深海より分離した細菌の生産する生理活性物質について

塩野 義人^{*1} 能木 裕一^{*2} 掘越 弘毅^{*2}

深海泥土より900株の細菌を分離し、スクリーニングした結果、殺ブラインシュリンプ活性を有するVL103株を得ることができた。次に本菌株の培養物を各種クロマトグラフィーにより精製し、活性物質1と2をそれぞれ単離した。NMRを中心とした構造解析の結果、活性物質1と2はそれぞれ3-(3-hydroxybutyryloxy)-butyric acidと3-[3-(3-hydroxybutyryloxy)-butyryloxy]-butyric acidであることが明らかとなった。

キーワード: ブラインシュリンプ, 海洋性細菌

Bioactive Compounds Produced by Marine Bacteria Isolated from Deep-sea Mud

Yoshihito SHIONO^{*3} Yuichi NOGI^{*4} Koki HORIKOSHI^{*4}

As a part of our ongoing search for new biologically active metabolites produced by marine microorganism from deep-sea mud, two active compounds have been isolated from VL 103 strain. These structures 1 and 2 were established to be 3-(3-hydroxybutyryloxy)-butyric acid and 3-[3-(3-hydroxybutyryloxy)-butyryloxy]-butyric acid by spectroscopic evidence from NMR, respectively. Both 1 and 2 exhibited cytotoxicity against brine shrimp.

Keywords : Brine shrimp, Marine Bacteria

*1 京都工芸繊維大学大学院ベンチャーラボラトリー 非常勤研究員
(現所属: 独立行政法人産業技術総合研究所)

*2 海洋科学技術センター 極限環境生物フロンティア研究システム

*3 Kyoto Institute of Technology Venture Laboratory
(Present address. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

*4 Japan Marine Science and Technology Center, Frontier Research System for Extremophiles

1. はじめに

海洋は地球上で最も豊富な資源を抱えた領域であり、未知の点が多い世界でもある。海洋は地球の全表面積の約71%を占め、地球上の全動物種の80%が生息していると言われている。このように多様性に富んだ生物資源が膨大な量存在しており、また、海洋生物は陸上生物とは異なった環境に生息しているためか、生産される物質に新規性の高い化学構造を有する化合物が多く認められる。実際に、これまで抗ガン活性物質などの新しい医薬のシードの探索源として、海洋生物の抽出物が用いられ、多くの化合物が単離されてきた。さらに、最近ではシアバクテリアや海洋性のバクテリア、カビ、放線菌などの海洋微生物の二次代謝産物からの探索も注目されてきている。しかしながら、深海から分離された種々の細菌を対象に生理活性物質をスクリーニングした研究報告の例は極めて少ない¹⁾。深海は、陸上とは異なり、低温でかつ高圧環境である。従って、このような特殊な極限環境下から、これまでに報告されていない新種の細菌が分離されることが多い。そこで、今回、深海由来の微生物の代謝産物より、新規な生理活性物質を探索することを目的とした。

2. 実験方法

2.1. 培養およびコロニーの分離

菌の分離用培地は、Difco社の マリンアガー-2216培地をあらかじめシャーレに約20mlずつ広げて寒天プレートとした。97種の海底土サンプルは数mgずつ試験管に取り、約1mlの滅菌した人工海水に懸濁し、その上澄みを先のプレートに塗抹した。このプレートは20℃で培養し、1~4週間後にプレートよりコロニーを分離し、スラントに釣菌した。このようにして分離した900菌株は、雑菌汚染のないことを確認して番号を付し、バイオアッセイに供した。

2.2. ブラインシュリンプを用いたバイオアッセイ

ブラインシュリンプ (*Artemia salina*) は塩水湖に生息する甲殻類で、分類学的にはダニや昆虫と近縁にあり、これらと生態学的にも類似点が多い。さらに殺ブラインシュリンプ活性を示す化合物が抗腫瘍活性や抗菌活性など他の生理活性を示すことも報告されていることから、生理活性物質の検索において優れた検定生物として注目されている²⁾。

分離された細菌はマリンブロス(10ml)の入った試験管に植菌し、25℃で7日間振とう培養した後、培養液をメタノールで抽出した。次に得られたメタノール抽出液50μlをサンプル管に取り、メタノールを減圧留去する。そこにあらかじめ孵化させておいたブラインシュリンプの幼生20匹を2mlの並塩水と共に加え、25℃で12時間培養後ブラインシュリンプの致死率(致死率 = {死亡個体数/全個体数} / 100)を調べる。その結果、活性を示した菌株の中で、No.103株(日本海溝宮古沖水深6292mより採取された泥土より単離された菌株である)の培養液に強い殺ブラインシュリンプ活性が認められ、活性物質の生産が安定していた。以後、この菌株をVL103株とし、活性物質を明らかにすることにした。

3. VL103株の生産する殺ブラインシュリンプ活性物質の単離、精製とそれらの構造

3.1. 活性物質の単離、精製

VL103株を51のマリンブロス培地に植菌し、25℃で10日間振とう培養した。その後、培養濾液の酢酸エチル抽出画分に活性が認められたことより、この酢酸エチル抽出物を各種カラムクロマトグラフィーにより精製分離し、最終的に活性物質 1 (1mg, LD₅₀ 30μg/ml) と 2 (8mg, LD₅₀ 30μg/ml) を単離した。

3.2. 構造解析

NMRを中心とした構造解析を行った。活性物質 1 の¹H-NMRスペクトルより、1.31ppmと 1.35ppmに2個のダブルレットメチル基のシグナルと 2.46ppmから 2.68ppmに2個のメチレンのシグナルが認められた。また、4.23ppmと 5.35ppmに2個のメチンのシグナルが観測された。さらに活性物質 1 の¹³C-NMRスペクトルからは、エステルに帰属されるカルボニル炭素が含まれることが分かった³⁾。これらのことから、活性物質 1 は2分子の3-ヒドロキシ酪酸(3-hydroxybutyric acid)が縮合した3-(3-hydroxybutyryloxy)-butyric acidであることが分かった。

活性物質 2 についても1と同様にNMRスペクトルデータの解析を行った。活性物質 2 の¹H-NMRスペクトルより、1.29ppm, 1.30ppm, 1.33ppmに3個のダブルレットメチル基のシグナルと 2.45ppmから 2.65ppmに3個のメチレンのシグナルが認められた。また、4.28ppmと 5.35ppmに3個のメチンのシグナルが観測された⁴⁾。これらのことから、活性物質 2 は3分子の3-ヒドロキシ酪酸が縮合した3-[3-(3-hydroxybutyryloxy)-butyryloxy]-butyric acid ことが明らかになった。なお両化合物の立体配置については、未決定である。

4. おわりに

海洋生物や海洋微生物由来の生理活性物質の探索研究は、まだまだ歴史が浅く、さらに漢方や伝承薬用植物とは異なり生物活性に関する情報がないことから、ランダムスクリーニングにより活性物質を探索していかなければならない。最近、化学合成を基本としたコンビナトリアルケミストリー等を利用し、多くの化合物を一度に合成し、その中から新しい医薬の創製をめざす研究が行われるようになってきた。このような化学合成により生理活性物質を探索するの方向性ではあるが、今後、深海のような未知領域より分離された細菌から得られる新規化合物をヒントにした医薬品や研究用試薬が開発されることに期待される。

最後に本研究を行うにあたり、御協力頂きました海洋科学技術センター 極限環境生物フロンティア研究システム プログラムリーダー 辻井薫博士、京都工芸繊維大学大学院ベンチャーラボラトリー 安孫子淳先生にそれぞれ感謝致します。

参考文献,ノート

- 1) K. Gustafson, M. Roman and W. Fenical, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 7519-7529, (1989).
- 2) B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobson, D. E. Nichols and J. L. McLaughlin, *Planta Medica*, 45, 31-34, (1982).
- 3) Data for 1 : $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, in CDCl_3) : 1.31 (3H, d, $J=6.3\text{Hz}$), 1.35 (3H, d, $J=6.3\text{Hz}$), 2.46 (1H, dd, $J=16.1, 8.5\text{Hz}$), 2.49 (1H, dd, $J=16.1, 3.8\text{Hz}$), 2.61 (1H, dd, $J=15.9,$

4.6Hz), 2.68 (1H, dd, $J=15.9, 8.2\text{Hz}$), 4.23 (1H, m), 5.35 (1H, m), 5.67 (2H, br. s). $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, in CDCl_3) : 19.9, 22.3, 40.4, 43.2, 64.7, 67.5, 172.1.

- 4) Data for 2 : $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, in CDCl_3) : 1.29 (3H, d, $J=6.3\text{Hz}$), 1.30 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 1.33 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 2.45-2.65 (6H, m), 3.49 (3H, br. s), 4.28 (1H, m), 5.35 (2H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, in CDCl_3) : 20.0, 20.1, 22.3, 41.1, 43.0, 64.8, 67.8, 67.9, 169.9, 171.1.

(原稿受理: 2001年7月28日)