総 説

フッ素化学における生物化学的方法

北 爪 智 哉

東京工業大学工学部生物工学科 (東京都目黒区大岡山)

Biosynthesis in Fluorine Chemistry

Tomoya KITAZUME

Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology
(Ookayama, Meguro-ku, Tokyo)

The importance of microbial behavior of halogen-containing compounds, which are hardly decomposed by microorganisms, has been recognized in living systems. Especially, in fluorine chemistry, considerable attention has been focused on the search for chiral synthetic tools for the preparation of fluorinated bioactive molecules. In this review, we wish to outline the possibility of microbial transformation of fluorinated compounds under stereocontrol.

はじめに

自然の営みの中で永い間ゆっくりと着実に繰り返されてきた炭化水素系化合物の生態サイクル系に非天然型の多種多様の化学物質が次々と送りこまれ始めたのはここ20~30年間のことである。なかでも有機ハロゲン化合物は、現在、冷媒、潤滑油、絶縁剤、可塑剤、除草剤、殺虫剤、殺菌剤などして産業界においても家庭においても重要な位置をしめている。特に、本特集号のテーマであるフッ素化合物の最先端技術分野での貢献度は大きく、需要は毎年増加しており、ファインケミカルにはなくてはならない化学物質となってきた。先進工業国として成り立つためにはこれを支える化学物質が生態系システムに取り込まれサイクルすることが不可欠と考えられる。事実、自然界では様々な元素や化学物質の循環に生物が大きな役割を果たしており、ハロゲン系物質においても生態系では生物が新しい能力を遺伝子の組みかえで獲得し、想像以上のスケールで物質変換が行われていると考えられる。この小文では、フッ素化合物の化学とバイオテクノロジーのかかわりについて、筆者らの分子のフッ素修飾と生物化学的変換を核として簡単に述べてみたい。

フルオロ酢酸の分解酵素

生態系のシステムへ散布された有機ハロゲン化合物が、土壌中の微生物により取り込まれ分解されると初めて報告されたのは30年程前であり¹⁾、1960年代に入ると脱ハロゲンを触媒する微生物酵素、デハロゲナーゼ

が発見された²⁾。フッ素修飾体であるモノフルオロ酢酸(FA)は南アフリカに生育するギブラルールという植物の有毒成分であり³⁾、TCAサイクルの阻害剤として著名な有毒性の物質である⁴⁾。唯一天然に存在するモノフルオロ酢酸の資化性菌が1960年代に、堀内⁵⁾、外村⁶⁾、Goldman^{7)~9)}らにより分離され、1980年代に非常に強固なC-F結合を加水分解する酵素が *Pseudomonas* 属の細菌から精製結晶化された^{10),11)}。この菌に対するモノハロ酸の反応速度比は、F:Cl:Br:I=100:21:14:0.03であり下式に従ってC-X結合を切断する。

このほか、FAの資化性菌としてフッ素系化合物を取り扱っている工場の近くから *Pseudomonas*^{12),13)} 2株及び *Moraxella*¹⁴⁾ 1株が分離されておりこれら細菌によるFAの代謝経路についても明らかにされている。しかしながらFA以外のフッ素化合物の生態系での挙動は全く知られていない。

有機ハロゲン化合物の生物化学的変換

一方、海産生物には多くの有機ハロゲン化合物が含まれており、このことは生合成に関連してハロゲン化反応を促進化する酵素が存在することを示唆しており、事実いくつかのハロペルオキシダーゼが見いだされている。

例えば、モノクロロジメドンから生成するジハロジメドンはクロロペルオキシダーゼ (E.C. 1.11.1.10), プロモペルオキシダーゼによるハロゲン化反応である^{14)~16)}。

ハロ酢酸デハロゲナーゼ (E.C. 3.8.1.3) と呼ばれる酵素は C-X 結合に作用し、ハロゲンを遊離する。例えば、2-ハロ酸デハロゲナーゼ (E.C. 3.8.1.2) は炭素数 4 までの L-2-ハロ酸に作用して D-2-ヒドロキシ酸を生成する^{17)~20)}。又、D,L-2-ハロ酸デハロゲナーゼという酵素は炭素数 5 までの直鎖 2-ハロ酸に立体非特異的に作用して 2-ヒドロキシ酸を生成する。このように、

ハロゲン化合物に作用するいくつかの酵素が明らかにされ、生物化学的手法による有用物質への変換が、有機ハロゲン化合物においても可能であることが示唆されている。

フッ素修飾体へと視点を移してみると生物化学的変換のいくつかの例が知られている。なかでも芳香族フッ素修飾体の酸化反応が報告されているが、合成化学的にはそれ程重要な反応は報告されておらず、むしろ分子をフッ素で修飾した場合の代謝科学の立場から興味深い例が多い。

フッ素修飾への分子設計

分子をフッ素で修飾することにより生理活性がどのように発現してくるかをしておくことは、バイオテクノロジーの立場にたって分子のフッ素修飾を行うさいに重要な因子である。もちろん、生体への取り込み、作用発現のための受容体との相互作用などの考え方は通常の炭化水素系化合物と同様である。ただし、周期表から推測されるように、フッ素は他のハロゲン元素に比較して立体的に非常に小さく水素原子に類似した立体的因子と大きな電気陰性度の特徴がある。さらに、C-F 結合エネルギーが C-H 結合エネルギーに比較して大きいことが

フッ素修飾した分子の生物体との関係の特徴あるものとしている要因である。これらの要因が、分子内の水素原子をフッ素原子で置換した化合物の立体的変化を小さくし生物体にまちがって取り込まれる ミミック 効果を生み、正常の成分と同様な代謝を受けながらどこかの代謝経路を阻害する結果を生じてくるのである。C-F 結合が強い極性をもつことから酵素と不可逆的に結合して正常成分の吸収を阻害し代謝を阻害することになる。又、フッ素の電子リッチな電子的特徴がもたらす効果として 6-デオキシ-6-フルオログルコースの酵母発酵阻害があり、この阻害は可逆的吸着による細胞膜での能動輸送阻害であることが知られている。

有機合成的立場からなめるとフッ素修飾した分子の不可逆的代謝きつ抗阻害の考えが分子設計へのヒントを与えてくれる。すなわち、酵素自殺基質 (suicide inactivator) と呼ばれる化合物群のことであり、フッ素修飾の位置がある特定の立体的、電子的環境におかれると酵素の働きによる脱離、置換反応を受けやすくなり酵素は次の基質を取り込めず不可逆的酵素反応阻害に基づく作用を発現する^{24), 25)}。

このように分子のフッ素修飾がもたらす効果は多大であるにもかかわらず生体との関連上重要なフッ素修飾体の立体化学的知見についてはほとんど知られていないのが現状である。

以上のような知見に基づき有機合成の立場から生物化学的変換がフッ素で修飾した分子にも適用できるならば、フッ素で修飾した分子のバイオテクノロジー分野への展開が可能となり全く新しいタイプの生理活性物質や

フッ素修飾したタンパク質等が創製できるのではと考えられる。次に、フッ素修飾した分子の微生物や酵素による識別について説明したい。

修飾基としての CH_2F 基と CF_3 基

分子内修飾基としての CH_2F 基と CF_3 基とは生物化学的にはどのような差異で識別されるのであろうか。筆者らは目的の基で修飾した分子を用い、いくつかの生物化学的変換を試みた。最近、光学活性な合成ブロック創

製的手段として良く用いられているパン酵母によるカルボニル基の還元におけるフッ素修飾の効果は驚くほど大きいことがわかった。

すなわち、 CH_2F 基と CH_3 基では大きな差異が還元速度にあらわれなかったが、酵母が電子リッチなフッ素原子を識別し高い光学純度のカルピノール体を創製したが、 CF_3 基では明らかに還元速度が遅くなり CF_3 基の大きな疎水性と極性の大きな電子的性質が芳香核との識別を困難にしている。もちろん、ペルフルオロアルキルケトン類が全く変換をうけないことはフルオロカーボン鎖の特徴が生物化学的変換でもくずれないことを示唆している。

次に、加水分解酵素を用いるアセタート体の不斉加水分解における両基の識別の相違を検討した。表-1 に示したように $\text{CH}_3 < \text{CH}_2\text{F} \ll \text{CF}_3$ の順で明らかに光学純度が向上していることが明らかである。この結果は、加水分解酵素は CF_3 基を異質物として認識し、識別するのに対し CH_2F 基は CH_3 基と区別できにくいことを示唆している。2 種の異なる生物化学的変換は CH_3 基を

Table-1 Optical resolution with lipase-MY.

Carbinol	Hydrolysis ratio (%)	Time (h)	$[\alpha]_D/\text{MeOH}$	Optical purity (% e.e.)	Absolute configuration
PhCH(OH)CF_3	40	24	-11.8 (c 1.91)	57	R
$\text{PhCH}_2\text{CH(OH)CF}_3$	46	6	+44.7 (c 2.07)	94	
$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH(OH)CF}_3$	44	6	+69.2 (c 1.55)	98	R
$\text{PhCH(OH)C}_2\text{F}_5$	23	23		0	
$\text{PhCH(OH)C}_8\text{F}_{17}$		24	no reaction		
$n\text{-PrC}\equiv\text{CCH(OH)CF}_3$	41	6	-1.85(c 1.06)	67	
$n\text{-BuC}\equiv\text{CCH(OH)CF}_3$	47	6	-1.39(c 1.67)	55	
$(E)\text{-PhCH=CHCH(OH)CF}_3$	37	6	+39.6 (c 1.84)	93	R
$(Z)\text{-PhCH=CHCH(OH)CF}_3$	35	6	+38.3 (c 1.83)	90	R
$n\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{CH(OH)CF}_3$	22	6	+50.0 (c 1.57)	85	R
$\text{CF}_3\text{CH(OH)CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	41	2.5	+20.4 (neat)	96	R

Table-2 Preparation of (S)-enantiomers.

Carbinol	Yield (%)	Method ^{a)}	Time (h)	$[\alpha]_D/\text{MeOH}$	Optical purity (% e.e.)
$\text{PhCH}_2\text{CH(OH)CF}_3$	99	A	48	-39.0 (c 1.80)	82
$\text{PhCH}_2\text{CH(OH)CF}_3$	95	B	6	-47.4 (c 1.76)	98 ^{b)}
$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH(OH)CF}_3$	99	A	24	-60.7 (c 1.55)	86
$\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH(OH)CF}_3$	94	B	6	-70.2 (c 1.67)	99 ^{b)}
$(E)\text{-PhCH=CHCH(OH)CF}_3$	97	A	24	-23.9 (c 1.76)	56
$(Z)\text{-PhCH=CHCH(OH)CF}_3$	97	B	24	-26.0 (c 1.87)	61
$\text{CF}_3\text{CH(OH)CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	99	A	12	-16.6 (neat)	80
$\text{CF}_3\text{CH(OH)CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	90	B	2	-15.6 (neat)	75

a) Method A : aq. NaOH/acetone; Method B : cellulase.

b) (S)-acetate with the hydrolysis ratio (55~60%) by lipase-MY was used.

視できず炭素数3以上のアルキル基が置換すると加水分解速度が非常に遅くなる。

フッ素修飾と酵素の適応性

生物化学的方法の問題点として、変換反応のスケールアップ、基質の特異性、酵素の大量供給の可能性などが

あげられる。そこでまず様々な加水分解酵素を上記で述べたフッ素で修飾した分子の変換反応に用いてみた。

PLE (pig liver esterase) は基質の特異性も大きく、光学純度も低いのでフッ素で修飾した分子の光学活性体の創製には実用的でない。α-キモトリプシンは高い光学純度

のものを与えるものの大量供給という点ではやはり実用的とはなりがたい。表-6 に示したように、lipase-MY は、基質も幅広く、大量供給も簡単であり実用的である。スケールアップという点においても問題なく、フッ素で修飾された光学活性体の創製のために実用的な酵素といえる。

酵素の新しい機能発現

自然界に何か新しい物質が生み出されるたびに微生物や酵素はそれに対応して進化を繰り返しながら生態系のバランスを保ってきたように思われる。分子のフッ素修飾という新しい技術は酵素そのものにどのような新しい機能の発現をうながすのかということについて次に述べてみたい。分子を多種多様にフッ素で修飾した分子を用

Table-3

Carbinol	Hydrolysis ratio (%)	Time (h)	$[\alpha]_D/\text{MeOH}$	Optical purity (% e.e.)	Absolute configuration
PhCH(OH)CH ₂ F	34	1.5	+20.7 (c 0.94)	26	S
PhCH ₂ CH(OH)CH ₂ F	50	2	+ 3.91(c 1.03)	16	
PhCH ₂ CH ₂ CH(OH)CH ₂ F	34	2.5	+22.1 (c 1.85)	81	
n-C ₆ H ₁₃ CH(OH)CH ₂ F	34	2.5	+ 3.67(c 1.08)	24	
PhCH(OH)CH ₃	25	1	+ 3.14(c 1.08)	6	R
n-C ₆ H ₁₃ CH(OH)CH ₃	30	2.5	+ 0.32(c 0.98)	3	

Table-4

Mimic effect of the fluorine atom.

X	Yield (%)	Optical purity (% e.e.)	van der Waals radius (Å)
H	82		1.20
F	87	91	1.35
Cl		no reaction	1.80
Br		no reaction	1.95
CH ₃		no reaction	2.00

CH₂F 基で置換したフッ素修飾は明らかなミミック効果を示すことを示唆しており、CF₃ 基修飾の場合には周囲の化学的環境との相互作用が重要であることを示唆していると考えられる。

フッ素修飾とミミック効果の活用

フッ素修飾の利点の一つとしてミミック効果が知られている。この効果の活用法として 2-アルキル-2-ハロゲンマロン酸ジエステルの不斉加水分解をあげることができる。

表-4 に示した結果から明らかに フッ素修飾のミミック効果と呼べる現象が示唆されている。すなわち、無置換体は加水分解はされるものの当然ラセミ化してしまい光学活性体は与えない。しかしながらフッ素修飾体は不斉加水分解をうけ高選択的に光学活性な合成ブロックとなりうるハーフエステル体を創製した。一方、塩素や臭素修飾体はハロゲン原子の大きさが影響を及ぼし、酵素に取り込まれず識別されている。その大きさを考えて分子設計したジメチル体も同じく識別を受けている。さらに、表-6 に示したようにフッ素修飾体においても 2 位のアルキル基の立体的因子は無

Table-5

Origin of enzyme	Yield (%)	$[\alpha]_D/\text{MeOH}$	Optical purity (% e.e.)
<i>Candida cylindracea</i> ^{a)}	87	-20.9 (c 2.81)	91
Porcine pancreas ^{b)}	23	-12.0 (c 1.20)	61
<i>Aspergillus sp.</i> ^{c)}	80	- 6.46(c 1.11)	28
<i>Chromobacterium viscosum</i> ^{d)}	67	0 (c 1.87)	0
<i>Rhizopus delemar</i> ^{e)}	no reaction		
Pig liver esterase ^{b)}	34	- 4.88(c 0.70)	24
α-Chymotrypsin ^{b)}	82	-16.0 (c 1.70)	70
<i>Trichoderma viride</i> ^{f)}	60	+13.1 (c 2.24)	56
<i>Trichoderma viride</i> ^{e)}	53	+ 9.97(c 2.34)	44
<i>Aspergillus niger</i> ^{e)}	52	+ 4.39(c 1.54)	19

a) Meito Sangyo Co. Ltd.; lipase-MY

b) Sigma Co. Ltd.

c) Amano Seiyaku Co. Ltd.

d) Toyo Jozo Co. Ltd.

e) Tanabe Seiyaku Co. Ltd.

f) Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd.

Table-6

Substrate	Origin of enzyme	Yield (%)	bp °C (mmHg)	$[\alpha]_D/\text{MeOH}$	Optical purity (% e.e.)
$\text{MeCF}(\text{CO}_2\text{Et})_2$	<i>Candida cylindracea</i> ^{a)}	87	88~89 (0.6)	-20.9 (c 2.81)	91
	Porcine pancreas ^{b)}	23		-12.0 (c 1.20)	61
	<i>Aspergillus sp.</i> ^{c)}	80		-6.46(c 1.11)	28
	<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}	60		+13.1 (c 2.24)	56
$\text{MeCF}(\text{CO}_2\text{Me})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	74	98~101 (2)	-23.2 (c 2.84)	95
	<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}	83		+12.5 (c 2.70)	46
$\text{CHF}(\text{CO}_2\text{Et})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	70	100~102 (1)	+13.9 (c 3.59)	99
	<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}	74		+5.33	38
	<i>Trichoderma viride</i> ^{e)}	51		+8.12	58
$\text{EtCF}(\text{CO}_2\text{Et})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	87	94~95 (0.7)	-14.0 (c 1.86)	93
	<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}	no reaction			
	<i>Trichoderma viride</i> ^{e)}	no reaction			
$\text{EtCF}(\text{CO}_2\text{Me})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	87	105~108 (4)	-18.1 (c 1.97)	99
	<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}	no reaction			
$\text{PrCF}(\text{CO}_2\text{Et})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	30	108~111 (1)	-2.90(c 1.51)	33
$\text{BuCF}(\text{CO}_2\text{Et})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	78	93~97 (0.7)	-1.53(c 2.26)	11
$\text{CF}_3\text{CH}(\text{CO}_2\text{Me})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	no reaction			
$\text{MeCl}(\text{CO}_2\text{Et})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	no reaction			
$\text{MeBr}(\text{CO}_2\text{Et})_2$	<i>Candida cylindracea</i>	no reaction			

a) Meito Sangyo Co. Ltd.; lipase-MY b) Sigma Co. Ltd. c) Amano Seiyaku Co. Ltd. d) Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. e) Meijiiseika Co. Ltd. f) The optical purities were determined by glc and/or ^{19}F NMR after conversion of the amlonic acid monoesters to their diastereomeric amides by optically active α -methylbenzylamine.

Table-7 Asymmetric Michael addition reaction of 2-trifluoropropenoic acid.

Enzyme	Substrate	Product ^{a)}	Reaction time (h)	Yield (%)	$[\alpha]_D/\text{MeOH}$	Optical purity (% e.e.)
<i>Candida cylindracea</i> ^{c)}	H_2O	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{CF}_3)\text{CO}_2\text{H}$	34	48	+5.70 (c 1.52)	70 ^{d)}
Pig liver esterase ^{b)}	H_2O	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{CF}_3)\text{CO}_2\text{H}$	52	54	+4.90 (c 1.50)	60 ^{d)}
α -Chymotrypsin ^{b)}	H_2O	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{CF}_3)\text{CO}_2\text{H}$	169	77	+3.91 (c 1.75)	49 ^{d)}
<i>Candida cylindracea</i> ^{c)}	EtOH	no reaction	48			
Pig liver esterase ^{b)}	EtOH	no reaction	48			
<i>Candida cylindracea</i> ^{c)}	Et_2NH	$\text{Et}_2\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CF}_3)\text{CO}_2\text{H}$	92	47	+0.61 (c 1.56)	71 ^{e)}
Pig liver esterase ^{b)}	Et_2NH	$\text{Et}_2\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CF}_3)\text{CO}_2\text{H}$	92	39	+0.58 (c 1.85)	69 ^{e)}
<i>Candida cylindracea</i> ^{c)}	PhNH_2	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{CF}_3)\text{CONHPh}$	40	76	+0.51 (c 0.77)	39
Pig liver esterase ^{b)}	PhSH	$\text{PhSCH}_2\text{CH}(\text{CF}_3)\text{CO}_2\text{H}$	24	64	+0.13 (c 2.60)	50 ^{e)}

a) Structures of these products are established from spectral data. For the new compound the microanalysis was in satisfactory agreement with the calculated values (C, H, N; $\pm 0.4\%$). b) Sigma Co. Ltd. c) Meito Sangyo Co. Ltd. d) Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. e) Amano Seiyaku Co. Ltd. f) The optical purity was determined by ^{19}F NMR after conversion of methyl 3-hydroxy-2-(trifluoromethyl) propanoate derived from 3-hydroxy-2-(trifluoromethyl) propanoic acid and diazomethane to its diastereometric ester by optically active MTPA. g) The optical purities were determined by glc and/or ^{19}F NMR after conversion of optically active acids to their diastereometric amides by optically active α -methylbenzylamine.

Table-8 Preparation of optically active heterocycles.

Substrate	Enzyme	Product ^{a)}	Reaction time (h)	Yield (%)	$[\alpha]_D/\text{MeOH}$	Optical purity ^{f)} (% e.e.)
<i>Candida cylindracea</i> ^{b)}		21	83	+2.74 (c 0.45)	41
	Pig liver esterase ^{c)}		16	69	+2.41 (c 1.21)	36
	<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}		2.5	94	+3.74 (c 1.35)	56
<i>Trichoderma viride</i> ^{e)}		11	61	+2.01 (c 0.87)	30
	<i>Aspergillus niger</i> ^{e)}		11	90	+4.48 (c 0.47)	67
	<i>Candida cylindracea</i> ^{b)}		20	86	-0.92 (c 1.15)	47
<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}		6	72	-0.70 (c 0.70)	36
	<i>Candida cylindracea</i> ^{b)}		24	56	+0.66 (c 0.89)	38
	<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}		24	52	+0.76 (c 1.01)	44
<i>Candida cylindracea</i> ^{b)}		20	71	+0.56 (c 1.54)	25
	<i>Trichoderma viride</i> ^{d)}		20	57	+0.83 (c 1.07)	37

a) Structures of these products are established from spectral data. For the new compound the microanalysis was in satisfactory agreement with the calculated values (C, H, N; $\pm 0.4\%$). b) Meito Sangyo Co. Ltd. c) Sigma Co. Ltd. d) Yakult Pharmaceutical Industry Co. Ltd. e) Amano Seiyaku Co. Ltd. f) The optical purities were determined by ^{19}F NMR signal intensities by commercially available (+)-tris[di(perfluoro-2-propoxypropionyl)metanate]europium (III).

いて加水分解酵素の機能を検討したところ、2-(トリフルオロメチル)プロペン酸が系中に存在すると加水分解酵素の新しい機能が発現してくることが明らかになった。新しい触媒機能として、不斉マイケル付加反応がおこり、さらに縮合反応が誘起される。これらの反応が繰り返して生じるにより光学活性なヘテロ環化合物が生じてくる。

これらの結果は、フッ素で修飾された分子により加水分解酵素の通常の活性部位がブロックされることにより、酵素に内在していた他の活性部位が機能を発現してきたことを意味しており、非天然型の化合物が自然界の中に加えられたときの生態系での対応の仕方を解き明かすヒントになりうるかもしれないと考えている。

おわりに

バイオテクノロジーの利用が大きくクローズアップされ、フラスコと試剤という化学的操作で行われて発達してきたテクノロジーに、大きな転機の時期が到来したことはまちがいないように思われ、フッ素で修飾された分子においてもバイオテクノロジーの手法を駆使して生態系のシステムに順応できるように分子設計をしていくことができる時代が来たように思われる。

(昭和61年5月28日受理)

文 献

- 1) H.L. Jensen, *Can. J. Microbiol.*, **3**, 151 (1957)
- 2) H.L. Jensen, *Acta Agr. Scand.*, **10**, 83 (1960)

- 3) J.S.C. Marais, *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, **20**, 67 (1944)
- 4) R.A. Peters, *Advances in Enzymol.*, **17**, 113 (1957)
- 5) 堀内信生, 生化, **34**, 92 (1962)
- 6) K. Tonomura, F. Futai, O. Tanabe, T. Yamaoka, *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 124 (1965)
- 7) P. Goldman, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3434 (1965)
- 8) P. Goldman, G.W. Milne, M.T. Pignataro, *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 178 (1967)
- 9) P. Goldman, *Science*, **164**, 1123 (1969)
- 10) H. Kawasaki, N. Tone, K. Tonomura, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 29 (1981)
- 11) H. Kawasaki, N. Tone, K. Tonomura, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 35 (1981)
- 12) H. Kawasaki, K. Miyoshi, K. Tonomura, *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 543 (1981)
- 13) H. Kawasaki, S. Hayashi, H. Yahara, F. Minami, K. Tonomura, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 5 (1982)
- 14) L.P. Harger et al., *J. Biol. Chem.*, **241**, 1769 (1966)
- 15) R. Theiler et al., *Science*, **202**, 1094 (1978)
- 16) N. Alexander, *Anal. Biochem.*, **4**, 341 (1962)
- 17) D.J. Hardman, J.H. Slater, *J. Gen. Microbiol.*, **123**, 117 (1981)
- 18) P. Goldman, G.W.A. Milne, D.B. Keiser, *J. Biol. Chem.*, **243**, 428 (1968)
- 19) M. Little, P.A. Williams, *Eur. J. Biochem.*, **21**, 99 (1971)
- 20) K. Motosugi, N. Esaki, K. Souda, *J. Bacteriol.*, **150**, 522 (1982)
- 21) C. Walsh, *Tetrahedron*, **38**, 87 (1982)
- 22) R.B. Cain et al., *Biochem. J.*, **106**, 203 (1968); *ibid*, **106**, 211 (1963)
- 23) A. Capek, B. Kakac, *Folia Microbiol.*, **10**, 267 (1965)
- 24) 左右田健次, 谷沢克行, 江崎信芳, 化学, **35**, 197 (1980)