

〔醸酵工学 第57巻 第1号 15-19. 1979〕

Aspergillus terreus によるサイトカラシンEの生産

藤島 鉄郎・市川 雅常・石毛 英幸
吉野 宏・大石 洵一*・池上 四郎*

ヤマサ醤油(株)研究所, * 科学技術庁放射医学総合研究所

Production of cytochalasin E by *Aspergillus terreus*. FUJISHIMA, T., M. ICHIKAWA, H. ISHIGE, H. YOSHINO, J. OHISHI*, and S. IKEGAMI* (Research Laboratory of Yamasa Shoyu Co. Ltd., Choshi; *National Institute of Radiological Sciences, Chiba 288) *Hakkokogaku* 57: 15-19. 1979.

Cytochalasin E was produced by a strain M-120-7 grown on wheat bran. The strain was freshly isolated from soil and was proved to be a new strain of *Aspergillus terreus*. The solid surface culture on wheat bran (3 kg) was extracted with 50% acetone (33 l). The extract was adsorbed on a column of Diaion HP-40 (2.5 l), and 6.5 g of almost pure cytochalasin E was obtained upon elution with a linear gradient of acetone from 40% to 100%. For the production of cytochalasin E by *A. terreus* M-120-7, wheat bran culture was much more effective than liquid and sponge culture with glucose-peptone medium.

サイトカラシン E^{1,2)}は、サイトカラシン A,^{3) B,⁴⁾ C,⁴⁾ D^{4,5)}および F¹⁾と同様に、細胞原形質の分裂を抑制する生理活性物質^{6,7)}であり、細胞生理活性と生体膜との関連性などを追求して行く際の重要な試薬として注目を浴びている。サイトカラシン化合物は、現在まで25種が報告され、その生産菌として、*Aspergillus clavatus*, *Chaetomium cochloides*, *Hormiscium* sp., *Helminthosporium dematiodeum*, *Materrhizium anisopliae*, *Rosellinia necatrix*, *Zygosporium mansonii*, *Nigrosabulum* sp., *Penicillium aurentiovirens*, *Phoma* sp., *Phomopsis papali* などが報告されている。⁸⁾ しかし一般に、微生物によるサイトカラシン類の生産性は低く、各種薬理作用を検討するにたる十分な量のサイトカラシン類を得ることは困難である。今回サイトカラシン類の生産菌を広く土壌より検索した結果、著量のサイトカラシンEを生産する *Aspergillus terreus* に属する新菌株 M-120-7 を見いだしたので報告する。}

実験材料および方法

使用菌株 当研究所保存の糸状菌約300株、および自然界より分離した糸状菌約800株を使用した。土壌より糸状菌の分離は、次のような方法で行った。各

地より採取した土壌1gに殺菌水10mlを加え、28°C、30分間振とう後、上澄液0.2mlをグルコース・ペプトン寒天培地(グルコース5%、ポリペプトン0.5%、リン酸1カリウム0.05%、リン酸2カリウム0.05%、塩化カルシウム0.04%、硫酸マグネシウム0.04%、pH 6.0)に植菌し、28°C、4日間培養した。培養終了後、糸状菌のみをグルコース・ペプトン培地に釣菌し、純化後供試菌とした。

培地および培養条件 サイトカラシン類生産菌のスクリーニング培地として、ふすまを使用した。200ml容三角フラスコにふすま4g、水2.4mlを加え充分にかくはん後、120°C、30分間殺菌した。放冷後、試験菌を植菌し、28°C、7日間培養した。液体培養には、グルコース・ペプトン培地を使用した。スポンジ培養⁹⁾は、次のように行った。500ml三角フラスコに1辺が0.5~1cmよりなる立方体のウレタンスポンジ1.5gに3倍濃度のグルコース・ペプトン培地30mlを添加、殺菌後植菌し、28°C、7日間培養した。

サイトカラシンEの定量 ふすま麩に50%アセトン溶液40mlを加え、28°C、1時間振とう抽出後ろ過し、そのろ液を試験溶液とした。

a) TLCによる定量 ふすま麩のアセトン抽出液ないしその10倍濃縮液をシリカゲルプレートにスポッ

とし、クロロホルム：メタノール=10：1を用いて展開し、風乾後水を薄層プレートに噴霧し、 R_f 0.73 付近の白色スポットをかき取り、0.5 N 塩酸を含む50%メタノールで抽出し、284 nm の吸光度より authentic サイトカラシン E (Aldrich 社製、市販品) を標準として定量した。

b) 細胞増殖抑制活性よりの定量 アセトン抽出液ないし TLC 分離液のマウス白血病細胞 L 5178 Y の細胞増殖阻害より、サイトカラシン E の bioassay を行った。細胞増殖阻害活性は Thayer の方法¹⁰⁾に準じ、使用培地は RPMI-1640¹¹⁾ を改変して使用した。すなわち、 1.4×10^6 個/ml の細胞懸濁液 0.9 ml と試料の希釈液 0.1 ml を混和し、48時間、37°C で培養したのち、細胞数を計測し、対照に対する50%増殖阻害希釈度から、試料中のサイトカラシン E 量を算出した。なお、サイトカラシン E の L 5178 Y の50%増殖阻害濃度は、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

実験結果

サイトカラシン E 高生産菌 M-120-7 供試菌株約 1,100 株を固体培養法でスクリーニングした結果、長野県上田市にて採取した土壌から分離した糸状菌 M-120-7 が著量のサイトカラシン E を生産することを見いだした。M-120-7 以外の供試菌株にも若干のサイトカラシン類の生産が見られるものもあったが、M-120-7 の場合には、麴のアセトン抽出液 1 l (ふすま 100 g 相当分) 当たり 200 mg 前後のサイトカラシン E の生産を認め、その生産性は顕著であった。

M-120-7 の麴アセトン抽出液よりサイトカラシン E の分離 ふすま 3 kg に 1.8 l の水を加え充分に混合後、その 800 g ずつを布蓋付金属製バットに盛り込み、120°C、30分間殺菌した。冷却後あらかじめ前培養した M-120-7 の種麴を植菌し、28°C、1週間培養した。このふすま麴に50%アセトン溶液 33 l を加え、1時間かくはん後、遠心分離によって麴粕を分離し、抽出液 30 l を得た。このアセトン抽出液をハイポラスイオン交換樹脂、ダイヤイオン HP-40 の 2.5 l (径 8 cm, 長 1.5 m) のカラムに吸着後、40%アセトン溶液 5 l で洗浄した。さらに 40%アセトン 4 l と 100%アセトン 4 l の濃度勾配溶出法で溶出した。1フラクション 15 g ずつ分画したところ、フラクション番号 131~147 に結晶の析出が見られた。ろ別した粗結晶をアセトンより再結して、結晶 6.5 g を得た。精

製結晶は、authentic サイトカラシン E と TLC の R_f で一致し、Fig. 1 に示した本標品の赤外吸収スペクトルは authentic サイトカラシン E のそれと一致した。その他、NMR スペクトル、紫外吸収スペクトルも合致し、また元素分析値、分子量は計算値と一致し、融点の値も一致した (Table 1) ことより、分離菌 M-120-7 より得た結晶は、サイトカラシン E と同定した。さらにマウス白血病 L 5178 Y 細胞に対する細胞増殖抑制活性も authentic サイトカラシン E と一致した。このようにして得たサイトカラシン E は光に比較的安定で、クロロホルム、酢酸エチル、メチルアルコール、エチルアルコール、アセトン、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドには溶解し、ベンゼン、エーテルには難溶、水、石油エーテルに不溶であった。

M-120-7 の菌学的性質 M-120-7 の菌学的性質は、次の通りである。本菌は、被子器および子のうを形成せず、頂のうは桿棒状ではない。集落は緑色ではなく、分生子柄の壁は、平滑、無色で、その上端部は黄褐色で、分生子の連鎖は円柱状の束となり、淡い桃褐色である。分生芽細胞柄は、平滑、無色で、直径 4.5~5.5 μm 、長さ 100~200 μm であり、分生芽胞頭は、鈍黄色、肉桂色ないし黄褐色で、直径 30~50 μm 、長さ 150~400 μm の円柱状をしている。頂の

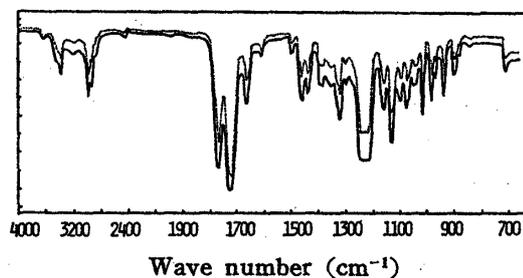


Fig. 1. IR spectra of cytochalasin E.

— Authentic, - - - Sample.

Table 1. Elementary analysis and physical properties of cytochalasin E produced by *A. terreus* M-120-7.

	C	H	N
Calcd.	65.48%	6.87%	2.73%
Found	65.38%	6.87%	2.74%
Molecular weight		496 ± 2	
Melting point		207°C (dec.)	

うは、直径 10~16 μm の半球状をしており、梗子は2段で、第一梗子は直径 2~2.5 μm 、長さ 5~6 μm 、第二梗子は直径 1.5~2 μm 、長さ 6~7 μm である。芽胞子はわずかに楕円形で無色をしており、2~3 μm \times 3~4 μm である。各培地における生育状態は、次の通りである。まず麦芽エキス寒天培地では生育良好で、あまり拡散することなく、クッション状を示す。表面の色は黄褐色ないし鈍黄色で、周辺は肉桂色をしている。裏面は黄褐色である。次にツァペック寒天培地においては発育良好で、放射状の浅い溝が見られる。中心部は柔毛状に盛り上がり、淡い黄褐色を示すが、周辺部は肉桂色ないし黄褐色のピロード状であり、裏面は淡黄色ないし黄褐色である。以上の菌学的性質を The Genus *Aspergillus*¹²⁾ に照合したところ、*Aspergillus terreus* に属する菌株と推測した。さらに麦芽エキス寒天培地で培養した時、菌核よう (sclerotium-like) のかたまりが形成しなかったことより、本菌は *A. terreus* var. *africanus* には属さない。また、MY 20 寒天培地 (ペプトン 0.5%、酵母エキス 0.3%、麦芽エキス 0.3%、ブドウ糖 20%、寒天 2%) で培養した結果、本菌は比較的厚い細胞壁を有しておらず、麦芽エキス寒天培地でコロニーがピロード状であることより、本菌は *A. terreus* var. *aureus* に属さない。これら実験結果を総合して、本菌は *A. terreus* に属する菌株と同定した。なお本菌は、工業技術院微生物工業技術研究所に *A. terreus* M-120-7 として寄託された。

M-120-7 と *A. terreus* 標準株との比較 本菌と醸酵研究所の *A. terreus* (IFO 7078) との菌学的性質を比較した。生育 pH 範囲は、両菌株共に 3~11 と一致した。次にグルコース・ペプトン培地 50 ml を 200 ml の三角フラスコに入れ、植菌後各温度で 96 時間静置培養を行った時の乾燥菌体量を Fig. 2 に示す。Fig. 2 より明らかなように、M-120-7 は 40°C では全く生育できなかったのに対して、IFO 7078 株は 45°C でも若干の生育が見られた。また最適生育温度は、M-120-7 が 30°C であるのに対して、IFO 株では 35°C と相違が見られた。次に生育に及ぼす炭素源の効果について検討した。その結果を Table 2 に示す。両菌株共に、デキストリン、マンノース、グルコース、可溶性デンプン、サッカロースをよく資化し、ラクトース、アラビノース、ソルビットにはあまり生育しなかった。M-120-7 と IFO 7078 株との間には、炭素源

の資化性に関しては、あまり顕著な差異は見られなかった。Table 3 は、サイトカラシンEの各種培養条件における生産性を検討した結果である。4菌株ともに液体培養およびスポンジ培養では、サイトカラシンEの生産はほとんど認められなかった。スポンジ培養の場合、酵素生産の良好な条件であった、炭酸カルシウ

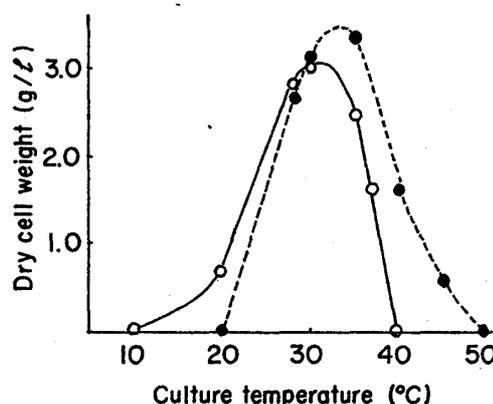


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of two strains of *A. terreus*.

Dry cell weight was determined after stationary culture in 50 ml of glucose-peptone medium for 96 hr.

○—○ *A. terreus* M-120-7,
●—● *A. terreus* IFO 7078.

Table 2. Effect of carbon source on the growth of 2 strains of *A. terreus* in liquid culture.

Carbon source	Dry cell weight (g/l)	
	IFO 7078	M-120-7
Glucose	1.51	4.20
Saccharose	0.64	1.69
Lactose	0.24	0.19
Galactose	0.17	0.40
Mannose	1.6	2.97
Sorbose	0.12	0.37
Arabinose	0.47	0.22
Xylose	0.31	1.90
Fructose	0.63	1.47
Raffinose	0.50	0.41
Sorbit	0.09	0.07
Soluble starch	1.96	1.78
Dextrine	2.61	3.20
Sodium acetate	0.48	0.28

Glucose-peptone medium was employed except that glucose was replaced with various carbon sources as indicated in the table.

Table 3. Production of cytochalasin E by several strains of *A. terreus*.

Culture method	IFO 6123	IFO 7078	IFO 8835	M-120-7
Liquid ^{a)}	trace	trace	trace	trace
Sponge ^{b)}	trace	trace	trace	trace
Solid ^{c)}	<10 $\mu\text{g/ml}$	<10 $\mu\text{g/ml}$	<10 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$

^{a)} Glucose-peptone medium.

^{b)} Sponge cubes wetted with liquid medium of 3 times higher concentration than the standard glucose-peptone medium.

^{c)} Wheat bran wetted with 0.6 weight of water.

ム、フィチン、オリーブ油およびふすま抽出液を添加したが、サイトカラシンEの生産量が10 $\mu\text{g/ml}$ を超えることはなかった。固体培養に於ては、M-120-7がふすま麩の10倍量(v/w) 50%アセトン抽出液当たり400 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンEの生産量があったのに対して、標準株では10 $\mu\text{g/ml}$ 以下の微量な生産量であった。

考 察

サイトカラシンの生理活性としては、細胞原形質分裂の阻害^{6,7)} 細胞運動機能の可逆的阻害^{6,7)} および脱核の誘導^{13,14)}が知られている。これらの他に、細胞膜成分の生合成と取り込みの減少、食細胞作用および表面接着性の変化、血小板凝集、心筋収縮生長ホルモン遊離など広い生理活性を有することが明らかになった。¹⁵⁾ サイトカラシンEの生産菌としては、*R. necatrix*^{1,2)}および*A. clavatus*¹⁶⁾が知られているが、後者は一度*A. glaucus*と誤認されている。¹⁷⁾ 英国ICI社の実験例(使用菌株*R. necatrix*)によると、25°C、22日間の液体培養で、サイトカラシンEの生産量は、12 mg/lと記述されており、¹⁸⁾ 工業的規模でのサイトカラシンEの生産量には、あまりにもその量は少ない。今回土壌より検索して得た*A. terreus* M-120-7のサイトカラシンEの生産量は、ふすま1g当たり2.2 mg、ふすま麩の10倍量(v/w)のアセトン抽出液中には186 mg/lの濃度にあたり、ICI社の*R. necatrix*の液体培養でのサイトカラシンEの生産量の約15倍に相当する。*R. necatrix*の場合、著者らの実験によると、固体培養ではサイトカラシンEの生産はほとんど見られなかった。このように微生物によるサイトカラシンEの生産は、菌株によって異なると同時に培養方法によって、その生産性が大きく相違する等まだ不明の点が多い。本報の土壌よりの分離菌株M-120-7は、

従来の*A. terreus*株と比較して、最適生育温度および生育温度範囲が異なり、その上サイトカラシンEの生産が著しく相違するので、本菌は*A. terreus*に属する1新菌株と考えられる。本菌によるサイトカラシンEの生産は、グルコースを主炭素源とした液体培養およびスポンジ培養ではほとんど見られず、ふすまを用いた固体培養においてのみ著量に蓄積した。今回スクリーニング培地として固体培地を用いた理由は、液体培養では既知の菌株を選択する可能性が高い点と、従来液体培養ではサイトカラシン類の生産性なしと判定された菌株でも、固体培養では生産性が発揮されることが想定されたことによる。*H. dematioides*の場合、サイトカラシンA, B, Fを、*M. anisopliae*ではサイトカラシンC, Dを同時に生産することが明らかになっているが、本菌M-120-7の固体培養の抽出液中には、サイトカラシンE以外の同族体は全く検出できなかった。

要 約

長野県上田市の土壌より分離した糸状菌M-120-7が、固体培養で著量のサイトカラシンEを生産することを見いだした。本菌の菌学的性質を検討した結果、*Aspergillus terreus*に属する新菌株であることがわかった。本菌のサイトカラシンEの生産は、液体およびスポンジ培養ではほとんど見られず、ふすまを用いる固体培養法が有効であった。M-120-7のふすま麩に、50%アセトン溶液10倍量(v/w)添加してサイトカラシンEを抽出し、この抽出液をダイヤイオンHP-40に吸着し、さらに洗浄後アセトンで溶出すると、白色結晶として析出したサイトカラシンEの生産量は、ふすま1g当たり2.2 mgであった。

終わりに、サイトカラシンEの同定に協力した当研究所渋谷進氏、坂田純二氏、またサイトカラシンEのbioassayを担当した小玉健次郎氏に感謝します。

文 献

- 1) Aldridge, D. C., Burrows, B. B., Turner, W. E. : *Chem. Commun.*, 148 (1972).
- 2) Aldridge, D. C., Greatbanks, D., Turner, W. B. : *Chem. Commun.*, 551 (1973).
- 3) Aldridge, D. C., Armstrong, J. J., Speaks, R. N., Turner, W. B. : *J. Chem. Soc.*, (C), 1667 (1967).
- 4) Aldridge, D. C., Turner, W. B. : *J. Chem. Soc.*, (C), 923 (1969).
- 5) Minato, H., Matsumoto, M. : *J. Chem. Soc.*, (C), 38 (1970).
- 6) Carter, S. B. : *Nature*, 213, 261 (1967).
- 7) Krishan, A. : *J. Cell. Biol.*, 54, 657 (1972).
- 8) Natori, S. : *Mycotoxins in Human and Animal Health* (Rodricks, J. V., Hesseltine, C. W., Mehlman, M. A.), p. 559, Pathotox. Publ., Park Forest South, II. (1977).
- 9) 藤島, 内田, 吉野 : *醸工*, 50, 724 (1972).
- 10) Theyer, P. S., Himmelfarb, P., Watts, G. L. : *Cancer Chemotherapy Report* (Part 2), 2 (1), 1 (1971).
- 11) Moore, G., Mount, D., Tara, G., Schwartz, N. : *Cancer Res.*, 23, 1735 (1963).
- 12) Raper, K. B., Fennell, D. L. : *The Genus Aspergillus*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1965).
- 13) Prescott, D. M., Myerson, D., Wallace, J. : *Exp. Cell. Rev.*, 71, 480 (1972).
- 14) Carter, S. B. : *Endeavour*, 31, 77 (1972).
- 15) Copeland, E. G. M. : *Cytologia.*, 39, 709 (1974).
- 16) Büchi, G. B., Kitaura, Y., Yuan, S. S., Wright, H. E., Clardy, J., Demain, A. L., Glinsukon, T., Hunt, N., Wogan, G. N. : *J. Amer. Chem. Soc.*, 95, 5423 (1973).
- 17) Büchi, G., Kaubert, D. H., Shank, R. C., Weinreb, S. M., Wogan, G. N. : *J. Org. Chem.*, 36, 1143 (1971).
- 18) ダグラス・ブロードン : 特開昭46-6943.
(昭53.7.31 受付)