

医薬品への応用を目指した新しい放線菌ランチバイオティックの探索

静岡大学創造科学技術大学院 統合バイオサイエンス部門
小谷 真也

1. 目的

本申請課題の目的は、医薬品としての利用を目指した放線菌の新しいタイプのランチバイオティックの探索である。乳酸菌などのグラム陽性菌の生産するペプチド性抗菌物質ランチバイオティックNisinは長い間、食品添加料を中心として使用されている最も用いられているランチバイオティックである。一方で長期的なNisinの使用によって耐性菌が出現することが予期されており、対策が望まれている。このような背景から新しい化学構造を有したランチバイオティックの開発は重要な課題である。これまで、主に乳酸菌から数々のランチバイオティックが発見されたが、放線菌からは数種のランチバイオティックしか発見されていない。申請者は、これまで放線菌から2つの新しいランチバイオティックを単離し、その構造が多様性に富むことを発見した。そこで本申請課題において、新しい医薬品の開発を目指し、放線菌を用いたスクリーニングを行い、ランチバイオティックの探索を行ったので報告する。

2. 方法

TM59株から抗菌物質の単離を行った。まず、TM59株を約600 mlのアセトンで15 min抽出した。抽出液を減圧濃縮しCHP20P用いて逆相オープンカラムに供し、H₂O : MeOH/90 : 10、40 : 60、0 : 100の3つのフラクションを、1.2.2と同様のISP2寒天培地に塗った*S. coelicolor*に直接添加する方法で活性を調べた。活性の見られた100 % MeOH画分を逆相カラムであるODSを用いて分析することにより、TM59-2とTM59-3と命名した抗菌物質が得られた。

TM59-2のMS測定

分取して精製したTM59-2をそのままポジティブイオンモードのESI-MS測定に供した。

TM59-2のアミノ酸分析

分取して精製したTM59-2 5 mlを凍結乾燥にかけ完全に乾燥させた。乾燥したTM59-2に6 N HCl 1 mlを加え、110 °C、overnightで加水分解反応に供した。加水分解したサンプルを凍結乾燥にかけ完全に乾燥させた。乾燥したサンプルに蒸留水 1 mlを加えて溶解し、アミノ酸分析を行った。

TM59-2のNMR分析

分取して精製したTM59-2を凍結乾燥にかけ完全に乾燥させた。乾燥したTM59-2を重DMSOに溶かし、NMRチューブに入れ再度凍結乾燥させた。チューブ内のTM59-2を完全に乾燥させたら、素早く重DMSOをチューブ内に入れ溶解させた。これを¹H NMR測定した。ピークがブロードで重なりが激しいため、解析が困難であった。そこで再度NMRチューブを凍結乾燥にかけ、TM59-2を完全に乾燥させた後、素早く重MeOHをチューブ内に入れ溶解させた。これを¹H NMR測定した。

3. 結果

TM59 株のアセトン抽出物を、3つの菌 (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*) に対して抗菌活性試験を行った。その結果、枯草菌 *Bacillus subtilis* と放線菌 *Streptomyces coelicolor* に対して抗菌活性が見い出され、特に放線菌 *Streptomyces coelicolor* に対して強い活性を示した。

抗菌活性物質を単離するために、TM59 株の ISP2 寒天培地培養物をアセトン抽出し、減圧濃縮した後、逆相オープンカラムによって 10 %MeOH、60 %MeOH、100 %MeOH 画分に分けた。それぞれの画分について活性試験を行ったところ 100 %MeOH 画分に抗菌活性が見られたため、HPLC 分析を行った。HPLC 分析によって検出された大きなピーク 3 本をそれぞれ分取し、活性試験を行ったところ 2 本目の大きなピークに *B. subtilis* と *S. coelicolor* に対して抗菌活性が見られた。また、3 本目の大きなピークに *B. subtilis* に対して抗菌活性が見られた。2 本目の大きなピークを TM59-2、3 本目の大きなピークを TM59-3 と命名した。

TM59-2 を ESI-MS でポジティブイオンモードにて測定すると、 m/z 2185 にイオンピークが検出された。また、 m/z 1104 に二価のイオンピークが観測された。二価イオンの分子量は Na イオン付加の分子量で、一価イオンの分子量は H イオン付加の分子量であると推定された。よって本物質の分子量は約 2184 であることが推定された。

4. 考察 まとめ

本研究により、新規抗菌ペプチドが得られた。分子量および構成アミノ酸を明らかにした。今後、化学分解などを行った後に、NMRおよびMSスペクトラムを用いて全構造を決定する予定である。