

## 天然活性物質を生産する海洋微生物の亜熱帯海域からの分離と塩成分が 活性物質生産に及ぼす影響の解析

木谷 茂<sup>1</sup>, 仁平 卓也<sup>1</sup>, Arinthip Thamchaipenet<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪大学生物工学国際交流センター, <sup>2</sup>カセサート大学(タイ王国)理学部

**概要** 天然の生物活性物質は医療や農業などの分野で抗生物質として用いられ、社会生活において重要な役割を担っている。年々問題となる抗生物質耐性菌の発生や様々な疾患に対応するには、新しい天然活性物質の発見が欠かせない。この天然活性物質の主要な供給源であるのが、土壌微生物として知られる放線菌である。これまでに、多くの医薬品や農薬が、放線菌が生産する活性物質を元にして開発されてきた。しかし、土壌由来の放線菌から同定される新規物質の割合は低下傾向にあるため、土壌以外の生育環境から放線菌を分離し、生物活性物質を探索する研究が盛んになってきた。

本研究では、未開拓の生物資源である“海洋”放線菌に着目し、生物多様性に富む亜熱帯域の海洋から、生物活性物質を生産する放線菌を分離することを第一の目的とした。塩成分が存在し、また酸素濃度も低い特殊な環境である海洋からは、陸地とは異なる海洋特異的な微生物が生息することが近年、知られてきた。したがって、海洋微生物では陸上微生物にはないメカニズムにより塩要求性を示すと考えられるが、活性物質生産における塩成分の働きは明らかではない。次に、分離した海洋放線菌の活性物質生産に対して塩(海水)成分がどのような影響を及ぼすかを解析し、海水成分要求性と活性物質生産の相関関係を明らかにすることを本研究の第二の目的とした。

亜熱帯域に属するタイ王国周辺の海底堆積物や海綿動物を回収し、その希釈サンプルを、抗生物質を含む培地に塗布した結果、多様な形態分化を示す 35 菌株の分離に成功し、一部の分離株の形態分化は、海水成分に応答することを見いだした。次に、分離株の生物活性物質生産能を検討するため、細菌または真菌を用いてバイオアッセイを行った。まず、3 種類の培地で固体培養した分離株と寒天片を利用したバイオアッセイでは、調査した 15 菌株の内、10 菌株が抗菌活性を、また 5 菌株が抗真菌活性を示した。また、分離株を 5 種類の培地にて液体培養し、同様のバイオアッセイを行ったところ、7 菌株が抗菌活性を、また 8 菌株が抗真菌活性を示した。これらの結果から、分離した海洋放線菌は生物活性物質の探索源として適しており、また固体培地または液体培地の成分に依存して生物活性物質を生産する海洋放線菌の存在が明らかとなった。続いて、培養液に含まれる代謝産物の有無を検討するため、培養液の n-ブタノール抽出物を濃縮乾固し、ジメチルスルホキシドに再溶解させ、逆相 HPLC により分析、独自の化合物ライブラリーの UV スペクトラムと比較した。その結果、ポリケタイド化合物 *resistomycin* や抗ガン活性を示す可能性がある *rakicidin* 様物質を生産する分離株を見いだした。興味深いことに、生物活性物質の生産が海水成分により誘導される現象も、一部の分離株にて観察された。したがって、塩(海水)成分の添加による新たな機能物質探索法を構築できることが示唆された。

### 1. 研究目的

天然の生物活性物質は医療や農業などの分野で抗生物質として用いられ、社会生活において重要な役割を担っている。年々問題となる抗生物質耐性菌の発生や様々

な疾患に対応するには、新しい天然活性物質の発見が欠かせない。この天然活性物質の主要な供給源であるのが、土壌微生物として知られる放線菌である(Bérdy, 2005)。これまでに、多くの医薬品や農薬が、放線菌が生産する活

性物質を元にして開発されてきた。しかし、土壌由来の放線菌から同定される新規物質の割合は低下傾向にあるため、土壌以外の環境から放線菌を分離し、生物活性物質を探索する研究が盛んである。これまでに、我々は新規天然物質の発見率を向上させるべく、新規物質を迅速に同定解析するシステムを共同開発し、植物内また汽水域などの特殊環境に生息する微生物を新たな探索源としたところ、抗ガン性物質などを高確率で同定してきた (Siriwach *et al.*, 2011, Igarashi *et al.*, 2010)。

本研究では、未開拓の生物資源である“海洋”放線菌に着目し、生物多様性に富む亜熱帯域の海洋から、生物活性物質を生産する放線菌を分離することを第一の目的とした。塩成分が存在し、また酸素濃度も低い特殊な環境である海洋からは、陸地とは異なる海洋特異的な微生物が生息する (Bredholdt *et al.*, 2007)。したがって、海洋微生物では陸上微生物にはないメカニズムにより塩要求性を示すと考えられるが、活性物質生産における塩成分の働きは明らかではない。次に、海洋放線菌が天然活性物質の有望な探索源である一例として、パハマ沖の海洋堆積物から分離された海洋放線菌 *Salinispora tropica* は、実用開発化が進む抗ガン物質 salinosporamide 類を生産する (Buchanan *et al.*, 2005)。また、分離した海洋放線菌の活性物質生産に対して塩(海水)成分がどのような影響を及ぼすかを解析し、海水成分要求性と活性物質生産の相

関関係を明らかにすることを本研究の第二の目的とした。

## 2. 研究方法

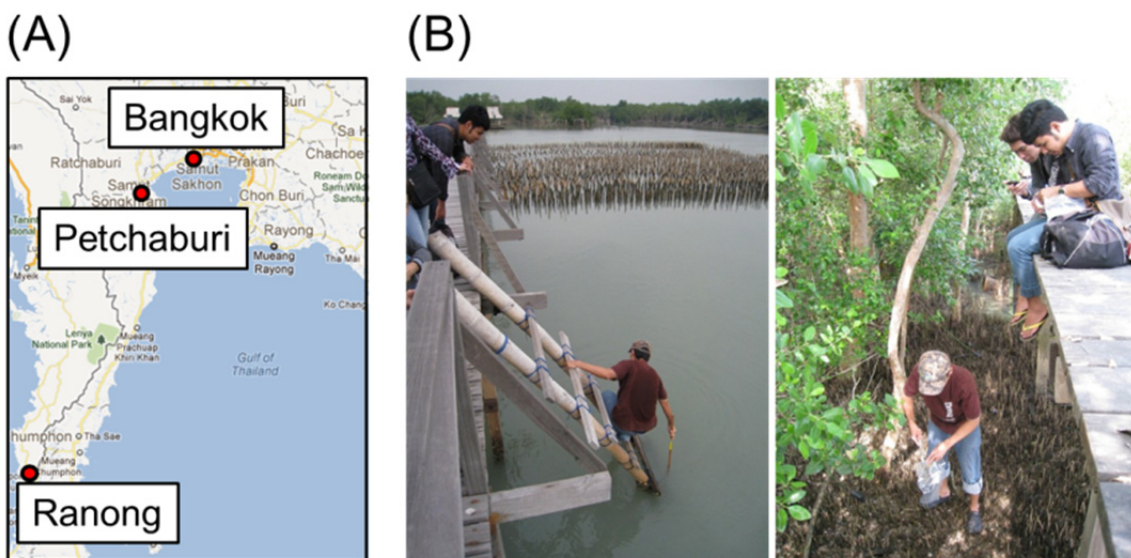
### 2.1 海洋放線菌の分離

亜熱帯域に属するタイ王国の周辺海域から海洋放線菌を分離するため、**Fig. 1A** に示す3箇所(ラン市・ペッチャブリー県・バンコク都)から海底堆積物または海洋生物を、Thamchaipenet 博士の協力により、回収した。ラン市沖合では、海綿動物を、ペッチャブリー県では、海底 3 m(沖合 4 km)と 13 m(18 km)の海底堆積物を、バンコク都郊外では、汽水域であるマングローブ自生地地域の堆積物を採取した (**Fig. 1B**)。

海綿動物 1 g をすりつぶしたサンプル、または海底堆積物 1 g を海水(海水成分を 27.9 g/l になるように加えた精製水) 10 ml に懸濁した。希釈サンプルを 55°C、30 分間処理した後、 $10^{-1}$  または  $10^{-2}$  になるように希釈した。調製したサンプル 100  $\mu$ l を、抗生物質を含む以下の 5 種類の培地に塗布し、28°C で約 3 週間培養し、海洋放線菌を分離した。

<培地>

- SCA 培地±海水成分(27.9 g/lになるように添加、以下同様)
- SYM 培地±海水成分
- Water agar 培地



**Fig. 1.** A map of Thailand for sampling points (A) and pictures for collection of samples (B)

<培地成分(ノリットル)>

- SCA 培地: 可溶性デンプン 10 g, KNO<sub>3</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, ビタミンフリーカゼイン 0.3 g, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g, CaCO<sub>3</sub> 0.02 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, 寒天 15 g
- SYM 培地: 可溶性デンプン 10 g, yeast extract 4 g, ペプトン 2 g, 寒天 18 g
- Water agar 培地: 寒天 15 g

<添加抗生物質> (最終濃度)

アンピシリン 100 µg/ml, ケトコナゾール 80 µg/ml, ナイスタチン 50 µg/ml, ナリジキシン酸 25 µg/ml

## 2. 2 海洋放線菌の抗微生物物質生産能の検討

4 種の検定菌 (抗菌作用検定菌: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*、抗真菌作用検定菌: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*)を用いて、2種類の方法によるバイオアッセイを行った。

### 2. 2. 1 固体培養した菌体と寒天片を利用したバイオアッセイ法

分離した海洋放線菌を、3種類の固体培地 (ISP 2 培地, Seino's Agar 培地, MS 培地)により、28°C、7日間培養した。培養菌体を含む寒天片を、検定菌を含む培地上に各検定菌の至適培養温度にて一晚静置した後、形成された生育阻止円により生物活性物質の生産能を判別した。

### 2. 2. 2 液体培養上清を用いたバイオアッセイ法

炭素源と窒素源が異なる以下の5種類の液体培地を用いて、海洋放線菌を 28°C、7日間振盪培養した。培養上清をペニシリンカップに注入し、カップ周囲に形成される検定菌に対する生育阻止円を観察することにより、培養上清に含まれる生物活性物質の有無を検討した。

<培地>

No. 2M 培地, A-3M 培地, A-11M 培地, A-16 培地, No. 8 培地

<培地成分(ノリットル)>

- No. 2M 培地: 可溶性デンプン 20 g, soybean meal 15 g, yeast extract 2 g, CaCO<sub>3</sub> 4 g, pH 6.2
- A-3M 培地: Glucose 5 g, glycerol 20 g, 可溶性デンプン 20 g, Pharmamedia 15 g, yeast extract 3 g, Diaion HP-20 10 g, pH 7.0
- A-11M 培地: 可溶性デンプン 25 g, glucose 2 g, yeast extract 5 g, polypeptone 5 g, NZ-amine 5 g, CaCO<sub>3</sub> 3 g, pH 7.0

- A-16 培地: Glucose 20 g, Pharmamedia 10 g, CaCO<sub>3</sub> 5 g
- No. 8 培地: Casitone 7.5 g, yeast extract 7.5 g, glycerol 15 g, NaCl 2.5 g

## 2. 3 n-ブタノール培養液抽出物の HPLC 解析

2. 2. 2で培養した菌体を含む培養液に半等量の n-ブタノールを加え、攪拌し、遠心分離により、n-ブタノール相を回収した。n-ブタノール相を濃縮乾固し、DMSO に再溶解させたサンプルを、次の HPLC 条件により解析した。

<HPLC 条件>

- 分離カラム: Cadenza CD-C<sub>18</sub> カラム (4.6 x 75 mm)
- 溶媒: 0.1% HCOOH を含むアセトニトリル
- 分離条件: 0-3 min 15%, 3-25 min 15-85%, 25-29 min 85%, 29-32 min 85-15%

## 3. 研究結果と考察

### 3. 1 タイ王国由来海洋放線菌の分離

本研究では、生物多様性に富む亜熱帯地域であるタイ王国に生息する海洋放線菌に注目し、その物質生産能を評価すると共に、生産する生物活性物質を同定することを目的とした。多様な海洋放線菌を分離するため、溶存酸素度や光の影響、海底の栄養状況が異なる海底堆積物または海綿動物を分離源として、回収した。これらの分離源を各種処理した後、各培地に生育してきた放線菌様コロニーを釣菌し、画線培養を繰り返すことで、分離株の純化を図った結果、35 菌株を分離することに成功した。Fig. 2 に分離した微生物のコロニー写真を示す。

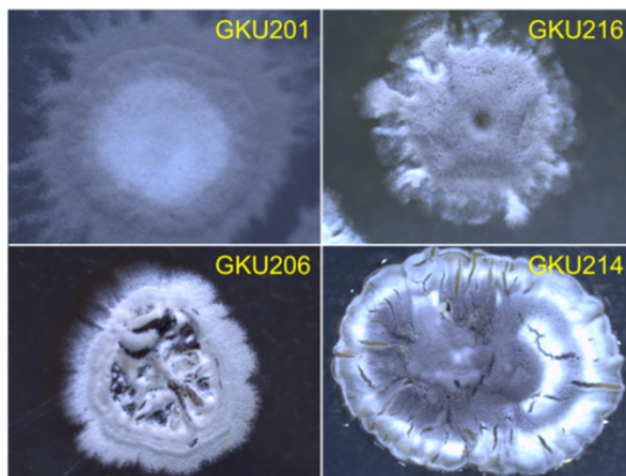


Fig. 2. Colonies of marine actinomycetes isolated in this study

分離株の培養形状から、放線菌と推察されたため、今後、分離株を海洋放線菌とみなした。また、分離放線菌の一部は、気中菌糸形成や胞子形成などの形態分化が固体培地中の海水成分に依存することが分かった (Fig. 3)。このような形態分化の海水依存性はほとんど報告されておらず、非常に興味深い現象である。これら分離した放線菌は、形態分化や生育速度が異なっていたことから、多様な海洋放線菌を分離できたものと考えられ、その生物活性物質の生産能に興味を持たれた。

### 3. 2 分離放線菌の生物活性物質生産能

#### 3. 2. 1 固体培養における生物活性物質生産能

固体培養や液体培養などの異なる培地条件では、分離した放線菌は生物活性物質を生産する能力を変化させる可能性が考えられた。したがって、まず培養が容易な固体培養において、分離放線菌の生物活性物質生産能を観察することにした。3 種類の固体培地を用いて、分離放線菌 15 菌株を培養し、抗菌物質または抗真菌物質の生産能をバイオアッセイにより確認した (Table 1)。

バイオアッセイの結果、15 菌株の内、10 菌株が抗菌活性を示した。抗菌活性を示した菌株の内、*B. subtilis* にしか活性を示さない菌株、逆に *S. aureus* にしか活性を示さ

ない菌株も見いだした。また、活性物質の生産が、培地成分に依存して変化することが観察された。一方、抗菌活性を示した菌株が 10 菌株であったのに対し、抗真菌活性を示す菌株は 5 菌株のみであった。また、弱いながらも活性が比較的、多く検出された抗菌物質生産に比べ、抗真菌物質の培地依存生産はあまり多く見られなかった。また、抗菌物質と抗真菌物質の両方を生産する菌株は、5 菌株であったことも加え、分離した放線菌集団は、生物活性物質の探索源となり得ることが明らかとなった。

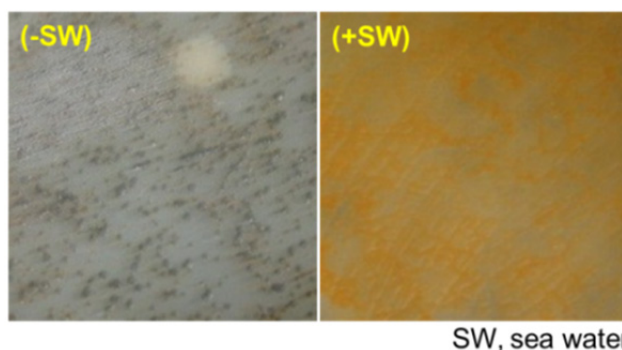


Fig. 3. Pictures of GKU238 strain grown in the absence and in the presence of sea water

Table 1. Biological activity of GKU strains cultivated in solid cultivation

|     | <i>B. subtilis</i> |    |    | <i>S. aureus</i> |    |    | <i>S. cerevisiae</i> |    |    | <i>C. albicans</i> |    |    |   |
|-----|--------------------|----|----|------------------|----|----|----------------------|----|----|--------------------|----|----|---|
|     | ISP2               | SA | MS | ISP2             | SA | MS | ISP2                 | SA | MS | ISP2               | SA | MS |   |
| GKU | 201                | -  | -  | -                | -  | -  | -                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 202                | -  | -  | +                | -  | -  | -                    | +  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 204                | -  | -  | -                | ±  | -  | -                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 206                | +  | +  | +                | +  | -  | ±                    | -  | -  | -                  | -  | +  |   |
|     | 207                | -  | -  | -                | -  | -  | -                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 208                | ++ | -  | +                | +  | -  | -                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 209                | ±  | +  | ±                | +  | +  | +                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 210                | +  | +  | +                | ±  | -  | -                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 212                | +  | ++ | ±                | ++ | ++ | ++                   | +  | +  | +                  | ±  | ±  | ± |
|     | 213                | -  | -  | -                | -  | -  | -                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 214                | -  | -  | -                | -  | -  | -                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 215                | -  | -  | -                | -  | -  | -                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 216                | ++ | ++ | ++               | +  | +  | +                    | -  | -  | -                  | -  | -  |   |
|     | 217                | ±  | ±  | ±                | -  | -  | -                    | +  | -  | ±                  | ±  | ±  | ± |
|     | 220                | ++ | ++ | ++               | ++ | ++ | ++                   | ++ | ++ | +                  | +  | +  | ± |

SA, Seino's Agar

### 3. 2. 2 液体培養における生物活性物質生産能

3. 2. 1と同様に、液体培養における分離放線菌の生物活性物質生産能を観察した(**Table 2**)。15 菌株の内、7 菌株が抗菌物質を、また 8 菌株が抗真菌物質を生産することが明らかとなった。また、固体培養と比較して、液体培養における活性物質生産の培地依存は顕著に高いことが分かった。活性物質の同定には、大量の培養物を必要とするため、液体培養により調製されるケースが多い。したがって、分離菌株の活性物質生産の高度な培地依存性は、活性物質本体が今までに単離されていない可能性を強く示唆する。また、活性物質生産能の固体培養と液体培養に対する依存性について、さらに解析した(**Table**

3)。

その結果、固体培養では、抗菌物質の生産能を活性化させるのに対し、液体培養では、抗真菌物質の生産を促進させることが分かった。今回は 15 菌株しか調査しておらず、検定菌株数を増加させることで、この傾向が維持されるのかを検証する予定である。

### 3. 3 培養抽出物の HPLC 解析による天然物質の同定

3. 2で解析した放線菌 15 菌株に、生物活性物質生産能を検定していない放線菌 20 菌株を加え、液体培養における二次代謝物質の生産プロファイルを解析した。35 菌株を 5 種類の培地で 1 週間培養し、計 175 サンプルの n-ブタノール抽出物を逆相 HPLC により解析した。その結

**Table 2.** Biological activity of GKU strains cultivated in liquid cultivation

|     | <i>B. subtilis</i> |    |      |     |      | <i>S. aureus</i> |    |      |     |      | <i>S. cerevisiae</i> |    |      |     |      | <i>C. albicans</i> |    |      |     |      |   |
|-----|--------------------|----|------|-----|------|------------------|----|------|-----|------|----------------------|----|------|-----|------|--------------------|----|------|-----|------|---|
|     | 2M                 | 3M | No.8 | 11M | A-16 | 2M               | 3M | No.8 | 11M | A-16 | 2M                   | 3M | No.8 | 11M | A-16 | 2M                 | 3M | No.8 | 11M | A-16 |   |
| GKU | 201                | -  | -    | -   | -    | -                | -  | -    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 202                | -  | -    | -   | -    | -                | -  | -    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | ++   | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 204                | -  | -    | -   | -    | -                | -  | -    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 206                | +  | -    | -   | -    | -                | +  | -    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | -    | +                  | -  | -    | -   | ++   |   |
|     | 207                | -  | -    | -   | ±    | -                | -  | -    | -   | -    | ++                   | -  | -    | -   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 208                | ±  | ±    | -   | -    | ±                | ±  | ±    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 209                | ±  | -    | -   | -    | -                | ±  | -    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 210                | -  | +    | -   | -    | +                | ±  | +    | -   | -    | +                    | -  | -    | ±   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 212                | -  | -    | -   | -    | -                | -  | -    | -   | -    | -                    | +  | -    | +   | ++   | ++                 | ±  | -    | ±   | ±    | + |
|     | 213                | -  | -    | -   | -    | -                | -  | -    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 214                | -  | -    | -   | -    | -                | -  | -    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 215                | -  | -    | -   | -    | -                | -  | -    | -   | -    | -                    | -  | -    | -   | -    | -                  | -  | -    | -   | -    |   |
|     | 216                | -  | -    | -   | -    | ±                | -  | -    | -   | -    | -                    | ++ | -    | ++  | ++   | ++                 | +  | -    | ±   | ±    | - |
|     | 217                | -  | -    | -   | -    | -                | -  | -    | -   | -    | -                    | ++ | -    | ++  | ++   | -                  | +  | -    | +   | +    | - |
|     | 220                | +  | -    | -   | -    | ++               | ++ | +    | ±   | -    | +                    | +  | ++   | -   | +    | +                  | ±  | +    | -   | ±    | + |

**Table 3.** Comparison of biological activity by cultivation methods

| Activity detected with | Anti-bacterial activity | Anti-yeast activity |
|------------------------|-------------------------|---------------------|
| Solid cultivation      | 4                       | 0                   |
| Liquid cultivation     | 1                       | 3                   |
| Both cultivation       | 6                       | 5                   |

/15 strains

果、85 サンプルにおいて、培地成分とは異なる 110 本の HPLC ピークが有意に観察されたことから、これらの培養条件では多様な二次代謝産物が生産されていることが期待された (Fig. 4)。

次に、これらの HPLC ピークの UV スペクトラムを既知化合物の UV スペクトラムと比較し、その生産物の化学構造を推定した。GKU206 株を A-16 培地で培養した培養抽出物を解析したところ、2 種類の未知化合物と共に resistomycin を生産していることが推察された (Fig. 5)。Resistomycin は芳香環を5つもつポリケタイド化合物であり、HIV-1 プロテアーゼ阻害活性を示すなど、近年注目を浴びている物質である (Rosenbrook *et al.*, 1967., Jakobi and Hertweck. 2004)。

HPLC ピークの UV スペクトラムの分析により、新規物質を生産する可能性がある海洋放線菌をスクリーニングした結果、A-16 培地で液体培養した GKU220 株が rakicidin 様の新規物質を生産する可能性が示唆された (Fig. 6)。Rakicidin 類化合物は、リポペプチドであり抗ガン活性を示す物質である (McBrien *et al.*, 1995)。

GKU220 株が示すピーク A と B は、既知の rakicidin 類とほぼ同一の UV スペクトラムを示すが、その HPLC カラム

における保持時間が大きく異なる。したがって、これらの2つの化合物は rakicidin の基本骨格を有しているが、その側鎖構造が異なるのではないかと推察された。今後、この2つのピークについて、分離精製を進め、その化学構造を決定する予定である。

### 3. 4 生物活性物質生産能の海水成分依存性の検討

海水成分が生物活性物質の生産性にどのような影響を与えるかを知るために、海水成分を含む固体培地に培養した分離放線菌群の生物活性物質生産能を観察し、海水成分を含まない培地で培養した結果と比較した。3. 2で生物活性物質生産能が検出されなかった菌株を、海水成分を含む培地で固体培養し、3. 2と同様の検定菌を用いて、バイオアッセイを行った (Fig. 7)。

GKU201 株の *S. aureus* に対する抗菌物質生産能が、海水成分により誘導されることが分かった。このような天然物生産が海水成分に依存するといった報告は、我々の知見ではなく、非常に興味深い現象を見いだしたのではないかと考えられる。この現象のメカニズムを追求するには、まずこの活性物質を同定する必要がある、現在、活性物質を各種方法により分離精製をしている段階である。

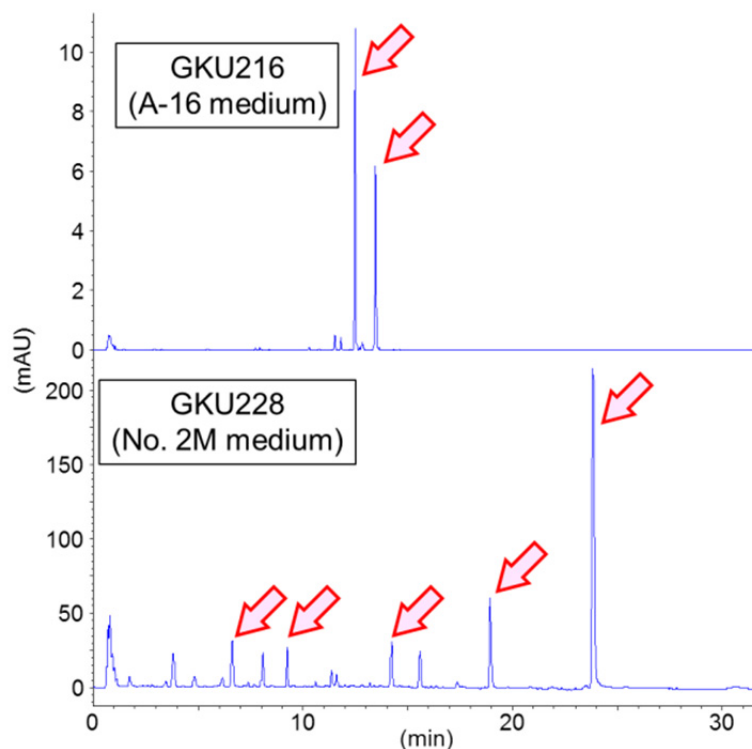


Fig. 4. HPLC chromatograms of crude extract of GKU228 strains

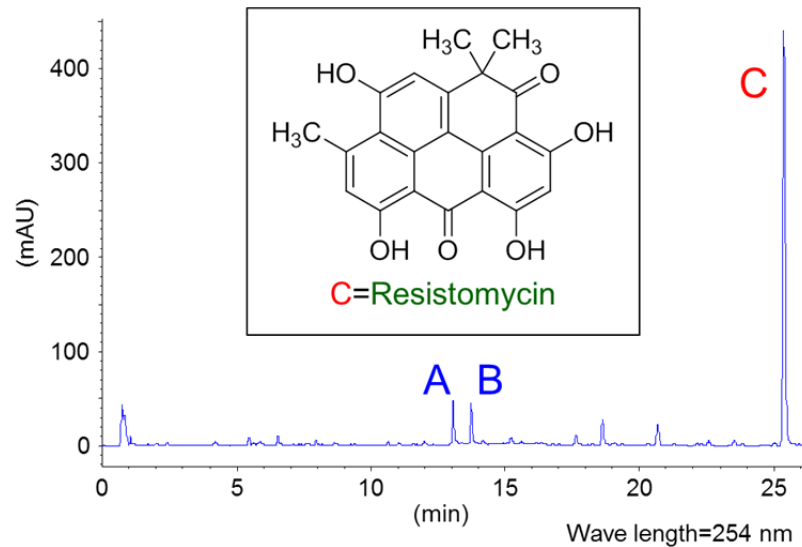


Fig. 5. HPLC chromatogram of crude extract of GKU206 strain and structure of resistomycin

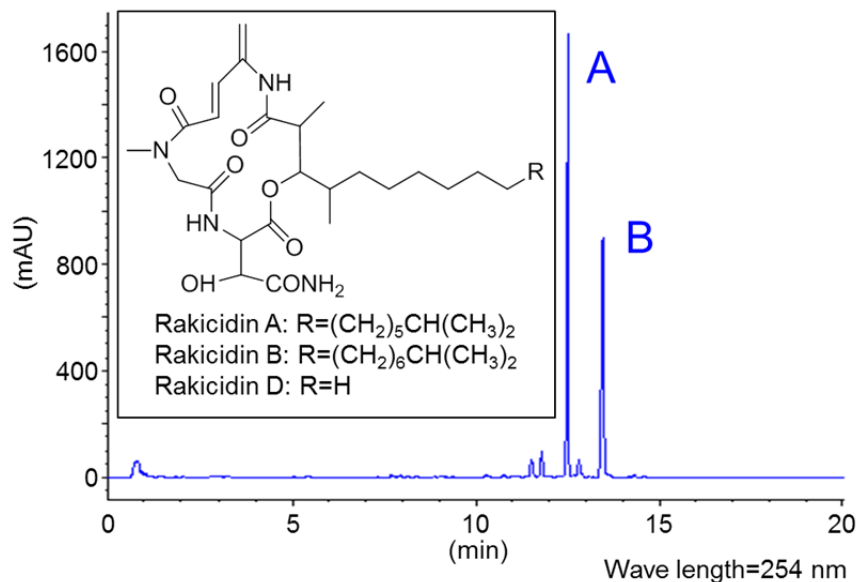


Fig. 6. HPLC chromatogram of crude extract of GKU220 strain and structure of rakicidins

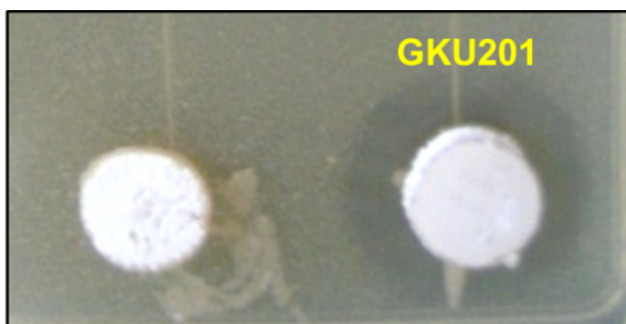


Fig. 7. Bioassay with *S. aureus* in the presence of sea water

#### 4. 今後の課題

本研究により、亜熱帯地域に属するタイ王国の海底堆積物または海綿動物から、生物活性物質を高頻度で生産する放線菌群を分離することに成功した。亜熱帯地域は生物多様性に富むことに一致して、分離した海洋放線菌の形態分化は様々であった。したがって、これらが生産する活性物質も、既知物質に加えて、新規物質である可能性が非常に高い。この仮説を実証するためにも、活性物質本体の構造を決定することが不可欠であり、現在、生産物質の構造を同定中である。

また、一部の放線菌が生産する活性物質は、培地に含まれる海水成分に依存するものであった。このような現象は報告されておらず、この海水成分誘導機構を明らかにすることは、天然活性物質の新たな探索法を構築する上で、非常に興味深いといえる。今後、どの海水成分が活性物質生産に影響を及ぼすのか？また、その分子メカニズムは？ということに焦点を当てて、研究を推進していく必要があると考えている。

## 謝 辞

本研究にご支援いただきましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。また、日本学術振興会・アジア教育研究拠点事業・「亜熱帯微生物資源を活用する次世代物造りバイオ技術の構築」(研究代表者:仁平卓也)により、海洋サンプルの収集を行った。

## 文献等

Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* (Tokyo). 58: 1-26. 2005.

Siriwach R, Kinoshita H, Kitani S, Igarashi Y, Pansuksan K, Panbangred W, and Nihira T. Xylaropyrone, a new  $\gamma$ -pyrone from the endophytic fungus *Xylaria feejeensis* MU18. *J Antibiot*. 64: 217-9. 2011.

Igarashi Y, Shimasaki R, Miyanaga S, Oku N, Onaka H, Sakurai H, Saiki I, Kitani S, Nihira T, Wimonravude W,

and Panbangred W. Rakicidin D, an inhibitor of tumor cell invasion from marine-derived *Streptomyces* sp. *J Antibiot* (Tokyo). 63: 563-5. 2010.

Bredholdt H, Galatenko OA, Engelhardt K, Fjaervik E, Terekhova LP, and Zotchev SB. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol*. 9: 2756-64. 2007.

Buchanan GO, Williams PG, Feling RH, Kauffman CA, Jensen PR, and Fenical W. Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Org Lett*. 7: 2731-4. 2005.

Rosenbrook W Jr. The structure of resistomycin. *J Org Chem*. 32: 2924-5. 1967.

Jakobi K and Hertweck C. A gene cluster encoding resistomycin biosynthesis in *Streptomyces resistomycificus*; exploring polyketide cyclization beyond linear and angucyclic patterns. *J Am Chem Soc*. 126: 2298-9. 2004.

McBrien KD, Berry RL, Lowe SE, Neddermann KM, Bursucker I, Huang S, Klohr SE, and Leet JE. Rakicidins, new cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora* sp. fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot* (Tokyo). 48: 1446-52. 1995.



## Isolation of Marine Actinomycetes Producing Bioactive Compounds and Effect of Sea Water on the Production

Shigeru Kitani <sup>1</sup>, Takuya Nihira <sup>1</sup>, Arinthip Thamchaipenet <sup>2</sup>

<sup>1</sup> International Center for Biotechnology, Osaka University,

<sup>2</sup> Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand

### Summary

Natural products have a major commercial impact in the fields of medicine and agriculture, where they continually give rise to novel applications and new modes of action and targets. A number of terrestrial actinomycetes, especially those belonging to the genus *Streptomyces*, are being extensively used for commercial production of different medically important compounds. As the search for producers of novel compounds continues, it becomes apparent that many terrestrial *Streptomyces* species isolated from different environments produce the same compounds. Thus, the ratio of finding genuinely new biologically active molecules is greatly declined. Marine actinomycetes, especially which are being in Thailand, a country of great biological diversity, are one of promising sources in search for new drugs, and their potential for producing biologically active compounds is poorly examined. In this work, we have isolated marine actinomycetes in the sea water sediments and the sponge of the Gulf of Thailand, evaluated their metabolites as bioactive compounds, and investigated the potential effect of sea water on the production.

Thirty-five actinomycetes-like colonies have been isolated from the samples derived from the Gulf of Thailand, and regarded as marine actinomycetes. In order to evaluate the potential activity for production of bioactive compounds, the strains were grown on solid medium and in liquid medium, and bioassays with the agar pieces and the culture supernatant were performed by using 4 indicator strains. The results of bioassays suggested that the marine actinomycetes isolated in this study are a suitable microbial group for isolation of new bioactive compounds. Subsequently, to discover structurally unique secondary metabolites, we performed a HPLC/UV-based chemical screening using crude extracts from liquid cultivation. The result of these analyses demonstrated that some of the isolated strains produce the polyketide compound resistomycin and another strain has an ability to produce rakicidin-like compounds, which may have anti-tumor activity. The observation that the presence of sea water stimulated the production of bioactive compounds could lead to an idea that exogenous addition of sea water into the medium is one of methods for finding new clinically useful compounds.