

Penicillium notatum Westlingの生産するNo.386物質

誌名	玉川大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University
ISSN	0082156X
著者名	古田,喬樹 菅野谷,裕子 酒井,平一
発行元	玉川大学農学部
巻/号	26号
掲載ページ	p. 16-22
発行年月	1986年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Penicillium notatum Westling の生産する No. 386 物質

古田 喬樹・菅野谷裕子・酒井 平一

No. 386 Substance Produced by
Penicillium notatum Westling

Takaki Furuta. Yuko Suganoya and Heiichi Sakai

緒 言

我々は各地の土壤中より糸状菌を分離し、これら糸状菌の生産するインドール・アルカロイドについて Allport-Cocking 反応およびレタス実生を用いて検索をおこなって来た。今までに Furuta は *A. fumigatus* Fres. 株より gliotoxin をレタス実生生育阻害物質として単離し、*Aspergillus japonicus* Saito 株より微生物の代謝生産物として初めて cyclo-clavine を単離した (古田ら 1984, Furuta et al. 1982)。

本研究では分離した糸状菌株の培養物中のインドール・アルカロイド生産性についてシリカゲル薄層クロマトグラフィーにて検討をおこなっていたところ、No. 386 株の培養物が Ehrlich 反応によって著しい淡黄緑を呈したのでこの物質を単離し結晶として得た。この結晶の理化学的性質を測定したところ、この物質の分子式として $(C_{20}H_{23}N_2O_3S_2)$ が得られた。既往の文献を調べたところ、これと同じ分子式で 1, 4-dimethyl-3-[(4'- γ -dimethyl allyloxy phenyl) methyl]-3, 6-bis (methylthio) piperazin-2, 5-dione が知られているが (Hanson et al., 1981), これとは異なる物質であった。またこの物質のレタス実生生育に対する影響についても検討した。以下その研究経過について記述する。

実験材料および方法

1. 実験材料

各地より採集した土壤を滅菌水にて希釈し、表 1 に示す Rose Bengal 寒天培地に塗布し 27°C 7日間培養し糸状菌類のコロニーの成育をみた。これらのうち、単一コロニーについて、表 2 の Potato Dextrose 寒天斜面培地に鈎菌し 770 株を分離し本研究の供試菌株とした。M.G.S. 培地

Table 1. Rose Bengal Agar medium

D-Glucose	10 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Rose bengal	0.035 g
Streptomycin	0.030 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
pH	6.5

Table 2. P.D. Agar medium

200 g of Potatoes peeled and diced boiled and filtered	500 ml
D-Glucose	20 g
Agar	15 g
Distilled water	500 ml
pH	6.5

Table 3. M.G.S. medium

Mannitol	30 g
Glucose	10 g
Succinic acid	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
NH ₄ OH to adjust the pH to 5.6	

(表3)にて培養された供試菌株のインドール・アルカロイドの生産性の試験は、供試菌培養液 1ml に Allport-Cocking 反応試薬 2ml を試験管内壁を伝わらせて静に重層し、その液と液との境界面にそって出現した色帯の青色度合いを観察し、色調の強く出現する菌株を求めた。供試菌株中、No. 386 株は最も強くこの反応を呈した。

500ml 容ルーフラスコに 100ml Potato Dextrose 寒天培地を分注し、滅菌後、寒天平板とし No. 386 株を接種し 27°C 6日間培養し、分生子を着生させた。このルーフラスコに、φ6mm ガラスビーズと滅菌水 50ml を注入し、静かに攪拌し分生子を滅菌水中によく懸濁させ、分生子懸濁液を作成した。

500ml 容三角フラスコに、M.G.S. 培地 100ml を分注、滅菌後、被検菌株の分生子懸濁液を 1ml 接種し、27°C 7日間振盪培養をおこなった。

2. 菌株の同定

常法にしたがい、被検菌株のスライド培養、巨大コロニーについて形態学的諸性質を調べた。培地としては、表4に示す Czapek-Dox 寒天培地、表5に示す Malt extract 寒天培地を用いた。

3. レタス実生生育測定法

レタス実生生育の測定は Frankland and Wareing (1960) の方法を参考にした。

直径 9 cm のシャーレに濾紙を 2 枚敷き蒸留水で湿らした後、レタス種子を播種して 25°C 2 日間暗所で発芽させ、生長のそろった実生を実験に供した。

Table 4. Czapek-Dox Agar medium

NaNO ₃	3g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
KCl	0.5g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
Sucrose	30g
Agar	15g
Distilled water	1000 ml
pH	6.5

Table 5. Malt extract agar medium

Malt extract	20g
D-Glucose	20g
Peptone	1g
Agar	15g
Distilled water	1000 ml
pH	6.5

直径 3 cm のシャーレに脱脂綿を薄く敷いた物を準備しておき、No. 386 物質をメタノールに溶解して 2, 5, 10, 20, 50 および 100 ppm の溶液を作成し、それぞれの溶液 1 ml ずつを、脱脂綿を薄く敷いたシャーレに分注後風乾してメタノールを良く除いた後、これに蒸留水を 1 ml ずつ入れ、2 日間生育させた実生を 10 個体移植し、6,800 Lux 蛍光灯照明下で 4 日間生育させた後、生育した実生を脱脂綿から静かにはずし根および子葉下軸の長さを測定した。なお、コントロールには試験液に蒸留水を使用した。

4. 機器分析法

UV 吸収スペクトルは試料をメタノールで溶解し、島津 UV-240 により測定した。

IR 吸収スペクトルは KBr 錠剤法にて、島津 IR-420 により測定した。

MS スペクトルは、島津 GCMS-7000 を用いイオン価電圧 70 mV にて測定した。

NMR スペクトルは試料を CDCl₃ に溶解し、日本電子 GX-270 により測定した。

実験結果および考察

1. 菌株 No. 386 株の同定

No. 386 はペニシリウム属に属し、次のような形態学的諸性質が得られた。(Czapek-Dox 寒天平板培地において 25°C, 14 日間培養を行ない巨大コロニーを得た。その色調は培養初期では薄い blue-green であり、培養時間の経過とともに深い blue-green の色調になった。コロニーを横より観察したところではその厚さは薄い。培養 7 日目のコロニーの直径の大きさは 40 mm であった。コロニー全体が分生子でおおわれ、その表面の状態はフェルト状であり、コロニーの縁は 1~2 mm くらいは白色である。巨大コロニーの裏面は黄色であり古くなったものは褐色に変わり、

その色素は培地に拡散した。

Conidiophores の大きさは変化しやすく、その幅は $2.5\sim 4.0\mu$ で長さは $300\sim 600\mu$ 、その表面は無色で滑面である。

Penicilli は非対称の枝別れがあり副輪性である。

Metulae 3~5 個で 1 つの束になっている、その幅は $2\sim 3\mu$ 長さは $10\sim 20\mu$ である。

Sterigmata は輪生になって、幅は $1\sim 3\mu$ で長さは 8μ である。

Conidia は球形から亜球形であり、直径は 3μ であり、表面は滑面であり、黄緑色を呈している。

これらの結果を Raper and Thom (1949) の A Manual of the Penicilla の記載を参照し、検索の結果 *Penicillium notatum* Westling と一致した。本菌は対照として調べた *Penicillium notatum* IFO 4626 と形態学的によく一致した。従って No. 386 株を *Penicillium notatum* Westling と同定した。

2. 代謝物の分離

フェルンバッハフラスコに、M.G.S. 培地 1000 ml を分注、滅菌後、被検菌株の分生子懸濁液を 10 ml 接種し、 27°C 21 日間静置培養をおこなった。このようにして得た培養液を濾過し、全体で 10 l の培養濾液を得た。これをアンモニア水にて pH 10 に調整し、半量の酢酸エチルを加え良く攪拌したのち、酢酸エチル層と水層とに分離し、水層には酢酸エチルを加え、同様の操作を繰り返した。

菌体については 50% アセトン水 2 l に一夜浸漬したのち濾過し、濾過液をロータリーエバポレーターにてアセトンを留去したのちアンモニアにて pH 10 に調整し、同量の酢酸エチルを加え良く攪拌したのち、酢酸エチル層と水層とに分離し、水層には同量の酢酸エチルを加え、同様の操作を繰り返した。この様にして得た酢酸エチル層を集め、フラッシュエバポレーターにて 500 ml 容になるまで濃縮し、無水硫酸ナトリウムにて脱水したのち、ロータリーエバポレーターにて乾固した。この乾固物を少量のクロロホルムに溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル 60, 70~230 メッシュメルク製） $4\times 40\text{ cm}$ に付した。溶出溶媒としてクロロホルムを 700 ml 流下したのちにクロロホルム：酢酸エチル (9:1 v/v) 1000 ml の混液に変え流下した。流下液は 10 ml ずつフラクションコレクターにて画分し、各画分をキャピラリーにてシリカゲル薄層にスポットし Ehrlich 反応試薬を噴霧し青色を呈した画分を集め濃縮したところ油状物質を得た。この物質をフラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカゲル 60, 230~400 メッシュメルク製、草野製ガラスカラム $\phi 22\text{ mm}$ ）にかけた。溶出溶媒はヘキサン：酢酸エチル (4:1 v/v) にて溶出し、紫外線吸収モニター (254 nm) にて吸収を観察したところ、A 画分 180~240 ml および B 画分 290~320 ml の画分に吸収帯が出現した。A 画分および B 画分をそれぞれ濃縮しシリカゲル薄層にスポットしメタノール：クロロホルム (1:4 v/v) の展開溶媒にて展開したのち、Ehrlich 試薬にて呈色を行ったところ、A 画分には青色の呈色像が出現したが、B 画分には呈色像が出現しなかった。B 画分に 30% H_2SO_4 を噴霧して 110°C にて 5 分間加熱したところ Rf 0.7 に単一スポットが出現したので、この画分を濃縮した。

この濃縮物を ODS カラムをつけた高速液体クロマトグラフィー（島津製）に付した、溶出溶媒として酢酸エチル：メタノール (1:9 v/v) を 1.5 ml/min の流速の条件を用いてクロマトグラフィーを行ったところ 20 分後に単 1 ピークとして出現した。この溶出画分を濃縮乾固後、この乾固物に少量のメタノールを加え加熱し乾固物を完全に溶解したのち放冷して結晶化した。この溶液を

濾過して結晶を得た。結晶に少量のメタノールを加え加熱し結晶を完全に溶解したのち放冷して再結晶化した。この様にして無色針状結晶 (30mg) を得た。これを No. 386 物質と仮称した。

3. No. 386 物質の理化学的性質

この結晶の機器分析の結果、融点は 137°C であり、その赤外線吸収スペクトラムは図1に示す。

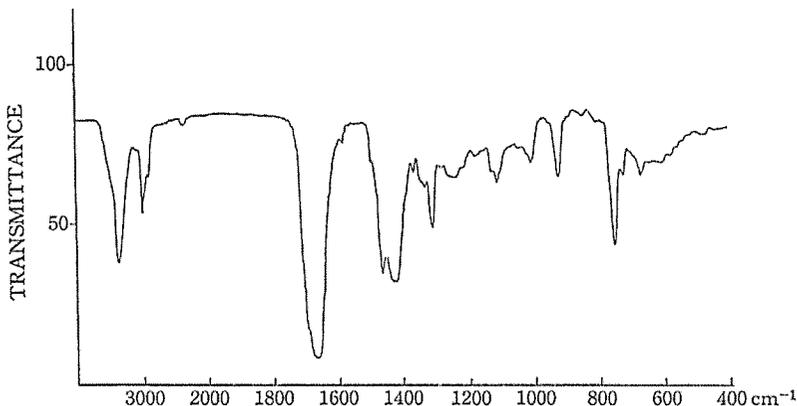


Fig. 1. IR spectrum of No. 386 substance

紫外線吸収スペクトラムは UV λ_{\max} 283 (ϵ 12000), 277 (13000) および 228 (17000) nm に吸収極大が存在した。MS スペクトルは、親イオンピークが MS m/z 408 M^+ 存在し、その分子組成は $(C_{20}H_{28}N_2O_5S_2)$ であった。これと同じ分子式を持つ天然物を調べたところ、1, 4-dimethyl-3-[(4'- $\gamma\gamma$ -dimethyl allyloxy phenyl) methyl]-3, 6-bis (methylthio) piperazin-2, 5-dione が知られているのみであるが、この物質は油状でしか得られていない、紫外線吸収スペクトラムでは No. 386 物質と同じ吸収帯である。本物質と No. 386 物質の 1H NMR スペクトラムを比較すると表6のとうり、この両者は明らかに異なるものと考えられる。従って No. 386 物質は新規な

Table 6. 1H NMR Spectra of No. 386 substance and 1, 4-dimethyl-3-[(4'- $\gamma\gamma$ -dimethyl allyloxy phenyl) methyl]-3, 6-bis (methylthio) piperazin-2, 5-dione

No. 386 substance	1, 4-dimethyl-3-[(4'- $\gamma\gamma$ -dimethyl allyloxy phenyl) methyl]-3, 6-bis (methylthio) piperazin-2, 5-dione
chem. shift, δ	chem. shift, δ
1.57	1.70
1.71	1.77
1.77	2.13
1.95	2.26
3.04	2.93
3.06	3.04
3.25	3.20
3.65	3.53
4.45	4.18
4.62	4.45
5.44	5.47
6.79	6.79
7.05	6.98

構造を有する微生物生産物でありその構造については別に報告する予定である。

4. レタス実生生育試験

No. 386 物質の各濃度における子葉下軸の長さを図 2 に示した。また各濃度における根の長さは図 3 に示した。

この実験から No. 386 物質の子葉下軸に対しての作用は図 2 に示されたごとく濃度が高くなるにしたがって少しずつであるが阻害作用が現れている。No. 386 物質の根に対しての作用に図 3 に示すように濃度が高くなるにしたがって僅かながら促進作用が認められた。

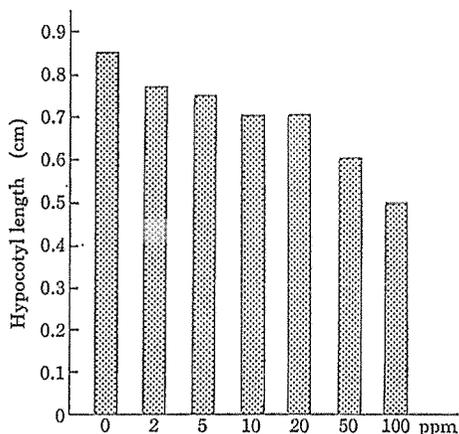


Fig. 2 Effect of No. 386 substance on hypocotyl growth of lettuce seedlings

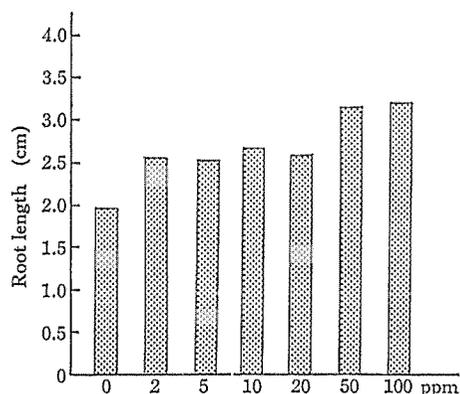


Fig. 3 Effect of No. 386 substance on root growth of lettuce seedlings

摘 要

各地の土壌から糸状菌を 770 株分離し、その培養物についてインドール・アルカロイドの生産性について調べた結果、No. 368 株の培養物中に Ehrlich 反応陽性物質が顕著に生産されていることを見出した。No. 368 株の形態学的諸特性から *Penicillium notatum* Westling と同定し、この菌株の培養物 10 l から酢酸エチルにより活性物質を抽出し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび ODS. カラムの HPLC. により精製した結果、メタノール溶液から無色針状結晶として得、No. 368 物質とした。本物質の理化学的性質は m.p. 137 °C, UV λ_{max} 283 (ϵ 12000), 277 (13000) 及び 228 nm (17000): MS m/z 408 M⁺ で、分子式として (C₂₀H₂₅N₂O₃S₂) の価が得られた。これらの性質からこの No. 368 物質は新規な微生物生産物と決定した。No. 386 物質のレタス実生生育試験を行ったところ子葉下軸に対して濃度が高くなるにしたがって少しずつではあるが阻害作用が現れていた。また根に対しての作用は物質の濃度が高くなるにしたがって僅かながら促進作用が認められた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました元本学農学部教授阿部又三先生に深く感謝致します。

引 用 文 献

- Hanson, James R and Margaret A. O. Leary, 1981, New Piperazinedione Metabolites of *Gliocladium deliquescens* J. C. S. Perkin 1:218-222.
- Frankland, B. and P. F. Wareing, 1960, Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings. Nature, 23:4708-4709
- 古田 喬樹, 木金 哲也, 菅野谷裕子, 1984, *Aspergillus fumigatus* Fres. の培養からレタス実生生育阻害物質としての Gliotoxin の単離. 玉川大学農学部研究報告 24:16-25
- Furuta Takaki, Masami Koike and Matazo Abe, 1982, Isolation of cycloclavine from the culture broth of *Aspergillus japonicus* SAITO, Agric. Biol. Chem. 46:1921-1922
- Raper, Kenneth B. and Charles Thom, 1949, A Manual of the Penicillia The Williams & Wilkins Company U.S.A. p. 367-371

Summary

In the course of our screening for indol alkaloid produced by fungi, the strain No. 386 was selected as the most potent producer of Ehrlich positive substance. The strain was identified with *Penicillium notatum* Westling, according to the Raper's Manual.

The active substance was extracted from the culture broth and followed by purification by silica gel column chromatography and ODS column on HPLC. Recrystallization from methanol afforded colorless needles (No. 386 substance), mp. 173°C. The analytical data were as follows; UV λ max 283 (ϵ 12000), 277 (13000) and 228 nm (17000), MS m/z 408 M^+ . Molecular formula ($C_{20}H_{29}N_2O_3S_2$) was postulated. These data indicated that No. 386 substance to be a new microbial product.

The substance showed weak plant physiological activities using lettuce seedling test.