

## 海洋深層水からの放線菌の分離と抗癌物質の生産

今田千秋\*<sup>1</sup>, 梁 太熙\*<sup>1</sup>, 山田勝久\*<sup>2</sup>, 周 韜\*<sup>3</sup>, 春成 円十朗\*<sup>3</sup>, 五十嵐 康弘\*<sup>3</sup>, 池上康之\*<sup>4</sup>

### Isolation of actinomycetes from deep-sea water and production of anticancer substance

Chiaki IMADA\*<sup>1</sup>, Taehui YANG\*<sup>1</sup>, Katsuhisa YAMADA\*<sup>2</sup>, Thoa SCHU\*<sup>3</sup>,  
Enjuro HARUNARI\*<sup>3</sup>, Yasuhiro IGARASHI\*<sup>3</sup>, Yasuyuki IKEGAMI\*<sup>4</sup>

\*<sup>1</sup>Tokyo University of Marine Science and Technology 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

\*<sup>2</sup>DHC Corporation 2-8-21 Minami-azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0047, Japan

\*<sup>3</sup>Toyama Prefectural University 5180 Kurokawa, Imizu-shi, Toyama 939-0398, Japan

\*<sup>4</sup>Institute of Ocean Energy University of Saga 1-Honjo machi, Saga-shi, Saga, 840-8502, Japan

#### Abstract

Various actinomycete strains were isolated from deep-sea water (DSW) and surface seawater (SSW) in Izu-Akazawa in Shizuoka Prefecture and Kume-Jima in Okinawa Prefecture, and anticancer activities of culture supernatant of these strains were tested. Out of 252 isolates, 16 positive strains were obtained. Among them, one strain named as strain AKA32, isolated from Izu-Akazawa DSW had constant high anticancer activity and was selected for further studies. Taxonomical characterization of strain AKA 32 and 3 type strains (*Nonomurea asiatica*, *N. indica*, and *N. muscoviencis*) was performed. The strain showed close resemblance with *N. indica* by 16S rDNA analysis (98.5%, 1,435bp). However, all the type strains had no anticancer activity. When the strain was cultivated in a liquid medium at 30°C for 7 days with shaking, the anticancer substances were produced in the culture broth. The active substances were purified from the broth and three active compounds were isolated by extraction using *n*-butanol, followed by silica gel column and ODS column chromatographies, and high-performance liquid chromatography. The chemical structure of a novel compound which we named as “akazamicin” was very similar to that of “madurahydroxylactone” whereas the other two compounds were identical with *N*-formylanthranilic-acid and actinofuranone C, respectively by mass and NMR analysis. The cytotoxicity of akazamicin against B-16 cells was much higher than those of other two compounds.

**Key words** : deep-sea water, actinomycete, cancer cell, anticancer substance

## 1. 結 言

微生物由来の抗生物質や抗癌剤などの生理活性物質は人間生活の向上に大きく貢献してきたことは周知の事実である。微生物の中でも放線菌というグラム陽性細菌は主に陸地の土壌から分離される微生物であり、各種抗生物質や酵素阻害剤および癌治療薬の生産者として知られてきた。従来これらの活性物質は陸土壌由来の微生物からの探索が主であったが、近年新規活性物質の発見頻度が著しく減少してきたことから、新たな微生物の探索源として、海洋環境が俄かに注目されるようになってきた。しかし、これまで微生物の分離源は海洋表層水 (SSW)、沿岸の海底堆積物や海洋生物などがほとんどであり、水深 200m を超える深度の海洋深層水 (DSW) はその対象からはずれていた。この理由として、DSW は SSW と比較して微生物数が極めて少ないことが考えられる (今田 2012)。そこで、分子遺伝学的手法を用いて日本各地の DSW および SSW の微生物群集構造の解析を行った結果、DSW には SSW に見られない独自の微生物群集構造が存在し、新たな有用微生物探索源として期待が持てることが判明した (Terahara *et al.* 2016)。DSW の微生物は低温、高水圧、低有機物濃度の極限環境に適応していることから、他の環境では見られない特異な微生物が生息していることは明らかであり (矢田ら, 2003)、このような微生物は特異な代謝系を用いて、新規生理活性物質を生産している可能性が考えられる。そこで本研究では、この放線菌に着目し、DSW から分離を行い、得られた有望株が生産する抗癌物質の諸性状を調べることを目的とした。

原稿受付 2019年8月5日

\*<sup>1</sup> 東京海洋大学学術研究院 (〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7)

Email of corresponding author: imada@kaiyodai.ac.jp

## 2. 試料および方法

### 2-1. DSW からの放線菌の分離と有望株の選択

第 14 回海洋エネルギーシンポジウム 2017 (2017 年 9 月 21 日)において報告した日本各地の DSW および SSW の微生物群集構造解析結果より, 新種を含む未同定種の多かった伊豆赤沢および久米島に着目し, 以下の方法により微生物の分離を行った。

伊豆赤沢は, 図 1 に示す DSW の懸濁物の濾過に用いる使用済みのバッグ状フィルター (孔径約 0.5 $\mu$ m) を入手し (2015 年 10 月 30 日, 12 月 28 日), フィルターの底部を無菌的に 3 cm 画に切り取った。なお, SSW は DSW 取水設備の直上水 2 L を採集した。

一方久米島は, 佐賀大学久米島サテライトにある海洋温度差発電装置で発電に使用後の DSW (2015 年 6 月 25 日, 8 月 30 日, 2016 年 1 月 14 日, 5 月 16 日) を微生物の分離に用いた。この DSW 約 2 トンを逆洗濾過器内に装着されている 8 つの中空糸膜フィルター (孔径 0.1 $\mu$ m, 井戸水濾過装置 TC-12J, 株式会社十字屋) を用いて約 3,000 倍に濾過濃縮した。この濃縮物をさらに孔径 0.2 $\mu$ m のヌクレポアフィルターで濾過濃縮し, 最終的に約 5 万倍の DSW 濃縮懸濁液を得た。なお, SSW はサテライト付近から採集 (2 L) した。

これら 伊豆赤沢バッグ状フィルター, SSW サンプルおよび久米島 DSW 濃縮懸濁液, SSW サンプルをそれぞれ滅菌 DSW で適宜希釈した後, その希釈液 0.1 ml を放線菌の分離に汎用されている ISP-No.4 培地および HV 寒天培地に塗抹したのち, 27°C において 4 週間静置培養した。培養後, 生じたコロニーの中から肉眼で放線菌と判断されたコロニーを釣菌し, 分離株として保存した。

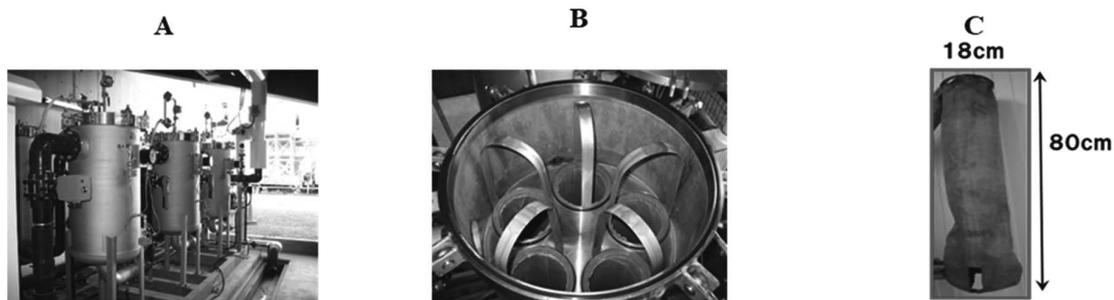


Fig. 1. Filtration equipment of DSW in Izu-Akazawa

A: The water tanks of the filtration equipment containing bag filters used for the isolation of DSW microorganisms

B: Inside of the tanks where 5 bag filters are installed

C: The bag filter (Nagoya Filter Co. Japan. Type CB x 400M: 180 $\phi$  x 80mm)

### 2-2. 分離放線菌株の抗癌活性評価

これらの分離株を液体培養後, 遠心分離した上清について, B16 マウスメラノーマ細胞 (理化学研究所バイオリソースセンターより入手, 以下: B16 細胞) を用いた MTT 還元法 (山田ら, 2007) により癌細胞に対する毒性を評価した。得られた有望株について, さらにヒト皮膚由来線維芽細胞 (理化学研究所バイオリソースセンターより入手, 以下: NB1 細胞) を用いて正常細胞に対する毒性も調べた。なお本研究では, 正常細胞に対するよりも癌細胞に対する毒性が特異的に高いことを抗癌活性, その抗癌活性を示す物質を抗癌物質と呼称する。本研究において, 特に高い抗癌活性を示した株について, 16S rRNA 遺伝子解析による種の同定を行った。さらにその培養液から目標化合物を単離・精製して化学構造を解析した。また, これらの化合物について B16 細胞, Caco-2 細胞 (理化学研究所バイオリソースセンターより入手, ヒト結腸癌由来) および Hep-G2 細胞 (理化学研究所バイオリソースセンターより入手, 肝臓癌由来) を用いて抗癌活性をそれぞれ調べた。

## 3. 結果および考察

### 3-1. 伊豆赤沢および久米島 DSW および SSW の放線菌有望株同定および抗癌活性

伊豆赤沢 DSW より 131 株および SSW より 37 株, また久米島 DSW より 67 株および SSW より 17 株の合計 252 株の放線菌を得た. これらすべての分離株について B16 細胞に対する毒性を調べた結果, 表 1 に示すように伊豆赤沢 DSW から 7 株および SSW から 1 株, また久米島 DSW から 4 株および SSW から 4 株の合計 16 株の有望株が得られた. これらの有望株について, 16S rRNA 遺伝子解析により同定を行った結果, *Streptomyces* 属の放線菌が最も多かった. 本研究では, 伊豆赤沢由来の AKA32 株と命名した株が最も安定に抗癌活性が見られたことから, 分類学的諸性状を明らかにするとともに有効物質を培養液から単離・精製し, 化学構造を解析するとともに抗癌活性を評価した.

Table 1. Characteristics of 16 positive strains from DSW and SSW in Izu-Akazawa and Kumejima

Strain	Origin	Species	Identification % (bp)	Cytotoxicity (B16)
AKA32	AK DSW	<i>Nonomuraea indica</i>	98.5 (1,435)	++
AKA39	AK DSW	<i>Streptomyces bingchenggensis</i>	99.6 (1,476)	++
AKA43	AK DSW	<i>Actinomadura geliboluensis</i>	99.4 (1,280)	++
AKA103a	AK DSW	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	98.3 (1,078)	+
AKA108	AK DSW	<i>Streptomyces sanglier</i>	97.1 (1,046)	+
AKA119	AK DSW	<i>Micromonospora chalcea</i>	99.3 (1,052)	+
AKA128	AK DSW	<i>Streptomyces pulveraceus</i>	99.7 (1,162)	++
AKA223	AK SSW	No growth after cultivation		++
KS1	KU SSW	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	99.9 (1,265)	+
KS2	KU SSW	<i>Mycobacterium poriferae</i>	97.7 (1,498)	++
KS4	KU SSW	No growth after cultivation		+
KS30	KU SSW	No growth after cultivation		+
KD2	KU DSW	No growth after cultivation		+
KD5	KU DSW	<i>Streptomyces globosus</i>	98.5 (1,262)	+
KD7	KU DSW	<i>Actinobacteria bacterium</i>	98.7 (1,263)	+
KD38	KU DSW	<i>Streptomyces antibioticus</i>	99.8 (1,284)	++

\*AK: Izu-Akazawa; KU: Kumejima, \*\*+: Moderate activity; ++: High activity

### 3-2. AKA32 株の同定

本株について, 常法により 16S rDNA の塩基配列を解析した結果, 本株は放線菌 *Nonomuraea indica* DRQ-2 と 98.5% (1,435bp) の相同性を示した(Saitou and Nei, 1987). この *N. indica* DRQ-2 はこれまで鉱山の石灰岩からの分離報告があるが, 抗癌物質の生産性については知られておらず, 海洋環境からの分離例も皆無である(Syed *et al.*, 2015). 次に本株の近縁種 (標準菌株) 3 株を入手し, 本株との培養性状および生理・生化学的性状の比較を行った (表 2). その結果, これら 3 株の標準菌株には抗癌活性が全く認められなかった. また各種培地における AKA32 株と標準菌株との生育程度の比較では, AKA32 株, *N. asiatica* A299 株および *N. indica* DRQ-2 株が 10-45°C 間で生育が見られた反面, *N. muscovyensis* FMN03 株は 15-40°C 間での生育を示した. 同じく生育 pH 範囲試験でも AKA32 株, *N. asiatica* A299 株および *N. indica* DRQ-2 株は pH 6-9 間で生育を示した反面, *N. muscovyensis* FMN03 株は pH 7 のみで生育を示した. NaCl 耐性では AKA32 株, *N. asiatica* A299 株および *N. indica* DRQ-2 株はいずれも NaCl 3% まで生育を示したが, *N. muscovyensis* FMN03 株は NaCl 1% までしか生育しなかった. 上記生育温度, 生育 pH 範囲および NaCl 耐性から, AKA32 株, *N. asiatica* A299 株および *N. indica* DRQ-2 株は互いに類似した生理・生化学的性状を有していると考えられたが, 残りの *N. muscovyensis* FMN03 株は性状が異なっていると判断された. 次に炭素源の利用試験では AKA32 株および *N. asiatica* A299 株は 8 種類全ての炭素源を含む培地で生育を示したが, *N. indica* DRQ-2 株および *N. muscovyensis* FMN03 株は L-arabinose および D-fructose で生育が見られなかった (表 3). また, アミノ酸の利用試験では AKA32 株が L-methionine, D-alanine および L-isoleucine を除く 7 種類のアミノ酸を利用したことに対し, *N. asiatica* A299 株は L-methionine, D-alanine, L-isoleucine, valine および L-tyrosine を除く 5 種類のアミノ酸を, また *N. indica* DRQ-2 株は L-methionine, L-isoleucine および valine を除く 7 種類のアミノ酸を, さらに *N. muscovyensis* FMN03 株はいずれのアミノ酸も利用することが出来なかった (表 4). 以上のように, AKA32 株はこれら 3 つの標準菌株と炭素源の利用性およびアミノ酸の利用性が異なっていることから, 新種の放線菌の可能性が示唆され, 今後さらなる性状試験を実施する必要があると思われる.

**Table 2. Differences of physiological properties of strain AKA 32 and 3 type strains**

Characteristics	Strain AKA32	<i>N. asiatica</i> A299 <sup>T</sup>	<i>N. indica</i> DRQ2 <sup>T</sup>	<i>N. muscovyensis</i> FMN03 <sup>T</sup>
Antitumor activity	++	+	-	-
Inhibition activity against <i>Bacillus subtilis</i> PCI219	11.6**	-	-	-
pH range of growth	6 - 9	6 - 9	6 - 9	7
Growth temperature (°C)	10 - 45	10 - 45	10 - 45	15 - 38
NaCl tolerance (% w/v)	3	3	3	1

\*+: Positive, -: Negative

\*\*Diameter of inhibition zone (mm)

**Table 3. Utilization of carbohydrates by strain AKA32 and 3 type strains on various media**

Carbon	Strain AKA32	<i>N. asiatica</i> A299 <sup>T</sup>	<i>N. indica</i> DRQ2 <sup>T</sup>	<i>N. muscovyensis</i> FMN03 <sup>T</sup>
D-Glucose	++	+	+	+
None	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	-	-
D-Fructose	+	+	-	-
Sucrose	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+

\*+: Positive, -: Negative

**Table 4. Utilization of amino acid by strain AKA32 and 3 type strains on various media**

Amino acid	Strain AKA32	<i>N. asiatica</i> A299 <sup>T</sup>	<i>N. indica</i> DRQ2 <sup>T</sup>	<i>N. muscovyensis</i> FMN03 <sup>T</sup>
L-Alanine	++	+	+	-
L-Proline	+	+	+	-
Histidine	+	+	+	-
Glycine	+	+	+	-
Valine	+	-	-	-
L-Tyrosine	+	-	+	-
L-Methionine	-	-	-	-
$\alpha$ -Isoleucine	-	-	-	-
L-Phenylalanine	+	+	+	-
D-Alanine	-	-	+	-

\*+: Positive, -: Negative

### 3-3. 本菌の培養液からの抗癌物質の単離・精製 (Yang *et al.*, 2019).

本菌をあらかじめ V22 液体培地 (soluble starch 1%, glucose 0.5%, Bacto-yeast extract 0.2%, Bacto-tryptone 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.005%, CaCO<sub>3</sub> 0.3%) 100ml 中で 6 日間前培養した (30°C) . 前培養後, その全量を A16M (glucose 2%, Pharmamedia 1%) 液体培地 2L に接種したのち, 7 日間回転振盪 (30°C) 培養した. 培養後, n-ブタノール 2L をこれに直接添加したのち, 1 時間回転振盪し, 二層に分配したのち, 得られた有機層を回収し, エバポレーターで濃縮乾固した. この乾固物をクロロホルムとメタノール (1:1) に溶解させたのち, シリカゲルカラム (10cm x 50cm) を用いて, クロロホルムとメタノールで段階溶出した後, 得られた活性画分を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に展開し, 目的物質を確認した. この目的物質を含む画分をエバポレーターで濃縮後, ODS 中圧カラム (5cm x 40cm) を用いて, 0.1%ギ酸水溶液とメタノールで段階溶出した. 各 ODS 画分中から HPLC 分析によって目的物質を確認した後, エバポレーターで濃縮乾固した. 得られた濃縮物をさらに ODS カラム (I.D.x250 mm, COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II Packed, Nacalai Tesque) を装着した HPLC により, 単一の化合物になるまで精製した. 精製された各化合物は<sup>1</sup>H および<sup>13</sup>C NMR (Bruker AVANCE 500 spectrometer, Bruker Biospin K. K., Yokohama, Japan) を用いて化学構造を解析した. その結果, 1 つの新規物質 (akazamicin と命名) 及び 2 つの既知物質 *N*-formylanthranilic-acid (Jiaolin *et al.*, 2016) , actinofuranone C (Um, *et al.*, 2013) がそれぞれ得られた.

### 3-4. Akazamicin の諸性

図 2 に akazamicin の化学構造を示した(Yang *et al.*, 2019). 本物質は madurahydroxylactone (Kim *et al.*, 2017)と類似した構造を有していた. akazamicin は分子量 491.1 (C<sub>26</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>9</sub>) の赤色粉末であり, メタノール溶媒中では, 243, 292, 319, および 476nm に極大吸収を示した.

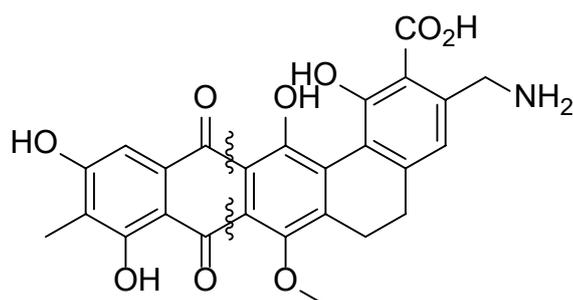


Fig. 2. Chemical structure of novel compound named as “akazamicin”

### 3-5. 各種癌細胞に対する細胞毒性

表 5 にこれら 3 つの物質の各種癌細胞に対する細胞毒性を示した. この表から明らかのように, これらの 3 つの化合物は各種癌細胞に対して特異的な毒性を示し, 特に akazamicin は B16 メラノーマ細胞に強い細胞毒性を示した.

Table 5. Cytotoxicity of three compounds against various tumor cell types

Tumor cell type	Akazamicin	<i>N</i> -Formylanthranilic-acid	Actinofuranone C
<b>B16</b>	<b>1.69</b>	<b>25.00</b>	<b>69.50</b>
<b>HepG2</b>	<b>75.25</b>	<b>84.24</b>	<b>37.88</b>
<b>Caco-2</b>	<b>185.00</b>	<b>80.61</b>	<b>12.75</b>

本研究では伊豆赤沢 DSW 由来の抗癌物質生産放線菌の諸性状について明らかにしたものであるが, 久米島由来の DSW からいくつかの有望株が取得されているため, 今後これらの株についても詳細に諸性状を調べたいと考えている. このように, DSW からの有用微生物探索研究はようやく緒に就いたばかりであり, 今後益々有用性の高い生理活性物質が続々と単離され, 諸産業に応用されることを祈念したい.

#### 文献

- 今田千秋 海洋における新有用微生物. 海洋深層水研究, 13, (2012), pp.33-40.
- Terahara, T., K. Yamada, J. Nakayama, Y. Igarashi, T. Kobayashi and C. Imada. Bacterial community structure of deep-sea water investigated by molecular biological techniques. Gene, 576, (2016), pp. 696-700.
- 矢田修一・大場雅行・榎本恵一 室戸海洋深層水中の細菌種の分析. 海洋深層水研究, 4, (2003), pp. 47-56.
- 山田勝久・今田千秋・土屋孝弘・宮本勝城・辻坊 裕・小林武志・濱田 (佐藤) 奈保子 海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究. 日本化粧品技術者会誌, 41, (2007), pp. 254-261.
- Syed RQ, Xin-Peng T, Jing Z, Jie L, Guo-Xing N, Shu-Kun T, Jamal AR, Dayanand A, Wen-Jun L and Syed GD. *Nonomuraea indica* sp. nov., novel actinomycetes isolated from lime-stone open pit mine India. J. Antibiot., 68, (2015), pp. 491-495.
- Saitou, N. and M. Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees Mol. Biol. Evol., 4, (1987), pp. 406-425.
- Yang, T., Yamada, K., Zhou, T., Harunari, E., Igarashi, Y., Terahara, T., Kobayashi, T., Imada, C., Akazamicin, a cytotoxic aromatic polyketide from marine-derived *Nonomuraea* sp. J. of Antibiot., 72(4), (2019), pp. 202-209.
- Jiaolin B, Fang L, Chao Z, Kai W, Xuejing J, Xiaotong W, Meiwan C, Peng L, Huanxing S, Yitao W, Jian-Bo W and Chengwei H. Anti-melanoma activity of forsythiae fructus aqueous extract in mice involves regulation of glycerophospholipid metabolisms by UPLC/Q-TOF MS-based metabolomics study. Scientific Reports 6, (2016), 39415.
- Kim BM, Choi HY, Kim GW, Zheng CJ, Kim YH, Kim WG. Madurahydroxylactone, an Inhibitor of *Staphylococcus aureus* FtsZ from *Nonomuraea* sp. AN100570. J. Microbiol. Biotechnol., 27, (2017), pp.1994-1998.
- S Um, HS Bang, JH Shin and DC Oh (2013) Actinofuranone C, a new 3-furanone-bearing polyketide from a dung beetle-associated bacterium. Natural Product Sciences 19, (2013), pp.71-75.