

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14794

研究課題名（和文）海洋深層水からの希少放線菌の分離と新規化合物の探索

研究課題名（英文）Isolation of rare actinomycetes for screening of new compound from deep-sea water

研究代表者

春成 円十郎（Harunari, Enjuro）

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：00750449

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：放線菌は抗生物質等を生産する有用な微生物グループであるが、簡単に発見できる種類からは有用な物質を見つけることが非常に難しい。そのため、研究がほとんど行われていない海洋深層水の放線菌が生産する物質を調査した。北海道・羅臼の海洋深層水から分離された6グループ（属）、合計55個体を調べたところ、ロドコッカスとストレプトストランギウムというグループからそれぞれ2個、合計4個の新規物質を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋には陸上とは異なる放線菌が存在し、陸上の放線菌が生産しない物質が発見されている。陸上では環境が変わると生息する放線菌が大きく異なることが知られており、海洋でも海域・水深が変われば同様の変化が予想できるが、海洋深層水の放線菌が生産する物質は不明であった。本研究により、海洋深層水においては、ストレプトマイセス属などの主要な放線菌に比べて、希少な放線菌群からの新規物質の発見率が顕著に高いことが改めて示された。そのため、海洋深層水に存在する希少な放線菌グループは陸上に代わる有用な探索源になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Actinomycetes are a useful group of microorganisms that produce antibiotics and other useful substances, but it is very difficult to find new compounds from easily isolate species. Therefore, we investigated compounds produced by actinomycetes in deep ocean water, where little study has been done. We checked 55 strains from six genera isolated from Rausu, Hokkaido, and discovered four new compounds, two each from the Rhodococcus and Streptosporangium.

研究分野：応用微生物学、天然物化学

キーワード：放線菌 海洋深層水 Rhodococcus Streptosporangium

1. 研究開始当初の背景

陸土壌の優占種である放線菌は、*Streptomyces* 属を筆頭に、微生物由来生理活性物質の約半数を生産しており、その二次代謝能力は微生物の中でも群を抜いている。しかしながら、ストレプトマイシンが発見された 1944 年から約半世紀の間に土壌放線菌は徹底的に調べ尽くされており、免疫抑制剤であるタクロリムスの発見があった 1984 年以降は新薬開発につながる化合物は 40 年近く見つかっていない。このような状況から抜け出すため、新たな放線菌群の分離・化合物探索が海洋を中心に様々な環境から行われてきた。

海洋から分離される放線菌は陸上と形態的・生理生化学的な違いが認められないことから、陸上由来であると考えられ、2000 年代頃までは注目されていなかった。しかし、2001 年に生育に海水を必要とする *Salinispora* 属が発見され、様々な新規化合物が本属から発見された。中でも抗がん剤サリニスポラマイド A のように臨床試験に進む有望化合物も得られたことから、陸上放線菌とは異なる二次代謝系の存在が認識されはじめ、海洋放線菌からの新規化合物報告は増加傾向にある。また、海洋から分離した 2000 株の系統解析により、陸上の放線菌とは遺伝子配列が異なる 13 のグループが示された。系統解析に用いられた 1500 塩基の短い領域でも系統樹に現われるような相違があるため、ゲノム全体では非常に大きな変化があると考えられ、これらの二次代謝能力に期待がもたれる。

海洋には陸上とは異なる放線菌が存在し、それらは徹底的に探索がなされた陸上放線菌からは発見されていない新規化合物を生産することが明らかになってきた。陸上では環境が異なれば生息する放線菌も大きく異なることから、海洋でも海域や水深が異なると同様の変化があると推測できる。一方で、海洋の中でも陸上の影響を受けにくく、浅海や表層水とは異なる環境を有する海洋深層水の放線菌はほとんど研究が行われていない。微生物分離において未開拓環境からの分離は新規微生物を得るための重要な条件であることから、深層水は有望な放線菌の分離源であるといえる。申請者の最近 3 年間の深層水放線菌の研究では、これまで類似する構造がない二環性ペプチドをはじめ、多様な新規化合物を発見している。また、生産物の詳細な解析により同じ海域でも採水点や水深が異なると、生産物が大きく異なることを明らかにした。静岡県深層水からは富山に比べて多様な形態の放線菌が得られ、これらの株から新規化合物の探索を行ったところ、非常に高頻度で新規化合物を得ることに成功した。富山との違いを明らかにするため、放線菌を属レベルで同定したところ、新規化合物を生産していたのは主要な放線菌群ではなく、希少放線菌と呼ばれる自然界で分離頻度が低いグループであった。このことから、深層水の希少放線菌群は特に有用な医薬品探索資源になると考え、本グループに着目した新規化合物の探索を行った。

2. 研究の目的

本研究では海洋深層水から分離頻度の低い希少放線菌と呼ばれるグループを選択的に分離し、生産する化合物を網羅的に解析、同定する。ここから多くの新規化合物を得ることができれば、医薬品探索源として新たな分野を開くとともに、深層水のように特殊な環境は陸上や海洋とは異なる放線菌を保持していることを示すことが可能である。以上のことを明らかにするため、本研究では 富山湾、静岡、沖縄をはじめとする、様々な深層水から希少放線菌を分離する。次に徹底的に生産する化合物を調べることで、生産物方面からの新規性・多様性を明らかにすることで、深層水希少放線菌の有用性を示すことを目指す。

3. 研究の方法

新型コロナウイルス感染症の影響により、申請当初に計画をしていた全国の海洋深層水取水施設へのサンプリングが困難な状況であった。そのため、当初予定していた研究計画を大きく変更し、製品評価基盤機構 (NITE) の微生物保存機関であるバイオテクノロジーセンター (NBRC) で提供されているスクリーニング用微生物 (RD 株) から、海洋深層水由来の放線菌株を検索した。このうち、特に研究報告例の無い北海道羅臼の海洋深層水から分離された 55 株について、詳細な生産物の解析を実施することで、新規化合物の探索を行うこととした。2 年目までに海洋深層水に存在する放線菌における有用希少放線菌として選定した *Rhodococcus* 属 6 株、さらには海洋深層水からの分離例が極めて少ない *Streptosporangium* 属 20 株を優先的に研究に用いた。これら 26 株は 3 種類の化合物生産用培地にて培養・抽出し、主に HPLC を用いた生産物の詳細な解析を行った。

4. 研究成果

解析の結果、構造解析に十分な量の化合物を生産していると判断した *Rhodococcus* 属の 2 株、*Streptosporangium* 属の 2 株について、目的化合物を各種クロマトグラフィーにて精製した。NMR、MS スペクトルによる構造解析の結果、*Rhodococcus* 属 2 株からそれぞれ 1 化合物、*Streptosporangium* 属 1 株から 2 化合物の合計 4 種類の新規化合物を得た。新規化合物の詳細な解析により平面構造を決定し、NMR によって立体構造の解析を進め、相対立体を決定した。決定

した相対立体をもとに計算化学によって ECD スペクトルおよびプロトンとカーボン NMR のケミカルシフトの計算値を算出して実測値との比較を行ったが、立体化学の決定には至らず、現在もパラメーターの最適化を検討して解析を継続している。*Rhodococcus* の生産する化合物は類縁構造の有機化合物がなかったため新規性の高い天然物であると判断し、炭素同位体標識による合成経路の解析を進めている。*Streptosporangium* の生産する新規化合物は、陸上由来の同属が生産する化合物に水酸基が追加された新規類縁体であった。類縁体には抗菌活性がないが、今回発見した新規類縁体にはグラム陽性菌への抗菌活性が確認された。また、類縁体同様に抗酸化作用を示したが、マウス白血病細胞に対する毒性は無いことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harunari Enjuro, Bando Maho, Igarashi Yasuhiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Rausuquinone, a non-glycosylated pluramycin-class antibiotic from Rhodococcus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 86 ~ 91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-021-00489-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 春成円十朗、坂東真帆、五十嵐康弘
2. 発表標題 羅臼海洋深層水から分離された希少放線菌の生産物解析
3. 学会等名 海洋深層水利用学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春成円十朗、坂東真帆、五十嵐康弘
2. 発表標題 Rhodococcusが生産する新規pluramycin類縁体
3. 学会等名 日本放線菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 春成円十朗
2. 発表標題 海洋深層水から分離された石油分解放線菌のアルカンによる カロテノイド生産の向上
3. 学会等名 海洋深層水利用学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------