

リンゴ果実で産生するかび毒エクспан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спан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」果実からジュースで果汁を調製し、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、ツアペックドックス+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。

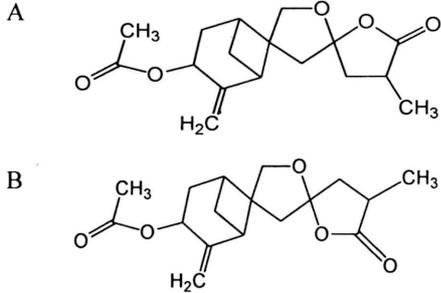


図1 エクспанソリデス A(A)及びB(B)の構造

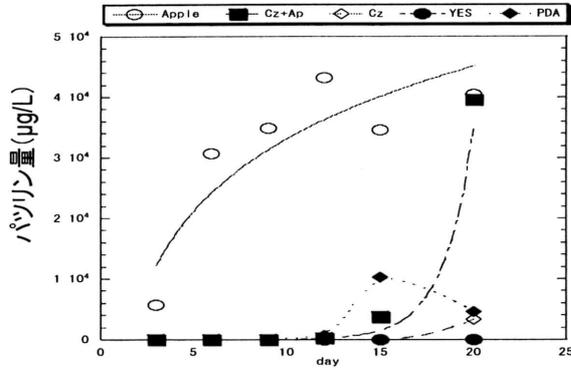


図2. *P. expansum*液体培養におけるパツリンの産生

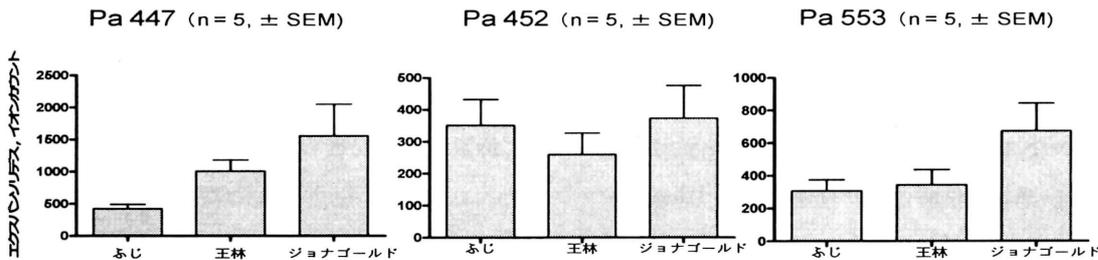


図3. *P. expansum* のEXP産生量に及ぼすリンゴ品種の影響

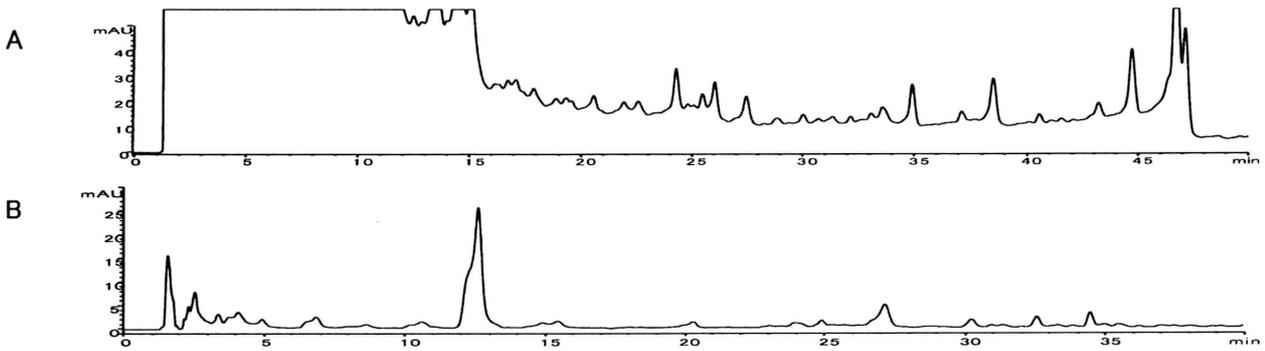


図4. 酢酸エチル抽出物(A)及びヘキサン分画物(B)のHPLCクロマトグラム(280nm)

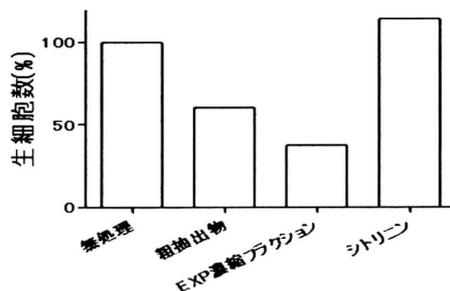


図5. EXP含有フラクション及び酢酸エチル抽出物のLLC-PK1細胞に及ぼす影響