

20周年記念号

深層水由来の海洋微生物の期待

The Future of Marine Microorganisms Inhabiting Deep Seawater

今田千秋¹・柴田雄次¹・山田勝久²

Chiaki IMADA, Yuji SHIBATA and Katsuhisa YAMADA

Abstract

The present research identifies a number of useful microorganisms inhabiting deep seawaters (DSW). The microorganisms were isolated from a bag filter used to remove detritus at a DSW pumping facility at Izu-Akazawa, Shizuoka Prefecture, Japan and identified by 16SrRNA analysis. A bacterial strain (No. 586) identified as *Pseudoalteromonas denitrificans* showed the highest ability of oxidative stress resistance (OSR). An OSR substance purified from culture supernatant was identified as Questiomycin A, in which only anticancer and antibacterial activities were known. An actinomycete strain (No. D77) identified as *Streptomyces fulvissimus* showed anticancer activity against B16 mouse melanoma cells. The results suggest the presence of novel anticancer substances in No. D77 although the standard strain of *S. fulvissimus* showed no anticancer activity.

Key Words: 海洋深層水, 酸化ストレス抵抗性物質, 抗癌物質, *Pseudoalteromonas denitrificans*, *Streptomyces fulvissimus*

1. 緒 言

近年、有用微生物の新たな探索源として海洋環境が注目され、盛んに研究が進められているが、未探索の領域も多く、海洋深層水（以下、DSW）もその1つである。DSWは様々な分野で応用されているが、DSWに生息する微生物はほとんど研究されていない。理由として、DSWの清浄性が示すように、微生物の存在量の少なさが考えられる。しかし、近年、DSW中にも未知種を含む多種多様な細菌叢の存在が示され（矢田ら、2003）、表層水（以下、SSW）と異なる細菌叢も明らかとなってきた（Tera-hara *et al.*, 2016）。このため、DSWには他の環境に見られない特異な微生物が生息し、DSW環境に適応して新規の生理活性物質を生産している可能性もある。本研究では、DSWを新たな有用微生物の分離源とし、酸化ストレス抵抗性物質（老化防止機能の

指標）を生産する海洋細菌と抗癌物質を生産する放線菌の分離を試み、それらの諸性状を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

国内最深度（800 m）のDSW取水施設である伊豆赤沢のDSWから放線菌の分離を行うため、DSWの懸濁物除去に用いられるバッグフィルター（BF、孔径0.5 μm）を分離源とした。BFの底部を無菌的に2×2 cm角に切り取ったのち滅菌DSWに懸濁した。これをISP-4寒天培地、HV寒天培地およびZoBell 2216E培地に塗抹し、27°Cで4週間培養した。得られた海洋細菌分離株は、液体培地で回転振とう培養後、遠心分離して得られた上清をDPPH法と正常ヒト皮膚由来線維芽細胞による細胞試験で酸化ストレス抵抗性を評価した。得られた有望株の培養上清が

¹東京海洋大学（〒108-8477 東京都港区港南4-5-7）

²株式会社ディーエイチシー（〒106-8571 東京都港区南麻布2-7-1）

ら各種クロマトグラフィーにより酸化ストレス抵抗性物質を単離・精製し、各種機器分析によって化学構造を解析した。

また、同様に分離した放線菌について、B16マウスメラノーマ細胞の細胞活性を指標としたMTT還元法(山田ら, 2007)で抗癌活性を測定し、最も活性が高かった有望株について16S rRNA遺伝子の塩基配列解析から種の同定を行った。

3. 海洋細菌の生産する酸化ストレス抵抗性物質

DSWのBFから海洋細菌約900株が分離された。これらをDSWで調製した液体培地で培養し、その上清をDPPH法で一次評価した後、線維芽細胞を用いて酸化ストレス抵抗性を評価したところ、最も高い抵抗性を示す株(No. 586株と命名)が得られた。この株の16S rRNA遺伝子の塩基配列を解析した結果、*Pseudoalteromonas denitrifican*と98.07%の相同性を示した。本株の培養液上清から有効物質を単離・精製し、構造解析を行った結果、Fig. 1に示したよ

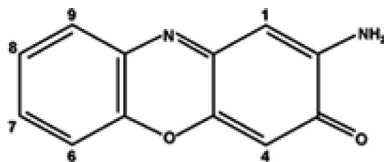


Fig. 1 The chemical structure of Questioniomycin A

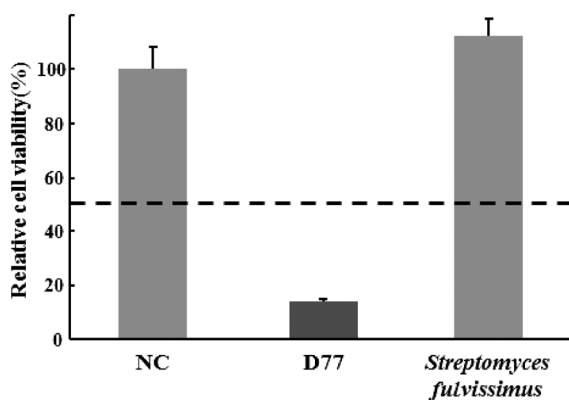


Fig. 2 The effect of culture supernatant of strain No. D77 and *Streptomyces fulvissimus* on B16 mouse melanoma cells. Negative control (NC) is supernatant of non-inoculation ISP-2 liquid medium. The error bar indicates the standard deviation among six experiments.

うにQuestioniomycin A (Igarashi *et al.* 1998)と同一構造であることが判明した。

Questioniomycin Aは放線菌や真菌、細菌などから分離されており、抗菌活性や癌細胞への細胞毒性などの活性が報告されている。しかし、正常細胞に対する酸化ストレス抵抗性を有することについては全く知られていない。本研究で新たに確認されたQuestioniomycin Aの酸化ストレス抵抗性は産業利用が期待される。特に、新規酸化ストレス抵抗性物質に関する新たな知見が得られる可能性を考慮すると、今後の研究に期待が持たれる。

4. 放線菌の生産する抗癌物質

DSWのBFから約100株の放線菌を分離した。このうち、D77株と命名した株にのみB16細胞に対する抗癌活性が認められた。本株の16S rRNA遺伝子を解析した結果、*Streptomyces fulvissimus*と同定された。しかし、D77株と*S. fulvissimus*の標準菌株と抗癌活性を比較した結果、D77株にのみ抗癌活性が確認された(Fig. 2)。本株は糖の資化性においても標準株と相違が見られた。これらの性状の違いは、分離された環境に起因すると推察された。なお、*S. fulvissimus*では抗菌物質バリノマイシンの生産(Ristow *et al.*, 1974)が報告されているが、抗癌物質の分離報告は見られない。これらの結果から、D77株が新規の抗癌活性物質を生産している可能性が示唆された。現在、本株から有効物質を単離・精製中である。DSWからの有用微生物探索研究はようやく緒に就いたばかりで、今後ますます有用性の高い生理活性物質が単離され、諸産業に応用されることを祈念したい。

参考文献

- Igarashi, Y., K. Takagi, T. Kajiura and T. Furumai (1998) Gluosylquestioniomycin, a novel antibiotic from *Micromonospora* sp. TP-A0184: fermentation, isolation, structure determination, synthesis and biological activities. *J. Antibiotics*, 51, 915-920.
- Ristow, H., J. Salnikow and H. Kleinkauf (1974) Biosynthesis of valinomycin. *FEBS LET.*, 42, 127-130.
- Terahara, T., K. Yamada, J. Nakayama, Y. Igarashi, T.

- Kobayashi and C. Imada (2016) Bacterial community structure of deep-sea water investigated by molecular biological techniques. *Gene*, 576, 696–700.
- 山田勝久・今田千秋・土屋孝弘・宮本勝城・辻坊裕・小林武志・濱田(佐藤)奈保子(2007) 海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究. *日本化粧品技術者会誌*, 41, 254–261.
- 矢田修一・大場雅行・榎本恵一(2003) 室戸海洋深層水中の細菌種の分析. *海洋深層水研究*, 4, 47–56.