輸入ピーナツから分離した *O*-methylsterigmatocystin 生産性 *Aspergillus parasiticus* について

長谷川明彦^{*1}, 田中 敏嗣^{*1}, 山本 進^{*1}, 戸矢崎紀紘^{*1}, 松田 良夫^{*1},
宇田川俊一^{*2}

A. HASEGAWA^{*1}, T. TANAKA^{*1}, S. YAMAMOTO^{*1}, N. TOYAZAKI^{*1}, Y. MATSUDA^{*1},
S. UDAGAWA^{*2}: A study on *O*-methylsterigmatocystin-producing *Aspergillus*
parasiticus isolated from imported peanuts

Summary

O-Methylsterigmatocystin (OMST)-producing strain (No. 35-8) of *Aspergillus parasiticus* was isolated from imported peanuts in 1983. The strain No. 35-8 was taxonomically identified with *A. flavus* subsp. *parasiticus* sensu Kurtzman et al. (1986), but produced no detectable aflatoxins on peanut meal medium. The OMST accumulation in solid culture of this strain on peanut meal was thus confirmed by comparison of chromatographic behavior on TLC and HPLC, and also by UV spectra and mass spectra data with those of OMST standard. Furthermore, bioproduction of OMST on three kinds of substrates by this strain was measured and the following yields were obtained: 700 $\mu\text{g/g}$ on peanut meal, 350 $\mu\text{g/g}$ on polished rice and 180 $\mu\text{g/g}$ on YES agar medium, respectively.

O-Methylsterigmatocystin (以下 OMST と略す) は, Burkhardt と Forgacs¹⁾ が *Aspergillus flavus* から aflatoxins (以下 AF と略す) と同時に新代謝産物として, また Cole ら²⁾ は同じ *A. flavus* からの単独生産を報告している. その後, sterigmatocystin (以下 ST と略す) とともに *Chaetomium* spp., *Farrowia* sp., *Monocillium nordinii* などの菌類からも生産性が明らかにされた³⁻⁵⁾. 最近 Bhatnagar ら⁶⁾ は AF の生合成に関する研究において AF を生産せず, しかも OMST を蓄積する *A. parasiticus* の 1 系統が存在することを報告した. 著者らは, 輸入ナッツ類からの AF 生産菌の分離とそれらの AF 生産力, 輸入ナッツ類の AF 汚染について実態調査を行いその一部を報告⁷⁾したが, その際に輸入ピーナツより分離した *A. parasiticus* の 1 菌株が, AF 生産能を示さず OMST のみ生産することを確認したため, 本菌株の同定と合わせて報告する.

材料および方法

1. 試料

1983年7月にアメリカから輸入されたバージニア種の生ピーナツの1試料から25粒を供試し, 常法通り1%次亜塩素酸ナトリウム液を用いて1分間表面殺菌後, 滅菌水で洗浄し, クロラムフェニコール添加ポテトデキストロース寒天培地(日水製薬製, 以下 PDA と略す)平板上で, 25°C, 4~7日間培養し, 出現菌を分離した. その結果, *A. flavus* 菌群に属する13菌株が得られ, さらに

^{*1} 神戸市環境保健研究所 (〒650 神戸市中央区港島中町4-6)

Public Health Research Institute of Kobe City (4-6, Minatojimanaka-machi, Chuo-ku, Kobe 650)

^{*2} 国立衛生試験所 (〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

National Institute of Hygienic Sciences (1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158)

既報⁷⁾のように AF 生産性を検索したところ菌株番号35-8の1菌株のみは、AF 生産が認められず、しかも薄層クロマトグラフ上で、AFB₁ よりやや高い位置に OMST と思われるスポットが検出された。そのため、以下の実験に本菌株を用いた。

2. OMST 生産菌の同定

Raper と Fennell⁹⁾ の成書に従って、同定のため Czapek-Dox 寒天培地、Malt extract 寒天培地および PDA の各平板中央部に供試菌株の分生子を接種し、23°C、10日間培養後、コロニーの性状、顕微鏡的形態について観察を行った。なお、*A. flavus* および *A. parasiticus* の分類については最近報告された Kurtzman ら⁹⁾の概念に従った。

3. OMST 生産の確認

1) 菌の培養および代謝産物の単離

脱脂ピーナッツ 50 g を培養フラスコ (400 ml) にとり、121°C、20分滅菌後、滅菌水 25 ml を添加し、OMST 生産のための培養基質とした。供試菌株の PDA 斜面培養から一白金耳をとって接種し、25°C、7日間培養した。

抽出は、培養物 20 g を分液ロートにとり、クロロホルム-メタノール (97:3) 200 ml で振とう抽出した。

精製は、抽出液をフロリジル、シリカゲルカラムで精製した後、クロロホルム-メタノールから再結晶し単離化合物を得た。

2) 単離化合物の化学分析

① 薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略す)

シリカゲルプレート (Whatman 社製 LHP-K) に単離化合物のクロロホルム溶液を 10¹/_{μl} スポットし、クロロホルム-アセトン (9:1) で展開後、紫外線 (360 nm) 照射下で検索した。さらに 20% AlCl₃ を噴霧し、110°C、10分間加熱後、紫外線 (360 nm) 照射下で検索した。

② 高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略す)

HPLC (島津製作所製 Model LC-3 A) による分析は、カラム; Nucleosil 50-10 (4 mm×300 mm) 移動相; 水飽和クロロホルム-シクロヘキサン-クロロホルム-アセトニトリル-エタノール (45:15:5:2:1) 流速; 1.0 ml/min 検出器; 螢光検出器 (島津製作所製 Model RF-530) EX 310 nm, EM 450 nm の条件で行った。

③ 紫外外部吸収スペクトル

単離化合物をメタノールに溶解し、分光光度計 (日立製作所製 Model 200-10) で測定した。

④ マススペクトル分析

単離化合物を質量分析計 (日立製作所製 Model M-80 A) の直接導入用ピペットに塗布し、イオン化電圧 70 eV でマススペクトル分析を行った。

4. 各種基質における OMST の生産性

脱脂ピーナッツ、精白米および YES 培地 (Yeast extract 20 g, Sucrose 150 g, Agar 20 g, Distilled water 1000 ml), 各々 50 g に供試菌株の PDA 斜面培養から前項と同様に接種し、25°C、7日間培養した後、各培養物について HPLC で OMST 生産量を分析定量した。

結 果

1. 生産菌の同定

供試菌株の Czapek 寒天培地、Malt extract 寒天培地、PDA 上での生育速度は、23°C、10日後、それぞれ直径 4.5 cm, 7.0 cm, 6.7 cm となり、良好な発育を示した。Czapek 寒天培地上で

Fig. 1. Conidial heads of *A. flavus* subsp. *parasiticus* (strain No. 35-8)
a: $\times 200$; b: $\times 400$.

のコロニー表面の色調は黄緑色，性状は羊毛状で，菌核の形成が認められた．コロニー表面の色調は，PDA 上では暗緑色を示した．本菌の光学顕微鏡写真を Fig. 1 に示す．その形態的性質を要約すると，分生子頭は放射状で，大部分はフィアライドのみで構成されるが，まれにメトレとフィアライドからなるものが見られた．分生子は球形ないし亜球形，直径 $4\sim 6\ \mu\text{m}$ ，表面は著しい小突起によって覆われている．

このような諸形質から考えて，われわれの OMST 生産菌は最近の Kurtzman ら⁹⁾の概念に従い *A. flavus* subsp. *parasiticus* (Speare) Kurtzman et al. と結論された．

2. OMST 生産の確認

A. flavus subsp. *parasiticus* (35-8 株)の培養物から単離した化合物と OMST 標準品(国立衛生試験所 生薬部 関田博士より分与)との化学的性状の比較の結果は，まず TLC においては， R_f 値 0.55 に単一の青色の蛍光スポットを認め，さらに行った 20% AlCl_3 の反応試験においても黄色の蛍光を呈し，OMST 標準品と一致した．また，HPLC 分析においても OMST 標準品と同一の保持時間に単一ピークとして検出した．

続いて行った単離化合物のメタノール溶液の紫外吸収スペクトルは，238, 313 nm に吸収極大が観察され，またマススペクトルは Fig. 2 に示すように m/z 338(M^+)，309, 323 の特徴のあるマスフラグメントピークが観察され，それぞれのスペクトルデータが OMST 標準品と一致した．また，このマススペクトルデータは Cole と Cox¹⁰⁾によって示された OMST のものとも完全に一致した．以上の結果から *A. flavus* subsp. *parasiticus* (35-8 株)からの単離化合物を OMST と同定した．

3. 各種基質による OMST 生産性

A. flavus subsp. *parasiticus* (35-8 株)の基質別による OMST の生産性について比較した．結果は，Table 1 に示すようにいずれの基質でも OMST を生産し，脱脂ピーナッツが最も高く $700\ \mu\text{g/g}$ ，つづいて YES 培地では $350\ \mu\text{g/g}$ ，精白米は $180\ \mu\text{g/g}$ であった．

Fig. 2. Mass spectrum of OMST from culture of *A. flavus* subsp. *parasiticus* (strain No. 35-8) with a Hitachi M-80 A instrument at ionizing voltage 70 eV

Table 1. Production of OMST by *A. flavus* subsp. *parasiticus* (strain No. 35-8)

Substrate	Amounts of OMST ($\mu\text{g/g}$)* ¹
Peanuts powder	700
Polished rice	180
YES agar* ²	350

*¹ Incubated at 25°C for 7 days.

*² Yeast extract 20 g, sucrose 150 g, agar 20 g and distilled water 1,000 ml.

考 察

最近 Bhatnagar ら⁶⁾は OMST 生産性 *A. parasiticus* による ST→OMST の変換を報告し、OMST が AF の生合成経路において ST から AF への中間体として位置づけられることを明らかにしている。その後、彼らは *A. parasiticus* 変異株を用い OMST→AFB₁ 変換についても研究し、ST→AF の生合成経路が OMST をはさむ二段階で進行することを発表している (Cleveland et al.¹¹⁾)。

しかしながら、Bhatnagar ら⁶⁾は彼等の分離した OMST 生産菌の菌学的性質および OMST 生産力については記載していないため、われわれの分離した OMST 生産菌のデータを評価するためには、今後の比較研究が必要である。結果の項で示した菌学的性質は、同一試料から分離された残り12株の AF 生産菌の形態と比較したとき、外観上は、もちろん顕微鏡的形質においても全く区別できなかった。このように35-8株が形態上は何等の変異も認められないにもかかわらず OMST の生産までで終わったことは、上述の Bhatnagar ら⁶⁾、Cleveland ら¹¹⁾による ST→OMST→AF 生合成の研究結果からみて、35-8株は AF 生産菌における生合成経路において OMST→AF への酵素活性が欠落した一種の生理的自然変異株であることを推測させる。このような変異株の存在は今回を含めてわずかに2例が発見されたにすぎないことから考えると、きわめてまれなことと思われる。しかし、より多数の *A. flavus* の AF 非生産株について OMST 生産の有無を検索すれば、さらに発見される可能性もある。*Chaetomium thielavioideum* (= *C. virescens* var. *thielavioideum*) での OMST 生産については Sekita ら⁴⁾が 278 mg/200 g rice と報告しているので、今回発見された *A. flavus* subsp. *parasiticus* の OMST 生産力は、かなり強いものと考えられる。

終わりに本研究に使用した OMST 標準品を分与して頂いた国立衛生試験所 生薬部 関田節子博士に深謝致します。

引用文献

- 1) Burkhardt, H.J., Forgacs, J. : Tetrahedron, **24**, 717 (1968).
- 2) Cole, R.J., Kirksey, J.W., Schroeder, H.W. : Tetrahedron Letters, **35**, 3109 (1970).
- 3) Udagawa, S., Muroi, T., Kurata, H., Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Umeda, M. : Can. J. Microbiol., **25**, 170 (1979).
- 4) Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Udagawa, S., Muroi, T., Sugiyama, Y., Kurata, H., Umeda, M. : Can. J. Microbiol., **27**, 766 (1981).
- 5) Ayer, W. A., Pena-Rodriguez, L., Vederas, J.C. : Can. J. Microbiol., **27**, 846 (1981).
- 6) Bhatnagar, D., McCormick, S.P., Lee, L.S., Hill, R.A. : Appl. Environ. Microbiol., **53**, 1028 (1987).
- 7) 長谷川明彦, 田中敏嗣, 青木伸實, 山本 進, 戸矢崎紀紘, 松田良夫, 宇田川俊一 : マイコトキシン, **25**, 21 (1987).
- 8) Raper, K.B., Fennell, D.I. : "The Genus *Aspergillus*" p. 686 (1965), Williams & Wilkins, Baltimore.
- 9) Kurtzman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J., Wicklow, D.T. : Mycologia, **78**, 955 (1986).
- 10) Cole, R.J., Cox, R.H. : "Handbook of Toxic Fungal Metabolites" p. 937 (1981), Academic Press, New York.
- 11) Cleveland, T.E., Lax, A.R., Lee, L.S., Bhatnagar, D. : Appl. Environ. Microbiol., **53**, 1711 (1987).