放線菌が生産するアフラトキシン生産阻害物質 aflastatin A に関する研究

小野 誠^{*1}, 作田 庄平^{*2}

Makoto ONO^{*1}, Shouhei SAKUDA^{*2}: Aflastatin A, a new metabolite from *Streptomyces* that inhibits the biosynthesis of aflatoxin

アフラトキシンは、非常に強い発ガン性を有するマイコトキシンとして知られ、*Aspergillus* 属の *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* 等により生産される。アフラトキシン生産菌はトウモロコシやピーナッツなどの農作物に感染し、熱帯夜亜熱帯の環境条件下でアフラトキシンを生産し作物を汚染する。アフラトキシンに汚染された作物の恒常的な摂取は肝臓ガンを引き起こし、現在、アジアやアフリカなどのアフラトキシン高汚染地帯では、年間 25 万人に上る人々がアフラトキシンが原因の肝臓ガンにより死亡していると推定されている¹⁾。農産物をアフラトキシン汚染から守ることは安全な食糧を確保する上で重要な課題の一つであり、防除のための有効な薬剤の開発が急がれてきた。

アフラトキシンの汚染を防除するには、第一に、生産者である真菌の生育を阻止する方法が考えられる。しかし、強力な抗真菌剤は植物や哺乳類に対する毒性も強いことが多く、また、その汎用による、これまで多くの抗生物質の使用で繰り返して見られてきた、早期の薬剤耐性菌の出現が懸念される。一方、アフラトキシンは二次代謝産物として生産されることに注目すれば、その生合成を阻害しても生産菌の生育には影響を与えないと考えられる。従って、アフラトキシンの生産は阻害するが生産菌の生育は阻害しないような物質が得られれば、高選択性の、耐性菌が出現しにくい薬剤となる可能性が高いと考えられる。

そこで、発表者らはアフラトキシン生産菌である *A. parasiticus* とアフラトキシン高感受性菌株の *Bacillus megaterium* を用いるバイオアッセイ法を開発しアフラトキシン生産阻害物質の検索を試みた。その結果、*Streptomyces* 属と同定された一放線菌の代謝産物中に阻害活性を見だし、活性物質の単離、構造解析を行ったところ新規化合物と分かり、aflastatin A と命名した²⁾。以下、aflastatin A の検索、生産菌の同定、aflastatin A の単離、構造決定、類縁体である aflastatin B, blasticidin A の構造決定、aflastatin A の生合成、aflastatin 類の生物活性について報告する。

1. aflastatin A の検索

aflatoxin の生産を特異的に阻害する化合物を検索するスクリーニング系として、*B. megaterium* ATCC 25848 を用いたバイオアッセイにより aflatoxin を定量する事を利用した検索系を確立した。具体的には、被検液となる放線菌培養液を含有する高 aflatoxin 生産性培地²⁾に aflatoxin 生産菌を接種した後その生育を観察し、生育阻害が観察されなかった aflatoxin 生産菌の培養上清中の

^{*1} 森永製菓 (株) 品質管理部 (〒230-8504 横浜市鶴見区下末吉 2-1-1)

Quality Assurance Division, Morinaga and Co., Ltd., (Shimosueyoshi 2-1-1, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8504)

^{*2} 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 (〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo (Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657)

Fig. 1 Screening method for the inhibitor of aflatoxin biosynthesis

aflatoxin 濃度を *B. megaterium* ATCC 25848 を用いたペーパーディスク法によるバイオアッセイにより測定し、コントロールに比して阻止円が小さくなる物質を検索することとした。本検索法の概略を Fig. 1 に示す。

2. aflastatin A の生産菌

aflastatin A 生産菌である MRI142 株は以下の特徴を有する。

- (1) 孢子鎖は螺旋状で、孢子表面は棘状である。
- (2) ペプトン・酵母エキス・鉄及び栄養 (Nutrient) 寒天培地上では気菌糸が形成されず、オートミール及び無機塩・スターチ寒天培地上では豊富に形成される。その色調は白色から灰色を呈し、Gray series に属する。
- (3) ペプトン・酵母エキス・鉄及びチロシン寒天培地上で褐色のメラニン様色素の生産が認められる。
- (5) 細胞壁ジアミノピメリン酸は LL タイプである。
- (6) L-ラムノース及びシュクロースは資化されない。

これらの結果から、“Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” 8th Ed.の記載より MRI142 株は *Streptomyces griseochromogenes* 種と類似の菌株であることが判明した。しかし、*S. griseochromogenes* の type strain である *S. griseochromogenes* IFO13413 株との炭素源の資化性の直接比較において、*S. griseochromogenes* IFO13413 株はシュクロースを資化しサリシンを資化しなかったことから、MRI142 株を *S. griseochromogenes* にきわめて類似する菌株である *Streptomyces* sp. MRI142 と同定した²⁾。

3. aflastatin A, B の発酵生産及び単離

aflastatin A, B の発酵生産は、ジャーファーメンターで行った。すなわち、10 L 容のジャーファー

メンターを用い、5 L のグルコース、大豆粉を主成分とする生産培地²⁾中で 27°C において 400 rpm の攪拌下、5 L/min の通気のもとに行った。培養時間は 7 日間とし、このジャーファーメンターによる培養物を aflastatin A, B の精製に供した。

aflastatin A, B の精製法を Fig. 2 に示す。即ち、アフラトキシン生産阻害活性の大部分は菌体中に見いだされるため、ろ紙を用いて培養液を濾過して菌体を回収し、蒸留水を用いてこれを洗浄した。次いで、65°C に加温下 1.2 L のメタノールにて 3 回、菌体から活性物質を攪拌抽出した。メタノール抽出液を濃縮して得た褐色スラリー状物質を水飽和ブタノールに溶解し、ブタノール相を 0.5% NaHCO₃ (300 ml)、蒸留水 (300 ml) で洗浄した。ブタノール相を回収し、減圧下で濃縮して得た褐色油状物質にテトラヒドロフランを注ぎ激しく攪拌後、暗所、室温にて 1 夜放置することにより活性物質を含むアモルファス状の沈殿を得た。沈殿をろ別、洗浄、回収し、クロロホルム-メタノール混液に懸濁した。この懸濁液から不溶物をろ別し、残さを少量のメタノールで洗浄後、回収してデシケータ内で減圧下乾燥して 632 mg の粗 aflastatins 画分を得た。粗 aflastatins 画分は、

Fig. 2 Isolation procedure of aflastatins

更に、塩基性条件下の分取 HPLC (カラム: Capcell Pak C18 AG120, 250 mm X 15 mm I.D., Shiseido Co., 溶出液: methanol-0.5% diethylamine (65:35)) にて精製した。なお、移動相に対する aflastatins の溶解度が低いため (0.6-0.9 mg/ml), 繰り返し分取 HPLC を行い活性画分を分取後、凍結乾燥して、約 20 mg の粗 aflastatins 画分から 17 mg の aflastatin A を得た。

aflastatin B は aflastatin A を分取した粗 aflastatins 画分に見いだされる。従って、上記と同様の方法で調製した粗 aflastatins 画分 (650 mg) を上記と同様の条件下で繰り返し分取 HPLC に付し、回収した aflastatin B 画分を凍結乾燥後、再度、分取 HPLC にて精製し 5.7 mg の aflastatin B を得た。

4. aflastatin A, B 及び blasticidin A の構造決定

aflastatin A, B は無色の粉末で、その分子式は、高分解能 FAB マススペクトル及び ^{13}C -NMR の解析より、それぞれ、 $\text{C}_{62}\text{H}_{115}\text{O}_{24}\text{N}$ 及び $\text{C}_{61}\text{H}_{113}\text{O}_{24}\text{N}$ と決定された。また、aflastatin A については元素分析によっても本分子式が支持された。aflastatins は特徴的な紫外外部吸収スペクトルを有する。すなわち、その紫外外部吸収スペクトルは pH 依存性であり、中性、塩基性溶液中では 299 及び 247 nm に吸収極大を有し、酸性溶液中では 314 及び 237 nm に極大がシフトする。これは tetramic acid に特徴的な光学的性質である。aflastatin A, B の赤外吸収スペクトルは、ともに、 $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ に水酸基由来の吸収を有し、 1600 cm^{-1} にカルボニル基由来の強い吸収が認められた。

aflastatin A の NMR 解析によって、部分的な構造はいくつか判明したが aflastatin A 自体の構造の全容を明らかにすることは出来なかった。一方、一部の部分構造にはいくつかの 1,2-ジオール構造が含まれていたことから過沃素酸酸化により aflastatin A を分解してその構造を解析することとした。即ち、過沃素酸酸化により得られた 3 種類のフラグメント分子について種々の NMR スペクトルを解析することにより (Fig. 3), 更に、C-33 と C-37 の間のエーテル結合によりテトラヒドロピラン環が形成されている事を確認することによって aflastatin A の平面構造を決定することが出来た³⁾。

aflastatin B についても NMR の解析等により aflastatin A の *N*-デメチル体であることが判明

Fig. 3 Degradation experiments of aflastatin A

(A): Partial structure of aflastatin A deduced from the analysis of NMR spectra of aflastatin A itself.

Fig. 4 Structures of aflastatin A and its relating compounds.

Fig. 5 Biosynthetic origin of aflastatin A

—■— H_3COOH , —●— $\text{CH}_2(\text{OH})\text{COO}$, —▲— $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$, —/— CH_3COCOHH

した。

blasticidin A は 1968 年に Kono 等によって発見された、放線菌由来の抗真菌活性を有する抗生物質であるが⁴⁾、その構造は明らかになっていなかった。ここで、blasticidin A の理化学的性質及び生物活性が aflastatin A のものと酷似していたため、blasticidin A についても単離を行い aflastatin A と同様の手法によりその構造を明らかにした⁵⁾。

aflastatin A, B 及び blasticidin A の構造は tetramic acid 部位を有する直鎖状ポリオールであり、これまでに例のない特異なものであった (Fig. 4)。

5. aflastatin A の生合成

aflastatin A は直鎖状ポリオール構造を有することからポリケタイド経路により生合成されることが予想された。そこで、aflastatin A の生合成を、 ^{13}C ラベルした酢酸、プロピオン酸の取り込み実験により調べたところ、aflastatin A の C_2 , C_3 ユニットの大部分は酢酸及びプロピオン酸由来であったが、C-7,8 の C_2 ユニットと C-27~30 および C-33~36 の 2 カ所の C_4 ユニットに酢酸分子ではない事が判明した。

これらのユニットの由来を解明すべく ^{13}C ラベルしたグルコース、グリコール酸の取り込み実験を行ったところ C-7,8 の C_2 ユニットと C-27~30 および C-33~36 の 2 カ所の C_4 ユニットにグリコール酸分子が取り込まれ、その生合成は、通常のポリケタイド経路と異なる新規なものであった (Fig. 5)。

Table 1 Effect of aflastatin A and B on aflatoxin production of *A. parasiticus* NRRL 2999 in liquid culture*.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Aflastatin A		Aflastatin B	
	Growth ($\text{m} \pm \text{S.D.} : \text{mg}/10 \text{ ml}$)***	Aflatoxin** conc. ($\text{m} \pm \text{S.D.} : \mu\text{g/ml}$)***	Growth ($\text{m} \pm \text{S.D.} : \text{mg}/10 \text{ ml}$)***	Aflatoxin** conc. ($\text{m} \pm \text{S.D.} : \mu\text{g/ml}$)***
0	58 ± 2.0	4.1 ± 0.73	34 ± 1.0	4.7 ± 1.33
0.03	63 ± 7.9	2.3 ± 0.36	33 ± 0.6	1.5 ± 0.34
0.125	61 ± 4.4	2.0 ± 0.57	32 ± 0.6	0.2 ± 0.40
0.5	63 ± 5.0	not detected	32 ± 0.6	not detected

* Potato dextrose medium

** Total value of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂

*** $n=3$

Table 2 Effect of aflastatin A and blasticidin A on aflatoxin production of *A. parasiticus* NRRL 2999 on agar plate*.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Aflastatin A		Blasticidin A	
	Diameter of colony ($\text{m} \pm \text{S.D.} : \text{mm}$)***	Aflatoxin** conc. ($\text{m} \pm \text{S.D.} : \mu\text{g/ml}$)***	Diameter of colony ($\text{m} \pm \text{S.D.} : \text{mm}$)***	Aflatoxin** conc. ($\text{m} \pm \text{S.D.} : \mu\text{g/ml}$)***
0	81 ± 1.0	13.8 ± 0.81	81 ± 1.0	13.8 ± 0.81
0.03	78 ± 2.0	7.1 ± 2.15	79 ± 1.8	7.2 ± 1.88
0.125	65 ± 1.5	0.8 ± 0.60	71 ± 5.0	1.1 ± 0.70
0.5	55 ± 2.8	not detected	40 ± 3.1	not detected

* Potato dextrose agar plate

** Total value of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂

*** $n=3$

6. aflastatin A, B 及び blasticidin A の生物活性

aflastatin A を 0.03 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した PDA 培地で *A. parasiticus* NRRL 299 を培養するとアフラトキシンの生産は約 50% に減少し, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではアフラトキシンは全く生産されなかった。その際, 菌の生育阻害はほとんど認められず, aflastatin A はアフラトキシンの生産阻害に対し高い選択性を示した。

また, aflastatin B 及び blasticidin A も aflastatin A と, ほぼ同様の生理活性を有していた (Table. 1, Table. 2)。

引用文献

- 1) Massey, T. E., Stewart, R. K., Daniels, J. M., Liu, L.: *Proc. Exp. Biol. Med.*, **208**, 213-227 (1995)
- 2) Ono, M., Sakuda, S., Suzuki, A., Isogai, A.: *J. Antibiot.*, **50**, 111-118 (1997)
- 3) Sakuda, S., Ono, M., Furihata, K., Nakayama, J., Suzuki, A., Isogai, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7855-7856 (1996)
- 4) Kono, Y., Takeuchi, S., Yonehara, H.: *J. Antibiot.*, **21**, 433-438 (1968)
- 5) Sakuda, S., Ono, M., Ikeda, H., Inagaki, Y., Nakayama, J., Suzuki, A., Isogai, A.: *Tetrahedron lett.*, **38**, 7399-7402 (1997)