약학회지 제42권 제6호 552~557(1998)
Yakhak Hoeji Vol. 42, No. 6

Bacillus sp. B-6가 생산하는 acyl CoA 합성 효소 억제 물질의 분리 및 구조 결정

김경자 · 김태경
순천향 대학교 생명과학부
(Received August 5, 1998)

Isolation and Structure Elucidation of Acyl CoA Synthetase Inhibitor from *Bacilus* sp. B-6

Kyoung-Ja Kim and Tae-Kyong Kim
Department of Life Science, Soonchunhyang University, Onyang, 336-600, Korea

Abstract—Acyl CoA synthetase inhibitor, was purified from the culture broth of a *Bacillus* sp. B-6, which had been isolated from soil, by chloroform extract, silica gel column chromatography and preparative TLC. The purified acyl CoA synthetase inhibitor showed higher Antifungal activity against *C. albicans* (MIC : 8 μg/m*l*). Through the analysis of UV spectrum, melting point, IR spectrum, Mass-spectrum, ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectrum, the inhibitor could be identified as phenazine-1-carboxylic acid.

Keywords ☐ Acyl CoA synthetase inhibitor, *Bacillus* sp. B-6, Antifungal activity, Phenazine-1-carboxylic acid.

지방의 대사는 정상적인 상태에서는 합성과 분해 사이의 균형을 잘 이루고있으나 균형이 깨어졌을 때에 과콜레스테롤증(hypercholesterolemia)과 과지방증(hyperlipidemia)으로 진행된다. 이것은 결국 동맥경화, 고혈압, 비만, 당뇨병과 같은 심각한 병을 야기시킬 수 있다. 이러한 비정상적인 지방 대사에 기인한 질병을 치료하기 위하여 지방 대사 관련 효소 저해제들이 이와 같은 질병치료제로 관심을 끌고 개발되기 시작하였다. 비정상적인 지방 대사의 저해물질로 fatty acid synthetase 저해제인 cerulenin[1]이 1963년에 발견되었으나 부작용때문에 약으로는 개발되지 못하고 지방 연구의 생화학적 도구[2,3]로 널리 이용되었다. 1983년에는 type II fatty acid synthetase억제제인 thiotetromycin[4]이 발견되었으며 1986년에는 acyl coA synthetase억제제인 triacsin[5]이 *Streptomyces* sp. SK-1894에의해 생성됨이 밝혀졌으며, 그 중에서 triacsin A는 ATP와 coenzyme A에 대해서는 비경쟁적으로, 긴사슬 지방산에 대해서는 경쟁적으로 작용하는 것으로 보고되었다.[6] 설치류의 간에서 peroxisome의 proliferation에 관여하는 perfluorodecanoic acid(PFDA)가 쥐의 hepatocyte에서 긴사슬 acyl CoA synthetase(ACS)의 억제제로 작용하는 것으로 밝혀졌으며, phytanic acid도 ACS의 억제제로 알려져 있다. ACS는 microsome, mitochondria, peroxisome, 원형질막에 존재하는 것으로 알려져 있으며 microsome과 peroxisome을 detergent로 처리시 ACS가 억제된다는 연구보고가 있으며 phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylinositol(PE)과 sphingomyelin(SM) 등의 인지질이 ACS를 억제하는 것으로 보고되고 있다. 세계적으로 식생활 양식이 육류위주로 바뀜에 따라 과지방, 과콜레스테롤증 환자가 급증하고 있어서 지방산 대사 관련 효소의 저해제[7] 개발시 그 시장성이 매우 클 것으로 생각된다. 지방대사[8,9]와 관련된 효소로서 fatty acid thiokinase[10,11]는 long chain- 과 medium chain-이 있는데, long chain-fatty acid thiokinase(EC 6.2.

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0418-530-1352 (팩스) 0418-530-1350

1.3)는 acyl CoA synthetase로 C_6-C_{20} acid에 작용하고 medium chain fatty scid thiokinase(EC 6.2.1.2)는 butyryl-CoA synthetase로 C4-C11 acid와 3-hydroxy-and 2,3- or 3,4-unsaturated acids에 작용한다. 두 효소 모두 acyl-activating enzyme으로 불리운다. acetyl CoA synthetase(EC 6.2.1.1)는 acetate를 acetyl CoA로 전환시키는 효소로 propanoate, propenoate에도 작용하는 acetate thiokinase로 acyl-activating enzyme으로도 불리운다. Acyl CoA synthetase(EC 6.2.1.3, fatty acid thiokinase)는 free fatty acid 의 COOH기를 ATP를 이용하여 CoA의 SH group과 thioester결합형성을 촉매하여 active thioester 인 acyl-CoA로 변화시키며,[12,13] 지방산 대사와 지질 생합성[14,15]에 중요한 역활을 한다. 지방산이 산화되거나 지질로 합성되기 위해서는 먼저 acyl CoA synthetase에 의해 지방산의 COOH기가 ATP존재하에서 CoA의 SH기와 thioester결합을 하여 활성화가 되어야 한다.[16,17,18] 본 실험에서는 미생물 2차 대사산물로부터 acyl CoA synthetase억제제를 찾아 지방 대사의 불균형을 치료할 수 있는 치료제[19,20]로 개발하고자 하였다. 지방산 대사를 억제하는 억제제 개발의 일환으로 acyl CoA synthetase 억제제를 생산하는 토양균을 분리하여 특성을 조사하고 억제제 생산의 최적 조건을 조사하여 전보[21]에 보고하였다. 본 연구에서는 분리한 *Bacillus* sp. B-6의 배양상등액에서 억제제를 분리, 정제하여 그 이화학적 특성을 조사하고 구조를 규명하여 보고하는 바이다.

실험방법

시약 및 기기 - 배지에 사용된 시약 및 CoA-SH, acyl CoA synthetase(from *Pseudomonas*), linoleic acid 등의 시약들은 Sigma 사에서 구입하였으며, 사용된 용매는 HPLC용으로 구입하여 그대로 사용하였다. 최종적으로 얻어진 정제 시료를 UV scanning, Infra Red spectroscopy와 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy 등을 행하였다. 50 μg의 분리된 저해물질을 클로로포름에 녹인 후, UV-visible spectrophotomer(Jasco V550 spectrophotometer)를 이용하여 자외선 흡수 스펙트럼을 얻었으며, 200 μg의 저해물질과 5 g의 KBr을 혼합하여 pellet maker를 통해 pellet을 형성시킨 후에 4,000~400 cm^{-1}의 적외선 범위내에서 IR spectrophotometer(Perkin Elmer 1710)를 이용하여 저해물질의 적외선 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 분리된 저해물질의 분자량 결정은 Kantos MS 25 RFA Mass 기기를 이용하였고, 저해물질을 $CDCl_3$에 녹여 JEOL JNH-GSX 400 NMR spectrometer(400 MHz)로 NMR분석을 하였다. 이때 내부표준물질로는 TMS(tetramethylsilane)를 사용하였다.

사용 균주 및 사용 배지 - 전보[21]에서 보고한대로 토양에서 분리하고 동정한 *Bacillus* sp. B-6를 사용하였다. 균주는 한천 배지에 접종하고 계대 배양하여 4°C에 보관하였다. 종균 배양은 glucose 0.1%, starch 2.4%, peptone 0.3%, meat extract 0.3%, yeast extract 0.5%, $CaCO_3$ 0.4%(pH 7.0)가 되도록 배지를 만들어 사용하였으며, 본 배양은 glucose 1.0%, soluble starch 1.0 %, urea 0.3%, oatmeal 1.0%, parmamedia 1.0%, basic magnesium carbonate 0.5%(pH 7.5)을 함유한 배지를 사용하였으며 30°C에서 7~8일간 배양하였다.

저해 활성 측정 - 150 mM tris-HCl buffer(pH 7.4)에 0.25 mg Triton-X 100, 2 mM EDTA, 50 mM $MgCl_2$, 20 mM ATP, 300 μM CoA-SH, 억제제와 0.1 unit의 Acyl CoA synthetase를 전체 부피 0.25 m*l*이 되게한 후 37°C에서 30분간 preincubation하였다. 그 후 200 μM의 sodium linoleic acid를 첨가하고 37°C에서 10분간 preincubation한 다음 0.1 M의 potassium phosphate buffer(pH 8.0)에 녹인 0.5 mM의 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 0.75 m*l*를 첨가한 후에 413 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control은 반응 마지막에 효소를 첨가하였다. 이러한 조건하에서의 CoASH의 molar extinction coefficient[11]는 1.36 ×104 cm^{-1}로 알려져 있다.

억제 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition}\,(\%) = \left(1 - \frac{A_{con} - A_{sample}}{A_{con} - A_{sup}}\right) \times 100$$

A_{con} : control, A_{sup} : 억제제를 녹인 용매를 첨가한 반응액의 반응 후의 흡광도,

A_{sample} : 억제제를 첨가한 반응액의 반응 후의 흡광도.

Acyl CoA 합성 효소 억제 물질의 정제

전보[21]의 acyl CoA 합성효소 억제물질의 분리를 위한 예비 실험에서 corn steep liquor를 함유한 acyl CoA 합성효소 억제물질 생산 배지에 *Bacillus* sp. B-

6를 배양한 경우에는 배지의 색의 변화가 없었으나, corn steep liquor대신 NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$나 urea를 첨가한 배지의 경우에는 5~6일 째부터 배지의 색이 녹색으로 변하였다. 또한 녹색으로 변한 배지의 상등액으로 항균력 검사를 한 결과, *Candida albicans*에 대한 항균력도 급증하였고, corn steep liquor를 질소원으로 사용한 경우에는 유기 용매에 대한 추출성을 비교한 결과, 부탄올 추출액에서 항균력과 효소 억제 활성이 최대였으나, 이와는 달리 NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$나 urea를 질소원으로 첨가한 배지의 경우에는 클로로포름 추출액에서 항균력과 acyl CoA 억제 활성이 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서는 녹색으로 변한 균주 배양액을 원심분리하여 얻어진 상등액을 클로로포름과 3 : 1의 비율로 하여 3회 추출한 후 감압 농축하였다. 농축된 클로로포름 추출액을 클로로포름 : 아세톤(5 : 1)로 미리 평형시킨 Silica gel column(2.8×50 cm)에 흡착시킨 후에 동일 용매로 용출한후 클로로포름 : 메탄올 (10 : 1)로 이어서 용출하였으며 50 m*l*/hr의 속도로 5 m*l*씩 분획하였으며, 효소 억제 활성이 높은 분획을 모아 감압농축하였다. Silica gel chromatography를 거쳐 농축된 활성 용액을 silica gel이 피막된 plate(Kiesel gel 60 F 254)에 점적한 다음 클로로포름-메탄올(10 : 1)로 전개하여 잘 말리고 활성이 확인된 Rf 0.77부근의 silica plate를 일정 간격으로 spatular로 잘 긁어내어 클로로포름으로 추출하여 감압 농축하였다.

MIC 측정 - 정제된 억제물질을 600~0.2 μg/m*l*의 농도 범위로 dimethylsulphoxide-phosphate buffered saline, pH 7.4(5 : 95)에 희석한 후에 agar diffusion 방법으로 식물 병원성 곰팡이를 비롯한 9종의 시험균에 대한 생육저지 최소농도(MIC)를 측정하였다.

Acyl CoA 합성 효소의 억제활성의 dose-response curve 작성 - 정제된 억제 물질을 평량하여 1.0 μg에서 1,000 μg까지 변화시켜 acyl CoA 합성 효소의 억제 활성 정도를 측정한 후에 억제제의 양에 따른 억제 활성 정도를 dose-response curve로 작성하였다.

Acyl CoA 합성 효소 억제 물질의 이화학적 특성 조사

용해도 및 안정성 - Acyl CoA 합성 효소 억제 물질의 용해도 및 안정성은 시료를 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, water 등의 용매에 녹인 후, 각각 4°C와 50°C에서 하루 방치한 후에 잔존 활성을 조사하여 결정하였으며 100°C에서 15분 가열한 후 식혀서 잔존활성을 조사하여 온도에 대한 안정성을 조사하였다. pH에 대한 안정성은 억제제를 녹인 용액을 pH 2, 7, 10으로 한후 4시간 후에 중화시켜 억제 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

Acyl CoA 합성 효소 억제 물질의 생산과 정제

Bacillus sp. B-6균주를 urea를 함유한 억제제 생산 배지에 30°C에서 7일간 배양후 10 liter의 균액을 8,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 원심분리한 균체를 acetone 추출을 행한 결과 acyl CoA 합성효소 억제 활성을 가지는 물질이 균체내부에는 존재하지 않고 배양상등액에서만 발견되었으며, pH 6.0~9.0에서 안정하고 pH 2.0 에서 그 활성을 완전히 상실하였다. 온도 안정성을 검토한 결과 100°C에서 15분 가열 후 식혀서 활성을 조사한 결과 65%의 활성이 남아 있었다. 억제제를 분리하기 위하여 배양상등액을 클로로포름과 3 : 1의 비율로 섞어 추출하여 감압증류하여 녹색의 물질을 얻었다. 이것을 silica gel 칼럼에 흡착후 클로로포름 : 아세톤(5 : 1)으로 용출시켜 Rf 치가 높은 물질을 얻고 이어서 클로

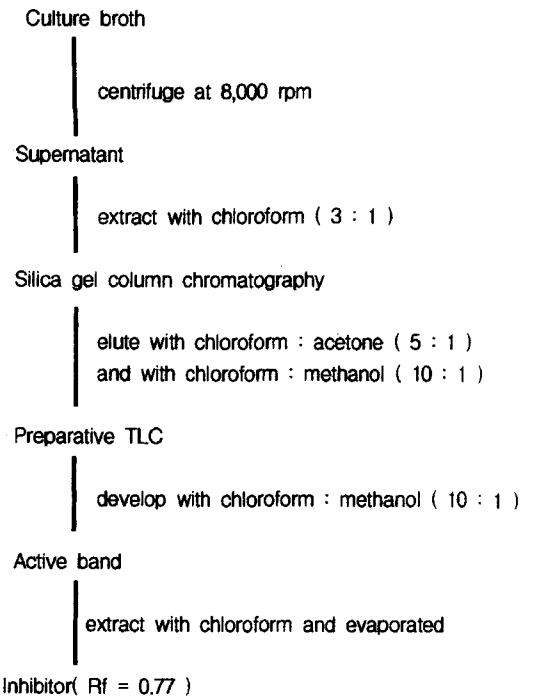


Fig. 1 — Purification Steps of acyl CoA synthetase inhibitor from *Bacillus* sp. B-6.

Table I—MIC values of acyl CoA synthetase inhibitor

Test organism	MIC (μg/ml)
Candida albicans	8
Botrytis cinerea	10
Saccharomyces cerevisiae	10
Staphylococcus aureus	18
Micrococcus luteus	18
Klebsiella pneumoniae	16
Salmonella typhimurium	18
Pseudomonas aeruginosa	16
Escherichia coli	34

로포름 : 메탄올(10 : 1)로 용출시켜 Rf치가 낮은 물질을 얻었다. 이중에서 Rf치가 높은 분획이 억제 활성이 높아 이것을 감압증류후 silica gel plate에 점적하고 클로로포름 : 메탄올(10 : 1)로 전개시킨 결과 Rf치가 0.77, 0.53인 두 개의 물질이 분리되었으며 이중에서 억제 활성이 높은 것으로 나타난 Rf치가 0.77인 것을 spatular로 긁어 클로로포름으로 추출후 감압 증류하여 구조 결정을 하였다 Fig. 1과 같은 정제 과정을 거쳐 acyl CoA 합성 효소 억제 활성을 갖는 물질을 순수 분리하여 KJH-1-133-D로 명명하였으며 노란색의 분말이었다. 전보에서 질소원에 따른 항균력을 비교해 본바 NH_4-NO_3를 질소원으로 이용하였을 경우에는 항균력이 나타나지 않았으므로, 항균력을 나타내는 이 노란색 물질의 생산에 관여하는 효소의 활성에 NH_4NO_3가 어떠한 영향을 미치는지 연구되어야 할 것이다.

억제 물질의 생물학적 특성 – 식물 병원성 곰팡이를 비롯한 여러 시험균에 대한 정제된 효소 억제제의 MIC 값을 Table I에 나타내었다. 분리한 이 억제물질이 여러 bacteria에 대해서도 항균 활성을 보였으며, *Candida albicans*와 *Botrytis cinerea*와 같은 곰팡이에도 억제 활성을 보이는 것으로 나타났다. 특히 *Botrytis cinerea*는 사과, 배, 토마토 등의 수확후 저장중에 흔히 발생하는 잿빛 곰팡이병을 야기하는 것으로 알려져 있으므로, 분리한 억제 물질이 미생물 농약으로의 사용가능성에 관한 연구가 필요할 것으로 본다. Dose response curve를 Fig. 2에 나타내었으며, 억제제의 양에 따라 100 μg/ml까지는 효소 억제 활성이 비례적으로 증가되었으며 IC_{50}는 42 μg/ml로 나타났다.

억제 물질의 이화학적 특성 및 구조 결정 – 분리된 억제 물질의 이화학적 특성을 Table II에 나타내었다. 분리된 억제 물질은 노란색 분말로 melting point는 238°C였고, Benzene, ethyl acetate ethanol, chloroform, DMSO, acetonitrile, acetone에 잘 녹았고 methanol, hexane, 물에는 용해되지 않았다. 분리된 억제 물질은 UV 247 nm, 362 nm에서 최대 흡수파장을 보였으며, IR spectrum에서는 3400 cm^{-1}에서 carboxyl 산에 의한 흡수를 보여주며, 3000 cm^{-1}의 흡수는 aromatic C-H bond를 나타낸다. 또한 1640, 1430, 1400 cm^{-1}의 흡수대로 부터 aromatic C-C, C-N bond의 존재를 알 수 있었다. Mass spectrum으로부터 base peak는 180, molecular peak는 224임을 확인하였다. ^{1}H-NMR spectrum에서 15.50 ppm의 singlet은 CO-OH group을, 8.98~7.97 ppm부근에서 7개의 aromatic proton signal을 각각 관찰할 수 있었다. ^{13}C-NMR spectrum에서는 165 ppm에서 C=O group 탄소의 signal이, 145~125 ppm에서 aromatic 탄소의

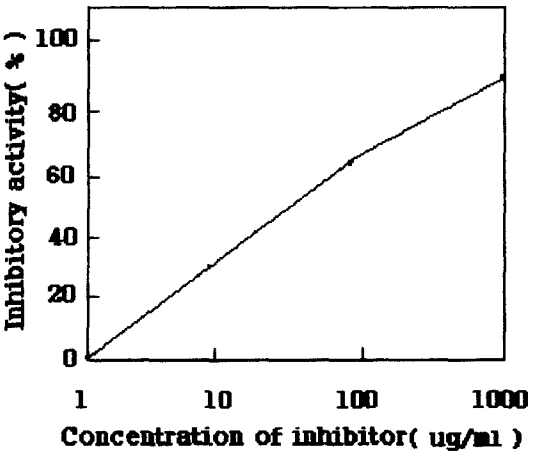
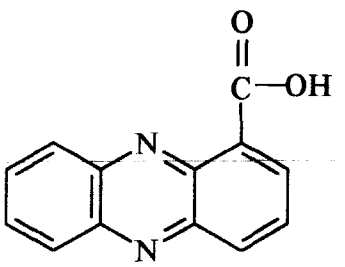


Fig. 2—Dose response curve of acyl CoA synthetase inhibitor from *Bacillus* sp. B-6. Different concentration of acyl CoA synthetase inhibitor from *Bacillus* sp. B-6, was added in the acyl CoA synthetase inhibitor assay mixture and the inhibitory activity was measured.

Table II—Physico-chemical properties of the acyl CoA synthetase inhibitor from *Bacillus* sp. B-6

Nature	Yellow powder
UV λmax nm	247 nm, 362 nm (in chloroform)
Melting point	238°C
Molecular weight	224
Molecular formular	$C_{13}H_8N_2O_2$
TLC Rf. value*	
EtoAc : Benzene (2 : 8)	0.43
EtoAc : Benzene (1 : 1)	0.68
$CHCl_3$: Methanol (10 : 1)	0.77
Solubility, soluble	Benzene, $CHCl_3$, Ethyl acetate
insoluble	H_2O, n-hexane, methanol

* Precoated silica gel plate (Merck)



Phenazine-1-carboxylic acid

Fig. 3 — Proposed structure of acyl CoA synthetase inhibitor from *Bacillus* sp. B-6.

signal이 관측되었다. 이상에서 열거한 이화학적 특성과 기기분석 결과들을 종합하여 볼 때, KJH-1-133-D는 $C_{13}H_8N_2O_2$의 화학식을 가지는 phenazine-1-carboxylic acid[22](PCA)로 추정되었으며 문헌[23]에 수록된 phenazine-1-carboxylic acid와 각종 spectrum data가 일치하여 그 구조를 phenazine-1-carboxylic acid로 동정하였다(Fig. 3). Phenazine-1-carboxylic acid는 밀의 뿌리에 병을 유발하는 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*의 생육을 억제하는 중요한 항생물질로 알려져 왔으며 *Pseudomonas*에서 생산되는 것으로 보고되었다.[24] 본 연구에서는 *Bacillus subtilis*균종에서 PCA가 생산되었으며 *Candida albicans*에 대해 항균력을 가지며 acyl CoA 합성 효소 억제 효과를 갖는 것으로 나타났다. 앞으로 PCA의 acyl CoA 합성 효소 억제 기작을 연구하고 새로운 억제제의 개발을 위하여 유도체들을 합성하여 억제 활성을 증가시키는 쪽으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 본다. 또한 PCA의 생합성[24,25]에 관여하는 효소에 관하여 현재까지는 shikimic acid pathway에 관여하는 효소와 유사한 것으로 추측하고 있을 뿐 아직 정확하게 밝혀지지 않았으므로, 이에 관한 생화학적 연구를 수행하고 PCA의 생산을 증대시키는 방법에 관한 연구를 앞으로 계속할 예정이다.

결 론

미생물 대사산물로부터 acyl CoA 합성효소 억제물질 탐색 연구를 수행하던 중 *Candida albicans*에 항균력을 가지며 acyl CoA 합성 효소에 강한 억제 활성을 가지는 물질을 생산하는 *Bacillus* sp. B-6균을 선별하여 무기 질소원을 변형시켜 조사한 바 urea, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl을 사용한 배지에서 녹색으로 배지가 변하는 것을 관찰하였으며, 이 조건하에서 균주 배양액의 클로로포름 추출액에서 *Candida albicans*에 대한 항균활성이 높고 acyl CoA 합성효소 억제 활성이 높은 물질을 분리, 정제하여 이화학적 특성을 조사하고 구조 분석을 행하였다. 균배양액으로부터 클로로포름 추출, silica gel column chromatography와 preparative TLC를 통하여 억제물질을 순수 분리하였으며, UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR 등의 기기분석을 한 결과 phenazine-1-carboxylic acid로 동정하였다.

문 헌

1) Kawaguchi, A., H. Tomoda, J. Awaya, S. Omura and S. Okuda : Cerulenin resistance in a cerulenin producing fungus. Isolation of cerulenin resistant fatty acid synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* **197**, 30 (1979).

2) Omura, S. : The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. *Bacteriol. Rev.* **40**, 681 (1976).

3) Omura, S. : Cerulenin. *Methods Enzymol.* **72**, 520 (1981).

4) Omura, S., Y. Iwai, A. Nakagawa, R. Iwata, Y. Takahashi, H. Shimizu and H. Tanaka. : Thiotetromycin, a new antibiotic. Taxonomy, production, isolation, and physicochemical and biological properties. *J. Antibiot.* **36**, 109 (1983).

5) Omura, S., H. Tomoda, Q.-M. Xu, Y. Takahashi and Y. Iwai : Triacsin, new inhibitors of acyl CoA synthetase produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **39**, 1211 (1986).

6) Tomoda, H., K. Igarashi and S. Omura : Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsins. *Biochim. Biophys. Acta* **921**, 595 (1987).

7) Omura, S., H. Tomoda, H. Kumagai, M. D. Greenspan, J. B. Yodkovitz, J. C. Chen, A. W. Alberts, I. Martin, S. Mochals, R. L. Monaghan, J.C. Chabala, R.E. Schwartz and A.A. Patchett: Potent inhibitory effect of antibiotic 1233A on cholesterol biosynthesis which specifically blocks 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. *J. Antibiot.* **40**, 1356 (1987).

8) Powell, G. L., P. S. Tippett, T. C. Kiorpes, J. McMillin-Wood, K. E. Coll, H. Schultz, K. Ta-

naka, E. S. Kang and E. Shrage : Fatty acyl-CoA as an effector molecule in metabolism. *Fed. Proc.* **44**, 81 (1985).

9) Tanaka, H. K. Yoshida, Y. Itoh and H. Imanaka : Stadies on new vasodilators, WS-1228A and B. I. Discovery, taxonomy, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **35**, 157 (1982).

10) Wakil, S. and J. K. Stoops : Structure and mechanism of fatty acid synthetase. In: The Enzymes(Boyer, P.D., ed.), pp.3-61, Academic Press, New York (1983).

11) Bartana, J., G. Rose and B. Shapiro : The purification and properties of palmitoyl Coenzyme A synthetase. *Biochem J.* **122**, 353 (1971).

12) Grayson, N. A., and R. B. Westerkaemper : Stable analogs of adenylates. Inhibition of acety- and acyl CoA synthetase by adenosine 5′-alkylphosphates. *Life Science*, **43**, 437 (1988).

13) Massaro, E. J. and W. J. Lennarz : The partial purification and characterization of a bacterial fatty acyl Coenzyme A synthetase. *Biochemistry*. **4**(1), 85 (1965).

14) Bar-Tana, J., G. Rose and B. Shapiro : The purification and properties of microsomal palmitoyl-Coenzyme A synthetase. *Biochem. J.* **122**, 353 (1971).

15) Tomaszwski, K. E. and R. L. Melnick : In vitro evidence for involvement of CoA thioesters in peroxisome proliferation and hypolipidaemia. *Biochimica et Biophisica Acta*. **1120**, 118 (1992).

16) Tomoda, H., K. Igarash, J. C. Cyong and S. Omura : Evidence for an essintial role long chain acyl CoA synthetase in animal cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **266**(7), 4214 (1991).

17) Vandel Heuvel, J. P., P. F. Sterchele, D. J. Nesbit and R. E. Peterson : Coordinate Indction of acyl CoA binding protein, fatty acid binding protein and peroxysomal β-oxidation by peroxysome proliferators. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1177**, 183 (1993).

18) Grimaldi, P. A., S. M. Knbel, R. R. Whitesell and N. A. Abumrad : Induction of a P2 gene expression by nonmetabolized long-chain fatty acids. *Proc. Natl. Acid. Sci. USA*, **89**, 10934 (1992).

19) Hayashi, M., Y. Imai, H. Tomoda, S. Omura and S. Oh-ishi : Enhanced producion of platelet-activating factor in stimulated rat leukocytes pretreated with triacsin C, A novel acyl CoA synthetase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res.Commun.* **188**(3), 1280 (1992).

20) Abdel, A. S., J. Youssef, M. Badr, P. Morgan and C. Frangkis : The inhibition of long-chain fatty acid acyl -CoA synthetase by enoximone in rat heart mitochondria. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **19**(6), 899 (1992).

21) 김경자, 김태성 : Acyl CoA 합성 효소 억제제를 생산하는 토양균의 분리 및 특성 연구. 약학회지, **40**(6), 713 (1996).

22) Linda, S. T., M. W. David, F. B. Robert ans S. P. Leland : Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas species* in the rhizosphere of wheat. Appl. *Environ. Microbiol.* **56**(4), 908 (1990).

23) Pouchert, C. J. : The Aldrich Library of NMR Spectra. Edition II, Aldrich, Mil Waukee (1983).

24) Hollstein, U. and L. Marshall : Biosynthesis of Phenazines. *J. Org. Chem.* **37**(22), 3510 (1972).

25) Hollstein, U. and D. McCamey : Biosynthesis of Phenazines. II. Incorporation of [6-^{14}C]-D-Shikimic acid into Phenazine-1-carboxylic Acid and Iodinin. *J. Org. Chem.* **38**(19), 3415 (1973).