

Myxococcus stipitatus JW150 이 생산하는 세포독성 물질의 분리 및 특성

안중웅[#] · 이정옥

한국화학연구원 생명의약부

(Received February 25, 2002; Revised March 28, 2002)

Isolation and Properties of Cytotoxic Antibiotics Produced by *Myxococcus stipitatus* JW150

Jong-Woong Ahn[#] and Chong-Ock Lee

Medicinal Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea

Abstract — 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 a resistant subline of HCT15 to adriamycin (CL02), we undertook the screening for agents which were effective to multidrug-resistant cancer cells. As a result, a myxobacterial strain JW150 was selected for study since an activity against CL02 cells was discovered in the strain. Cytotoxicity-guided fractionation of the culture broth led to the isolation of cystothiazole A and melithiazole F. 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. Cystothiazole A and melithiazole F demonstrated potent cytotoxicity against certain human cancer cells with IC₅₀ values ranging from 0.03~0.72 µg/ml. Both compounds were interestingly as active against drug-resistant sublines CL02 and CP70 as against the corresponding parental cells.

Keywords □ *Myxococcus stipitatus*, cystothiazole A, melithiazole F, mdr-cancer cell, cytotoxicity

현재 암환자의 화학요법에 있어서 약물에 대한 암세포의 내성 발현이 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.¹⁻³⁾ Pgp는 분자량이 170 KDa 정도이며 transmembrane glycoprotein으로서, vinca alkaloids, anthracyclines, *epi-podophyllotoxin* 등과 같은 다양한 종류의 약물들을 세포 밖으로 배출시킴으로써 결과적으로 약물의 세포독성을 나타나지 못하게 한다.^{4,5)} 이러한 다약제 내성으로 인해 지금까지 개발된 많은 항암제가 사용해보기도 전에 무력화될 뿐만 아니라 최근 항암제개발 연구에서 가장 성공적인 성과로 인정 받고있는 taxol의 경우도 이를 이용한 치료과

정에서 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 받지않는 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 등⁶⁾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 JW150의 배양물에 우수한 활성을 발견하고 그것에 함유된 활성물질의 분리 및 구조결정과 그 생물활성을 조사한 것이다.

실험방법

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-860-7164 (팩스) 042-860-7160
(E-mail) jwahn@kRICT.re.kr

균주의 분리 및 배양 - 점액세균 JW150은 충청남도 연기군 전 동면 소재의 야산에서 채집한 토양에서 *E. coli*의 용균현상을 지

표토 하여 분리하였으며, VY/2 agar 배지⁷⁾상에서 계대하고, 균체양식을 위한 전배양과 물질생산을 위한 본배양은 modified MD1배지⁸⁾를 이용하였다. 다만 본배양에는 생산균에 대한 feedback: inhibition을 방지하고 물질생산을 높이기 위해 흡착수지인 Amberlite XAD-16(Aldrich)을 배양액에 첨가하였다. Modified MD1배지 400 ml와 Amberlite XAD-16 6 g을 2 l 용량의 배양 플라스크에 넣은 후 동일성분의 배지에서 전배양한 JW150의 균액을 5%(v/v) 접종하여 30°C, 5일간 진탕배양 하였고, 배양 플라스크의 수를 증가시킴으로서 대량배양에 충당하였다.

균주의 동정 - JW150의 분류학적 동정을 위해 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(9th ed.) 및 참고문헌⁹⁾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.

기기 및 시약 - UV spectrum은 Shimadzu UV 265 spectrophotometer로 측정하였고 IR spectrum의 측정은 Genesis II FTIR spectrometer로 하였다. 선광도는 AUTOPOL III automatic polarimeter로 측정하였으며, mass의 측정은 OPUS data system 이 장착된 Micromass AutoSpec mass spectrometer로 하였다. COSY, ROESY, DEPT, HMBC 및 HSQC를 포함한 각종 NMR spectrum은 Varian 사의 UNITY500 NMR spectrometer를 사용하였으며 내부 표준물질로는 tetramethyl silane(TMS)을, 측정 용매로는 CDCl₃를 사용하였다. Low-pressure liquid chromatography(LPLC)에는 Lichroprep Lobar-A Si-60을 사용하였으며 분취용 HPLC는 RI detector와 UV detector가 부착된 JAI사의 Recycling preparative HPLC(Model LC-908)에 JAIGEL-1H column(20×500 mm)을 장착하여 사용하였다. TLC plate는 Silica gel 60F₂₅₄ precoated plate(Art. 5554, Merck)를 사용하였고 용매는 시약급을 재증류하여 사용하였다.

추출 및 분리 - 배양액을 원심분리하여 균체와 흡착수지를 모은 다음, 이들을 MeOH-acetone=1:3 용액으로 추출하여 감압 농축하였다. 이 농축물을 silica gel(Si)에 흡착시켜 acetone-*n*-hexane=0:100~10:90을 전개용매로 하여 단계적으로 극성용매의 비율을 높이면서 Si-LPLC를 행하였다. 활성 분획물을 MeOH-CH₂Cl₂(1:1)를 전개용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography(φ2.5×80 cm) 한 후, 다시 acetone-*n*-hexane (1:4)를 전개용매로 한 분취용 Si-TLC를 했을 때 활성물질은 두 개로 분리되었다. 이들을 각각 소량의 CH₂Cl₂에 녹인 후, 최종적으로 JAIGEL-1H column을 이용하여 CH₂Cl₂를 용매로 한 Recycling prep. HPLC를 통하여 두 개의 활성물질을 순수한 액상으로 정제하고 각각 KR15011, KR15012로 명명하였다.

KR15011 - colorless oil; [α]_D=+109° (c, 0.24 in CHCl₃); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm(log ϵ): 223(4.58), 310(4.09); IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3123, 1706, 1624, 1150, 1094; HREIMS m/z: 422.1439 (calcd for C₂₀H₂₆N₂O₄S₂, 422.1412); EIMS m/z (rel. int.): 422[M]⁺(5.9), 407 (3.4), 279 (100); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.87 (1H, s, H-2), 7.09 (1H, s, H-5), 6.58 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-7), 6.41 (1H, dd, *J*=15.6, 7.6 Hz, H-8), 4.96 (1H, s, H-12), 4.17 (1H, m, H-10), 3.81 (1H, t, *J*=7.8 Hz, H-9), 3.66 (3H, s, H₃-17), 3.60 (3H, s, H₃-16), 3.36 (1H, sept, *J*=6.8 Hz), 3.33 (3H, s, H₃-14), 1.44 (3H, d, *J*=6.8 Hz), 1.22 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H₃-15).

KR15012 - colorless oil; [α]_D=+166° (c, 0.09 in CHCl₃); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm(log ϵ): 226(4.79), 311(4.15); IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3105, 1710, 1623, 1145, 1093; HREIMS m/z: 470.1306 (calcd for C₂₄H₂₆N₂O₄S₂, 470.1334); EIMS m/z (rel. int.): 470[M]⁺(5.5), 455 (3.4), 438 (2.0), 327 (100); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.88 (1H, s, H-2), 7.34~7.31 (4H, m), 7.30 (1H, m), 7.11 (1H, s, H-5), 6.58 (1H, d, *J*=15.6 Hz, H-7), 6.42 (1H, dd, *J*=15.6, 7.8 Hz, H-8), 4.96 (1H, s, H-12), 4.38 (2H, s), 4.17 (1H, m, H-10), 3.81 (1H, t, *J*=7.8 Hz, H-9), 3.66 (3H, s, H₃-17), 3.60 (3H, s, H₃-16), 3.33 (3H, s, H₃-14), 1.21 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H₃-15).

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 CL02 세포와 자궁암세포주인 A2780 세포로부터 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, NaHCO₃, gentamicin 및 amphotericin B를 첨가하여 5% FBS로 보강한 RPMI1640 용액을 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 및 100% 습도의 조건에서 배양하고 3~4일에 한번씩 계대 유지하였다.

세포독성 - 세포들을 각각 96-well flat bottom microplate에 분주하여 바닥 면에 세포가 부착하도록 24시간 배양하고 세포가 바닥 면에 부착된 후에 배양액을 제거한 다음 시료약물을 well 당 100 μ l씩 넣어 배양기에서 72시간 배양하였다. 약물과의 배양이 끝난 후 세포독성의 측정은 세포표면 단백질 염색시약인 SRB를 이용하여 측정하였다.¹⁰⁾ 즉 약물과의 배양이 끝난 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 실온에서 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 reader를 이용하여 520 nm에서 측정하였으며, 약물을 가하지 않은 well(C)과 약물을 가한 각 well(T) 및 약물을 가할 때의 well(Tz)을 비교하여, $T_z \leq T$ 인 경우에는 $[(T-T_z)/(C-T_z)] \times 100$ 의 수식으로, $T_z > T$ 인 경우에는 $[(T-T_z)/T_z] \times 100$ 의 수식으로 약물의 세포독성을 계산하였다.

실험결과 및 고찰

균주의 동정 - 균주 JW150은 타 세균의 균체를 용해하며 셀룰로오스를 이용하지 못하는 용균성 점액세균으로 Gram 염색결과 음성으로 판별되었다. VY/2 agar배지 상에서 막이균인 대장균에 접종했을 때 4~5일 후 대장균의 용균현상이 관찰되었고 7~10일이 지나면서 자루(stalk)가 달린 자실체가 형성되었다. 전자 현미경으로 형태적 특성을 관찰한 결과 영양세포는 오렌지색의 간상이며 myxospore는 굴광성을 보이고 크기가 1.5 μm 이하의 작은 구형으로 확인되었다(Fig. 1). 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 참고문헌⁹⁾의 시험항목을 기준으로 하여 고찰한 결과 생산균주 JW150을 *Myxococcus stipitatus*로 동정하고(Table I) 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(Accession number: KCTC 0567BP).

활성물질의 정제 및 구조결정 - 배양액(10 l)을 원심분리하여 균체와 흡착수지를 모은 다음 MeOH-acetone=1:3 용액으로 3

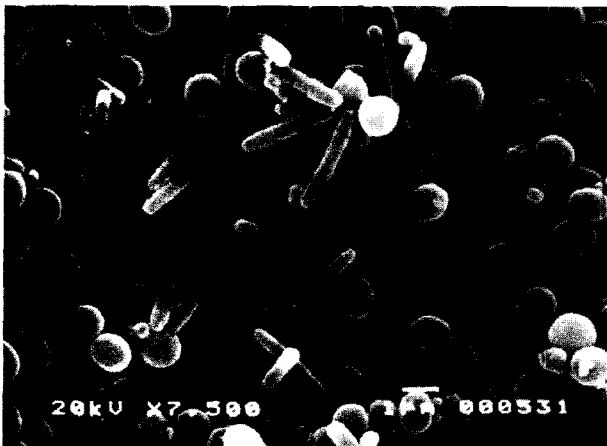


Fig. 1 - Scanning electron micrograph of *Myxococcus stipitatus* JW150 cultured in VY/2 agar medium.

Table I - Basic biochemical and physiological properties of strain JW150

Optimum temperature for growth	28-32°C
Gram staining	-
Fruiting bodies on VY/2 agar	
Deliquescent	+
Raised on a stalk	+
Myxospores	
Ellipsoidal to spherical	+
1.5 μm 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)	+

일간 실온에서 추출하였다. 활성을 보인 균체와 흡착수지의 추출물(1.1 g)은 silica gel을 이용한 LPLC와 Sephadex LH-20 column chromatography 및 prep. TLC를 통해 정제하는 과정에서 2개의 활성물질로 분리되었고 이들을 각각 CH_2Cl_2 를 용매계로 하여 Recycling prep. HPLC로 정제한 결과 활성본체로서 KR15011(21 mg)과 KR15012(13 mg)를 순수한 액상으로 얻었다. KR15011과 KR15012의 화학구조(Fig. 2)를 결정하기 위해 2D-NMR을 비롯한 다양한 분광학적 방법을 이용하였는데, 이 과정에서 이들의 NMR, UV, IR 등의 spectral data가 서로 비슷할 뿐 아니라 bithiazole계 화합물인 myxothiazol¹¹⁾과 유사한 점이 많아서 이들은 모두 분자내에 bithiazole ring을 지닌 myxothiazol의 동족체 화합물일 것으로 추정되었다. HREIMS와 ^{13}C NMR spectral data로부터 KR15011의 분자식은 $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 로, KR15012는 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ 로 각각 결정하였다. 이들의 IR data로부터 각각 분자내에 α, β -unsaturated ester¹²⁾가 존재함을 알 수 있었으며, 또한 ^1H 및 ^{13}C NMR, COSY, HSQC, HMBC

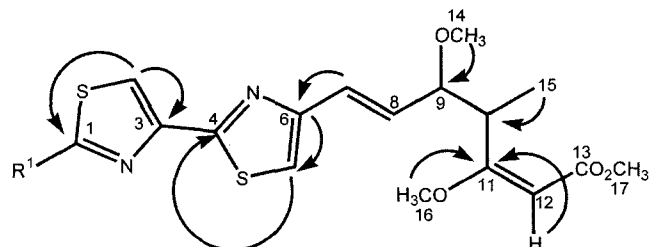


Fig. 2 - Chemical structures of cystothiazole A and melithiazole F and HMBC correlations, Cystothiazole A: $\text{R}^1 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$, Melithiazole F: $\text{R}^1 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, Arrows indicate selected ^1H - ^{13}C long-range correlations observed in the HMBC spectra.

Table II – Cytotoxicities of cystothiazole A(1), melithiazole F(2) and reference compounds

Compound	IC ₅₀ [μg/ml]						
	A549	SK-MEL-2	XF498	HCT15	CL02	A2780	CP70
1	0.28	0.31	0.05	0.14	0.13	0.68	0.72
2	0.10	0.35	0.03	0.10	0.11	0.34	0.30
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

IC₅₀: 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

data의 해석과 myxothiazole의 비교를 통하여 이들 분자내에 bithiazole ring의 치환양식을 포함해 C-1~C-17의 부분구조가 확인되었으며, H-12와 16-OCH₃ 사이에 ROE가 관찰되어 C-11의 이중결합의 geometry가 E임이 확인되었고, 아울러 이들의 선광도 및 chiral carbon에 결합된 H-9와 H-10의 coupling pattern 등이 myxothiazole과 상당히 유사하여 모두 동일한 절대구조를 지닌 것으로 추정되었다. 이러한 사실을 바탕으로 문헌^{13,14)}을 검색한 결과, KR15011은 cystothiazole A와 일치하였고 KR15012는 melithiazole F임이 확인되었다.

세포독성 – 분리된 활성물질의 암세포주에 대한 세포독성을 측정된 결과, cystothiazole A와 melithiazole F는 공시된 암세포주에 대해 모두 강한 세포독성을 나타내었으며, 감수성 세포주의 경우 IC₅₀은 0.03~0.68 μg/ml이었다(Table II). 이들은 공통적으로 분자 내에 bithiazole ring을 모핵으로 하는 β-methoxyacrylate 화합물로서 side chain의 구조가 서로 다른데, 그 화학구조의 차이에 따른 이들의 활성 양상이 거의 변화가 없음을 볼 때, 분자내 측쇄구조는 세포독성의 발현에 크게 상관없는 것으로 판단되며, 이것은 Ahn 등¹⁵⁾에 의해 *M. fulvus*에서 세포독성물질로 분리된 bithiazole계의 β-methoxyacrylate 화합물인 KR025의 경우와도 일치한다. 한편 약제내성 세포주에 대한 세포독성 실험에 있어서 adriamycin의 세포독성은 내성세포주(CL02)에서는 IC₅₀ 값이 3.27 μg/ml인데 비해 감수성 세포주(HCT15)에서는 0.12 μg/ml으로 약 27배정도 차이를 보이며, cisplatin의 경우는 내성세포주(CP70)에서 IC₅₀ 값이 13.75 μg/ml인데 비해 감수성 세포주(A2780)에서는 3.24 μg/ml으로 약 4배정도 차이를 나타냄에 따라 adriamycin과 cisplatin은 이들 암세포주에 대해 내성을 유도하는 것을 보여주고 있다. 그러나, cystothiazole A와 melithiazole F는 감수성 세포주와 약제내성 세포주에 대하여 거의 동일한 세포독성을 나타내고 있어서 약제내성을 극복함을 나타내고 있다. bithiazole계의 β-methoxyacrylate 화합물은 점액세균의 대사산물에서 cystothiazole A와 melithiazole F를 포함해 다양한 종류가 분리되었으며¹⁴⁾ 최근에는 해양에서 분리된 점액세균에서도 β-methoxyacrylate 화합물이 분리되었다.¹⁶⁾ Cystothiazole A와 melithiazole F는 기타의 β-methoxyacrylate 화합물과 마찬가지로 진균류를 포함한 진핵생물의 전자전달계

중 cytochrom-*bc*₁ complex(complex III)의 억제를 통한 호흡 저해제로 알려져 있으며, 항균활성 및 mouse tumor cell에 대한 세포독성이 보고되어 있지만,^{13,14)} 본 연구를 통해서 이들이 인체 기원의 다양한 암세포 및 약제내성 암세포주에 대해 우수한 살상효과가 있음이 확인되었다. 특히 adriamycin 내성 암세포주에 대해 cystothiazole A와 melithiazole F의 내성극복이 현저함에 따라 이들이 Pgp와 관련하여 항암제의 active efflux를 저해하는지를 조사하기 위해 현재 Pgp에 대한 이들의 작용을 검토하고 있다.

결 론

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 JW150 균주의 대사산물에서 우수한 활성을 발견하고 그 활성본체로서 cystothiazole A와 melithiazole F를 분리하였다. 이 화합물들은 인체기원의 암세포에 대해 강한 세포독성(IC₅₀=0.03~0.72 μg/ml)을 나타낼 뿐 아니라 약제내성 세포주인 CL02와 CP70에 대해서도 감수성 세포주와 동일한 활성을 나타내어 다약제 내성을 극복하는 우수한 활성물질임을 확인하였다.

문 헌

- 1) Bradley, G., Juranka, P. F. and Ling, V. : Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* **948**, 87 (1988).
- 2) Lum, B. L., Gosland, M. P., Kaubisch, S. and Sikic, B. I. : Molecular targets in oncology: implications of the multidrug resistance gene. *Pharmacotherapy* **13**, 88 (1993).
- 3) Perez, R. P., Hamilton, T. C., Ozoles, R. F. and Young, R. C. : Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* **71**, 1571 (1993).
- 4) Iwahashi, T., Okochi, E., Ono, K., Sugawara, L., Tsuruo, T. and

- Mori, S. : Establishment of multidrug resistant human colorectal carcinoma HCT15 cell line and their properties. *Anticancer Res.* **11**, 1309 (1991).
- 5) Ueda, K., Cardarelli, G., Gottesman, M. M. and Pastan, I. : 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 (1987).
- 6) Choi, S. U., Kim, N. Y., Choi, E. J., Kim, K. H. and Lee, C. O. : Establishment of doxorubicin-resistant subline derived from HCT15 human colorectal cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 342 (1996).
- 7) Reichenbach, H. and Dworkin, M. : *The Prokaryotes* 2nd ed., Springer Verlag, New York, p. 3416 (1992).
- 8) Irschik, H., Jansen, R., Hoefle, G., Gerth, K. and Reichenbach, H. : The coralopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from myxobacteria. *J. Antibiotics* **38**, 145 (1985).
- 9) Yamanaka, S., Kawaguchi, A. and Komagata, K. : Isolation and identification of myxobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**, 247 (1987).
- 10) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bokesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
- 11) Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H. and Trowitzsch, W. : Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus*. *J. Antibiotics* **33**, 1474 (1980).
- 12) Nakanishi, K., Solomon, P. H. and Furutachi, N. : *Infrared Absorption Spectroscopy*. Nankodo, Tokyo (1981).
- 13) Ojika, M., Suzuki, Y., Tsukamoto, A., Sakagami, Y., Fudou, R., Yoshimura, T. and Yamanaka S. : Cystothiazoles A and B, new bithiazole-type antibiotics from the Myxobacterium *Cystobacter fuscus*. *J. Antibiotics* **51**, 275 (1998).
- 14) Sasse, F., Bohlendorf, B., Hermann, M., Kunze, B., Forche, E., Steinmetz, H., Hofle, G. and Reichenbach, H. : Melithiazoles, new β -methoxyacrylate inhibitors of the respiratory chain isolated from Myxobacteria. *J. Antibiotics* **52**, 721 (1999).
- 15) Ahn, J.-W., Woo, S.-H., Lee, C.-O., Cho, K.-Y. and Kim, B.-S. : KR025, a new cytotoxic compound from *Myxococcus fulvus*. *J. Nat. Prod.* **62**, 495 (1999).
- 16) Fudou, R., Iizuka, T. and Yamanaka S. : Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. *J. Antibiotics* **54**, 149 (2001).