リンゴ果実で産生するかび毒エクスパンソリデスの部分精製と細胞毒性

誌名	東北農業研究
ISSN	03886727
著者名	渡辺,満
発行元	[東北農業試験研究協議会]
巻/号	62号
掲載ページ	p. 217-218
発行年月	2009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

AgriKnowledge

東北農業研究（Tohoku Agric. Res.）62, 217－218（2009）

リンゴ果実で産生するかび毒エクスパンソリデスの部分精製と細胞毒性

渡辺　満
（東北農業研究センター）

Partial Purification of Expansolides Produced in Apple Fruits and its Cytotoxic Effect.

Mitsuru WATANABE
(National Agricultural Research Center for Tohoku Region)

1　は　じ　め　に

リンゴ青かび病菌（*Penicillium expansum*）はパツリンの他にも複数のかび毒を産生することが知られている。我々はパツリン以外にシトリニン、エクスパンソリデスA/B（以下 EXP）（図１）がリンゴ果実で産生頻度が高いことを明らかにしている。パツリン・シトリニンは、検出器の選択により HPLC で定量分析が可能である。しかし EXP は紫外・可視光で特徴的な極大を持たない等から HPLC による分析は困難である。EXP の危害要因としての緊急性判定には、果実での産生量及び毒性についての知見が不可欠である。そこで本研究では、液体培地及びリンゴ果実における *P. expansum* の EXP 産生について調査した。その結果に基づき、接種果実から EXP の精製を試みると共に細胞毒性について検討した。

2　試　験　方　法

(1) *Penicillium expansum* 培養液におけるかび毒産生

５種類の液体培地（リンゴジュース(AP)、ツアペックドックス＋リンゴジュース(20%)(CZ+AP)、ツアペックドックス(CZ)、酵母エキス培地（YES)）、ポテトデキストロース（PDA）に *P. expansum*（ATCC 36200）を接種し、培養期間中複数回サンプリングし、LC-MS でかび毒を網羅的に解析するとともに、パツリンは公定法により HPLC で定量した。

(2) リンゴ果実品種におけるかび毒産生量の差異

３品種（ジョナゴールド、王林、ふじ）の果実（各５個）に３菌株の *P. expansum*（Pa 453, Pa 467, Pa 553）胞子を接種し、25 ℃で 12 日間貯蔵した。罹病果実から調製した果汁の酢酸エチル抽出物 EXP イオン量を、LC-MS（ESI、ポジティブイオンモード）で測定した。

(3) 罹病果実からの EXP 精製

貯蔵した多数の「ジョナゴールド」果実からジューサーで果汁を調製し、かび毒を酢酸エチルで抽出した。この抽出物を水に溶解し、さらにヘキサン抽出した。固相抽出は Sep-pak　C18 を用いた。分取 HPLC は 20 × 250 mm のカラムを用い、アセトニトリルの濃度勾配により溶出させ、EXP 溶出時間付近の溶離液を回収した。

(4) EXP 含有濃縮フラクションの細胞毒性

ブタ腎臓由来細胞（LLC-PK1）に酢酸エチル抽出物、ヘキサン分画及び分取 HPLC で得た EXP 含有フラクション、シトリニン（標準物質）を添加し、培養後の生細胞数を WST-1 試薬で測定することにより、細胞毒性を調査した。

3　試験結果及び考察

(1) 培養液におけるかび毒産生

培養期間を通じ５種類の培地全てで、*P. expansum* による EXP 産生は確認されなかった。一方、*P. expansum* はリンゴジュース培地(AP)で培養初期からパツリンを産生し、ツァペックドックス+リンゴジュース培地(CZ+AP)では 15 日頃からパツリンを産生した（図２）。

(2) リンゴ果実品種間でのかび毒産生量の差異

リンゴ３品種に３菌株の *P. expansum* を接種しパツリン産生量を調査したところ、３品種のいずれにおいても「ジョナゴールド」が「ふじ」、「王林」よりも有意に産生量が多かった。これに対して EXP ではいずれの菌株でも有意差は認められなかったものの、２菌株(Pa 453, Pa 553)で「ジョナゴールド」の EXP 産生量が「ふじ」「王林」よりも多い傾向が認められた（図３）。

(3) EXP の精製

酢酸エチル抽出物の HPLC 分析で認められた多数のピーク（図４ A）は、さらにヘキサン抽出を実施することによりピーク数が大幅に減少した（図４ B)。これに対して、ヘキサン分画物の固相抽出前後の HPLC クロマトグラムには大幅な変化は認められず、固相抽出法は EXP 精製に有効でないことが明らかになった。そこで、ヘキサン分画物を分取 HPLC で EXP 溶出時間を含めて分取したところ、完全精製には至らなかったが、粗抽出物と比較して 10 倍濃度の EXP を含有する画分を得た。

(4) EXP 含有濃縮フラクションの細胞毒性

酢酸エチル抽出物及び EXP 含有フラクションは、LLC-PK1 の生細胞数を減少させた(図５)。従って、EXP は細胞毒性を有する可能性があることが示された。

4 まとめ

リンゴ果実品種における EXP 産生量は、使用した3菌株中2菌株で「ジョナゴールド」における産生量が「ふじ」「王林」と比較して多い傾向が認められた。「ジョナゴールド」罹病果実から酢酸エチル抽出、ヘキサン分画、分取 HPLC で得た EXP 濃縮フラクションは LLC-PK1 生細胞数を減少させ、EXP は細胞毒性を有する可能性が示された。

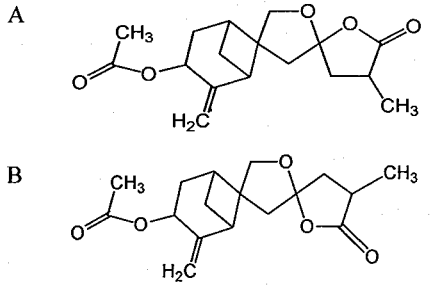

図1　エクスパンソリデス A(A)及びB(B)の構造

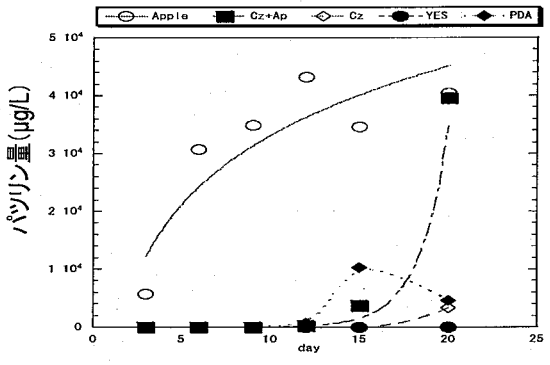

図2．*P. expansum*液体培養におけるパツリンの産生

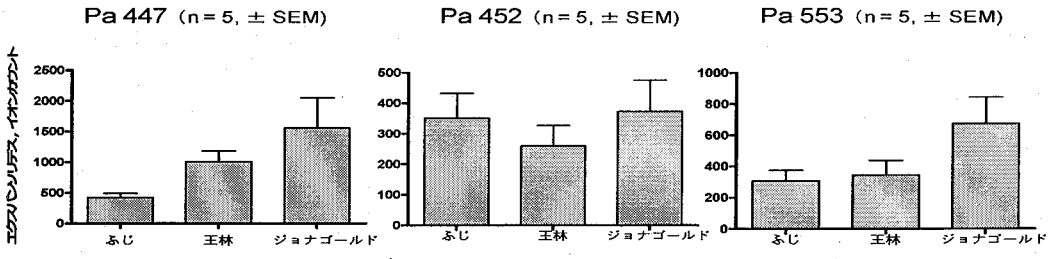

図3．*P. expansum* のEXP産生量に及ぼすリンゴ品種の影響

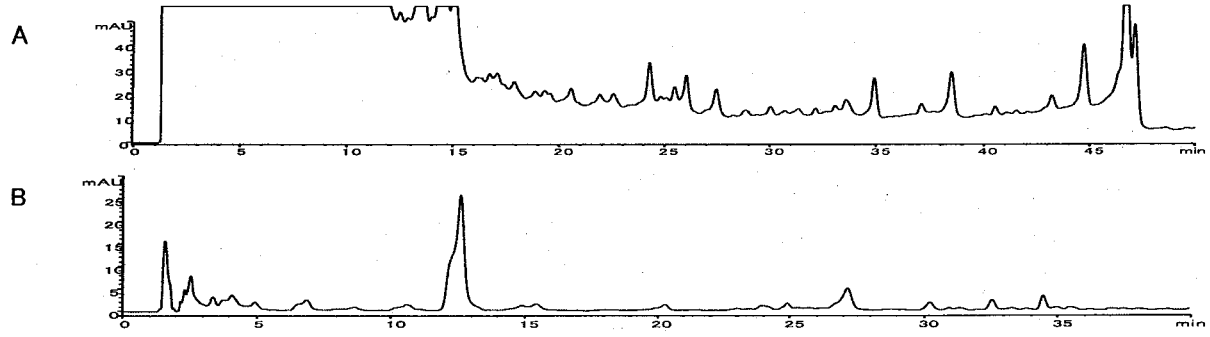

図4．酢酸エチル抽出物(A)及びヘキサン分画物(B)のHPLCクロマトグラム(280nm)

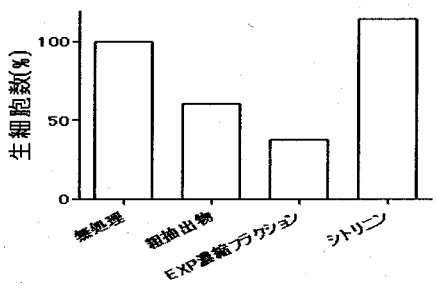

図5．EXP含有フラクション及び酢酸エチル抽出物のLLC-PK1細胞に及ぼす影響