

海洋微生物由来の生物活性成分に関する化学的研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 米澤 健

〔目的〕

地球上でも広大な面積を占める海洋には、地球上の全生物の 8 割とも言われる非常に多種多様な生物が生存していることが知られている。海洋生物の代謝産物は、その海水中という陸上と異なる生息環境により、陸上生物由来の化合物には見られないような化学構造をもった、多様な生物活性を示す新規化合物の発見が期待されているが、陸上生物の代謝産物に関する研究と比較すると海洋生物の代謝産物の研究は進んでいない。

本研究では、海洋生物由来の生物活性成分中に医薬素材となりうる成分を探索することを目的とし、長崎県沿岸海域に生息する海洋生物に注目して、その活性成分の検索を行うことを企画した。すなわち、抗菌活性および Brine shrimp 幼生に対する致死活性を指標にして、長崎県沿岸海域で採集した海洋生物の生物活性成分の検索を行った。

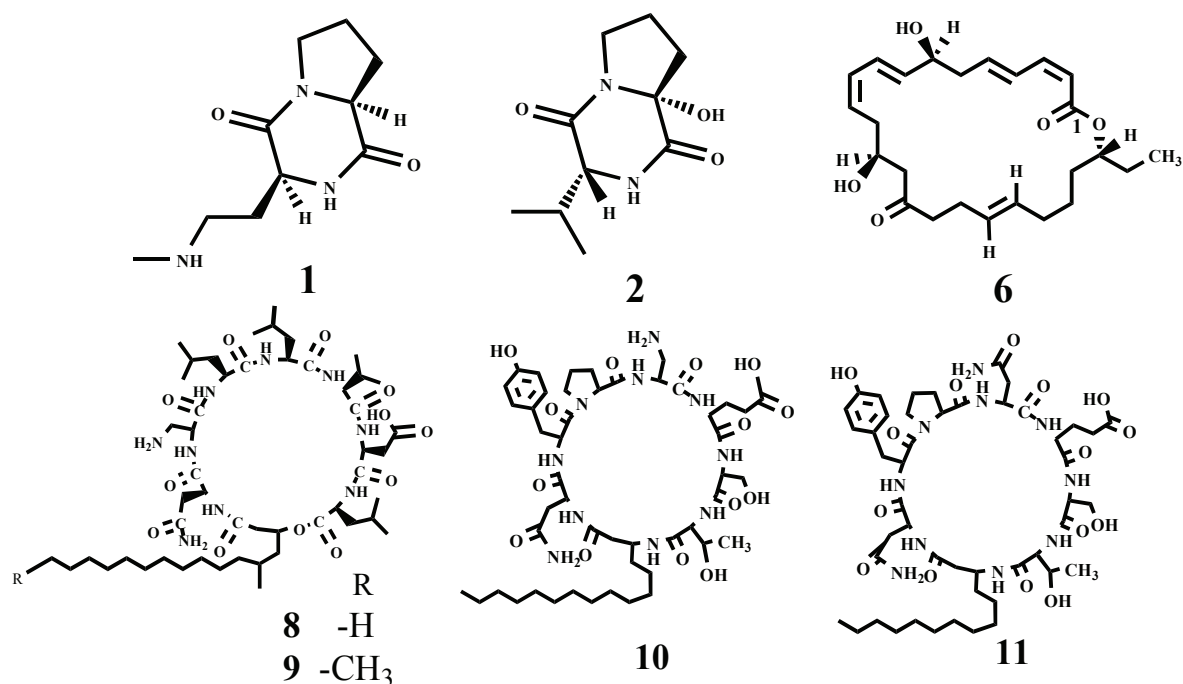
〔実験・結果〕

第一章

2007 年 7 月に、長崎県東出津町沿岸海域で採集した数種の海洋生物から 131 種類の細菌を分離、培養し、抗菌活性を示す細菌の検索を行った。このうち、ムラサキウニ (*Anthocidaris crassispina*) から分離した *Bacillus* sp. (P-0707-517) が、*Sizophyllum commune* および *Aspergillus niger* に対して顕著な生物活性を示したことから、P-0707-517 の大量培養を行い、これを酢酸エチルで分配し、酢酸エチル層を得た。一方、水層を DIAION HP-20 カラムにふすことによって、60%MeOH 溶出画分、100%MeOH 溶出画分、アセトン溶出画分を得、これらのフラクションに対して抗菌活性を指標とした活性成分の分離を試みた。すなわち、各々の画分に対し、Sephadex LH-20 を用いたゲル濾過や、順相および逆相カラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC による分離精製を繰り返し行った。得られた化合物の構造決定については、各種スペクトル ($^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HSQC、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、HMBC、IR、FAB-MS) データの解析によって行った。

その結果、新規ジケトピペラジン誘導体 **1**, **2** を含むジケトピペラジン誘導体 **1**~**5**、および新規 24 員環マクロラクトン **6** を含む 24 員環マクロラクトン **6**~**7**、新規環状デプシペプチドである **8**~**9**、新規環状ペプチドの **10**~**11**、植物ホルモンである **12** を単離し構造を解明することができた。さらに、**1**~**12** 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. *Aureus*、*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結果、**2** は *Aspergillus niger* に対し、**6** は *Bacillus subtilis subsp. Subtilis* と *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* に対し弱い抗菌活性を、**10**～**11** は広範囲のグラム陰性菌と真菌に対して顕著な抗菌活性を示すことが明らかとなった。



第二章

2007 年 7 月に長崎市東出津町沿岸海域で水深約 20 cm の海底土壌を採集し、平面寒天培地を用いて数種の糸状菌類を分離した。このうち Brine shrimp に対して顕著な致死活性を示した *Penicillium*.sp (No.P-0704-15-1-1) の大量培養を行った後、得られた菌糸体をアセトン抽出し、減圧乾燥によりアセトン除去した後に水-酢酸エチルで分配処理して酢酸エチル抽出物を得た。一方、水層を DIAION HP-20 カラムにふすことによって、60%MeOH 溶出画分、100%MeOH 溶出画分、アセトン溶出画分を得た。得られたフラクションのうち、酢酸エチル抽出物および MeOH 溶出画分について Brine shrimp 幼生に対する致死活性を指標とした活性成分の分離精製を第一章と同様の方法で行った。

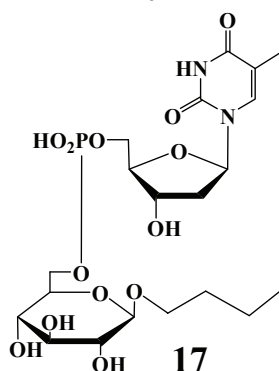
その結果、cerebroside (**13**) と Ergosterol-5, 8-peroxide (**14**)、6-O-Methyl cerevisterol (**15**)、cerevisterol (**16**) を単離同定することができた。さらに **14**～**15** は Brine shrimp 幼生に対し中程度の致死活性を、**16** は顕著な致死活性を示すことを明らかにすることができた。

第三章

2005 年 11 月に長崎市三和町沿岸海域で採集したオオパンカイメン

(*Spirastrella insignis*) より、細菌生育培地を用いて数種の細菌類を分離した。そのうちの 1 種の細菌 *Staphylococcus*.sp (No.05-1117-3-J-3) を 200 ml の種培養を行ったのち、液体培地を用いて、25 °C、21 日間振盪培養 (120rpm) を行った。続いて培養液を超音波処理後、濾過して得られた懸濁液を酢酸エチルで分配し、酢酸エチル層を得た。一方、水層を DIAION HP-20 カラムにふすことによって、水溶出画分、MeOH 溶出画分、acetone 溶出画分を得た。このうち Brine shrimp に対して顕著な致死活性を示した酢酸エチル抽出物および MeOH 溶出画分について Brine shrimp 幼生に対する致死活性を指標とした活性成分の分離精製を第一章と同様の方法で行った。

その結果、新規チミジンモノホスフェイト (**17**) と、RNA の微量塩基として知られる Inosine (**18**)、胆汁酸関連の化合物である taurodeoxycholic acid (**19**)、glycocholic acid (**20**)、taurocholic acid (**21**)、deoxycholic acid (**22**)、cholic acid (**23**) が各々得られ、また、**22** が Brine shrimp 幼生に対し特に顕著な致死活性を示すことを明らかとすることができた。



[結論]

長崎県沿岸海域に生息する 3 種の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、8 種の新規化合物を含む計 23 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。

得られた新規化合物のうち、**1**, **2** は共に異常アミノ酸を含むジケトピペラジン誘導体であり、その由来に興味を持たれる。また、**6** は 24 員環マクロラクトンであり、炭素鎖が通常のマクロラクトンと比較し 1 炭素分長い希少な構造である。さらに **8**, **9** はアルキル鎖長の異なる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。**10**, **11** は長鎖アルキル構造を含む化合物であり、顕著な抗菌活性が見られたことから、医薬素材としての応用に関心を持たれる。**17** はチミジンモノホスフェイトであり、抗ウイルス活性を持つスポンゴチミジンや抗白血病薬として知られるシタラビンとの構造類似性から、更なる活性の検討が期待される。

[基礎となった学術論文]

1. Ken Yonezawa., Koji Yamada, Isao Kouno, *Chem.Pharm.Bull.*, **59**, 106-108(2011).