

## Phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola* SW-3가 생산하는 항암활성 물질의 분리 정제

나여정 · 이방숙<sup>1</sup> · 남궁성건<sup>1</sup> · 정동선\*  
서울여자대학교 식품·미생물공학과, <sup>1</sup>화학과

**Isolation and Purification of an Antitumor Metabolite from *Alternaria brassicicola* SW-3, the Cause of Brassica Black Leaf Spot Disease. Na, Yeo-Jung, Bang Sook Lee<sup>1</sup>, Sung Keon Namgoong<sup>1</sup>, and Dong-Sun Jung\*.** Department of Food and Microbial Technology and <sup>1</sup>Department of Chemistry, Seoul Women's University, Seoul, 139-774, Korea – An antitumor substance was purified from the culture filtrate of phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola* SW-3 isolated from soil of a chinese cabbage patch, and its characteristics were investigated. Antitumor activity of *A. brassicicola* SW-3 was measured by MTT assay. The cytotoxic activity against human cancer cell line was detected in the culture filtrate of *A. brassicicola* SW-3, but no activity found in mycelium. Antitumor substance was isolated from the culture broth by ethyl acetate extraction and purified by silica gel column chromatography. Structure of the purified compound was analyzed by the instrumental analysis such as <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and IR spectroscopy. The purified fungal metabolite of an *A. brassicicola* SW-3, consists of 11 carbon chain with two hydroxyl groups and two epoxides which is identical to depudecin. The IC<sub>50</sub> values of the active compound identified as depudecin were 69 µg/mL and 57 µg/mL against mouse melanoma B16BL6 cell line, and human hepatoma SK-HEP1 cell line, respectively.

**Key words:** *Alternaria brassicicola*, Fungal metabolites, Antitumor activity, Depudecin

자연계에 널리 분포해 있는 미생물은 이루 헤아릴 수 없을 만큼 다양한 대사산물을 생산하고 있으며, 우리에게 알려지지 않은 것도 무수히 많다. 각종 생리활성물질이 방선균과 곰팡이, 세균 등의 미생물에 의해 생산되고 있으며, 시판되고 있는 항생제의 60% 이상이 방선균에 의해 생성되어, 방선균은 생리활성물질 생성균의 주요 탐색대상이 되고 있다[1]. 그러나 최근에는 곰팡이의 대사산물인 Rhizoxin[2], Cytochalasin E[3], Apicidin[4] 등의 mycotoxin에 의한 암세포의 성장 억제 및 신규혈관생성(angiogenesis) 저해효과가 보고되어 새로운 항암제 개발의 대상으로 부각되고 있다. 미생물의 대사산물은 선도물질(lead molecule)로 이용되어 새로운 항암제로 개발할 수 있으며[5], 특히 곰팡이가 생산하는 mycotoxin은 화학적으로 다양한 종류가 생산되므로 강력한 항암제 또는 새로운 항암활성을 갖는 유도체를 합성하기 위한 선도물질로 이용될 가능성이 높다.

*Alternaria* 속의 곰팡이는 과일과 채소에 널리 분포하고 있는 식물병원균으로서, 다양한 phytotoxins과 mycotoxins을 생산하며[6], 특히 *Alternaria*가 생산하는 대사산물 중에는 돌연변이를 유발하는 독소와 만성적인 독성을 나타내는

것으로 알려져 있으며[7]. *Alternaria*속이 생산하는 유용한 대사산물에 관한 연구보고는 소수에 불과하다. Ciegler 등은 127종의 *Alternaria*를 검색하여 86종이 항생물질 생성능이 있는 것으로 보고하였으며, *Alternaria brassicicola*가 생산하는 항생물질을 분리하여 brassicicolin A로 명명하였다[8]. Brassicicolin A는 수종의 fungi와 세균에 대한 antimicrobial activity를 나타내는 것으로 보고하였으나, 후속연구는 최근까지 보고된 것이 거의 없다. 그러나 1992년에 일본 Matsumoto 등은 *Alternaria brassicicola* 배양액에서 v-ras and v-src oncogenes에 의해 transformed된 NIH3T3 fibroblasts를 정상으로 복귀시키는 대사산물을 분리하고, depudecin으로 명명하였다[9]. Depudecin은 또한 anti-angiogenetic activity를 지니고 있으며[10] 새로운 항암제로서의 가능성이 부각되어[11,12], depudecin의 생합성 및 화학합성을 위한 연구가 진행되고 있다[13,14].

그러나 국내에서는 *Alternaria*속 곰팡이를 대상으로 항암효과를 검색하여 신물질을 탐색하고자 하는 연구는 거의 이루어지지 않고 있으며, 우리 고유의 미생물을 대상으로 새로운 항암활성물질을 탐색하기 위한 연구가 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 국내 미생물로부터 새로운 생리활성물질을 얻기 위한 기초연구로서, 국내 토양에서 분리한 식물병원성 곰팡이인 *Alternaria brassicicola*의 배양액에서 항암활성을 확인하고, 활성물질을 분리 정제하여 구조와 특

\*Corresponding author  
Tel. 822-970-5637, Fax. 822-970-5639  
E-mail: dsjung@swu.ac.kr

성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

*Alternaria brassicicola* SW-3는 경기도 포천군 이동면 노곡리 지역의 배추밭 토양에서 분리된 배추의 검은무늬 반점을 일으키는 식물병원균으로서, potato dextrose agar (PDA, Difco Co. USA) 사면배지에 접종하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

### 재료 및 시약

세포주 배양에 필요한 배지성분인 RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA, penicillin/streptomycin은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 Aldrich Chem. Co, DMSO (dimethylsulfoxide)는 Sigma Chem. Co.(USA)에서 구입하였으며, 시료 추출을 위한 용매나 기타 시약은 특급품 이상을 사용하였다.

### 곰팡이의 배양

*Alternaria brassicicola* SW-3는 PDA 사면배지에 계대 배양하여 포자를 충분히 생성시킨 후, 멸균한 0.05% Tween 80을 함유한 생리식염수를 가해 포자현탁액을 만들었다. 포자현탁액은 seed culture 배지(glucose 0.5%, polypepton 0.5%, beef extract 0.5%, yeast extract 0.25%, NaCl 0.25%) 100 ml를 함유한 300 ml-삼각 플라스크에  $3 \times 10^8$  conidia/ml의 농도로 접종하여, 28°C의 shaking incubator (100rpm)에서 48시간 동안 배양하여 종배양액을 만들었다. 대사산물 생성을 위한 본배양은 Potato dextrose broth 250 ml을 함유한 1L 플라스크에 종배양액을 30 ml씩 접종한 후, 15°C의 shaking incubator(200 rpm)에서 2주 동안 배양하였다.

### 대사산물의 분리 및 정제

토양에서 분리한 *Alternaria brassicicola* SW-3를 potato dextrose 배지에서 15°C, 200 rpm에서 2주간 배양한 후, 배양 여액과 균사체의 항암활성을 측정하였다.

항암활성이 확인된 곰팡이 배양액은 여과와 원심분리에 의해 배양 상등액을 분리하여 2배 volume의 ethyl acetate로 추출하고, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시켜 celite로 여과한 후, 여액을 감압 농축하여 crude extract를 얻었다. Crude extract는 chloroform에 용해시킨 후 silica gel column에 분주하고, chloroform-methanol(15:1) 혼합액으로 용출하여 활성분획을 분리하였다. 활성분획은 소량의 ethyl acetate에 녹인 후 2차 silica gel column에 분주하고, 전개 용매는 ethyl acetate-hexane(2:1) 혼합액으로 용출하여 단일 성분을 분리

하였다(Fig. 1).

활성물질의 확인은 TLC-precoated silica gel 60F254 plate(Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, 전개용매는 chloroform-methanol(15:1) 혼합액을 사용하였다. 전개 후 자외선 하에서 활성 물질의 spot을 확인하고, 7% phosphomolybdic acid 용액을 분무하여 spot을 발색시켰다.

### 활성물질의 구조분석

용매추출 및 silica gel column chromatography에 의해 정제된 대사산물은 Infra Red spectroscopy(Midac, PRS-INT), Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy(Bruker, Avance 500) 등의 기기 분석법을 통하여 구조를 결정하였다.

### 암세포주의 배양

인체 간암세포주인 SK-HEP1(KCLB 30052)와 mouse melanoma 세포주인 B16BL6(KCLB 80006)은 한국세포주 은행에서 구입하여 사용하였다. SK-HEP1과 B16BL6은 RPMI 1640에 10%(v/v) fetal bovine serum을 혼합한 배지에 100unit의 streptomycin/penicillin을 첨가한 후 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. 세포의 상태는 현미경으로 관찰하여 생육상태를 확인하고 사용하였다.

### 세포독성 측정

Fungal metabolite의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다[15]. 96 well plate의 각각의 well에 암세포를  $1 \times 10^4$  cells 농도로 첨가한 뒤 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 시료는 DMSO에 용해한 다음 RPMI-1640 배지를 이용하여 일정농도로 희석하여 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 반응시킨 후 MTT 용액(5 mg/ml)을 20  $\mu\text{l}$ 씩 처리하여 4시간 동안 배양

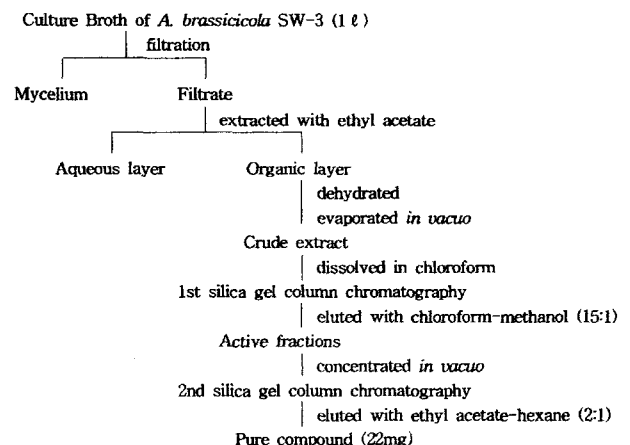


Fig. 1. Schematic diagram for the isolation and purification of cytotoxic fungal metabolite produced by *A. brassicicola* SW-3.

하여 formazan을 형성시켰다. 각 well에 DMSO 200  $\mu$ l씩 첨가하여 침전물을 완전히 용해한 후, ELISA reader(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 암세포의 증식도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 시료의 용매를 첨가한 것으로 하였으며, 성장 억제율(Growth inhibition(%))=[(대조구의 흡광도-시료 처리구의 흡광도)/대조구의 흡광도]  $\times$  100을 구하여 세포독성의 지표로 하였다. 암세포 성장을 대조군에 비하여 50% 억제하는 시료의 농도를 IC<sub>50</sub>으로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

*Alternaria brassicicola* SW-3의 배양 및 대사산물 확인

*A. brassicicola* SW-3는 potato dextrose agar 사면배지에 보관하며, 사용하기 직전에 계대 배양하여 포자를 생성시킨 후 종배양액을 만들어 사용하였다. *A. brassicicola*가 생산하는 항암활성물질을 얻기 위하여, 종배양액을 potato dextrose broth에 접종하고, 15°C에서 2주 동안 200rpm으로 shaking하며 배양하였다.

균사체와 배양액의 항암활성을 측정하기 위하여, 배양액을 제거한 균사체를 methanol 또는 ethyl acetate로 추출한 후, 불용성 성분들을 여과하고 여액을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조, 여과하여 농축한 다음 항암활성을 측정한 결과, 균사체에서는 항암활성이 나타나지 않았다(data not shown). 그러나 균사체를 제거한 배양액을 ethyl acetate로 추출하여 얻은 용매 추출물에서는 항암활성이 확인되었다.

*A. brassicicola* SW-3에 의한 항암활성 물질 생산을 위한 배양조건을 조사하기 위하여, 배양온도를 달리하여 배양한 곰팡이의 배양액을 ethyl acetate로 추출하여 얻은 생성물(crude extract)을 이용하여 인체 간암세포주(SK-HEP1)에

대한 생육억제 정도를 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 활성물질 생산을 위한 배양온도는 *Alternaria*의 생육적 온도인 28°C 보다 낮은 온도인 15°C에서 2주 동안 배양한 생성물에 의한 세포독성은 250 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 58%의 저해효과가 나타났으며, 배양온도가 높아질수록 생성물의 세포독성이 낮아져 20°C에서는 50% 정도의 저해효과가 있었으나 배양기간 중 온도변화에 아주 민감하게 반응하여 생성량이 달라졌다. 25°C와 30°C에서는 배양기간에 관계없이 활성이 아주 낮은 것으로 나타났다. 그러나 10°C 이하의 온도에서는 생육이 매우 느리기 때문에 대사산물의 생산을 위한 온도는 15°C 또는 20°C의 온도가 적당한 것으로 나타났으며, 대사산물의 생산은 배양온도의 fluctuation에 의해 영향을 받을 뿐만 아니라, 배양기간과 포자의 상태 등에 의해 민감하게 변화하는 것으로 나타났기 때문에 배양온도는 15°C에서 2주로 하였다.

*Alternaria brassicicola* SW-3가 생산하는 대사산물의 분리정제

*A. brassicicola* SW-3 배양액을 ethyl acetate로 추출한 후 감압농축시켜 230 mg의 crude extract를 얻었다. 용매추출물은 silica gel TLC 상에서 약 5종류의 화합물이 관찰되었으며, silica gel column chromatography(chloroform:methanol, 15:1)를 수행하여 2 종류의 활성 분획물을 얻었으며, 이들의 생성비율은 배양 조건에 따라 다른 것으로 나타났다. 두 가지 분획물 중에서 한 가지(분획물 II, R<sub>f</sub>=0.37)는 세포독성이 없었으나, 분획물 I(R<sub>f</sub>=0.25)은 세포독성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 세포독성이 있는 분획물 I은 다시 silica gel column(ethyl acetate:hexane, 2:1)로 분리하여 22 mg의 단일성분을 얻었다.

*A. brassicicola* SW-3 배양액으로부터 분리 정제한 항암활성 대사산물은 무색의 oily한 물질로서, 물이나 hexane에는 녹지 않고, chloroform, ethyl acetate, ethanol 등에는 잘 녹는 특징을 나타내었다(Table 1).

*A. brassicicola* SW-3에서 분리, 정제한 대사산물의 구조를 분석하기 위하여 FT-IR과 <sup>1</sup>H NMR 및 <sup>13</sup>C NMR spectroscopy 등의 기기 분석을 실시하였다. 정제된 대사산물을 IR로 측정된 결과 Fig. 3과 같이 3440 cm<sup>-1</sup>에서 OH

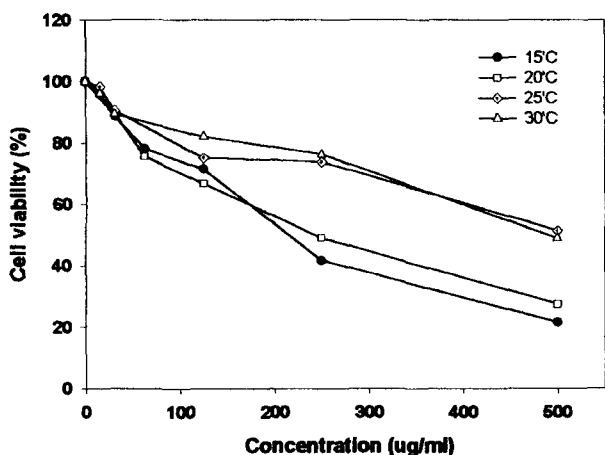


Fig. 2. Effect of growth temperature of *A. brassicicola* SW-3 on production of cytotoxic metabolites (crude extract) against human hepatoma SK-HEP1 cell line.

Table 1. Physico-chemical properties of the active compound isolated from *Alternaria brassicicola* SW-3

Appearance		Colorless oily paste
Molecular formula		C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>
Molecular weight		212.25
Solubility	Soluble	Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethanol Methanol, Methylene chloride
	Insoluble	Chloroform, Ethyl acetate H <sub>2</sub> O, Ether, Hexane

기의 peak를, 1602 cm<sup>-1</sup>에서 aliphatic CH 기의 peak를 확인하였다. <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼을 측정한 결과, Fig. 4에 나타난 것과 같이 5.93 ppm에서 methine proton 이 관찰되었고 5.69 5.70 ppm에서도 <sup>2</sup>H분의 methine proton이 관찰되었다. 5.39, 5.29 ppm에서는 methylene proton이 관찰되었고 또한 10.5, 17.2 Hz의 결합상수로부터 cis와 trans의 결합 형태를 알 수 있었다. 4.11, 3.73 ppm에서는 각각의 <sup>1</sup>H 분의 proton들이 관찰되었다. epoxide가 결합한 탄소에 존재하는 proton들이 각각 3.43, 3.39 ppm에서 관찰되었고 또한 결합상수도 2.2 Hz로 일치함을 보였고 3.01, 2.91 ppm에서도 <sup>1</sup>H 분의 proton이 4.5~4.7 Hz의 결합상수를 나타냄을 알 수 있었다. 2.25, 2.10 ppm에서 broad한 peak형태의 hydroxy proton들이, 1.30 ppm에서는 doublet methyl protone이 관찰되었다. <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 136.45 ppm에서 methylene 탄소, 132.45-117.50 ppm에서는 3개의 methine 탄소, 71.96-64.54 ppm 사이에 수산기가 결

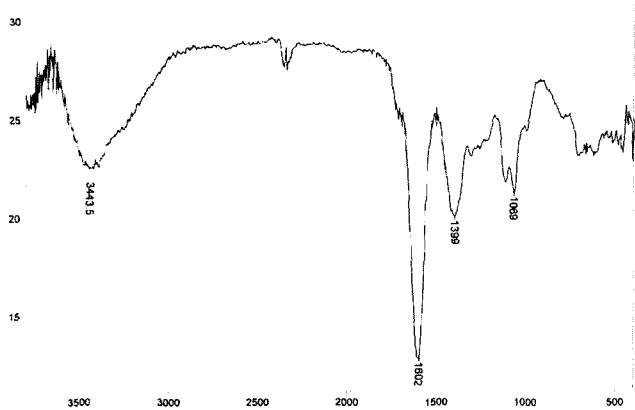


Fig. 3. IR spectrum of the fungal metabolite isolated from *A. brassicicola* SW-3 (CHCl<sub>3</sub>).

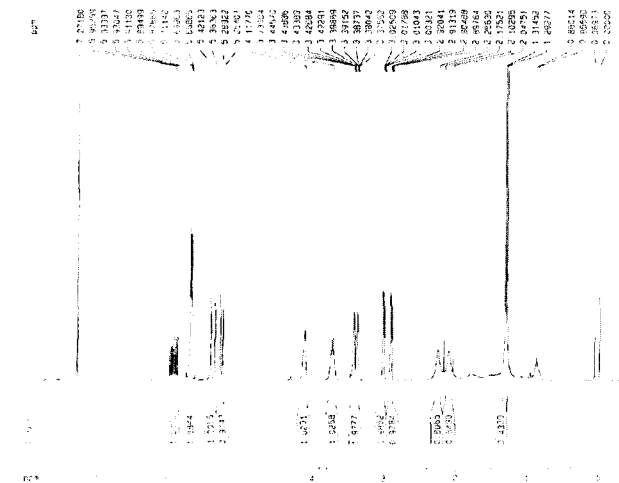


Fig. 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the purified antitumor metabolite (500MHz, CDCl<sub>3</sub>).

합된 탄소, 62.90-55.35 ppm사이에 3, 8, 4, 7번의 methine 탄소 peak를 확인하였다(Fig. 5).

이상의 결과를 토대로 구조를 추정된 결과, *A. brassicicola* SW-3에서 분리, 정제한 대사산물은 Fig. 6에 나타난 바와 같이 11개의 carbon chain에 두 개의 epoxides와 두 개의 hydroxyl group 및 두 개의 이중 결합(특히 하나는 trans-double bond)을 포함하는 화합물(C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>, MW=212.25)로서, Matsumoto[9]에 의해 처음 분리되어 (-)-depudecin으로 명명된 물질과 동일한 것으로 추정되었다.

Depudecin은 최근에 *Nimbya scirpicola*[16], *Xylaria* sp. [17]등을 사용한 연구에서도 분리, 확인된 물질로서, 생산율이 높지 않고, 합성단계 또한 복잡하여 대량생산이 이루어지지 않고 있는 연구 초기 단계의 물질이다. 따라서 분리된 물질이 기지의 물질이지만, 이는 새로운 항암제로서의 가능성이 매우 높은 물질로서[11], 유도체를 합성하거나, 다른 항암제와의 혼용에 의해 부작용이 적은 강력한 항암제를 개발하기 위한 연구재료로 활용될 수 있을 것이다. 본 연구진은 현재 depudecin을 선도물질(lead compound)로 하여 이 화합물의 functional group variation을 통하여 용해도가 높고, 보다 강력한 항암활성을 지닌 새로운 형태의 유도체를 합성하기 위한 연구를 진행 중에 있다.

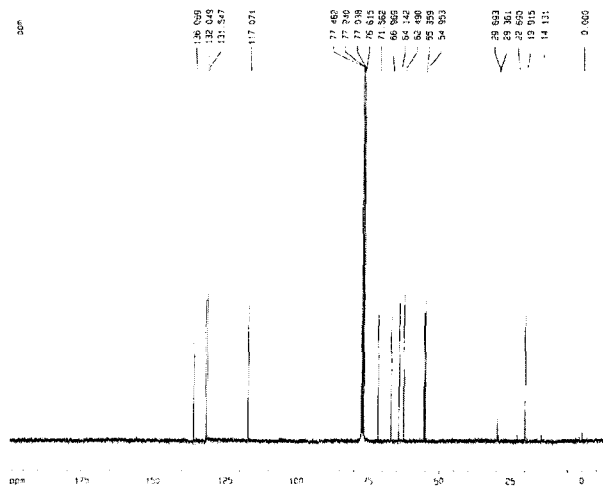


Fig. 5. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of the purified antitumor substance (500MHz, CDCl<sub>3</sub>).

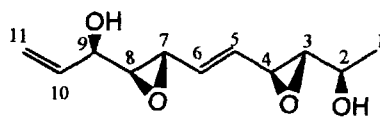


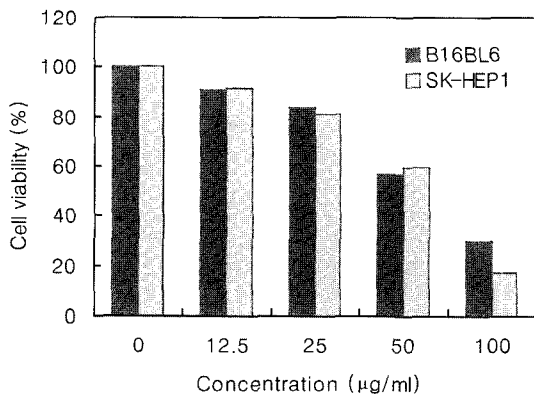
Fig. 6. Structure of the purified antitumor metabolite produced by *A. brassicicola* SW-3.

**Alternaria brassicicola SW-3가 생산하는 대사산물의 항암활성**

*A. brassicicola* SW-3가 생산하는 대사산물의 항암활성을 측정하기 위하여, 인체 간암세포인 SK-HEP 세포주와 mouse 피부암세포인 B16BL6 세포주에 대하여 MTT assay를 실시하였다.

용매 추출액(crude extract)은 인체 간암세포주에 대해서는 250 µg/ml의 농도에서 46.5%의 저해효과를 나타내었으며, mouse 피부암세포에 대해서는 44.4%의 저해효과가 나타나, 비교적 높은 농도에서 melanoma cancer cell과 hepatoma cell의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. crude extract를 silica gel column chromatography을 사용하여 얻은 활성 분획물(부분정제물)의 세포독성은 100 µg/ml의 농도에서 SK-HEP1과 B16BL6 세포주에 대한 저해효과가 57.4%, 37%로 나타나 1차 정제에 의해 세포독성이 증가한 것을 알 수 있었다.

단일물질로 분리된 활성 물질(depudecin)에 의한 암세포주에 대한 사멸정도를 측정하기 위하여 시료를 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml)로 처리하여 24시간 배양한 후 MTT assay를 실시하였다(Fig. 7). SK-HEP1의 경우, 50 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 40.4%가 저하되었고, 100 µg/ml에서는 세포가 급격히 사멸하여 83%의 저해효과를 보였다.



**Fig. 7. Inhibitory effects of the purified fungal metabolite on the growth of human hepatoma SK-HEP1 and mouse melanoma B16BL6 cell lines.**

**Table 2. Inhibitory effect of fungal metabolites on the human hepatoma carcinoma and mouse melanoma cell lines**

Sample	*IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	B16BL6	SK-HEP1
Ethyl acetate extract	450	278.7
Partially purified metabolite	130	87.8
Purified metabolite	69	57

\*The IC<sub>50</sub> is the concentration of the fungal metabolite that decreases the absorbance to 50% of the control in MTT assay.

B16BL6의 경우는, 대조군에 비해 각각의 농도에서 43.2%, 70.3%가 사멸한 것으로 나타났다.

*Alternaria* 대사산물인 depudecin의 IC<sub>50</sub>는 인체 간암세포주인 SK-HEP1 cells과 mouse melanoma B16BL6 cells에 대해 각각 57 µg/ml과 69 µg/ml으로서, *Alternaria brassicicola* SW-3가 생산한 depudecin은 피부암과 간암 세포에 대한 항암활성이 강한 것으로 나타났다(Table 2).

Matsumoto가 분리한 depudecin은 oncogenically transformed된 NIH<sub>3</sub>T<sub>3</sub> 세포의 detransformation을 유도시키고[8], antiangiogenesis activity가 있는 것으로 보고되었다[10].

본 연구에서는 국내 토양에서 분리한 phytopathogenic fungus가 생산하는 depudecin이 인체 암세포에 대한 항암활성을 지니고 있을 가능성을 *in vitro* assay를 통해 확인하였으며, 후속연구로서 실험동물을 사용한 *in vivo* assay와 depudecin의 대량생산 및 유도체 합성을 위한 연구를 수행 중이다.

**요 약**

국내 토양에서 분리한 식물성 병원균인 *Alternaria brassicicola* SW-3의 항암활성 물질 생산능을 조사하고, 활성물질을 분리 정제하여 구조를 확인하였다. *A. brassicicola* SW-3는 potato dextrose broth를 이용하여 15°C에서 2주간 진탕 배양한 다음, MTT assay를 실시하여 항암활성을 확인하였으며, 배양여액 중의 항암물질은 ethyl acetate로 추출하고, silica gel column chromatography로 정제하여 무색의 oily product를 얻었다(수율 22 mg/ml). 분리된 물질은 물이나 hexane에는 녹지 않고, chloroform, ethyl acetate, ethanol 등에는 잘 녹는 특징을 보였으며, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 등을 통해 구조를 분석한 결과, 최근에 일본에서 분리되어 항암효과가 있는 것으로 알려진 depudecin과 동일한 물질로 추정되었다. 본 실험에서 분리된 depudecin은 인체간암세포와 mouse 피부암세포에 대한 세포독성을 나타내었으며, 각각의 IC<sub>50</sub>는 57 µg/ml, 69 µg/ml로 나타났다. *Alternaria brassicicola* SW-3에 의해 생산된 물질이 기지의 물질이지만, depudecin은 아직 작용 기작이나 적용범위 등이 밝혀지지 않은 초기 연구 단계에 있는 물질로서, 새로운 항암제로서의 가능성이 매우 높아 이의 유도체를 합성하거나, 다른 항암제와의 혼용에 의해 부작용이 적은 강력한 항암제를 개발하기 위한 선도물질로 활용될 수 있을 것이다.

**감사의 말**

본 연구는 과학기술부 여대연구기반확충(과제번호 99-N6-03-01-A-01)으로 수행된 연구결과의 일부로서 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Miyadaoh, S. 1993. Research on antibiotics screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *J. Actinomycetol.* **7**: 100–106.
2. Tsuruo, T., T. OH-hara, H. Iida, S. Tsukagoshi, Z. Sato, I. Matsuda, S. Iwasaki, F. Shimizu, K. Sasagawa, M. Fukami, K. Fukuda, and M. Arakawa. 1986. Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines. *Cancer Res.* **46**: 381–385.
3. Udagawa, T., J. Yuan, D. Panigraphy, Y. H. Chang, J. Shah, and R. J. D'Amato. 2000. Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **294**: 421–427.
4. Han, J. W, S. H. Ahn, S. H. Park, S. Y. Wang, G. U. Bae, D. W. Seo, H. K. Kim, S. Hong, H. Y. Lee, Y. W. Lee, and H. W. Lee. 2000. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res.* **60**: 6068–6074.
5. Satoshi Omura. 1992. The search for bioactive compounds from microorganisms, Springer Verlag, New York.
6. King, A. D. Jr. and J. E. Shade. 1984. *Alternaria* toxins and their importance in food. *J. Food Prot.* **47**: 886.
7. Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*, biology, epidemiology and pathogenicity. APS press, St. Paul, MN
8. Ciegler, A. and A. Laxdenfelser. 1969. An antibiotics complex from *A. brassicicola*. *Experientia* **25**: 719.
9. Matsumoto, M., S. Matsutani, K. Sugita, H. Yoshida, F. Hayashi, Y. Terui, H. Nakai, N. Uotani, Y. Kawamura, K. Matsumoto, J. Shoji, and T. Yoshida. 1992. Depudecin: a novel compound inducing the flat phenotype of NIH3T3 cells doubly transformed by *ras*- and *src*-oncogene, produced by *Alternaria brassicicola*. *J. Antibiotics* **45**: 879–885.
10. Oikawa, T., C. Onozawa, M. Inose, and M. Sasaki. 1995. Depudecin, a microbial metabolite containing two epoxide groups, exhibits anti-angiogenic activity in vivo. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1305.
11. Privalsky, M. L. 1998. Depudecin makes a debut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 3335–7.
12. Kwon, H. J., T. Owa, C. A. Hassig, J. Shimada, and S. L. Schreiber. 1998. Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3356–3361.
13. Shimada, J., H. J. Kwon, Sawamura M., and S. L. Schreiber. 1995. Synthesis and cellular characterization of the detransformation agent, (-)-depudecin. *Chem Biol* **2**: 517–25.
14. Tanaka, M., T. Fujimori, and K. Nabeta. 2000. Biosynthesis of depudecin, a metabolite of *Nimbya scirpicola*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 244–247.
15. Scudiero, D. A., R. H. Shoemaker, K. D. Paul, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, and M. R. Boyd. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**: 4827–4833.
16. Tanaka, M., J. Ohra, Y. Tsujino, Y. Sawaji, and T. Fujimori. 1994. Phytotoxin produced by *Nimbya scirpicola*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 565–566.
17. Isaka, M. A. Jaturapat, W. Kladwang, J. Punya, Y. Lertwerawat, M. Tanticharoen, and Y. Thebtaranonth. 2000. Antiplasmodial compounds from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. *Planta Med.* **66**: 473–475.

(Received Oct. 8, 2001/Accepted Dec. 28, 2001)