薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
106 (9) 729-757 (1986)

マクロライドをはじめとする各種抗生物質に関する研究

大村 智

北里研究所, 〒108 港区白金 5 丁目 9-1

Studies on Macrolides and New Antibiotics

SATOSHI ŌMURA

The Kitasato Institute, 5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo, 108, Japan

After structure elucidation of 16-membered macrolide antibiotic leucomycin, the structures of spiramycin, tylosin, megalomicin, irumamycin and virustomycin were determined by chemical degradation and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The studies on the chemical modification and structure-activity correlation of macrolides led to the elaboration of clinically useful new derivatives.

The biosynthetic origin of the carbon skeleton of macrolide aglycone was investigated by means of ^{13}C NMR and the feeding experiments of ^{13}C labeled precursors. We found that an antifungal antibiotic cerulenin is a specific inhibitor of fatty acid and "polyketide" biosyntheses, and applied the antibiotic to the biosynthetic studies of macrolides after formation of the lactone ring and to the production of a new "hybrid" macrolide, chimera-mycin. Furthermore, a strain which produces a new "hybrid" antibiotic mederrhodin was bred from actinorhodin and medermycin producers by gene manipulation.

Sixty-five or more new antibiotics have been discovered from secondary microbial metabolites using newly devised screening systems. Azureomycins and izupeptins were found as bacterial cell wall biosynthesis inhibitors. In combination with the above screening, several new antibiotics, nanaomycins, frenolicin B, cervinomycins, asukamycin and so on were discovered as antimycoplasmal substances. Diazaquinomycins as antifolate substance, hitachimycin and avermectin as anthelmintics, herbimycin, phosalacine and oxetin as herbicides have been found by the corresponding each screening system. The structure elucidation, biosynthesis and mode of action of these antibiotics have been studied. Among of them, nanaomycin A and avermectin (or ivermectin) have been employed as antifungal and antiparasitic therapeutics, respectively, for veterinary use.

Keywords—macrolide; hybrid biosynthesis; antibiotic; actinomycete; biosynthesis; chemical modification; mode action; antimicrobial activity; structure elucidation; screening

はじめに

Leucomycin 各成分の分離と構造決定を手がけて以来, マクロライド抗生物質に興味を持ち, この系統のマクロライドで構造が未決定であった spiramycin, tylosin 及び megalomicin などの絶対構造を明らかにした. さらに構造と活性との相関性を明らかにし, これらの知見をもとに新しいマクロライド誘導体を開発した. 次いで ^{13}C -核磁気共鳴 (^{13}C -NMR) スペクトロメトリーを構造解析に導入すると共に, 生合成研究にも適用し, マクロライド炭素骨格の由来を種々の第一次代謝産物との関係で明らかにした. 抗カビ抗生物質 cerulenin の単離, 構造決定の後, その作用機序に興味を持ち, これが脂肪酸生合成の特異的な阻害剤であることを明らかにするとともに, マクロライドを含めたポリケチド抗生物質の生合成をも阻害することを見いだした. 本物質をポリケチド抗生物質の生合成に応用し, ハイブリッド抗生物質の生合成, さらには遺伝子操作による新しいハイブリッド抗生物質の創製へと発展させた. この cerulenin の発見でみられるように 1 つの抗生物質の発見が予想もしない方

向に発展し、いろいろな分野で役立つことに心をひかれ、新しい有用な抗生物質や生理活性物質を発見するための種々の探索方法を考案し、これを実施した。これにより 65 余種の新しい微生物代謝産物を発見するとともにこれらについて構造決定、生合成並びに作用機序などを明らかにした。筆者らの発見した新物質の中で *nanao-mycin* 及び *avermectin* などが実用化され、またいくつかは *cerulenin* と同様に生化学的試薬として有用であるものも見いだされる。その他、生産菌の分類、発酵生理などについても国の内外の多くの協同研究者らと行ってきた内容について総説することにする。

I. マクロライド抗生物質に関する研究

I-1. 構造解析

a. **Leucomycin 及び Spiramycin** Leucomycin は 1953 年に *Streptovercillium* (旧名 *Streptomyces*) *kita-satoensis* の培養液から発見され、¹⁾ 1955 年から国産最初のマクロライド抗生物質として臨床に用いられていたが、筆者らが研究を開始した 1965 年頃にはまだ含有成分及びそれらの構造上の関連については不明であった。まず leucomycin A₃ (**1**) を最初に単離、結晶化し、これを用いて構造研究を行った。化学分解に加え、紫外吸収スペクトル (UV), 赤外吸収スペクトル (IR), 質量 (Mass) スペクトル並びに当時天然物の構造研究に導入されたばかりの NMR (60 MHz) スペクトロメトリーを適用して、これらの構造を明らかにした。²⁾ **1** のラクトン上 9 位のアリル位水酸基を MnO₂ で酸化し、当時、R.B. Woodward らにより構造が訂正されたばかりの *carbo-mycin B* (*magnamycin B*, **9**) と同一物質を得ることによって両者の構造上の関連を明らかにした。³⁻⁵⁾ このラクトン上 9 位の水酸基は酸性条件下で容易に 13 位にアリル転位した *isoleucomycin A₃* (**10**) となる。この転位反応は構造決定において障害になったが、*demycarosyl isoleucomycin A₃* (**11**) の HBr 塩の X 線結晶解析によってラクトン上 9 位の配位を除いてすべての絶対配位が決定出来た。⁶⁾ 9 位の配位については一旦は *mills* 則を適用して *S* 配位としたが、³⁾ これは後に L. A. Freiberg ら⁷⁾ により *R* 配位であると報告された。そこで X 線結晶解析により確証を得るべく、良品性の化合物について検討し、最終的に、**1** をアルカリ処理して得られた 3,6-bicycloleucomycin A₃ (**12**) に Polonovski 反応を適用して得られたアグリコン、5,9-*O,O*-diacetyl-3,6-bicycloleuconolide A₃ (**15**) を用いて解析を行った。その結果、9 位は *R* 配位であると結論づけられ、^{8,9)} ここに全絶対構造を決定することが出来た (Chart 2)。他の成分についてはアセチル化して得られる誘導体並びに加水分解して得られるアシル *mycarose* の構造を決定することによりそれぞれの構造上の関連性を明らかにすることが出来た (Chart 1)。^{10,11)}

当時、18 員環あるいは 17 員環の構造^{12,13)} が提出されていた *Streptomyces ambofaciens* の生産する spiramycin I (**16**), II (**17**), III (**18**) について leucomycin との関連性を検討した。成分、**17** のテトラヒドロ体の酸加水分解によって得られる tetrahydroforocidine B (**19**) と *demycarosyltetrahydroleucomycin A₃* とが同一物質であることから、**1** と構造的に関連付けることが出来た (Chart 3)。⁴⁾ その後、我が国を中心に leucomycin と同一のアグリコン骨格を有する 16 員環マクロライドが相次いで発見され、現在では 44 成分が知られるまでに至っている。¹⁴⁾

b. **マクロライドの ¹³C-NMR スペクトル解析及び Tylosin の絶対構造** 1975 年筆者らは G. Lukacs ら (仏) と共に初めてマクロライド抗生物質の構造研究に ¹³C-NMR を適用した。¹⁵⁾ すでに絶対構造が決定していた leucomycin の ¹³C-NMR スペクトルデータなどを基に tylosin (**20**) や spiramycin の同スペクトルの解析を行い、その過程で **20** の二糖部 (*mycaminosylmycarose*) のアグリコンへの結合部位及び spiramycin の構成糖、*forosamine* のグリコンド結合の配位を決定することが出来た。この ¹³C-NMR 解析はその後、後述する ¹³C 標識前駆体を用いるマクロライド抗生物質の生合成研究の基礎となったばかりでなくスピニン格子緩和時間の測定

Leucomycin

	R ₁	R ₂
A ₁ (2)	H	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
A ₃ (1)	COCH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
A ₄ (3)	COCH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
A ₅ (4)	H	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
A ₆ (5)	COCH ₃	COCH ₂ CH ₃
A ₇ (6)	H	COCH ₂ CH ₃
A ₈ (7)	COCH ₃	COCH ₃
A ₉ (8)	H	COCH ₃

Chart 1

Chart 2

に役立った.^{16,17)} Tylosin 各炭素 (^{13}C) のスピン格子緩和時間 T_1 ($^{13}\text{C-N}T_1$) を測定したところ、ラクトン骨格炭素のメチン及びメチレンの平均値は糖のこれらの平均値と比較して短く、また糖の中でも mycaminose は短く、mycarose は長くなっており、分子内での運動性を良く表わしていた (Table I). Mycinose が他の糖より T_1 値が長いのは $-\text{O}-\text{CH}_2-$ 結合を介しているためこの部分は分子内での動きがより速いものと思われる。20 と共に leucomycin, spiramycin 及び chalconomycin についても T_1 を測定し、同様の結果を得ることが出来、この測定が天然有機化合物の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル解析に有効な手段であることを示した。^{16,17)}

20 の絶対構造は 1 と 20 から誘導された化合物を用いて検討した。Chart 4 に示すように 20 の酸加水分解によって 2 つの中性糖, mycarose 及び mycinose を除去して得た mycaminosyltylonolide (21) を *m*-chloroperbenzoic acid にて処理し、N-oxide とした。次いで前述の leucomycin のビシクロ体に応用した Polonovski 反応 (Chart 2) を行い、mycaminose 部をはずし、tylonolide-5,20-hemiacetal (22) を得た。本物質をクロム酸酸化し、tylonolide dilactone (23) を得た。同様にして 1 についても leuconolide A₃-5, 18-hemiacetal (28) 及び 9-de-

Chart 3

TABLE I. Average ¹³C NT₁ Data (in s) for 16-Membered Macrolide Antibiotics

Carbon type (CH+CH ₂)	Tylosin (20)	Leucomycin A ₈ (1)	Spiramycin III (18)	Chalcomycin
Macrolide ring	0.16	0.09	0.13	0.30
Mycaminose	0.17	0.09	0.15	—
Mycarose	0.20	0.11	0.19	—
Mycinose	0.37	—	—	0.45
Forosamine	—	—	0.23	—
Chalcose	—	—	—	0.34

¹³C Spin-lattice relaxation times for 20 (in s).

hydroleuconolide A₈ dilactone (29) に導いた。一方、20 を dimethyl acetal (24) に変換後、9 位カルボニル基を NaBH₄ 還元し、次いで酸処理によりアセタールをはずし、9-dihydrotylosin (26) とした。また 21 及び 1 からそれぞれ H₂/PtO₂ 還元体のアセタール、27 及び 30 を得た。¹⁸⁾ このようにして得られた構造的に対応する一連の化合物の ¹H-NMR 及び円二色性 (CD) スペクトル解析の比較から C-3、C-4、C-5、C-6 及び C-8 の絶対配位を決定した。¹⁸⁾ 残る C-14 及び C-15 については tylosin 生産菌の一変異株、*S. fradiae* KA-427 No. 261 によって生産される 20 の生合成中間体である protylonolide (31)¹⁹⁾ の X 線結晶解析を適用し、これらのデータを総合して 20 の全絶対構造を決定することが出来た。²⁰⁾

Chart 4

c. **Megalomicin A** 当時ほぼ全貌が明らかにされていた 14 員環マクロライド, megalomicin A (32) の構造について ^{13}C -NMR, X線結晶解析及び構成糖の合成研究を行い, 構成糖の 1 つは当時報告されていた D-rhodamine ではなく新規な糖, L-megosamine であること及びこの糖のアグリコンへの結合様式を含め全構造を決定した (Chart 5).²¹⁾

d. Irumamycin 及び関連物質 筆者らは 1982 年に *S. subflavus* subsp. *irumaensis* の生産する抗真菌抗生物質 irumamycin (**33**) を発見し,²²⁾ その構造解析を行った. **33** の酸メタノリシスにより得られる中性糖は NMR 解析より, methyl-3-*O*-carbamoyl-2-deoxy- α -D-rhamnoside (**34**) と同定した (Chart 6). **33** のジアセチル体の酸化のオゾン分解, 次いで CH_2N_2 処理によりトリクロル体 (**35**) を得た. このものを酢酸中 Zn 末で処理し, モノクロル体 (**36**) を得, これらの構造と **33** の ^1H -NMR (400 MHz) 解析から炭素 11 個からなるアルキル側鎖を含む 20 員環ラクトン構造を推定した. この時点で **33** はポリケチド経路から生成されることが推定されたので, ^{13}C 標識前駆体を添加して得られる化合物の ^{13}C -NMR 解析による構造決定を試みた. [1- ^{13}C]酢酸, [1,2- $^{13}\text{C}_2$]酢酸, [1- ^{13}C]プロピオン酸, [1,2- $^{13}\text{C}_2$]プロピオン酸をそれぞれ 0.1–0.2% 添加し, 得られる **33** の ^{13}C 標識体について ^{13}C -NMR を測定し, 取り込まれた酢酸及びプロピオン酸単位の分子内及び分子間の各炭素間で観測された J_{CC} (Hz) 値と前述の分解物の構造及び ^1H -NMR の結果を合わせて全構造を決定した (Fig. 1).²³⁾ 本研究によって, ^{13}C 前駆体を取り込ませた物質の ^{13}C -NMR 解析は生成に関する情報を提供するのみならず, 構造決定にも有用であることを示した.

その後, 同一菌株によって 3'-*O*-decarbamoylirumamycin (**37**) が生産されることを見いだした.²⁴⁾ また, 別の菌株 *Streptomyces* sp. によって生産される抗生物質 X-14952 B (**38**) は **33** のエポキシ基が還元され, 後者の C-24 位上のメチル基がエチル基で置換された構造を有していることを明らかにした.²⁵⁾

e. Virustomycin A Virustomycin A (**39**) は 1982 年に発見した一放線菌 *Streptomyces* sp. により生産される抗ウイルス, 抗トリコモナス活性物質である.²⁶⁾ 本物質はアルカリ加水分解及び酸メタノリシスより炭素 14 個からなるアルキル側鎖を含むラクトン (**40**) と flavensomycinic acid methyl ester (**41**) をそれぞれ与える.

Chart 5

Chart 6

前者は **concanamycin A** の加水分解物と一致すること及び **39** の 600 MHz NMR スペクトル解析から 18 員環ラクトン構造を含む全構造を決定した。²⁷⁾

I-2. 化学修飾並びに構造-活性相関

a. Leucomycin, Spiramycin 及び Tylosin

Leucomycin の各成分の分離と構造決定を終えた段階でそれぞれの抗菌活性を測定したところ、**mycarose** の 4'' 位のアシル基の違い及びラクトン上 3 位のアセチル基の有無により活性に大きな差があることを見いだした。²⁸⁾ そこで、**leucomycin**, **spiramycin** 及び **tylosin** の化学修飾を行い構造-活性相関を調べると同時にこれをもとに優れた誘導体を得る研究を開始した。**Leucomycin** については構造解析の過程で得られた化合物や各官能基を修飾して数多くの化合物の抗菌活性^{5,29,30)} を測定すると同時に大腸菌由来のリボゾームとの結合性、感染治療実験 **propionylleucomycin A₅ (42, Rokitamycin)** を選び **coccus pyogenes**, **Staphylococcus aureus** などの感染造許可申請中である。

Spiramycin についても分子中の各水酸基に注目してアシル化を行い、3,3',4"-tri-*O*-propionylspiramycin I (43) と 3,4"-di-*O*-acetyl-3"-*O*-butyrylsipramycin I (44) を選り出し、現在開発研究が行われている。⁸⁴⁾ 他の研究グループの結果を含めて 16 員環マクロライドの化学修飾については筆者らの総説を参考にされたい。^{85,86)} 最近、leucomycin アシル誘導体についてコンピュータによる QSAR (quantitative structure-activity relationship) を行い、グラム陽性菌、*Bacillus subtilis* 及び *Staphylococcus aureus* などに最も強い抗菌活性を有する誘導体は、42 に相当する 3"-*O*-propionyl-4"-*O*-butyryl の場合であることが理論的に裏付けられた。⁸⁷⁾

Fig. 1. ^{13}C - ^{13}C Coupling Constant Values (Hz) of Irumamycin (**33**)

intramolecular ^{13}C - ^{13}C coupling constants
intermolecular ^{13}C - ^{13}C coupling constants
acetate
propionate

Chart 7

Chart 8

筆者らは tylosin (20) についても数多くの誘導体を合成し活性を調べた.³⁸⁻⁴¹⁾ その中で抗菌活性が増強された 20-deoxy-20-(di-*N*-benzylamino)demycarosyltylosin (45) などでは実用的に興味ある物質である.⁴⁰⁾ また構造と抗菌活性との関連性の上で 20 及び leucomycin とから興味ある化合物を得た. 両抗生物質について NaBH₃CN 及び酢酸アンモニウムを用い、アルデヒド基の還元的アミノ化を行い、相当するアミン誘導体とは別に、それぞれイミノ 2 量体, 20,20'-dideoxo-20,20'-iminoditylosin (46), 18,18'-dideoxo-18,18'-iminodileucomycin A₃ (47) を得た. 両化合物の抗菌力とリボソームへの親和性を調べたところ, leucomycin のイミノ 2 量体, 47 では母体に比べ、抗菌活性 (MIC) と大腸菌由来のリボソーム親和性とは共に著しく低下するが, 46 のイミノ 2 量体, 47 では抗菌力は 1/2 に低下するが、リボソーム親和性は 20 と同程度の活性を有しており興味を持たれる (Fig. 2).⁴²⁾

Fig. 2. Effect of Leucomycin A₃ (1), Tylosin (20) and Their Derivatives on [³H]Tetrahydroleucomycin A₃ Binding to *E. coli* Ribosomes

A) ○---○, leucomycin A₃ (1). ID₅₀ = 4.2 × 10⁻⁶; ●—●, 18,18'-dideoxo-18,18'-iminodileucomycin A₃ (47). ID₅₀ = 1.0 × 10⁻⁴.

B) ○---○, tylosin (20). ID₅₀ = 4.0 × 10⁻⁷; ●—●, 20,20'-dideoxo-20,20'-iminoditylosin (46). ID₅₀ = 2.3 × 10⁻⁷.

b. Erythromycin 及び関連化合物の消化管収縮運動作用 Erythromycin には主として下痢とか嘔吐など消化管に係わる副作用が知られている。⁴³⁾ この原因は erythromycin が強い消化管運動促進作用を有するためであることが最近、伊藤ら (群馬大) により報告された。⁴⁴⁾ そこで筆者らは伊藤らと共同でまず、この作用と構造との関連性を調べたところ、erythromycin が最も強く、同じ 14 員環マクロライドである oleandomycin 及び pikromycin では弱いながらも活性を有していた。しかし、16 員環マクロライドにはこの作用がみられない。⁴⁵⁾ さらに erythromycin A (48) について各種誘導体を合成し、この作用を調べているが、中でも 8,9-anhydroerythromycin A 6,9-hemiketal (49) が 48 より 10 倍作用が強く、しかも抗菌活性はほとんど消失した (Table II).⁴⁶⁾ この系統の化合物は将来、消化管運動調節剤としての開発が期待されるが、またこれを用いて消化管運動の機構を解明する薬剤として使用されると思われる。今後他の抗生物質についても主作用以外の活性に注目した誘導体の合成が期待される。

TABLE II. Antimicrobial Activity and Gastrointestinal Motor Stimulating Activity of Erythromycin A (48) and 8,9-Anhydroerythromycin A 6,9-hemiketal (49)

	48	49
Antimicrobial activities	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
<i>Staph. aureus</i> ATCC 6538P	0.2	100
<i>Kleb. pneumoniae</i> ATCC 10031	6.25	>100
Gastrointestinal motor-stimulating activity	MED ($\mu\text{g/kg}$) ^{a)}	
	30	3

a) The minimal effective doses (MED) to induce the contractions comparable to the natural interdigestive migrating contractions in dog.

I-3. 生合成及び調節

a. アグリコン骨格炭素の由来 Leucomycin のアグリコンは 1 分子のプロピオン酸と 8 分子の酢酸から生合成されることが考えられていた。⁴⁷⁾ 筆者らは ^{13}C で標識した酢酸、プロピオン酸及び酪酸を *Streptovorticillium kitasatoensis* の培養液に添加して ^{13}C 標識 leucomycin A₈ を得た。このもののアグリコン部には 5 分子の酢酸、1 分子のプロピオン酸及び酪酸が取り込まれることを明らかにした。しかし、C-3 及び C-4 の C_2 ユニットについてはいずれの前駆体からも取り込みが認められなかった (Fig. 2 (a)).^{48,49)} その後さらに C-3, C-4 の由来についてグリシン、コハク酸などの ^{13}C 標識アミノ酸及び有機酸の取り込みについて調べたがこの部位への特異的な取り込みは認められなかった。1983 年になって $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ グルコース及び $[\text{2-}^{13}\text{C}]$ グリセロールの入手が容易になったところでそれらの取り込み様式を調べたところ、Fig. 2 (b) に示すような結果を得た。グリセロールの 2 位炭素は酢酸の 1 位に相当する炭素に取り込まれるのみならず 4 位炭素にも取り込まれることから、本生産菌には Chart 9 に示すようなグリコレートを経る経路が存在することが推定された。⁵⁰⁾

Tylosin (20) においては Fig. 2 (c) に示すように 2 分子の酢酸、5 分子のプロピオン酸及び 1 分子の酪酸が取り込まれた。⁴⁹⁾ なお、leucomycin の C-3, C-4 に相当する部位にはこの場合プロピオン酸が取り込まれている。これらの一連の研究過程で酪酸、エチルマロン酸及びバリンから代謝されたイソ酪酸のカルボキシル基が β 位へ転移して得られた化合物が 20 のアグリコン部に取り込まれることを見いだした (Chart 10).^{49,51)} このようなカ

Fig. 4. Biosynthetic Pathway of Tylosin (20) after the Aglycone Formation

(MM) mycaminose; (MC) mycinose; (MR) mycarose.

し、さらに **51** が仮想的中間体、ポリケチドを経ると考えられる天然物、例えば *leucomycin*, *tetracycline*, *6-methylsalicylic acid*, *naringenin* などの生合成をも特異的に阻害することを見いだした。それ以来、**51** は生化学並びに天然物あるいは発酵生理学などの領域で広く使われるようになった。^{54,55)}

ラクトン形成後の生合成中間体と想定される各種化合物を合成した。次いで、培養液に **51** を添加し、**20** のラクトン部の生合成を阻害した状態で合成中間体を添加し、これらが生産菌によってどのような化合物に変換されるかを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により調べた。⁵⁶⁾ その結果を Fig. 4 にまとめた。ラクトンの中で **20** に変換されたのは **31** のみで化合物、**60**, **61**, **62** (Chart 13) は **20** に変換されなかった。ラクトン **60** は **58** や抗菌活性を有する **56** や **59** へと変換されたが、**20** への変換は認められなかった。一方、**53** 及び **54** はいずれも **20** へ変換され、この実験では **20** または **23** 位のいずれが先に酸化されるかは明らかに出来なかった。そこで 5-O-mycaminosylprotylonolide (**52**) から 5-O-mycaminosyltylonolide (**21**) への経路を関連化合物の酵素的変換反応により検討した。⁵⁷⁾ その結果、酸化反応は **20** 位でまず起こること及びこの反応は 2-ケトグルタル酸をコファクターとして要求する dioxygenase により触媒されることを明らかにした。また **23** 位の酸化 (**64**→**21**) にも同様の dioxygenase が関与することを明らかにした (Fig. 5)。**65** から **21** への変換が微弱であることから、

Chart 13

Fig. 5. Biosynthetic Pathway of Tylosin (20) after the Aglycone Formation

52→63→64→21 が主経路であると考えられる。

(ii) Leucomycin 及び Spiramycin——20 のラクトン部前駆体, 31 に相当するものとして leucomycin 系では platenolide I (66) 及び II (67) が得られている。⁵⁸⁾ Cerulenin (51) を用いる変換実験の結果, spiramycin の生合成はまず 66 に mycaminose が結合し, 18 位がアルデヒドに酸化された後 forosamine が, 次いで mycarose が結合し, 最後にラクトン上 3 位水酸基のアシル化が起こることを確かめた。⁵⁹⁾ 最終段階の spiramycin I (16) を II (17) に変換するアシル化酵素を菌体抽出から 33 倍精製し, 至適 pH が 8.5 で, Ca²⁺ などの 2 価の金属イオンで活性化されること及びアシル供与体としてアセチル CoA とプロピオニル CoA に同程度の反応性を示すなどの性状を明らかにした。⁶⁰⁾ Leucomycin の場合は mycarose 上のアシル基の導入がラクトン上 3 位のアセチル化に優先すると考えられている。⁶¹⁾

c. マクロライド抗生物質の生合成の調節 筆者らは生産培地にリン酸マグネシウム (Mg(PO₄)₂·8H₂O) を添加すると leucomycin の生産性が向上することを見いだした。この原因は培地中の NH₄⁺ とリン酸マグネシウムとが不溶性の複塩を形成するため, 生合成を阻害している NH₄⁺ 濃度を低下させるためであると結論づけた。⁶²⁾ これを契機として抗生物質の生合成と調節機構の研究を開始した。

(i) マクロライド生合成の制御機構——抗生物質の生合成が培養液中のグルコースや NH₄⁺, PO₄²⁻ 酸などによって阻害される現象は多数報告されているが, その機構が明らかにされた例は少ない。我々はこの機構を詳細に検討するため, tylosin (20) の生合成をとりあげ酵素レベルでの解明を試みた。前述の tylosin 生産菌 *S. fradiae* から得た 2 つの変異株 No. 261 と Np 10 はこの研究にきわめて有効であった。No. 261 株は tylosin 生合成の後半部分が欠損しており, protylonolide (31) を生産する。一方, Np 10 はアグリコン部の生合成が欠損しているため tylosin 関連化合物を生産しないが, 外部から 31 を加えると, これを 20 に変換出来る株である。両菌株を別々に合成培地で培養すると No. 261 株による 31 の生産は高濃度の NH₄⁺ により強く阻害されるが, Np 10 株による 20 への変換反応は何ら影響を受けなかった。⁶³⁾ つまり tylosin 生合成の NH₄⁺ による阻害はアグリコン部が生成されないためであると考えられた。前述のとおりアグリコン部はアミノ酸やコハク酸あるいは高級脂肪酸の分解代謝で生成する低級脂肪酸が縮合して生成される。¹⁴C 標識化合物を No. 261 株の静止菌体と反応させ, 31 の生成量を調べた結果, 高濃度の NH₄⁺ を含む培地で生育させた菌では明らかにバリン, スレオ

Chart 14

ニン、コハク酸からの **31** の生成量が低下していた。この阻害は **31** の生合成前駆体である酢酸、プロピオン酸、酪酸あるいはバリン代謝産物である α -ケトイソバレリオン酸の添加により消失した。⁶⁴⁾ この結果から NH_4^+ による **31** の生合成阻害はバリン及びコハク酸代謝の阻害によると推定された (Chart 14)。実際、valinedehydrogenase の活性と **31** 生産量及び NH_4^+ 濃度との間に明瞭な相関関係が見られた。一方、本酵素活性が低下したり、増加した変異株では **31** の生産も低下あるいは増加することにより上述の関係が支持された。⁶⁵⁾

(ii) 窒素制限発酵及びリン酸制限発酵——筆者らは発酵過程でマクロライド抗生物質の生産性を増加させる手段として培養液中の NH_4^+ が低くなるような NH_4^+ 捕捉剤を見いだした。リン酸マグネシウムやゼオライトは通常の培養条件下で NH_4^+ を捕捉して不溶性とする性質を有している。これらを 1% 前後培地に添加して培養すると培養液中の NH_4^+ 濃度は低下し、leucomycin, tylosin, spiramycin などの生産量は 2—10 倍増加した (Table III)。マクロライド抗生物質のみならず, streptomycin, chloramphenicol, nanaomycin 及び cerulenin などの生産量も大幅に増加した。Demain ら (M.I.T.) はこの方法を β -ラクタムの生産と cephamycin 生合成の窒素制御の機構の研究に応用し、リン酸マグネシウムの添加で cephamycin の生産が 4—7 倍に増加することを見いだした。我々はこの方法を窒素制限発酵と呼ぶことにした。⁶⁶⁾ この利点を生かし筆者らは NH_4^+ 捕捉剤を新抗生物質の探索に応用した。 NH_4^+ 捕捉剤を添加した培地でのみ生産される抗生物質を調べた結果, thiotetromycin と nanaomycin 誘導体を見いだすことが出来た。

リン酸制御を解除する方法を検討し、炭酸マグネシウムとアロフェンが優れた効果を示すことを見いだした。アロフェンは無結晶性の鉱物であり火山灰性のたい積土壌中に含まれ、我が国では園芸用カヌマ土にも含まれる。これらのリン酸捕捉剤を培地に添加したところ、培地中のリン酸濃度が低下し, tylosin, nanaomycin, candidicin などの生産が数倍増加することを見いだした。⁶⁷⁾ 我々はこれをリン酸制限発酵と呼んでいる。

I-4. ハイブリッド生合成

a. Cerulenin を用いるハイブリッド生合成 Cerulenin (**51**) は前述のようにマクロライドのラクトン部の生合成を選択的に阻害するが他の部分、例えば糖の生合成は阻害しない。ラクトン部と構造の類似する他のマク

TABLE III. Enhancement of Antibiotic Production by NH_4^+ - and PO_4^{3-} -Trapping Agents

Trapping agent	Amount added (%)	Antibiotic	Maximum antibiotic titers ($\mu\text{g/ml}$)	
			No addition	Addition
NH_4^+	Magnesium phosphate (MgP)	Leucomycin	700	3800
	Sodium phosphotungstate	Spiramycin	150	450
	Natural zeolite (ZL)	Tylosin	59	149
	MgP	Cephalosporin	400	1600 ^{a)}
	MgP	Dihydrostreptomycin	55	145
	NH_4^+ -satd. ZL	Nanaomycin	85	750
	ZL	Cerulenin	40	280
PO_4^{3-}	Kanuma tsuchi	Tylosin	70	130
	Kanuma tsuchi	Nanaomycin	110	560
	Kanuma tsuchi	Candicidin	180	530

a) Y.-Q. Shen, J. Heim, N. A. Solomon, S. Wolfe, A. L. Demain, *J. Antibiot.*, **37**, 503 (1984).

ロライドのラクトンを **51** の存在下, 培養液に加えることによって新しいアグリコンを有するハイブリッドマクロライドが得られると考えられた. そこでまず, pikromycin 生産菌 *Streptomyces* sp. No. 4900 の培養液に **51** を $40 \mu\text{g/ml}$ の割合で毎日 1 回添加し, 培養 2 日目に $50 \mu\text{g/ml}$ の protylonolide (**31**) を加えた. これをさらに 4 日間培養し, 培養液から生成した抗菌活性物質を抽出, 単離した. 本物質 (desosaminylprotylonolide) は古米らにより *Micromonospora capillata* NCRL 3940 から発見された M-4365 G₁ (**68**) と同一物質であることが分かった.⁶⁸⁾ 前述のように, **31** の絶対構造が分かっているのでこの実験により, **20** の絶対構造も明らかになった (Chart 15).

このハイブリッド生合成により種々の新マクロライドを得たが,^{69,70)} この中で最も興味あるものは chimera-mycin である. これは spiramycin のアグリコン, platenolide II (**67**) を tylosin (**20**) のそれと置き換える試みで得られたものである. Spiramycin と **20** の構造を比較すると, アグリコンの構造以外に構成糖並びに糖の結合様式が一部異っている. Spiramycin 生産菌, *S. ambofaciens* KA-448 によって, cerulenin 存在下, **31** を変換したところ新しい抗生物質 2 成分が得られ, これを chimeramycin A (**69**) 及び B (**70**) と名付けた (Chart 16).⁷¹⁾ 新規マクロライド, **69** 及び **70** の抗菌活性は親の spiramycin I (**16**) 及び **20** とほぼ同等であったが, demycarosylchimeramycin A 及び B は *Escherichia coli* などのグラム陰性菌に対してより優れた抗菌活性を有していた.

このようなハイブリッド抗生物質の生産方法は優れた抗菌活性を有する物質が得られた場合, 大量生産する方法としては適当でない. そこで我々はプロトプラスト融合などでハイブリッド抗生物質を生産する菌株の育種を試みたが, 異種間の安定な recombinant を得ることに成功しなかった.⁷²⁾

b. 遺伝子操作によるハイブリッド抗生物質の創製 前述の chimeramycin のようなハイブリッド抗生物質の生産菌を遺伝子操作によって育種することは極めて重要なことと考え, 種々の試みを行ってきたが, この中で Hopwood らと共同で行った mederrhodin A (**71**) の生産が世に最初の成功例となった.^{73,74)} Hopwood らはすでに *Streptomyces coelicolor* の生産する actinorhodin (**72**) の生合成全遺伝子のクローニングに成功しているので,⁷⁵⁾ この中から同抗生物質の 6 位の水酸化酵素遺伝子を含む領域を遺伝子ライブラリーからプラスミッド 922 に連結して得たプラスミッド pIJ 2315 によって medermycin 生産菌 *Streptomyces* sp. AM-7161 を形質転換させた. Medermycin (**73**) と **71** は異なる赤色を呈する物質なので構造上の変化を色調の変化として容易に見分けることが出来る. 寒天プレート上に生育した形質転換体のコロニー周辺に両抗生物質とは異なる色調の物質が生産されていることを認め, 液体培養して抗菌活性を有する 2 つの成分を単離した. これらは **73** の 6 位に新たに水酸基が導入された構造を有し, 両方の名前を一部ずつとって mederrhodin A (**71**) 及び B (**74**) と名付けた. 成分 B は dihydromederrhodin A である (Chart 17).

Chart 15. Hybrid Biosynthesis of M-4365 G₁ (68) from Protylonolide (31) Using a Picromycin Producing Organism in the Presence of Cerulenin (51)

Chart 16. Hybrid Biosynthesis of Chimeramycin A (69) and B (70) from Protylonolide (31) Using a Spiramycin Producing Organism in the Presence of Cerulenin (51)

Chart 17

II. 新抗生物質及びその他の生理活性物質の探索研究

β -ラクタム系抗生物質の発展はめざましいものがある。新 β -ラクタムの発見や優れた誘導体の合成により当初効果を示さなかったグラム陰性桿菌、例えば *Klebsiella pneumoniae* や *Pseudomonas aeruginosa* などにもその効力を広め、他の系統の抗生物質の役割が少なくなったかに見える。しかし、好気性細菌以外の微生物例えば、マイコプラズマや嫌気性菌による感染症にはマクロライド抗生物質や clindamycin などがそれぞれ使われており、1つの系統の抗生物質だけではまだまだ不十分である。また、真菌症あるいはフィラリア症、各種ウイルスや癌による疾病に安心して使える優れた抗生物質の発見が望まれている。微生物の代謝産物は生理活性物質の宝庫であり、この中から医薬品のみならず農薬、動物薬など実用的な抗生物質が発見されることが期待される。筆者らは種々の抗生物質及び生理活性物質の探索系を考案し、これを用いてこれまでに 65 余種近くの新物質を発見して

TABLE IV. Screening Methods and the New Compounds Found by Ōmura's Group at Kitasato (March, 1986)

Screening	Compounds
Antibacterial	A-73A, aurantinins, factumycin, kinamycins, KM-8, LA-1, leucomycins, takaokamycin
Bacterial cell wall synthesis inhibitor and antimycoplasmal	Asukamycin, azureomycins, nanaomycins, setomimycin, vineomycins, izuzeptin, 2'-amino-2'-deoxyadenosine, cervinomycins, frenolicin B, OM-173
Antifolate	Diazaquinomycins
Antianaerobic	Clostomicin, luminamicin, lustromycin, thiotetromycin
Antiviral	Virantmycin, virustomycin
Antifungal	AF-8 (alboleutin), cerulenin, irumamycin, 0-2867 prumycin
Antiparasitic	Avermectins, hitachimycin (stubomycin), setamycin, KP-197
Anticancer	OS-3256B, sporamycin, sohbumycin
Herbicidal	Herbimycins, karabemycin, oxetin, phosalacine
Penicillinase inhibitor	KA-107
Protease inhibitor	Ahpatinin
Fatty acid activation inhibitor	Triacsin
Elastase inhibitor	Elasnin
Platelet aggregation inhibitor	Aggregeride
Alkaloid (chemical screening)	AM-2504 (prolimycin), 1,3-diphenethylurea, herquiline, NA-338A, neoxaline, pyridicin, quinoline-2-methanol, staurosporine, TM-64 (narcoactine)
Hybrid biosynthesis	Chimeramycins, mederrhodins
Others	Irumanolides, protylonolide

きたが、この中のいくつかはすでに実用化もしくは開発研究の途上にある (Table IV).

本章ではこれ迄に行ってきた種々の探索系について代表的なものをとりあげ、系を確立するに至った背景、方法及びこれにより発見された新物質の構造、合成、作用機序などについて述べる。

II-1. 細菌の細胞壁合成阻害剤 (CSI) と抗マイコプラズマ物質

細胞壁を持たないマイコプラズマに CSI は効力を示さない。そこでマイコプラズマと通常の細菌との抗菌力を比較して CSI の探索と同時にマイコプラズマに有効な薬剤の探索を行った。⁷⁶⁾ Fig. 6 に示すように *Acholeplasma laidlawii* 及び *Bacillus subtilis* 両菌に活性を示すものは除き、かつ CSI 探索の二次系として細菌の細胞壁の特異的な前駆体である [³H]diaminopimelic acid (A₂pm) とタンパク質に取り込まれる [¹⁴C]ロイシンの *Bacillus* sp. ATCC 21206 (A₂pm⁻) の酸不溶性分画への取り込み阻害を調べた。そして前者の取り込みを選択的に阻害する物質を探索した。この探索系によって新しい CSI, azureomycin (75),⁷⁷⁾ izupeptin (76)⁷⁸⁾ を発見した。他に既知物質, 3-amino-3-deoxy-D-glucose^{79,80)} 及び amphomycin^{81,82)} が細菌の細胞壁を特異的に阻害することを見だし、その作用機序を明らかにした。

Fig. 6. Screening for Inhibitors of Bacterial Cell Wall Synthesis and Antimycoplasmal Antibiotics

抗マイコプラズマ物質としては nanaomycin, frenolicin B 及び cervinomycin を発見した。この探索過程で、3 種の新生物質, asukamycin, setomimycin 及び vineomycin を発見した。以下これらの新抗生物質について記す。

a. Azureomycin Azureomycin は *Pseudonocardia azurea* によって生産される vancomycin タイプの糖ペプチド物質である。⁷⁷⁾ *Bacillus megaterium* KM, *Bacillus cereus* T を用いて作用機序の研究を行い、本物質によって uridine-5'-diphosphate-*N*-acetyl-muramyl (UDP-MurNAc) peptide(s) が蓄積することを見いだした。このことから本抗生物質の作用点は細菌の細胞壁合成経路の UDP-MurNAc peptide(s) の形成以後であると判断される。⁸⁸⁾ また, azureomycin は uridine-5'-diphosphate-[¹⁴C]-*N*-acetyl-glucosamine (UDP-[¹⁴C]GlcNAc) と UDP-MurNAc-pentapeptide とを基質とする顆粒画分による酵素反応を阻害しないことなどから、この作用点は Fig. 7 に示すとおり polymerase によるリピッドと結合する二糖ペプチドのペプチドグリカン受容前駆体への転移にあると考えられる。⁸⁴⁾

b. Nanaomycin Nanaomycin は *Streptomyces rosa* var. *notoensis* の生産するベンゾイソクロマンキノン系抗生物質であり、成分として nanaomycin A (77), B (78), C (79), D (80) 及び E (81) を含む (Chart 18).⁸⁵⁻⁸⁷⁾ 成分 D が kalafungin (82) の enantiomer であることが CD スペクトルの測定によって判明した。⁸⁸⁾ このことから他の成分の 9 位及び 11 位の配位を決定した。本抗生物質は当初は抗マイコプラズマ物質として発見されたものであるが、マイコプラズマの他にグラム陽性菌、陰性菌、カビ、酵母などに広い抗微生物活性を示す。⁸⁹⁾ 抗マイコプラズマ物質としては実用化されなかったが、その後の研究でモルモットの実験的白癬菌 (*Trichophyton mentagraphytes*) 感染に対して優れた治療効果を示すことを見いだされ、⁹⁰⁾ さらに野外試験でウシの皮膚白癬菌症に著効を示すことが確かめられ、⁹¹⁾ 動物用抗真菌剤として実用化されるに至った。

Fig. 7. Biosynthetic Pathway of Cell Wall Peptidoglycan and Its Inhibitors Screened in This Work

Chart 18

77 は *staphylococcus aureus* においてタンパク質, DNA, RNA 及び細胞壁の生合成を一様に阻害する一方, 外呼吸を上昇させた. また nanaomycin であらかじめ処理した細胞は Ca^{2+} 及び Mg^{2+} -ATPase の阻害剤である N,N' -dicyclohexylcarbodiimide の添加によって水素イオンの流入の上昇を起こした. これらの現象を合わせて本抗生物質は細胞質膜に作用し, 酸化的リン酸化反応を阻害することによって二次的にタンパク質, 核酸及び細胞壁ペプチドグリカンに阻害すると推定した.⁹²⁾ 一方, 海洋微生物 *Vibrio alginolyticus* を用いる実験で成分 77 及び 78 は共に本菌の呼吸系に連結している flavin dehydrogenase によって還元型になり, 次いで分子状態酸素によって自動酸化されることが分かった. この際に発生する細胞膜上の O_2^- が細胞に細菌的に作用することが本抗生物質の作用機序であると示唆された.⁹³⁾ しかし, この系統の抗生物質がアルキル化剤としても作用するとする仮説⁹⁴⁾もあり結論は今後の研究に待たなければならない.

Nanaomycin の成分間の生合成上の関連を明らかにするため, cerulenin 存在下でこれらの各成分がどのような成分に変換されるかを調べ,⁹⁵⁾ 次いで酵素系で各生合成段階を確認した (Chart 19). このうち成分 80 から 77 への変換酵素 (nanaomycin D reductase) は硫酸分画, DEAE-cellulose, DE-52, Sephadex G-100 及び hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーにより polyacrylamide ゲル電気泳動で単一バンドを示すまでに精製する

Chart 19. Proposed Biosynthetic Pathway of Nanaomycins by *S. rosa* subsp. *notoensis*

ことが出来た。本酵素は分子量 68000 の flavin adenine dinucleotide (FAD) を有するタンパク質であり、至適 pH 及び温度はそれぞれ 5.0 及び 37°C であり、反応には nicotinamide adenine dinucleotide の還元型 (NADH) を必要とし、Cu²⁺ により阻害された。成分 77 から 81 への変換、すなわちエポキシ形成は nicotinamide adenine dinucleotide phosphate の還元型 (NADPH) と O₂ とを要求する monooxygenase により触媒される。第 3 の酵素、エポキシの開裂は NADH 又は NADPH を要求する nanaomycin B synthase によって行われる。⁹⁸⁻⁹⁹⁾ 天然物においてエポキシが開裂する場合はジオールを形成するのが一般的であるが、このように 1 個の水酸基を生ずる反応はこれが最初の例で、その後同様の反応が 24-(S)-25-epoxycholesterol のエポキシ開裂反応で報告された。⁹⁹⁾

c. **Frenolicin B** Frenolicin B (83) は *Streptomyces roseofulvus* AM-3867 により生産される抗マイコプラズマ物質として単離された。¹⁰⁰⁾ 83 の立体配位 (1R, 3R, 4R) は 82 のそれと一致している。その後、本抗生物質は優れた抗コクシジウム活性を有することが明らかにされ、¹⁰¹⁾ その活性は市販されているポリエーテル系抗生物質 salinomycin に匹敵し、目下実用化に向けて研究を行っている。

d. **Cervinomycin** 新放線菌, *S. cervinus* nov. sp. の生産する cervinomycin A₁ (84) 及び A₂ (85) は *in vitro* でマイコプラズマのみならず、嫌気性菌, *Clostridium perfringens*, *Peptococcus prevotii* 及び *Bacteroides fragilis* などに強い抗菌活性を示すことを特徴とする。¹⁰²⁾ 本物質はキサントン骨核を含む新しいタイプの構造を有し、85 はキノン骨核を有する (Chart 20).¹⁰³⁾ 成分 84 のトリアセチル誘導体は各種嫌気性菌に母体よりも強い活性を示し、市販の clindamycin と同程度かあるいはそれ以上の効果を有し、毒性も低いことから実用化が期待される。¹⁰⁴⁾

e. **Asukamycin** *S. nodosus* subsp. *asukaensis* の培養液から見い出された asukamycin (86) は *Staphylococcus aureus*, *Nocardia asteroides* などに抗菌活性を示すが、グラム陰性菌には抗菌力を示さない。¹⁰⁵⁾ 本抗生物質は CSI の一次探索系ではマイコプラズマに活性を示さず、CSI の可能性があったが、二次系では [³H]A₂pm 及び [¹⁴C]L-ロイシンの取り込み阻害に特異性がみられなかった。しかし、粗物質を用いての抗コクシジウム試験においてモネンシンと同程度の強い活性を示し、しかも UV 吸収スペクトルなどから推察して新規性が高いと考えられたので精製を進め発見したものである。本物質は

Chart 20

非常に新規な構造¹⁰⁶⁾を有し、生合成的にも興味を持たれた。[2-¹³C, ¹⁵N]グリシンの取り込み実験から、アミノサイクロペンテノン部の C-2'' の ¹³C シグナルが J_{CN} 17.6 Hz をもってカップリングし三重線を示すことから、グリシンの C-N 結合の開裂が起こることなく取り込まれることを確認した。さらに、[U-¹³C₃]グリセロールの取り込み結果と合わせて、2-amino-3-hydroxy-cyclopent-2-enone 部は 5-aminolevulinic acid を直接の生合成前駆体として PLP(pyridoxalphosphate)-酵素の関与により分子内閉環反応によって取り込まれることを明らかにした (Fig. 8).¹⁰⁷⁾

Fig. 8. Biosynthetic Pattern of Asukamycin (86)

f. Setomimycin Setomimycin (87) も CSI 探索のいわば副産物として、*S. pseudovenezuelae* の培養液より発見されたものである。*Staphylococcus aureus* や *Bacillus subtilis* などのグラム陽性菌に抗菌活性を示し、また、マウスの sarcoma-180 固形癌にも抗癌活性を示した。¹⁰⁸⁾ 本物質は放線菌から単離された初めての 9,9'-bis-anthracene 骨格を有する化合物である。その炭素骨格は2つのポリケチド鎖から形成される (Fig. 9).¹⁰⁹⁾

Fig. 9. Biosynthesis of Setomimycin (87)

g. Vineomycin 本抗生物質も CSI の探索過程での副産物として *S. matensis* subsp. *vineus* の培養液より発見された。¹¹⁰⁾ 成分 A₁ (88), A₂, B₁ 及び B₂ (89) が見いだされており、いずれもグラム陽性菌に有効であると同時に成分 88 は sarcoma 固型癌に効果を示す。これらは後にその構造^{111,112)} から、イソテトラセノン抗生物質¹¹³⁾と総称されるようになった一群の抗生物質に含まれるものである。成分 88 及び 89 のアグリコン部の生合成上の関連は [1,2-C₂] 酢酸の取り込み様式から、88 の D 環開裂により 89 が生合成される (Fig. 10).¹¹⁴⁾

II-2. 葉酸関連代謝阻害剤

葉酸の代謝系は化学療法剤の標的として重要である。^{115,116)} Fig. 11 には抗癌剤として用いられている methotrexate (MT),¹¹⁷⁾ 抗菌剤 trimethoprim (TP)¹¹⁸⁾ 並びに生体内で 5-fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) となって作用する 5-fluorouracil の作用部位を示した。Tetrahydrofolic acid (THF) 及びこの関連化合物はセリン、プリン及びピリミジンヌクレオチドなどの生合成において炭素1個を付加する反応に関与しているが、動物ではこの生合成系が欠除しており、ビタミンとして補給される。多くの細菌では THF の生合成系を

Fig. 10. The Structures and Biosynthetic Patterns of Vineomycins A₁ (88) and B₂ (89)

Fig. 11. Folate Metabolism and Inhibitors

持つものの、外部より葉酸あるいは関連化合物を取り込むことが出来ないため **sulfonamide** などによってこの生合成が阻害されると生育が阻止される。一方、一部の細菌、例えば葉酸の生物検定に用いられる *Enterococcus faecium* は葉酸の生合成系に欠陥があるものの細胞の外部から同関連物質を取り込んで生育出来る。葉酸関連物質が多量に存在することによって抗生物質による同菌の生育阻害が解除される場合にはその抗生物質は葉酸の代謝系に作用するものと考えられる。

a. Diazaquinomycin この原理に基づいて確立した探索系¹¹⁹⁾により、天然物としては初めての thymidylate synthase 阻害剤, diazaquinomycin A (90) 及び B (91) を発見した (Chart 21).¹²⁰⁾

本抗生物質名は 1,8-diazaanthraquinone 骨格を有することに由来し、成分 91 は 90 の 9,10-ジヒド

Chart 21

Fig. 12. Biosynthetic Origins of Hitachimycin (92)

ロ体である。¹²¹⁾ Diazaquinomycin は 5,10-methylenetetrahydrofolate と拮抗的に *E. faecium* 及び Ehrlich ascites carcinoma の thymidylate synthase を阻害する。¹²²⁾

II-3. 抗寄生虫抗生物質

ニワトリのコクシジウム症やヒトのトリコモナス症、それにオンコセルカ症など原虫や蠕虫による疾病に用いられる化学療法剤はきわめて限られている。毒性が強いとか抗寄生虫スペクトルが狭いと云ったものが多く、新規なより優れた化学療法剤が要望されている。筆者らは *Trichomonas foetus*, *Eimeria tenella* などの原虫, *Bursaphelenchus lignicolus*, *Nematospiroides dubius* などの蠕虫を用いる探索系によって, hitachimycin (stubomycin) 及び avermectin を発見した。

a. Hitachimycin (Stubomycin) Hitachimycin (92)¹²³⁾ は放線菌 KM-4927 株 (stubomycin¹²⁴⁾ では *Streptomyces* sp. KG-2245) の生産するアンサマイシン系には属さない新しい大環ラクタム抗生物質である。¹³C 標識前駆体を用いる生合成研究により, 8 分子の酢酸, 1 分子のプロピオン酸及び 1 分子のフェニルアラニン, メチオニンのメチルから由来する (Fig. 12)。フェニルアラニンがポリケチドのスターターとなった生合成例はめずらしく,¹²³⁾ ラクタム窒素はフェニルアラニンの α -アミノ基が β 位に分子内転位したものであることを [$1\text{-}^{13}\text{C}$, ^{15}N]-フェニルアラニンの取り込み実験により確認した。

Chart 22

	R ₁	R ₂	R ₃
A _{1a} (93)		C ₂ H ₅	CH ₃
A _{1b} (94)		CH ₃	CH ₃
A _{2a} (95)	OH	C ₂ H ₅	CH ₃
A _{2b} (96)	OH	CH ₃	CH ₃
B _{1a} (97)		C ₂ H ₅	H
B _{1b} (98)		CH ₃	H
B _{2a} (99)	OH	C ₂ H ₅	H
B _{2b} (100)	OH	CH ₃	H

Where R₁ is absent, the double bond (---) is present.
Both sugars are α -L-oleandrose.

TABLE V. Pathogenic Organisms (病原生物)

Viruses (ウイルス)

Procaryotes (原核細胞生物) — Schizomycetes (細菌)

— Fungi (真菌)

— Protozoa (原生動物)

Eucaryotes (真核細胞生物)

— Helminths (蠕虫類)

— Platyhelminthes (扁形動物)

Trematoda (吸虫類)

Cestoda (条虫類)

— Nematelminthes (線形動物)

Nematoda (線虫類)

Acanthocephala (鉤頭虫類)

Nematomorpha (鉄線虫類)

— Arthropoda (節足動物)

— Arachnida (蜘蛛類)

— Insecta (昆虫類)

b. Avermectin Avermectin は *S. avermitilis* によって生産される 16 員環マクロライドである (Chart 22).¹²⁵⁾ 二糖部, oleandrosyleandrose 部を除くアグリコン部は抗ダニ物質として発見された milbemycin¹²⁶⁾ に近似している. Avermectin は Table V に示すように節足動物や線虫類, 鉤頭虫類及び鉄線虫類に有効であり, これ迄の抗寄生虫薬に比較して活性も極めて強く, 抗寄生虫スペクトルも広い. 成分 B_{1a} (97) 及び B_{1b} (98) のジヒドロ体の混合物が ivermectin と呼ばれ, 現在家畜の消化管寄生虫や皮膚寄生のダニなどに広く使用されている. 最近, ヒトのオンコセルカ症に有効であることが確認され注目を集めている.^{127,128)} また, avermectin そのものは抗ダニ薬として農薬に使われている.

Avermectin の作用機序の研究も多くの人々により行われており, これ迄の研究を総合すると蠕虫や節足動物の神経伝達物質, γ -aminobutyric acid (GABA) のアゴニストとして働き, 抗寄生虫作用を現わすと考えられているが,¹²⁹⁾ 詳細については今後の研究を待たねばならない.

II-4. 除草剤

放線菌の培養液を直接イネ又は雑草を用いるポット試験にかけることによって除草活性物質を探索し, herbimycin を発見した. また除草剤の中には植物のグルタミン酸からグルタミンへの生合成を阻害することにより, 植物組織に NH_4^+ を蓄積させ, この毒性により植物を枯死させる作用を有するものが知られている.¹³⁰⁾ そこで合成培地中での細菌の生育阻害がグルタミンによって解除される物質を放線菌の代謝産物から探索し, phosalacine と oxetin を発見した.

a. Herbimycin Herbimycin は *S. hygroscopicus* の生産する抗生物質で成分 A (101), B (102) 及び C (103) から成る (Chart 23). 本物質はイネを除く単子葉及び双子葉植物に対して共に強い除草活性を示した.¹³¹⁾ 本物質の構造決定は ^{13}C 標識前駆体を用いる生合成手段をも併用した ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトル解析を中心に行われ,¹³²⁾ その結果は更に X線結晶解析により確認した.¹³³⁾ Herbimycin はベンゾキノイド系アンサマイシンに分類される. また, 抗癌活性を有することに注目し, 化学修飾を行い, 優れた活性を有する誘導体 (104) も得られた. 本化合物はマウスを用いる実験で IMC carcinoma (T/C=358%), Ehrlich carcinoma (同 205), sarcoma 180 (同 200) などに優れた活性を示した.¹³⁴⁾

Chart 23

b. Phosalacine グルタミン代謝阻害剤として発見された phosalacine (105) は放線菌の新しい属, *Kitsatospora* KA 338 の生産するトリペプチド (L-phosphinothricyl-L-alanyl-L-leucine) である (Chart 24).^{135,136)}

Chart 24

この物質は合成培地上で *Bacillus subtilis* のみならず, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli* KB 213, *Piricularia oryzae* KF 180 などに抗菌, 抗カビ活性を示すが, 天然培地を用いた場合にはこのような抗微生物活性を示さない. 本物質はマウス経口投与で LD_{50} 500 mg/kg 以上と低毒性である. 本物質は単子葉並びに双子葉植物に幅広い除草活性を示すことから, 非選択的な除草剤としての開発が期待される.

c. **Oxetin** Oxetin (106) は *Streptomyces* sp. OM-2317 の生産する除草活性物質で, 天然では初めての oxetane 環を有し, X線結晶解析により (2*R*,3*S*)-3-amino-2-oxetane carboxylic acid と決定された (Chart 24).¹⁸⁷⁾ 本物質はアルファルファ (*Medicago sativa*) 及びかぶら (*Brassica rapa*) などに 125 μ g/ml の濃度で除草活性を示すが, phosalacine に比較して弱い.

II-5. 農薬用抗真菌剤

a. **Prumycin** 植物病原菌 *Sclerotinia* sp. 及び *Botrytis* sp. に *in vitro* で活性を示す物質を探索し, *Streptomyces kagawaensis* と名付けた放線菌の培養液から prumycin (105) を発見した.¹⁸⁸⁾ *O*-Acetyl-*N,N'*-bisbenzoyloxycarbonyl 体及び *N,N'*-acetyl 体の ¹H 及び ¹³C-NMR スペクトル解析などにより本物質の構造を 4-D-alanyl-amino-2-amino-3,4-dideoxy-L-arabinose と決定した (Chart 25).¹⁸⁹⁾ 105 は *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* などの植物病原菌に強い活性を示し, 発見当時, 野外試験でも優れた抗真菌活性がみられたが, 生産性が低く実用化に至らなかった. しかし, 今後遺伝子操作などによる育種で生産性の向上に成功すれば実用化されるものと期待される.

Chart 25

おわりに

微生物の二次代謝産物の研究は約半世紀の間に抗生物質を中心に大きな発展を遂げて来た. 今後共, 簡便でかつ適切な探索系を確立し, 研究を進めることにより種々の疾病に対して有用かつ興味ある生理活性物質が発見されると思われる. また非検材料が微生物から動物細胞へ, 実験動物から細胞へ, また酵素から細胞へと云った細胞化へ向けた研究がこの分野において重要性を増すものと思われる.

引用文献および注

- 1) T. Hata, Y. Sano, N. Ohki, Y. Yokoyama, A. Matsumae, S. Ito, *J. Antibiot.*, **6**, 87 (1953).
- 2) S. Ōmura, M. Katagiri, H. Ogura, T. Hata, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 1181 (1968).
- 3) S. Ōmura, A. Nakagawa, M. Katagiri, T. Hata, M. Hiramatsu, T. Kimura, K. Naya, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1501 (1970).
- 4) S. Ōmura, A. Nakagawa, M. Otani, T. Hata, H. Ogura, K. Furuhashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3401 (1969).
- 5) S. Ōmura, M. Tishler, A. Nakagawa, Y. Hironaka, T. Hata, *J. Med. Chem.*, **15**, 1011 (1972).
- 6) M. Hiramatsu, A. Furusaki, T. Noda, K. Naya, Y. Tomiie, I. Nitta, T. Watanabe, T. Take, J. Abe, S. Ōmura, T. Hata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **43**, 1966 (1970).
- 7) L. A. Freiberg, R. S. Egan, W. H. Washburn, *J. Org. Chem.*, **39**, 2474 (1974).
- 8) S. Ōmura, A. Nakagawa, K. Suzuki, T. Hata, *J. Antibiot.*, **27**, 370 (1974).
- 9) A. Ducruix, C. Pascard, A. Nakagawa, S. Ōmura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1976**, 947.
- 10) S. Ōmura, M. Katagiri, T. Hata, *J. Antibiot.*, **21**, 199 (1968).
- 11) S. Ōmura, M. Katagiri, T. Hata, *J. Antibiot.*, **21**, 272 (1968).
- 12) S. Pinnert-Sindico, L. Ninet, J. Preud'Homme, C. Cosar, *Antibiot. Ann.*, **1954**, 724.
- 13) M. E. Kuehne, B. W. Benson, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4660 (1965).
- 14) S. Ōmura, H. Tanaka, "Macrolide Antibiotics—Chemistry, Biology and Practice," ed. S. Ōmura, Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, 1984, p. 3.
- 15) S. Ōmura, A. Nakagawa, A. Neszmelyi, S. D. Gero, A.-M. Sepulchre, F. Piriou, G. Lukacs, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 4001 (1975).

- 16) A. Neszmelyi, S. Ōmura, G. Lukacs, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1976**, 97.
- 17) A. Neszmelyi, S. Ōmura, T. T. Thang, G. Lukacs, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 725.
- 18) S. Ōmura, A. Nakagawa, M. Machida, H. Imai, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 1045.
- 19) S. Ōmura, C. Kitao, H. Matsubara, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1963 (1980).
- 20) S. Ōmura, H. Matsubara, A. Nakagawa, A. Furusaki, T. Matsumoto, *J. Antibiot.*, **33**, 915 (1980).
- 21) P. Bartner, D. L. Boxler, R. Brambilla, A. K. Mallams, J. B. Morton, P. Reichert, F. D. Sancilio, H. Suprenant, G. Tomalesky, G. Lukacs, A. Olesker, T. T. Thang, L. Valente, S. Ōmura, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, **1979**, 1600.
- 22) S. Ōmura, Y. Tanaka, A. Nakagawa, Y. Iwai, M. Inoue, H. Tanaka, *J. Antibiot.*, **35**, 256 (1982).
- 23) S. Ōmura, A. Nakagawa, Y. Tanaka, *J. Org. Chem.*, **47**, 5413 (1982).
- 24) A. Nakagawa, Y. Tanaka, K. Otoguro, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **38**, 1266 (1985).
- 25) S. Ōmura, A. Nakagawa, N. Imamura, K. Kushida, C.-M. Liu, L. H. Sello, J. W. Westley, *J. Antibiot.*, **38**, 674 (1985).
- 26) S. Ōmura, H. Shimizu, Y. Iwai, K. Hinotozawa, K. Otoguro, H. Hashimoto, A. Nakagawa, *J. Antibiot.*, **35**, 1632 (1982).
- 27) S. Ōmura, N. Imamura, K. Hinotozawa, K. Otoguro, G. Lukacs, R. Faghieh, R. Tolmann, B. H. Arison, J. L. Smith, *J. Antibiot.*, **36**, 1783 (1983).
- 28) S. Ōmura, M. Katagiri, I. Umezawa, K. Komiyama, T. Maekawa, K. Sekikawa, A. Matsumae, T. Hata, *J. Antibiot.*, **21**, 532 (1968).
- 29) S. Pestka, A. Nakagawa, S. Ōmura, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **6**, 606 (1974).
- 30) S. Ōmura, A. Nakagawa, H. Sakakibara, O. Okakawa, R. Brandsch, S. Pestka, *J. Med. Chem.*, **20**, 732 (1977).
- 31) H. Sakakibara, O. Okekawa, T. Fujiwara, M. Otani, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **34**, 1001 (1981).
- 32) H. Sakakibara, O. Okekawa, T. Fujiwara, M. Aizawa, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **34**, 1011 (1981).
- 33) 第31回 日本化学療法学会総会新薬シンポジウム IV.
- 34) S. Ōmura, H. Sano, T. Sunazuka, *J. Antimicrob. Chemother.*, **16**, suppl. A, 1 (1985).
- 35) 大村 智, 榊原秀夫, 発酵と工業, **37**, 1171 (1979).
- 36) H. Sakakibara, S. Ōmura, "Macrolide Antibiotics—Chemistry, Biology, and Practice," ed. S. Ōmura, Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, 1984, p. 85.
- 37) H. Tanaka, I. Moriguchi, S. Hirono, S. Ōmura, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2803 (1985).
- 38) H. Matsubara, K. Miyano, A. Nakagawa, S. Ōmura, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 97 (1982).
- 39) S. Ōmura, J. Inokoshi, H. Matsubara, H. Tanaka, *J. Antibiot.*, **36**, 1709 (1983).
- 40) H. Matsubara, J. Inokoshi, A. Nakagawa, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **36**, 1713 (1983).
- 41) S. Ōmura, H. Matsubara, K. Tsuzuki, A. Nakagawa, *J. Antibiot.*, **37**, 1007 (1984).
- 42) S. Ōmura, K. Miyano, H. Matsubara, A. Nakagawa, *J. Med. Chem.*, **25**, 271 (1982).
- 43) H. V. Kuder, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1**, 604 (1960).
- 44) Z. Itoh, T. Suzuki, M. Nakaya, M. Inoue, S. Mitsuhashi *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**, 863 (1984).
- 45) S. Ōmura, K. Tsuzuki, T. Sunazuka, H. Toyota, I. Takahashi, Z. Itoh, *J. Antibiot.*, **38**, 1631 (1985).
- 46) S. Ōmura, K. Tsuzuki, T. Sunazuka, I. Takahashi, Z. Itoh, Abstracts of the 25th ICAAC, Mineapolis, USA, 1985, p. 302.
- 47) H. Grisebach, C. A. Weber-Schilling, *Naturforsch.*, **23**, 655 (1968).
- 48) S. Ōmura, A. Nakagawa, H. Takeshima, K. Atsumi, J. Miyazawa, F. Piriou, G. Lukacs, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6600 (1975).
- 49) S. Ōmura, H. Takeshima, A. Nakagawa, J. Miyazawa, F. Piriou, G. Lukacs, *Biochemistry*, **16**, 2860 (1977).
- 50) S. Ōmura, K. Tsuzuki, A. Nakagawa, G. Lukacs, *J. Antibiot.*, **36**, 611 (1983).
- 51) S. Ōmura, K. Tsuzuki, Y. Tanaka, H. Sakakibara, M. Aizawa, G. Lukacs, *J. Antibiot.*, **36**, 614

- (1983).
- 52) S. Posisil, S. Sedmera, M. Havranek, V. Krumphanzl, Z. Vanek, *J. Antibiot.*, **36**, 617 (1983).
- 53) S. Ōmura, N. Sadakane, C. Kitao, H. Matsubara, A. Nakagawa, *J. Antibiot.*, **33**, 913 (1980).
- 54) S. Ōmura, *Bact. Rev.*, **40**, 681 (1976).
- 55) S. Ōmura, "Method in Enzymology," ed. J. M. Lowenstein, Academic Press, New York, 1981, p. 520.
- 56) S. Ōmura, N. Sadakane, H. Matsubara, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 223 (1982).
- 57) S. Ōmura, H. Tomoda, S. Yamamoto, M. Tsukui, H. Tanaka, *Biochem. Biophys. Acta*, **802**, 141 (1984).
- 58) T. Furumai, Y. Seki, K. Takeda, A. Kinumaki, M. Suzuki, *J. Antibiot.*, **26**, 708 (1973).
- 59) S. Ōmura, C. Kitao, H. Hamada, H. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 176 (1979).
- 60) S. Ōmura, H. Ikeda, C. Kitao, *J. Biochem.*, **86**, 1753 (1979).
- 61) C. Kitao, H. Hamada, H. Ikeda, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **32**, 1055 (1979).
- 62) S. Ōmura, Y. Tanaka, C. Kitao, H. Tanaka, Y. Iwai, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **18**, 691 (1980).
- 63) S. Ōmura, Y. Tanaka, H. Mamada, R. Masuma, *J. Antibiot.*, **37**, 494 (1984).
- 64) S. Ōmura, A. Taki, K. Matsuda, Y. Tanaka, *J. Antibiot.*, **37**, 1362 (1984).
- 65) S. Ōmura, Y. Tanaka, H. Mamada, R. Masuma, *J. Antibiot.*, **36**, 1792 (1983).
- 66) R. Masuma, Y. Tanaka, S. Ōmura, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 607 (1983).
- 67) R. Masuma, Y. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **39**, 813 (1986).
- 68) S. Ōmura, H. Ikeda, H. Matsubara, N. Sadakane, *J. Antibiot.*, **33**, 1570 (1980).
- 69) N. Sadakane, Y. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **36**, 680 (1983).
- 70) N. Sadakane, Y. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **36**, 921 (1983).
- 71) S. Ōmura, N. Sadakane, Y. Tanaka, H. Matsubara, *J. Antibiot.*, **36**, 927 (1983).
- 72) H. Ikeda, M. Inoue, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **37**, 1224 (1984).
- 73) D. A. Hopwood, F. Malphartida, H. M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. M. Rudd, H. G. Floss, S. Ōmura, *Nature* (London), **309**, 642 (1985).
- 74) S. Ōmura, H. Ikeda, F. Malphartida, H. M. Kieser, D. A. Hopwood, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **29**, 13 (1986).
- 75) F. Malphartida, D. A. Hopwood, *Nature* (London), **309**, 462 (1984).
- 76) S. Ōmura, H. Tanaka, R. Ōiwa, T. Nagai, Y. Koyama, Y. Takahashi, *J. Antibiot.*, **32**, 978 (1979).
- 77) S. Ōmura, H. Tanaka, Y. Tanaka, P. Spiri-Nakagawa, R. Ōiwa, Y. Takahashi, K. Matsuyama, Y. Iwai, *J. Antibiot.*, **32**, 985 (1979).
- 78) 田中晴雄, 前橋一紀, P. Spiri-Nakagawa, 福士由紀子, 今村信孝, 高橋洋子, 田中芳武, 大村 智, 日本薬学会第106年会(千葉)講演要旨, 1986, p. 289.
- 79) Y. Iwai, H. Tanaka, R. Ōiwa, S. Shimizu, S. Ōmura, *Biochem. Biophys. Acta*, **498**, 223 (1977).
- 80) H. Tanaka, S. Shimizu, R. Ōiwa, Y. Iwai, S. Ōmura, *J. Biochem.*, **86**, 155 (1979).
- 81) H. Tanaka, R. Ōiwa, S. Matsukura, S. Ōmura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 902 (1979).
- 82) H. Tanaka, R. Ōiwa, S. Matsukura, J. Inokoshi, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **35**, 1216 (1982).
- 83) P. Spiri-Nakagawa, Y. Tanaka, R. Ōiwa, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **32**, 995 (1979).
- 84) P. Spiri-Nakagawa, R. Ōiwa, Y. Tanaka, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Biochem.*, **88**, 565 (1980).
- 85) S. Ōmura, H. Tanaka, Y. Koyama, R. Ōiwa, M. Katagiri, J. Awaya, T. Nagai, T. Hata, *J. Antibiot.*, **27**, 363 (1974).
- 86) H. Tanaka, H. Marumo, T. Nagai, M. Okada, K. Taniguchi, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **28**, 925 (1975).
- 87) M. Kasai, K. Shirahata, S. Ishi, K. Mineura, H. Marumo, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiotics*, **32**, 442 (1975).
- 88) S. Ōmura, H. Tanaka, Y. Okada, H. Marumo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1976**, 320.
- 89) H. Tanaka, Y. Koyama, J. Awaya, H. Marumo, R. Ōiwa, M. Katagiri, T. Nagai, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **27**, 860 (1974).
- 90) 北浦吉三, 荒木義孝, 丸茂博大, 大村 智, *Jpn. J. Antibiot.*, **33**, 728 (1980).
- 91) 浜名克己, 津田和幸, 椎 信義, 獣医畜産新報, **697**, 468 (1979).

- 92) H. Marumo, K. Kitaura, M. Marimoto, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **33**, 885 (1980).
- 93) M. Hayashi, T. Unemoto, S. Minami-Kakimura, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **35**, 1078 (1982).
- 94) H. W. Moore, R. Czerniak, *Med. Res. Rev.*, **1**, 249 (1981).
- 95) C. Kitao, H. Tanaka, S. Minami, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **33**, 711 (1980).
- 96) S. Ōmura, H. Tanaka, S. Minami, I. Takahashi, *J. Biochem.*, **90**, 355 (1981).
- 97) H. Tanaka, S. Minami-Kakinuma, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **35**, 1565 (1982).
- 98) S. Ōmura, S. Minami, H. Tanaka, *J. Biochem.*, **90**, 291 (1981).
- 99) S. R. Steckbeck, J. A. Nelson, T. A. Spencer, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 983 (1982).
- 100) Y. Iwai, A. Kora, Y. Takahashi, T. Hayashi, J. Awaya, R. Masuma, R. Ōiwa, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **31**, 959 (1978).
- 101) S. Ōmura, K. Tsuzuki, Y. Iwai, M. Kishi, S. Watanabe, H. Shimizu, *J. Antibiot.*, **38**, 1447 (1985).
- 102) S. Ōmura, Y. Iwai, K. Hinotozawa, Y. Takahashi, J. Kato, A. Nakagawa, *J. Antibiot.*, **35**, 645 (1982).
- 103) S. Ōmura, A. Nakagawa, K. Kushida, G. Lukacs, *J. Am. Chem. Soc.*, in press.
- 104) A. Nakagawa, Y. Iwai, H. Shimizu, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, in press.
- 105) S. Ōmura, C. Kitao, H. Tanaka, R. Ōiwa, Y. Takahashi, A. Nakagawa, M. Shimada, Y. Iwai, *J. Antibiot.*, **29**, 876 (1976).
- 106) K. Kakinuma, N. Ikekawa, A. Nakagawa, S. Ōmura, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3402 (1979).
- 107) A. Nakagawa, T.-S. Wu, P. J. Keller, J. P. Lee, S. Ōmura, H. G. Floss, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 519.
- 108) S. Ōmura, H. Tanaka, Y. Iwai, K. Nishigaki, J. Awaya, Y. Takahashi, R. Masuma, *J. Antibiot.*, **31**, 1091 (1978).
- 109) K. Kakinuma, N. Imamura, N. Ikekawa, H. Tanaka, S. Minami, S. Ōmura, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7493 (1980).
- 110) S. Ōmura, H. Tanaka, R. Ōiwa, J. Awaya, R. Masuma, Y. Tanaka, *J. Antibiot.*, **30**, 908 (1977).
- 111) N. Imamura, K. Kakinuma, N. Ikekawa, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **34**, 1517 (1981).
- 112) N. Imamura, K. Kakinuma, N. Ikekawa, H. Tanaka, S. Ōmura, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1788 (1981).
- 113) Y. Hayashi, T. Iwakiri, K. Imamura, H. Seto, N. Otake, *J. Antibiot.*, **38**, 957 (1985).
- 114) N. Imamura, K. Kakinuma, N. Ikekawa, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **35**, 602 (1982).
- 115) H. C. S. Wood, *Chem. Ind.*, **7**, 150 (1981).
- 116) H. G. Hitchings, J. J. Burchall, *Adv. Enzymol.*, **27**, 417 (1965).
- 117) W. C. Werkheiser, *Cancer Res.*, **23**, 1277 (1963).
- 118) P. G. Wormser, G. T. Keusch, "Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 68, Inhibition of Folate Metabolism in Chemotherapy," ed. G. H. Hitchings, P. L. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983.
- 119) S. Ōmura, M. Murata, K. Kimura, S. Matsukura, T. Nishihara, H. Tanaka, *J. Antibiot.*, **38**, 1016 (1985).
- 120) S. Ōmura, Y. Iwai, K. Hinotozawa, H. Tanaka, Y. Takahashi, A. Nakagawa, *J. Antibiot.*, **35**, 1425 (1982).
- 121) S. Ōmura, A. Nakagawa, H. Aoyama, K. Hinotozawa, H. Sano, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 3643 (1983).
- 122) M. Murata, T. Miyasaka, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **38**, 1025 (1985).
- 123) S. Ōmura, A. Nakagawa, K. Shibata, H. Sano, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4713 (1982).
- 124) I. Umezawa, H. Takeshima, K. Komiyama, Y. Koh, H. Yamamoto, M. Kawaguchi, *J. Antibiot.*, **34**, 259 (1981).
- 125) R. W. Burg, B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birnbaum, S. A. Currie, R. Hartman, Y.-L. Kong, R. L. Monaghan, G. Olson, I. Putter, J. B. Tunac, H. Wallick, E. O. Stapley, R. Ōiwa, S. Ōmura, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 361 (1979).
- 126) A. Aoki, R. Fukuda, T. Nakayabu, K. Ishibashi, C. Takaichi, M. Ishida, *J. Antibiot.*, **29**, 76 (1976).
- 127) B. M. Greene, H. R. Taylor, E. W. Cupp, R. P. Murrhy, A. T. White, M. A. Aziz, H. S.-Key, S. A.

- D'Ann, H. S. Newland, L. P. Goldschmidt, C. Auer, A. P. Hanson, S. V. Freeman, E. W. Reber, *New Eng. J. Med.*, **313**, 133 (1985).
- 128) M. Lariviere, M. Aziz, D. Weimann, J. Ginoux, P. Gaxotte, P. Vingtain, B. Beauvais, F. Derouin, H. S.-Key, D. Basset, *Lancet*, **1985**, 174.
- 129) H. H. Fisher, H. Mrozik, "Macrolide Antibiotics—Chemistry, Biology, and Practice," ed. S. Ōmura, Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, 1984, p. 533.
- 130) 松中昭一, *ファルマシア*, **21**, 1144 (1985).
- 131) S. Ōmura, Y. Iwai, Y. Takahashi, N. Sadakane, A. Nakagawa, H. Ōiwa, Y. Hasegawa, T. Ikai, *J. Antibiot.*, **32**, 255 (1979).
- 132) S. Ōmura, A. Nakagawa, N. Sadakane, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 4223.
- 133) A. Furusaki, T. Matsumoto, A. Nakagawa, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **33**, 781 (1980).
- 134) K. Shibata, S. Satsumabayashi, H. Sano, K. Komiyama, A. Nakagawa, S. Ōmura, *J. Antibiot.*, **39**, 415 (1986).
- 135) S. Ōmura, M. Murata, H. Hanaki, K. Hinotozawa, R. Ōiwa, H. Tanaka, *J. Antibiot.*, **37**, 829 (1984).
- 136) S. Ōmura, M. Murata, N. Imamura, Y. Iwai, H. Tanaka, A. Furusaki, T. Matsumoto, *J. Antibiot.*, **37**, 1324 (1984).
- 137) S. Ōmura, K. Hinotozawa, N. Imamura, M. Murata *J. Antibiot.*, **37**, 939 (1984).
- 138) S. Ōmura, M. Katagiri, J. Awaya, K. Atsumi, R. Ōiwa, T. Hata, S. Higashikawa, K. Yasui, H. Terada, S. Kuyama, *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1805 (1973).
- 139) S. Ōmura, M. Katagiri, K. Atsumi, T. Hata, A. A. Jakubowski, E. B. Spring, M. Tishler, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1974**, 1627.