

## 곰팡이 분리주 No. 51005로부터 포스포리파제 C 저해물질 앙길로스포랄의 분리

오원근 · 이현선 · 안순철 · 고학룡 · 김보연 · 민태익 · 안종석\*

생명공학연구소, 세포반응조절 연구Unit

(Received May 13, 1997)

### Isolation of Anguillosporal, a Potent Inhibitor of Phospholipase C from Fungi Isolate No. 51005

Won Keun Oh, Hyun Sun Lee, Soon Cheol Ahn, Hack Ryong Ko,  
Bo Yeon Kim, Tae Ick Mheen and Jong Seog Ahn\*

Cellular Response Modifier Research Unit, Korea Research Institute of  
Bioscience and Biotechnology, P.O.BOX 115, Yusong, Taejon 305-600, Korea

**Abstract**—MT 51005 as a potent inhibitor of phospholipase C(PLC) was purified from the culture broth of a fungal strain No. 51005 isolated from soil. It was identified as a benzaldehyde derivative, anguillosporal, by the physico-chemical properties and spectroscopic data. Anguillosporal showed the inhibitory activity against purified PLC with an  $IC_{50}$  of 13  $\mu\text{g/ml}$ . And it also inhibited the formation of inositol phosphates( $IP_3$ ) in platelet-derived growth factor(PDGF)-stimulated NIH3T3 $\gamma$ 1 cells with an  $IC_{50}$  of 0.8  $\mu\text{g/ml}$ .

**Keywords** □ phospholipase C, inositol phosphates formation, anguillosporal.

Phosphoinositide specific phospholipase C(PLC)는 platelet-derived growth factor(PDGF), epidermal growth factor(EGF)등의 세포성장인자나 vasopressin, angiotensin등의 자극인자가 세포막에 존재하는 각각의 수용체에 결합하므로써 활성화되는 것으로 알려져있다. 활성화된 PLC는 세포막에 소량 존재하는 phospholipid인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate( $PIP_2$ )를 inositol 1,4,5-triphosphate( $IP_3$ )와 diacylglycerol(DAG)로 분해하며 생성된  $IP_3$ 는 세포내의 저장소로부터  $Ca^{2+}$ 를 유리시키고 DAG는 protein kinase C(PKC)을 활성화시켜 일련의 세포반응을 유도하여 궁극적으로 세포의 성장과 분화를 일으킨다.<sup>1,2)</sup>

현재까지 알려진 PLC isozyme들은 Rhee등<sup>1,3)</sup>이 분류한 바에 따르면 크게 PLC  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ 의 세종류로 구별된

다. 이러한 PLC중 한 종류인 PLC $\gamma$ 를 미세조작에 의하여 NIH3T3 세포주에 주입해주거나<sup>4)</sup> 이의 유전자를 증폭 발현시켜주면<sup>5)</sup> 세포분열이 활성화되며 반대로 PLC 항체나  $PIP_2$  항체를 NIH3T3 세포주에 주입해주면 DNA 합성이 억제되는 것으로 보고되었다.<sup>6)</sup> 더욱이 폐암등의 암세포에서 PLC 효소의 발현량이 증가되었다는 보고<sup>7)</sup>는 PLC 저해제가 신호전달과정의 이상을 조절하는 새로운 약물개발의 방향이 될 수 있을 것이다.<sup>8)</sup>

이와 같은 목적으로 저자들은 미생물 분리주 및 약용식물로부터 PLC 저해물질을 탐색하여 왔으며 이들로 부터 분리한 scopafungin<sup>9)</sup>, amentoflavone<sup>10)</sup>, prenylated flavones<sup>11)</sup>등을 보고한 바 있다. 계속적인 탐색 과정에서 토양으로부터 분리한 곰팡이 분리주 No. 51005의 균체 배양액에서 PLC에 강한 저해활성을 가지는 물질을 분리하였다. 이 물질의 물리 화학적 성질 및 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR 및 HMBC등의 분광학적 방법을 통하여 benzaldehyde계 물질인 anguillosporal로 동

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 042-860-4312 (팩스) 042-860-4595

정하였기에 보고하는 바이다.

### 실험방법

**시약 및 사용기기** - HEPES, EGTA, L-3-phosphatidyl inositol(PI)은 Sigma사에서 PDGF는 Genzyme사에서 구입하여 사용하였다. PLC와 PKC 효소활성을 측정하기 위하여 [ $^3\text{H}$ ]-PI와 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP를 Amersham사에서 구입하였다. 세포내 inositol phosphates(IPt)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 No. 51005의 배양은 New Brunswick Scientific사의 MF-107 jar fermentor을 이용하였다. HPLC는 Shimadzu LC-6A system을 사용하였으며 UV spectrum은 Beckmann DU-64를 사용하여 측정하였다.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , HMBC NMR spectrum은 Varian UNITY 300 NMR spectrophotometer 로 ESI(electrospray ionization)-MS는 VG사의 Guattro로 측정하였다. PLC, PKC 효소활성 및 IP<sub>t</sub> 생성량의 측정을 위한 radioactivity는 Bekmann사의 LS 600 TA scintillation counter를 이용하여 측정하였으며 IC<sub>50</sub>값 결정은 Jandel Corporation의 Sigmplot Scientific Graphing system을 이용하였다.

**곰팡이 분리주 No. 51005의 배양** - 곰팡이 분리주 No. 51005는 토양으로부터 분리한 균주로 배양조건은 다음과 같다. 14 l의 jar fermentor에 1 l당 yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, glucose 10g이 함유된 배지에 4일간 배양한 종균액을 3% 접종하여 배양온도 25°C, 통기량 0.5 vvm, 교반속도 200 rpm에서 14일간 배양하였다.

**PLC 효소활성 측정** - PLC 효소활성은 Rhee등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. PLC 효소는 PLC $\gamma$ 1 cDNA가 재조합된 vaccinia virus를 감염시킨 HeLa-3S세포로부터 분리정제한 것을 사용하였다.<sup>13)</sup> 20  $\mu\text{Ci}$ 의 [ $^3\text{H}$ ]-PI가 포함된 50  $\mu\text{M}$  PI, 1 mM EGTA, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES(pH=7.0) 및 0.1% sodium deoxycholate로 구성된 반응액 185  $\mu\text{l}$ 에 효소액 5  $\mu\text{l}$

와 검정시료 10  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 다음 반응액을 37°C에서 10분간 반응시킨 후 CHCl<sub>3</sub>/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.

**PKC 효소활성 측정** - PKC 효소활성은 Huang등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 측정하였으며 PKC 효소는 소 뇌로부터 부분정제하여 사용하였다.<sup>13)</sup> PKC 효소활성 측정은 Ca<sup>2+</sup>, phospholipid와 diolein의 존재하에 기질인 histone III-S에 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP의  $^{32}\text{P}$ 가 인산화되는 정도를 측정하였다. 반응액 25  $\mu\text{l}$ 에는 30 mM Tris-HCl(pH=7.5), 6 mM magnesium acetate, 0.12 mM [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP( $4 \times 10^4$  cpm/ml), 0.25 mM EGTA, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, phosphatidylserine 2.5  $\mu\text{g}$ , diolein 0.5  $\mu\text{g}$ , histone III-S 25  $\mu\text{g}$ 과 PKC 효소액 5  $\mu\text{l}$ 를 포함한다. 여기에 검정시료 5  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid(TCA)용액 20  $\mu\text{l}$ 로 미리 적신 cellulose-Pi paper에 반응액 10  $\mu\text{l}$ 를 점적하고 말린 후 0.2 M KCl이 함유된 5% TCA용액으로 전개시킨 paper 하단부 2 cm 정도를 절단하여 radioactivity를 scintillation counter로 측정하였다.

**세포내 IP<sub>t</sub>량의 측정** - 세포내 IP<sub>t</sub>량의 측정은 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양한 NIH3T3 $\gamma$ 1 세포주를 사용하여 Fleischman등<sup>15)</sup>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 20분 동안 배양하고 PDGF로 30분 동안 자극하였다. 이 세포주를 5% HClO<sub>4</sub>를 사용하여 반응을 중지시킨 뒤 세포내 inositol phosphate를 추출하였다. 추출된 inositol phosphate를 Biorad AG 1-X8 anion exchange column을 사용하여 흡착시킨 뒤 10 ml의 증류수로 세척하고 5 mM sodium tetraborate와 60 mM ammonium formate 용액 10 ml로 다시 세척하였다. 마지막으로 1 M ammonium formate와 0.1 M formic acid를 사용하여 total inositol phosphates를 용출시킨 뒤 radioactivity를 측정하였다.

**활성물질의 분리정제** - 배양액 10 l를 5,000 rpm에

서 10분간 원심분리하여 배양 상등액과 균체 침전물로 나누었다. Diaion HP-20에 배양 상등액을 통과시켜 분리하고 자 하는 물질을 흡착시킨 뒤 30% MeOH을 사용하여 세척하였다. Acetone으로 흡착물질을 용출시킨 뒤 균체 침전물의 acetone추출액과 합하여 농축하였다. 농축액을 물에 용해시킨 뒤 BuOH로 용매추출하여 silica gel을 넣어 흡착시켜 농축하였다. CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20/1을 전개용매로하여 silica gel column chromatography로 분획하였다. 이렇게 용출된 각 분획마다 PLC 활성을 조사하여 저해활성이 강한 분획을 모아 농축한 뒤 70% MeOH을 전개용매로 Lobar RP-18 column chromatography하였다. 이때 활성물질과 동일한 위치에 나오는 물질들을 제거하기 위하여 CHCl<sub>3</sub>/n-hexane/MeOH=2/3/1을 전개용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 2회 동일하게 실시하였다. 분리된 분획들 중 높은 저해활성을 보이는 분획들을 모아 Prep. HPLC(column: J'sphere ODS-H80,  $\phi$  20 mm $\times$ 150 mm, 용매: 75% MeOH, 유속: 4 ml/min, UV detector: 254 nm)를 실시하여 retention time(RT) 17분에 해당하는 활성물질 MT 51005 67 mg을 순수 분리하였다.

**물질 MT 51005** - 이 물질은 TLC상에서(SiO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH=20/1) R<sub>f</sub>값은 0.45로 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, I<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 발색되었다.

UV  $\lambda_{max}$ (MeOH): 222, 298 nm, Mass(E.I., 70ev), m/z: 250, 154, 150, <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 300MHz, ppm):  $\delta$  0.87(3H, t, J=6.9 Hz, 5'-CH<sub>3</sub>), 1.15(3H, t, J=7.5 Hz, 2''-CH<sub>3</sub>), 1.26(4H, m, 3'-CH<sub>2</sub> and 4'-CH<sub>2</sub>), 1.60(5H, m, 2'-CH<sub>2</sub> and 6'-CH<sub>3</sub>), 2.62(2H, q, J=7.5 Hz, 1''-CH<sub>2</sub>), 3.32(1H, sextet, J=6.9 Hz, 1'-CH), 5.51(1H, s, 4-OH), 6.28(1H, s, aromatic-H), 10.17(1H, s, 7-CHO), 12.8(1H, s, 2-OH). <sup>13</sup>C-NMR(Table I)

**물질 MT 51005의 아세틸화** - 물질 MT 51005 10 mg을 무수초산 200  $\mu$ l, pyridine 200  $\mu$ l에 녹이고 상온에서 5시간 반응시킨 후 감압농축한 뒤 n-hexane/EtOAc=3/1를 전개용매로 silica gel column chromatography하여 MT 51005-acetate 약 5 mg을 얻었다.

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm):  $\delta$  0.87(3H, t, J=6.9 Hz, 5'-CH<sub>3</sub>), 1.15(3H, t, J=7.5 Hz, 2''-CH<sub>3</sub>), 1.26(4H, m, 3'-CH<sub>2</sub> and 4'-CH<sub>2</sub>), 1.60(5H, m,

**Table I** - Comparison of <sup>13</sup>C-NMR spectral data between MT 51005 and anguillosporal<sup>16)</sup> (CDCl<sub>3</sub>, 75MHz)

Carbon No.	anguillosporal	MT 51005
1	112.1(s)	112.4(s) <sup>1)</sup>
2	163.7(s)	164.0(s)
3	114.2(s)	114.5(s)
4	160.5(s)	160.8(s)
5	105.1(d)	105.4(d)
6	151.8(s)	152.1(s)
7	192.2(d)	192.6(d)
2-OH	-	-
4-OH	-	-
1'	32.2(d)	32.4(d)
2'	37.8(t)	38.1(t)
3'	29.6(t)	29.8(t)
4'	22.5(t)	22.7(t)
5'	13.7(q)	14.0(q)
6'	21.9(q)	22.2(q)
1''	15.1(t)	15.3(t)
2''	12.8(q)	13.0(q)

<sup>1)</sup> Multiplicities were established by DEPT spectra

2'-CH<sub>2</sub> and 6'-CH<sub>3</sub>), 2.32(3H, s, 4-COCH<sub>3</sub>), 2.62(2H, q, J=7.5 Hz, 1''-CH<sub>2</sub>), 3.32(1H, sextet, J=6.9 Hz, 1'-CH), 6.28(1H, s, aromatic-H), 10.17(1H, s, 7-CHO), 12.8(1H, s, 2-OH).

## 실험결과

**MT 51005의 구조동정** - MT 51005는 노란색 분말로 UV  $\lambda$ (MeOH) max 222 nm에서 최대 흡수 peak를 보였으며 ESI-MS 분석결과 m/z 250에서 [M]<sup>+</sup> peak가 관찰되어 분자량 250으로 확인되었다. 또한 HREI-MS 및 NMR에 의한 구조분석 결과 분자식은 C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>로 결정되었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum은 0.87 ppm(3H, 5'-CH<sub>3</sub>), 1.15 ppm(3H, J=7.5 Hz, 2''-CH<sub>3</sub>), 및 1.60 ppm(3H, 6'-CH<sub>3</sub>)에서 3개의 methyl proton, 2.62 ppm(2H, J=7.5 Hz, 1''-CH<sub>2</sub>)에서 1개의 methylene proton, 3.32(1H, J=6.9 Hz, 1'-CH)위치에서 1개의 methine proton, 6.28 ppm(1H, 5-H)에서 aromatic proton 및 5.51 ppm, 12.8 ppm에서 hydroxy proton peak를 확인할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 5개의 quaternary carbon(C-1, C-2, C-3, C-4, C-6), 2개의 methine carbon(C-5, C-1')과 192.6 ppm 위치에서 1개의 aldehyde carbon (C-7)이 존재함을 알수있었다. 위와같은 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-

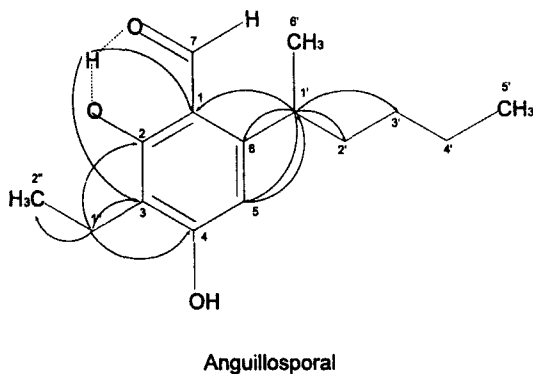
NMR spectrum의 결과들로부터 MT 51005는 tetrasubstituted benzaldehyde구조로 추정하였으며 따라서 각 치환기의 정확한 위치는 HMBC spectrum로 결정하였다. HMBC spectrum상에서 6.28 ppm(1H, 5-H)의 주소는 32.4 ppm(C-1') 위치의 carbon과 12.8 ppm(1H, 2-OH)의 수소는 112.4 ppm(C-1), 114.5 ppm(C-3) 위치의 carbon과 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 원거리 짝지움이 관찰되었다. 또한, 3.32 ppm(1H, 1'-H)위치의 methine proton은 29.8 ppm(C-3'), 38.1 ppm(C-2'), 105.4 ppm(C-5), 112.4 ppm(C-1), 152.1 ppm(C-6)위치의 carbon과 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C 원거리 짝지움을 하였다.

이상의 물리 화학적 성질 및 기기분석 결과들을 종합하여 MT 51005는 Harrigan등<sup>16)</sup>이 *Anguillospora longissima*에서 분리한 anguillosporal과 기기 분석치가 일치하였으므로 MT 51005를 anguillosporal(Fig. 1)로 동정하였다.

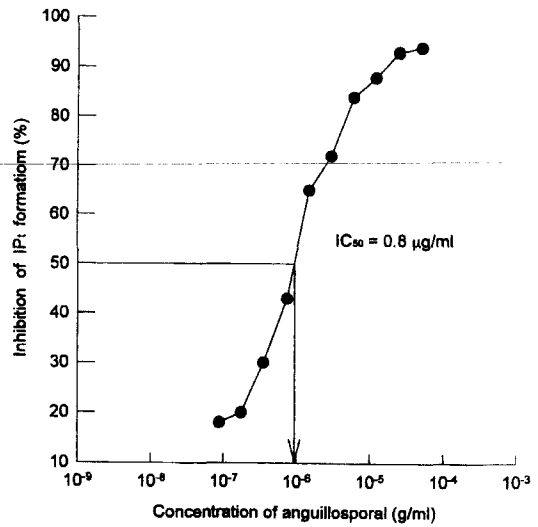
**MT 51005의 생물활성** - MT 51005는 NIH3T3γ1 세포주에서 PDGF 자극에 의한 IP<sub>1</sub>생성에 대하여 0.8 μg/ml의 농도에서 IC<sub>50</sub>값을 보여 주었다(Fig. 2). 또한 PLC와 PKC 효소활성에 대한 저해작용을 조사한 결과 PLC 효소활성에 대하여는 13 μg/ml에서 IC<sub>50</sub>값을 보여 주었으나(Fig. 3) PKC 효소 활성에 대해서는 333 μg/ml의 농도에서도 저해작용을 보여주지 않았다.

**고 찰**

PLC 효소는 동물의 각종 조직에서 발견되고 있는 효소로서 세포내 신호전달과정에서 세포막에 존재하는



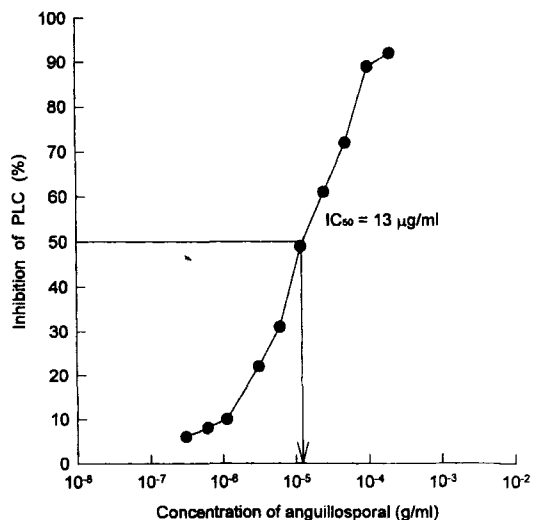
**Fig. 1** - The chemical structure of anguillosporal elucidated by HMBC. <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long-range coupling (→) were shown in a important position.



**Fig. 2** - Inhibition of IP<sub>1</sub> formation in the PDGF-stimulated NIH3T3γ1 cells. After prelabeling with myo-[2-<sup>3</sup>H]-inositol for 24 hr, the cells were stimulated with PDGF in the presence of anguillosporal.

PIP<sub>2</sub>를 분해하여 IP<sub>3</sub>와 DAG를 생성하고 이들은 세포내 신호전달의 2차 매개자로 작용하여 여러 가지 세포증식 및 반응을 유도한다. 따라서 이 효소의 선택적 저해제가 신호전달과정의 이상을 조절하는 작용을 가질 수 있을 것이란 기대하에 최근 많은 연구가 진행되고 있다.

저자들은 토양 미생물 및 약용 식물을 대상으로



**Fig. 3** - Inhibition of phospholipase C by anguillosporal. The assay procedure was described in the Methods.

PLC 저해물질을 탐색하던 중 곰팡이 분리주 No. 51005로부터 PLC 저해작용을 갖는 물질을 분리하여  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 및 HMBC 등의 기기분석을 통하여 *anguillosporal*로 동정하였다. *Anguillosporal*은 Harrigan 등<sup>16)</sup>이 담수로 부터 분리한 곰팡이를 배양하여 이의 배양액으로부터 항균활성을 갖는 물질로서 분리하였으며 *Staphylococcus aureus*와 *Candida albicans*에 대하여 각각  $4\ \mu\text{g/ml}$ 과  $58\ \mu\text{g/ml}$ 의 MIC값을 갖는 것으로 보고되었다.

그러나, *anguillosporal*에 대해서는 항균활성 이외에 다른 생물활성에 대한 보고는 없었으며 본 논문에서 PLC 저해효과를 처음으로 보고하는 바이다. 이러한 *anguillosporal*은  $13\ \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 PLC 활성을 50% 저해하였다. 그리고 이 물질의 세포내에서 PLC 효소활성에 대한 저해효과를 조사하고 자 PLC 효소가 과발현되는 NIH3T3 $\gamma$ 1 세포주를 사용하여 PDGF의 자극에 의해 생성되는 세포내  $\text{IP}_3$ 양을 측정하였을 시  $0.8\ \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서  $\text{IC}_{50}$ 값을 보여주었다. 이러한 결과는 *anguillosporal*이 현재까지 보고된 PLC 저해물질인 *vinaxanthone*<sup>17)</sup> ( $\text{IC}_{50}=3.1\ \mu\text{g/ml}$ , PLC purified from bovine brain), *caloporoside*<sup>18)</sup> ( $\text{IC}_{50}=15\sim 28\ \mu\text{g/ml}$ , from rat brain), *hispidospermidin*<sup>19)</sup> ( $\text{IC}_{50}=6.5\ \mu\text{g/ml}$ , from rat brain), *scopafungin* ( $\text{IC}_{50}=34\ \mu\text{g/ml}$ , from bovine brain), *amentoflavone* ( $\text{IC}_{50}=16\ \mu\text{g/ml}$ , from bovine brain), *prenylated flavones* ( $\text{IC}_{50}=3\sim 15\ \mu\text{g/ml}$ , from bovine brain) 등에 비하여는 다소 약하거나 동등한 저해작용을 보여주었다. 그러나 저자들이 사용한 PLC 효소는 분리된 기원이 다르며 또한 현재까지 보고된 PLC 저해작용이 대부분 *in vitro* 효소 활성만을 측정된 것으로 저자들이 NIH3T3 $\gamma$ 1 세포주를 사용하여 PDGF에 의해 활성화되는 PLC에 대한 영향을 조사하여 세포내  $\text{IP}_3$ 양을 측정하는 방법으로 보고한 *amentoflavone*<sup>10)</sup>을 제외하고는 없었다. 더욱이 *amentoflavone*은  $4.9\ \mu\text{g/ml}$ 에서  $\text{IC}_{50}$  값을 가지나 *anguillosporal*은  $0.8\ \mu\text{g/ml}$  농도에서  $\text{IC}_{50}$  값을 갖는 것으로 보아 *amentoflavone*보다 세포내에서 6배 강한 저해활성을 보이고 있는 것을 알 수 있다. 또한 *anguillosporal*을 신호전달과정에서 중요한 또다른 효소인 PKC에 대하여 효소활성 측정시  $333\ \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 저해활성을 보이지 않았다. 이러한 결과들을 볼 때 *anguillosporal*의 세포내 신호전달과정의 저해양식은 PLC 효소에 대한 직접적인 저해에 기인하여 세포내  $\text{IP}_3$

양을 감소 시킨 것으로 볼 수 있다.

따라서 저자들은 현재 암 세포주 및 면역과 관련된 세포주를 사용하여 *anguillosporal*의 세포내 저해작용을 검토 중에 있으며 또한 PLC 효소외의 다른 신호전달 관련 phosphodiesterase인 phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>), phosphatidylcholine specific phospholipase D (PLD) 등의 효소들에 대한 저해활성을 검토 중에 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 과학 기술처의 선도기술개발 사업비의 일부에 의해 수행되었음을 밝히는 바입니다.

## 문헌

- 1) Rhee, S. G., Suh, P. G., Ryu, S. H. and Lee, S. Y. : Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* **244**, 546 (1989).
- 2) Nishizuka, Y. : Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305 (1986).
- 3) Rhee, S. G. and Choi, K. D. : Regulation of inositol phospholipid specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **267**, 12393 (1992).
- 4) Smith, M. R., Ryu, S. H., Suh, P. G., Rhee, S. G. and Kung, H. F. : S-phase induction and transformation of quiescent NIH3T3 cells by microinjection of phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 3659 (1989).
- 5) Margolis, B., Ziberstein, A., Franks, C. and Felder, S. : Effect of phospholipase C overexpression on PDGF-induced second messengers and mitogenesis. *Science* **248**, 607 (1990).
- 6) Smith, M. R., Liu, Y. L., Kim, H., Rhee, S. G. and Kung, H. F. : Inhibition of serum- and ras-stimulated DNA synthesis by antibodies to phospholipase C. *Science* **247**, 1074 (1990).
- 7) Arteaga, C. L., Jojanson, M. D., Todderud, G., Coffey, R. Y., Carpenter, G. and Page, D. L. : Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- $\gamma$ 1 in primary human breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 10439 (1991).
- 8) Powis, G. : Drugs active against growth factor and oncogene phosphatidyl-inositol signalling

- pathways. *Cancer Biology* **3**, 343 (1992).
- 9) 오원근, 이현선, 안순철, 김보연, 박문수, 민태익, 안종석 : 방사균 분리주 No. 2511-5로부터 포스포리파제 C 저해물질 스크리닝의 분리, 약학회지 **39**, 554 (1995).
  - 10) 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 : Inhibition of phospholipase C $\gamma$ 1 activity by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Planta Med.* **62**, 289 (1996).
  - 11) 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 : Inhibition of phospholipase C $\gamma$ 1 activity by the prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Planta Med.* (in press, 1997).
  - 12) Rhee, S. G., Ryu, S. H. and Cho, K. S. : Assays of phosphoinositide-specific phospholipase C and purification of isozymes from bovine brain. *Methods in Enzymol.* **197**, 502 (1991).
  - 13) 안종석, 이현선, 안순철, 오원근, 강대욱, 류성호, 서관길 : 세포반응의 신호 전달조절 선도물질의 탐색기술 개발, 과기처 연구보고서 (1993).
  - 14) Huang, K. P., Huang, F. L., Nakabayashi, H. and Yoshida, Y. : Biochemical characterization of rat brain protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **263**, 14839 (1988).
  - 15) Fleischman, L. F., Chahwala, S. B. and Cantley, L. : Ras-transformed cells: altered levels of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and catabolites. *Science* **231**, 407 (1986).
  - 16) Harrigan, G. G., Armentrout, B. L. and Gloer, J. B. : Anguillosporal, a new antibacterial and antifungal metabolite from the freshwater fungus *Anguillosporal longissima*. *J. Nat. Prod.* **58**, 1467 (1995).
  - 17) Aoki, M., Itezono, Y., Shirai, H., Nakayama, N., Sakai, A. and Tanaka, Y. : Structure of a novel phospholipase C inhibitor, vinaxanthone(R009-1450), produced by *Penicillium vinaceum*. *Tetrahed. Lett.* **32**, 4737 (1991).
  - 18) Weber, W., Schu, P., Anke, T., Velten, R. and Steglich, W. : Caloporoside, a new inhibitor of phospholipase C from *Caloporus dichrous*(Fr.) Ryv. *J. Antibiotics* **47**, 1188 (1994).
  - 19) Yanagisawa, M., Sakai, A., Adachi, K., Sano, T. and Watanabe, K. : Hispidospermidin, a novel phospholipase C inhibitor produced by *Chaetosphaeronema hispidulum*(Cda) Moesz NR 7127. *J. Antibiotics* **47**, 1 (1994).