

## 곰팡이 분리주 MT60109가 생산하는 Phospholipase C 저해물질의 분리

오원근 · 이현선 · 박찬선 · 안순철 · 고희룡 · 민태익 · 안종석\*

생명공학연구소, 세포반응조절 연구Unit

**Isolation of Phospholipase C Inhibitor Produced by Fungal Isolate MT60109. Won-Keun Oh, Hyun-Sun Lee, Chan-Sun Park, Soon-Cheol Ahn, Hack-Ryong Ko, Tae-Ick Mheen and Jong-Seog Ahn\***. Cellular Response Modifier Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea - During the screening of inhibitors against phospholipase C (PLC) and the formation of inositol phosphates (IP<sub>3</sub>) at NIH3T3γ1 cells from microbial secondary metabolites, we selected a fungal strain MT60109 which was capable of producing an inhibitor. By the taxonomic studies, this fungus was identified as *Pseudallescheria* sp. MT60109 and an inhibitor of PLC was purified by BuOH extraction and chromatographic techniques from the culture broth of *Pseudallescheria* sp. MT60109. The inhibitor was identified as thielavin B by the physico-chemical properties and spectroscopic analysis of UV, FAB-MS, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and HMBC. Thielavin B showed potent inhibitory activity against PLC purified from bovine brain with an IC<sub>50</sub> of 20 μM. And it also inhibited the formation of inositol phosphates in platelet-derived growth factor (PDGF)-stimulated NIH3T3γ1 cells with an IC<sub>50</sub> of 20 μM.

Phosphoinositide specific phospholipase C(PLC)는 platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor(EGF) 등의 세포성장인자나 vasopressin, angiotensin 등의 자극인자가 세포막에 존재하는 각각의 수용체에 결합하므로써 활성화되는 것으로 알려져 있다(1). 활성화된 PLC는 세포막에 소량 존재하는 phospholipid인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP<sub>2</sub>)를 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP<sub>3</sub>)와 diacylglycerol(DAG)로 분해하며 생성된 IP<sub>3</sub>는 세포내의 저장소로부터 Ca<sup>2+</sup>를 유리시키고 DAG는 protein kinase C(PKC)을 활성화시켜 일련의 세포반응을 유도하여 궁극적으로 세포의 성장과 분화를 일으킨다(2).

현재까지 알려진 PLC의 세포내 신호전달 반응에서의 다양한 조절 역할을 볼 때 선택적인 PLC 저해제가 항암제를 비롯하여 신경계, 순환계 질환 및 면역계 질환 치료제로서의 개발 가능성을 보여주고 있어 이들의 탐색이 이루어지고 있다(3, 4).

지금까지 알려진 PLC 저해물질로는 유기합성 ether lipid인 ET-18-OCH<sub>3</sub> (5) 및 phosphoinositol 유도체(6) 등이 알려져 있으며 미생물 유래 PLC 저해물질로는 *Penicillium vinaceum*으로부터 분리된 vinaxanthone(7), *Actinomodula* sp.의 Q 12713(8), *Chatetospaeronema hispidulum*으로부터 분리된 hispidospermidin(9) 및 *Calo-*

*porus dichrous*로부터 caloporoside(10) 등이 보고되고 있다. 또한 최근에 저자들은 식물 유래의 PLC 저해물질로 *Selaginella tamariscina*로부터 amentoflavone(11)을, *Sophora flavescens*로부터 prenylated flavones(12) 등을 분리하여 보고하였다. 본 연구자들은 PLC 저해물질에 대한 계속적인 탐색과정 중에 토양으로부터 분리한 곰팡이 분리주 MT60109의 배양액으로부터 PLC에 강한 저해활성을 가지는 물질 CRM-60109를 분리하였으며 구조 분석 결과 thielavin B로 동정하였다. 따라서, 본 논문에서는 생산균주의 특성, 활성물질의 분리, 분리된 물질의 이화학적 특성 및 구조결정 그리고 생물학적 활성 등을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주의 배양조건

곰팡이 분리주 MT60109는 토양으로부터 분리한 균주로 배양조건은 다음과 같다. 14 l의 jar fermentor에 1당 yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g이 함유된 배지에 4일간 배양한 종균액을 3% 접종하여 배양온도 25℃, 통기량 0.5 vvm, 교반속도 200 rpm에서 7일간 배양하였다.

#### 선발균주의 동정

PLC 저해활성을 나타내는 균주를 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 배양하면서 colony의 형태변화를 조사하고 광학현미경을 이용하여 균사와 포자의 형태를 관찰

\*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4312, Fax. 82-42-860-4595

E-mail: jsahn@kribb4680.kribb.re.kr

Key words: Phospholipase C, Inositol phosphates formation, Fungi isolate, Thielavin B.

하였다. 이러한 형태학적인 특성을 Medically Important Fungi(13), Compendium of Soil Fungi(14) 등에 제시된 방법에 따라 비교 조사하여 균주동정을 실시하였다.

### 시약 및 사용기기

HEPES, EGTA, L-3-phosphatidyl inositol(PI)은 Sigma사에서 PDGF는 Genzyme사에서 구입하여 사용하였다. PLC와 PKC 활성을 측정하기 위하여 [ $^3\text{H}$ ]-PI와 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP를 Amersham사에서 구입하였다. 세포내 inositol phosphates(IP<sub>i</sub>)를 측정하기 위하여 사용한 anion-exchange resin AG 1-X8은 Biorad사에서 구입하였다. TLC는 silica gel 60F<sub>254</sub>와 RP-18F<sub>254</sub>S(Merck)을 사용하였으며 column chromatography에는 silica gel(70-254 mesh, Merck), ODS RP-18(40-63  $\mu\text{m}$ , Merck), Sephadex LH-20(Sigma)을 사용하였다. 곰팡이 분리주 MT60109의 배양은 New Brunswick Scientific사의 MF-107 Jar fermentor를 사용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-6A system을 사용하였으며 UV spectrum은 Beckmann DU-64를 사용하여 측정하였다.  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 및 HMBC spectrum은 Varian UNITY 300 NMR spectrophotometer로 FAB-MS는 VG사의 Guattro로 측정하였다. PLC, PKC 활성 및 IP<sub>i</sub> 생성량의 측정을 위한 radioactivity는 Beckmann사의 LS 600 TA scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

### PLC 활성 측정

PLC는 DE-52, matrix green gel affinity, phenyl 5-PW 및 Mono Q column chromatography을 이용하여 소의 작은 뇌로부터 정제하여 사용하였으며 PLC 활성은 Rhee 등의 방법에 따라 측정하였다(15). 20  $\mu\text{Ci}$ 의 [ $^3\text{H}$ ]-PI가 포함된 50  $\mu\text{M}$  PI와 1 mM EGTA, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM HEPES(pH=7.0), 0.1% sodium deoxycholate, 효소액 5  $\mu\text{l}$ , 검정시료 10  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 200  $\mu\text{l}$ 의 반응액을 37°C에서 10분간 반응시킨 후  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}(2/1)$  혼합용액 1 ml을 넣어 반응을 중지시켰다. 이어서 5 mM EGTA가 포함된 1N-HCl용액 0.3 ml을 넣고 섞은 후 원심분리하여 상등액층의 radioactivity를 측정하였다.

### 세포내 IP<sub>i</sub>량의 측정

세포내 IP<sub>i</sub>량의 측정은 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양한 NIH3T3 $\gamma$ 1 세포주를 사용하여 Ahn 등(16)의 방법에 따라 실험하였다.  $6 \times 10^5$  cells/ml의 NIH3T3 $\gamma$ 1 세포주를 inositol을 제거한 DMEM배지에서 24시간 동안 1  $\mu\text{Ci}$ 의 myo-[2- $^3\text{H}$ ]inositol과 함께 배양하였다. 이렇게 배양한 세포주를 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척한 뒤 15분 동안 배양하였다. 여기에 검정시료를

5  $\mu\text{l}$  첨가한 뒤 20분동안 배양하고 PDGF로 30분 동안 자극하였다. 이 세포주를 5%  $\text{HClO}_4$ 를 사용하여 반응을 중지시킨 뒤 세포내 inositol phosphate를 추출하였다. 추출된 inositol phosphates를 Biorad AG 1-X8 anion exchange column을 사용하여 흡착시킨 뒤 10 ml의 증류수로 세척하고 5 mM sodium tetraborate와 60 mM ammonium formate용액 10 ml로 다시 세척하였다. 마지막으로 1 M ammonium formate와 0.1 M formic acid를 사용하여 total inositol phosphates를 용출시킨 뒤 radioactivity를 측정하였다.

### PKC 활성 측정 및 소포(bleb)형성 저해활성 측정

PKC 및 소포형성 저해활성 측정은 이 등의 방법에 따라 측정 하였으며 PKC는 소 뇌로부터 DE-52와 phenyl 5-PW column chromatography를 이용하여 부분정제한 후 사용하였다(17).

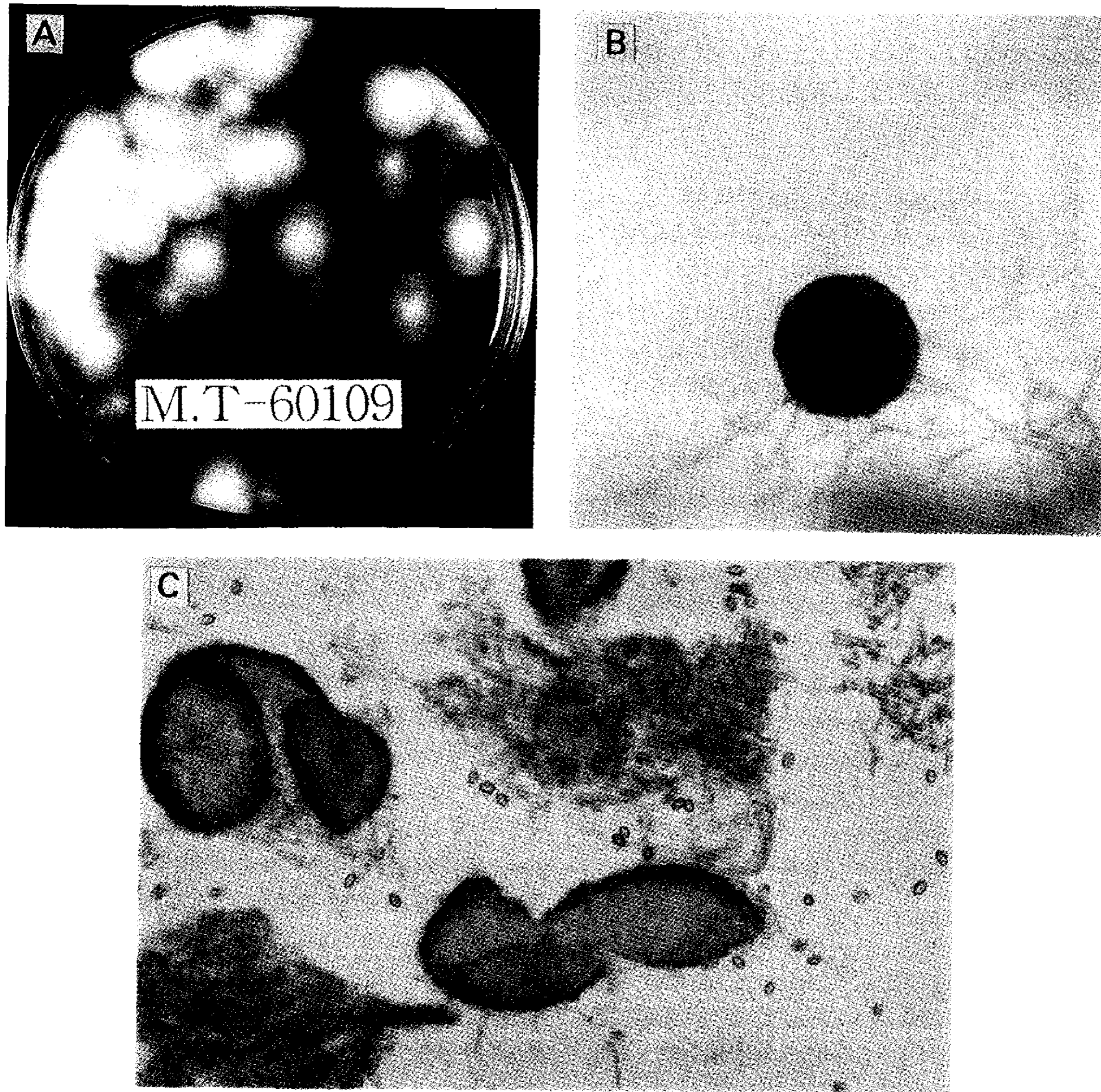
### 활성물질의 분리정제

배양액 10 l를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양 상등액과 균체 침전물로 나누었다. Diaion HP-20에 배양 상등액을 통과시켜 분리하고 자 하는 물질을 흡착시킨 뒤 70% MeOH을 사용하여 세척하였다. Acetone을 사용하여 흡착물질을 용출시킨 뒤 균체 침전물의 acetone 추출액과 합하여 농축하였다. 농축액을 물에 용해시킨 뒤 BuOH로 용매추출하여 silica gel을 넣어 흡착시켜 농축하였다.  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=10/1$ 을 전개용매로 하여 silica gel column chromatography로 분획하였다. 이렇게 용출된 각 분획마다 PLC 저해활성을 검사하여 저해활성이 강한 분획을 모아 농축한 뒤  $\text{CHCl}_3/n\text{-hexane}/\text{MeOH}=2/3/1$ 을 전개용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하였다. 이때 PLC에 대한 저해활성을 보이지 않으면서 활성물질과 유사한 물성을 지니는 지용성 물질들을 이러한 용매조건에서 초기에 용출시켜 제거하였다. 이후 MeOH을 전개용매로 사용하여 활성물질을 용출시킨 뒤 농축하여 50% MeOH을 전개용매로 Lobar RP-18 column chromatography를 실시하였다. 각각의 분획들 중 높은 저해활성을 보이는 분획을 모아 Prep. HPLC(column; YMC-Pack ODS-AM  $\phi 6.0$  mm  $\times$  250 mm, 용매; 50% MeOH, 유속; 2 ml/min, UV detector; 254 nm)를 실시하였다. 이때 retention time (RT) 20분에 해당하는 활성물질을 순수 분리하여 CRM-60109로 명명하였다.

## 결과 및 고찰

### 선발 균주의 동정

Fig. 1은 선별균주 MT60109를 PDA 배지를 이용하여



**Fig. 1. Morphological obserbation of fungal isolate MT60109.**

Strain of MT60109 was cultivated on PDA medium at 25°C for 5 days. A: colony of fungal isolate MT60109; B: mycelium and cleistothecium ( $\times 150$ ); C: ascospore and broken cleistothecium ( $\times 250$ ).

25°C에서 5일 배양한후 colony의 형태(Fig. 1-A)와 광학 현미경으로 관찰한 균사 및 폐자낭(Fig. 1-B)과 폐자낭 각이 파쇄되어 터져나온 포자(Fig. 1-C)을 찍은 사진이다. 선별 균주 MT60109는 PDA배지에서 5일 배양시 직경이 6.5 cm 정도가 되도록 신속하게 성장하였다. Colony의 색깔은 처음에 흰색 이었으나 성장함에따라 colony의 내부 중심에서부터 갈색으로 변하였으며 배지배면은 흰색에서 회색으로 변하였다(Fig. 1-A). 또한 광학 현미경에 의한 관찰에서 균사는 격막이 있으며 무색 투명하였고 직경은 2-4  $\mu\text{m}$  이었음을 알았다. Colony의 중심부에서부터 갈색의 폐자낭기(cleistothecium)를 형성하였으며 폐자낭기는 직경이 50-250  $\mu\text{m}$ 의 크기였다(Fig. 1-B). 이 폐자낭기는 성숙시 불규칙적으로 파열하였으며

4개의 포자가 들어있는 자낭으로부터 타원형의 자낭포자가 방출됨을 관찰하였다(Fig. 1-C). 이상의 형태학적 특성을 Table 1에 정리하여 표시하였고, 이의 특성을 근거로 Medically Important Fungi(13), Compendium of Soil Fungi(14)에 기술된 유성포자로 자낭포자를 폐자낭기에 생성하는 곰팡이 균주들과 비교하여 *Pseudallescheria*속 곰팡이(18)로 동정할 수 있었다.

#### CRM-60109의 이화학적 성질 및 구조동정

CRM-60109의 이화학적 성질을 Table 2에 표시하였다. CRM-60109는 백색분말로 IR spectrum에서 1660  $\text{cm}^{-1}$ 의 carboxylate, 3106  $\text{cm}^{-1}$ 의 aromatic CH stretching을 확인하였으며 UV  $\lambda_{\text{max}}$ (MeOH)는 277 nm, 310

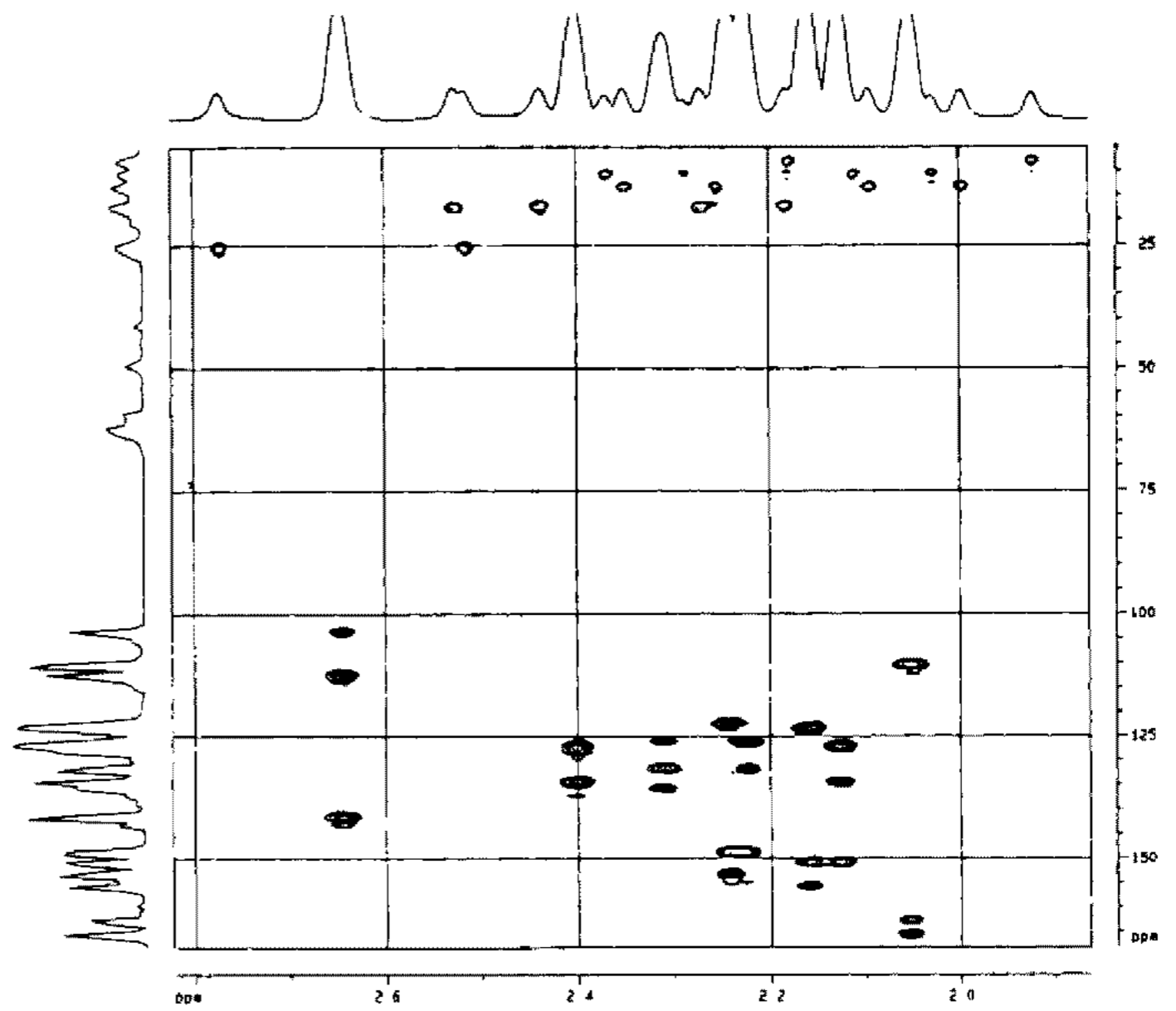
**Table 1. Morphological and cultural characteristics of the strain MT60109**

Colony	grow rapidly colony diameter on PDA: 6.5 cm after 5 days surface: spreading and cottony mycelium color: white at first, brown with age reverse color: white at first, becomes gray
Hyphae	septatic, 2-4 μm in diameter, hyaline
Ascospore	elliptical spore
Cleistothecia	brown color form in the center of the colony release elliptical spores when ruptured 50-250 μm in diameter

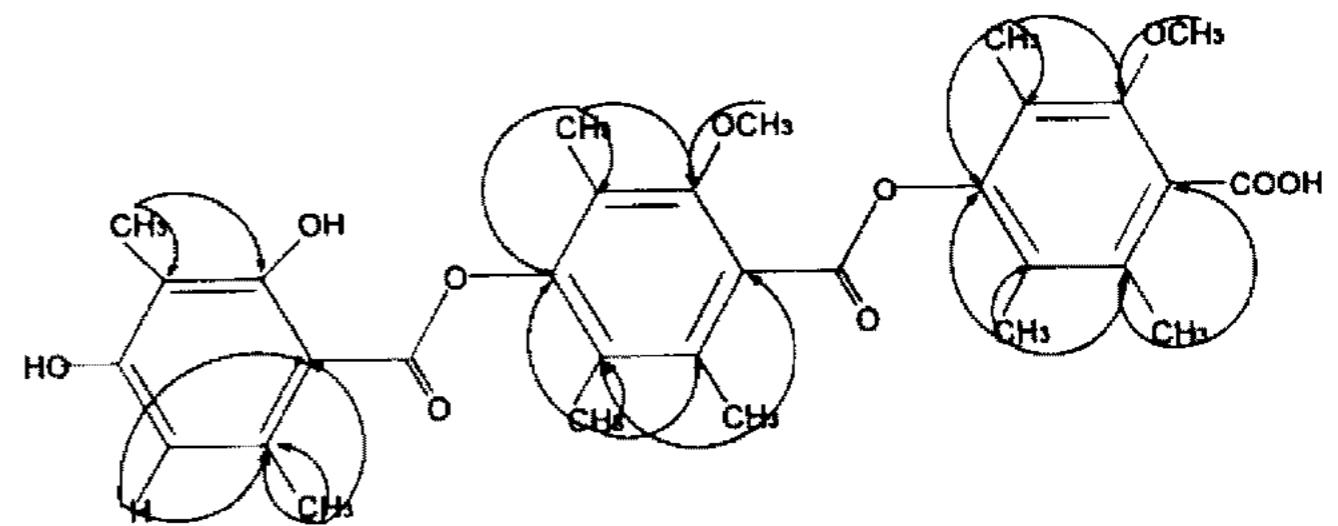
**Table 2. Physico-chemical properties of CRM-60109**

Appearance	Whitish powder
Solubility	
soluble	MeOH, BuOH, EtOAc, acetone
insoluble	H <sub>2</sub> O, benzene, n-hexane
UV λ <sub>max</sub> (MeOH) nm	277 nm, 310 nm
(1N-NaOH)	241 nm, 315 nm
IR ν <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup>	1076, 1660, 1745, 3106, 3403
FAB-MS	567 [M+H]

nm에서 최대 흡수파장이 관찰되었다. 또한 CRM-60109은 알카리용액에서 UV λ<sub>max</sub>(MeOH) 측정시 241 nm, 315 nm로 흡수파장의 이동이 관찰되었다. 이러한 결과로부터 이 물질은 ortho위치가 치환된 salicylic acid 유도체로 추정하였으며 FAB-Mass spectrum으로부터 [M+H] ion peak가 567에서 관찰되었으므로 분자량을 566으로 결정하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 2.1~2.8 ppm 사이에서 8개의 CH<sub>3</sub>, 3.9~4.1 ppm 사이에서 2개



**Fig. 3. HMBC spectrum of CRM-60109 (MeOH-d<sub>6</sub>).**



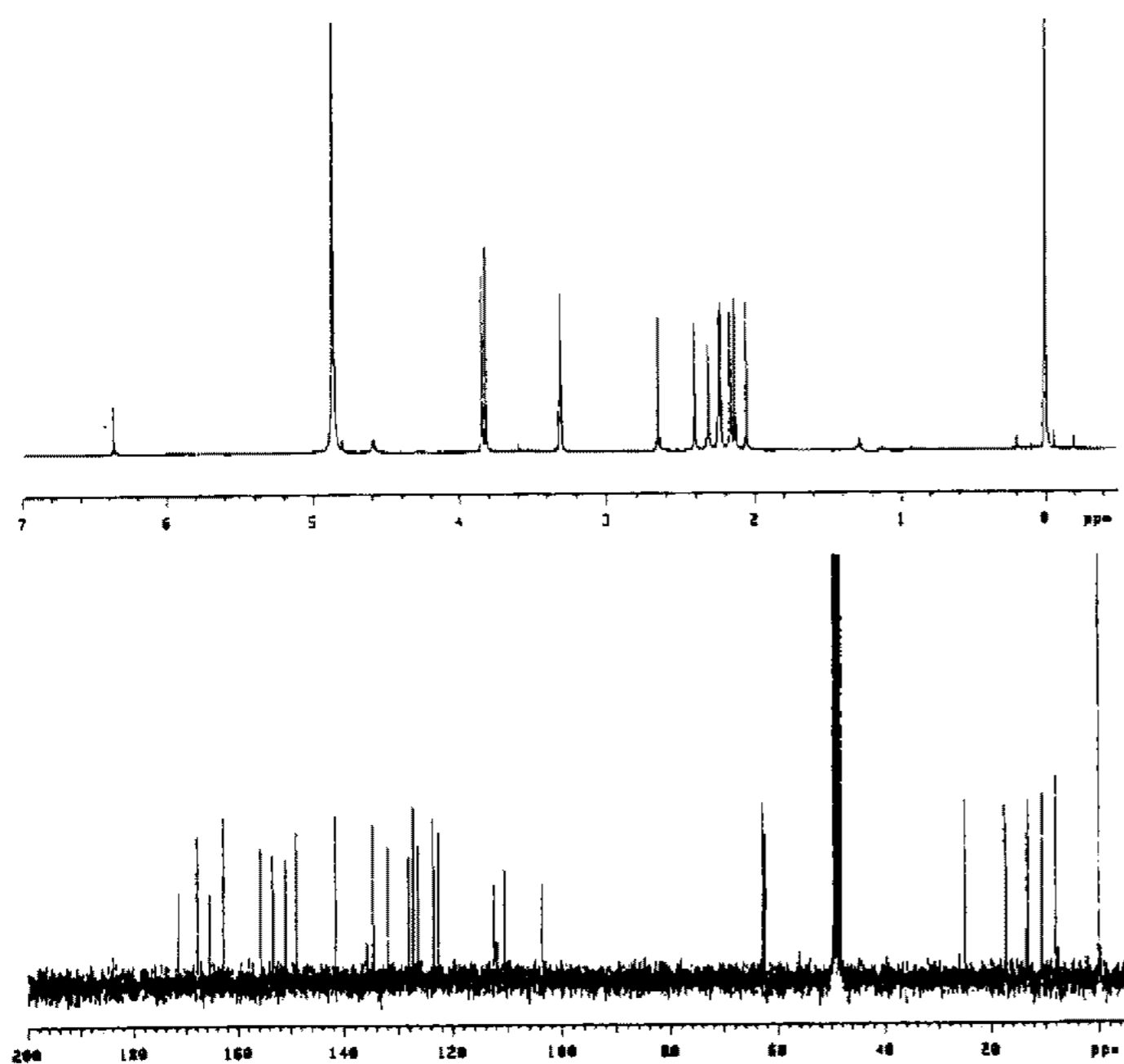
**Fig. 4. Chemical structure of CRM-60109 elucidated by HMBC.**

<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long-range coupling (→) were shown in important positions.

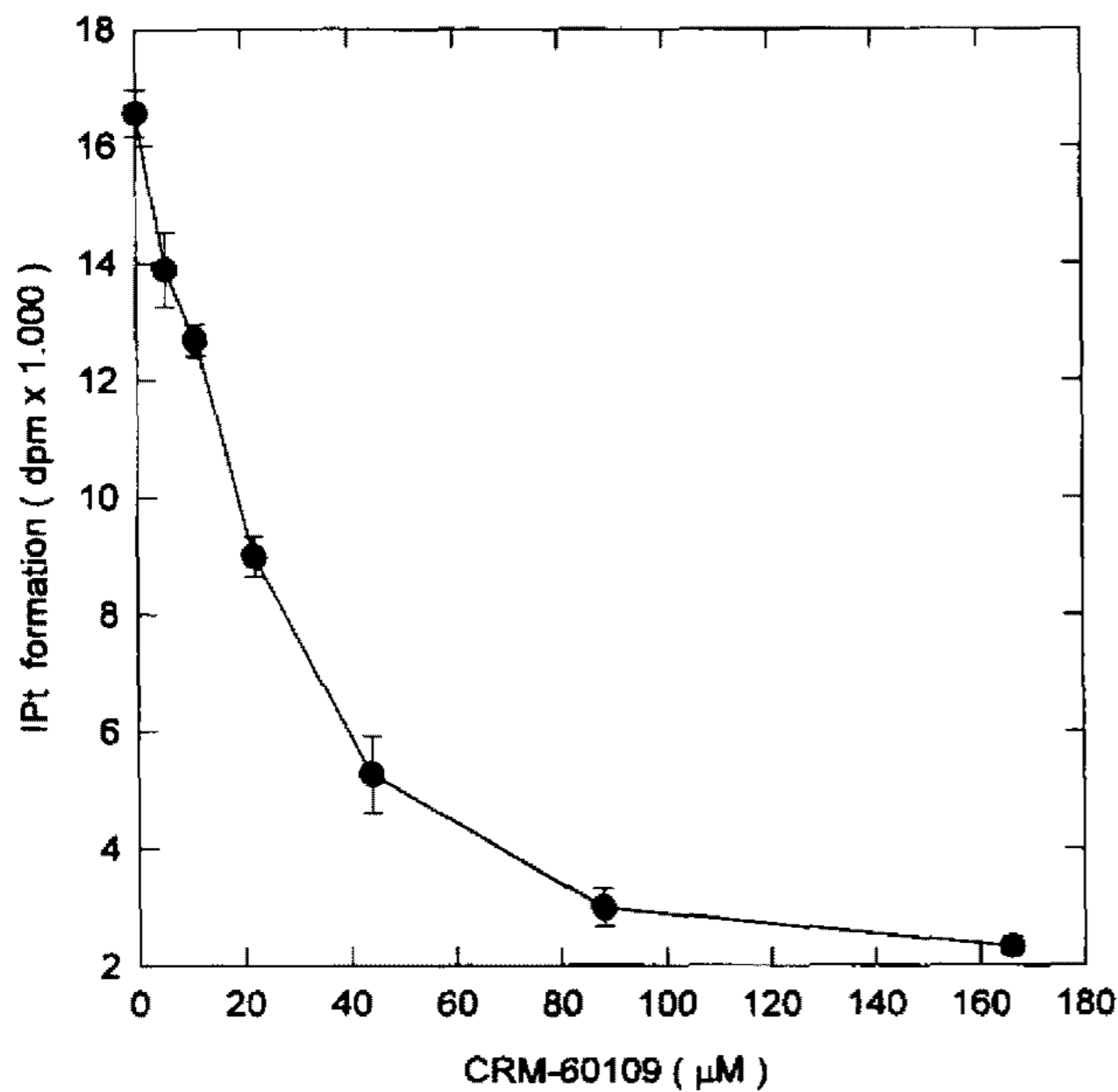
의 -OCH<sub>3</sub>, 6.8 ppm에서 aromatic ring에 기인한 proton peak를 확인할 수 있었다. 그리고 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 8.0~26.0 ppm에서 8개의 CH<sub>3</sub> peak, 62 ppm 근처에서 2개의 -OCH<sub>3</sub> peak, 112.3 ppm에서 1개의 aromatic ring에서 기인한 signal과 103~171 ppm에서 20개의 quaternary carbon을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY와 HMBC spectrum(Fig. 3)을 이용하여 각 치환기의 정확한 연결위치를 결정하였다. 이상과 같은 이 화학적 특성 및 기기분석 결과 CRM-60109을 Kitahara 등이 *Thielavia terricola*로부터 분리한 thielavin B(Fig. 4)로 동정하였다(19).

**CRM-60109의 생물활성**

CRM-60109는 NIH3T3γ1 세포주에서 PDGF 자극에 의한 IP<sub>3</sub>생성에 대하여 20 μM의 농도에서 IC<sub>50</sub>값을 보여 주었다(Fig. 5). 또한 PLC 와 PKC 활성화에 대한 저해작용을 조사한 결과 PLC 활성화에 대하여는 20 μM에서 IC<sub>50</sub>값을 보여 주었으나(Fig. 6) PKC 활성화와 K562 세포주를 이용하여 PKC 활성화 작용을 갖는 phorbol ester인 PMA에 의한 세포표면의 소포형성을 저해하는 효과는 200 μM

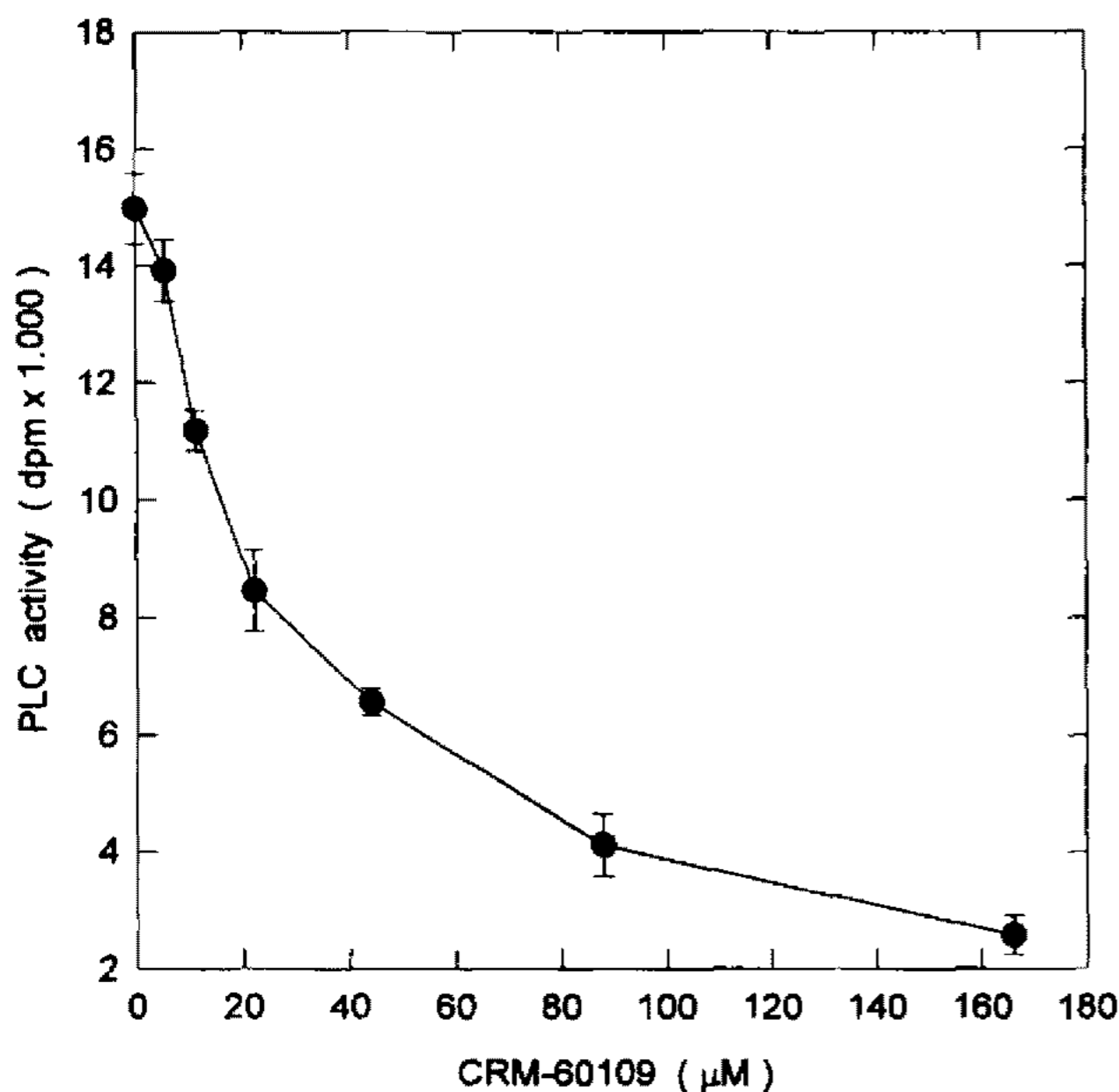


**Fig. 2. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectrum of CRM-60109 (MeOH-d<sub>6</sub>).**



**Fig. 5. Inhibition of IP<sub>1</sub> formation by CRM-60109 in PDGF-stimulated NIH3T3γ1 cells.**

After prelabeling of NIH3T3γ1 cells with myo-[2-<sup>3</sup>H]inositol for 24 hr, the cells were stimulated with PDGF in the presence of CRM-60109. All the procedures were done as in Materials and Methods. The value in the absence of PDGF stimulation was 2,036 dpm. Data show means ± SD from triplicate experiments.



**Fig. 6. Dose-dependent inhibition of CRM-60109 on the PLC activity.**

The value in the absence of PLC was 488 dpm. All the points show means ± SD from triplicate experiments.

의 농도에서도 저해작용을 보여주지 않았다(결과 생략).

## 고찰

PLC는 세포내에 극히 미량으로 존재하고 각각의 조직

이나 세포의 종류에 따라 수종의 isozyme이 있다. PLC는 세포내 신호전달과정에서 세포막에 존재하는 PIP<sub>2</sub>를 분해하여 IP<sub>3</sub>와 DAG를 생성하고 이들은 세포내 신호전달의 2차 매개자로 작용하여 여러가지 세포증식 및 반응을 유도한다. 따라서 이 효소의 저해제가 신호전달과정의 이상을 조절하는 작용을 가질 수 있을 것이라 기대하에 최근 많은 연구가 진행되고 있다.

저자들은 토양 미생물 및 약용 식물을 대상으로 PLC 저해물질을 탐색하던 중 토양에서 분리한 곰팡이인 *Pseudallescheria* sp. MT60109로부터 PLC 저해작용을 갖는 물질을 분리하여 <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC 및 FAB-MS등의 기기분석을 통하여 thielavin B로 동정하였다. Thielavin B는 Kitahara 등(19)이 *Thielavia terreicola*의 배양액으로부터 분리한 물질로 생물활성으로는 prostaglandin H<sub>2</sub>로부터 prostaglandin E<sub>2</sub>의 생합성과 관련된 단계를 9 μM의 농도에서 50% 저해하는 것으로 알려지고 있다.

그러나 thielavin B에 대해서는 prostaglandin 생합성 저해활성 이외에 다른 생물활성에 대한 보고는 없었으나 본 논문에서 PLC 저해효과를 새로이 보고하는 바이다. 이러한 thielavin B는 20 μM 농도에서 소의 작은뇌에서 분리한 PLC 활성을 50% 저해하였다. 그리고 이 물질의 세포내에서 PLC 활성화에 대한 저해효과를 조사하고자 PLC가 과발현되는 NIH3T3γ1세포주를 사용하여 PDGF에 의해 유도되는 세포내 IP<sub>1</sub>양을 측정하였을 시 20 μM 농도에서 IC<sub>50</sub>값을 보여주었다. 이러한 결과는 thielavin B가 현재까지 보고된 PLC 저해물질인 vinaxanthone (IC<sub>50</sub>=5.4 μM, PLC purified from bovine brain)(7), hispidospermidin(IC<sub>50</sub>=16 μM, from rat brain)(9), caloprosidine(IC<sub>50</sub>=18~31 μM, from rat brain)(10), amentoflavone(IC<sub>50</sub>=30 μM, from bovine brain)(11), prenylated flavones(IC<sub>50</sub>=5~30 μM, from bovine brain)(12) 등에 비하여 약하거나 동등한 저해작용을 보여주었다. 그러나, PLC 분리원이나 PLC 활성 측정 방법은 각각의 연구자에 따라 다르므로 직접적인 비교는 할 수 없었다. 또한 현재까지 보고된 PLC 저해작용이 대부분 *in vitro* 효소활성만을 측정한 것으로 저자들이 NIH3T3γ1 세포주를 사용하여 PDGF에 의해 활성화되는 PLCγ에 대한 영향을 조사하여 세포내 IP<sub>1</sub>양을 측정하는 방법으로 보고한 amentoflavone(11)을 제외하고는 없었다. 한편 thielavin B는 신호전달과정에서 중요한 또 다른 효소인 PKC에 대한 저해효과를 조사하였으나 200 μM의 농도에서도 저해활성이 관찰되지 않았으며 PKC 활성화 물질인 phorbol ester에 의해 유도되는 K562 세포 표면의 소포형성에 대하여도 저해활성을 나타내지 않았다. 이러한 결과들을 볼 때 thielavin B의 세포내 신호전달과정의 저해양식은 PLC에 대한 직접적인 저해에 기인하여 세포내 total inositol phosph-

ates양을 감소 시킨 것으로 볼 수 있다.

따라서 현재 저자들은 암 및 면역과 관련된 세포주를 사용하여 thielavin B의 세포내 저해작용을 연구하고 있으며, PLC외의 다른 신호전달 관련 효소에 대한 저해활성도 검토 중에 있다.

## 요 약

미생물 배양액으로부터 phospholipase C 저해물질을 탐색하던 중 저해물질을 생산하는 곰팡이 분리주 MT 60109를 선별하였다. 이 균주를 배양하여 활성물질을 분리정제한 후 구조 및 생물활성을 검토하였다. 선별된 MT 60109 균주는 형태학적, 배양학적 특성 등을 조사한 결과 *Pseudallescheria* sp.으로 동정되었다. 균체 배양액으로부터 BuOH추출 및 column chromatography법을 이용하여 활성물질을 분리정제한 후 FAB-MS,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 및 HMBC에 의한 구조 분석결과 thielavin B로 동정하였다. Thielavin B는 PLC 활성을  $20\ \mu\text{M}$ 에서 50% 저해하였으며 NIH3T3 $\gamma$ 1 세포내에서 PDGF에 의하여 활성화된 PLC에 의한 IP<sub>1</sub> 생성을  $20\ \mu\text{M}$ 에서 50% 저해하였다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술처의 선도기술개발 사업비의 일부에 의해 수행되었음을 밝히는 바입니다. 곰팡이 분리주 MT60109의 동정을 위하여 균주배양 및 형태학적 관찰에 기술적인 도움을 주신 생명공학연구소 미생물 탐색연구팀의 박상호 박사와 균주 동정을 위하여 토의하여 주신 유전자은행의 배경숙 박사님에게 감사를 표합니다.

## 참고문헌

1. Rhee, S. G., Suh, P. G., Ryu, S. H. and Lee, S. Y. 1989. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* **244**: 546-550.
2. Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312.
3. Powis, G. 1992. Drugs active against growth factor and oncogene phosphatidyl-inositol signalling pathways. *Cancer biology* **3**: 343-350.
4. Powis, G. 1993. Inhibitors of phospholipase C. *Drugs of the Future* **18**: 305-312.
5. Powis, G., Seewald, M. J., Cratas, D. and Modest, E. J. 1992. Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. *Cancer Research* **52**: 2835-2840.
6. Potter, B. V. L. 1990. Recent advances in the chemistry

- and biochemistry of inositol phosphates of biological interest. *Nat. Prod. Rep.* **1**: 1-24.
7. Aoki, M., Itezono, Y., Shirai, H., Nakayama, N., Sakai, A. and Tanaka, Y. 1991. Structure of a novel phospholipase C inhibitor, vinaxanthone(R009-1450), produced by *Penicillium vinaceum*, *Tetrahed. Lett.* **32**: 4737-4740.
8. Ogawara, H., Higashi, K., Manita, S., Hidaka, M., Kato, H. and Takenawa, T. 1993. An inhibitor of inositol-phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem. Biophys. Acta.* **1175**: 289-292.
9. Yanagisawa, M., Sakai, A., Adachi, K., Sano, T. and Watanabe, K. 1994. Hispidospermidin, a novel phospholipase C inhibitor produced by *Chaletosphaeronema hispidulum*(Cda) Moesz NR 7127, *J. Antibiotics* **47**: 1-15.
10. Weber, W., Schu, P., Anke, T., Velten, R. and Steglich, W. 1994. Caloporoside, a new inhibitor of phospholipase C from *Caloporus dichrous*(Fr.) Ryv. *J. Antibiotics* **47**: 1188-1194.
11. Lee, H. S., Oh, W. K., Kim, B. Y., Ahn, S. C., Kang, D. O., Shin, D. I., Kim, J. W., Mheen, T. I. and Ahn, J. S. 1996. Inhibition of phospholipase C $\gamma$ 1 activity by amantoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta medica* **62**: 293-296.
12. Lee, H. S., Ko, H. R., Ryu, S. Y., Oh, W. K., Kim, B. Y., Ahn, S. C., Mheen, T. I. and Ahn, J. S. 1997. Inhibition of phospholipase C $\gamma$ 1 activity by the prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Planta medica*(in press).
13. Larone, D. H. 1995. Medically important fungi: a guide to identification. Pp. 132-133. ASM press. Washington, D. C.
14. Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1993. Compendium of soil fungi(vol. I) Pp. 614-616. IHW-Verlag, Eching, Federal Republic of Germany.
15. Rhee, S. G., Ryu, S. H. and Cho, K. S. 1991. Assays of phosphoinositide-specific phospholipase C and purification of isozymes from bovine brain. *Methods in Enzymol.* **197**: 502-510.
16. Ahn, S. C., Kim, B. Y., Park, C. S., Lee, H. S., Suh, P. G., Ryu, S. H., Rho, H. M., Rhee, J. S., Mheen, T. I. and Ahn, J. S. 1995. Inhibition of PDGF-induced phosphoinositide-turnover by glucopiericidin A. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* **37**: 125-132.
17. 이현선, 박문수, 오원근, 안순철, 김보연, 김환목, 오구택, 민태익, 안중석. 1993. 능소화의 꽃받침으로부터 protein kinase C 저해물질인 Verbascoside의 분리 및 그 생물활성. *약학회지* **37**: 598-604.
18. Salkin, L. F. 1973. Dermatophyte test medium: evaluation with nondermatophytic pathogens. *Appl. Microbiol.* **26**: 134-137.
19. Kitahara, N., Endo, A., Furuya, K. and Takahashi, S. 1981. Thielavin A and B, new inhibitors of prostaglandin biosynthesis produced by *Thielavia terricola*. *J. Antibiotics* **34**: 1562-1568.

(Received 22 June 1997)