

富山湾海洋深層水からの放線菌分離と生産物解析

Isolation and metabolites analysis of actinomycetes from deep-sea water
in Toyama Bay

春成円十朗¹・萩野景子¹・金木紗恵¹・熊谷敬之²・五十嵐康弘¹

Enjuro HARUNARI, Keiko OGINO, Sae KANAOKI, Takayuki KUMAGAI, and Yasuhiro IGARASHI

Abstract

Various bioactive compounds have been discovered from actinomycetes; however, it is difficult to obtain a new compound in recent years. Therefore, a new group of actinomycetes is required which has a different potential for secondary metabolite production. In this study, we report the isolation and metabolites of actinomycetes in Toyama Bay. The results of genus-level identification, 110 actinomycetes isolates were identified as *Streptomyces* (88 strains), *Micromonospora* (19 strains), *Actinomadura* (2 strains), and *Nocardioopsis* (1 strain). The metabolite analysis by the HPLC-UV spectra database showed that 41% of strains produced unknown UV compounds. The selected strain produced 5 new compounds. These results indicated that deep-sea water is a useful isolation source of actinomycetes for drug discovery.

Key Words: actinomycetes, deep-sea water, Toyama Bay, secondary metabolite

要 旨

放線菌からは様々な医薬品のリード化合物が発見されてきたが、近年では新規化合物を得ることが困難となっている。本研究では、異なる二次代謝能力を有する放線菌群の発見を目的として、海洋深層水中から放線菌を分離し、生産物を網羅的に解析することで、医薬品探索源としての有用性を評価した。富山県入善沖の海洋深層水から分離された110株の放線菌を属レベルで同定したところ、*Streptomyces*属88株、*Micromonospora*属19株、*Actinomadura*属2株、*Nocardioopsis*属1株であった。これらの生産物をHPLC-UVスペクトルデータベースを用いて解析した結果、41%がデータベースに一致しない未知化合物を生産していた。このうち5株を選定して主要な生産物の構造解析を行った結果、5つの新規化合物が確認された。以上の結果から、海洋深層水中には陸上とは異なる二次代謝能力を有する放線菌群が存在しており、医薬品の探索源として有望であると考えられる。

キーワード: 放線菌, 海洋深層水, 二次代謝物, 富山湾

1. 緒 言

放線菌は土壌の優占細菌として難分解性有機化合物の循環に寄与しているほか、有用物質の生産菌として産業上重要なグループである。ワクスマン博士

が*Streptomyces*属から抗結核薬となるストレプトマイシンを発見したのを契機に、陸上の放線菌からは抗生物質や抗がん剤をはじめとする様々な医薬品が発見されてきた(図1)。これまでに発見された抗生物質は1万を超えるが、このうち半数以上は放線菌

¹ 富山県立大学 生物・医薬品工学研究センター (〒939-0398 富山県射水市黒河5180)

² 富山県入善漁業協同組合 (〒939-0667 富山県下新川郡入善町芦崎338)

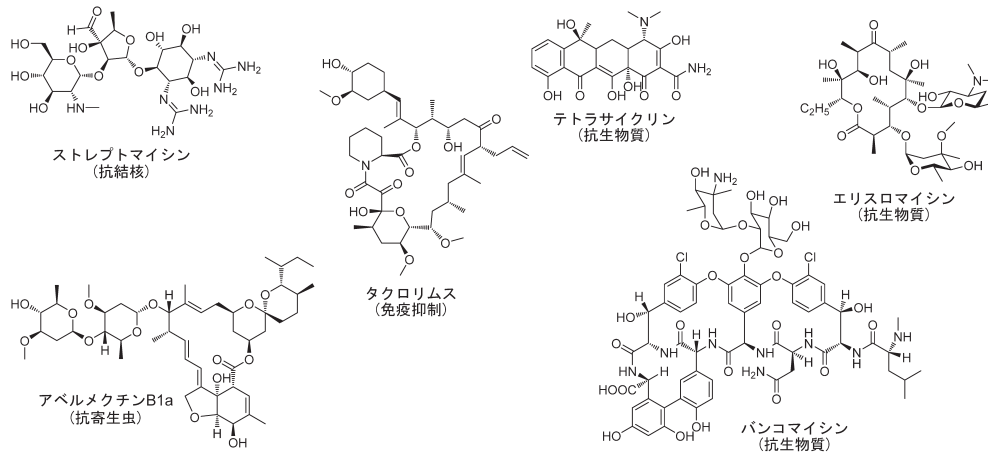


図1 陸上放線菌由来の医薬品

由来の化合物であり、実用化された微生物由来医薬品では約7割を占める (Bérdy, 2005)。しかしながら、免疫抑制剤タクロリムスの発見があった1984年以降は新薬となる化合物は見つかっていない。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として行われてきた。

海洋から分離される放線菌は陸上放線菌と形態的・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ていた。しかし、2001年に生育に海水を必要とする *Salinispora* 属が海洋堆積物から分離され、陸上からは報告の無い様々な新規化合物が発見された。なかでも抗がん剤サリニスポラマイドA (Feling *et al.*, 2003) のように臨床試験に進む有望な化合物も得られたことから、海洋放線菌の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た。また、海洋から分離した2000株の系統解析により、陸上の放線菌とは異なる13グループの存在が示されている (Fenical and Jensen, 2006)。系統解析に用いられた短い遺伝子領域でも異なるクラスターを形成することは、ゲノム全体ではさらに大きな違いがあると推測され、新たな二次代謝能力に期待がもたれる。このように陸上与異なる環境からは二次代謝能力の異なる放線菌が得られると考えられるが、海洋深層水放線菌の網羅的な研究は、当研究室と東京海洋大学の今田らのグループ以外には行われていない。

当研究室では1995年～2005年にかけて、富山湾海洋深層水の医薬分野への利用を目指して、放線

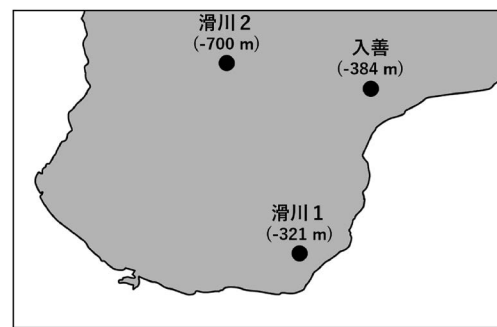


図2 ろ過フィルターからの懸濁物の回収

菌の分離と有用物質の探索を行ってきた。滑川市沖合の水深321 m (滑川1) と700 m (滑川2) の海洋深層水 (図2) をそれぞれ1回、5回採水し、10 Lをメンブランフィルター (直径90 mm, 孔径0.2 μm) を用いてろ過・濃縮して放線菌を分離した。その結果、水深321 mから38株 (*Streptomyces* 属12株, *Micromonospora* 属24株, 未同定2株)、水深700 mからは4回で39株 (*Micromonospora* 属2株, 未同定37株) の放線菌を取得している。水深321 mから分離された放線菌は半数以上が抗生物質を生産しており、その割合は富山県土壌から分離された放線菌と比較して約2倍と高かった。抗生物質を生産した放線菌から10株を選定して生産物の解析を行った結果、新規化合物である arisostatin (Furumai *et al.*, 2000a), kosinostatin (Furumai *et al.*, 2002a), watasemycin (Sasaki *et al.*, 2002), TPU-0037 (Furumai *et al.*, 2002b) (図3)、既知化合物の polyene antibiotics, TAN1323D, thiazostatin, aerugine, antimycin A1, tetrocarcin A, actinomycin X2, rosamicin, quinocycline の生産が確認された。水深700 mから分

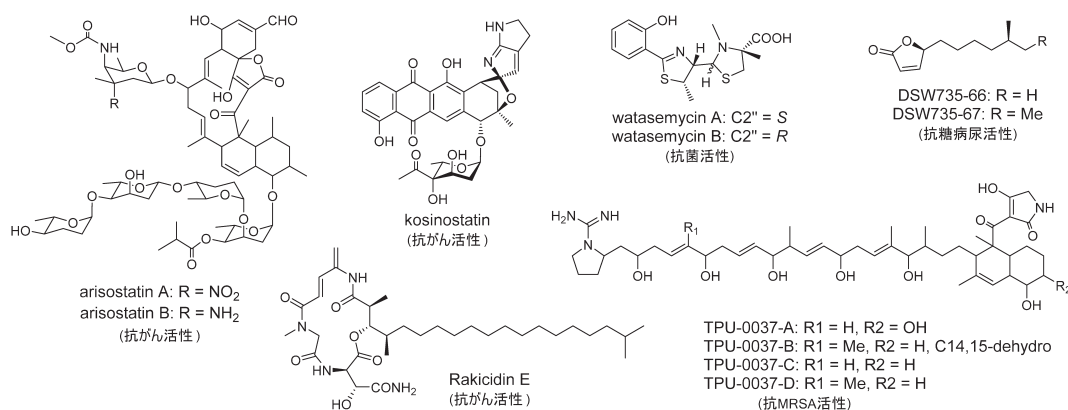


図3 滑川海洋深層水の放線菌が生産する新規生物活性物質



図4 ろ過フィルターからの懸濁物の回収

離された放線菌は、生物活性試験とHPLCによる生産物解析によって候補株を選定した。選定株から発見された新規化合物は、rakicidin E (Oku *et al.*, 2014) とブチロラクトン (Igarashi *et al.*, 2015) (図3)、既知化合物はtrichostatin, manumycin, nonactin, bohema-mine, chrymutin, rakicidin A, rakicidin B, BU-4664 L, butyrolactol, borrelidin, collismycinであった。

以上のように、海洋深層水から分離される放線菌は、陸上放線菌と同様の化合物を生産する一方で、新規化合物を生産しており、医薬品探索源として有用であると考えられる。しかし、先行研究では放線菌の分離数が少なかったため、種類や生産物において陸上放線菌との明確な違いを示すことはできなかった。そのため本研究では、解析に十分な数の放線菌を分離し、属レベルでの同定と生産物の網羅的な解析を行うことで、陸上放線菌との違いを明らかにするとともに、医薬品探索源としての有用性を評価することを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 海洋深層水のろ過・濃縮

放線菌分離に用いた海洋深層水のろ過フィルターは、富山県入善町にある海洋深層水活用施設から2016年11月に入手した。本施設では水深384 mから汲み上げられた海洋深層水を、プランクトンネットとパイプ型フィルター(シリウスYSP-50P, 孔径50 μm, 65×250 mm, ワイエスフィルタージャパン株式会社)によって濾過した後に各種事業に供給している。本研究では、使用済みのパイプ型フィルターを放線菌の分離に用いた(図4)。入手時の海洋深層水の総ろ過量は約60万Lで、前述のメンブランフィルター法の約3万倍をろ過・濃縮している。

2.2 放線菌の分離

入手したフィルターは水中で保存し、6時間以内に放線菌の分離に用いた。フィルターは1 cm角に裁断して滅菌海洋深層水中で攪拌することで、ろ過された懸濁物を脱離させた。懸濁物は遠心分離によって海水を除去し、等量の生理食塩水を加えて分

離用の試料とした(図4)。放線菌の選択分離培地はISP 4寒天培地(Difco)にナリジクス酸(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とシクロヘキシミド(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を添加して作成し、培地表面に試料100 μL を塗抹した。これまでの研究から、海や海洋深層水から分離される放線菌の基本的性質は陸上放線菌と共通であり、至適温度は28 $^{\circ}\text{C}$ 前後と予想された。一方で、深層水に適応した場合は低温性を有していると推測されるが、4~10 $^{\circ}\text{C}$ の分離条件では放線菌が得られなかった。そのため、本分離では至適温度が低温側にシフトしているグループの存在も考慮して、23 $^{\circ}\text{C}$ で最長8週間培養した。培地上に出現したコロニーのうち、形態から放線菌と判断したものを新しい培地に植菌し、純粹分離により単一の放線菌株を得た。

2.3 放線菌の系統解析

分離した放線菌は属レベルの同定を行うため、菌体を鋳型DNAとするコロニーPCRにより16S rRNA遺伝子領域を増幅してシーケンス解析を行った。PCR反応液にはKOD FX Neo(東洋紡)とユニバーサルプライマー(27F, 1492R)を用いて総量を25 μL とした。PCR反応は98 $^{\circ}\text{C}$ (2分間)の初期熱変性を行い、その後98 $^{\circ}\text{C}$ (10秒), 55 $^{\circ}\text{C}$ (30秒), 68 $^{\circ}\text{C}$ (1分間)の3ステップを45サイクル行い、最後に10分間の伸長反応を行った。得られたPCR産物はアガロース電気泳動により、目的とする16S rRNA遺伝子領域の増幅を確認した後に、Gel/PCRエクストラクションキット(日本ジェネティクス)によって精製し、ユーロフィンジェノミクスのDNAシーケンス解析により500-700 bpの塩基配列を取得した。得られた各株の配列はデータベース検索により属レベルの同定を行った。

2.4 放線菌の生産物解析

分離した放線菌が生産する化合物を解析するため、液体培地による生産培養を行った。はじめにV-22液体培地(可溶性でんぷん1.0%, グルコース0.5%, NZ-ケイス0.3%, 酵母エキス0.2%, トリプトン0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCO_3 0.3%, pH 7.0)で3日間の前培養(200 rpm, 30 $^{\circ}\text{C}$)を行い、

その後3種類の化合物生産用培地A-3M(可溶性でんぷん2.0%, glycerol 2.0%, グルコース0.5%, ファルマメディア1.5%, 酵母エキス0.3%, ダイイオンHP-20 1.0%, pH 7.0), A-11M(グルコース0.2%, 可溶性でんぷん2.5%, 酵母エキス0.5%, ポリペプトン0.5%, NZ-アミン0.5%, CaCO_3 0.3%, ダイイオンHP-20 1.0%), A-16(グルコース2.0%, ファルマメディア1.0%, CaCO_3 0.5%, ダイイオンHP-20 1.0%, pH 7.0)で6日間培養(200 rpm, 30 $^{\circ}\text{C}$)した。培養後に等量のBuOHによって抽出・濃縮乾固し、DMSOに溶解させて逆相HPLC-DADシステム(LCシステム: アジレント1100シリーズ, カラム: ナカライテスクCOSMOSIL 3C₁₈-AR-II 4.6 \times 100 mm, 溶媒: MeCN/0.1% HCOOH, 流速: 1.2 mL)によって分析した。得られた生産物ピークのUVスペクトルを、当研究室で構築しているHPLC-UVスペクトルデータベースと照合して既知化合物を排除し、新規の化学構造である可能性が高い化合物(以降、未知化合物とする)の選別を行った。放線菌において生産報告が多く、既知化合物である可能性が高いポリエンやインドール系化合物、UVスペクトルに特徴が無い脂肪酸やペプチド系化合物は基本的に既知化合物として除外した。

2.5 未知化合物生産株の生物活性

未知化合物を生産していた45株に対して、はじめにマウスメラノーマB16細胞に対する毒性およびMRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌, 使用株名: 110)に対する抗菌試験を行った。生産物解析に用いた培養抽出物のDMSO溶解物を用いて、B16細胞への毒性は山田ら(2007)の方法で、MRSAに対する活性はTrangら(2011)の方法で測定した。

2.6 放線菌の生産物解析

選定した株の生産物を解析するため、はじめに化合物生産に最適な培地で2Lの液体培養を行った。培養液中の目的化合物はBuOHによって抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3 :MeOH=1:0, 20:1, 10:1, 4:1, 2:1, 1:1, 0:1), フラッシュODSカラムクロマトグラフィー(MeCN:0.1% HCOOH = 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, MeOH)による分

画, 分取HPLCによる単離・精製を行い, NMR (核磁気共鳴) および質量分析によって化学構造の解析を行った。

3. 結果

3.1 放線菌の系統解析

寒天培地上に出現した放線菌様コロニーのうち, 形態が異なるものを優先して合計138株を単離した。このうち110株について16S rRNA塩基配列に基づく同定を行った結果, *Streptomyces*属88株, *Micromonospora*属19株, *Actinomadura*属2株, *Nocardiopsis*属1株であった。

3.2 放線菌の生産物解析

同定した110株の生産物を解析した結果, 未知化合物が確認されたのは45株, 既知化合物のみ確認されたのは47株, 未生産は18株であった。既知化合物のうち, HPLCの溶出時間とUVスペクトルを指標としたデータベース解析により23化合物が同定された(図5: 脂肪酸, インドール, ポリエン等は簡易同定のため, 一部を除いて図に示していない)。このうち先行研究で生産が確認されていたのはthiazostatin A, rakicidin A, BU-4664 Lの3化合物であった。

3.3 未知化合物の精製と構造解析

未知化合物を生産していた45株のうち, 強力な生物活性を示したN11-24株(抗MRSA活性), N11-26株(細胞毒性), N11-34株(抗MRSA活性)の3株と, 多様な生産物が確認されたN11-115株, N11-123株の2株を選定して主要な生産物を単離・精製, 構造解析を行った。その結果, 18の既知化合物と5つの新規化合物の生産を確認した(図6, 7: 重量は培養液1Lあたりの収量)。新規化合物が確認されたのは*Streptomyces* N11-34株で, alchivemycin C, D, Eおよびnyuzenamide A, B (Karim *et al.*, 2021)を生産していた(図7)。また, これらの新規化合物は抗MRSA活性を示さなかった。

4. 考察

はじめに分離された放線菌の種類から, 富山湾における放線菌の多様性を考察する。次に, 確認された生産物から, 医薬品探索源としての有用性を評価する。

海洋深層水中の放線菌をろ過・濃縮するフィルターを, メンブランフィルターからパイプ型フィルターに変更することで, 多数の放線菌の効率的な分離に成功し, これまで富山湾からは分離されていない希少放線菌である*Actinomadura*属や*Nocardiopsis*属の存在を明らかにした。分離された放線菌の割合

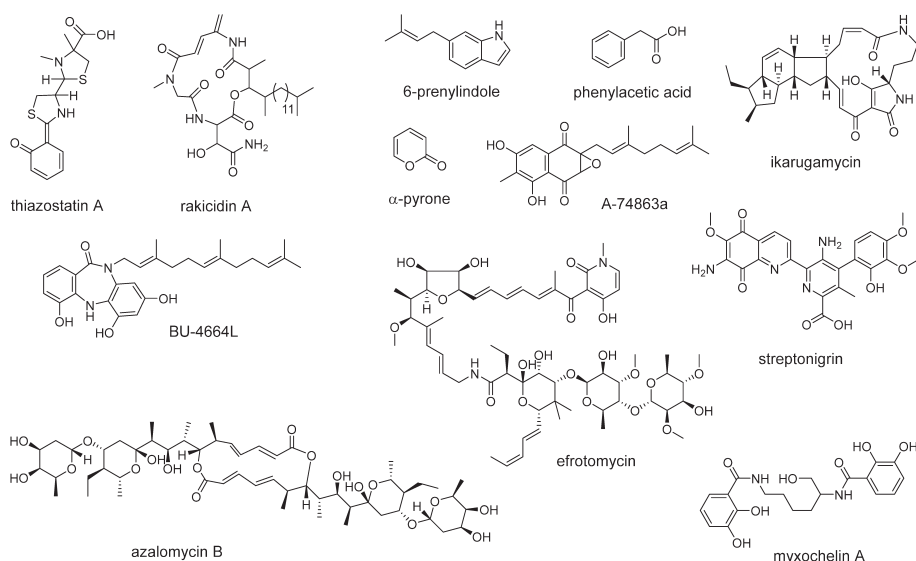
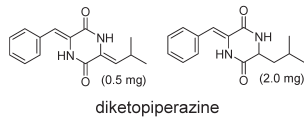
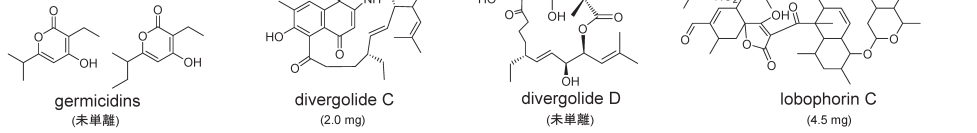


図5 HPLC-UV解析により確認された既知化合物

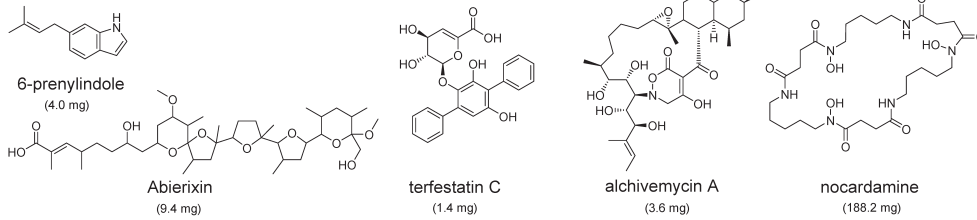
N11-24株



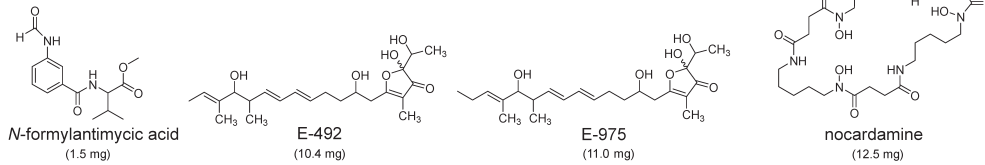
N11-26株



N11-34株



N11-115株



N11-123株

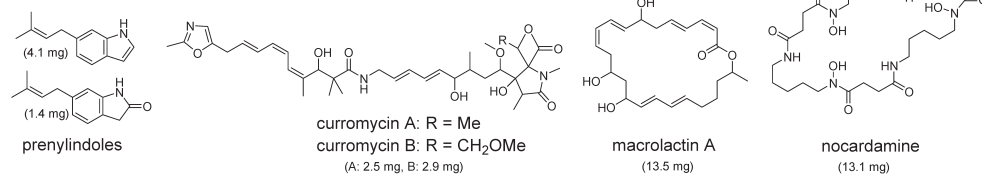
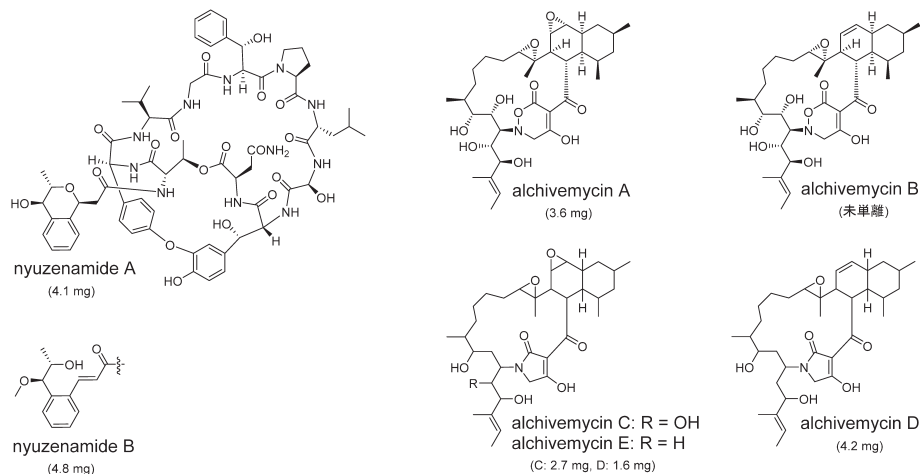


図6 構造解析により確認された既知化合物

図7 *Streptomyces* N11-34株が生産する新規化合物

は *Streptomyces* 属 (80%) が最も多く、次に *Micromonospora* 属 (17%) であり、これら2属で97%を占めていた。滑川から分離された放線菌は *Streptomyces* 属 (37%), *Micromonospora* 属 (63%) であったことか

ら、富山湾ではこの2属が優占していることがわかる。一方で、入善と滑川では2属間の割合が逆転しており、同じ富山湾であっても採水点が異なれば、存在する放線菌が異なると考えられる。では、海域

が大きく異なる場合はどうだろうか。

東京海洋大学の今田らは、伊豆赤沢の海洋深層水(水深800 m)から *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Nocardia* の6属を分離しており(山田ら, 2018), 富山湾と比較して多様性が高いことがわかる。生物は赤道に近いほど多様性が高くなるが、放線菌では有意差は認められていない(Hayakawa *et al.*, 2010; 早川, 2016)。一方で、分離される種は気候により大きく異なっており、北海道と沖縄で重複する種は21.6%, 日本と熱帯のミャンマーでは22.3%と低い(同論文)。海洋深層水は北海道や富山では0~2℃と低いことに対して、太平洋側では9℃前後と高いため、両者では放線菌の種類が異なると推測される。特に富山湾の海洋深層水は閉鎖的な日本海固有水であることから、他の海域とは存在する放線菌が異なる可能性が高い。今後は環境の異なる海域の海洋深層水から分離を行うことで、海域と分離される放線菌の関係について明らかにしたい。

次に、確認された生産物から、医薬品探索源としての有用性を評価する。入善から分離された110株の生産物を、当研究室で構築しているHPLC-UVスペクトルデータベースを用いて解析した結果、41%がデータベースに一致しない未知化合物を生産していた。データベースには当研究室がこれまでに扱ってきた陸上や海洋由来の放線菌生産物をはじめ、2000以上の化合物が登録されている。そのため、今回分離された放線菌の約40%は、これまで扱ってきた放線菌とは種類や二次代謝能が異なると考えられる。

本研究の生産物解析における最大の成果は、*Streptomyces* N11-34株が生産する新規化合物nuzenamideとalchivemycinの発見である。特にnuzenamideの二環性ペプチド構造は新規性が高く、これまで類似した化合物は報告されていない(Karim *et al.*, 2021)。Alchivemycin AとBは、当研究室が陸上の*Streptomyces*属から発見した化合物だが、これまで他の株からの生産報告は無い。Alchivemycinの生合成遺伝子クラスターをデータベースで検索したところ、保有するのはごく一部の*Streptomyces*属に限られており、遺伝子的にも希少な化合物である。本株からは強力な抗

MRSA活性を示す化合物も得られており、構造解析の情報から新規化合物と推定している。入善の放線菌から得られた既知化合物のうち、diketopiperazin類, divergolide類, lobophorin Cは海洋放線菌から発見された化合物で、これまで陸上放線菌からの生産報告は無い。これらの事実は環境に特有の放線菌やその二次代謝遺伝子の存在を示唆するものであり、海洋深層水は放線菌の分離源として有用であると考えられる。

富山以外の海洋深層水では、今田らが伊豆赤沢や久米島の海洋深層水から分離した放線菌から有用物質の探索を行い、伊豆赤沢の*Nonomuraea*属から新規抗がん物質akazamicinを発見している(Yang *et al.*, 2019a)。当研究室でもこれらの株について生産物解析を行った結果、伊豆赤沢の*Micromonospora*属からakazaoxime(Igarashi *et al.*, 2021), *Actinomadura*属からnomimicin B, C(Zhang *et al.*, 2021)の生産を明らかにしている(図8)。

新規化合物を生産している放線菌は、これまで分離されている放線菌とは代謝系や遺伝子が異なると考えられるが、分類・同定に用いられる16S rRNA遺伝子による解析では、これらの検出は困難である。特に*Streptomyces*のように種数が多い属では、既知種との相同性が100%近い場合でも、保有する二次代謝遺伝子が大きく異なる可能性がある(Komaki *et al.*, 2018)。そのため、化合物探索における候補株の選定には一層の注意が必要であり、別の指標と併用すべきである。今回、新規化合物を生産していた*Streptomyces* N11-34株の既知種との相同性は99.9%であり、本遺伝子による選別を行っていた場合、除外されていた可能性が高い。一方で、本研究のよう

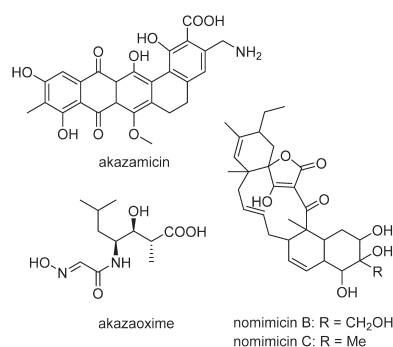


図8 伊豆赤沢放線菌が生産する新規化合物

に生産物を指標とした解析では、新規化合物の生産株を除外する可能性は低い。また、生産物の違いによって、本遺伝子では検出できない多様性を解析することも可能である。例えば今回の結果では、入善の放線菌から確認された化合物のうち、滑川の放線菌と重複していたのは僅かに3化合物であり、滑川と入善から分離された放線菌の組成は明らかに異なることがわかる。

本研究で発見された新規化合物や生産物の違いは、存在する放線菌群が他の環境とは異なることに起因すると考えられ、海洋深層水を反映した放線菌クラスターの存在を示唆するものである。今田らによる海洋深層水放線菌のメタゲノム解析は本考察を支持するもので、海域や水深で優占種が異なることや、これまで分離・培養されていない多くの「未知放線菌群 (uncultured actinobacteria)」の存在が示唆されている (Yoshida *et al.*, 2008; 寺原ら, 2013)。また、同グループは次世代シーケンサーにより、日本の7海域の海洋深層水中に存在する細菌を解析して、放線菌の多様性は表層水よりも深層水の方が高いことを示している (Yang *et al.*, 2019b)。海外ではアラビア海、地中海、バルト海の海洋深層水におけるメタゲノム解析から「未知放線菌」の存在が示唆されており (Fuchs *et al.*, 2005; Zaballos *et al.*, 2006; Labrenz *et al.*, 2007)、新たな二次代謝能力を有する放線菌の獲得が期待される。

本研究から、採水場所や海域によって海洋深層水に存在する放線菌の種類や生産物が異なることが示された。海洋深層水由来の放線菌からは、陸上や海洋の放線菌とは異なる、多くの新規化合物が発見されていることから、医薬品の探索源として有用であると評価できる。日本のように、北海道から沖縄まで様々な環境の海洋深層水にアクセスできる国は他に無く、重要な遺伝子資源として、今後も積極的に活用すべきである。

謝 辞

海洋深層水ろ過フィルターの取得には入善町キラキラ商工観光課、入善海洋深層水活用施設の皆様に

ご協力いただきました。また、細胞毒性試験では東京海洋大学の梁太熙博士ならびに今田千秋教授、MRSA 活性試験では国際医療福祉大学の竹内啓晃教授に測定をしていただきました。以上の皆様に深く御礼申し上げます。本研究の一部は科学研究費助成事業 (若手研究, 21K14794) により行われたものです。

参考文献

- Bérdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 58, 48–50.
- Feling, R. H., G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, and W. Fenical, (2003) Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42, 355–357.
- Fenical, W. and P. R. Jensen, (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.*, 12, 666–673.
- Fuchs, B. M., D. Woebken, M. V. Zubkov, P. Burkill and R. Amann, (2005) Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 39, 145–157.
- Furumai, T., K. Takagi, Y. Igarashi, N. Saito, and T. Oki, (2000) Arisostatins A and B, new members of tetrocarcin class of antibiotics from *Micromonospora* sp. TP-A0316. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, 53, 227–232.
- Furumai, T., Y. Igarashi, H. Higuchi, N. Saito, and T. Oki, (2002a) Kosinostatin, a quinocycline antibiotic with antitumor activity from *Micromonospora* sp. TP-A0468. *J. Antibiot.*, 55, 128–133.
- Furumai, T., K. Eto, T. Sasaki, H. Higuchi, H. Onaka, N. Saito, T. Fujita, H. Naoki, and Y. Igarashi, (2002b) TPU-0037-A, B, C and D, novel lydicamycin congeners with anti-MRSA activity from *Streptomyces platensis* TP-A0598. *J. Antibiot.*, 55, 873–880.
- Hayakawa, M., H. Yamamura, Y. Sakuraki, Y. Ishida, M. Hamada, M. Otoguro and T. Tamura, (2010) Diversity analysis of Actinomycetes assemblages isolated from soils in cool-temperate and subtropical areas of Japan. *Actinomycetologica*, 24, 1–11.
- 早川正幸 (2016) 熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築. *IFO Res. Commun.*, 30, 21–38.
- Igarashi, Y., M. Ikeda, S. Miyanaga, H. Kasai, Y. Shizuri, and

- N. Matsuura, (2015) Two butenolides with PPAR α agonistic activity from a marine-derived *Streptomyces*. J. Antibiot. 68, 345–347.
- Igarashi, Y., Y. Matsuyuki, M. Yamada, N. Fujihara, E. Harunari, N. Oku, M. R. U. Karim, T. Yang, K. Yamada, C. Imada, K. Fukaya, and D. Urabe, (2021) Structure determination, biosynthetic origin, and total synthesis of akazaoxime, an enteromycin-class metabolite from a marine-derived actinomycete of the genus *Micromonospora*. J. Org. Chem., 86, 6528–6537.
- Karim, M. R. U., Y. In, T. Zhou, E. Harunari, N. Oku, and Y. Igarashi (2021) Nyuzenamides A and B: Bicyclic Peptides with Antifungal and Cytotoxic Activity from a Marine-Derived *Streptomyces* sp. Org. Lett., 23, 2109–2113.
- Komaki, H., K. Sakurai, A. Hosoyama, A. Kimura, Y. Igarashi, and T. Tamura, (2018) Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene clusters among taxonomically close *Streptomyces* strains. Sci. Rep., 8, 1–11.
- Labrenz, M., G. Jost, and K. Jürgens, (2007) Distribution of abundant prokaryotic organisms in the water column of the central Baltic Sea with an oxic–anoxic interface. Aquat. Microb. Ecol., 46, 177–190.
- Oku, N., S., Matoba, Y. M. Yamazaki, R. Shimasaki, S. Miyana, and Y. Igarashi, (2014) Complete stereochemistry and preliminary structure-activity relationship of rakicidin A, a hypoxia-selective cytotoxin from *Micromonospora* sp. J. Nat. Prod., 77, 2561–2565.
- Sasaki, O., Y. Igarashi, N. Saito, and T. Furumai, (2002) Watasemycins A and B, new antibiotics produced by *Streptomyces* sp. TP-A0597. J. Antibiot., 55, 249–255.
- Trang, V. T., H. Takeuchi, H. Kudo, S. Katsuno, T. Shimamura, T. Kashiwagi, V. Son, T. Sugiura, and H. Ukedo, (2011). In vitro antimicrobial activity of aminoreductone against the pathogenic bacteria methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J. Agric. Food Chem. 59, 8953–60.
- Sasaki, O., Y. Igarashi, N. Saito, and T. Furumai, (2002) Watasemycins A and B, new antibiotics produced by *Streptomyces* sp. TP-A0597. J. Antibiot., 55, 249–255.
- 寺原 猛・加藤 朋・山田 勝久・小林 武志・今田 千秋 (2013) DGGE法による海洋深層水中の放線菌の群集組成解明. 海洋深層水研究, 1, 11–18.
- 山田 勝久・今田 千秋・土屋 孝弘・宮本 勝城・辻坊 裕・小林 武志・浜田 (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.
- 山田 将之・梁 太熙・山田 勝久・今田 千秋・春成 円十朗・五十嵐 康弘 (2018) 伊豆赤沢海洋深層水由来放線菌からの新規有用物質の探索. 海洋深層水研究, 19, 28.
- Yang, T., K. Yamada, T. Zhou, E. Harunari, Y. Igarashi, T. Terahara, T. Kobayashi, and C. Imada, (2019a) Akazamicin, a cytotoxic aromatic polyketide from marine-derived *Nonomuraea* sp. J. Antibiot., 72, 202–209.
- Yang, T., K. Yamada, J. Nakayama, Y. Igarashi, T. Terahara, T. Kobayashi, and C. Imada, (2019b) Bacterial community structure analysis of deep-sea water and surface seawater in Japan by pyrosequencing. Deep Ocean Water Research, 19, 137–146.
- Yoshida, A., Y. Seo, S. Suzuki, T. Nishino, T. Kobayashi, N. Hamada-Sato, K. Kogure, and C. Imada, (2008) Actinomycetal community structures in seawater and freshwater examined by DGGE analysis of 16S rRNA gene fragments. Mar. Biotechnol., 10, 554–563.
- Zaballos, M., A. Lopez-Lopez, L. Ovreas, S. G. Bartual, G. D'Auria, J. C. Alba, B. Legault, R. Pushker, F. L. Daae, and F. Rodríguez-Valera, (2006) Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea. FEMS Microbiol. Ecol., 56, 389–405.
- Zhang, Z., T. Zhou, T. Yang, K. Fukaya, E. Harunari, S. Saito, K. Yamada, C. Imada, D. Urabe, and Y. Igarashi, (2021) Nomimicins B–D, new tetronate-class polyketides from a marine-derived actinomycete of the genus *Actinomadura*. Beilstein J. Org. Chem., 17, 2194–2202.

(2021年7月6日受付；2021年9月16日受理)