

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21603010

研究課題名（和文） 魚病感染に関わる防御物質の構造と機能

研究課題名（英文） Structures and Functions of Bioactive Compounds against Fish Disease

研究代表者

倉本 誠 (MAKOTO KURAMOTO)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・准教授

研究者番号：50291505

研究成果の概要（和文）：ヒラメに観察されるレンサ球菌症は、ワクチンの無い種類の発生が問題となっていた。2種のレンサ球菌(*S. iniae*と*S. parauberis*)が同時に発生しないことから、調査を行った。その結果、2種のレンサ球菌の間に忌避関係を確認した。さらに、*S. iniae*の培養を行い、抽出液を対象として活性物質の分離と生物活性試験を行った。また、利用価値の低い海洋生物由来の抗菌活性物質の探索を行い、含臭素アルカロイドを分離した。これらについて構造活性相関も行っている。

研究成果の概要（英文）：Aquaculture of flounder is an important industry in Ehime prefecture. However, occurrence of new streptococcal disease and the incidence of resistant bacteria has become a major problem in recent years. We found that there is a repellent effect between *Streptococcus iniae* and *S. parauberis*. Therefore, separation of aversive substances has been done. Furthermore, antimicrobial substances (halogenated alkaloids) were isolated from the marine sponge.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

おり、特に海面養殖業は全国でも有数の売上高をほこる。研究代表者は、愛媛県水産試

験場および愛媛県各所の漁業協同組合と協力してこれまで、愛媛県の高産業に関わる研究を行ってきた。特に、1997年以降アコヤガ

イの大量死問題では、病気の進行状況において観察される現象とそれに関わる物質の解明を行った。(特定領域研究H12-14) また、この研究過程で愛媛県水産試験場において見いだされた耐性を獲得した貝は、市場での育成を目指した研究が開始されている。このように、申請者は愛媛県水産試験場や漁業関係者と協力し、海洋生物に観察される現象とその現象に関わる鍵化学物質について研究を行ってきた。

愛媛県では特に、ブリ、ヒラメ、マダイ、カンパチなどの漁獲高が全国一位である。しかしながら、近年では市場価格の低下と共に育種に関わる費用の高騰が問題となっている。特に感染症や疾病による損失が非常に大きくなっており、対策が求められている。感染症に関してはワクチンの接種が有効であるが、耐性菌の発生が第一の課題であった。さらに、ワクチンの認可には多くの時間が必要であり、現在のところワクチンの市販されていない魚病菌も多くある。

研究代表者の注目したヒラメ類は養殖が盛んに行われており、単価が高いことから養殖漁家も多い魚類である。愛媛県水産研究センターの平成19年度の調査では、ヒラメにはエドワジエラ症とレンサ球菌症が多いことがしめされていた。エドワジエラ症およびレンサ球菌 (*Streptococcus iniae*) はワクチンが市販されており対処が可能であったが、ワクチンが無いレンサ球菌症 (*Streptococcus parauberis*) が発生したことから、対策法が求められていた。

表1. 魚病診断件数 (愛媛県水産研究所 平成19年度調査結果より抜粋)

ヒラメ魚病診断件数	発生件数
エドワジエラ症	37
レンサ球菌症	28
スクーチカ症	11
ウイルス性出血性敗血症	9

愛媛県水産研究センターの協力を得て養殖魚に関する調査を行ったところ、複数のレンサ球菌に同時に発症しないことが推測された。この現象は宿主ではなく、感染生物自身の防御機構が働いていると推測される。この現象に関わる物質の解明を行うことで、感染という生命現象に関する基礎的発見と応用面での発展が期待できると考えられた。また、魚病を取り扱うことで新しい物質の発見が期待された。

2. 研究の目的

- 先に述べたように、養殖魚に観察される魚病では対処法のない病気やワクチン

ン無い病気が多くある。そのような魚病における調査が求められていることから、養殖魚に感染する魚病を対象として感染や防御に関わる物質の分析を行う。

- 食品とならない海藻やカイメン動物などは、漁の作業中に多く得られてくるが、すべて廃棄されてしまう。そのような未利用の海産資源を対象として、魚病菌に対する抗菌活性を指標として物質の探索を行い、新しい有用物質の探索を行う。

以上の2つの事柄を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) レンサ球菌由来の物質に関する研究

レンサ球菌に関しては、愛媛県水産試験場魚類検査室の協力をえてレンサ球菌症に罹患したヒラメ内臓より分離を行った。分離したレンサ球菌 (*S. iniae*, *S. parauberis*) は、実験室内での活性試験に用いるため、保存条件および培養条件、活性試験について条件を検討した。最終的に分離した株はミューラーヒントン培地を用いて-80℃で冷凍保管した株を使用した。通常培養には、固体培地および液体培地は共にBHI (ブレインハートインヒュージョン) 培地を用いた。

S. iniae の培養液を作成した後、菌体と培養液を分離したのちに、クロロホルムおよびメチルアルコールの混合液を用いて抽出を行った。得られた抽出液を分配操作およびカラムクロマトグラフィー操作により分離を行い、各画分について活性の評価を行った。阻害活性はペーパーディスク法を用い、阻止円の大きさにより評価した。

(2) 未利用資源由来の抗菌活性物質および有用分子探索

愛媛県佐田岬でカイメン動物を集めた。一般にカイメン動物類は共生微生物を内包していることから、有用分子探索には有効な生物と考えられる。このような生物の採集は、潮間帯やダイビングでの採集が主であるが、本研究では、漁業協同組合の協力を得て底引き網漁船で水深200m付近に生息する生物の採集を行った。

共生微生物由来の二次代謝産物も対象としたことから、アルコール中での粉碎、抽出液の分配操作、各種クロマトグラフィーを用いて分画を進めた、各段階でのレンサ球菌症への抗菌活性を指標として分析をすすめた。構造の解析には、所属センターに設置されている核磁気共鳴装置や質量分析装置などの大型機器を用いて行うこととした。さらに、得られた物質について構造変換や合成の容易な物質は変換反応や合成を試みることに

した。

また、カンキツ類の果皮はほとんどが廃棄されていることから、入手が容易な未利用資源であった。これらについても分析を行うこととした。

4. 研究成果

(1) レンサ球菌に関する研究の結果について

S.iniae と *S.parauberis* の培養液 40 μ L をペーパーディスクにそれぞれ染み込ませ、インキュベーター中で培養を行った。その結果を下に示す。右が *S.iniae* 左が *S.parauberis* のディスクである。両者は混ざることなく拮抗していることが観察された。その後 10 日目まで観測しても重なることはなかった。このとき、*S.parauberis* は *S.iniae* と反対側にコロニーが広がっていることから両者の間に忌避関係があることが強く示唆された。

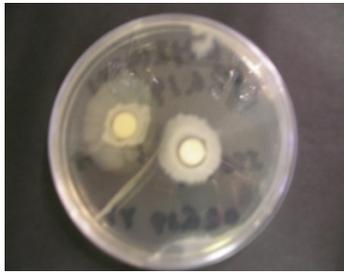


図 1. レンサ球菌間に観察される現象
(左: *S. parauberis*, 右: *S. iniae*)

培養条件検討の結果より、*S. iniae* は 10% の滅菌済みパラウベリス培養液を加えた BHI 培地で培養することで良好な生育となることが示唆された。そこで、上記の方法を用いて培養液 7 L を作成し、菌体と上精に分離した。



図 2. *S.iniae* 培養液菌体 (左) と上精(右)

得られた上精および破碎した菌体をそれぞれクロロホルム・メタノールの混合液で抽出し、得られた抽出液を水可溶部クロロホルム可溶部に分離した後に、ペーパーディスク法で生物活性試験を実施した。このとき、クロロホルム層に抗菌活性が確認できた。



図 3. *S.parauberis* に対する抗菌活性試験
(上: コントロール, 左: クロロホルム層 100 ppm, 下: クロロホルム層 10 ppm)

そのため、クロロホルム可溶部をヘキサンとメチルアルコールを用いて脱脂操作を行った。しかしながら、得られたメチルアルコール可溶部およびヘキサン可溶部は共に活性の低下が確認された。また、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分離を進めたが、活性の向上は認められなかった。そこで、水溶性画分についてさらに検討を行った。ブタノール抽出を行うことで、抗菌活性を確認することが出来たが、このブタノール溶解部についても、分離を進めることで活性の低下が認められた。(図 4, 表 2) 現在は更なる分離を展開している。

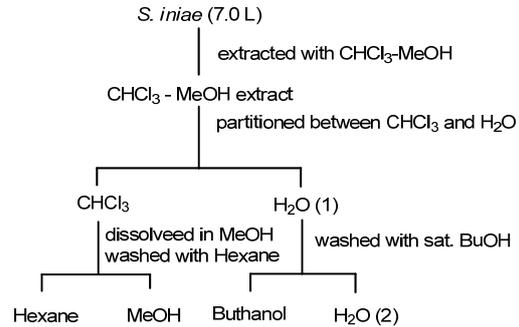


図 4. *S.iniae* の分離スキーム

表 2. *S. iniae* の活性評価

	100 ppm	10 ppm
CHCl ₃	++	+
Hexane	+	±
MeOH	+	±
H ₂ O (1)	-	-
Buthanol	++	+
H ₂ O (2)	-	-

阻止円直径: 15mm 以上 (++)、10-15 mm

(+), 8-10 mm (±), 8 mm 未満 (-)

健康なヒラメ尾部より採集した血液を採

集し、遠心分離後にフィルターを用いて分離することで、血清を作成した。*S.iniae*の培養時にこの血清を投与することで、これまでは困難であったより海水温に近い低温(18℃以下)での培養が可能となった。今後は血清を添加した条件での培養を行い、先の結果とひかくして活性について検討を行っていく。

(2) 未利用資源由来の抗菌活性物質について
愛媛県佐田岬で採集したカイメン動物 *Axinella cylindratus* (1.5 kg、図5)をメチルアルコール 10 L を用いて抽出した。



図5. *Axinella* sp.

得られたアルコール抽出物を、水-酢酸エチルを用いて分配し、得られた酢酸エチル層をヘキサンとメチルアルコールを用いて脱脂操作を行った。この抽出物について、ドラージェンドル試薬による呈色反応をおこなったところ、複数の陽性反応が検出された。この呈色反応およびレンサ球菌に対する抗菌活性を指標として分離を進めた。(図6)

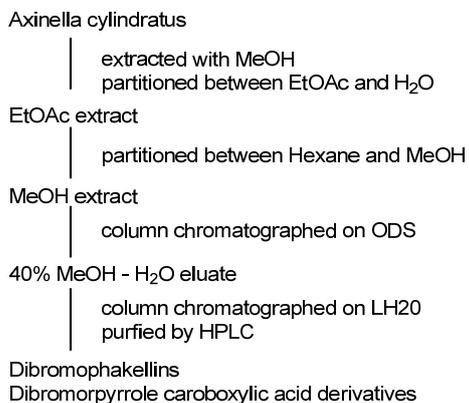


図6. カイメン動物の分離スキーム

逆層のカラムクロマトグラフィーを用いて分離を行ったのちに、ゲル濾過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離を行い、図7に示す化合物群(1-7)を分離し、その構造を明らかとすることが出来た。

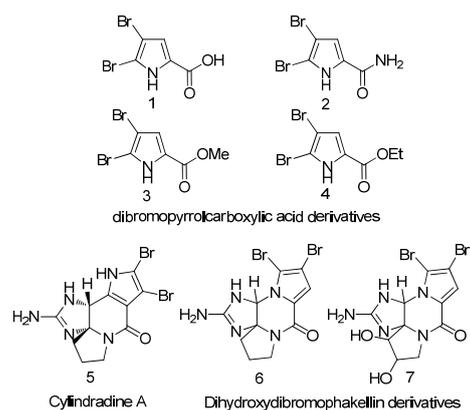


図7. カイメン動物由来の活性物質の構造

このうち、ジブロモピロールカルボン酸類はレンサ球菌に対して抗菌活性を示したことから、構造と生理活性について分析を行うために合成研究を行った。スキーム1に示すように市販の2-ピロールカルボン酸およびその類縁体を出発原料として、目的の化合物(1-4, 8, 9)へと導くことが出来た。(図8)

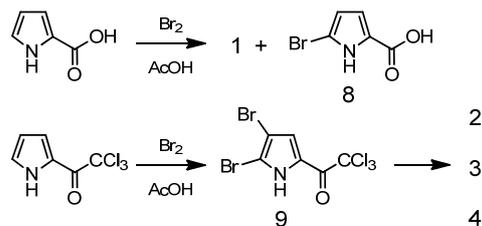


図8. 抗菌活性ピロール類の合成

このようにして得た物質について、抗菌活性試験を実施した。その結果、この化合物群は、*S.parauberis*だけでなく*S.iniae*、ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草菌(*Batillus subtilis*)に対しても抗菌活性を示した。これらの合成は簡便に行えることから、更なる誘導体の合成と活性評価を可能となる。

表3. 臭化ピロール類の抗菌活性

化合物	濃度(ppm)	<i>S. parauberis</i>	<i>S. iniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
1	100	±	++	++	-
	10	±	+	+	-
2	100	+	-	N.D.	N.D.
	10	+	-	N.D.	N.D.
3	100	-	+	+	-
	10	-	±	+	-
4	100	-	+	++	-
	10	-	+	++	-
8	100	+	++	+	+
	10	+	++	+	+
9	100	++	++	++	+
	10	++	++	++	-

(3) 含臭素ピロールアルカロイド類の生合成に関する基礎的知見

今回のレンサ球菌症に対する抗菌活性物質探索の課程で得た dibromophakellin はこれまでの報告と大きく異なる知見が得られた。

これまでに、dibromophakellin(6)は、その旋光性がことなる(+)体と、(-)体が異なる生物から別々に得られていた。しかしながら、今回私たちの単離した dibromophakellin はその旋光度が -3.2° と非常に小さい値を示した。そこでキラルカラムを用いて工学純度について検討を行った。

種々の条件を検討した結果、図9に示すように Na_2PO_4 を含む条件で(+), (-)体の両方をほぼ等量含むエナンチオマー混合物であることを明らかとすることが出来た。一般にカイメン動物由来の二次代謝産物の真の生産者は共生微生物であることが示唆されている。今回の dibromophakellin を作り出す微生物はこれまでの生産微生物とは異なることが強く示唆されており、新しい物質の発見が今後期待できる。

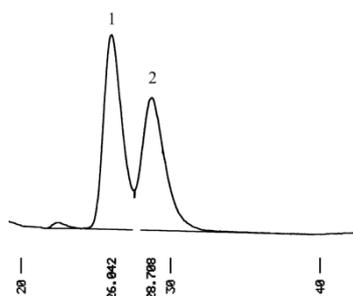


図9. Dibromophakellin の HPLC チャート

しかしながら、同時に単離した 11,12 位に水酸基を持つ化合物(7)は $+109^\circ$ と大きな旋光度を示した。また、上と同様にキラルカラムを用いた分析においてエナンチオマーが確認できなかった。Phakellin 型の化合物はアミノ酸から、oroidine を経て生成されることが知られている。そこで、直鎖の oroidine に水酸基が導入されたことにより、環化の方向が制御され一方のエナンチオマーのみが生成したと考えられる。

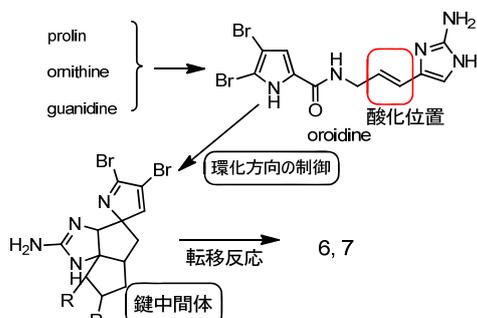


図10. 化合物 6,7 の合成経路

(4) カンキツ果皮に関する調査

カンキツ栽培は、愛媛県では大きな地場産業となっている。カンキツの果皮はジュース工場などで排出されその有効活用が求められていた。この果皮をクロロホルムおよびアルコールで抽出した。抽出液の *S. parauberis* に対する抗菌活性を評価したところ、非常に弱い活性が示唆された。果皮抽出液には、クマリンやフラボノイド類が非常に多く含まれている。一連の化合物は抗菌活性が知られている。そこで一連の化合物の分離を実施した。物質の分離を行い、複数の物質を得ることが出来たが、短時間で分解してしまう物質であった。今後は、活性試験法を検討していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計5件)

1. 内村祐之, 倉本 誠, “2種のレンサ球菌の拮抗阿庄から見たヒラメレンサ球菌症の抑制”、平成23年度瀬戸内・四国ブロック魚病検討会、愛媛県南予地方局(宇和島市), 2011年10月。
2. 倉本 誠, 中平 祐也, 近藤 直, 小川 雄一, 山本 一哉, MOMIN, MD, Abdul, 井戸 恭平, “カンキツ果皮に含まれる蛍光物質に関する研究”, 日本化学会第92春季年会, 慶應義塾大学(横浜市), 2012年3月。
3. 横尾義貴, 倉本 誠, 宇野英満, “愛媛県産海綿動物由来の含窒素化合物の探索”, 日本化学会第91春季年会, 神奈川大学(横浜市), 2011年3月。
4. Makoto KURAMOTO, Yoshitaka YOKOO, Norimichi MIYAKE, Hidemitsu UNO, Isolation and elucidation of bioactive compounds from Sada Cape”, Pachifichem 2010, Hawaii, 2010 December.
5. 横尾義貴, 三宅教道, 二宮高裕, 倉本 誠, 宇野英満, “愛媛県産海洋生物由来の生物活性物質”, 日本化学会第90春季年会, 近畿大学(東大阪市), 2010年3月。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉本 誠 (KURAMOTO MAKOTO)
愛媛大学・総合科学研究支援センター・
准教授
研究者番号: 50291505