437.

(Received 10 October 1996)