

制癌性抗生物質の開発研究自史 —アントラサイクリン系抗生物質

吉本 明弘

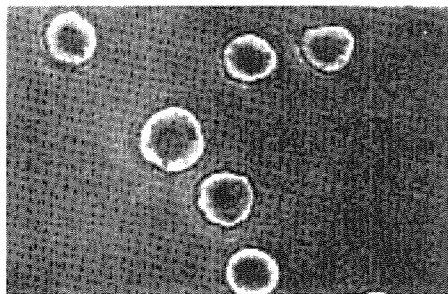
広島大学生物生産学部, 東広島市 739-8528

2000年7月21日 受付

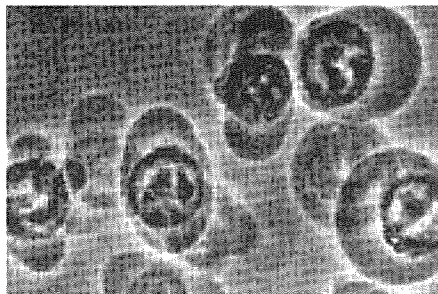
1. ま え お き

私が最初に制癌性抗生物質と接点をもったのは30数年前の大学院生時代の頃である。当時、納豆菌のバクテリオファージの単離と同定の研究をやりながら、次のテーマとしてなにか医薬の探索研究を始めたいと考えていた。Adams著“bacteriophage”(1959年発行)が当時の私のバイブルであったが、その中でλファージの溶原化細胞が紫外線や核酸合成阻害剤に暴露すると、λファージの爆発的な生産が起こって溶菌する現象があり、これを制癌剤の検索に使えると提案していた。実際、大腸菌 K12 (λ) 溶原菌培養液に制癌剤 mitomycin C (MMC) を極低濃度添加すると、ファージの増殖が起こって菌が溶菌する。これを寒天平板上で多数のサンプルを処理できる簡便検索法にするため、λ溶原菌と感受性菌の菌数の混合比を変えて接種した寒天平板上に抗生物質力価検定用のカップを置き、種々濃度の MMC 溶液を注入して、一夜培養する方法で、カップ周辺に溶菌帯が最も明確に出現する条件を検討した。この結果を農芸化学会西日本支部大会で発表したら当時の大手バルブ会社と乳業会社の研究所から技術習得させてほしいとの依頼がきて大いに恐縮した。この方法によるスクリーニングは修士1年生の中国留学生のテーマになったが、思った成果が得られず中止になった。大学院を終了後、教授の勧めでメルシャン中央研究所に入った。会社の本業は酒(アルコール製造, ワイン, 洋酒)であるが、医薬品の製造にも手を染めていた。当時、世界の抗生物質界をリードする梅沢浜夫博士(1986年12月没)の下に在京の発酵会社が参加して共同研究をしていた。梅沢浜夫著「抗生物質をもとめて」(文芸春秋社, 1987年発行)にその成り立ちが窺える。梅沢博士が率いる微生物化学研究所(微化研)は新しいシーズを検索し、見つけた物質の開発研究を協力企業に開発をまかせていた。メルシャンはその協力メンバーの一社で、すでに農薬カスガマイシンやマクロライド抗生物質ジョサマイシン(山之内製薬発売)の原体製造の権利を受けていたのである。

配属は微化研との共同研究を主務とする活性物質研究グループに決まった。ここでの私の最初の仕事が“Ehrlich ascites carcinoma”に著効を示す放線菌 *Streptomyces atrofaciens* M950 の活性物質に関するものであった。これも、微化研が見いだした活性物質で、培養上清に存在し、培養上清を直接投与するとエールリッヒ癌が完全に消失し、リチャレンジにも抵抗性を示す大変面白い活性物質であると言うことであった。しかし、不安定さで、一年余の研究後も精製できずに持て余されていた。実際にやってみると、粗抽出物では抗腫瘍活性があるが、精製を重ねても比活性が上がらず、むしろ低下するといった塩梅であった。何度も失敗を重ねたが、入社早々の意気盛んな頃であり、フラスコ大量培養と精製に格闘を挑んだ。まさにそんな心境で取り組んだ一年後に、やっと一つの活性実体を特定することができた。このものは分子量3万5千の蛋白性高分子で、細胞膜に作用して膜機能を阻害し、その結果細胞は膨潤して死滅した(図1)。¹⁾ Macracidmycin (MRM) と名づけられたが、依然として安定性が確保できず、その後の研究は結局中止になった。微化研との共同研究は定期的に梅沢先生に報告し、その都度指導を仰ぐのが習わしであった。既に kanamycin, Josamycin, kasugamycin, bleomycin 等の開発に成功し、当時の抗生物質界における梅沢イズムの威光と権威は凄いのがあった。先生は、大柄で、がっしりとした体格、威風堂々の趣があり、口上は穏やかであったが、叱責には容赦がなかった。MRM の研究報告では機嫌がよく、丁度微化研で研究中の類似した作用を有する diketocorioroline-K, Na-ATPase の阻害剤—との対比でずいぶんと話がはずんだことを覚えている。MCM の終了と入れ替えに、マウス L1210 白血病細胞に有効な *Streptomyces galilaeus* MA144 M1 菌



未処理 L1210 細胞



処理 L1210 細胞

図 1. Macracidmycin の作用

が生産する抗腫瘍性物質をやらないかと申し出があった。既に、微化研は抗菌剤から酵素インヒビターや抗腫瘍性物質、免疫作用物質の探索に方向を切り換えつつあった時期である。新たな提案がアントラサイクリン系抗生物質の研究開発に入るきっかけとなったのである。

2. アントラサイクリン系抗生物質発見の歴史

最初にアントラサイクリン系抗生物質を発見し、命名したのはゲッチンゲン大(独)の有機化学者 Brockmann 博士である。1950年代に彼は放線菌 *Streptomyces purpurascens* が生産する赤色抗菌性抗生物質を単離し、それを rhodomycins (RMs) と名づけた。本抗生物質は配糖体で、anthracyclines と総称し、そのアグリコン(4員環構造)を anthracyclinone と呼ぶことを提案した(図2参照)。RMs はアグリコン rhodomycinone (RMN) にアミノ糖 L-rhodamine (RN) が結合した化合物であった。²⁾後に、再単離され多数のアナログの存在が明らかになったが、当時は分析技術がなく、多くのアグリコン部(α , β , γ , ϵ -RMN ほか大部分の代謝分解物)の構造決定と2,3の簡単な配糖体アナログを同定することにどまった。彼の単離した β -rhodomycin は細胞毒性が強く抗菌剤としては開発されなかった。二つ目は、イタリアの製薬会社 Farmitalia の Di Marco らによって64年に発見され、70年に抗白血病剤として承認された daunomycin (DM・一般名 daunorubicin) である。³⁾このものはアグリコン daunomycinone (DMN) にアミノ糖 L-daunosamine (DN) が結合したもので、放線菌 *Streptomyces peucetius* の生産物であるが、ほぼ同時期にフランスの製薬会社 Rhone-Poulenc において単離され特許出願されていたもの(rubidomycin)と同一であることが後に判明し、両者の間でしばらく特許紛争が続いた。一般名 daunorubicin の由来は daunomycin と rubidomycin の混成名であり、以降アントラサイクリン類の一般名には語尾に -rubicin をつけることになった。さらに Farmitalia は DM 生産菌株の変異処理によって、微量蓄積する Adriamycin (ADM・一般名 doxorubicin) をみつけ、これが各種固形癌に幅広く有効であることを認めた。⁴⁾親化合物 DM と ADM の構造の違いは14位の水酸基の有無のみであったが、薬効への影響は大きく、DM は白血病の薬として、一方 ADM は肺癌、胃癌、卵巣癌、食道癌、結腸癌、膀胱癌等の広域抗癌スペクトルを有する制癌剤として75年に承認されたのである。ADM の発見は抗癌剤としてのアントラサイクリン母核の重要性を認識させ、一気にアントラサイクリン系抗生物質の発見が相次いだ。旧ソ連の医科学アカデミーは *Actinomadura* sp. が生産する carminomycin (CM)⁵⁾を、Ciba Geige 社(スイス)は *Streptomyces cineaeruber* が生産する cinerubins (CBNs)⁶⁾を、Bristol-Meyers 社(米)は *Actinosporangium* sp. が生産する marcellomycin を、⁷⁾Upjohn 社(米)は steffimycins⁸⁾ および nogalamycins⁹⁾を単離し、発表した(図2)。しかし、日本ではアントラサイクリン類の単離の報告はなかった。その頃までに日本で開発された制癌性抗生物質としては、梅沢らの sarkomycin (1954年承認)、carzinophilin (1957)、北里研と協和発酵が発見した MMC (1959)、武田薬品が開発した chromomycin A3 (1961) および梅沢-日本化薬が開発した扁平上皮癌に有効な bleomycin (BLM) (1969) 等が臨床応用されていたが、MMC および BLM 以外はマイナーな存在であった。

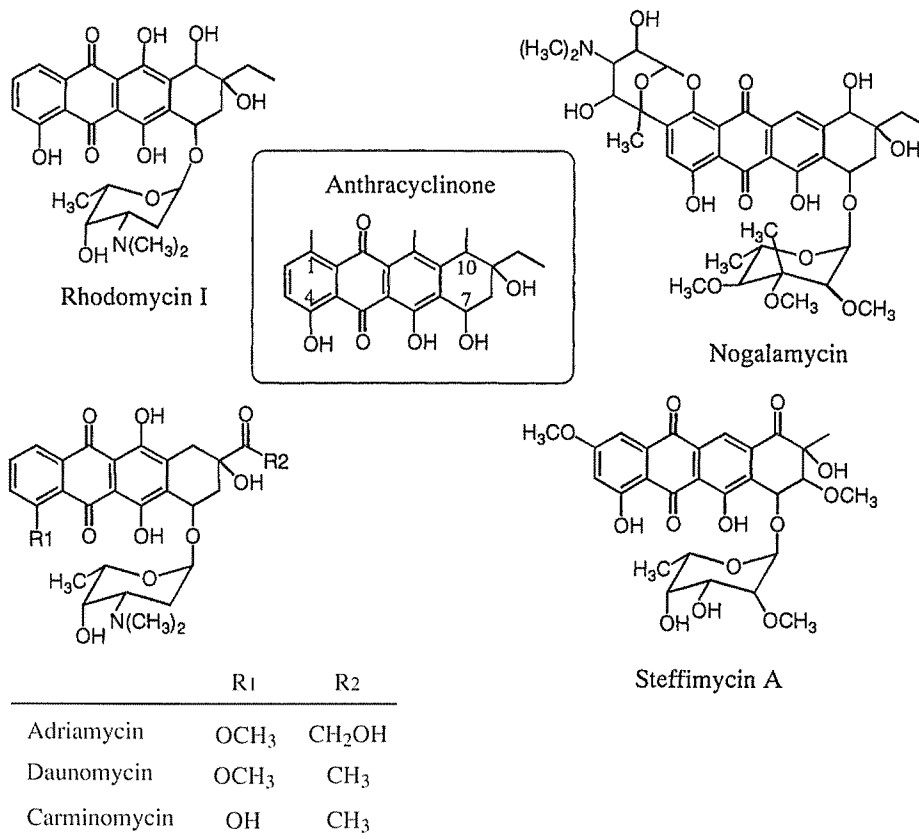


図2. ACM 以前のアントラサイクリン系抗生物質

3. 新規アントラサイクリン系抗生物質 aclacinomycins (ACMs) の単離と評価

微化研との共同研究で始めた *S. galitaeus* MA144-M1 株の生産物を、早々に培養して TLC で生成物を調べたところ、橙色を呈する色素物質で主に 2 成分 (A 成分, B 成分として区別) であることが分かった。当初生産力価は 10 μg/ml 程度で 30L の大量培養菌体から、粗抽出物として取り出し、シリカゲルカラムクロマトで精製して 2 成分を取り出すことができたが、TLC でチェックすると A, B 両成分とも黄色の成分が僅かに分離する傾向が見られ、橙色の成分がさらに黄色と赤色の 2 成分の混合物であることがわかった。シリカゲルの代わりにカオリナイトを用いてカラムクロマトを行うと、黄色と赤色成分がさらに明確に分離することがわかった。赤色物質は金属とのキレート作用が強く、カラムに残る傾向を示したのである。しかし、分離することはわかったが、カラムへの吸着力が強く、ほとんど精製品を回収することができなかった。構造分析に供する最初の精製サンプルの調製は、成分 A および B に分けた後、酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解し、硫酸銅の存在下で、それぞれ LH-20 ゲルガラムにかけて精製し、黄色および赤色精製標品を取得した。構造決定の結果、A 成分の赤色成分は先に Ciba Geige 社が単離済みの CBN-A (シリーズ名 A2) であること、B 成分のそれは CNB-B (シリーズ名 B2) と一致することがわかった。一方、黄色成分は CBNs の 1-deoxy 体で、新規アントラサイクリン抗生物質と断定し、aclacinomycin (ACM) A および B と命名した (シリーズ名 A1 & B1)。この最初の結果は *J. Antibiotics* の 28 巻 (1975) に発表された。¹⁰⁾ 生産物は A1 (ACM-A), B1 (ACM-B) のほかに、マイナー成分 N1, S1 や部分加水で得られる T1, 精製過程の部分分解物 K1, L1 などが単離された (表 1)。

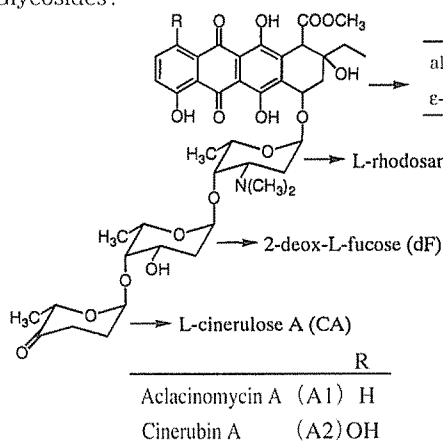
マウス白血病 L1210 培養細胞に対する ACMs の *in vitro* 細胞増殖阻害活性は CBNs に比べ低いことがわ

表 1. *S. galilaeus* MA144-M1 および変異株が生産するアントラサイクリン類と抗腫瘍活性

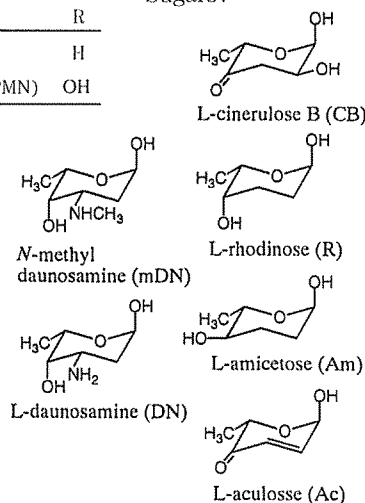
Strain	Products	Structure		Antitumor activity (L1210)	
		Aglycone	Sugar	IC ₅₀ (μg/ml)	T/C% ¹⁾
parent:					
MA144-M1	A2 (Cinerubicin A)	ε-PMN	RN-dF-CA	0.01	170(2.0)
	B2 (" B)	〃	RN-dF-CB	0.01	140(1.0)
	A1 (aclacinomycin A)	AKN	RN-dF-CA		
	B1 (" B)	〃	RN-dF-CB		
mutant:					
6U-21	A1	AKN	RN-dF-CA	0.03	186(3.5)
	B1	〃	RN-dF-CB	0.03	160(1.2)
	Y1	〃	RN-dF-Ac	0.03	130(10.0)
	N1	〃	RN-dF-R	0.03	173(2.5)
	S1	〃	RN-dF	0.05	180(4.0)
	T1	〃	RN	0.05	170(4.0)
	L1	〃	mDN-dF-CA	0.05	114(4.0)
	K1	〃	DN-dF-CA	0.05	109(10.6)
7U-491	U1	AKN	RN-dF-dF	0.04	182(8.0)
3AR-33	Aklavinone (AKN)	AKN	none	>10.0	
ANR-58	58D (2-hydroxy AKN)	—	none	>10.0	
ANR-665	665A	—	none	>10.0	

¹⁾ T/C% : ip-ip 投与 (dose on day 1 to 10 ; mg/kg) で投与群(T)の平均生存日数を無投与群(C)の平均生存日数で除して%で示した。

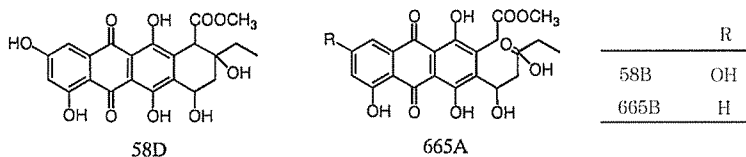
Glycosides:



Sugars:



Aglycones:



かった。ACMs アナログの中では B1 が最も活性が強かった。糖鎖が短くなると活性が低下し、N-demethyl 体 (L1 & K1) は一層の活性低下を来した。最初のマウス白血病 L1210 細胞を用いる *in vivo* 抗腫瘍性試験は微化研で実施された。L1210 細胞 (10⁵/ml) を腹腔に接種し、1日後に被検薬を9日間連続腹腔に注入す

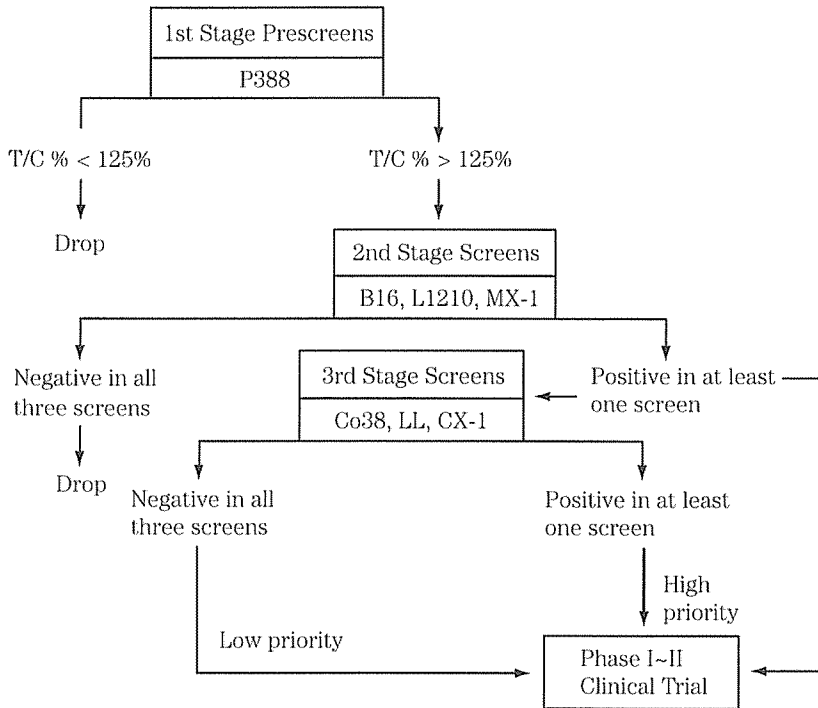


図3. 米国 NCI における制癌剤のスクリーニング方法 (1970年代)

る方法である。対照薬の ADM の抗腫瘍活性 T/C% (薬剤投与マウスの生存日数を未処理マウスの生存日数で割った値%) は最適投与濃度 1.3mg/kg で290%を示したのに対し、ACM-A は投与濃度 3.8mg/kg で最大値186%であった。ACM-A は十分に高い抗腫瘍性効果を示したが、ADM に比べて活性は低かった。しかし、*in vitro* 活性で強かった CBNs は毒性が強く、*in vivo* 抗腫瘍活性はむしろ ACMs に劣ることがわかった。また、アナログ中、ACM-A が最も治療係数が高かった。実験腫瘍を用いる制癌剤の評価は、今以て確立されていない難題であるが、実験腫瘍に対する有効性が臨床効果と必ずしも相関しないことである。ましてや、特定癌に対する有効性を予測する実験腫瘍を用いる試験方法は確立されていない。1970年代、米国 NIH の NCI (National Cancer Institute) で実施されていた制癌剤のスクリーニング方法を図3に示す。初期スクリーニングはマウス白血病細胞P388に対する抗腫瘍活性で行い、T/C%で125以上を固形癌に有効な制癌剤の一次評価試験としていた。二次試験には、マウス白血病 L1210、増殖の遅い実験腫瘍としてマウスの B-16 メラノーマやヒト乳癌異種移植細胞 MX-1 に対する効果を、三次試験としてはマウス Lewis 肺癌、結腸癌 Co38、ヒト乳癌異種移植 CX-1 等に対する有効性を調べる方法である。なお、NCI では、1983年以降は、スクリーニング法を一変して各種ヒト腫瘍を用い、特定癌の有効性を指向した *in vitro* disease-oriented screening test に変更している。日本では、癌研究会癌化学療法センターがアメリカ方式を踏襲した評価システムを実践しており、誰彼なく受け付けているので、これらと思うサンプルがあれば送付して調べてもらえる。NCI にも同様のシステムがある。ところで、ACM-A の二次評価試験を、固形種 (メラノーマ B16、Lewis 肺癌、結腸癌36、マウス乳癌等) での抗腫瘍活性について調べた結果、ADM とほぼ同等の抗腫瘍性効果が認められた。ADM は副作用として蓄積性の心毒が難点とされ、使用が制限されるケースがあった。そこでラットで調べたところ、ADM に比べ心毒は 1/10 以下と低いことがわかった。また、Ames test や Rec assay による変異原性試験では、ADM は陽性であるが、ACM-A は陰性を示すことが明らかとなった。¹¹⁻¹²⁾ これらの特徴を考慮した結果、ACM-A を制癌剤として臨床開発することが決定された。

4. Aclacinomycin A の臨床開発研究

メルシヤンは農薬カスガマイシンや抗菌剤ジヨサマイシンのバルク製造をやっているが、医薬の臨床開発は初めての経験であった。医薬の臨床開発は「医薬品製造指針」に従って行うが、未経験者にとっては恐ろしく責任の重い仕事となる。製造指針の基本は、一度定めた製造法は変えられないと言う原則である。方法を変更すれば、臨床試験をやり直す必要が生じる。タイムロスと経費のロスは確実にコストに跳ね返る。医薬製造申請に必要な資料は、大まかに当該医薬の物質製造法、安定性・保存法に関するものと、薬効、毒性、および吸収・代謝・排泄等の生物学的資料（前臨床試験）と臨床試験（第1相～第3相）である。いずれ、臨床結果がよければ、それらの結果をまとめて中央薬事審議会に提出し、部会で詳細に審議されて承認にいたる。結論から言えば、ACM-A は73年に臨床開発を始め8年後の81年6月には「製造許可」申請が承認された。早い開発であった。通常、開発には10年以上が普通とされる。実際の医薬開発から見れば、医薬品としての原体や製剤の形、その安定性、種々の実験腫瘍に対する抗腫瘍性効果、作用特徴、ADME等の前臨床研究や臨床試験の成果は開発研究の主題ではあるが、本稿の趣旨ではないので ACM-A の発酵製造に向けて行った技術開発に関する研究成果を中心に紹介する。

前述のように、親株 MA144-M1 は CNBs および ACMs を混合生産し、しかも性質が類似するため、ACM-A を分離精製することは困難であった。生合成的には ACM は CNB の前段階にあり、1位の水酸化に関わる生合成遺伝子の欠損により ACMs のみを生産する菌株の取得が可能である。“Mutation & Selection” は菌株育種の常套手段で、経験的には変異処理菌株の 10^{-3} 程度の頻度で目標菌株が取れる。図4に ACM の生産性変異株と高力価生産株の単離の簡略を示した。CNBs 系の生産性を欠失した変異株 6U-21 が3回目の変異処理検索で単離された。この菌株には全体的な力価の低下は見受けられず、一気に ACM-A の調製が有利になった。このものは脂溶性で菌体内生産物質であるが、変異処理の7段階目に得た YA-1 株でおよそ 200 $\mu\text{g/ml}$ の力価を達成し、最初の親株の力価の約20倍に達した。次の発想は、菌体外生産への培地条件的アプローチである。発酵生産力価アップの基本方策の一つは、菌体外に放出させ、生産物制御機構から解除させることである。抗生物質は生産物制御以外に、自己攻撃からの解放・菌体外生産も力価向上に貢献する。様々な試行錯誤の後、ACMs の菌体外生産は培地組成としてガゼインを用いることによって達成されることがわかった。本来、85%程度の菌体内生産が、ガゼインの使用により80%が菌体外生産となった。それと同時に力価にも一段の改善が見られ、菌株 TK-466 では ACM-A の発酵力価は 1000 $\mu\text{g/ml}$ 以上となった（図4）。100倍以上に力価が改善された。あとは、主要な副成物 ACM-B の除去ができれば、さらに有利になる。菌株育種の過程で取得した生合成変異株の生産物の同定から、ACM-B は ACM-A の糖鎖の酵素的変換によって生じていることが推察された。そこで ACM-A を基質にして、別のアナログに変換する酵素活性を培養上清中に検索してみると、ACM-Y と名づけた新しいアナログの生成を触媒する酵素活性の存在を見出した。また、ACM-Y は容易に ACM-B に変換することがわかった。この酵素は、分子量7万2千の酸性酵素で、反応に分子状酸素を必要とする、これまでにない奇異な脱水素酵素であった。¹³⁾ 基質には ACM-A のほかに N1にも作用することが明かとなったが、N1 蓄積株 KE-197 には酵素活性が全く見られないことから、この酵素が N1 から ACM-A への生成変換に関わる重要な酵素であることがわかった。図5に本酵素が関与する N1 から ACM-B への変換の経路を示した。ところで生成した ACM-Y は mercaptoethanol や cysteine のような SH 試薬と反応し、水に易溶の極性物質に変わり、有機溶媒では抽出されない。そこで次亜硫酸ソーダを添加して sulfite 化を行った後、溶媒抽出する方法を採用することで ACM-B の大幅除去が達成できた。実際にはそのように処理した培養上清から酢酸エチルで ACM-A を抽出、酸転溶、再抽出したものを調製用逆相 HPLC で精製して、99%以上の ACM-A を取得する製造工程を確立した。製品の高純度化はコストに絡む問題を含むが、反面ゾロ品開発阻止の一手段でもある。最終的には、塩酸塩として1バイアル当たり10mg 力価の注射剤として製品化されたのである。

ACM-A は ADM, DM 同様に核酸合成阻害剤ではあったが、作用機序については種々の点で異なっていた。HeLa, Burkitt, L1210 等の培養細胞を用いた細胞致死作用で ACM-A はシグモイド型生存曲線を示すが、ADM, DM では単純な指数関数型であった。細胞分裂周期への影響では ACM-A は mid G1 期と late S 期の2点でブロックするが、ADM, DM は late S 期および G2 期をブロックした。また、ACM-A は細胞 RNA および

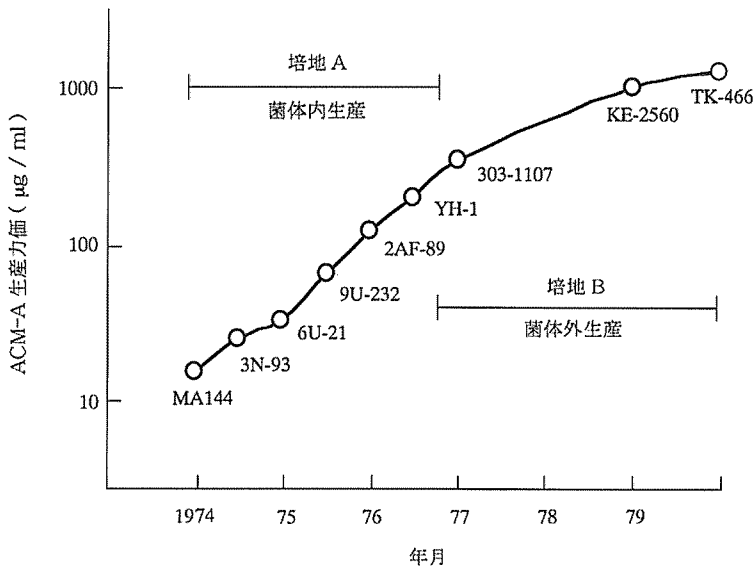
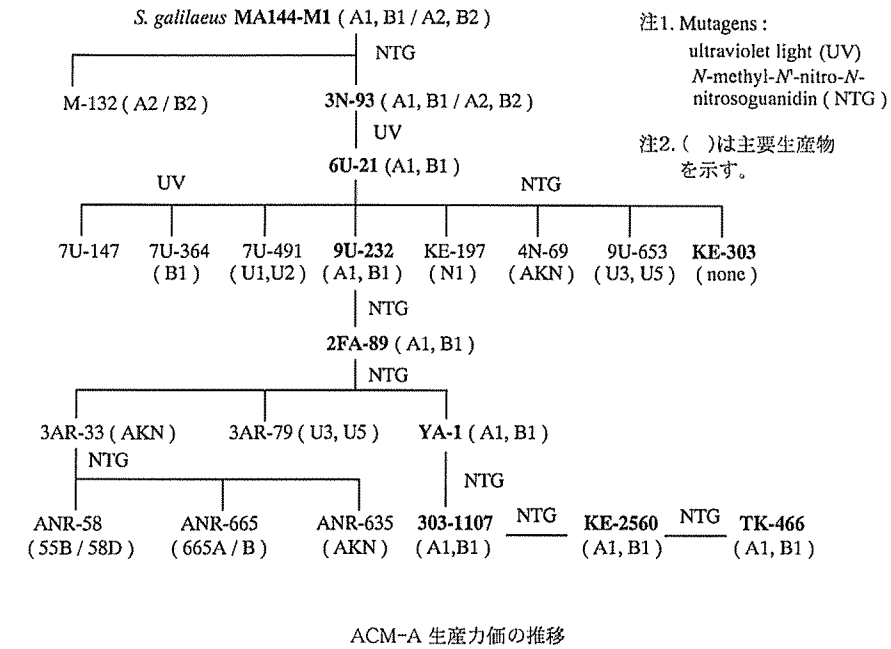


図4. *S. galilaeus* MA144-M1 の生産力価および生合成ブロック変異株の単離系統

核 RNA を低濃度で特異的に阻害するが、一方 ADM, DM はその作用が弱い。L1210 培養細胞での DNA/RNA 合成の50%阻害濃度 (IC₅₀値: µg/ml) 比は ACM-A では 8.1, ADM では 2.5 で ACM-A は ADM に比べ、著しく RNA 合成阻害活性が強い。Ehrlich 癌細胞由来の RNA polymerase II を阻害するが、DNA polymearse I を阻害しない。また、DNA と弱く結合 (1.2 × 10⁶ M⁻¹) し、ヌクレオチド 6 塩基に 1 個の割合で結合するが、結合塩基は dAdT で dGdC には結合しない。また、適当な還元剤の存在下で DNA 切断作用を発揮する。この作用は、実際には redox 酵素との共役下で生じるキノラジカルの作用を意味していると思われる。¹⁴⁾

ACM-A は静注投与されると肺、脾臓に活性配糖体 (M1, N1) として高濃度に分布し、肝臓や副腎には非

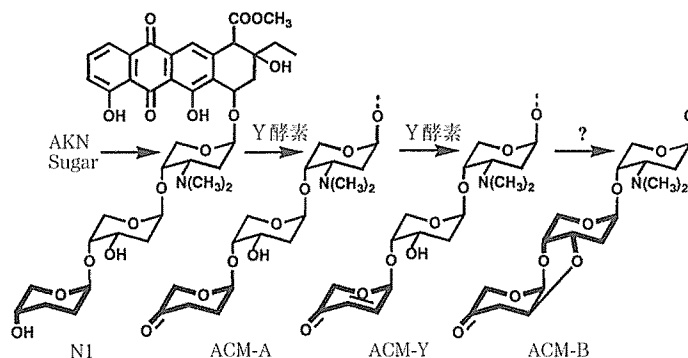


図5. Y酵素の糖鎖変換作用と ACM-A および B の生成機序

活性体 (C1, E1) として蓄積した。血中から組織への移行が早く、血中濃度の維持は ADM に比べて低い。主として尿中排泄され、胆汁排泄は少ない。ラット肝ホモジネートでの代謝を見ると、好気下では末端シネルローズが還元されて M1 あるいは N1 を生じた。一方、嫌気下では肝チトクロム P450 還元酵素により、7位の糖鎖が離脱して 7-deoxy AKN を生じた。これらの結果を通じて ACM-A の作用と代謝の姿が明らかにされたのである。臨床試験の結果、ACM-A は胃癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、悪性リンパ腫および急性白血病に適用される広域の抗癌剤として承認されたのである。

5. 次世代アントラサイクリン系抗生物質の探索と創製

アントラサイクリン系抗癌剤への関心は、ますます高まり、世界的な競争の時代を迎えた。より低心毒性で、固形癌、特に胃癌や肺癌に対しさらに有効なものと経口剤が開発の標的となった。剤形を変えるだけでは経口剤にはならない。経口で吸収のよい化合物の新たな開発が必要になる。先行する Farmitalia は DM 関連物質の化学誘導体 epirubicin および idarubicin を次の候補として開発研究中であった。Bristol-Meyer は 10-methoxycarbonyl 系を、Hoechst が β -RMN diglycoside cytorhodines を、Upjohn が nogalamycin 関連物質を、国内では K社 および A社 が β -RMN diglycosides を、R社 が ACMs の 9位アナログ類を、M社、T製薬、S製薬等が ADM の化学誘導体の開発研究を報告していた。我々もポスト ACM に向けて新規アントラサイクリン抗生物質の探索をめざした。方策としては、第一に新規アントラサイクリン生産菌の検索、第二に既知生産菌株の変異株生産物の単離、第三に mutabiosynthesis によるハイブリッド抗生物質の創製等による新規物質の取得である。つまり、微生物手段で予想されるあらゆる新規アントラサイクリン抗生物質の単離を実践したのである。遠大な計画ではあるが成果はこれ以外にはないと考えた。

すでに ACM-A の開発研究と並行して、新規アントラサイクリン生産菌株検索を微化研と進め、抗菌性色素生産株をメルクマールとして幾つかの当該抗生物質生産菌を単離していた、合計 8 菌株で、生産物を加水分解し、アグリコンを調べると予備試験で、DM 系生産菌 3 株、CNB 系生産菌 2 株、および RM 系生産菌 2 菌株であると判定した。DM 系生産菌 3 菌株のうち、1 菌株は微化研が単離した *S. coeruleorubidus* ME130-A4 で Rhone-Poulanc が単離し、特許出願している DM 生産菌と同一菌株であった。残りの 2 菌株はモンゴルで採取した土壌より単離した *Streptomyces* sp. D788 および *Actinomadura* sp. D326 と命名した菌株である。前者の生産物は ME130-A4 のそれと類似したが、D326 菌株は carminomycinone (CMN) を含むことから CM 系の化合物を生産する菌株であることがわかった。一方、CBNs 系生産菌株の一つ M578 菌株はアルゼンチンで採取した土壌より単離したもので、もう一つの *Streptomyces* sp. ME505 HE1 は微化研が単離した菌株であった。RM 系生産性 2 菌株、*S. violaceus* A262 および *S. roseoviolaceus* A529 は研究所の保存菌株から検索したものであった。いずれの生産物も、既報に一致するものではなく、新規なアナログを生産しているものと考えられた。これらを、逐一単離、同定するとともに、さらに変異処理による生合成ブロック変異株を取得し、新たな中間体の取得を試みて抗腫瘍活性の強い化合物の単離を進めたのである。

1) 新規 DM アナロの単離と oxanomycin の発見

DM 系 2 菌株はともに DM を直接生産せず、弱酸性下で加熱すると DM に変換する数種の化合物を生産した。ME130-A4 培養菌体よりアセトンで抽出して得た粗抽出物のシリカゲルカラムクロマトより 4 種の化合物を単離し、構造決定したところ、DM の 4' 置換体であることがわかった。置換体はアセタール構造（アルコール型と酸型）で、それぞれに光学異性体を含んでいた。アルコール型置換体は baumycins (BM) A1 & A2 (A1 の 4' epimer)、酸型置換体は B1 & B2 と命名された。L1210 培養細胞を用いた *in vitro* 増殖阻害活性を測定した結果、BM-A1 & A2 が DM の約 10 倍強い活性を有することがわかった。しかし、B1 & B2 の活性は低かった。この ME130-A4 菌株から特徴的な 2 種の変異株が得られた。ひとつは DM と 13-deoxyDM (feudomycin A と命名) を混合生産する変異株 2N-218 で、¹⁵⁾ もう一つは 4'-daunosaminyl DM (D788-18 に同一)、すなわち DM の 4' 位にさらにアミノ糖 DN が 1 個置換した化合物を主生産する変異株 MDR5 であった。このうち feudomycin A は DM 並活性を有していたが、D788-18 は活性が弱かった。一方、D326 菌株は CM 系と判定されたが、主生産物は ME130-A4 菌株の産物と同一のアセタール（アルコール型）を含む D326-3 & 4 であることがわかった。¹⁶⁾ *In vitro* 活性は、BM と同様に、4' 置換体 (D326-3 & 4) の活性は CM に比べて強かった。この菌株からは 13-dihydro 体 (D326-1 & 2) が得られたが、このものの活性は弱かった。もうひとつの菌株 D788 も BM-A1 & A2 を主生産する菌株であった。そこで、本菌株より DM 蓄積性の変異株の取得を試みた。本変異株は 4' 置換基（アセタール構造）を結合する酵素の欠損株である。三段階の変異処理の結果、T23 と命名した 1 菌株が BMs を全く生産せず、DM を主生産することを見出した。変異株 G1-1 は DM の高力価性の菌株として T23 菌株からさらに数段階の変異処理により誘導された菌株であるが、DM 以外に微量の ADM ほかに、既知の 13-dihydro DM (DHDM)、13-dihydro CM (DHCM) や D788-14、D78-15 等の新規アナログを生成した。¹⁷⁾ なお、ADM は変異株 *S. peucetius* var. *caesius* の微量成分として、69 年に Farmitalia グループによって単離されたが、別菌株による報告はこれがはじめてのものであった。G1-1 菌株からさらに幾つかの変異株を誘導した。KL-330 菌株は DM (赤色) の 11 位の水酸基が欠失した 11-deoxyDM (黄色) を生産する変異株であったが、既に Farmitalia グループが単離していた。変異株 RPM-5 はユニークな菌株で、主生産物が水溶性で培養上清に生産される特殊な菌株であった。¹⁸⁾ 有機溶媒では抽出されず、合成吸着剤 HP-20 カラムに酸性下で吸着させた後、アセトン水で溶出し、ブタノールに転溶して粗抽出を調製し、シリカゲルカラムで精製した。この物質は 10 位にカルボン酸を有する新規アナログ、D788-1、で DM 生合成上の重要な中間体と思われた。本菌株の培養液からは、マイナー成分として D788-6 (7-O-daunosaminyl- ϵ -RMN)、D788-7 (7-O-daunosaminyl- β -RMN)、D788-11 (13-deoxy CM)、D788-12 (13-dihydro CM) 等の活性物質のほか、活性の低い幾つかの新規アナログが単離された。このうち D788-11 および 12 は DM 並の活性物質であったが、またもや Farmitalia に先行された。水溶性 D778-1 も DM 並活性を示した。しかし、これらの中で D788-7 が DM の約 100 倍に相等する驚異的な *in vitro* 活性を示したのである。¹⁹⁾ このものの生成は DM 生合成経路上に位置づけることは考えられず、D788-1 の化学的変換により生じている副生成物と推定された。本化合物は 85 年 10 月に特許出願したが、約 1 ヶ月遅れで K 社が出願したことが後に判明した。注目物質だけにきわどい勝負に勝利して安堵した。K 社は、その後この物質のモリフォリノ誘導体を半合成し、脳腫瘍の治療剤として開発を進めている。変異株 4L-660 は DM 生合成の初期グリコシド中間体に位置すると思われる D788-6 および D788-5 (4-O-methyl D788-6) を生産した。構造上の類推から、生合成上 RPM-5 の前の段階がブロックされたものと思われた。²⁰⁾ 両化合物とも活性は弱かった。変異株 YDK-18 は 4L-660 から単離した 11-deoxy 体生産菌株で 2 種の新規アナログが得られたが低活性物質であった。²¹⁾ DM 系生産菌株およびその変異株よりおよそ 30 余種の新規アントラサイクリン抗生物質を単離することができた (表 2)。その大部分は *in vitro* L1210 培養細胞増殖阻害活性において DM に劣る化合物であったが、D788-7 (後に oxanomycin と命名) は DM の約 100 倍の強力な活性を示し、DM 系産物の中で、唯一抗腫瘍活性が期待される化合物と思われた。

2) RM 系生産菌株および変異株が生産する新規アントラサイクリン類

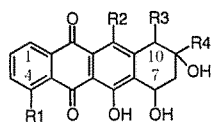
前述のように *S. purpurascens* が生産する RMs の研究は初期に Brockmann によって明らかにされたが、その後 Brockmann Jr. に受け継がれ、メジャーな活性物質として β -RMN diglycosides (β -RM-S1b, S2,

S3 & S4 等) が単離同定されていた。このものは、 β -RMN の 7 位および 10 位の両水酸基に trisaccharide が結合した化合物で、糖鎖の第 1 糖はアミノ糖 L-rhodamine (RN) で第 2, 第 3 糖は数種の中性糖からな

表 2. DM 系生産菌株および生合成ブロック変異株から単離された新規化合物

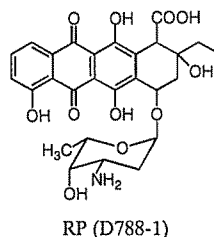
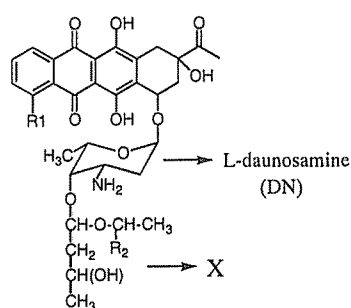
菌株名 生産物	構造*		IC ₅₀ (L1210) (μ g/ml)
	Aglycone ¹⁾	Sugar ²⁾	
<i>S. coeruleorubidus</i> ME130-A4			
Baumycin A1 (BM-A1)	DMN	DN-XA	0.015
Baumycin A2	〃	DN-XA (4'-epi)	0.005
Baumycin B1	〃	DN-XB	0.5
Baumycin B2	〃	DN-XB (4'-epi)	0.5
Mutant 2N-218			
Feudomycin A (FM-A)	13-deoxoDMN	DN	0.02
<i>Actinomadura</i> sp. D326			
D326 I	DHCMN	DN-XA	0.006
D326 II	DHCMN	DN-XA (4'-epi)	0.025
D326 III	CMN	DN-XA	0.015
D326 IV	CMN	DN-XA (4'-epi)	0.005
<i>Streptomyces</i> sp. D788			
Mutant G1-1			
D788-13 (9,10-anhydro DM)			0.49
D788-14 (4-O-demethyl FM-B)			0.33
D788-15 (4-O-demethyl FM-C)			1.0
D788-18 (4'-daunosaminy DM)			>1.0
Mutant KL-330			
11-Deoxy DM	11-deoxy DMN	DN	>1.0
11-Deoxy AM	11-deoxy SMN	DN	>1.0
D788-3	11-deoxy RPN	DN	>1.0
D788-4 (9,10-anhydro-11-deoxy RP)			>1.0
11-deoxy D788-11			0.15
Mutant RPM-5			
D788-1 (RP)	RPN	DN	0.03
D788-2 (9,10-anhydro RP)			0.18
D788-6	ϵ -RMN	DN	0.25
D788-7	β -RMN	DN	0.0003
D788-8 (9,10-anhydro-13-deoxo CM)			0.22
D788-9 (10-methoxycarbonyl-4-O-demethyl FM-B)			0.02
D788-10 (10-carboxyl-4-O-methyl FM-C)			0.08
D788-11	13-deoxo CMN	DN	0.03
D788-12	DHCMN	DN	0.06
D788-15 (10-methoxycarbonyl-4-O-methyl FM-C)			0.10
Mutant 4L-660			
D788-5 (4-O-methyl D788-6)	4-O-methyl- ϵ -RMN	DN	0.05
Mutant YDK-18			
D788-16 (11-deoxy D788-5)			1.20
D788-17 (11-deoxy D788-6)			0.91
既知 DM 系関連物質			
Adriamycin (ADM)	AMN	DN	0.02
Carminomycin (CM)	CMN	DN	0.005
Daunomycin (DM)	DMN	DN	0.02
13-Dihydro CM	DHCMN	DN	0.06
13-Dihydro DM	DHDMN	DN	0.17

Aglycone :

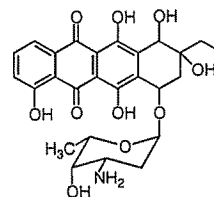


Aglycone	R1	R2	R3	R4
Adriamycinone (AMN)	OCH ₃	OH	H	COCH ₂ OH
Carminomycinone (CMN)	OH	OH	H	COCH ₃
13-Dihydro CMN (DHCMN)	OH	OH	H	CH(OH)CH ₃
Daunomycinone (DMN)	OCH ₃	OH	H	COCH ₃
11-Deoxy DMN	OCH ₃	H	H	COCH ₃
13-Dihydro DMN (DHDMN)	OCH ₃	OH	H	CH(OH)CH ₃
13-Deoxo DMN	OCH ₃	OH	H	CH ₂ CH ₃
β-Rhodomycinone (β-RMN)	OH	OH	OH	CH ₂ CH ₃
ε-Rhodomycinone (ε-RMN)	OH	OH	COOCH ₃	CH ₂ CH ₃
RPnone (RPN)	OH	OH	COOH	CH ₂ CH ₃

代表的生産物 :



	R1	R2
Baumycin A1	OCH ₃	CH ₂ OH
Baumycin B1	OCH ₃	COOH
D362 III	OH	CH ₂ OH
D362 IV (4' epimer)	OH	CH ₂ OH



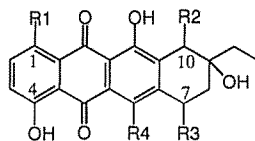
Oxaunomycin (D788-7)

っていた。中性糖鎖の配列の不規則性から、生産物が多くなることが予想された。我々が検索した2菌株、*S. violaceus* A262, *S. roseoviolaceus* A529 の生産物を予備的に分析すると、アグリコンとして β-RMN (あるいは β-isoRMN) および γ-RMN を含むことが明らかにされたが、ホールの生産物は無数に認められ、単離精製が不可能に思われた。そこで、変異処理により、まづ β-RMs を主生産する菌株 SN2-883 を誘導し、これから次々に変異誘導して合計8菌株の新規アントラサイクリン生産物を単離した。表3に親株2菌株とその変異株から単離した新規物質を記載した。SEI-625 菌株からは3種の限定された生産物 A262-1, -2 & -3 が単離された。いずれも β-RMN diglycosides で Brockmann Jr. が単離したものと異なる糖鎖を有していた。²²⁾ 類似の化合物であるが、糖鎖に L-rhodinose を含まない新規 β-RMN および β-isoRMN diglycoside (SS-288A & B) が変異株 SS-288 より得られた。²³⁾ 本菌株はおそらく、L-rhodinose 生合成能を欠失した変異株と考えられる。SEI-2385 菌株は β-isoRMN diglycosides を主生産する変種株で生産物は obelmycins (OBMs) と命名された。²⁴⁾ これは、先の A262s 化合物の 1-hydroxy 体で、これまでこのタイプの単離はほとんどやられていなかった。この単離をやっている頃、3社から β-RMN diglycosides の報告が相次いだ。A社はフレンド細胞に分化作用を有する cosmomycins を、K社は ditrisarubicins, Hoechst は cytorhodins を

表3. RM系生産菌株の新規生産物とそれらから誘導された生合成ブロック変異株の生産物

菌株名 生産物名	構造*		IC ₅₀ (L1210) (μ g/ml)
	Aglycone	Sugar	
<i>S. violaceus</i> A262			
Mutant SE1-625			
A262-1	β -RMN	RN-R-R(7)/RN-R-R(10)	0.003
A262-2	〃	RN-R-R(7)/RN-dF-R(10)	0.005
A262-3	〃	RN-dF-R(7)/RN-dF-R(10)	0.005
Mutant SE2-2385			
Obelmycin A	β -isoRMN	RN(7)	0.001
Obelmycin B	〃	RN-R-R(7)/RN-R-R(10)	0.001
Obelmycin C	〃	RN-R-R(7)/RN-dF-R(10)	0.001
Obelmycin D	〃	RN-dF-R(7)/RRN-dF-R(10)	0.004
Obelmycin S	〃	RN(7)/RN(10)	0.01
Obelmycin E	γ -isoRMN	RN-R-R(7)	0.06
Obelmycin F	〃	RN-dF-R(10)	0.09
Obelmycin G	〃	RN(10)	0.20
Alldimycin A	α_2 -RMN	RN(7)	0.05
Alldimycin B	〃	RN(7)/RN(10)	1.0
Alldimycin C	〃	RN(10)	1.0
Mutant SC-7			
Yellamycin A	α -CTN	RN(7)	0.007
Yellamycin B	〃	RN(7)/RN(10)	>1.0
Yellamycin C	〃	RN(10)	>1.0
Mutant SU2-730			
Epelmycin A	ϵ -RMN	RN-R-CA(7)	0.004
Epelmycin B	〃	RN-dF-CB(7)	0.001
Epelmycin C	〃	RN-dF(7)	0.004
Epelmycin D	〃	RN(7)	0.01
Epelmycin E	〃	RN-dF-CA(7)	0.01
Mutant SS-288			
SS-288A	β -RMN	RN-dF-dF(7)/RN-dF-dF(10)	0.002
SS-288B	β -isoRMN	RN-dF-dF(7)/RN-dF-dF(10)	0.001
Mutant KU4-502			
Kesselmycin A	10-deoxyKMN	RN-dF-CA(7)	0.59
Kesselmycin B	〃	RN-dF-dF(7)	0.10
Kesselmycin C	KMN	RN-dF-CB(7)	0.16
Kesselmycin D	10-deoxyKMN	RN-dF-dF(7)	0.25
Kesselmycin E	KMN	RN-dF-CA(7)	0.20
Kesselmycin F	〃	RN-dF-dF(7)	0.40
<i>S. roseoviolaceus</i> A529			
Roseorubicin A	γ -RMN	RN-RN-dF-R-R(10)	0.05
Roseorubicin B	〃	RN-RN(10)	0.06
既知 RM系関連物質			
β -Rhodomycin I (RM I)	β -RMN	RN(7)	0.01
β -Rhodomycin II	〃	RN(7)/RN(10)	0.02
Irenmycin	γ -RMN	RN(10)	0.15

*Aglycone 及び Sugar の構造は表1 及び表2 に示すほか、以下のとおり。() は糖鎖の結合位置を示す。



	R1	R2	R3	R4	
β -Isorhodomyicinone (β -IsoRMN)	OH	OH	OH	OH	7S
γ -Isorhodomyicinone (γ -IsoRMN)	OH	OH	H	OH	7S
γ -Rhodomycinone (γ -RMN)	H	OH	H	OH	7S
ϵ -Isorhodomyicinone (ϵ -IsoRMN)	H	COOCH ₃	OH	OH	7S
α_2 -Rhodomycinone (α_2 -RMN)	OH	OH	OH	H	7S
α -Citromycinone (α -CTN)	H	OH	OH	H	7S
10-Deoxykesselmycinone (10-deoxyKMN)	H	H	OH	OH	7R
kesselmycinone (KMN)	H	OH	OH	OH	7R

単離したが、互いに糖鎖の一部が異なる糖鎖アナログであった。同類の A262s の L1210 培養細胞に対する増殖抑制活性は DM や ACM-A に比べ10倍強い活性を示し、その 1-hydroxy 体 OBM はさらに数倍強い活性を有することがわかった。また、新規な γ -isoRMN monoglycosides (OBMs-E, F, & G) および α_2 -RMN monoglycoside [alldimycin (ALM) A~C] を OBM 生産菌のマイナーな成分として単離した。²⁵⁾ 変種菌株 SC-7 の同じくマイナー成分として、Yellamycin (YLM) A~C を単離した。²⁶⁾ これらのマイナー成分のうち、10位に糖鎖をもつ化合物 (ALM-C, YLM C) の活性は弱かったが、7位にアミノ糖 RN を持つ ALM-A や YLM-A の活性は強く、10位フリーで7位に糖鎖をもつ化合物が活性面で優れていることがわかった。一方、epelmycins (EPMs) と命名した ϵ -RMN glycosides のみを生産する菌株が UV 変異により誘導された。²⁷⁾ その結果、10-methoxycarbonyl を有するアントラサイクリン類を品揃えすることができた。ACMs, CBNs 両剤に比べ、EPMs の増殖抑制阻害活性は数倍強く、11位の水酸基が *in vitro* 活性に大きく影響することがわかった。変異株 KU4-502 からは 7 (R), 9 (R), 10 (R) 配位を有する RMN monoglycosides (Kesselmycins) を単離した。しかし、通常の 7 (S) 配位の化合物に比べ、活性が著しく劣る化合物であった。S. roseoviolaceus A529 菌株からは、糖鎖が pentasaccharide からなる特殊な γ -RMN glycoside roseorubicin を単離した。これには RN-RN のアミノ糖を有する点で特徴があるが、*in vitro* 活性は強くはなかった。以上、RM 系生産菌 2 株およびその変異株より、新規 RM アナログ30余種を単離したが、A262s および OBM-B, C & D の7, 10位の diglycoside 型 および7位のみ monoglycoside 型 (OBM-A, YLM-A) にも強い活性が認められた。

3) 微生物変換法による新規ハイブリッド抗生物質の造成

上述した ACMs, CBNs, DM および RMs 生産物は、それぞれ構成アグリコンおよび糖鎖に特徴があり、互いに異なっていた。アグリコンの基本的な骨格の由来は、少なくともこれら4種のアントラサイクリン系抗生物質間では同一と思われた。しかし、初期アグリコンの生成以後、各抗生物質ごとに、特異的な生合成修飾を受け、互いに異なる最終産物に至る生成経路が予想された。ACMs, CBNs, RMs は trisaccharide 糖鎖構造が同一で、アグリコンに差異が認められる。アグリコン部は、ACMs, CBNs, RMs の方向に複雑で、その方向に向けて修飾過程が増えることを意味している。DM はアミノ糖 daunosamine (DN) が1個結合するのみで単純に見えるが、アグリコン部の構造変化は前者に比べて大きい。このような生合成的背景を考えると、それぞれの生合成経路の特徴を組み合わせていくことができれば、新規でハイブリッドな抗生物質の取得が可能である。そこで、先ず各生産菌株あるいはその変異株から非生産菌を単離し、その培養液に適当な異種基質を添加・培養することにより、ハイブリッド抗生物質の単離を試みた。表4は、様々な試みのうちで、新規な生産物が得られたものについてまとめた。ACMs 生産菌株 6U-21 菌株から得た非生産菌株 KE-303 で培養変換を行った結果、異種アグリコン基質11種からそれぞれに ACM-A 糖鎖と同一の糖鎖 (trisaccharide) がついた新規ハイブリッド抗生物質が生成した。²⁸⁻³⁴⁾ この場合、添加したアグリコンには全く修飾が起らず、単に糖付加のみの変換が起こった。しかし、基質特異性が存在し、ACMs, CBNs および RMs 由来のアグリコンは糖付加を受けたが、DM系 由来のアグリコン (DMN や AMN) には糖付加が起こらなかった。4-O-methyl 基が糖鎖結合を阻止するものと推察された。また、DM 系の産物 (monosaccharide 型) を KE-303 で培養変換することにより、DMの4'位に L-rhodinose (R) あるいは 2-deoxy-L-fucose (dF) が付加した disaccharide 型の新規ハイブリッド抗生物質12種を取得した。³⁵⁾ この場合、ACM 糖鎖同様に trisaccharide 型が形成されず、disaccharide 型を生成することは興味深い知見である。また、2-hydroxy AKN, β -RMN あるいは CMN の同菌株による培養変換により、2-hydroxy ACMs, betaclamycin (BLM), trisarubicinol を得ることができた。一方、DM 系生産菌株およびその生合成ブロック変異株より導入した非生産変異株を用いて培養変換を行った結果、いくつかの新規ハイブリッド化合物の造成を可能にした。S. coeruleoravidus ME130-A4 から誘導した非生産性菌株 1U-222 による 1-hydroxy AKN (ϵ -pyrrymycinone) アグリコンの添加培養により 1-hydroxy DM 系化合物 GP-1 が得られた。³⁶⁾ また、もう一つの DM 生産菌株 D788 株より誘導した変異株 RPM-5 および DK 菌から、それぞれ非生産株 OXA-4 および NDK-4 を単離した。前者には DN の付加反応を、後者には 4-O-メチル化を特異的に行う変換菌として使用、6-deoxyoxaunomycin, 1-hydroxyoxaunomycin の調製、³⁷⁾ 4-O-methyloxaunomycin, 4-O-methyl BCMs の

表4. 微生物変換法による新規ハイブリッド生産物質の造成

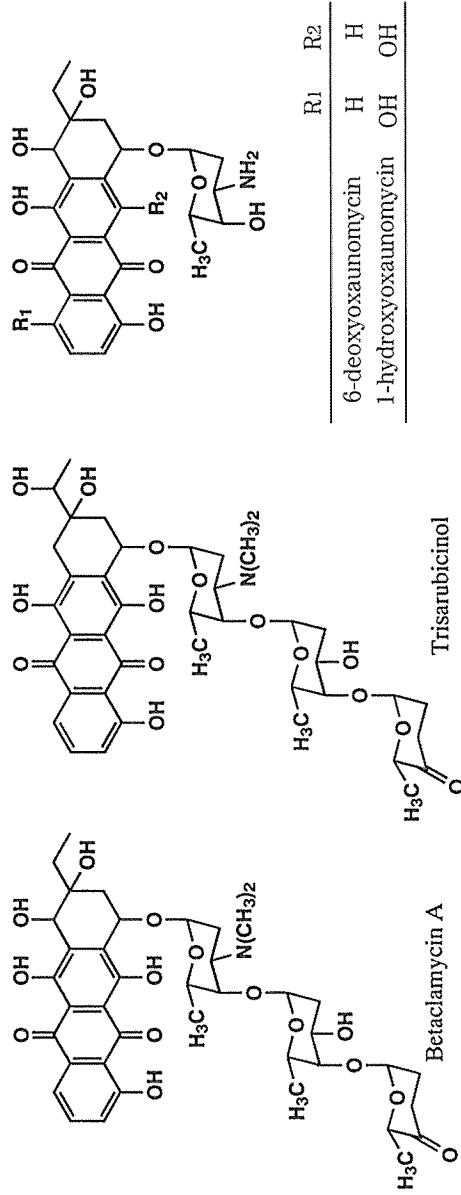
変換菌	基質	生産物名	生産物	構造*	IC ₅₀ L1210 (μ g/ml)
<i>S. galitaeus</i> MA144-MI Mutant KE303	AKN	CG1-C		AKN-RN-dF-Red ¹⁾	0.15
	2-hydroxy AKN	2-hydroxyactinomycin A		2-hydroxy AKN-RN-dF-CA	0.03
	10-demethoxycarbonylAKN	CG2 (10-demethoxycarbonyl ACM-A)		10-demethoxycarbonylAKN-RN-dF-CA	0.01
	4-O-methylAKN	CG3 (4-O-methyl ACM-A)		4-O-methylAKN-RN-dF-CA	0.01
	ϵ -isoRMIN	CG6 (1,1,1-dihydroxy ACM-A)		ϵ -isoRMIN-RN-dF-CA	0.01
	β -RMIN	betactamycin A		β -RMIN-RN-dF-CA	0.01
		betactamycin B		β -RMIN-RN-dF-CB	0.005
		betactamycin M		β -RMIN-RN-dF-Am	0.01
		betactamycin N		β -RMIN-RN-dF-R	0.02
		betactamycin S		β -RMIN-RN-dF	0.01
		betactamycin T		β -RMIN-RN	0.02
		CG21-C		β -RMIN-RN-dF-Red ¹⁾	0.15
	γ -RMIN	CG8		γ -RMIN-RN-dF-CA	0.11
	β -isoRMIN	CG10		β -isoRMIN-RN-dF-CA	0.003
	α_2 -RMIN	CG11		α_2 -RMIN-RN-dF-CA (10) ²⁾	0.86
	α -CTN	CG12		α -CTN-RN-dF-CA (10) ²⁾	1.00
	4-O-methyl- ϵ -RMIN	CG14		4-O-methyl- ϵ -RMIN-RN-dF-CA	0.01
	DHCMN	Trisarubicinol		DHCMN-RN-dF-CA	0.01
	β -RM-1	CG15A		β -RMIN-RN-R	0.04
	13-deoxoCM	CG16A		13-deoxoCM-DN-R	0.03
	CG16B		13-deoxoCM-DN-dF	0.04	
D788-6	CG17A		ϵ -RMIN-DN-R	0.10	
	CG17B		ϵ -RMIN-DN-dF	0.05	
Yellamycin-A	CG18B		α -CTN-DN-dF	0.16	
D788-5	CG19A		4-O-methyl- ϵ -RMIN-DN-R	1.00	
	CG19B		4-O-methyl- ϵ -RMIN-DN-dF	1.00	
D788-12	CG20A		DHCMN-DN-R	0.02	
	CG20B		DHCMN-DN-dF	1.00	
LB-1	CG21A		β -RMIN-mDN-R	0.01	

Strain	Structure	Yield (%)
<i>S. coeruleorubidus</i> ME130	β -RMN-mDM-dF	0.21
Mutant 1U-222	1-hydroxyDHDMMN-N-formyl-DN	0.02
<i>Streptomyces</i> sp. D788	α -CTN-DN	0.005
Mutant OXA-4	β -IsoRMN-DN	0.007
	—	>1.0
	—	>1.0
	—	>1.0
Mutant DKN-4	1-hydroxy RPN-DN	0.05
	1-hydroxy-13-deoxo CMN-DN	0.10
	1-hydroxy-13-dihydro CMN-DN	1.00
	4-O-methyl- ϵ -iso RMN-DN	0.03
	4-O-methyl- β -RMN-RN	0.04
	4-O-methyl- β -RMN-DN	0.18
	4-O-methyl- α -CTN-RN	0.15
	4-O-methyl- α -CTN-mDM	0.01
	4-O-methyl- α -CTN-DM	

* Aglycone 及び Sugar の構造は表 1, 表 2, 表 3 及び図 7 に示したとおり。

1) Red : L-redonose

代表的ハイブリッド化合物:



2) 10位に糖鎖, 未記載は7位に糖鎖

造成に成功した。³⁸⁾ 以上、各種のアントラサイクリン生産菌株から変換性の非生産菌株を単離し、様々な前駆体アナログを基質として添加、培養変換することにより、少なくとも40種以上の新規ハイブリッド化合物を造成することができた。³⁹⁾ このうち、*in vitro* L1210 細胞増殖阻害活性で評価の見られた化合物としては、2-hydroxy ACMs, BCMs, trisarubicinol, oxanomycin (OXM) およびその関連アナログ (1-hydroxy, 6-deoxy あるいは 4-O-methyl OXMs) であった。特に、OXM の *in vitro* 活性は強烈で、抗腫瘍活性が注目されたのである。

4) 光変換処理による脱 N-メチル化誘導体の調製

DM 系はアミノ糖 DN を、一方、10-methoxycarbonyl 系および RM 系は RN (*N,N*-dimethyl DN) を含んでいた。強力活性物質の OXM は β -RM-I の脱 N-メチル体であり、RN の DN への脱メチル化は有用な誘導

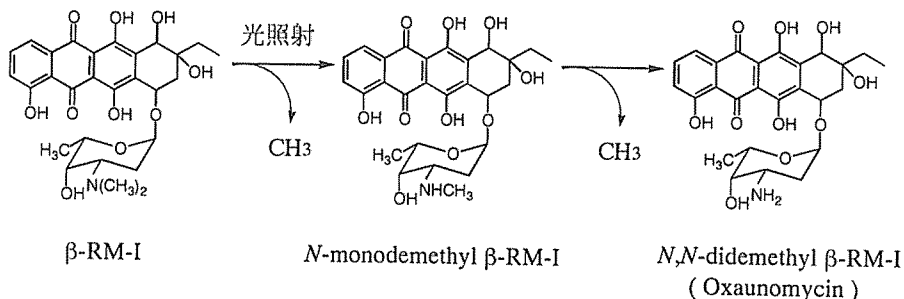
表5. 光照射による脱 N-メチル化アナログの調製¹⁾

親化合物	生成物	構造 ²⁾	IC ₅₀ L1210 (μg/ml)
Yellamycin (YLM)-A	—	α -CTN-RN (7)	0.007
	<i>N</i> -monodemethyl YLM-A	α -CTN-mDN (7)	0.026
	<i>N,N</i> -didemethyl YLM-A	α -CTN-DN (7)	0.005
Yellamycin-C	—	α -CTN-RN (10)	>1.0
	<i>N</i> -monodemethyl YLM-C	α -CTN-mDN (10)	1.0
	<i>N,N</i> -didemethyl YLM-C	α -CTN-DN (10)	1.0
β -Rhodomycin (RM)-I	—	β -RMN-RN (7)	0.01
	<i>N</i> -monodemethyl β -RM-I	β -RMN-mDN (7)	0.006
	<i>N,N</i> -didemethyl β -RM-I	β -RMN-DN (7)	0.0003
Obelmycin (OBM)-A	—	β -isoRMN-RN (7)	0.01
	<i>N</i> -monodemethyl OBM-A	β -isoRMN-mDN (7)	0.01
	<i>N,N</i> -didemethyl OBM-A	β -isoRMN-DN (7)	0.007
Iremycin (IRM)	—	γ -RMN-RN (10)	1.00
	<i>N</i> -monodemethyl IRM	γ -RMN-mDN (10)	>1.0
	<i>N,N</i> -didemethyl IRM	γ -RMN-DN (10)	>1.0
Alldimycin (ALM)-A	—	α_2 -RMN-RN (7)	0.05
	<i>N</i> -monodemethyl ALM-A	α_2 -RMN-mDN (7)	0.087
	<i>N,N</i> -didemethyl ALM-A	α_2 -RMN-DN (7)	0.057
Alldimycin (ALM)-C	—	α_2 -RMN-RN (10)	>1.0
	<i>N</i> -monodemethyl ALM-C	α_2 -RMN-mDN (10)	>1.0
	<i>N,N</i> -didemethyl ALM-C	α_2 -RMN-DN (10)	>1.0

¹⁾ 親化合物を CHCl₃:MeOH(15:1)中に溶解し(1mg/ml)、高圧水銀ランプ(200nm~500nm)で照射した。

²⁾ Aglycone 及び Sugar の構造は表1、表2及び表3に示したとおり。()は糖の結合位置。

³⁾ β -RM-I の場合(下図)



化法と考えられた。ところで、ACM-A の室温保存の分解産物中のメジャーなものとして RN 部分の N メチル基の離脱が起こり、L1 (脱 N-モノメチル体) および K1 (脱 N-ジメチル体) の生成が認められた。この変換は明らかに光反応によることが推測された。従って、この光反応を利用し、アミノ糖 RN を脱 N-メチル化して DN に変えることができる。太陽光線、自然光ランプや UV ランプを用いて、脱 N-メチル化を検討した結果、特定の有機溶媒中で UV ランプで照射することにより、容易に脱メチル化が起こることを見出した。β-Rhodomyacin-I を標準品として光反応条件を詳細に検討した結果、dioxane や ether 溶液として高圧水銀ランプ (波長 200nm-500nm) で照射することにより、60%-70%の高取率で N-monodemethyl 体が生成することを明らかにした。一方、CHCl₃ 溶液として照射することで N, N-didemethyl 体が最大約25%の取率で得られることが判明した。RMN monoglycosides 7 サンプルを CHCl₃ 溶解し、水銀ランプで照射することにより新規脱メチル化アナログ14物質を調製した (表5)。⁴⁰⁾ L1210 培養細胞に対する増殖阻害活性は、7 位にアミノ糖 RN をもつ化合物では脱 N-dimethyl で顕著に上昇し、一方10位に RN を有する化合物の脱 N-dimethyl 体には変化がなかった。得られた高活性化化合物のうち N, N-didemethyl-β-RM-I, N, N-didemethyl ALM-A および N, N-didemethyl YLM-A は、それぞれ微生物変換法はか得得した OXM, 1-hydroxy OXM および 6-deoxy OXM に相当した。なお、類似した光反応による N 脱メチル化については、Hoechst グループにより 1 年前に先行されていることがわかった。彼らは β-RMN diglycosides 系の開発中で光反応による N-脱メチル化を見つけたらしい。彼らの研究は N-monodemethyl 体の作成を認めたが、N, N-didemethyl 体の生成の溶媒効果を見落としていたと思われる。そのため、OXM の取得には至らず、N-monodemethyl OXM を特許していたのである。まさかとは思いつながら、研究の同時性をまたもや痛感することになった。

6. 新規アントラサイクリン系抗生物質の構造と抗腫瘍性活性相関

抗腫瘍活性の評価方法としては、様々な方法が考えられるが、NCI で初期検索に用いられたマウス白血病細胞 L1210 培養細胞に対する *in vitro* 増殖阻害活性 (IC₅₀ 値) の測定を行い、これを一次の活性評価としてきた。当然のことながら、*in vitro* 増殖阻害活性 (あるいは殺細胞活性) が弱ければ *in vitro* 抗腫瘍活性は望めない。しかし、問題は *in vitro* 活性が *in vivo* 抗腫瘍活性と必ずしも相関しないことである。従って、単純に *in vitro* 活性のみで抗腫瘍活性を論じることはできない。その物質の体内吸収、分布、代謝および毒性等に関する固有の特性により、*in vivo* 抗腫瘍活性が発揮されるからである。表2~5には取得した新規化合物について *in vitro* 増殖阻害活性 (IC₅₀ 値) を測定し、一次評価としてきた。大きな発見を見逃さないためには、全ての新規化合物について *in vivo* 抗腫瘍活性を測定することが望ましい。しかし、コストと時間の問題でそれは無理である。アントラサイクリン系化合物については *in vitro* 活性 IC₅₀ 値 (μg/ml) で 0.1 以上の化合物については、有意な *in vivo* 抗腫瘍活性を示さないことを経験しており、最終的な *in vivo* 抗腫瘍活性の測定は *in vivo* 活性 IC₅₀ 値 (μg/ml) で 0.1 以下の物質を対象に、グループを代表する物質と特徴的構造を有する化合物について調べることにした。*In vivo* 抗腫瘍活性の測定は、マウス白血病 L1210 細胞を *ip* 接種し、day1~day10 に薬剤を *ip* 連続投与して生存日数の T (薬剤投与群) / C (無投与群) % を求める従来法を用いた。また、L1210 培養細胞を用い、[2-¹⁴C] thymidine や [2-¹⁴C] uridine の酸不溶性分画への取り込み阻害から DNA あるいは RNA 合成の阻害を測定し、その阻害特徴を評価に組み入れた。表6に、代表的な新規化合物の *in vivo* 抗腫瘍活性を掲げた。本研究で単離した新規化合物約140サンプルから一次評価により30サンプルを選別し、*in vivo* 抗腫瘍活性を測定したのである。このうち、10数化合物が T/C %で200以上を示す優れた抗腫瘍活性を有する化合物であった。以下に取得した新規化合物を3グループに分類し、グループ内での構造と抗腫瘍活性との関係について解析した。

第一グループは 10-methoxycarbonyl 基を有する化合物で、既得の ACMs, CBNs (1-hydroxy ACMs) に加えて、新規な 2-hydroxy ACMs および EPMs (11-hydroxy ACMs) 等の約40化合物を評価したが、ACM-A 以上の *in vivo* 抗腫瘍活性を示したのは唯一 2-hydroxy ACMs (A, B) のみであった。しかし、その抗腫瘍活性は200% (T/C) を越す高い活性であった。2 位の水酸基の存在が *in vivo* 抗腫瘍活性の増強に与っていることは疑いない。最大抗腫瘍活性を与える投与量が ACMs に比べて多いことから、2 位の水酸基導入が低毒化に働いていることが窺える。また、2-hydroxy ACMs は redox 酵素による還元的脱糖鎖分解反応に対して著しく耐性であることが明らかにされており、⁴¹⁾ これが高活性を生む一因である可能性が高い。もし事実な

表6. 主要な新規アントラサイクリン系抗生物質の抗腫瘍活性

アントラサイクリン化合物	構造 ¹⁾	L1210 IC ₅₀ (μg/ml)			Ratio DNA/RNA	Antitumor act., (ip dose:mg/kg/days)
		Growth	DNA	RNA		
2-Hydroxyaclacinomycin A	2-hydroxyAKN-RN-dF-CA (7)	0.04	0.90	0.14	6.4	194 (5.0)
〃 B	2-hydroxyAKN-RN-dF-CB (7)	0.03	1.00	0.22	4.5	203 (7.5)
Epelmeycin E	ε-RMN-RN-dF-CA (7)	0.001	0.80	0.15	5.3	154 (1.25)
〃 C	ε-RMN-RN-dF (7)	0.04	0.80	0.20	4.0	179 (2.5)
〃 D	ε-RMN-RN (7)	0.01	0.95	0.23	4.1	141 (5.0)
A262-1	(10)R-R-RN-β-RMN-RN-R-R (7)	0.003	0.44	0.04	11.0	127 (0.2)
Obelmeycin B	(10)R-R-RN-β-isoRMN-RN-R-R (7)	0.001	0.26	0.03	8.7	120 (0.2)
Obelmeycin F	(10)R-dF-RN-γ-isoRMN	0.06	1.30	0.78	1.7	108 (0.6)
Roseorubicin A	(10)R-R-dF-RN-RN-γ-RMN	0.05	1.90	0.20	9.5	118 (0.25)
Betaclacinomycin A	β-RMN-RN-dF-CA (7)	0.005	0.46	0.12	3.8	214 (2.5)
〃 B	β-RMN-RN-dF-CB (7)	0.005	0.54	0.25	2.2	240 (1.25)
〃 S	β-RMN-RN-dF (7)	0.040	2.50	4.60	0.5	183 (0.1)
CG15A	β-RMN-RN-R (7)	0.003	3.00	1.20	2.5	222 (0.1)
4-O-methyl-β-rhodomyacin I	4-O-methyl-β-RMN-RN (7)	0.03	0.80	0.20	4.0	231 (4.0)
Obelmeycin A	β-isoRMN-RN (7)	0.001	0.58	0.14	4.1	155 (2.5)
Yellamycin A	α-CTN-RN (7)	0.007	0.28	0.23	1.2	169 (0.39)
CG18B	α-CTN-RN-dF (7)	0.02	2.60	2.32	1.1	213 (1.2)
Oxyaunomycin	β-RMN-DN (7)	0.0003	0.29	0.25	1.2	200 (0.05)
4-O-methyl-β-rhodomyacin (MC-3)	4-O-methyl-β-RMN-DN (7)	0.040	0.75	2.30	0.3	183 (0.5)
6-Deoxyoxaunomycin (DCP-1)	α-CTN-DN (7)	0.006	0.70	1.00	0.7	158 (0.08)
1-Hydroxyoxaunomycin (DCP-2)	β-isoRMN-DN (7)	0.005	1.00	0.78	1.3	188 (0.32)
Trisarubicinol	DHCMN-RN-dF-CA (7)	0.01	0.37	0.05	7.4	214 (5.0)
CG20A	DHCMN-DN-R (7)	0.02	1.20	1.20	1.0	226 (1.09)
Baunycin A2	DMN-DN-XA (7)	0.005	1.30	0.48	2.7	173 (0.63)
D326-IV	CMN-DN-XA (7)	0.005	0.19	0.09	2.1	156 (0.8)
Feudomycin A	13-deoxoDMN-DN (7)	0.02	0.30	0.30	1.0	135 (2.5)
既存 Aclacinomycin A	AKN-RN-dF-CA (7)	0.03	0.65	0.08	8.1	186 (3.8)
Cinerubicin A	1-hydroxyAKN-RN-dF-CA (7)	0.006	2.60	0.03	8.7	163 (1.5)
β-Rhodomyacin I	β-RMN-RN (7)	0.01	0.20	0.06	3.3	180 (3.1)
Daunomycin	DMN-DN (7)	0.02	0.42	0.16	2.6	145 (1.25)
Adriamycin	AMN-DN (7)	0.02	1.40	0.55	2.5	292 (1.25)

¹⁾ () の数値は糖鎖の結合位置を示す。

AKN : aklavinone ; RMN : rhodomyacinone ; isoRMN : isorhodomyacinone ; CTN : citromycinone ; AMN : adriamycinone ; DMN : daunomycinone
RN : L-rhodosamine ; DN : L-daunosamine ; dF : 2-deoxy-L-fucose ; CA : L-citerulose ; R : L-rhodinose ; XA : acetal

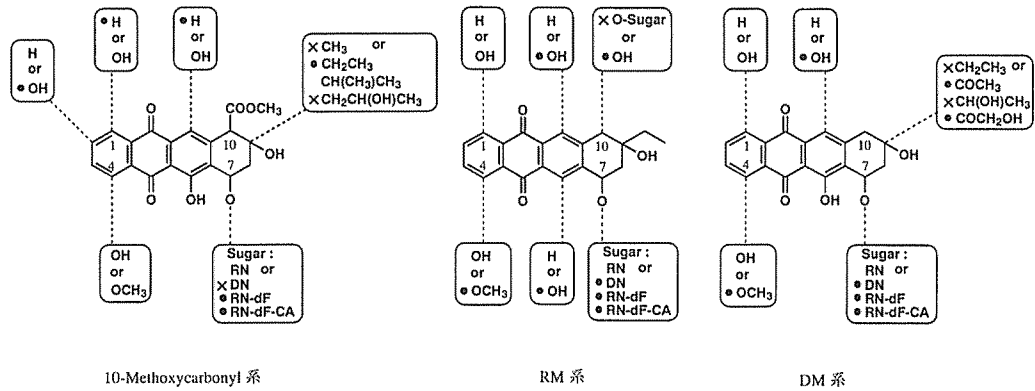
²⁾ L1210 細胞 10⁶ 個を ip 接種し、day1 より day10 まで薬剤を連続 ip 投与した。薬剤投与群の平均生存日数を無投与群のそれと除して%で表示。

れば、他のグループへの応用は重要課題と思われる。このグループは、核酸合成阻害濃度 (IC_{50}) の DNA/RN 比が 4 ~ 8 を示し、RNA 合成の優先的阻害剤であることがわかった。*In vitro* 活性では糖鎖が trisaccharide 型が最も強く、monosaccharide 型では活性が低下する傾向にあり、糖鎖は活性に重要と思われる。特に 2-hydroxy ACMs では短糖鎖による活性低下が顕著であった。ACM-A のアミノ糖 RN の脱 *N*-メチル化による DN への変換により *in vitro* および *in vivo* 抗腫瘍活性が激減することから、このグループではアミノ糖 RN の存在が活性発現に必須であると考えられる (表 1 参照)。また、1 位および 2 位の水酸基導入は *in vitro* 活性を増強したが、*in vitro* 活性には反映せず、重要な置換基ではないと判断した。

RM 系の化合物は 10 位に水酸基を有するグループで、7 位と 10 位の両方に糖鎖をもつ RMN diglycosides がメジャーで生産物である。既に Hoechst や国内数社が糖鎖の異なるアナログの約 30 種を単離しているが、我々の OBM_s を含め *in vitro* 増殖阻害活性は強力で *in vitro* 抗腫瘍活性が期待されたが、A262-1 および OBM-B の抗腫瘍活性は 120% (T/C) 台と低く、RMN diglycosides 系統には有意な *in vitro* 抗腫瘍活性を示す化合物はないと判断した。また、 γ -RMN glycosides 類の OBM-E および roseorubicin A も 100% (T/C) 台で無効であることがわかった。これらの化合物の核酸合成阻害作用の IC_{50} 値の DNA/RNA 比は 8 ~ 11 を示し、先の 10-methoxycarbonyl 系統に比べさらに顕著に RNA 合成を阻害する化合物であった。一方、10 位の水酸基が遊離の化合物、既知 β -RM-I ほか、新規な OBM-A (1-hydroxy- β -RM-I) および YLM-A (6-deoxy- β -RM-I) 等のマイナー成分にむしろ有意な *in vivo* 抗腫瘍活性 (T/C% で 155 ~ 180) が認められ、明らかに 10 位の糖鎖の存在が *in vivo* 活性を著しく低下させることがわかった。この系統の新規化合物のおよそ 30 余種を単離したが、このうち 6 化合物が 200% (T/C) 以上の高い抗腫瘍活性を示した。実際には、既知 β -RM-I の糖鎖アナログ BCM_s (A, B) や CG15A および RN が DN に置換したアミノ糖アナログ OXM, 4-O-methyl アナログ MC-1 と α -CTN disaccharide の CG18B がそれで、最高 240% (T/C) の抗腫瘍活性を記録した。明らかに β -RM-I 構造の周辺に高活性物質が集中したのである。この周辺の化合物の IC_{50} 値の DNA/RNA 比は 1 ~ 3 で RNA 合成阻害活性が大幅に低下しており、高抗腫瘍活性との関連性で興味深い。BCM_s および CG18B の高抗腫瘍活性は、活性に対する糖鎖の重要性を示すもので、disaccharide あるいは trisaccharide が必要であることを示している。また、 β -RM-I と OXM との関係からアミノ糖 RN の DN への置換で活性が上昇することを示している。DN を含む di- あるいは trisaccharide に興味もたれるが、残念ながら取得できていない。4-O-methyl 基の有効性は結果が二分して判定しにくい、*in vitro* 活性は下がる傾向にあった。また、1 位および 6 位の水酸基の有無は β -RM-I との対比から、活性に影響はないと思われるが、11 位の水酸基は、それを欠失した KSM_s で活性が激減することから活性に必須である。

DM 系グループは、10 位に置換基をもたない化合物群と言えるが、主として DM 生産菌および変異株からおよそ 50 種の新規化合物を単離した。このうちで *in vivo* 抗腫瘍活性が 200% (T/C) を越えた化合物は trisarubicinol とその糖鎖アナログ CG20A のみであった。Trisarubicinol は CMN を培養変換して得られたもので ACM-A と同じ trisaccharide を有する化合物である。このものは変換の過程で 13-dihydro CMN に変化した配糖体であるが、同じアグリコンをもつ 13-dihydro CM が劣性物質であるので、trisarubicinol の高活性はアミノ糖 RN および RN を含む糖鎖に由来するものと思われる。この系では、取得した新規物質のほとんどが DM に比べて劣性物質であったが、それは 9 位側鎖の acetyl 基の ethyl 基への変換、11 位の水酸基の離脱および 4' 位の置換体等によるものであった。BM_s や D788-18 で見られるように 4' 置換の *in vitro* 活性への影響は大きい、その効果は置換体に大きく依存しているように思われる。また、11 位の水酸基の離脱は活性を激下させることから、DM 系でも必須の置換基と考えられた。

本研究では約 140 種の新規アントラサイクリン化合物を調製し、*in vivo* 抗腫瘍活性 T/C % で 200 以上を示す化合物を検索した結果、10 数化合物を見出した。しかしながら、T/C% で 290 の抗腫瘍活性を示した ADM を越えるものはなかった。親化合物 DM の活性は 145% で、ADM のそれとは約 150% の差がある。しかし、両者の構造的差異は 9 位側鎖が DM の $-COCH_3$ に対し、ADM は $-COCH_2OH$ で僅かに OH 1 個の有無に過ぎないのである。図 6 に取得したアントラサイクリン類の構造 (置換基) と *in vivo* 抗腫瘍活性との関係を模式的に示した。高抗腫瘍活性が集中した BCM_s などの第二グループでの 2 位の水酸基の導入、さらには ADM の 9 位側鎖 $-COCH_2OH$ への置換ができれば活性が飛躍的に上がるだろうか、期待するところである



●は *in vivo* 抗腫瘍活性を高める置換基, ×は低下させる置換基

図6. 取得した新規アントラサイクリン系抗生物質の *in vivo* 抗腫瘍活性から見た構造的特徴

が、いまのところ微生物的生産手段が見あたらない。

7. 大量調製法

さて、改めて有力候補の臨床開発には何をしても製造法に目処を立てる必要がある。2-hydroxy ACMs, BCMs, Trisarubicinol および OXM を当面のポスト ACM 候補として選別してきたが、いずれも直接に発酵生産される化合物ではない。前3化合物はアグリコン 2-hydroxy AKN, β -RMN および CMN の微生物変換によって調製したものである。微生物変換法では、基質のアグリコンの調製と、それからの変換工程の2段階となり、それだけでも効率が悪い。さらに微生物変換は低濃度でしか起こらず、 $10\mu\text{g/ml}$ 程度の生成もやっとの生産技術である。製品化を考えるには、少なくとも100倍量の 1mg/ml の生産技術の確立が必要である。このうち、2-hydroxy ACMs は ACMs 生産菌株から2段階変異を行って得た ANR-58 株の蓄積アグリコンを、同菌株から得た ACM 非生産変異株で変換して得ることから、両者の掛け合わせで 2-hydroxy ACMs 生産菌の取得が可能である。1978年当時、放線菌の遺伝的組換え技術は、主として mating によっていたが、この現象は限られた菌株で起こる現象で ACM 生産菌株では起こらなかった。もう一つの方法は、当時組換え体の取得法として脚光を浴びていたプロトプラスト融合法であった。当時、この分野で非常に大きな研究成果を挙げたのは当時国立予防衛生研究所の岡西博士である。氏は1974年に、放線菌のプロトプラスト化とそれからの再生方法を明らかにし、J. Gen. Microbiology に報告していた。⁴¹⁾ この技術が放線菌のその後の遺伝子組換え技術の基礎となったのである。放線菌のプロトプラスト化は、菌株依存で前培養の技術(培地組成、培養条件)に大きく左右され、条件設定に手間取ったが、およそ半年余の取組みで組換え体、すなわち 2-hydroxy ACMs 生産菌の取得に成功した。組換えが起こるとしても 10^{-3} 頻度以下では実際には単離することは難しい。そこで、栄養要求マーカをつけておいて、その組換え体の中から 2-hydroxy ACMs 生産菌を採取する方法を採用した結果、プロトトロフの約1%の確率で組換え体が取得できたのである(表7)。^{42,43)} 薬学会主催の第10回メディスナルケイストリーシンポジュームの招待講演で発表した⁴⁴⁾が、翌日の朝日の何面かにマヒナスターズの芸能記事と並んで大きく紹介されて驚いた。今とすれば何でもなしの実験成果であるが、当時は S. N. Cohen らによる遺伝子組換え技術が発表された時期にあり、新聞記者も大変敏感になっていたものと思われる。BCMs および trisarubicinol については大量調製法は未だ見いだされていない。一方、OXM は DM 系生産菌の変異株 RPM-5 の微量蓄積物質で、D788-1 の化学分解の副産物であることが伺われた。そこで D788-1 からの光変換を検討した結果、アセトン中 (pH 5)、 I_2 の存在下で光照射を行うと約50%の収率で OXM が得られることがわかった(図7)。⁴⁵⁾ アルカリ性アセトン溶液中では D788-2 が生成した。D788-1 は水溶性で菌体外生産をするため大量に生成する物質で、培養液 10L の D788-1 より、最終的に 2g の OXM を調製することができたのである。このことは、不活性な中間体といえどもおそろかにはいけないという教訓を示している。また、最近、N, N-dimethyl D788-1 に相当する生合成中間体が

表 7. 2-Hydroxy AKN 蓄積変異株 (*aktH*, *aktG*) および ACM 非生産変異株 (*aktG*) のプロトプラスト融合法による 2-hydroxy ACM 生産組み換え体の作成

Genetic cross (genetic marker ¹⁾)	Prototrophic recombination frequency	Random selection		Prototrophic selection ²⁾	
		2HO-ACM-producing recombinant (<i>aktF</i>) No./fusants	2HO-ACM-producing recombinant (<i>aktF</i>) No./fusants	2HO-ACM-producing recombinant (<i>aktF</i>) No./fusants	ACM-producing recombinant No./fusants
ANR-58(<i>aktH</i> , <i>aktG</i>) × KE-303(<i>aktF</i> , <i>ura</i>)	—	0/500	—	—	—
10U-2936(<i>aktH</i> , <i>aktG</i> , <i>ade</i>) × 11U-111(<i>aktF</i> , <i>ura</i>)	19.6 × 10 ⁻³	0/500	9/500 (18 × 10 ⁻³)	1/500 (2 × 10 ⁻³)	—
10U-1183(<i>aktH</i> , <i>aktG</i> , <i>leu</i>) × 11U-111(<i>aktF</i> , <i>ura</i>)	19.6 × 10 ⁻³	0/500	2/500 (4 × 10 ⁻³)	0/500 (0)	—
10U-255(<i>aktH</i> , <i>aktG</i> , <i>arg</i>) × 11U-111(<i>aktF</i> , <i>ura</i>)	19.6 × 10 ⁻³	ND	1/333 (3 × 10 ⁻³)	1/333 (3 × 10 ⁻³)	—

¹⁾ *aktF* : polyketide synthase ; *aktG* : sugar transferase ; *aktH* : C2-reductase ; *ade*, *era*, *leu*, *arg* show adenine, uracil, leucine or arginine requirement.

それぞれの菌株から調製したプロトプラスト細胞懸濁液 (10⁸/ml 以上) を 40% PEG 存在下で融合させ、complete or minimum agar 上に塗布して、random or prototrophic selection を行った。生じた fusants につき、2-hydroxy ACMs あるいは ACMs の生産菌を検索した。

²⁾ () 内は組み換え融合体の出現頻度を示す。

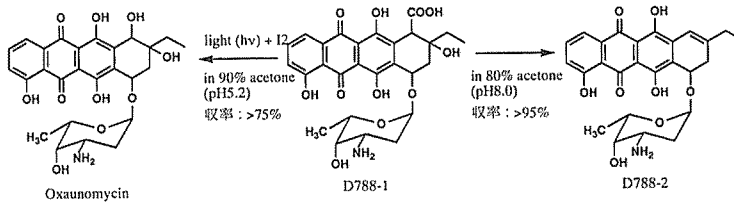


図 7. D788-1 物質の光変換による Oxaunomycin および D788-2 の生成

RMs 生産菌の生合成ブロック変異株に見いだしており、BCMs の大量調製への応用につながるものと期待される。

8. アントラサイクリン系物質の生合成

1980年以前には、アントラサイクリン類の生合成については、ほとんど研究されておらず不明であった。構造はアグリコン部と糖鎖からなる複合物質であるが、これらが別々に生成し合体してできるのか、あるいは初期段階でグリコシドが形成されたのち、さらに生合成変換を受けて最終アントラサイクリン構造に至るのかの2系統が考えられた。ACM 発酵とあわせて DM 系や RM 系の生産についても研究を始めて見ると、アグリコン蓄積株が高頻度に得られることがわかった。すなわち、ACM 生産菌からは Aklavinone (AKN) 蓄積性変異株が、DM や RMs 生産菌からは daunomycinone (DMN) や β-RMN ではなくて、ε-RMN を蓄積する変異株が得られた。これらのアグリコンは、ACM あるいは DM や RMs の生合成中間体であって、後者にあつては糖鎖が結合したのち、さらに変換されて生成する経路が考えられた。その証拠に AKN を ACM 非生産性変異株 (KE303) に培養液に入れると、見事に ACM が生成した。同様に DM 非生産性変異菌株

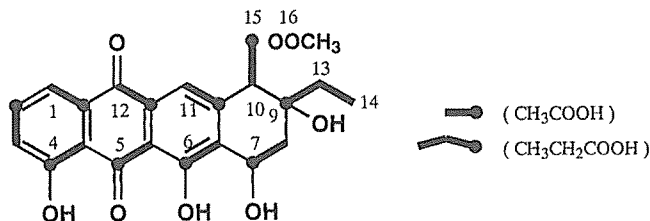


図 8. ACM アグリコンの生合成-¹³C 前駆体の取り込み

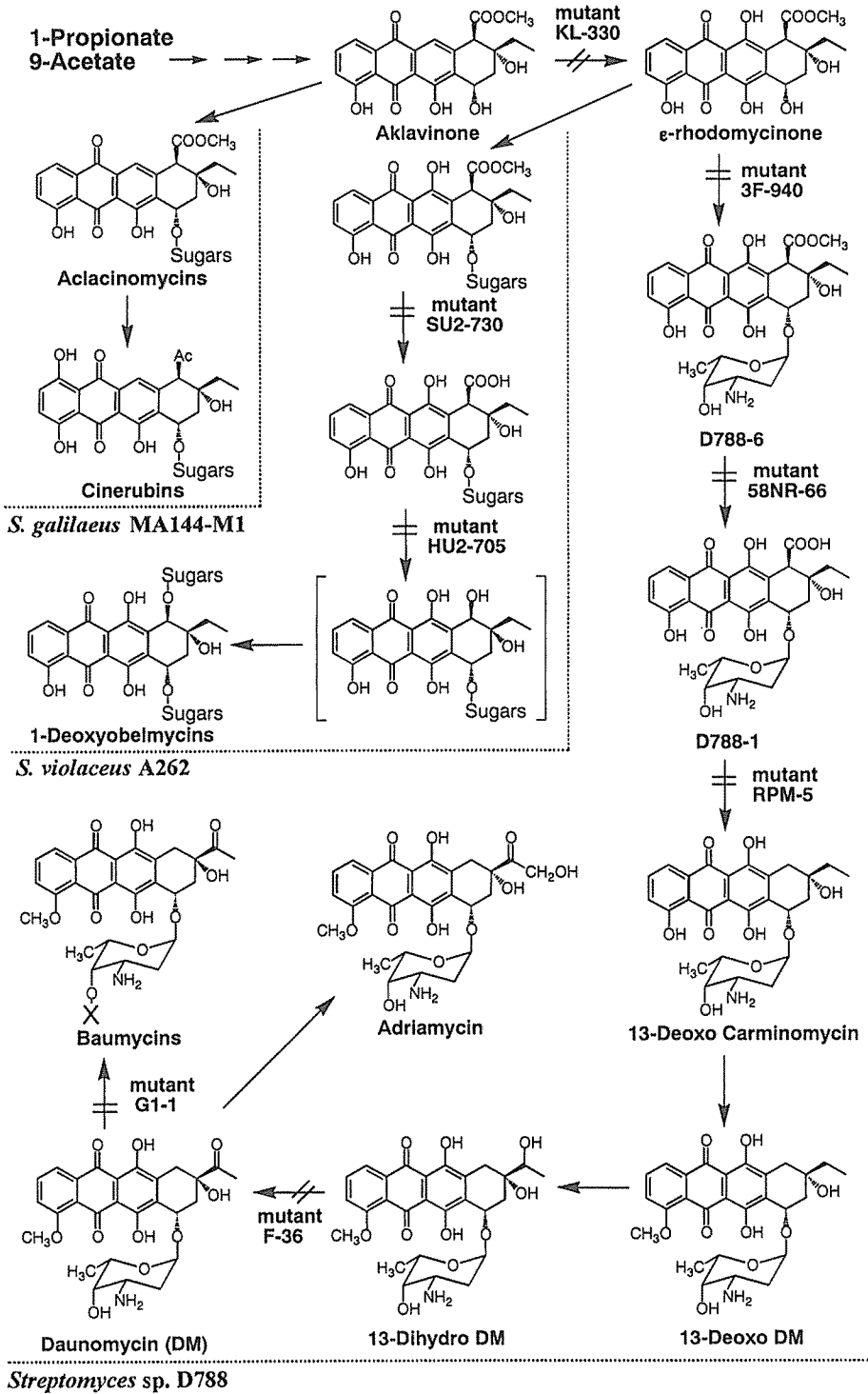


図9. *S. galilaeus* MA144-M1 *S. violaceus* A262 および *Streptomyces* sp. D788 菌株のアントラサイクリン生合成経路

(3F-773) の培養液に ϵ -RMN を入れて培養すると DM を生産することから、これらのアグリコンが中間体であることが示された。アグリコン部はマクロライド系抗生物質と同様にポリケチド系経路、すなわちマロンの脱炭酸縮合（最終的には酢酸ユニット）を経る脂肪酸合成経路に類似する経路により得られるものと推定された。そこで AKN 蓄積株に $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸あるいは $[1-^{13}\text{C}]$ プロピオン酸の添加培養により得た ^{13}C -ラベル AKN の ^{13}C NMR 分析より、前者では C2, 4, 5, 6, 7, 9, 10a, 11a および 15 が、後者では C9 のみに取り込まれることが判明した。従って、基本的なアグリコン骨格はプロピオン酸の 1 ユニットと酢酸の 9 ユニットから生成することが示された。⁴⁵⁾ 一方、 $[1-^{14}\text{C}]$ プロピオン酸および $[\text{methyl-}^{14}\text{C}]$ L-メチオニン を AKN 生産菌株に添加培養して得た $[^{14}\text{C}]$ AKN を 3F-773 菌株培養液に添加し、その粗抽出を加水分解して DMN および ϵ -RMN を単離し精製して、 ^{14}C 比放射活性 (cpm/mole) を比較するとにより、前者のものから得られた DMN の比放射活性に変化はないが、後者のものからは ^{14}C 放射活性がほとんど認められなかった。一方、 ϵ -RMN については、両者とも同一の ^{14}C 比放射活性を示した。この結果から、DM の生成は AKN から ϵ -RMN を経て、アミノ糖 DN が結合したのち 10 位の COOCH_3 が離脱して生成する経路の存在が明らかとなった。⁴⁶⁾

このアグリコン骨格の生成変換については、その生合成ブロック変異株の取得によって立証が可能である。図 9 は、ACMs, RMs および DM 系構成部室の生合成経路の概略を示したものである。ACMs は最も単純な化合物で AKN に糖鎖がついて生成するが、糖鎖のつき方については未だ不明である。Trisaccharide (RN-dF-R) が先にできて AKN につくのか、AKN に RN, dF, R の順に糖が結合し ACMs ができるのか、明確にされていない。しかし、ACM のアナログは Y 酵素によるの末端糖の修飾作用によって生成していることは間違いない。DM 生合成については、生合成ブロック変異株の分離から、そのほぼ全容を明らかにした。すなわち、 ϵ -RMN 蓄積株, D788-5 (7-O-daunosaminy- ϵ -RMN) 蓄積株, D788-1 (7-O-daunosaminy-10-carboxy-13-deoxy CMN) 蓄積株, FM-A (7-O-daunosaminy-4-O-methyl-13-deoxy CMN) 蓄積株, 13-dihydro DM 蓄積株等の変異株が単離できたのである。これに加えて Farmitalia の Cassinelli らは 13-deoxy CM の蓄積株を単離している。従って、これらの生産物を構造順に並べることによって、DM の生合成経路を特定することができる。図示したように、 ϵ -RMN \rightarrow D788-5 \rightarrow D788-1 \rightarrow 13-deoxy CM \rightarrow 13-deoxy DM \rightarrow 13-dihydro DM \rightarrow DM \rightarrow BMs のルートが明らかとなった。また、種々の中間体の DM への培養変換試験により、この経路の正当性が立証された。⁴⁶⁾ RMs についても、EPMs (ϵ -RMN glycosides) 蓄積株を単離しており、DM 生成と同様に ϵ -RMN glycosides を経由して生合成されることがわかった。さらに、10-carboxy-13-deoxy CMN glycoside (HU2-705B) の蓄積株を単離しており、DM 系の生合成に類似して、EPMs の 16 位脱メチルエステル化が起こり、10 位の脱炭酸-水酸基導入を経て、10 位に糖鎖がつき β -RMs (β -RMN glycosides) の生成に至る経路が推定される。 β -RMs の糖鎖については、ACMs の糖鎖と同様に、末端糖が Y 酵素によって変化し、種々の糖アナログ生成することが明らかにされている。¹³⁾ この 3 系統の化合物の生合成は、初期段階で共通するものの後期で微妙に異なっており、その遺伝的獲得過程が如何になされたか、進化の問題との関連で大変に面白い研究課題を含んでいる。

9. おわりに

本稿は制癌剤 aclacinomycin A の開発を中心に 1974 年から約 10 年間に取り組んだ新規アントラサイクリン系抗生物質の微生物生産についてまとめたものである。当時、既に 5 種の生産菌株が単離されていたが、その後異種構造を有するアントラサイクリン生産菌は発見されておらず、出尽くした状況にあると思われる。これらのうち 3 種の生産菌株からの新規アナログの探索を計画したのである。残り 2 種 nogalamycins および steffimycins については *in vivo* 抗腫瘍活性の予試の結果が悪く、アナログ開発の対象としなかった。一つは生合成中間体の取得、一つには互いの生合成の融合を企図したハイブリッド抗生物質の造成を試み、およそ 150 弱の新規物質を単離した。このうち、マウス白血病細胞 L1210 に対して T/C % で 200 を越える高い抗腫瘍活性を示す 10 数化合物を見出すことができた。そのうち、betaclamycin, 2-hydroxyaclacinomycin および oxaucomycin については、さらに化学誘導を重ねて、開発研究が進められている。企業での開発研究は、製品化に向けての短距離競争であって、基本的には寄り道は許されない。本研究では、相当数の生合成ブロック変異株を早期に単離しており、アントラサイクリン生合成遺伝子のクローニングには最も有利な位

置にいたが、米ウスコンシン大 Hutchinson や米オハイオ州立大 strohl に後塵を排することになった。新規物質の取得を命題としたからであり、今となっては大変に惜しまれる判断であったと後悔の念が強い。

引用文献

- 1) OKI, T., A. YOSHIMOTO, Y. MATSUZAWA, S. HORI, H. TONE, A. TAKAMATSU, T. TAKEUCHI, M. ISHIZUKA, M. HAMADA and H. UMEZAWA, 1975. A macromolecular antitumor antibiotic: macracidmycin. *J. Antibiotics*, **28**: 479-482.
- 2) BROCKMANN, H. and K. BAUER, 1950. Rhodomycin, ein rotes Antibioticum. *Naturwissenschaften*, **37**: 492-493.
- 3) DI MARCO, A., M. GAEANI, P. OREZZI, B. M. SCARPINATA, R. SILVERSTRINE, M. SOLDALTI and L. VALENTINI, 1964. Daunomycin, a new antibiotic of rhodomycin group. *Nature*, **201**: 706-707.
- 4) ARCAMONE, F. G., G. CASSINELLA, G. FANTINI, A. GEIN, P. OREZZI, C. POL and C. SALLA, 1969. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.*, **11**: 1101-1110.
- 5) BRAZHNIKOVA, M. G., V. B. ZBARSKY, V. L. PONOMARENKO and N. P. POTAPOVA, 1974. Physical characteristics and structure of carminomycin, a new antitumor antibiotic. *J. Antibiotics*, **27**: 254-259.
- 6) Keller-SCHERLING, W. and W. RICHLE, 1971. Metabolic products of microorganisms. LXXXVL. Structure of cinerubin A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **10**: 68-77.
- 7) NITTON, D. E., Jr., W. T. BRANDER, J. A. BUSH, A. B. COON, J. E. MOSELEY, R. W. MYLYMAKE, F. A. O' HERRON, R. HWH. SCHREIBER, and A. L. VULCANO, 1977. New antitumor antibiotics: Musettamycin and marcellomycin. *J. Antibiotics*, **30**: 525-529.
- 8) KELLY, R. C., I. SCHLETTER, J. M. KOERT, F. A. MacKELLER and P. F. WILEY, 1977. Structures of steffimycin and steffimycin B. *J. Org. Chem.*, **42**: 3591-3596.
- 9) WILEY, P. F., R. B. KELLY, E. L. CARON, V. H. WILEY, J. H. JOHNSON, F. A. MACKELLAR and S. A. MIZSAK, 1977. Structure of nogalamycin. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**: 542-549.
- 10) OKI, T., Y. MATSUZAWA, A. YOSHIMOTO, K. NUMATA, I. KITAMURA, S. HORI, A. TAKAMATSU, H. UMEZAWA, M. ISHIZUKA, H. NAGANAWA, H. SUDA, H. HAMADA and T. TAKEUCHI, 1975. New anthracycline antibiotics, aclacinomycins A and B. *J. Antibiotics*, **28**: 830-834.
- 11) YOSHIMOTO, A., T. OKI and T. INUI, 1978. Differential antimicrobial activities on anthracycline antibiotics on rec⁻ *Bacillus subtilis*. *J. Antibiotics*, **31**: 92-94.
- 12) UMEZAWA, K., M. SUGIMURA, T. MATSUSHIMA and T. SUGIMURA, 1978. Mutagenicity of aclacinomycin A and daunomycin derivatives. *Cancer Res.*, **38**: 1782-1784.
- 13) YOSHIMOTO, A., T. OGASAWARA, I. KITAMURA, T. OKI, T. INUI, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1979. Enzymatic conversion of aclacinomycin A to Y by a specific oxidoreductase in *Streptomyces*. *J. Antibiotics*, **32**: 472-481.
- 14) YOSHIMOTO, A., H. TOBE, O. JOHDO and T. TAKEUCHI, 1991. Structure-sensitivity relationship of anthracycline antibiotics to C-7-reduction by redox enzymes. *Jpn. J. Antibiotics*, **44**: 289-295.
- 15) OKI, T., Y. MATSUZAWA, K. KIYOSHIMA, A. YOSHIMOTO, H. NAGANAWA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1981. New anthracycline, feodomycins, produced by the mutant from *Streptomyces coeruleorubidus* ME130-A4. *J. Antibiotics*, **34**: 784-790.
- 16) MATSUZAWA, Y., A. YOSHIMOTO, K. KOUNO and T. OKI, 1981. Baumycin analogs isolated from *Actinomadura* sp.. *J. Antibiotics*, **34**: 774-776.
- 17) YOSHIMOTO, A., O. JOHDO, S. FUJI, K. KUBO, H. NISHIDA, R. OKAMOTO and T. TAKEUCHI, 1992. Anthracycline metabolites from baumycin-producing *Streptomyces* sp. D788. I. Isolation of antibiotic-blocked mutants and their characterization. *J. Antibiotics*, **45**: 1005-1007.
- 18) FUJII, S., K. KUBO, O. JOHDO and A. YOSHIMOTO, 1986. A new anthracycline metabolites D788-1 (10-carboxy-

- 13-deoxocarminomycin) in daunorubicin beer. *J. Antibiotics*, **39**: 473-475.
- 19) YOSHIMOTO, A., S. FUJI, O. JOHDO, K. KUBO and T. TAKEUCHI, 1986. Intensely potent anthracycline antibiotic oxaunomycin produced by a blocked mutant of the daunorubicin-producing microorganism. *J. Antibiotics*, **39**: 902-909.
- 20) YOSHIMOTO, A., S. FUJI, O. JOHDO, K. KUBO, H. NISHUDA, R. OKAMOTO and T. TAKEUCHI, 1993. Anthracycline metabolites from baumycin-producing *Streptomyces* sp. D788. II. New anthracycline metabolites produced by a blocked mutant strain RPM-5. *J. Antibiotics*, **46**: 56-64.
- 21) YOSHIMOTO, A., O. JOHDO, H. NISHUDA, R. OKAMOTO and T. TAKEUCHI, 1993. Anthracycline metabolites from baumycin-producing *Streptomyces* sp. D788. III. New anthracycline metabolites produced by blocked mutants 4L-660 and YDK-18. *J. Antibiotics*, **46**: 1758-1761.
- 22) JOHDO, O., T. ISHIKURA, A. YOSHIMOTO and T. TAKEUCHI, 1991. Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. I. Isolation of antibiotic-blocked mutants from *Streptomyces violaceus* A262. *J. Antibiotics*, **44**: 1110-1120.
- 23) SAITO, S., Y. KATSUDA, O. JOHDO and A. YOSHIMOTO, 1995. New rhodomycin analogs, SS-288A and SS-288B, produced by *Streptomyces violaceus* mutant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**: 135-137.
- 24) JOHDO O., Y. WATANABE, T. ISHIKURA, and A. YOSHIMOTO, 1991. Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. III. New anthracycline obelmycins produced by a blocked mutant strain SEI-2385. *J. Antibiotics*, **44**: 287-295.
- 25) JOHDO, O., Y. WATANABE, T. ISHIKURA, and A. YOSHIMOTO 1991. Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. V. New anthracycline alldimycin A: A minor component isolated from obelmycin beer. *J. Antibiotics*, **44**: 1160-1164.
- 26) JOHDO, O., Y. WATANABE, T. ISHIKURA, and A. YOSHIMOTO 1991. Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. IV. New anthracycline yellamycins produced by a variant strain SC-7. *J. Antibiotics*, **44**: 1155-1159.
- 27) JOHDO, O., Y. WATANABE, T. ISHIKURA, and A. YOSHIMOTO 1991. Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. II. New anthracycline epelmycins produced by a blocked mutant strain SU2-730. *J. Antibiotics*, **44**: 1121-1129.
- 28) YOSHIMOTO, A., T. OKI, Y. MATSUZAWA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1980. Biosynthesis of anthracycline antibiotics by *Streptomyces galilaeus*. Glycosidation of various anthracyclines by an aclacinomycin-negative mutant and biosynthesis of aclacinomycins from aklavinone. *J. Antibiotics*, **33**: 1331-1340.
- 29) YOSHIMOTO, A., T. OKI, Y. MATSUZAWA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1981. New anthracycline antibiotic, 2-hydroxyaclacinomycin A. *J. Antibiotics*, **34**: 914-920.
- 30) YOSHIMOTO, A., O. JOHDO, Y. TAKATSUKI, T. SAWA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1984. New anthracycline antibiotics obtained by microbial glycosidation of β -isorhodomycinone and α_2 -rhodomycinone. *J. Antibiotics*, **37**: 935-938.
- 31) JOHDO, O., A. YOSHIMOTO, T. ISHIKURA, H. NAGANAWA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1986. New anthracycline antibiotic CG12 obtained by microbial glycosidation of α -citromycinone. *Agr. Biol. Chem.*, **50**: 1657-1659.
- 32) YOSHIMOTO, A., O. JOHDO, Y. WATANABE, H. NISHUDA and R. OKAMOTO, 1992. Production of new anthracycline antibiotic betaclamycin B by microbial conversion with a specific aclarubicin-negative mutant. *J. Antibiotics*, **45**: 1005-1007.
- 33) JOHDO, O., I. YOSHIOKA, N. NAGANAWA, T. TAKEUCHI and A. YOSHIMOTO, 1996. New betaclamycin and aclarubicin analogs obtained by prolonged microbial conversion with an aclarubicin-negative mutant. *J. Antibiotics*, **49**: 669-675.
- 34) YOSHIMOTO, A., Y. MATSUZAWA, T. ISHIKURA, T. SAWA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1984. New anthracycline derivatives from betaclamycin A. *J. Antibiotics*, **37**: 920-922.
- 35) JOHDO, O., H. TONE, R. OKAMOTO and A. YOSHIMOTO, 1993. Microbial glycosidation of some anthracycline

- antibiotics by an antibiotic-blocked mutant of aclarubicin producer. *J. Antibiotics*, **46**: 1219-1231.
- 36) YOSHIMOTO, A., Y. MATSUZAWA, T. OKI, H. NAGANAWA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1980. Microbial conversion of ϵ -pyromycinone and ϵ -isorhodomyconone to 1-hydroxy-13-dihydrodaunomycin and *N*-formyl-1-hydroxy-13-dihydrodaunomycin and their bioactivities. *J. Antibiotics*, **33**: 1158-1166.
- 37) YOSHIMOTO, A., O. JOHDO, H. TONE, R. OKAMOTO, H. NAGANAWA, T. SAWA and T. TAKEUCHI, 1992. Production of new anthracycline antibiotics 1-hydroxyoxaunomycin and 6-deoxyoxaunomycin by limited biosynthetic conversion using a daunorubicin-negative mutant. *J. Antibiotics*, **45**: 1609-1617.
- 38) JOHDO, O., H. TONE, R. OKAMOTO, A. YOSHIMOTO and T. TAKEUCHI, 1992. Production of new anthracycline antibiotics by microbial 4-*O*-methylation using a specific daunorubicin-negative mutant. *J. Antibiotics*, **45**: 1609-1617.
- 39) YOSHIMOTO, A., 1982. Production of hybrid anthracycline antibiotics by microbial biosynthetic conversion. *4th Symposium on Medicinal Chemistry in Pharmaceutical Society of Japan*, pp. 33-36.
- 40) JOHDO, O., H. TONE, R. OKAMOTO and A. YOSHIMOTO, 1992. Photochemically obtained *N*-demethyl derivatives of anthracyclines. *J. Antibiotics*, **45**: 1653-1661.
- 41) OKANISHI, M., M. SUZUKI and H. UMEZAWA, 1974. Formation and reversion of streptomycetes protoplasts: cultural condition and physiological study. *J. Gen. Microbiol.*, **80**: 389-400.
- 42) YOSHIMOTO, A., O. JOHDO, T. ISHIKURA and T. TAKEUCHI, 1991. Anthracycline antibiotic 2-hydroxyaclacinomycins: I. Conversion of 2-hydroxyaclacinomycin-producing recombinant from aclacinomycin-blocked mutants of *Streptomyces galilaeus* by a technique of protoplast fusion. *Jpn. J. Antibiotics*, **44**: 269-276.
- 43) YOSHIMOTO, A., O. JOHDO, T. ISHIKURA and T. TAKEUCHI, 1991. Anthracycline antibiotic 2-hydroxyaclacinomycins: II. Production of 2-hydroxyaclacinomycins A and B by a new recombinant strain and their antitumor activity. *Jpn. J. Antibiotics*, **44**: 277-286.
- 44) YOSHIMOTO, A., O. JOHDO, H. TONE, R. OKAMOTO and T. ISHIKURA, 1991. Photochemical production of oxaunomycin from precursor anthracycline metabolites D788-1. *Jpn. J. Antibiotics*, **44**: 264-268.
- 45) KITAMURA, I., H. TOBE, A. YOSHIMOTO, H. NAGANAWA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA, 1981. Biosynthesis of aklavinone and aclacinomycins. *J. Antibiotics*, **34**: 1498-1500.
- 46) YOSHIMOTO, A., T. OKI and H. UMEZAWA, 1980. Biosynthesis of daunomycinone from aklavinone and ϵ -rhodomyconone. *J. Antibiotics*, **33**: 1199-1201.
- 47) YOSHIMOTO, A., T. NAKAMURA, K. KUBO, O. JOHDO and H. TONE, 1995. Daunomycin biosynthesis by microbial conversion of precursor metabolites using biosynthetically blocked mutants. *J. Ferm. Bioeng.*, **79**: 229-235.