

# Research for the Bioactive Constituents Isolated from a Marine-Derived Bacterium *Staphylococcus* sp.

(海洋細菌 *Staphylococcus* sp.由来の生物活性成分に関する研究)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻

Amgad Ibrahim Mansour Khedr

## [目的]

人類がこれまでに分離に成功している微生物は地球全体の 10% にも満たないと言われており、自然界には未だ数多くの未知微生物が棲息していると考えられている。とりわけ、海洋性微生物からは、その特異な棲息環境故に、未知微生物の発見ならびに、新規な有用物質生産微生物の発見等が期待できる。一方、近年、寄生虫、細菌類、真菌類、ウイルス、異常プリオン等の病原体の感染によって生じる様々な感染症が問題になっている。特に、医療現場では、細菌や真菌類、更には、各種の薬剤耐性菌による感染症が問題となっており、その克服薬の開発が急務となっている。

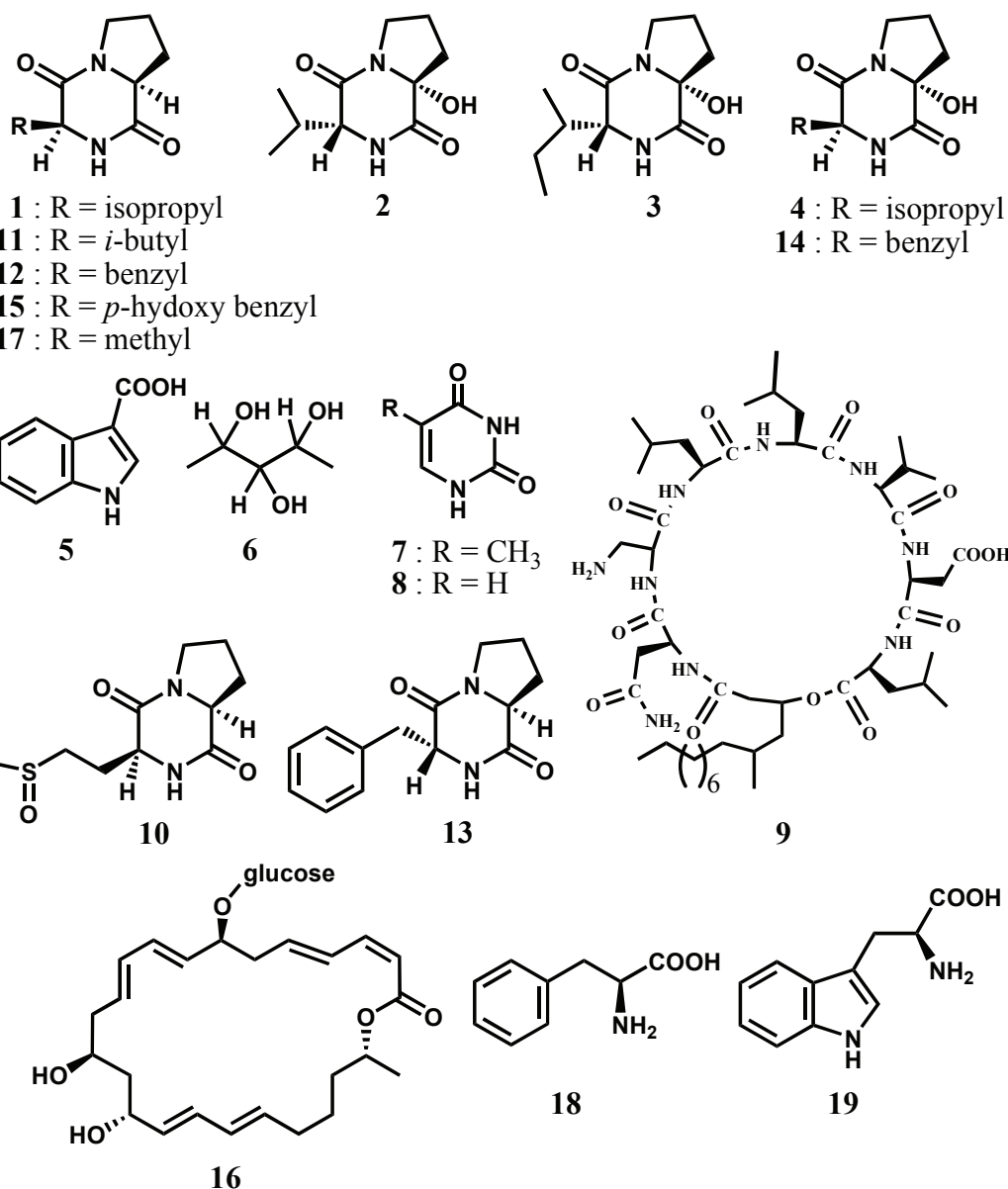
本研究では、病原細菌類、真菌類ならびに、多剤耐性菌類等の克服薬のシーズ化合物の探索を目指して、長崎県沿岸海域に生息する未利用・未開拓な海洋性菌類が生産する生物活性物質中に、抗病原菌物質を見出す事を目的として行った。

## [方法と結果]

長崎県沿岸海域で採集した、海底土壌ならびに各種海洋生物から約 360 種の菌類を分離した。次に、順次、少量培養を行い、培養液を処理して得られた抽出物について、抗病原菌活性試験を用いたスクリーニングを行った。その結果、*Staphylococcus* sp. (No. P-100826-4-6) の培養液を処理して得られた粗抽出物が顕著な抗真菌活性を示すことを見出し、その活性成分の検索を試みた。活性成分の分離には、細菌を培養後、培養液を酢酸エチルで抽出して、酢酸エチル粗抽出物を得た。一方、水層については、Diaion HP-20 を用いたカラムクロマトグラフィーを行うことによって、60% MeOH、100% MeOH、acetone 溶出画分を得た。このうち、抗真菌活性を示した酢酸エチル粗抽出物ならびに 100% MeOH 溶出画分について、Sephadex LH-20 を用いたゲル濾過、順相ならびに逆相カラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、最後に HPLC を用いて精製することによって活性成分を単離した。その結果、酢酸エチル抽出物から、ジケトピペラジン誘導体 **1** ~ **4**、indole-3-carboxylic acid (**5**)、1,3-dideoxy-3-C-methyl arabinitol (**6**)、thymine (**7**)、uracil (**8**) および、環状デブシペプチド **9** を得ることができた。100% MeOH 溶出画分からは、ジケトピペラジン誘導体 **10** ~ **15** 並びにマクロラクトン **16** を得ることができた。更に、60% MeOH 溶出画分からは、ケトピペラジン誘導体 **17**、phenyl alanine **18** と tryptophane **19** をそれぞれ単離することができた。

各成分の化学構造については、各種スペクトル ( $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、

HSQC、HMBC、NOESY、IR、HRFAB-MS) データ等の解析により、それぞれの解明を行った。このうち、**3**、**4**、**9**、**10**、は新規化合物であった。さらに、**3**、**4**を除く化合物について、ディスク拡散法を用いて、グラム陽性細菌の *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* と *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*、グラム陰性細菌の *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*、*Vivrio parahaemolyticus*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、真菌の *Schizophyllum commune*、*Aspergillus niger*、*Penicillium crustosum*、*Candida albicans*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Trichophyton concentricum*、の計 12 種の微生物に対する抗菌活性を検討した。その結果、**5**~**9** 及び、**14**~**16** は *S. aureus* subsp. *aureus*、*E. coli* 並びに *S. commune* に対して、また、**10** は *S. commune* 並びに *A. niger*、*P. crustosum* に対して顕著な活性を示すことが明らかになった (Table 1)。



**Table 1. Antimicrobial activities of compounds 1, 2, 5 ~ 19**

Microbial Strains	Compounds																		
	1	2	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
<b>Gram positive bacteria:</b>																			
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	—	—	±	±	±	±	±	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—		
<b>Gram negative bacteria:</b>																			
<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens aureus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Vivrio parahaemolyticus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Escherichia coli</i>	—	—	±	±	±	±	±	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<b>Fungi:</b>																			
<i>Schizophyllum commune</i>	—	—	±	±	±	±	±	++	—	—	—	+	+	+	—	—	—		
<i>Aspergillus niger</i>	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Penicillium crustosum</i>	—	—	—	—	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
<i>Trichophyton concentricum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

at the concentration of 125 µg/disc

Inhibition circle: — ; < 8 mm, ± ; 8 mm, + ; < 8mm ~ < 10 mm, ++ ; ≥ 10 mm

[結論]

長崎県沿岸海域に生息する海洋微生物に由来する二次代謝物の成分検索を行った結果、4種の新規化合物を含む計19種の化合物を単離し、その構造および生物活性を明らかにすることができた。海洋微生物由来のジケトピペラジン誘導体類としては、抗腫瘍活性成分 leptosin 類が知られているが、化合物 1 ~ 4、10 ~ 15 及び 17 のような低分子化合物は稀である。その由来に興味を持たれる。また、9は環状デプシペプチドであり、自然環境下ではマイナーなアミノ酸である 2,3-ジアミノプロパン残基を含む化合物である。今後、抗真菌薬素材としての可能性が期待できる。

[基礎となった学術論文]

1. Amgad I. M. Khedr, Kouno I., Tanaka T., Yamada K.: New Diketopiperazine Derivatives from Culture Broth of *Staphylococcus* sp. Isolated from *Corallina officinalis* Lineaus. *Heterocycles*, **87(5)**, 1029-1037(2013).