

バリダマイシン生産菌が生成する揮発物質

東出 栄治・大橋 利成・モハマド マフズル ホック・中島 修平
(生物資源開発学講座)

A Volatile, from Validamycin Producer

Eiji Higashide, Toshinari Ohashi, Mohamad Mahfuzul Hoque
and Shuhei Nakajima
(Department of Bioresources Chemistry)

Streptomyces hygroscopicus subsp. *limoneus* JCM 4911, a validamycin producer, was found to produce a volatile in the validamycin producing medium. The volatile was produced only by the organism which could form abundant aerial mycelium during the growth phase for one to two days of the culture and, thereafter, it decreased. Maximum production (3.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of the volatile was found in two-days' cultured broth with the conditions for validamycin production. On the contrary, the validamycin production started at around two days into the culture and increased up to five to seven days of the culture with maximum production of 440 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The volatile was extracted with n-pentane from the culture broth of *S. hygroscopicus* subsp. *limoneus* JCM 4911 and was identical with n-hexanol by GC-MS analysis.

Key words : *Streptomyces*, volatile, n-hexanol, validamycin

緒 言

バリダマイシン¹⁾ (以後 VM-A と略称する) は *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus*²⁾ によって生産されるアミノ配糖体抗生物質の一つで、*Pellicularia saskii* によって惹起されるイネ紋枯病の防除ばかりでなく、そ業苗立枯病^{3,4)}、白絹病⁵⁾ などにも防除効果を示す低毒性農薬として広く用いられている。我々はこの抗生物質生産時にその培養液中に芳香性揮発物質が生成されることを見いだした。

従来、多くの放線菌代謝産物として土壌臭物質が分離され、ジオスミン、メチルイソボルネオールなどと同定されている⁶⁾。しかし、放線菌培養液中に芳香性揮発物質の報告はなく、特に VM-A 生成菌とその変異株による芳香性揮発物質の生成、VM-A 生成、気菌糸の形成の関係に興味を持たれた。我々はこれらの微生物の発酵液からその揮発物質を分離し、同定を試みた。

本報告では VM-A 生成菌からその揮発物質を分

離・同定すると共にその変異株の揮発性物質、VM-A の生成、既知抗生物質に対する感受性および気菌糸の形成の関係について述べる。

材料と方法

微生物

Streptomyces hygroscopicus subsp. *limoneus* JCM 4911 は理化学研究所微生物系統保存施設(埼玉県和光市広沢) から購入した。この原株をニトロソグアニジン (NTG) 200mg/ml 溶液を適当に希釈した溶液を用いて微生物と接触・処理し、種々の変異株を得た。それら変異株は振とう培養³⁾ して、それら培養液中の揮発物質および VM-A の生成を調べた。

試 薬

VM-A は武田薬品工業(株) から分譲された。又、その他の試薬は市販品を用いた。

既知抗生物質に対する感受性測定法

原株および変異株はベンネット斜面寒天培地上に発育させ、これらの孢子または菌糸懸濁液を 10^6 CFU/mlとなるように調製した。これらの懸濁液をベンネット寒天平板培地上に接種して 37°C 、3日間培養し、12種の既知抗生物質；カナマイシン硫酸塩 (KM)、ストレプトマイシン硫酸塩 (SM)、ネオマイシン硫酸塩 (NM)、アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン塩酸塩 (TC)、リファンピシン (RFP)、オレアンドマイシンリン酸塩 (OL)、ノボピオシナトリウム塩 (NB)、チオストレプトン (TST)、バイオマイシン硫酸塩 (VM)、スペクチノマイシン塩酸塩 (SPT) に対する感受性をベンネット寒天平板培地を用いる寒天希釈法で調べた。

揮発物質の測定

原株およびその変異株をそれぞれ1日ないし5日培養して得た培養ろ液に、等量のn-ペンタンを加えて抽出した。この抽出液に含まれる揮発物質は日立ガスクロマトグラフ G-3000 (クロマトデータ処理装置 D-2100付き) を使用し、内部標準物質として3-オクタノンを用いそのピークの面積を試料のそれらと比較して次の条件で測定した。

GC 条件

カラム：DBWAX, $0.25\text{mm} \times 15\text{m}$ (J&W Scientific)

OV-1, $0.25\text{mm} \times 30\text{m}$: (J&W Scientific)

カラム温度： $50-200^{\circ}\text{C}$ ($3^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

カラム先端圧： N_2 $0.4 \text{ kgf}/\text{cm}^2$

注入口温度： 250°C

揮発物質の分離および GC-MS 分析

原株を2日間培養してその培養ろ液 500ml を得て、それを等量のn-ペンタンを用いて抽出、脱水した。その抽出液は冷却、窒素ガス噴霧下で濃縮した。その濃縮液を Automass 20 (日本電子工業株式会社) を用いて下記条件で分析した。

GC条件

カラム：DB-1, $0.25\text{mm} \times 30\text{m}$: (J&W Scientific)

カラム温度： $40-200^{\circ}\text{C}$ ($3^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

注入温度： 250°C

MSの条件

イオン源温度： 170°C

インターフェース温度： 250°C

イオン化電位： 70 eV

結 果

変異株の取得

NTG $200\text{m}/\text{ml}$ 溶液の適当な濃度を用いて、180分処理 (残存率12%) して得られたコロニーのうち原株と基生菌糸および気菌糸の色調および発育を異にする変異株170株を取得した。それらのうちから類似菌株を除外して原株および選別変異株 (13株) を後

Table 1 Sensitivity of validamycin producer and the mutants to antibiotics

Strains tested	Antibiotics used MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)											
	ABPC	CP	TC	KM	NM	SM	NB	OL	RFP	VM	TST	SPT
JCM 4911	1000	20	50	<0.5	2	1	5	20	20	5	>1000	10
GT 3	1000	20	20	<0.5	2	1	5	20	10	5	>1000	5
GT 4	200	50	20	<0.5	<0.5	<0.5	5	20	10	<0.5	>1000	5
GT 6	100	50	20	<0.5	2	1	5	20	10	5	500	5
GT 16	1000	20	20	<0.5	2	<0.5	5	20	20	5	>1000	5
GT 20	50	20	20	<0.5	5	<0.5	5	20	10	5	1000	5
GT 32	50	10	20	<0.5	1	<0.5	5	1	<0.5	5	500	5
GT 50	1000	10	50	<0.5	10	1	5	20	<0.5	5	>1000	5
MH 1	200	20	50	<0.5	2	1	10	20	10	5	1000	5
MH 4	100	10	10	<0.5	2	<0.5	5	1	10	5	1000	5
MH 5	200	20	20	1	2	<0.5	5	20	20	5	500	5
MH 6	200	50	50	10	2	10	5	20	20	5	500	5
MH 7	200	50	50	<0.5	1	1	5	50	10	5	>1000	5
MH 11	200	20	50	<0.5	1	<0.5	5	20	20	5	500	5

の検討に用いた。

既知抗生物質に対する感受性

原株および変異株 (計14株) の菌株は ABPC (MIC ; 50-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および TST (MIC ; 500-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に対して耐性であった。また、CP および TC に対してやや耐性 (MIC ; 10-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。その他、NB, OL, RFP, VM, SPT (MIC ; 0.5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に対して耐性が認められた。一方、菌株によっては抗生物質のうちKM, NM, SM に対して高い感受性 (MIC ; <0.5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を示した。しかし、これらの抗生物質感受性は揮発物質およびバリダマイシン A の生成には関連性は認められなかった。(Table 1)

VM-A および揮発物質の生成ならびに気菌糸の発育

Table 2 に示したように変異株 GT 3, GT 4, GT 6, GT 16, GT 20, GT 32, MH 5, MH 6 は VM-A の生成を認められなかった。VM-A の生成は原株と変異株 GT 50, MH 1, MH 4, MH 7 および MH 11 で認められた。それらのうち高力価生成株は原株と MH 11 でそれぞれ生成量は440 および 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。その他の変異株 GT 50, MH 1, MH 4 および MH 7 の VM-A 生成量は52, 25, 100 および 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

一方、原株と変異株 GT 3, GT 16, GT 20, GT 50, MH 1, MH 4, MH 5, MH 7 および MH 11

は揮発物質をそれぞれ3.88, 3.25, 1.60, 2.50, 1.20, 0.07, 1.25, 0.18, 1.15, 1.18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 生成した。それらは比較的豊富な気菌糸の発育が認められたが, GT 4, GT 6, GT 32 および MH 6 は気菌糸を発育せず, 揮発物質の生成も検出限界以下であった (Table 2)。以上の結果, VM-A と揮発物質の生成には相関が認められなかったが, 気菌糸の豊富な発育をする菌株のみが, 揮発物質を生成し, 気菌糸が貧弱, または発育しない菌株は揮発物質を生成しなかった。なお, 原株の VM-A および揮発物質の生成過程を Fig. 1 に示した。揮発物質の生成は培養20時間から始まり培養48時間で最高となり, その後減少して培養5日で0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になった。

揮発物質の測定および同定

揮発物質の GC 分析による主ピーク (ピーク A) の保持時間は Fig. 2 に示したように約12分でそれ以外には小さな2ないし3箇のピークが検出された。ピーク A のマス・スペクトルには主要なイオンとし

Table 2 Antibiotic and flavor production by validamycin producers and mutants

Strains tested	Aerial mass	Flavor ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Validamycin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
JCM 4911	Abundant	3.88	440
GT 3	Abundant	3.25	ND
GT 4	None to scant	ND	ND
GT 6	None	ND	ND
GT 16	Abundant	1.60	ND
GT 20	Moderate	2.50	ND
GT 32	Scant	ND	ND
GT 50	Abundant	1.20	52
MH 1	Abundant	0.07	25
MH 4	Abundant	1.25	100
MH 5	Moderate	0.18	ND
MH 6	Scant	ND	ND
MH 7	Abundant	1.15	25
MH 11	Abundant	1.18	400

ND : Not detected

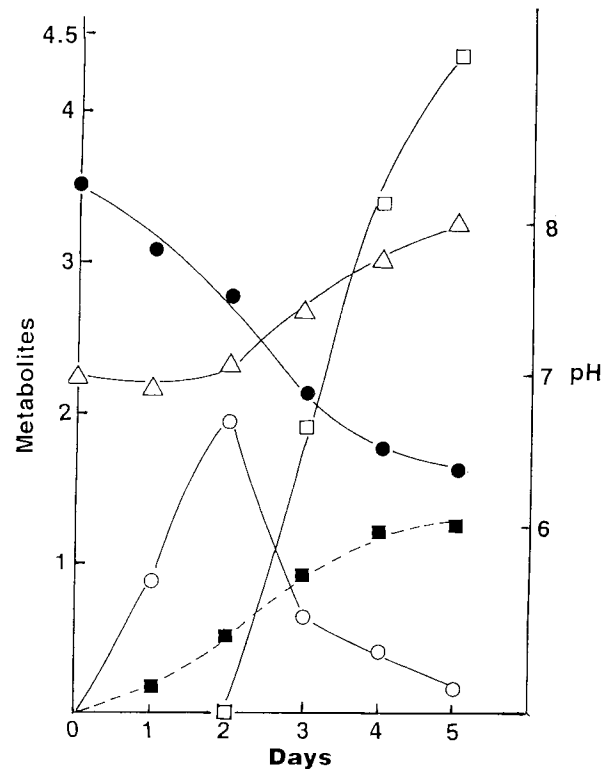


Fig. 1 Time course of the fermentation.
 □ : titre ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of validamycin A $\times 100$
 ■ : growth (ml/5 ml broth) by packed volume $\times 2$
 ○ : titre ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of the volatile $\times 2$
 ● : residual sugar (%) $\times 2$
 △ : pH

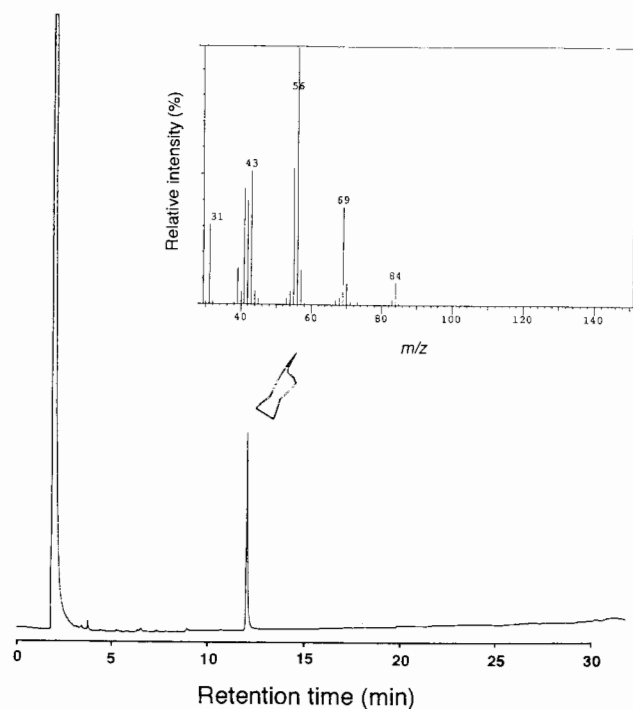


Fig. 2 Gas chromatogram and mass spectrum of the volatile

て $m/z=31, 43, 56, 69$ および 84 が認められた (Fig. 2). このスペクトル・パターンからピーク A は分子量 84 の直鎖アルケンの可能性が考えられたが、一級アルコールに特徴的な $m/z 31$ が存在すること、また通常直鎖アルコールの分子イオンピークは観察され難いことなどから、ピーク A を分子量 102 ($C_6H_{14}O$) の n -ヘキサノールではないかと推定した。一方、市販 n -ヘキサノールとピーク A のガス・クロマトグラム上での保持時間を 2 種のカラム (DBWAX および OV-1) を用いて比較したところ両者は完全に一致した。従って、ピーク A を n -ヘキサノールと同定した。 $m/z 31 [CH_2OH]^+$, $m/z 43 [C_3H_7]$, $m/z 56 [M-C_2H_4-H_2O]$, $m/z 69 [M(H_2O+CH_3)]^+$, $m/z 84 [M-H_2O]^+$.

考 察

多くの不快臭揮発物質が *Streptomyces* 属, *Cyanobacteria* かびその他の微生物から生成されることが報告されている。これら不快臭は微生物種, 水の汚濁, 色素などに相関し, その他汚水中の死体など不衛生な状況に関連している。

我々は VM-A の生産時, その大量培養液中に芳香性揮発物質の生成を認めた。我々は多くの放線

菌を扱ってきたが, 従来このような芳香性揮発物質の生成は経験はなく, それらはほとんどが土臭のみであった。今回, VM-A 生成菌培養液から芳香性揮発物質を分離して, これを n -ヘキサノールと同定した。また, 我々は n -ヘキサノールの詳細な殺菌力を明らかにした⁸⁾。また, VM-A 生成菌の種々の変異株の気菌糸発育, VM-A 生成, 揮発物質生成能およびそれら菌株の抗生物質感受性などとの相関を検討したが特定の相関は認められなかった。

n -ヘキサノールは天然ではセリ科のハナウド *Hara-cleum sphondylium* または *H. giganteum* の種子, 果実中にアセテートとして存在しているが, 最近, 遊離体としてタバコの花の頂点組成物中に見い出されている⁹⁾。更にそのアルデヒドである n -ヘキサノールは琵琶湖水から採取されたらん藻 *Synedra rumpens* の培養液から分離・同定された¹⁰⁾。

謝 辞

我々はバリダマイシンを分譲頂いた武田薬品工業株式会社の関係者に深謝する。また, 岡山大学内 NMR 測定室および MS 測定室 (農学部) に深謝する。この研究は平成 6 年度から 8 年度までの 3 年間に亘る岡山大学内特定研究『特殊環境生物の機能開発と物質生産への応用』を分担し行ったものである。

文 献

- 1) Iwasa, T., Y. Kameda, M. Asai and K. Mizuno : Studies on validamycins. New antibiotics IV. Isolation and characterization of validamycins A and B. *J. Antibiotics*, **24**, 19-24 (1971)
- 2) Iwasa, T., H. Yamamoto and M. Shibata : Studies on validamycins. New antibiotics I. *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* nov. var., validamycin-producing organism. *J. Antibiotics*, **23**, 595-602 (1970)
- 3) Iwasa, T., E. Higashide, H. Yamamoto and M. Shibata : Studies on validamycins. New antibiotics II. Production and biological properties of validamycins A and B. *J. Antibiotics*, **24**, 107-113 (1971)
- 4) Iwasa, T., E. Higashide and M. Shibata : Studies on validamycins. New antibiotics III. Bioassay methods for the determination of validamycin. *J. Antibiotics*, **24**, 114-118 (1971)
- 5) Wakae, O. and K. Matsuura : Proc. 1st Intl. Cong. IAMS. Tokyo C-3-3 (1974)
- 6) Wood, S. S., T. Williams and W. R. White : *Microbs*

- as a source of earthy flavors in potable water—a review. *Int. Biodeterio. Bulletin*, **19**, 63-97 (1983)
- 7) Horii, S., Y. Kameda and K. Kawahara : Studies on validamycins. New antibiotics VIII. Isolation and characterization of validamycins C, D, E and F. *J. Antibiotics*, **25**, 48-53 (1972)
- 8) Hoque, M. M., T. Ohashi, S. Inoue, Y. Omatsu and E. Higashide : Antimicrobial activities of n-hexanol isolated from an actinomycetes. *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**(5), 343-348 (1996)
- 9) Loughrin, J. H., T.R. Hamilton-Kemp, R. A. Andersen and D. F. Hildebrand : Headspace compounds from flower of *Nicotiana tabacum* and related species. *J. Agric. Food. Chem.*, **38**, 455-460 (1990)
- 10) Kikuchi, T., T. Mimura, Y. Moriwaki, M. Ando and K. Negoro : Metabolites of a Diatom, *Synedra rumpens* Kütz, isolated from water in Lake Biwa, Identification of odorous compounds, n-hexanol and n-heptanal, and analysis of fatty acids. *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 915-945 (1974)