

バリダマイシン生成菌培養液から抗細菌性抗生物質 ノカルダミンの分離・精製

東出 栄治・大松 義治・井上 末瑞・木村 吉伸
神崎 浩・中島 修平

(生物資源開発学講座)

Isolation and Purification of Nocardamine from the Validamycin Producer

Eiji Higashide, Yoshiharu Omatsu, Suemi Inoue
Yoshinobu Kimura, Hiroshi Kanzaki and Shuhei Nakajima

(Department of Bioresource Chemistry)

An antibacterial antibiotic active against *P. mirabilis* was isolated from the culture of *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus*, validamycin producer. The antibiotic was found to be produced with a non-validamycin producing condition. The antibiotic was identified as nocardamine with the analytical data, IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra.

Key words : *Streptomyces*, antibacterial compound, nocardamine, non-validamycin producing condition

緒 言

Streptomyces hygroscopicus subsp. *limoneus* はバリダマイシン生成菌として知られているが、その抗カビ物質以外に抗細菌性抗生物質を生成することは知られていない。

われわれはその微生物がバリダマイシン非生成条件において生成する抗細菌性抗生物質を見出そうと試みた。その結果、グラム陰性細菌に活性を示す抗生物質 EO-3 を得たのでこれを分離・精製してノカルダミンと同定した。

本報告では本抗生物質の培養条件、抗菌スペクトル、精製および同定法について述べる。

材料と方法

微生物

Streptomyces hygroscopicus subsp. *limoneus*^{1,2)} JCM4911は理化学研究所微生物系統保存施設(埼玉県和光市広沢)から購入した。他の試験菌は(勸発酵研究所から購入した。*Bacillus cereus* IFO3514, *B. subtilis* IFO3134, *Micrococcus luteus* IFO12708,

Sta-phylococcus aureus IFO13276, *S. epidermidis* IFO12993, *Escherichia coli* IFO12734, *Klebsiella pneumoniae* IFO3512, *Proteus mirabilis* IFO13300, *P. vulgaris* IFO3851, *Pseudomonas aeruginosa* IFO13275, *Serratia marcescens* IFO12648, *Candida albicans* IFO1385, *Rhodotorula minuta* IFO0387, *Saccharomyces cerevisiae* IFO0304, *Aspergillus oryzae* IFO4079, *A. niger* IFO4417, *Penicillium chrysogenum* IFO8648, *Microsporium gypseum* IFO6076, *Trichoderma viride* IFO31137, *Trichophyton menta-grophytes* IFO7522.

抗細菌活性 EO-3 およびその測定法

Streptomyces hygroscopicus subsp. *limoneus* JCM4911の抗細菌活性の検出は常法の画線平板法、寒天希釈法および寒天穿孔法を用いた。バリダマイシンの測定には既知の微生物測定法およびガスクロマトグラフィー法を用いた^{3,4)}。また精製された EO-3 の抗菌像は寒天希釈法によって測定した。

Received October 1, 1998

発酵, 分離および精製法

菌株 JCM4911は200ml容のエrlenマイヤー・フラスコに9種の下記¹⁾組成培地30および50mlを分注して滅菌した。次に発酵は回転振とう培養機上で28℃または37℃で8日間培養を行った。それらの抗菌活性は試験菌として *Proteus mirabilis* を用いる寒天穿孔法で測定した。上記各種培地を用いて培養条件を検討した結果、培地No.44, 培養温度28℃, 培養液量50ml (200mlフラスコ当たり), 接種量1%の条件を用いると生成量が最も多かった。その条件を用いた発酵液450mlを遠心分離して400mlの澄清液を得て、これをpH7.0に調整し、等量の1-ブタノールで3回抽出した。その全抽出液を併せて減圧下で濃縮し1800mgとして、これに純水を加えて400mlとした。その抽出液を減圧下で濃縮し360mgとして、さらに純水を加えて400mlとした。この濃縮液から脂溶性不純物を除去するために酢酸エチルで洗浄し、得られた水溶性溶液を100mlのHP-20樹脂を通過させ、等量の純水で5回洗浄した後、その樹脂から50%アセトン水溶液で溶出した。それらの活性画分を集めて濃縮し純水を加えて400mlとした。得られた溶液80mlをDowex 50W×2 (H⁺)で処理し、最後に以下の条件でHPLCを実施した。HPLC: 島津 LC-6 A, UV 検出器: 島津 SPD-6 A, カラムはcosmosil 5 C18-AR (オクタデシルシリカゲル: ods, i. d. 6 mm×250mm)を用い、37%含水メタノールを用いて流速1.2ml/minで溶出した。活性画分はUV 検出器で215nmにおける検出と微生物測定を用いて測定した。その活性画分は保持時間20分付近に溶出された。このHPLCを繰り返し実施し、これら活性画分を集めて濃縮して白色物質 (100mg)を得た。本物質はHPLCおよびTLC (担体: Kiesel-gel G, 展開溶媒: 1-ブタノール: メタノール: 5%アンモニア水: 水 = (4:0.5:0.5:1))による分析から単一であることが確かめら

れた (Fig. 1)。

機器分析

IR 吸収スペクトルは Nicolet FT-IR710型により試料500 μ gを用いて KBr 法で測定した。

¹H-NMR スペクトルには Varian VXR500を用い、EO-3 2mgを重水およびメタノール-d₄を用いて調整した90%メタノールに溶解し、また、¹³C-NMR スペクトル測定には Varian VXR200を用い、EO-3 10mgを同様の90%メタノールに溶解し測定した。また ESI MS スペクトルは Perkin-Elmer API III

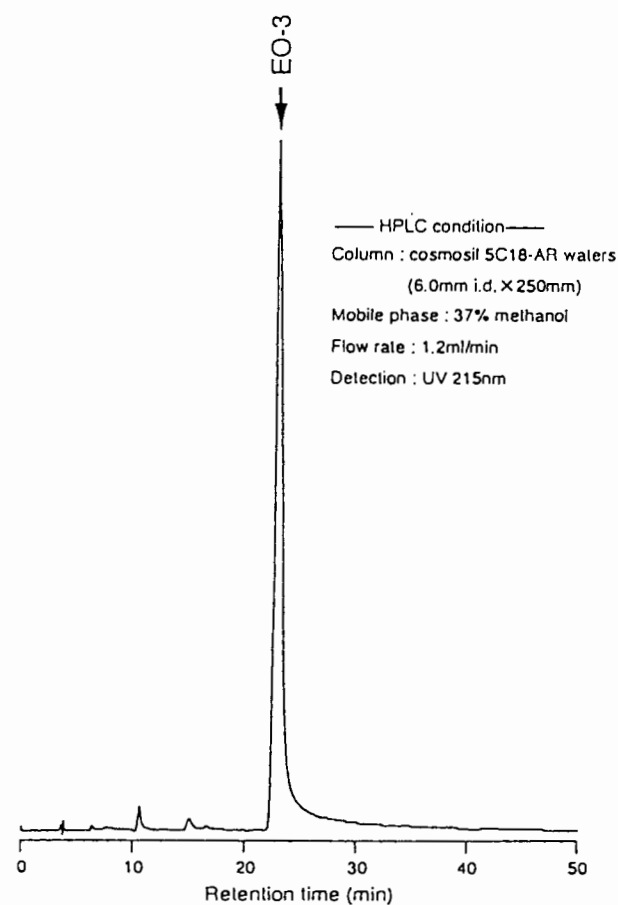


Fig. 1 HPLC chromatogram of EO-3.

¹⁾ 1) 可溶性澱粉3%, コーン・スチープ・リカー0.5%, ペプトン0.5%, K₂HPO₄0.1%, MgSO₄0.05%, CaCO₃0.5%, pH 7.0 2) デキストリン5%, 生大豆粉3%, ペプトン1%, CaCO₃0.5%, pH7.0 (培地No.44) 3) 可溶性澱粉3%, コーン・スチープ・リカー0.5%, ペプトン0.5%, K₂HPO₄0.1%, MgSO₄0.05%, CaCO₃0.5%, pH7.0 4) グルコース1%, 生大豆粉3%, ペプトン0.5%, NaCl0.3%, CaCO₃0.5%, pH7.0 5) グルコース1%, 肉エキス0.5%, ペプトン0.5%, NaCl0.3%, pH7.0 6) 可溶性澱粉3%, 肉エキス0.5%, ペプトン0.5%, NaCl0.5%, pH7.0 7) ガラクトース3%, コーン・スチープ・リカー3%, カゼイン1%, MgSO₄0.05%, CaCO₃0.5%, pH7.0 8) 可溶性澱粉3%, グルコース2%, コーン・スチープ・リカー3%, ペプトン0.5%, K₂HPO₄0.1%, MgSO₄0.05%, CaCO₃0.3%, pH7.0 9) 可溶性澱粉4%, グルタミン酸ソーダ2.15%, K₂HPO₄0.024%, MgSO₄0.04%, CuCl₂0.0072%, FeCl₂0.014%, MnCl₂0.0011%, ZnCl₂0.00036%, NaCl0.5%, CaCO₃0.5%, pH7.0

により、FAB MS スペクトルは JEOL SX102A により、それぞれ EO-3 を 50 ppm の濃度になるように 50% アセトニトリルに溶解したものをを用いた。

結果および考察

EO-3 の抗菌力

バリダマイシン生成菌をグリセロール栄養寒天平板培地(1)、栄養寒天平板培地(2)、およびベンネット栄養寒天平板培地(3)上に画線接種して、これを 28°C において 5 日培養してその抗菌力を調べるために次の 14 種試験菌の懸濁液を交差画線接種して、28°C において 1 ないし 3 日培養しその阻止長を測定した。その結果グリセロール栄養寒天平板培地では *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. maecescens*, *C. albicans*, *R. minuta*, *A. oryzae*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* の 8 株、栄養寒天平板培地では *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* の 2 株、ベンネット栄養寒天平板培地では *C. albicans*, *A. oryzae*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* の 4 株に活性を認めたので、液体培地で培養してそれら培養液中の抗菌活性を調べた結果、培地 No. 44, 培養温度 28°C, 培養液量 50 ml (フラスコ当たり), 接種量 1% の条件を用いるとその生成量が最も多かった (Fig. 2)。

EO-3 の分析および推定構造

IR 吸収スペクトルでは Fig. 3 に示した様に 1620 cm^{-1} にアミド、カルボニルの伸縮振動による吸収が、また 3500-3000 cm^{-1} 領域にはアミドの NH 振縮振動及びヒドロキシル基の OH 伸縮振動による吸収が見られた。

ESI MS スペクトル (Fig. 4, 5) からプロトン化分子イオンピークが m/z 601 (M+1) に観察され、また MS/MS 分析において m/z 401, 201 の娘イオンが観察された。

FAB MS スペクトルでは M+1 プロトン化分子イオンピークが m/z 601 に観察され、High resolution FAB MS より EO-3 の分子式は $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_9$ であることが分かった。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル (Fig. 6) から 1.35, 1.55, 1.66 ppm にトリプルトリプレットが、2.51, 2.82, 3.21, 3.65 ppm にトリプレットが観察された。これより連続してつながったメチレン基 5 個と 2 個のユニットが存在することが確認された。2.51 ppm のシグナルはアミド基カルボニル炭素と結合したメチレ

ン基のプロトンで、2.82 ppm のシグナルはヒドロキサム酸のカルボニル炭素と結合したメチレン基のプロトンのシグナルであると考えられた。また 3.21 ppm のシグナルはアミド基の窒素と結合したメチレン基のプロトンで 3.65 ppm のシグナルはヒドロキサム酸の窒素と結合したメチレン基のプロトンのシグナルである。また、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルより 24.2, 26.9, 28.9, 29.4, 31.6, 40.2, 48.7, 174.5 および 175.3 ppm のシグナルが観察され (Fig. 7), このことより異なる化学的環境にある炭素が 9 種類しかないことが確認された。また 174.5 および 175.3 ppm のシグナ

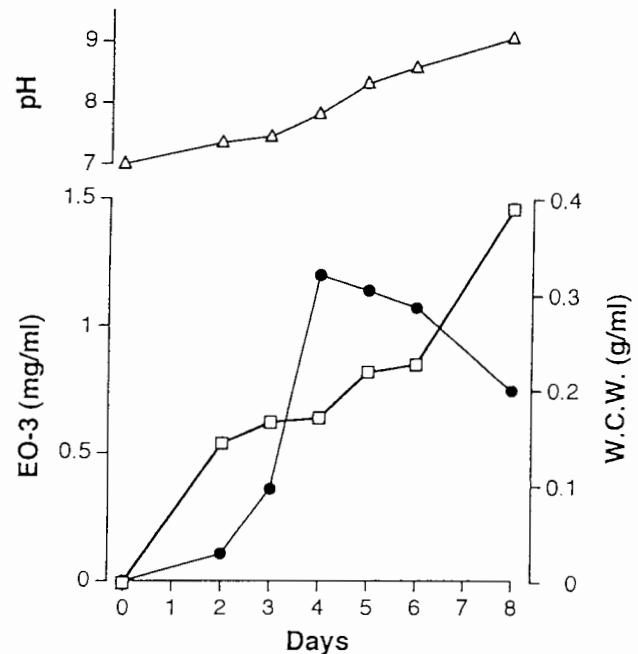


Fig. 2 Time course of EO-3 production.

△ : pH
● : titre of EO-3
□ : growth of packed volume, $\times 2\text{ml}/5\text{ml}$ broth

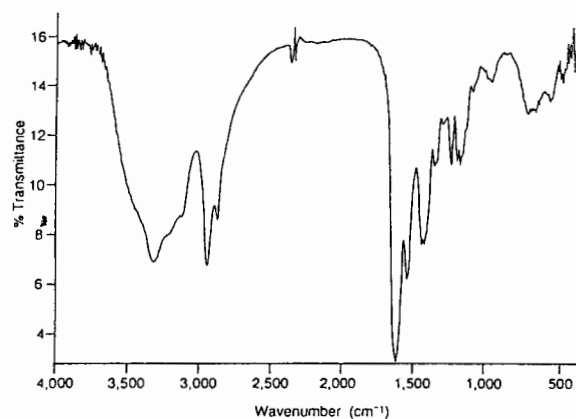


Fig. 3 IR spectrum of EO-3.

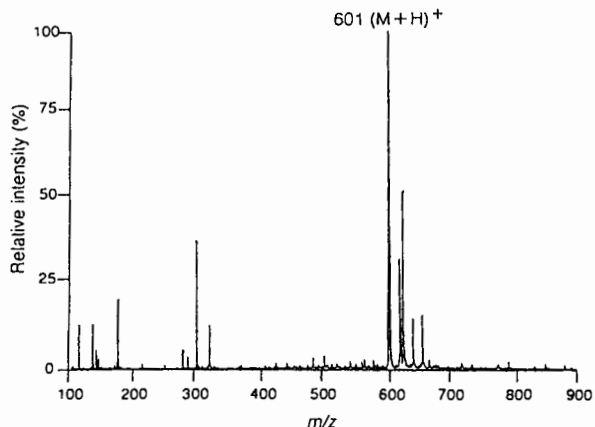


Fig. 4 ESI MS spectrum of EO-3.

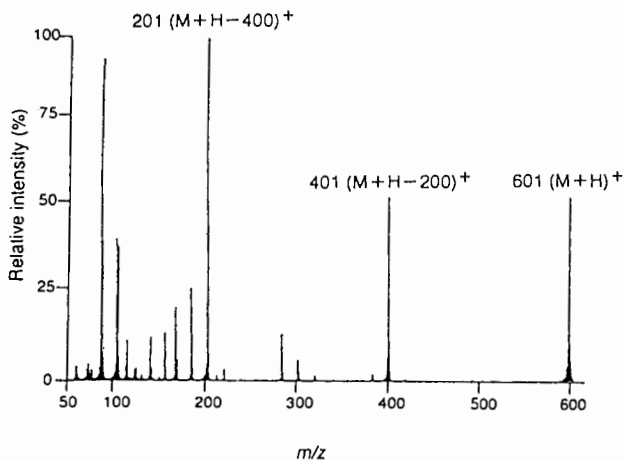


Fig. 5 ESI MS/MS spectrum of EO-3.

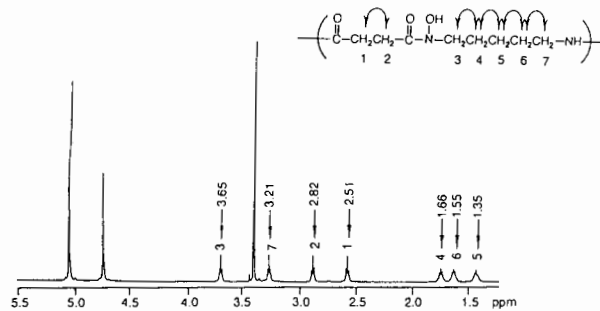


Fig. 6 ¹H-NMR spectrum of EO-3.

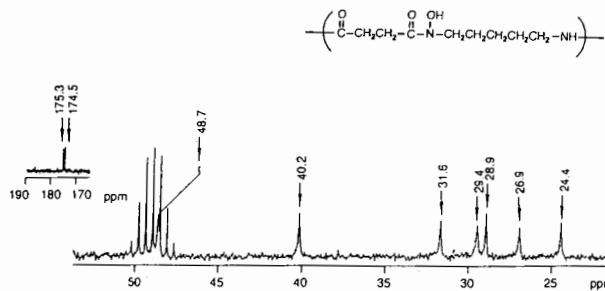


Fig. 7 ¹³C-NMR spectrum of EO-3.

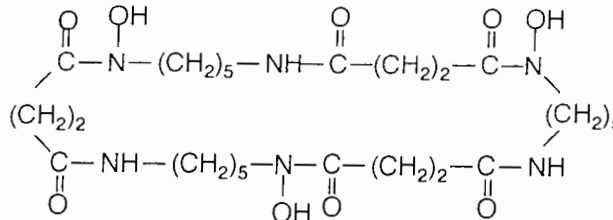


Fig. 8 Chemical structure of nocardamine.

ルはアミド基及びヒドロキサム酸のカルボニル炭素のシグナルであると思われる。

以上の解析から EO-3 は分子量が600で化学的環境が異なる水素と炭素がそれぞれ7種類と9種類あり、MS/MS 分析での顕著な娘イオンが質量200であることより、化学構造が同じユニット3個からなると考えられた。即ち EO-3 はメチレン基2個と5個のユニットからなりそれを接続しているのがアミド基及びヒドロキサム酸でこれらの繰り返し構造を有する nocardamine と推定された。(Fig. 8)

Nocardamine は *Nocardia* sp.⁵⁾, *Pseudomonas stutzeri*⁶⁾, *Streptomyces hygroscopicus geldanus*⁷⁾ および *Pseudomonas fluorescense* YK310⁸⁾ から生産されることが見出されているが、バリダマイシン生成菌のように抗かび物質のみの生成菌からは初めてであり、バリダマイシン非生成条件下で生成するということは本物質が多く他の細菌によっても生成され

る可能性があるものと思われる。

謝 辞

岡山大学内質量分析室、NMR 実験室の方々に深謝する。尚、この研究は平成6年度から8年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究『特殊環境生物の機能開発と物質生産への応用』を分担して行ったものである。

文 献

- 1) Iwasa, T., M. Yamamoto and M. Shibata : Studies on validamycins, new antibiotics. I *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus* nov var., validamycin-producing organism, *J. Antibiotics* **27**, 595-602 (1970)
- 2) Iwasa, T., E. Higashide, H. Yamamoto and M. Shibata : Studies on validamycins, new antibiotics. II Production and biological properties of validamycins A and B, *J. Antibiotics* **24**, 107-112 (1971)

- 3) Iwasa, T., E. Higashide and M. Shibata : Studies on validamycins, new antibiotics. II Bioassay method for the determination of validamycins, *J. Antibiotics* **24**, 114-118 (1971)
- 4) Horii, S., Y. Kameda and K. Kawahara, Shibata : Studies on validamycins, new antibiotics. VIII Isolation and characterization of validamycins C, D, E and F, *J. Antibiotics* **26**, 48-53 (1972)
- 5) Hossain, M. B., Dick van der Helm and M. Poling : The structure of defferioxamine E (Nocardamine), a cyclic trihydroxamate, *Acta Cryst.* (1983) B39, 258-263
- 6) Meyer, Jean-Mariee and M. A. Abdallah : A siderochromes of non-fluorescent pseudomonads : Production of nocardamine by *Pseudomona stuzeri*, *G. Microbiol.* (1980), **118**, 125-129
- 7) DeBoer, C. and A. Dietz : The description and antibiotic production of *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus*, *J. Antibiotics* **46**, 1182-1185 (1993)
- 8) Tsubotani, S., N. Katayama, Y. Funabashi, H. Ono and S. Harada, Ferriocins : new iron-containing peptide antibiotics produced by bacteria. Isolation, characterization and structure elucidation. *J. Antibiotics* **46**, 287-293 (1993)