

오미자에서 분리한 새로운 Chitin Synthase II 저해제인 Gomisin N과 Wuweizisu C

황의일 · 김미경* · 이항복 · 김영국* · 권병목* · 배기환** · 김성욱#

생명공학연구소, #식물보호소재 R. U., *단백질조질 R. U., **충남대학교 약학대학

(Received July 7, 1999)

Gomisin N and Wuweizisu C, new Inhibitors for Chitin Synthase II from *Schizandra chinensis*

Eui Il Hwang, Mi Kyung Kim*, Hyang Bok Lee, Young Kook Kim*,
Byoung Mog Kwon*, Ki Hwan Bae** and Sung Uk Kim#

*Plant Protectants R. U., Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology, Taejon, 305-600, Korea.

*Protein Regulator R. U., Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology, Taejon, 305-600, Korea.

*Chungnam National University, College of Pharmacy, 305-764, Taejon, Korea.

Abstract — To search for new chitin biosynthesis inhibitors from natural sources, several higher plants were examined the inhibitory activity against chitin synthase II by enzymatic assay. Among them, the extract of *Schizandra chinensis* strongly showed the inhibitory activity against chitin synthase II. Gomisin N and wuweizisu C were isolated from *Schizandra chinensis* and showed IC₅₀ value of 62.4 µg/ml and 19.2 µg/ml, respectively. Activities of these compounds were more stronger than that of polyoxin D. However, gomisin N and wuweizisu C showed weakly antifungal activities against various human pathogens.

Keywords □ Antifungal agents, chitin synthase II, *Schizandra chinensis*, gomisin N, wuweizisu C, polyoxin D.

진균류의 세포벽은 세포의 형태를 유지하고 삼투압으로부터 세포가 파괴되는 것을 방지하며, 생육과 거대분자의 이동 등에 관여하는 필수적인 요소로 진균류의 세포벽은 chitin, glucan, mannan 등으로 구성되어 있다. 이 중 주된 세포벽 구성 성분은 chitin과 β-1,3-glucan으로 이들 물질의 생합성 경로가 항진균제 개발의 주된 목표물이 되어 왔다.¹⁾

Chitin은 거의 모든 동식물 병원성 진균류의 세포벽과 무척추 동물의 골격구조를 구성하고 있는 필수적인 요소로서 N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)이 β-1,4 결

합으로 이루어진 homopolymer로서 chitin synthase에 의해 UDP-GlcNAc로부터 일련의 반응을 거쳐 생성되며 이러한 chitin 합성효소에 대한 연구는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주에서 가장 많이 이루어져 있다.^{1,2)} Chitin은 세포막에 결합된 chitin synthase I, II, III 효소에 의해 합성되는 데, 세포의 생육과 형태유지에 필수적인 효소는 chitin synthase II와 III이고, chitin synthase I은 세포 생육과 형태유지에 필수적인 효소는 아니라고 알려져 있다.^{2,5)} *S. cerevisiae* 균주에서 chitin synthase II 효소는 세포 분열시 격막 형성에 관여하며, chitin synthase III 효소는 모세포(mother cell)로부터 낭세포(daughter cell) 형성시 chitin ring 형성에 관여하는데 이러한 chitin ring 형성에는 진균류와 동물세포

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 042-860-4554 (팩스) 042-861-2675

에서 세포질 분열과 단백질 수송에 관여하는 것으로 알려진 septin이 *S. cerevisiae*의 *Chs3p*를 정확히 모세포와 낭세포 사이의 격막 부위로 이동시켜 chitin ring을 만드는 것으로 보고되어져 있다.⁶⁾ 최근에는 chitin synthase III 효소 활성화에 관여하는 *CHS3* 유전자가 chitin ring 형성과 vegetative growth 및 mating 이외에도 sporulation에 관여한다고 보고하고 있으며, *CHS4*와 *CHS5* 유전자도 chitin synthase III 효소 활성화에 관여한다고 보고하고 있다.^{7,9)} 이와는 대조적으로 chitin synthase I 효소는 세포 분열시 chitinase에 의해 과도하게 손상을 입은 세포벽을 회복시켜 주는 기능을 나타내나 세포 생육에는 필수적인 효소가 아니기 때문에 chitin synthase II와 III 효소가 새로운 세포벽 합성저해제 개발의 주된 목표물이 되고 있다. 이처럼 chitin 효소들에 대한 각각의 특성과 기능이 알려지면서 분자생물학 기법을 이용하여 각각의 chitin 합성 효소만을 선택적으로 생산할 수 있는 재조합 균주의 개발이나 조절기작을 이용한 과잉생산 균주들이 개발되고 있다.^{4,10,11)} 또한 최근에는 *S. cerevisiae* 이외에 인체 병원균인 *Candida albicans* 균주에서도 chitin synthase I, II, III 효소를 생산하는 재조합 균주를 제조하고 각 효소의 기능을 조사한 결과, *S. cerevisiae*의 chitin synthase 효소와는 차이가 있다고 보고하고 있다.¹²⁾

이러한 추세에 따라 chitin 합성효소 중 세포 분열시 격막 형성에 관여하는 chitin synthase II 저해제를 탐색하기 위해 전국 각지에서 수집한 다양한 전통 약용식물과 식물체를 대상으로 저해 활성을 검정하여 오미자(*Schizandra chinensis*) 추출물이 chitin synthase II의 활성을 강하게 저해하는 것을 발견하였다. 오미자는 Schizandraceae에 속하는 낙엽 덩굴성 목본으로서 정유, lignan, 지방유, 식물산 및 색소등을 성분으로 함유하고 있으며, 오래전부터 강장 및 진해제 등으로 사용되어온 약용 식물이나, 항균 작용에 관한 보고는 매우 미미한 실정이다.¹³⁾

따라서 본 연구에서는 오미자 추출물로부터 chitin synthase II에 특이적으로 강한 저해 활성을 나타내는 2종의 생리활성 물질을 분리하고, 그 구조와 물리·화학적 성질 및 저해 활성을 조사하였다.

실험방법

시약 및 재료 - 실험에 사용된 오미자(*Schizandra*

chinensis)는 유성 시장에서 구입하여 이용하였으며, 대조 약물로 사용된 polyoxin D는 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 이외에 사용된 모든 시약은 특급 이상과 Sigma 제품을 이용하였다. Column chromatography용 silica kieselgel 60, pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ 및 Lichroprep RP-18은 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, liphophilic Sephadex LH-20 Gel은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 또한 효소 활성 검정시 기질로 사용한 UDP-[¹⁴C]-N-acetyl-D-glucosamine(400,000 cpm/ μ mol)은 NEN(Du Pont Co.)제품을 이용하였으며 liquid scintillation counter는 Microbeta Trilux(Wallac Co.)을 사용하였다. 또한 NMR spectrometer (Bruker AMX-500)를 사용하여 구조 분석을 실시하였으며 HRCI-mass(VG ZAB-7070)을 통하여 분자량을 측정하였고, Optical rotation은 digital polarimeter (DIP-370)를 이용하여 측정하였다.

Chitin synthase II 효소의 조제 - Galactose promoter의 지배를 받으면서 chitin synthase II만을 과잉 생산할 수 있는 *Saccharomyces cerevisiae* ECY-38-38A(MATa *chs1-23 chs2::LEU2 cal1/csd2 ura3-52 trp1-1 leu2-2 pAS6*) 균주를 50 ml YPG(1% yeast extract, 2% peptone, 2% galactose)배지에 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 신선한 YPG 1 liter에 접종하여 30°C에서 A₅₅₀=1.0이 될때까지 배양하였다. 배양된 균체만을 모아 5 mM magnesium acetate을 함유한 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액 100 ml에 현탁하고 glass bead을 이용하여 마쇄한 후 3,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 파괴되지 않은 균체들을 제거하였다. 다시 상등액을 130,000×g에서 1시간동안 초원심분리하여 침전물을 모은 후 33% glycerol을 함유한 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)에 현탁하여 일정량씩 분주한 후 -70°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.⁵⁾

Chitin synthase II의 활성검정 - Chitin synthase II의 활성 검정은 UDP-[¹⁴C]-N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)을 기질로 이용하여 chitin synthase II에 의해 생성된 chitin의 양을 동위원소를 이용하여 다음과 같이 측정하였다.⁵⁾

32 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.6 mM cobalt acetate, 1.0 mM UDP-[¹⁴C]-N-acetyl-D-glucosamine, trypsin (2.0 μ g/ml)이 함유된 반응액에 효소 20 μ l과 시료 14 μ l을 첨가하여 30°C에서 15분 동안 전처리하여 효

소를 활성화시켰다. 반응 후 trypsin inhibitor(4.0 µg/ml)를 첨가하고 얼음 속에서 10분 동안 방치하여 trypsin 활성을 정지시킨 후 0.8 M의 GlcNAc을 첨가하여 총 반응액을 50 µl되게 조절한 후 30°C에서 90분 동안 반응시켰다. 반응 후 10% TCA 용액 1.0 ml로 반응을 정지시키고 GF/C filter로 여과하여 건조시킨 후 3.0 ml의 scintillation cocktail을 첨가하여 동위 원소량을 측정하였으며 저해율은 아래와 같이 계산하였다.

Inhibition(%)=

$$\left[1 - \frac{\text{Control(cpm)} - \text{Sample(cpm)}}{\text{Control(cpm)} - \text{Blank(cpm)}} \right] \times 100$$

이때 대조구는 반응액에 시료를 첨가하지 않았으며, blank는 시료와 조 효소액을 첨가하지 않고 반응시켰다.

활성 물질의 분리 - 오미자를 3일간 methanol로 추출하여 감압 농축하고, 다시 ethyl acetate로 재 추출하여 감압 농축한 후 silica gel에 흡착하여 n-hexane과 ethyl acetate를 이용하여 용출하였다. 얻은 활성 분획(n-hexane : ethyl acetate = 9 : 1)을 다시 reverse phase column chromatography(90% aqueous methanol)를 실시한 후 methanol을 용매로 사용하여 Sephadex LH-20 chromatography를 실시하여 부분 정제된 활성 물질을 얻었다. 이 물질을 최종적으로 n-hexane과 ethyl acetate(6 : 4)를 전개용매로 사용하여 preparative thin layer chromatography을 실시하고 2종의 순수한 생리활성 물질을 분리하였다(Fig. 1).

최소 생육저지 농도의 측정(MIC) - MIC를 측정하기 위하여 사용한 인체 병원균인 *Candida albicans* ATCC 10231, *Coccidioides immitis* ATCC 34020, *Candida krusei* ATCC 6528, *Candida lusitanae* ATCC 42720, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Cryptococcus neoformans* ATCC 36556, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16264 균주는 미국의 균주 보존 기관인 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양받아 사용하였다. 접종 균액을 제조하기 위해 효모류들은 Sabouraud's broth(Difco Co.)를 이용하여 하룻밤 액체 배양한 후 균액을 10⁷ CFU/ml되게 조절하여 접종 균액으로 사용하였으며, 진균류는 25°C에서 potato dextrose agar(Difco Co.)나 Sabouraud's agar(Difco Co.)배지에서 7~14일 동안 충분히 배양하여 접종원으

Schizandra chinensis

extract with MeOH and EtOAc
inhibitory activity : 70%(280µg/ml)

Evaporation

Silica gel column chromatography

elute with hexane : EtOAc(9 : 1)
inhibitory activity : 50~60%(140µg/ml)

Reverse phase column chromatography

elute with 90% aqueous MeOH
inhibitory activity : 60~65%(140µg/ml)

Sephadex LH-20 column chromatography

elute with MeOH
inhibitory activity : 75%(140µg/ml)

Preparative silica TLC

develop with n-hexane : EtOAc(6 : 4)

Active band

extract with MeOH and evaporated

Compound 1

inhibitory activity
: 82%(140µg/ml)

Compound 2

inhibitory activity
: 75.3%(140µg/ml)

Fig. 1 - Purification steps of chitin synthase II inhibitors from *Schizandra chinensis*.

로 사용하였다. MIC 측정은 시험하고자 하는 시료 용액을 멸균된 증류수를 이용하여 2배 희석 계열을 만든 후 멸균하여 50°C로 유지시킨 Sabouraud's agar (Difco Co.)나 potato dextrose agar(Difco Co.)배지를 시료 용액과 9 : 1의 비율로 혼합하여 최종 농도가 500~1.95 µg/ml이 되도록 5 cm 크기의 평판에 분주하였다. 배지가 고형화되면 위에서 제조한 접종 균액을 각 평판마다 일정량씩 접종하여 30°C에서 1~5일 동안 배양한 후 육안으로 관찰하여 균의 생육이 억제된 농도를 최소 생육저지 농도(MIC)로 정하였다.^{14,15)}

결과 및 고찰

분리한 활성 저해 물질의 물리·화학적 특성 - 오미자로부터 분리한 chitin synthase II에 저해 활성을 나타낸 2종의 생리활성 물질에 대한 물리·화학적 특성은 Table I에 나타내었다. 2종의 생리활성 물질은 colorless solid 성상으로 TLC(전개용매; n-hexane :

Table I – Physico-properties of chitin synthase II inhibitors from *Schizandra chinensis*

	Compound 1	Compound 2
Appearance	colorless solid	colorless solid
HRCI mass <i>m/z</i>	400.1374	384.1577
Molecular formula	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	C ₂₂ H ₂₄ O ₆
[α] _D CHCl ₃	-78 ⁰ (Conc. 2.2)	-68 ⁰ (Conc. 0.9)
R _f value ^a	0.6	0.65
Soluble	CHCl ₃ , CH ₃ OH	CHCl ₃ , CH ₃ OH
Insoluble	H ₂ O	H ₂ O

^a On the TLCplate(Merck, silica gel 60, F₂₅₄), *n*-Hexane : EtOAc (6 : 4).

Table II – ¹H and ¹³C NMR spectral data of compound 1 and 2

	Compound 1		Compound 2	
	δ H(ppm)	δ C(ppm)	δ H(ppm)	δ C(ppm)
1		151.5		141.2
2		140.0		134.6
3		151.5		147.5
4	6.55	110.5	6.48	106.0
5		134.0		132.7
6	2.54	39.0	2.49	38.7
7	1.78~1.91	33.5	1.71~1.90	33.6
8	1.78~1.91	40.6	1.71~1.90	40.6
9	2.04~2.27	35.4	1.97~2.27	35.2
10		137.7		138.1
11	6.48	102.9	6.48	103.1
12		148.6		148.6
13		134.5		134.3
14		141.0		140.9
15		121.3		120.9
16		123.2		122.1
-CH ₃	0.98	21.5	0.95	21.7
	0.74	12.8	0.72	12.5
-OCH ₃	3.52	55.8		
	3.82	59.6	3.83	59.6
	3.90	60.9	3.81	59.5
	3.90	60.5		
-OCH ₂ O-	5.95	100.7	5.93	100.7
			5.95	100.7

Measured in CDCl₃.

ethyl acetate = 6 : 4)상에서 각각 0.6(화합물 1)과 0.65(화합물 2)의 R_f값을 나타내었으며, 유기 용매에 따른 용해성을 알아본 결과, chloroform과 methanol에 잘 용해되었으나 물에는 잘 용해되지 않았다. 또한 분자량과 분자식을 알아보기 위하여 고분해능 CI mass(HRCI-MS)를 측정된 결과, 화합물 1의 분자량은 400.1324이며 분자식이 C₂₃H₂₈O₆이고, 화합물 2는 분자량이 384.1572이고 분자식은 C₂₂H₂₄O₆임을 알 수 있었다.

활성 저해 물질의 구조 분석 – 분리한 2종의 생리활성 물질에 대한 ¹H와 ¹³C NMR spectrum을 측정된 결과 화합물 1은 ¹H NMR spectrum에서 6.48 ppm과 6.55 ppm에서 peak가 관찰되어 aromatic이 존재함을 알 수 있었다. 또한 5.95 ppm에서 -OCH₂O-proton peak을, 3.55 ppm과 3.82 ppm 및 3.90 ppm에서 -OCH₃ proton peak을 관찰할 수 있었으며 0.73 ppm과 0.98 ppm에서 말단 methylene proton이 관찰되었다. ¹³C NMR spectrum에서는 55.8-60.9 ppm 사이에서 -OCH₃ carbon, 100.7 ppm에서 -OCH₂O- carbon peak을 포함하여 23개의 C가 관찰되었다(Table II).

화합물 2의 ¹H NMR spectrum을 통하여 6.48 ppm에서 aromatic에서 유래하는 peak을 관찰하였고, 3.81 ppm과 3.83 ppm에서 -OCH₃ proton과 5.95 ppm, 5.93 ppm에서 -OCH₂O- proton peak이 관찰되었으며 0.72 ppm과 0.95 ppm에서 말단 methylene proton이 관찰되었다. 또한 ¹³C NMR spectrum에 의해 59.5 ppm과 59.6 ppm에서 -OCH₃ carbon과 100.7 ppm의 -OCH₂O- carbon peak을 포함한 22개의 C를 관찰하였다(Table II). 이상과 같은 물리·화학적 특성과 기기 분석의 결과를 종합하여 볼 때 화합물 1은 C₂₃H₂₈O₆의 화학식을 가지는 gomisin N으로, 화합물 2는 C₂₂H₂₄O₆의 화학식을 가지는 wuweizisu C로 추정되었으며, 문헌¹⁶⁻¹⁹⁾에 수록된 gomisin N과 wuweizisu C의 각종

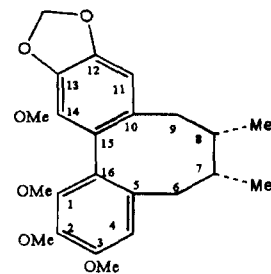


Fig. 2 – Structure and ¹H-NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of Gomisin N.

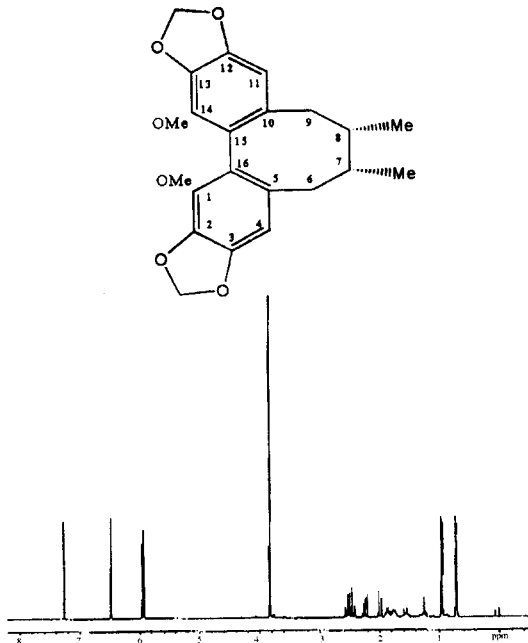


Fig. 3 - Structure and ¹H-NMR spectrum (CDCl₃, 300 MHz) of Wuweizisu C.

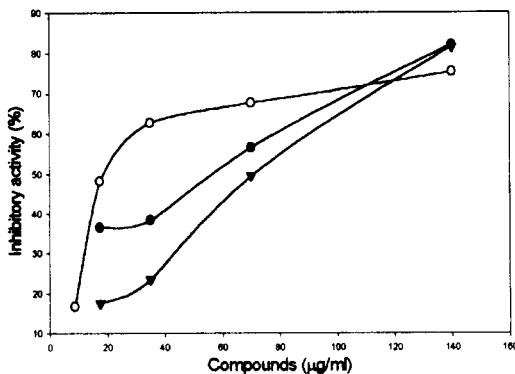


Fig. 4 - Effect of chitin synthase II inhibitors from *Schizandrin* on the activity of chitin synthase II. (○: Wuweizisu C, ●: Gomisin N, ▼: Polyoxin D)

물리·화학적 성질 및 NMR spectral data가 일치하여 최종적으로 화합물 1은 gomisin N(Fig. 2)으로, 화합물 2는 wuweizisu C(Fig. 3)로 동정하였다.

Chitin synthase II 억제 효과 - 오미자 추출물에서 분리한 gomisin N과 wuweizisu C를 시료로 하여 chitin synthase II에 대한 저해 활성을 측정한 결과 두 물질 모두 농도 의존적인 저해 양상을 나타내었으며 IC₅₀는 각각 62.4 µg/ml 와 19.2 µg/ml로 매우 강한 저

Table III - Antifungal activities of Gomisin N and Wuweizisu C against various human pathogens

Pathogens	(Unit : µg/ml)	
	Gomisin N	Wuweizisu C
<i>Aspergillus fumigatus</i>	250	> 200
<i>Candida albicans</i>	> 500	200
<i>Candida krusei</i>	> 500	200
<i>Candida lusitanae</i>	500	200
<i>Candida tropicalis</i>	> 500	200
<i>Coccidioides immitis</i>	250	200
<i>Cryptococcus neoformans</i>	> 500	200
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	125	200

해 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 chitin synthase II 저해제로 알려진 polyoxin D(IC₅₀: 70 µg/ml)와 비교해 볼 때 gomisin N은 유사한 저해 활성을 나타낸 반면 wuweizisu C는 polyoxin D보다 3배 정도 강한 저해 활성을 나타내었으나, 주목과 산사나무로부터 분리하여 이미 보고한 catechin과 ursolic acid 보다는 다소 낮은 활성을 나타내었다.^{20,21)} 또한 chitin synthase III에 대한 저해 활성을 측정한 결과, wuweizisu C는 chitin synthase III에 대해 미약한 저해 활성을 나타낸 반면 gomisin N은 chitin synthase III에 대해서는 전혀 저해 활성을 나타내지 않아(data not shown), gomisin N은 chitin synthase II에 선택적인 저해 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

최소 생육저지 농도(MIC) - 인체 병원균 8종에 대한 항진균 활성을 측정한 결과, gomisin N은 *Trichophyton mentagrophytes*와 *Aspergillus fumigatus* 및 *Coccidioides immitis*에 대해서는 125~250 µg/ml 농도에서 항균활성을 나타내었으나, 이 외의 병원성 진균에 대해서는 500 µg/ml 농도 이상에서 MIC값을 나타내어 미약한 항균 활성을 나타내었다(Table III). 반면에 wuweizisu C는 *Aspergillus fumigatus*를 제외한 병원성 진균류에 모두 200 µg/ml 농도에서 MIC값을 나타내었다. 이러한 gomisin N과 wuweizisu C의 항균활성은 polyoxin D에 비하여 미약하였으나, 2종의 생리활성물질 모두 미약한 항균 활성을 지니고 있음을 확인 할 수 있었다.

결론

인체나 식물 병원성 진균류의 중요한 세포벽 구성 성분 중의 하나인 chitin의 합성에 관여하는 chitin

synthase II 저해제를 탐색하기 위하여 다양한 천연물을 대상으로 활성 검정을 실시하여 오미자 추출물로부터 chitin synthase II의 저해 활성을 나타내는 화합물을 분리·정제하였다. 오미자는 *Candida*와 *Penicillium*속 균에 항균 효과²²⁾를 나타낸다고 보고되었으나, 이러한 항균 작용을 나타내는 구체적인 작용기작은 아직 밝혀지지 않았으며, 지금까지 gomisin N과 wuweizisu C는 GTP을 감소시키는 antihepatotoxic 작용¹⁶⁾과 체내 cholesterol 축적을 예방하는 ACAT 저해작용²³⁾등이 보고되었으나, 진균류에 대한 구체적인 항균 작용은 보고되지 않은 실정이다.

오미자 추출물에서 분리한 gomisin N과 wuweizisu C는 chitin synthase II에 강한 저해 활성을 나타내었으나 각종 진균류에 대해서는 미약한 항균 활성을 나타내었다. 이 두 화합물이 chitin synthase II 효소에 대해 강한 저해 활성을 나타내었음에도 불구하고 각종 진균류에 대한 항균력이 미약한 것은 이 화합물들이 hydrophobic하여 세포 내로 이동이 용이하게 일어나지 못하여 미약한 활성을 나타내는 것으로 추정되나 자세한 것은 더욱 더 규명되어야 할 것으로 생각된다. 또한 유사한 구조를 지닌 2종의 생리 활성 물질이 나타내는 활성간의 차이를 볼 때, 두 물질 사이의 구조와 활성에 미치는 상관관계(structure-activity relationship)를 규명하면 매우 흥미로운 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료되며, 이러한 결과들이 축적되면 보다 우수한 항진균제의 개발도 가능할 것으로 전망된다.

문 헌

- 1) Gooday, G. W and Trinci, A. P. J. : Wall structure and biosynthesis in fungi, in Gooday, G. W., Lloyd, D. and Trinci, A. P. J. (eds), The eukaryotic microbial cell, Cambridge University Press, Cambridge, p. 207 (1980).
- 2) Cabib, E. and Ulane, R. : Yeast Chitin Synthetase. *J. Biol. Chem.* **248**(4), 1451 (1973).
- 3) Sburlati, A. and Cabib, E. : Chitin synthase 2, a Presumptive Participant in Septum Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **261**(32), 15147 (1986).
- 4) Silverman, S. J., Sburlati, A., Slater, L. and Cabib, E. : Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4735 (1988).
- 5) Choi, W. J and Cabib, E. : The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthases. *Analytical Biochemistry.* **219**, 368 (1994).
- 6) DeMarrini, D. J., Adams, A. E. M., Fares, H., Virgilio, C. D., Valle, G., Chuang, T. S. and Pringle, J. R. : A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *S. cerevisiae* cell wall. *J. Cell. Biol.* **139**(1), 75 (1997).
- 7) COS, T., Ford, R., Trilla, A., Duran, A., Cabib, E. and Roncero, C. : Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur. J. Biochem.* **256**, 419 (1998).
- 8) Trilla, J. A., Cos, T., Duran, A. and Roncero, C. : Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of *S. cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and CSD4. *Yeast.* **13**, 795 (1997).
- 9) Santos, B., Duran, A. and Valdivieso, M. H. : CHS5, a gene involved in chitin synthesis and mating in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **17**(5), 2485 (1997).
- 10) Bulawa, C. E. : CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *S. cerevisiae* : the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* **12**, 1764 (1992).
- 11) Bulawa, C. E., Slater, M. L., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W. L. and Robbins, P. W. : The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell.* **46**, 213 (1986).
- 12) Munro, C. A., Schofield, D. A., Gooday, G. W. and Gow, N. A. R. : Regulation of chitin synthesis during dimorphic growth of *Candida albicans*. *Microbiology.* **144**, 391 (1998).
- 13) 정보섭, 신민교. : 항약(생약)대사전, 영림사, p. 471-472 (1989).
- 14) Drouhet, E. B., Dupont, B., Improsi, L., Viviani, M. and Tortorano, A. M. : In vitro and In vivo evaluation of antifungal agents. Elsevier, New York. p. 223 (1986).
- 15) McGinnis, M. R. and Rindali, M. G. : Antifungal drug. Antibiotics in laboratory medicine, Lorian, V (Eds), Williams & Wilkins, Baltimore. p. 1 (1991).

- 16) Hiroshi, H., Yoshinobu, K., Heihachiro, T. and Yukinobu, I. : Antihepatotoxic actions of lignoids from *Schizandra chinensis* Fruits. *Planta Medica*. **50**, 213 (1984).
- 17) Yukinobu, I., Heihachiro, T., Itiro, T. and Hiroshi, K. : The constituents of *Schizandra chinensis* BaILL. V. The structures of four new lignans, Gomisin N, Gomisin O, Epigomisin O and Gomisin E and transformation of Gomisin N to Deangeloygomisin B. *Chem. Pharm. Bull.* **27**(11), 2695 (1979).
- 18) Yukinobu, I., Heihachiro, T., Hiroshi, S., Kaoru, N. and Itiro, Y. : The constituents of *Schizandra chinensis* BaILL. VI. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Dibenzocyclooctadiene Lignans. *Chem. Pharm. Bull.* **28**(8), 2414 (1980).
- 19) Yukinobu, I., Heihachiro, T. and Yosioka, I. : The constituents of *Schizandra chinensis* BaILL. XII. Isolation and structure of a new lignan, Gomisin R, the absolute structure of Wuweizisu C and Isolation of Schisantherin D. *Chem. Pharm. Bull.* **30**(9), 3207 (1982).
- 20) Kim, S. U., Hwang, E. I., Nam, J. Y., Son, K. H., Bok, S. H., Kim, H. E. and Kwon, B. M. : Inhibition of Chitin Synthase II by Catechins from Stem Bark of *Taxus cuspidata*. *Planta medica*. **65**, 97 (1999).
- 21) Jeong, T. S., Hwang, E. I., Lee, H. B., Lee, E. S., Kim, Y. K., Min, B. S., Bae, K. H., Bok, S. H. and Kim, S. U. : Chitin synthase II Inhibitory Activity of Ursolic acid, Isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Medica*. **65**, 261 (1999).
- 22) 민병선, 방규호, 이준성, 배기환. : Candida와 Penicillium속 진균에 대한 천연물의 항진균 효과 검색. 약학회지. **40**(5), p. 582 (1996).
- 23) Kwon, B. M., Jung, H. J., Lim, J. H., Kim, Y. S., Kim, M. K., Kim, Y. K., Bok, S. H., Bae, K. H. and Lee, I. R. : Acyl-CoA : Cholesterol Acyltransferase inhibitory Activity of Lignans Isolated from Schizandra, Machilus and Magnolia Species. *Planta Medica*. **65**, 74 (1999).