

## 海洋深層水由来微生物のライブラリ構築と有用微生物の探索

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

### Construction of microbial library and beneficial microorganisms from deep-sea water

Chiaki IMADA \*<sup>1</sup>, Taehui YANG \*<sup>1</sup>, Katsuhisa YAMADA \*<sup>2</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

The bacterial community structures of deep-sea water (DSW) and surface seawater (SSW) collected from seven DSW pumping stations in Japan were investigated by molecular biological techniques using a 454 FLX sequencer. The result of pyrosequencing analysis showed that the bacterial diversity of DSW was considerably higher than that of SSW as we studied before.

Various actinomycete strains were isolated from deep-sea water in Izu-Akazawa in Shizuoka Prefecture and Kume-Jima in Okinawa Prefecture and three types of new active compounds were isolated. A new enteromycin-class antibiotic, named as “akazaoximes 1, 4, 17, 18” were isolated from cultured extract of an actinomycete of the genus *Micromonospora* sp. strain AKA109, which was isolated from Izu-Akazawa deep-sea water. Akazaoxime 1 showed weak to moderate antimicrobial activities against Gram-positive bacterium such as *Kocuria rhizophila* and those of synthetic analogues against a plant pathogen *Glomerella cingulate* (MIC of 50 µg/ml) and a human pathogen *Trichophyton rubrum* (MIC of 25-50 µg/ml). Three new tetronate-class polyketides, named as “nomimicins B, C, and D” along with nomimicin A were isolated from the culture extract of *Actinomadura* sp AKA43, which was isolated from Izu-Akazawa deep-sea water. Nomimicin B, C, and D showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria such as *Kocuria rhizophila* and *Bacillus subtilis*, with values in the range of 6.5 to 12.5 µg/ml. Nomimicin B and C also displayed cytotoxicity against P388 murine leukemia cells with IC<sub>50</sub> values of 33 and 89 µM, respectively. Seven cytotoxic angucyclinones named as “kumemicinones A-G were isolated from fermentation products of an actinomycete of the genus *Actinomadura* sp. strain KD439, which was isolated from Kume-Jima deep-sea water. All kumemicinones exhibited cytotoxicity against P388 murine leukemia cells with IC<sub>50</sub> values ranging from 1.8 to 53 µM.

**Key words :** deep-sea water, library, actinomycete, microorganisms, cytotoxicity, antibiotics

## 1. 緒 言

海洋深層水 (DSW) は太陽光の届かない補償深度以深の暗黒環境であるため、生物量が極めて少ない上、陸上から産業廃棄物を始めとする汚染物質の流入による影響も皆無であることから DSW は清浄性が高いと考えられている。また DSW 中には窒素やリンなどの無機栄養塩が豊富に含まれており、有望な海洋資源であると言われている(藤田・高橋,2006)。このような DSW の特性に着目した産業利用では、日本が最先端の技術を有している。特に魚介類の養殖や農業用水への DSW の利用研究が進んでいる(藤田,高橋,2006)。さらに太陽光を直接受ける表層海水 (SSW) に比べて、DSW は年間を通じて低い水温である。近年、DSW の健康増進効果にも注目が集まるようになり、抗酸化作用や動脈硬化の予防(高橋,2005)の報告が見られることから、食品や医薬品、美容など様々な産業分野への DSW の応用の期待が高まっている(伊藤他,2006)が、これらの応用研究に比べると、DSW 中の微生物はあまり研究が進んでいない。微生物の中でも放線菌は抗生物質などの多種多様な二次代謝産物を生産することなど産業

原稿受付 2022年11月29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)

E-mail of corresponding author: imada@kaiyodai.ac.jp

的に重要な微生物であり,これまで陸上放線菌について精力的な研究が続けられてきた.現在までに報告されている抗生物質のうち半数以上は放線菌由来であり,その半数以上が *Streptomyces* 属由来である(Procópio et al., 2012).

しかし,近年では陸上放線菌からの有用生理活性物質の報告は減少傾向にあり,新たな分離源の探索や分離・培養方法の開発が必要となってきた.海洋環境からの放線菌探索には海底堆積物が最も多く用いられており,海水からの分離例は比較的少ない.さらに DSW は海底堆積物や海洋生物とは大きく異なる特異的な環境であることから,新規放線菌の存在が期待される.Paolo et al. (2014)によると,海洋由来生理活性物質合計 1,241 の生産者の中で,微生物は 164 の新規生理活性物質の生産者として報告されている.微生物の分離源は主に海洋生物や堆積物由来であるのに対し,海水,特に DSW 由来の新規生理活性物質の報告は極めて少ない.このような背景から,本研究では DSW を新たな微生物探索資源としてとらえ,DSW には未同定種(新種を含む)の割合が SSW より高いことから(Yang et al. 2019),より多くの新規微生物が存在する可能性が高いことが示唆された.また,海域ごとに調べた属レベルでの細菌群集解析結果では,伊豆赤沢および久米島の DSW 中に新種を含む未同定種が最も多く存在していることが明らかとなった(今田他,2018).

このようなことから,伊豆赤沢および久米島 DSW から乳酸菌,酵母,放線菌などを分離し,SSW 由来のものと一緒に微生物ライブラリーを構築してきた.今回はこのライブラリーの中から放線菌を選択し,液体培地で培養し,有効物質を培養液から単離・精製し,その化学構造などの諸性状を調べることを目的とした.

## 2. 日本各地の海洋深層水と表面海水中の細菌群集組成

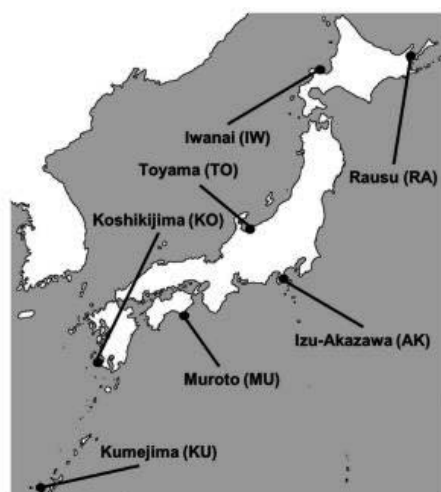


Fig. 1. Geographical location of DSW pumping stations in Japan

Table 1. Depth and sampling date of DSW pumping stations in Japan

Pumping station	Depth (m)	Sampling dates
Kumejima (KU)	612	25/May/2013, 30/Aug./2013, 29/Nov./2013, 27/Feb./2014
Koshikijima (KO)	325	24/May/2013, 30/Aug./2013, 29/Nov./2013, 27/Feb./2014
Muroto (MU)	374	15/May/2013, 30/Aug./2013, 29/Nov./2013, 28/Feb./2014
Izu-Akazawa (AK)	800	15/May/2013, 29/Aug./2013, 28/Nov./2013, 27/Feb./2014
Toyama (TO)	333	28/May/2013, 29/Aug./2013, 28/Nov./2013, 27/Feb./2014
Iwanai (IW)	300	7/May/2013, 23/Aug./2013, 29/Nov./2013, 28/Feb./2014
Rausu (RA)	356	7/May/2013, 23/Aug./2013, 29/Nov./2013, 28/Feb./2014

Fig 1 に本研究で入手した日本各地 7 カ所(北海道羅臼,北海道岩内,富山県滑川,静岡県伊豆赤沢,高知県室戸,鹿児島県甕島,沖縄県久米島)の海洋深層水取水設備の位置を示した。これらの設備より Table 1 に示すように 2013 年 5 月,8 月,11 月および 2014 年 2 月の合計 4 回にわたり DSW および SSW を入手した。Fig. 2 は分子遺伝学的手法によりこれらすべての水の細菌群集組成を解析したものであるが,新種を含む未同定細菌の割合 (unknown, unclassified) は DSW の方が SSW よりも多いことがわかる。(Yang et al. 2019)

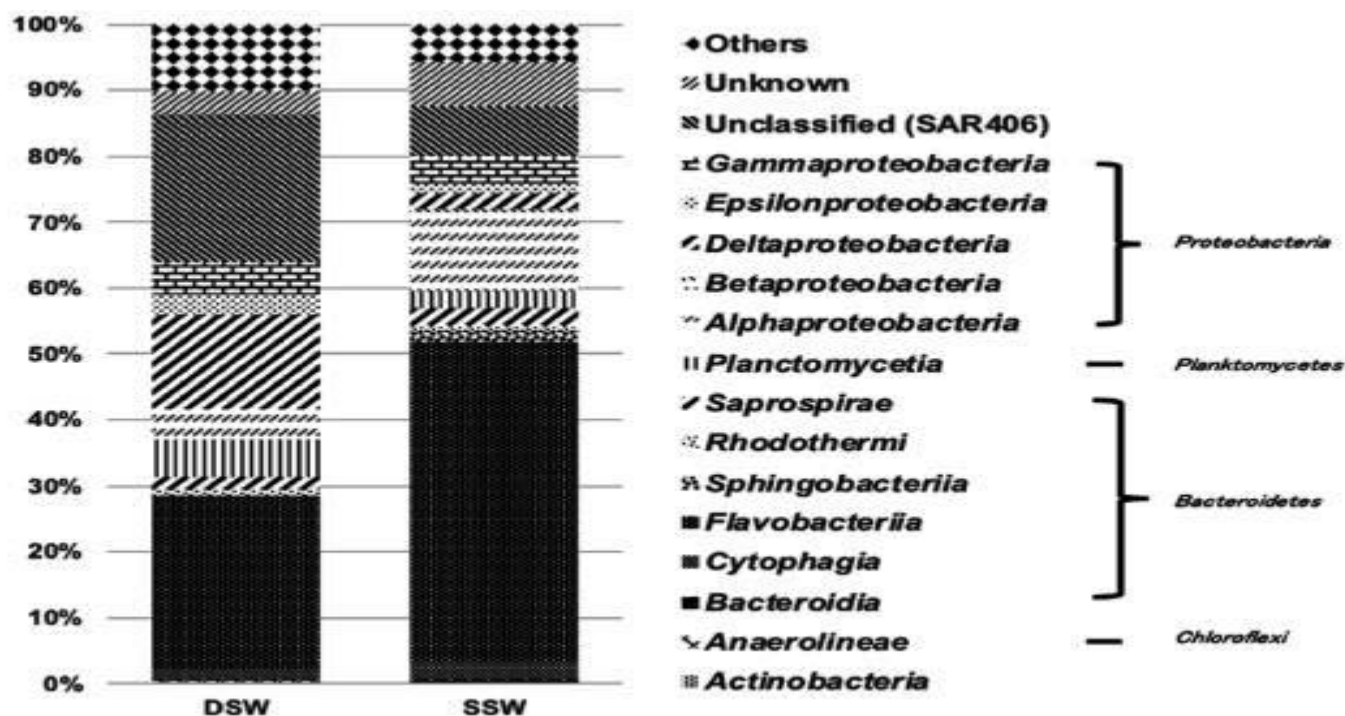


Fig. 2. The bacterial composition of all DSW and SSW collected from 7 DSW pumping stations in Japan (May, 2013 to Feb 2014)

3-1. 伊豆赤沢 DSW 由来放線菌からの新規キノン系抗生物質 akazaoxime 群 (Igarashi et al. 2021)

日本最大深度の伊豆赤沢 DSW 由来 (水深 800m) の放線菌 AKA109 株より新規抗生物質が分離された。本生産菌は 16S rDNA の塩基配列解析から,この標準株である *Micromonospora fifamycnida* AM1-5<sup>T</sup>株と 99.4%の相同性 (1,402 塩基解析) があり,DDBJ のデータベース (DNA Data Bank Japan) に LC476779 という番号で登録した。AKA109 株を A16 培養液で培養したのち,培養液に 1-butanol を加えて有効物質を有機層に抽出した後,シリカゲルおよび ODS のカラムクロマトおよび逆相の高速液体クロマトグラフィーで精製した。本物質 (akazaoxime と命名) および化学合成により得られた本物質の誘導体 17, 18, 19 はいずれも白癬菌 (水虫菌, *Trichophyton rubrum*) および農作物の炭疽病菌 (*Glomrella cingulate*) に対し,選択的な抗菌活性を示したことから,新たな抗カビ剤としての実用化が期待される。図 4 に新規キノン系化合物, akazaoxime と合成誘導体 17, 18, 19 の化学構造を示した。

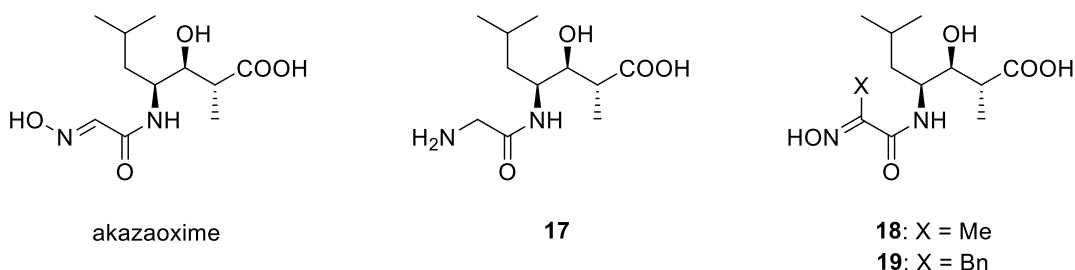


Fig. 3. Chemical structures of akazaoxime and compounds 17, 18, 19

### 3-2. 伊豆赤沢 DSW 由来放線菌からの新規抗菌物質 nomimicin 群 (Zang et al. 2021)

伊豆赤沢 DSW 由来放線菌 AKA43 株から新規テロン酸化合物が分離された。本生産菌は 16S rDNA の塩基配列解析 (1,397 塩基解析) から、この標準株である *Actinomadura gelboluensis* A8036<sup>T</sup> の配列と完全に一致し、DDBJ のデータベースに LC498623 という番号で登録された。本菌 *Actinomadura* sp. AKA43 株を A16 培養液で培養したのち、培養液に 1-butanol を加えて有効物質を有機層に抽出した後、シリカゲルおよび ODS のカラムクロマトおよび逆相の高速液体クロマトグラフィーで精製した。その結果、既知化合物 nomimicin A に加えて、新たに新規化合物 nomimicin B, C, D が得られた。このうち、nomimicin B, C, D はいずれもグラム陽性細菌 *Kocuria rhizophila*, *Bacillus subtilis* に MIC6.5-12.5mg/ml の値で増殖阻害が見られた。また、nomimicin B, C は IC<sub>50</sub> がそれぞれ、33, 89mM の濃度でマウス P388 白血病細胞に対する増殖抑制が認められた。これら新規テロン系化合物 nomimicin A, B, C, D の化学構造を図. 5 に示した。

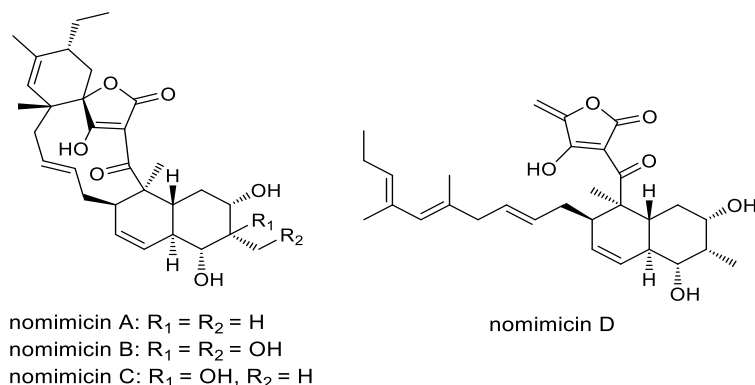


Fig. 4. Chemical structures of nomimicins A to D

### 3-3. 久米島 DSW 由来放線菌からの新規アングサイクリノン系化合物 kumemicinone 群 (Zang et al. 2022)

久米島 DSW 由来放線菌 KD439 株から新規アングサイクリノン系化合物が分離された。本生産菌は 16S rDNA の塩基配列解析 (1,277 塩基解析) から、この標準株である *Actinomadura miaoliensis* BC44T-5T 株と 99.9% の相同性が見られた。本菌を DDBJ のデータバンクに LC648321 という番号で登録した。本菌 *Actinomadura* sp. KD439 株を A16 培養液で培養したのち、培養液に 1-butanol を加えて有効物質を有機層に抽出した後、シリカゲルおよび ODS のカラムクロマトおよび逆相の高速液体クロマトグラフィーで精製した。その結果、7 つの物質が得られ、それぞれを kumemicinone A, B, C, D, E, F, G と命名した。これらの物質は、1.8-53mM の濃度でマウス P388 白血病細胞に対する細胞毒性が認められた。これら新規アングサイクリノン系化合物 kumemicinone A, B, C, D, E, F, G の化学構造を図. 6 に示した。

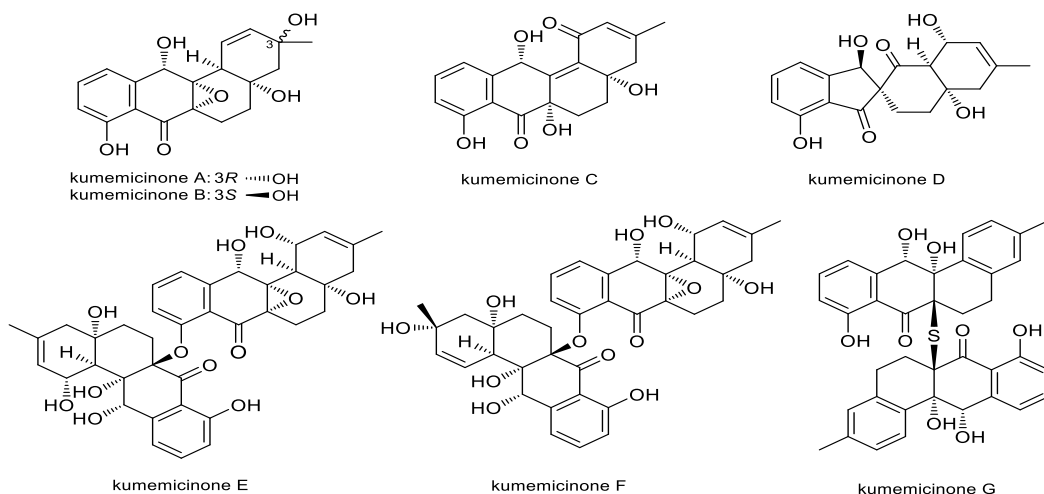


Fig. 5. Chemical structures of kumemicinones A-G

## 6. 謝辞

本研究の一部は佐賀大学海洋エネルギーセンター共同利用研究(採択番号;21E01)により実施されたことを記して謝意を表す。

## 参考文献

藤田 大介, 高橋 正征:「海洋深層水利用学会ー基礎から応用・実践まで」成山堂書店,2006, pp. 12-20.

伊藤 慶明, 深見 公雄, 高橋 正征:「海洋深層水の多面的利用ー養殖・環境修復・食品利用」 恒星社厚生閣,2006, pp. 17-48.

Igarashi, Y., Y. Matsuzaki, M. Yamada, N. Fujihara, E. Harunari, N. Oku, Md.R. U. Karim, T. Yang, K. Yamada, C. Imada, and K. Furuya Structure determination, biosynthetic origin, and total synthesis of enteromycin-class metabolite from a marine actinomycete of the genus *Micromonospora*. The J. of Org. Chem., 86, (2021), pp.6528-6537.

今田千秋, 梁太熙, 山田勝久, 中山二郎, 寺原猛, 小林武志 海洋深層水の微生物群集構造解析と有用微生物の分離. 海洋深層水研究, 19, (2018) p. 34.

Monciardini, P., M. Iprio, S. Maffioli, M. Sosio, and S. Donadio Discovering new bioactive molecules from microbial sources. Microb. Biotechnol., 7, (2014), pp.209-220.

Procópio RE, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL and Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Braz. J. Infect. Dis. 16, (2012), pp.466-471.

高橋 正征:「海にねむる資源海洋深層水」あすなろ書房,2005, pp.1-189.

Yang, T., K. Yamada, J. Nakayama, Y. Igarashi, T. Terahara, T. Kobayashi, and C. Imada Bacterial community structure analysis of deep-sea water and surface seawater in Japan by pyrosequencing. Deep Ocean Res., 19, (2019), pp.137-146.

Zhou, Z. T. T. Zhou, T. Yang, K. Fukaya, E. Harunari, S. Saito, K. Yamada, C. Imada, D. Urabe, and Y. Igarashi Nomimicins B-D, new tetranate-class polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Actinomadura*. Beil. J. of Org. Chem.,17, (2021), pp.2194-2202.

Zhou, Z., Y. In, K. Fukaya, T. Yang, E. Harunari, D. Urabe, C. Imada, N. Oku, and Y. Igarashi Kumemicinones A-G, cytotoxic angucyclinones from a deep sea-derived actinomycete of the genus *Actinomadura*. J, of Nat. Prod., 85, (2022), pp.1098-1108.