

## Myxococcus stipitatus JW117이 생산하는 Polyene계 세포독성 물질의 분리 및 특성

안종웅\*, 최상운, 권호정<sup>1</sup>

한국화학연구원 생명의약부, <sup>1</sup>세종대학교 공과대학 생명공학과

**Isolation and Properties of Cytotoxic Polyene Antibiotics Produced by *Myxococcus stipitatus* JW117.** Ahn, Jong-Woong\*, Sang-Un Choi, and Ho Jeong Kwon<sup>1</sup>. Medical Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea, <sup>1</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Institute of Bioscience, Sejong University, Seoul 143-747, Korea - Drug resistance is one of the most significant impediments to successful chemotherapy of cancer. Multidrug-resistance (MDR) is characterized by decreased cellular sensitivity to anticancer agents due to the overexpression of P-glycoprotein. By employing adriamycin-resistance CL02 cancer cells, we undertook the screening for agents which were effective to multidrug-resistant cancer cells. As a result, a myxobacterial strain JW117 was selected for study since the solvent extract of cell mass of the strain was found to exhibit significant activity against the CL02 cancer cells. Cytotoxicity-guided chromatographic fractionation led to the isolation of phenalamides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub>. The producing organism was identified as *Myxococcus stipitatus* by taxonomic comparison with type strains of *Myxococcus* sp. as well as its morphological and physiological characteristics. Phenalamides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>3</sub> were as active against drug-resistant cancer cells CL02 and CP70 as against the corresponding sensitive cells with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.23~0.57 µg/ml.

**Key words:** *Myxococcus stipitatus*, phenalamides, *mdr*-cancer cell, cytotoxicity

현재 암환자의 화학요법에 있어서 약물에 대한 암세포의 내성발현이 항암치료의 주요 장애요인이 되고 있으며, 특히 암세포가 특정 항암제에 의해 내성을 획득하면 구조가 상이한 타 항암제에도 교차내성을 나타내는 이른바 암세포의 다약제 내성(multidrug resistance, MDR)이 암 화학요법에 있어서 가장 심각한 문제가 되고 있다. 다약제 내성의 기전(mechanism)에 대해서는 다양한 형태가 보고되어 있는데 그 중에서도 P-glycoprotein(Pgp)에 의한 다약제 내성이 가장 많이 알려져 있다[1,7,8]. Pgp는 분자량이 170 KDa 정도이며 transmembrane glycoprotein으로서, vinca alkaloids, anthracyclines, epipodophyllotoxin 등과 같은 다양한 종류의 약물들을 세포 밖으로 배출시킴으로써 결과적으로 약물의 세포독성을 나타나지 못하게 한다[4,12]. 이러한 다약제 내성으로 인해 지금까지 개발된 많은 항암제가 사용해보기도 전에 무력화될 뿐만 아니라 최근 항암제개발 연구에서 가장 성공적인 성과로 인정받고 있는 taxol의 경우도 이를 이용한 치료과정에서 내성 암세포의 출현이 보고되고 있어서 그 심각성을 더해주고 있다. 이러한 관점에서 미국 국립 암연구소를 비롯해 Sandoz,

Pfizer, Vertex, Xenova 등과 같은 선진 제약기업들은 새로운 기전의 신규물질에 근거한 항암제 개발연구와 함께 다약제 내성을 극복하는 방법의 하나로써 Pgp에 영향을 받지 않는 새로운 항암제의 개발연구에 역점을 두고 있다. 본 연구는 최근 생리활성물질의 새로운 source로 부각되고있는 점액세균을 대상으로 그들의 대사산물에서 다약제 내성 암세포에 대한 생장억제물질을 탐색할 목적으로 Choi 등[2]이 확립한 다약제 내성 암세포주인 CL02 세포 및 A2780 인체기원 자궁암 세포주로부터 cisplatin 내성 세포주로 확립된 CP70 세포를 이용하여 그 세포독성을 스크리닝 한 결과, 균주 JW117의 배양물에서 우수한 활성을 발견하고 그것에 함유된 활성물질의 분리 및 구조결정과 그 생물활성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리 및 배양

점액세균 JW117은 당 연구소 주변의 산에서 채집한 토양에서 *Rhodotorula rubra*의 용균현상을 지표로 하여 분리하였으며, VY/2 agar 배지[9]상에서 계대하고, 균체증식을 위한 전배양과 물질생산을 위한 본배양은 modified MD1배지[3]를 이용하였다. Modified MD1배지 400 ml를 2 l 용량의 배양 플라스크에 넣은 후 동일성분의 배지에서 전배양한

\*Corresponding author

Tel: 82-42-860-7164, Fax: 82-42-860-7160

E-mail: jwahn@kriict.re.kr

JW117의 균액을 5% (v/v) 접종하여 30°C, 5일간 진탕배양 하였다.

### 균주의 동정

JW117의 분류학적 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 및 참고문헌[13]의 분류 동정에 관한 시험항목을 기준으로 하여 표준균주인 *Myxococcus stipitatus* ATCC 29611을 함께 공시하여 시험하였다. 영양세포의 swarm과 자실체의 형태는 실체현미경 (OLYMPUS SZ-11, OLYMPUS)과 광학현미경 (ECLIPS E600, NIKON)으로 관찰하였고, 포자의 형태 및 크기는 주사전자현미경 (SEM, JSM-5410LV, JEOL)으로 조사하였다.

### 추출 및 분리

배양액을 원심분리하여 균체를 모은 다음, acetone으로 추출하여 감압 농축하였다. 이 농축물을 silica gel에 흡착시켜 ethyl acetate:n-hexane=4:6~8:2를 전개용매로 하여 단계적으로 극성용매의 비율을 높이면서 column chromatography( $\phi 3 \times 30$  cm)를 행하였다. 분리과정에서 얻어진 활성 분획물은 다시 methanol을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography( $\phi 2.5 \times 80$  cm) 한 후, 최종적으로 85% aq. MeOH를 용매제로 reversed phase의 RP-18 column ( $\phi 2 \times 20$  cm, JAI)을 장착한 Recycling prep. HPLC(LC-908, Japan Analytical Industry Co., Ltd.)를 행하여 활성분체로서 3개의 화합물을 순수하게 분리하고 KR11701, KR11702, KR11703으로 각각 명명하였다.

### 기기분석

정제된 화합물들의 UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 UV265 spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 측정하였고 IR spectrum의 측정은 FTIR spectrometer(Mattson, USA)로 하였다. 선광도는 automatic polarimeter(Rudolph Research, USA)로 측정하였으며, mass의 측정은 OPUS data system이 장착된 mass spectrometer(Micromass, England)로 하였다. COSY, ROESY, DEPT, HMBC 및 HSQC를 포함한 각종 NMR spectrum은 UNITY500 NMR spectrometer (Varian, USA)를 사용하였으며 내부 표준물질로는 tetramethyl silane (TMS)을, 측정용매로는 CD<sub>3</sub>OD를 사용하였다.

**KR11701:** colorless oil;  $[\alpha]_D -189^\circ$  (*c* 1.0, MeOH); UV(MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 356nm (4.7); IR(film)  $\nu_{max}$ : 3320, 1636, 1600, 1577, 1496, 996  $cm^{-1}$ ; HREIMS *m/z* 491.3381 (calcd for C<sub>32</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>3</sub>, 491.3399); EIMS *m/z* 491[M<sup>+</sup>], 473, 455, 289, 271; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125MHz): 171.8(s), 144.1(s), 141.8(d), 139.7(d), 139.4(d), 136.3(s), 135.5(s), 135.1(d), 134.8(d), 134.2(d), 131.5(s), 129.7(d, x2), 129.2(d, x2), 129.0(d), 128.9(d), 126.5(d), 122.8(d), 82.6(d), 66.1(t), 48.5(d), 40.8(t), 37.8(d), 34.9(t), 32.8(d),

21.5(q), 18.3(q), 17.1(q), 13.3(q), 13.0(q), 12.6(q).

**KR11702:** colorless oil;  $[\alpha]_D +3.0^\circ$  (*c* 1.0, MeOH); UV(MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 355nm (4.7); IR(film)  $\nu_{max}$ : 3420, 1641, 1600, 1577, 1496, 993  $cm^{-1}$ ; EIMS *m/z* 491[M<sup>+</sup>], 473, 289, 271; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125MHz): 171.8(s), 144.0(s), 141.0(d), 139.9(d), 138.9(d), 137.8(s), 136.3(s), 135.5(s), 135.2(d), 134.1(d), 132.7(d), 130.5(s), 129.4(d, x2), 129.2(d, x2), 128.1(d), 127.7(d), 126.5(d), 82.6(d), 66.1(t), 48.8(d), 40.8(t), 37.8(d), 34.9(t), 32.8(d), 21.5(q), 18.3(q), 17.1(q), 13.3(q), 13.0(q), 12.6(q).

**KR11703:** colorless oil;  $[\alpha]_D -40.3^\circ$  (*c* 0.3, MeOH); UV(MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 353nm (4.6); IR(film)  $\nu_{max}$ : 3332, 1636, 1602, 1577, 1522, 1454, 998  $cm^{-1}$ ; EIMS *m/z* 491[M<sup>+</sup>], 473, 289, 271; <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125MHz): 172.0(s), 144.1(s), 141.3(d), 138.9(d), 138.4(d), 136.3(s), 136.0(d), 135.4(s), 134.0(d), 131.5(s), 129.7(d), 129.4(d, x2), 129.2(d, x2), 127.9(d), 127.7(d), 126.5(d), 124.0(d), 82.6(d), 66.2(t), 48.9(d), 40.8(t), 37.8(d), 34.9(t), 32.8(d), 21.5(q), 18.3(q), 17.1(q), 13.0(q, x2), 12.6(q).

### 암세포 배양

실험에 사용된 암세포주는 모두 인체기원의 암세포주들로서, 폐암세포주인 A549, 자궁암세포주인 A2780, 피부암세포주인 SK-MEL-2, 중추신경계암세포주인 XF498, 대장암세포주인 HCT15 및 HCT15 세포로부터 adriamycin을 처리하여 다약제내성 세포주로 확립한 CLO2 세포와 자궁암세포주인 A2780 세포에 cisplatin을 처리하여 내성 세포주로 확립한 CP70 세포를 이용하였다. 감수성 세포주는 모두 미국의 국립 암 연구소로부터 분양 받았으며, cisplatin내성 세포주인 CP70은 미국의 FOX CHASE Cancer Center에서 분양 받아 사용하였다. 배양액으로는 glutamine, NaHCO<sub>3</sub>, gentamycin 및 amphotericinB를 첨가하여 5% FBS로 보강한 RPMI1640 용액을 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 100% 습도의 조건에서 배양하고 3~4일에 한번씩 계대 유지 하였다.

### 세포독성

세포들을 각각 96-well flat bottom microplate에 분주하여 바닥 면에 세포가 부착하도록 24시간 배양하고 세포가 바닥 면에 부착된 후에 배양액을 제거한 다음 시료약물을 well당 100  $\mu$ l씩 넣어 배양기에서 72시간 배양하였다. 약물을 첨가하여 배양한 후 세포독성의 측정은 세포표면 단백질 염색시약인 SRB를 이용하여 측정하였다[10]. 즉 약물을 첨가하여 배양한 후, 배양액을 제거한 다음 각 well에 10% TCA 용액을 처리하고 4°C에서 1시간동안 방치하여 세포들을 고정시켰다. 그 후 TCA를 제거하고 실온에서 건조시킨 후 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 실

온에서 30분 동안 방치하여 세포를 염색하였다. 세포와 결합하지 않은 여분의 SRB를 1% acetic acid 용액으로 세척하여 제거하고, pH 10.3~10.5의 10 mM Trisma base(unbuffered) 용액을 염색된 세포들에 가하여 SRB를 용출시켰다. 각 well의 흡광도는 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 520 nm에서 측정하였으며, 약물을 가하지 않은 well(C)과 약물을 가한 각 well(T) 및 약물을 가할 때의 well(Tz)을 비교하여,  $Tz \leq T$ 인 경우에는  $[(T-Tz)/(C-Tz)] \times 100$ 의 수식으로,  $Tz > T$ 인 경우에는  $[(T-Tz)/Tz] \times 100$ 의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 동정

균주 JW117은 타 세균의 균체를 용해하며 셀룰로오스를 이용하지 못하는 용균성 점액세균으로 Gram 염색결과 음성으로 판별되었다. VY/2 agar배지 상에서 먹이균인 대장균에 접종했을 때 4~5일 후 대장균의 용균현상이 관찰되었고 7~10일이 지나면서 자루(stalk)가 달린 자실체가 형성되었다(Fig. 1). 전자 현미경으로 형태적 특성을 관찰한 결과 영양 세포는 오렌지색의 간상이며 myxospore는 굴광성을 보이고 크기가 1.5  $\mu\text{m}$  이하의 작은 구형으로 확인되었다. 특히 균체가 성장하고있는 VY/2 agar배지를 365 nm의 UV 하에서 관찰했을 때 swarm 주위에 밝은 노란색의 형광을 띠었으며, 표준균주인 *Myxococcus stipitatus* ATCC 29611과 동일한 성상을 나타내었다. 그 외 동정에 필요한 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (9th ed.) 및 참고문헌[13]의 시험항목을 기준으로 하여 고찰한 결과 생산균주 JW117을 *Myxococcus stipitatus*로 동정하였다(Table 1).

### 활성물질의 정제 및 구조결정

예비실험 결과 균체 추출물에 활성이 확인되었으므로 본

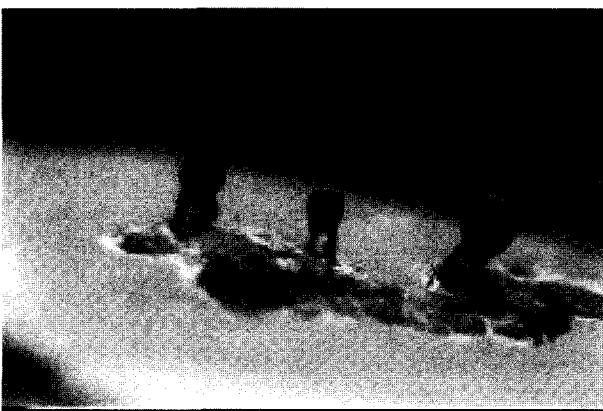


Fig. 1. Fruiting body of *Myxococcus stipitatus* JW117 on an agar surface.

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of strain JW117 and *Myxococcus stipitatus*.

Characteristics	Strain JW117	<i>Myxococcus stipitatus</i> (ATCC29611)
Optimum temperature for growth	28-32°C	28-32°C
Gram staining	-	-
Fruiting bodies on VY/2 agar	+	+
Deliquescent	+	+
Raised on a stalk	+	+
Myxospores		
Ellipsoidal to spherical	+	+
1.5 or more in diameter	-	-
Enzyme activity of		
Catalase	+	+
Urease	+	+
Cellulase	-	-
Stained with Congo red	+	+
Greenish diffusible pigment on agar	-	-
Nitrate reduction	-	-
Starch hydrolysis	+	+
Degradation of microbial cell	+	+
Swarm with a yellow fluorescence (365 nm)	+	+

배양액(10 l)을 원심분리하여 균체를 모은 다음 acetone으로 3일간 실온에서 추출하였다. 활성을 보인 균체 추출물 (728 mg)을 silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 거쳐 최종적으로 recycling prep. HPLC로 정제한 결과 활성분체로서 KR11701 (10.3 mg), KR11702 (3.5 mg), KR11703 (5.0 mg)을 순수한 액상으로 얻었다. 이들의 화학구조(Fig. 2)를 결정하기 위해 2D-NMR을 비롯해 다양한 분광학적 방법을 이용하였는데, 이 과정에서 이들은 NMR, UV, IR의 spectral data가 아주 비슷할 뿐 아니라 EIMS의 측정 결과  $m/z$  491[M<sup>+</sup>]의 동일한 분자량을 나타내어, 이들은 동일한 chromophore를 지닌 구조 이성체임이 강하게 시사되었다. 또한 NMR data로부터 이들 분자내 phenyl ring의 존재와 IR의 data로부터 amide carbonyl group (1636~1641  $\text{cm}^{-1}$ )의 존재가 추정되었으며, HREIMS와 <sup>13</sup>C NMR의 data로부터 확인된 이들의 분자식 C<sub>32</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>3</sub> (불포화도=11)와 18개의 sp<sup>2</sup> 탄소의 존재를 감안하면 이들은 분자 내에 적어도 6개의 이중결합으로 구성된 시슬구조를 가진 polyene계 화합물임이 추정되었다. 이러한 사실에 근거하여 우선 점액세균의 대사산물 중 polyenic compounds에 관해 문헌[11]을 조사한 결과, KR11701, KR11702 및 KR11703은 각각 phenalamides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>의 물리화학적 성상 및 spectral data가 일치하였는데 특히 그 중에서도 분자량과 선광도([ $\alpha$ ]<sub>D</sub>) 및 <sup>13</sup>C NMR data가 이들의 동정에 결정적 근거가 되었다.

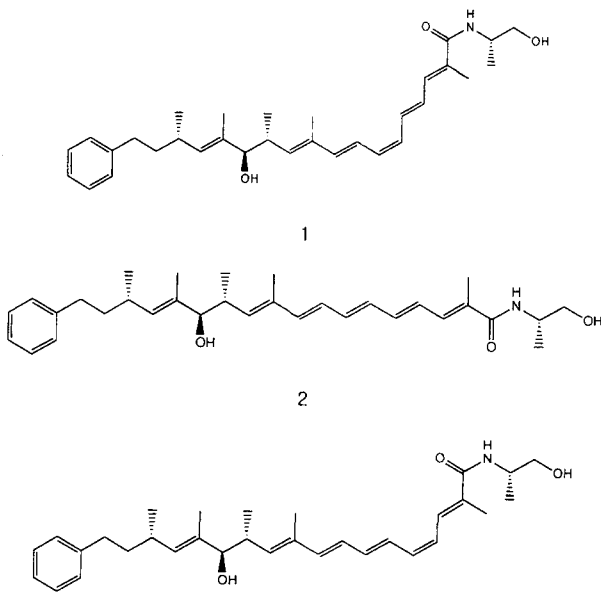


Fig. 2. Chemical structures of phenalamides A<sub>1</sub>(1), A<sub>2</sub>(2), and A<sub>3</sub>(3).

#### 세포독성.

분리된 활성물질의 human cancer cell에 대한 독성을 측정하여 Table 2에 나타내었다. Phenalamides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>는 공시된 모든 암세포주에 대해 우수한 활성을 나타내었으며, IC<sub>50</sub>은 0.23~0.57 µg/ml이었다. 한편 adriamycin의 세포독성은 감수성 세포주(HCT15)의 IC<sub>50</sub>이 0.12 µg/ml인데 비해 내성세포주(CL02)에서는 3.27 µg/ml로서 약 27배정도 차이를 보였다. Cisplatin의 내성세포주에 대한 세포독성 실험에서는 cisplatin에 대해 내성세포주(CP70)가 감수성 세포주(A2780)에 비해 약 4배정도 내성이 유도된 것과는 대조적으로 phenalamides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>는 감수성 세포주와 약제내성 세포주에 대하여 거의 동일한 활성을 보여 다약제 내성을 극복함을 나타내고 있다. 이것은 최근 보고된 점액세균 유래의 polyenic compound인 stipiamide[6]가 colchicines-resistance KB cell에 대해 내성을 극복한다는 보고와 일치하였다. 그러나, phenalamides A<sub>1</sub>~A<sub>3</sub>의 이러한 활성은 화학구조의 차

이에 따른 변화가 거의 없음을 볼 때, 분자내 이중결합 주위의 configuration은 활성발현에 크게 기여하지 못하는 것으로 판단된다. Phenalamide 화합물은 1992년 Reichenbach 등[11]에 의해 처음 분리되어 생합성과 stereochemistry를 포함한 입체구조가 밝혀졌으며 그 중 phenalamide A<sub>1</sub>은 phenoxan, thiangazol과 함께 HIV-1의 저해제[5]로서 점액세균 유래의 항바이러스 물질로 보고되었다. 또한 본 연구를 통해 이들은 다양한 human cancer cell을 포함해 다약제 내성의 암세포주의 성장을 효과적으로 억제하는 것이 확인되었으나, 그 작용기작에 관해서는 아직 보고된 바가 없다. 그러나, adriamycin 내성 암세포주에 대해 phenalamide 화합물의 내성극복이 현저함에 따라 Pgp와 관련하여 항암제의 active efflux를 저해하는지를 조사하기 위해 현재 이들의 Pgp에 대한 작용을 검토하고 있다.

#### 요 약

암세포가 특정 항암제에 의해 내성을 획득하면 구조가 상이한 타 항암제에도 교차내성을 나타내는 이른바 암세포의 다약제 내성(MDR)이 암 화학요법에 있어서 가장 심각한 문제가 되고 있다. 본 연구에서는 다약제 내성 암세포주인 CL02 세포를 이용하여 점액세균의 대사산물을 대상으로 다약제 내성 암세포에 유효한 항암물질을 탐색하는 과정에서, *Myxococcus stipitatus*로 동정된 JW117 균주의 대사산물에서 우수한 활성을 발견하고 그 활성본체로서 polyene계 화합물인 phenalamides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>를 분리하였다. Phenalamides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>는 인체기원의 암세포에 대해 모두 강한 세포독성(IC<sub>50</sub>=0.23~0.57 µg/ml)을 나타낼 뿐 아니라 다약제내성 세포주인 CL02와 cisplatin내성 세포주인 CP70에 대해서도 감수성 세포주와 동일한 활성을 나타내어 다약제 내성을 극복하는 우수한 활성 물질을 확인하였다.

#### REFERENCES

- Bradley, G., P. F. Juranka, and V. Ling. 1988. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* **948**: 87-128.

Table 2. Cytotoxicities of phenalamides A<sub>1</sub>(1), A<sub>2</sub>(2), A<sub>3</sub>(3), and reference compounds.

Compound	IC <sub>50</sub> [µg/ml]						
	A549	SK-MEL-2	XF498	HCT15	CL02	A2780	CP70
1	0.24	0.34	0.38	0.38	0.50	0.57	0.56
2	0.23	0.32	0.39	0.39	0.43	0.51	0.54
3	0.23	0.36	0.40	0.40	0.46	0.49	0.55
Adriamycin	0.04	0.06	0.13	0.12	3.27	0.02	0.08
Cisplatin	0.45	1.26	0.58	0.50	1.02	3.24	13.75

IC<sub>50</sub>: Drug concentration inhibiting 50% of cell growth; A549: Human lung cancer cell line; SK-MEL-2: Human skin cancer cell line; XF498: Human CNS cancer cell line; HCT15: Human colon cancer cell line; CL02: Adriamycin-resistant HCT15 subline; A2780: Human ovary cancer cell line; CP70: Cisplatin-resistant A2780 subline.

2. Choi, S. U., N. Y. Kim, E. J. Choi, K. H. Kim, and C. O. Lee. 1996. Establishment of doxorubicin-resistant subline derived from HCT15 human colorectal cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* **19**: 342-347.
3. Irschik, H., R. Jansen, G. Hoefle, K. Gerth, and H. Reichenbach. 1985. The coralopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from myxobacteria. *J. Antibiotics* **38**: 145-152.
4. Iwahashi, T., E. Okochi, K. Ono, L. Sugawara, T. Tsuruo, and S. Mori. 1991. Establishment of multidrug resistant human colorectal carcinoma HCT15 cell line and their properties. *Anticancer Res.* **11**: 1309-1312.
5. Jurkiewicz, E., R. Jansen, B. Kunze, W. Trowitzsch-Kienast, E. Forche, H. Reichenbach, G. Hoefle, and G. Hunsmann. 1992. Three new potent HIV-1 inhibitors from myxobacteria. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **3**: 189-193.
6. Kim, Y. J., K. Furihata, S. Yamanaka, R. Fudo, and H. Seto. 1991. Isolation and structural elucidation of stipiamide, a new antibiotic effective to multidrug-resistant cancer cells. *J. Antibiotics* **44**: 553-556.
7. Lum, B. L., M. P. Gosland, S. Kaubisch, and B. I. Sikic. 1993. Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy* **13**: 88-109.
8. Perez, R. P., T. C. Hamilton, R. F. Ozoles, and R. C. Young. 1993. Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* **71**: 1571-1580.
9. Reichenbach, H. and M. Dworkin. 1992. *The Myxobacteria*, pp. 3416-3487. In Balows, A., H. G. Truper, M. Dworkin (eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed.). Springer Verlag, New York.
10. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. Warren, H. Bokesch, S. Kenny, and M. R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
11. Trowitzsch-Kienast, W., E. Forche, V. Wray, H. Reichenbach, E. Jurkiewicz, G. Hunsmann, and G. Hoefle. 1992. Phenalamide, neue HIV-1 inhibatoren aus *M. stipitatus* Mx s40. *Liebigs Ann. Chem.* **1992**: 659-664.
12. Ueda, K., G. Cardarelli, M. M. Gottesman, and I. Pastan. 1987. Expression of a full length cDNA for the human *MDR-1* gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 3004-3008.
13. Yamanaka, S., A. Kawaguchi, and K. Komagata. 1987. Isolation and identification of myxobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 247-265.

(Received Feb. 18, 2002/Accepted May 18, 2002)