

## ダウノマイシン発酵：鉄イオンの特異的生産増強効果と回収・精製法

中村 智彦・吉本 明弘

広島大学生物生産学部，東広島市 739

1995年4月30日 受付

**要旨** 抗腫瘍性抗生物質ダウノマイシンの発酵生産に対する鉄イオンの特異的な増強効果を明らかにするとともに，培養液からのダウノマイシンの回収・精製法を検討した。増強効果は，特に3価鉄イオンが有効で，およそ 10 mM の添加培養で無添加の4倍の生産力価(およそ 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を達成した。関連するダウノマイシン前駆体 D788-1 発酵生産にはむしろ生産阻害的で，その効果はダウノマイシン発酵に特徴的であった。ダウノマイシン培養液を水で3倍に希釈し，リン酸で pH を1.5として液層に酸抽出した後，合成吸着樹脂 HP-20 カラムに吸着させ，15~50%アセトンの直線濃度勾配溶出をおこない，ついでクロロホルム抽出処理により副成アナログ含有率2.0%以下の高純度ダウノマイシンを取得する方法を確立した。

キーワード：ダウノマイシン，抗腫瘍性抗生物質，発酵生産，鉄イオン，回収精製

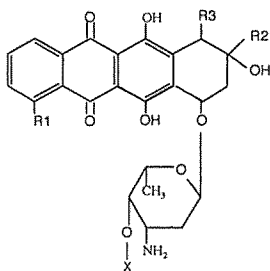
### 緒 言

ダウノマイシン (Daunomycin) は主として血液癌の治療に用いられるアントラサイクリン系抗生物質で，数種の放線菌により生産されることが明らかにされている (Di MARCO *et al.*, 1964, UMEZAWA *et al.*, 1976, YOSHIMOTO *et al.*, 1992)。本物質は血液癌の治療薬として使用されるほか，固形癌にも有効な臨床薬アドレアマイシン (Adriamycin) (ARCAMONE *et al.*, 1975) やピラルビシン (Pirarubicin) (UMEZAWA *et al.*, 1979) の合成原料として用いられており，その応用見地から発酵生産技術の研究は極めて重要である。

ダウノマイシン生産については *Streptomyces peucetius* による合成培地による生成の詳細研究があるが (DEKLEVA *et al.*, 1985)，発酵の見地からの報告はない。我々は，土壌から新しく単離したバウマイシン (Baumycin) (4''-substituted daunomycin) 生産菌 *Streptomyces* sp. D788 菌株からダウノマイシン生産性のブロック変異株を誘導し，その生産培地を特定してきた (YOSHIMOTO *et al.*, 1992)。また，本菌によるダウノマイシン生合成について，種々のブロック変異株の分離と仮想前駆体の生合成変換試験により，その生合成経路を明らかにしてきた (YOSHIMOTO *et al.*, 1995)。Fig. 1 に本報に関連するアントラサイクリン系抗生物質類の構造を記載した。ダウノマイシンはポリケチド系の抗生物質で，アグリコンとアミノ糖ダウノサミン (Daunosamine) からなる配糖体である。アグリコンは9個の酢酸ユニット及び1個のプロピオン酸ユニットから脂肪酸合成に類似した生合成経路により合成される (CASAY *et al.*, 1969)。最初の完成アグリコンはアクラビノン (Aklavinone) で，11位が酸化されて $\epsilon$ -ロドマイシノン ( $\epsilon$ -Rhodomycinone) が形成される。これにダウノサミンが結合し前駆体グリコシド D788-6 (YOSHIMOTO *et al.*, 1993A) が生成し，アグリコン部分が逐次変換修飾されてダウノマイシンが生成する。本生合成系の阻害剤について研究している過程で，鉄イオンによる顕著なダウノマイシン生産増強効果を見出した。一方，ダウノマイシンは菌体に蓄積生産され，培養上清ほとんど存在しない。従って，一般には菌体をろ過等により集積し極性溶媒で抽出する回収方法が考えられるが，工程的には問題があり，効率的な回収方法の検討が望まれる。そこで，酸による菌体外溶出と吸着樹脂による回収・精製法を試みた。

本論文ではダウノマイシン発酵に及ぼす金属イオンの効果を検討し，鉄イオン，特に3価鉄による特異的な生産増強効果を明らかにするとともに，培養液からのダウノマイシン回収・精製法を検討し，リン酸による菌体外抽出と合成吸着樹脂 HP-20 を用いる有効な回収方法を考案した。

Fig. 1. Structures of some anthracyclines produced by *Streptomyces sp.* D788 and its blocked mutants



Compound	R1	R2	R3	X
Baumycin	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	H	$  \begin{array}{c}  -\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\    \qquad \qquad   \\  \text{CH}_2 \qquad \qquad \text{CH}_2\text{OH} \\    \\  \text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3  \end{array}  $
Daunomycin	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	H	H
RP (D788-1)	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COOH	H
DK (D788-5)	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	H
5A (D788-6)	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	H

## 実験方法

### 1. 菌株

本研究に使用した菌株は *Streptomyces sp.* D788 から変異誘導した AO-63 菌株及び RPM-5 菌株である (YOSHIMOTO *et al.*, 1992, 1993B)。AO-63 菌株は 4' 位アセタール形成能を欠除した結果バウマイシン (BM と略称) (KOMIYAMA *et al.*, 1977) を生成できずダウマイシン (DM と略称) を蓄積するブロック変異株、および RPM-5 菌株は、さらに 1 段階で変異が起こり DM 前駆体 D788-1 (RP と略称) を蓄積する 2 段階生合成ブロック変異株である。これらの菌株は下記する YS 斜面寒天に接種し、30°C で培養して使用した。

### 2. 培地

YS 寒天培地は水道水 1 l 中、酵母エキス (オリエンタル酵母) 3 g、可溶性デンプン (和光純薬) 10 g、寒天 15 g を含み、pH は 1 N NaOH で 7.2 に調整した。発酵生産のための種母培地は水道水 1 l 中に大豆粉 (エスサンミート, 味の素) 10 g、グルコース 5 g、可溶性デンプン 5 g、第二リン酸カリ 1 g、硫酸マグネシウム 1 g、塩化ナトリウム 1 g を含み、pH は 1 N NaOH で 7.2 に調整した。本培養には以下の発酵培地組成を用いた。水道水 1 l 中、可溶性デンプン 30 g、マルトース 20 g、乾燥酵母 (オリエンタル酵母) 15 g、大豆粉 10 g、酵母エキス 2 g、塩化ナトリウム 1 g、硫酸マグネシウム 1 g 及び炭酸カルシウム 40 g を含み、pH は 7.8 に調整した。

### 3. 培養

種母培養は、培地 20 ml を分注殺菌した 100 ml 容三角フラスコに斜面培養より 1 白金耳を接種し、37°C ロタリーシェーカー (200 rpm) で 2 日間培養した。これを、発酵培地の 20 ml を分注殺菌した 100 ml 容三角フラスコに 3% (0.6 ml) 接種し、同ロタリーシェーカーで 4 日間培養した。

#### 4. 生産物の定量

培養液 2 ml をガラス製小遠心管に採り、3 倍希釈リン酸 0.1 ml 及びアセトン 6 ml を加えてサーモミキサーで 1 分間攪拌した。遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) をおこない、その上清を移動相で適当に希釈し、その 10  $\mu$ l を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にかけて分析した。使用したカラムは逆相系 A312 (ODS) (6 $\times$ 150 mm) (山村化学研究所) で、移動相として 35% アセトニトリル (リン酸で pH 2.0 に調整) を用いた。流速は 1 ml/秒で、波長 495 nm で検出した。各標準品につき、HPLC のピーク面積値と濃度の間の定量直線を作成し、これより定量した。主な生産物の HPLC 保持時間は、DM は 11.99 分、RP は 5.42 分、D788-6 (5A と略称) は 30.29 分、D788-5 (DK と略称) は 20.91 分及びジヒドロダウノマイシン (13-Dihydrodaunomycin: HDM と略称) は 11.87 分であった。

#### 5. 菌増殖度の測定

核酸含量で表わし、定量は SXHNEIDER ら (1956) の変法を用いた。培養液 2 ml を採り、遠心 (3,000 rpm, 10 分) で集菌した後、エタノール 5 ml 及び冷 10% 過塩素酸 4 ml で順次洗浄した。ついで 5% 過塩素酸 5 ml に懸濁して 98 $^{\circ}$ C で 30 分間加熱処理後、遠心分離した。遠心上清を水で希釈して波長 260 nm における吸光度を測定し、1% 核酸溶液の吸光度の値より次式を用いて定量した。

$$\text{核酸量 (g/l)} = 0.03442 \times 0.D_{260} \times \text{希釈倍率}$$

#### 6. 残糖量

フェノール硫酸法に従った。培養液 2 ml に水 4 ml 加え、攪拌後 3,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を水で希釈後、1 ml を採り、これに 5% フェノール 1 ml 及び濃硫酸 5 ml を加えて攪拌した。室温にて 30 分間静置し、波長 490 nm における吸光度を測定した。1% グルコース標準液の吸光度の値より次式を用いて定量した。

$$\text{残糖量 (\%)} = 0.0357 \times 0.D_{490} \times \text{希釈倍率}$$

#### 7. 酸抽出試験

培養液からの DM の酸抽出試験では、培養液を水で 3 倍し、その 30 ml を三角フラスコに採り、これに指示量の各種有機酸を添加した。無機酸については pH 1.0, 1.3, 1.5, 1.7 及び 2.0 になるように添加した。ついで、マグネチックスターラーで室温、1 時間攪拌した後遠心し、得られた上清につき HPLC で DM 量を定量した。希釈効果については、水で 1~5 倍に希釈した培養液の 30 ml を酸で pH 1.5 となし、室温、1 時間攪拌抽出した上清につき HPLC で DM を定量した。なお、培養液の全 DM 量は、培養液 2 ml に 3 倍希釈リン酸を 0.1 ml 添加し、これにアセトン 8 ml を加え、室温で 30 分間攪拌した後遠心し、その上清につき HPLC で DM 量を測定し、算定した。

#### 8. 合成樹脂吸着試験

Diaion HP-20 樹脂を常法により洗浄した後、最終的に希硫酸で pH 1.5~2.5 に調整し、その 10 ml を小試験管 (径 13 mm) に詰めた。これに培養液の酸抽出上清 (DM 濃度: 約 100  $\mu$ g/ml; 約 pH 2.0) の 200 ml を SV 5.0 で吸着させた。1 ベッド容量の水で洗浄した後、3 ベッド容量の含水アセトンで溶出した。

#### 9. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

回収・精製工程は TLC で分析した。薄層プレートにはシリカゲル 60F<sub>254</sub> (メルク) を用い、溶媒には CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O-AcOH (120:40:3:0.4) を用いた。

#### 10. 材料

標準品として使用したアントラサイクリン抗生物質類は以下の菌株を培養し調製したものである。DM は *Streptomyces* sp. D788 G1-1 菌株の培養により (YOSHIMOTO *et al.*, 1992), RP は同 RPM-5 菌株の培養により (FUJII *et al.*, 1986), 5A 及び DK は同 4L-660 菌株の培養により調製した (YOSHIMOTO *et al.*, 1993A)。吸着合成樹脂 Diaion HP-20 及び実験に供した各種イオン交換樹脂は三菱化成より購入した。

## 実験結果

### 1. DM 及び RP 発酵の経時変化

菌株 AO-63 による DM 発酵の経過を Fig. 2 に示した。培地には、窒素源及び炭素源について種々検討

の結果、最適と考えられた乾燥酵母 (1.5%)、大豆粉 (1.0%)、可溶性溶性デンプン (3.0%) 及びマルトース (2.0%) を主成分とする組成を用いた。菌の増殖は培養 2 日まで対数増殖を示し、3 日目にはほぼプラトーに達した。糖の消費は菌の増殖に比例して増加し、3 日目までおよそ直線的に減少し約 50% が消費されたが、その後徐々に消費された。DM 生産は培養 2 日目より起こり、菌の増殖がプラトーになる 3 日目には最高となり、典型的な二次代謝産物の生産パターンを示した。生産力価は培養 5 日目に最大となり、およそ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の生産量を示した。一方、RP 発酵についても、DM 発酵とほぼ同一の発酵パターンを示し、生産力価は培養 5 日目で 115  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった (データ省略)。なお、両発酵とも培養 pH は培養 1 日目に若干の低下を来したが、最終的には 8~9 となった。

## 2. 各種金属塩の添加効果

Table 1 に DM 発酵に対する種々金属塩の添加効果を示した。使用培地には、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム及び第二リン酸カリウムを、それぞれ 0.1% を含むが、これに 1 mM~5 mM を添加して培養 5 日目の DM 生産量を測定した。無添加対照区の DM 生成量はおよそ 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であったが、アルミニウム塩及び鉄塩の添加で DM 生産の増強が認められた。特に、鉄塩の添加効果は顕著で 5 mM の硫酸鉄の添加で 127  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の生産を示し、60% アップとなった。バリウム、コバルト、マンガン、ニッケル、亜鉛、モリブデン及びバタングステン等の塩には、DM 生産増強の作用は認められなかった。また、塩化ナトリウム、塩化カリウム及び第二リン酸カリウム等の増量添加では DM 生産の促進効果は認められなかった。従って、DM 生産に対する鉄塩の添加効果は特異的と考えられた。

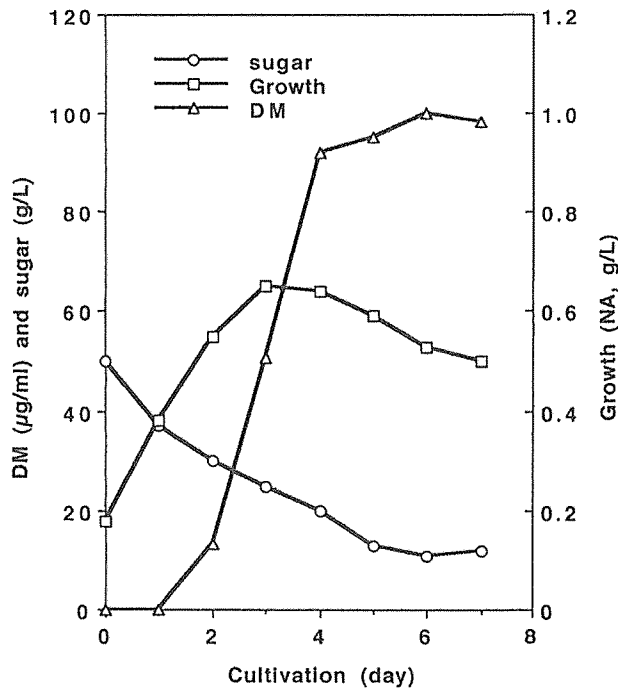


Fig. 2. Daunomycin production in a flask culture of *Streptomyces* sp. D788 strain AO-63. Fermentation was carried out using ten 100-mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL each of productive medium on a 37 °C rotary shaker. One mL each of the cultures was taken every day, combined and examined for the bacterial growth (nucleic acid content: NA), saugar consumption and daunomycin (DM) titers.

Table 1. Effect of metal salts on daunomycin production by *Streptomyces* sp. D788 strain AO-63

Metal salt	Added (mM)	Culture pH	DM yield	
			$\mu\text{g/ml}$	% control
none	—	7.3	79.5	100
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	1	7.4	80.0	101
	3	7.5	82.2	103
	5	7.3	84.8	107
	1	7.5	77.4	97
$\text{AlCl}_3$	3	7.5	79.5	100
	5	7.6	85.9	113
	1	7.4	53.0	67
$\text{BaCl}_2$	3	7.8	43.9	55
	5	7.6	46.1	58
	0.1	7.1	25.4	32
$\text{CoCl}_2$	0.3	7.0	0	0
	0.5	6.8	0	0
	0.1	7.3	75.8	95
$\text{CuSO}_4$	0.3	7.2	53.0	67
	0.5	6.8	29.7	37
	1	7.2	87.5	111
$\text{FeSO}_4$	3	7.1	101.8	120
	5	7.1	127.2	160
	1	7.4	80.6	101
$\text{FeCl}_2$	3	7.3	89.0	112
	5	7.1	103.4	130
	1	6.8	78.4	99
$\text{MnSO}_4$	3	7.1	77.4	97
	5	7.0	73.1	92
	1	7.3	76.9	97
$\text{NiCl}_2$	3	6.5	63.6	79
	5	6.8	53.0	71
	1	7.0	70.0	88
$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	3	5.8	42.4	53
	5	6.2	0	0
	1	7.5	81.1	102
$\text{Na}_2\text{WO}_4$	3	7.4	75.3	95
	5	7.3	76.9	97
	1	7.4	71.6	90
$\text{ZnSO}_4$	3	7.5	66.3	83
	5	7.1	47.7	60
	10	7.0	71.6	90
$\text{NaCl}$	30	7.1	74.2	93
	100	7.3	66.3	83
	10	7.3	75.8	95
$\text{KCl}$	30	7.0	71.6	90
	100	7.0	71.6	83
	10	7.4	71.6	90
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	30	7.6	71.6	90
	50	7.6	72.1	91

### 3. 二価及び三価鉄塩の添加効果

Fig. 3 に DM 生産に対する二価及び三価硫酸鉄の添加効果とその濃度について調べた結果を示した。DM 生産への増強作用は三価鉄塩でより大きいことが分かった。ともに、およそ 10 mM 添加濃度で最大値を示し、無添加区では DM 生産が 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であったが、二価鉄塩の添加で 230  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (2.9倍) 及び三価鉄塩の添加で 320  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (4倍) に高められた。一方、菌株 RPM-5 の RP 生産に対する二価鉄塩の効果も Table 2 に示した。鉄塩の添加効果は RP 生産では認められず、むしろ阻害的であった。RP 生成阻害に相応して前駆体 DK 及び 5A 中間体の蓄積が認められ、鉄塩による RP 生成段階 (10位脱メチルエステル化反応) の阻害が推測された。これら前駆体の蓄積量は合計で 20~30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に達し、RP 量のおよそ半量を占めるに至った。なお、その他の金属塩の添加で RP 生産は増強されることはなく、DK および 5A の蓄積現象は認められなかった。

### 4. DM の酸抽出

DM は大部分は菌体に蓄積し、一部が培養ろ液に放出される。従って、一般には発酵液からの DM の回収は、遠心操作により菌株とろ液に分離した後、菌体からはアセトンで抽出し、減圧濃縮してから pH を 8.5 付近に調整した後クロロホルムで再抽出する。ろ液からは直接クロロホルムで抽出して、菌体からの抽出物と混合して減圧濃縮して DM 粗粉末を取得する。しかし、本法ではアセトンを使用するほか、クロロホルムを大量に使用し、大型の分液装置が必要となる。そこで、DM の回収法として、培養液からの酸抽出をおこない、液層に遊離させた後合成吸着樹脂を用いる方法を検討した。Table 3 に各種の有機及び無機酸の

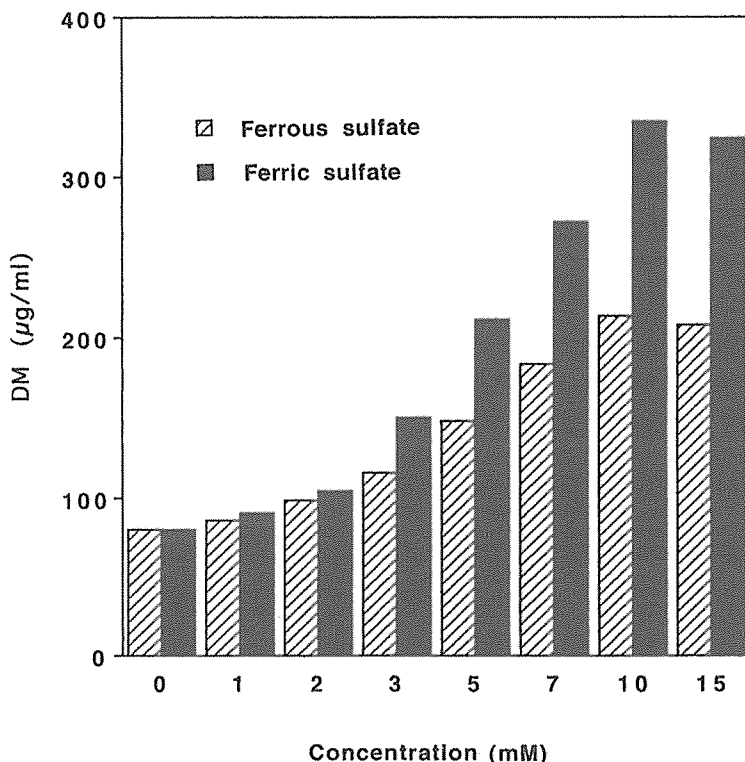


Fig. 3. Effect of ferric sulfate and ferrous sulfate on daunomycin production by *Streptomyces* sp. D788 stain AO-63. Fermentation was carried out using 100-ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml each of productive medium supplemented with either ferrous sulfate or ferric sulfate at the indicated concentration. After 4-day cultivation daunomycin (DM) titers were assayed.

Table 2. Effect of ferrous sulfate on RP production by *Streptomyces* sp. D788 strain RPM-5

FeSO <sub>4</sub> (mM)	Culture pH	Yield (μg/ml)		
		RP	DK	5A
0	8.2	122.5	0	0
0.2	8.3	82.3	0	0
0.5	8.4	91.8	0	0
1.0	8.3	77.6	0	0
2.0	8.1	73.3	16.4	17.2
3.0	8.0	47.1	10.2	11.0
5.0	8.3	52.3	13.5	16.1
10.0	8.3	39.9	16.1	13.7

Table 3. Acidic extraction of daunomycin by addition of organic acids and inorganic acid from 3-fold diluted culture broth

Acid	added (%)	pH	Ext. <sup>a)</sup> (%)	Acid	added (%)	pH	Ext. <sup>a)</sup> (%)	
Formic acid	1	3.3	30.2	Tartaric acid	1	2.4	27.8	
	3	3.0	41.8		3	2.1	44.1	
	5	2.8	52.2		5	1.8	52.2	
	7	2.5	56.8		7	1.6	58.0	
	10	2.0	60.3		10	1.4	63.8	
	20	1.7	74.2					
Acetic acid	1	3.8	18.6	Malic acid	1	3.6	23.0	
	3	3.6	21.8		3	3.3	41.8	
	5	3.5	24.4		5	3.1	52.0	
	7	3.3	27.8		7	2.9	54.5	
	10	3.2	33.6		10	2.7	59.2	
	20	2.9	62.6		20	2.2	73.1	
Oxalic acid	1	1.8	38.3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	— <sup>b)</sup>	2.0	50.0	
	3	1.4	54.5		—	1.7	54.0	
	5	1.3	58.0		—	1.5	57.5	
	7	1.2	59.2		—	1.3	61.5	
	10	1.0	66.1		—	1.0	63.5	
Maleic acid	1	2.3	30.2	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	— <sup>b)</sup>	2.0	63.5	
	3	2.0	63.8		—	1.7	68.5	
	5	1.8	71.9		—	1.5	74.8	
	7	1.5	76.6		—	1.3	75.6	
	10	1.3	80.0					
Fumaric acid	5	1.9	51.5	HCl	— <sup>b)</sup>	1.5	56.0	
	10	1.5	63.8					
Sussinic acid	5	2.9	41.8	HNO <sub>3</sub>	— <sup>b)</sup>	1.5	50.5	
	10	2.7	50.8					
Citric acid	5	1.8	46.4	None		8.2	12.5	
	10	1.5	58.0					

a) Extraction (% total DM titer)

b) Added to give an indicated pH

培養液への添加による液層への抽出について調べた結果を示す。液層への抽出を高めるために、培養液は3倍に希釈して酸抽出を検討した。酸無処理の培養液では、DM 全生産量の12.5%が液層に、残り87.5%が菌体に保持されていた。液層への酸抽出効果は、有機酸ではマレイン酸添加が最も効果的で3%添加 (pH 2.0) で64%、10%添加で (pH 1.3) で80%が液層に溶出した。酢酸、ギ酸、酢酸、修酸、フマル酸、クエン酸等の有機酸の添加でも酸抽出は可能であるが、マレイン酸の添加効果には及ばなかった。一方、無機酸ではリン酸の添加効果が有効で、pH 1.5 まで添加した場合およそ75%の抽出効果が認められた。硫酸、塩酸及び硝酸による酸抽出効果はリン酸に比して悪かった。一般により低 pH で抽出効果が上がるが、pH 1.2 以下に下げると DM が酸分解されるため不適であった。

Fig. 4 にリン酸及び硫酸による酸性抽出 (pH 1.5) と培養液の希釈効果を調べた結果を示す。無希釈培養液での酸抽出効果は低いが、2倍以上の培養液の希釈により液層への抽出量は顕著に増大した。リン酸で pH 1.5 に調整した場合の液層への抽出量は2倍希釈で約60%、3倍希釈で70%、4倍希釈で80%及び5倍希釈で85%以上に達し、大部分の DM を液層に移行することが可能であった。

### 5. HP-20 樹脂による回収・精製

液層に遊離させた DM を樹脂に吸着させ、溶出する回収方法を検討した。DM は塩基性化合物で陽イオン交換樹脂の使用が考えられる。そこで、Diaion HPK-16 (ハイポラス強酸性; Na<sup>+</sup> 型)、Diaion CR-10 (キレート樹脂; Na<sup>+</sup> 型) 及び Diaion PK-208 (ポラス強酸性; Na<sup>+</sup> 型) について pH 2.0 で吸着を試みた結果、1ℓ 樹脂あたりの吸着力はおよそ 1g で吸着能力が劣ることが分かった。一方、合成吸着樹脂 Diaion HP-20 について吸着試験を試みた結果、pH 1.3~7.5 で DM 15 g/ℓ 樹脂以上の吸着が可能であることが分かった。脱着には含水メタノールやアセトンの使用が考えられるが、予備試験の結果アセト

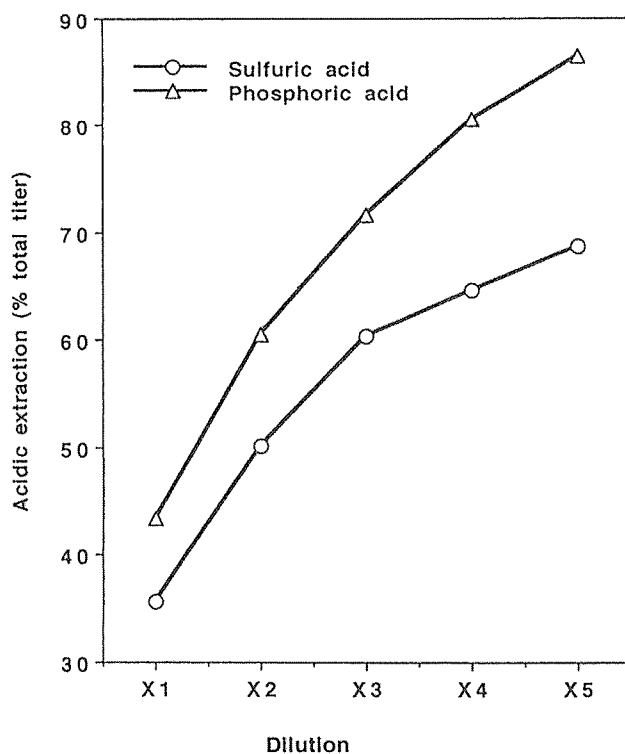


Fig. 4. Effect of broth dilution on the extraction of daunomycin from culture broth by acidification to pH 1.5 with sulfuric acid or phosphoric acid.



ン系が有利であることが分かった。Fig. 5 に HP-20 樹脂による DM の吸着と脱着の結果を示した。DM 発酵液には副生成物として HDM 及び RP を含む。このうち、HDM は DM と化学的性状が類似しており DM からの除去が困難である。RP は水に易溶でクロロホルム等の溶媒には溶けず、DM のクロロホルム抽出時に除去される。培養液 3 ℓ (DM 330  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 総量 990 mg) を水で 3 倍に希釈し濃リン酸で pH 1.5 として室温で 2 時間攪拌抽出した後、遠心し DM 抽出液 (DM 総量 710 mg) を得た。これを HP-20 樹脂 100 ml のカラム (pH 2.0) に流速 SV 5 で吸着させ、2 ベット容量の pH 1.5 水及び 10% アセトン (pH 1.5) で洗浄し、15%~50% アセトン (pH 1.5) で直線濃度勾配溶出をおこなった。およそ 20% 濃度のアセトンで HDM が溶出され、DM は 30% アセトン濃度で溶出された。従って、HDM の大部分は DM 溶出区分から除去することができた。RP は DM より僅かに早く溶出されるが、分離は困難であった。主要 DM 溶出区分 (分画 55-80 : 250 ml) を集め、減圧濃縮した後 pH を 8.0 に調整し、100 ml のクロロホルムで 2 回抽出した。少量まで減圧濃縮し、これに過剰の *n*-Hexane を添加して DM を沈澱させた。遠心操作により集積し、風乾、真空乾燥して純度 88.6% の DM 粉末 535 mg を取得した。HDM (1.6%) はか末

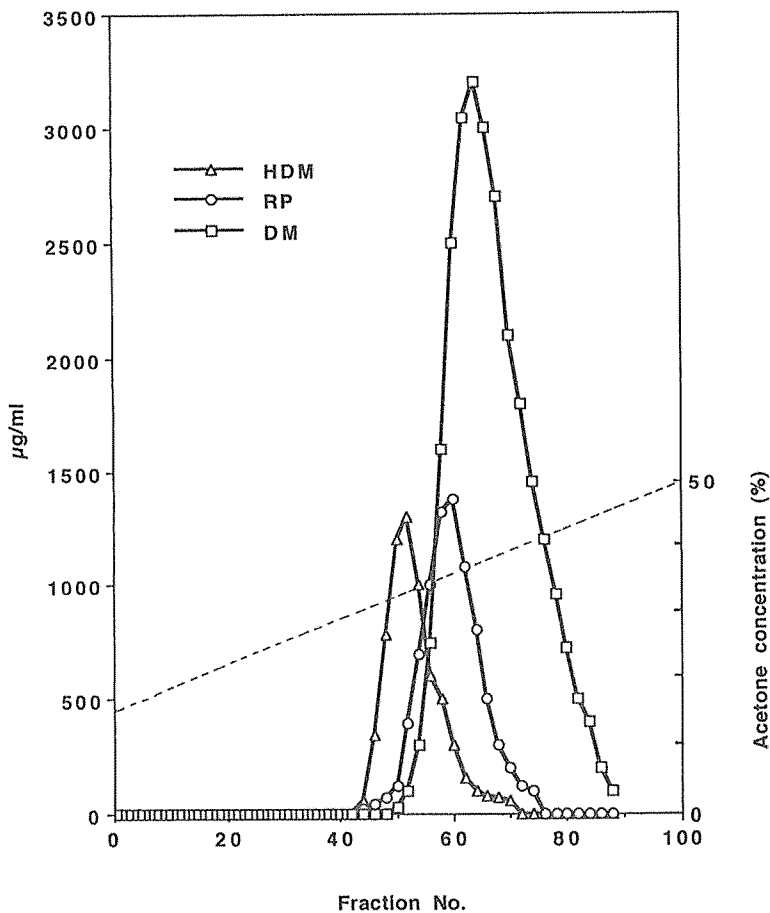


Fig. 5. Recovery and purification of daunomycin from acid-extracted filtrate by HP-20 resin column chromatography. HP-20 resin (100 ml) was packed in a column (diameter, 15 mm), to which 10 ℓ of acidic filtrate containing 710 mg of daunomycin were applied. A linear gradient elution was performed between 15 % and 50 % acetone (pH 1.5). Eluate was fractionated every 10 g and followed by HPLC analysis.

同定のアナログが総量で約2%認められた。

## 考 察

DM 生合成の阻害剤の研究の過程において、鉄イオンが DM 発酵を著しく増強することを見出した。各種の金属塩の添加効果を詳細に検討したが、アルミニウム塩に僅かに増強効果が認められたが鉄イオンに特異的であった (Table 1)。二価及び三価の両鉄イオンで効果が見られたが、三価鉄塩の効果がより顕著であった。至適添加濃度は極めて高く 10 mM 付近にあり、無添加対照力価の4倍に DM 生産を増強した。一方、同一菌株のブロック変異株 RPM-5 による RP 生産には鉄イオンはむしろ阻害的であった。RP はアンモニア性アセトン溶液中で光処理することにより (YOSHIMOTO *et al*, 1991A), 強力な抗腫瘍性抗生物質オキサウノマイシン (Oxaunomycin) (YOSHIMOTO *et al*, 1991B) に変換し得る重要な化合物である。RP は唯一水溶性のアントラサイクリン化合物であり、菌体に蓄積することなく培養液層に生産される。RP の生成の減少とは逆に、DK 及び 5A の蓄積が観察された。この結果は、先に提唱した DM 生合成経路 (YOSHIMOTO *et al*, 1995) を支持し、5A が RP の前駆体であることを証明している。従って、鉄イオンは、この場合10位の脱メチルエステル化酵素反応を強く抑制することが明かとなった。

生産増強効果は一般には関与する生合成酵素系の作用促進が普通であるが、本増強効果には極めて高濃度の鉄イオンの添加を必要としており、生合成酵素系の促進効果によるものとは考え難い。事実、DM 発酵に特異的で前駆体 RP の発酵生産では効果は認められていない。従って、本効果は物理化学作用によるもので、鉄イオンが DM とキレートを形成することに起因すると考えるのが妥当である。その結果、系外に放出され DM による生産阻害が解除されて高生産に至るものと考えられる。

発酵液からの DM の回収については、菌体に生成蓄積するため、菌体を遠心で集積して極性溶媒により抽出し、濃縮後非極性溶媒に転溶して濃縮乾固し粗粉末を得る方法が一般的であるが、酸により液層に放出させ吸着樹脂を用いて回収する方法が工程操作上有利であると考えられた。酸抽出に関して種々の有機酸及び無機酸について検討したが、有機酸では酸性度が高いマレイン酸の添加が最も抽出率が高いことが分かった。しかし、添加量は10% (w/v) 以上の添加が必要であり、コスト的に問題があった。無機酸ではリン酸がよく、硫酸や塩酸に比しておよそ10%程度アップの抽出効果を示した。pH 1.3 の最適添加で液層への DM の放出率は85%以上となり、アセトン抽出による抽出効率に匹敵するものであった。リン酸の有効性は、これが菌体表層に蓄積している生産物の遊離を促す何らかの作用を持つためと考えられるが、さらには生じる DM リン酸塩の溶解性が他の無機塩に比して高くなるためと思われる。液層からの DM の回収は合成吸着樹脂 HP-20 カラムの使用が有効であった。pH 1.5~6.5 で吸着量はほとんど変わらず、約 15 g/l 樹脂程度の吸着が可能であった。カラムからの溶出は15%~50%アセトンの直線濃度勾配でおこなったが、副成する HDM の分離除去が可能であった。一方、RP の分離は困難であったが、このものは濃縮後クロロホルムによる再抽出時に完全に除去された。最終的に得られた DM 粉末は HPLC 分析でアナログ含有率2.0%以下で、主不純物 HDM を1.6%含んでいた。粗 DM 標品の回収方法としては、1) 操作が一貫している、2) 抽出にアセトン溶媒を使用しない、3) クロロホルムの使用量が少なくすむ等の利点があり有効な回収手段になり得ると考える。まだ塩酸塩としての結晶化による精製を試みていないが、結晶化により HDM ほか不純物の除去が可能で、粗 DM 標品より一気に完全精製ができるものと期待される。

## 引 用 文 献

- ARCAMONE, F. G., CASSINALLA, G., FANTINI, G., GREIN, A., OREZZI, P., POL, C. and SALLA, C. 1969, Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.*, 11: 1101-1110.
- CASY, M. L., PAULICK, R. C. and WHITLOCK, H. W. 1978, Carbon-13-nuclear magnetic resonance study of the biosynthesis of daunomycin and islandicin. *J. Org. Chem.*, 43: 1627-1634.
- DEKLEVA, M. L., TITUS, J. A. and STROHL, W. R. 1985, Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.*, 31: 287-294.
- Di MARCO, A., GAETANI, M., OREZZI, P., SCARPINATA, B. M., SILVESTRINI, R. and VALENTINI, L. 1964,

- Daunomycin, a new antibiotic of rhodomycin group. *Nature*, 201: 706-707.
- FUJII, S., KUBO, K., JOHDO, O., YOSHIMOTO, A., ISHIKURA, T., NAGANAWA, H., SAWA, T., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H. 1986, A new anthracycline metabolite D788-1 (10-hydroxy-13-deoxocarminomycin) in daunomycin beer. *J. Antibiot.*, 39: 473-475.
- KOMIYAMA, T., MATSUZAWA, Y., PKI, T., INUI, T., TAKAHASHI, Y., NAGANAWA, H., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H. 1977, Baumycins, new antitumor antibiotics related to daunomycin. *J. Antibiot.*, 30: 619-621.
- SCHNEIDER, W. C. 1945 Phosphorus compounds in animal tissue. I. extraction and stimulation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 161: 293-303.
- UMEZAWA, H., TAKAHASHI, T., KINOSHITA, M., NAGANAWA, H., MASUDA, T., ISHIZUKA, M., TATSUTA, K. and TAKEUCHI, T. 1979, Tetrahydropyranyl derivatives of daunomycin and adriamycin. *J. Antibiot.*, 32: 1082-1084.
- YOSHIMOTO, A., JOHDO, O., FUJII, S., KUBO, K., NISHIDA, H., OKAMOTO, R. and TAKEUCHI, T. 1992, Anthracycline metabolites from baumycin-producing *Streptomyces* sp. D788. I. Isolation of antibiotic-blocked mutants and their characterization. *J. Antibiot.*, 45: 1225-1267
- YOSHIMOTO, A., NAKAMURA, T., KUBO, K., JOHDO, O. and TONE, H. 1995, Daunomycin biosynthesis by microbial conversion of precursor metabolites using biosynthetically blocked mutants. *J. Ferment. Bioeng.*, 3: 229-235.
- YOSHIMOTO, A., JOHDO, O., NISHIDA, H., OKAMOTO, R. and TAKEUCHI, T. 1993B, Anthracycline metabolites from baumycin-producing *Streptomyces* sp. D788. III. New anthracycline metabolites by blocked mutant strains 4L-660 and YDK-18. *J. Antibiot.*, 46: 1758-1761.
- YOSHIMOTO, A., FUJII, S., JOHDO, O., KUBO, K., NISHIDA, H., OKAMOTO, R. and TAKEUCHI, T. 1993B, Anthracycline metabolites from baumycin-producing *Streptomyces* sp. D788. II. New anthracycline metabolites produced by a blocked mutant strain RPM-5. *J. Antibiot.*, 46: 56-64
- YOSHIMOTO, A., JOHDO, O., TONE, H., OKAMOTO, R. and TAKEUCHI, T. 1991A, Photochemical production of anthracycline antibiotic oxaunomycin from precursor metabolite D788-1. *Jpn. J. Antibiot.*, 44: 264-268.
- YOSHIMOTO, A., FUJII, S., JOHDO, O., KUBO, K., ISHIKURA, T., NAGANAWA, H., SAWA, H., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H. 1991B, Intensely potent anthracycline antibiotic oxaunomycin produced by a blocked mutant of the daunorubicin-producing microorganism. *J. Antibiot.*, 39: 902-909.

## Daunomycin Fermentation: Enhanced Production of Daunomycin by Iron Salt and an Approach for Its Recovery and Purification from Fermentation Broth

Tomohiko NAKAMURA, Akihiro YOSHIMOTO

*Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University  
Higashi-Hiroshima 739, Japan*

The fermentation yield of antitumor anthracycline antibiotic daunomycin was found to be considerably increased by iron salts. The effect was more significant with ferric ion than ferrous ion. When an optimum 10 mM of ferric sulfate was added to the culture, the daunomycin production was enhanced 4 folds as compared with that in the control culture without ferric sulfate. The iron effect was not observed with related anthracycline D788-1 fermentation.

Recovery of intracellularly accumulated daunomycin to cultural filtrate was carried out by adding phosphoric acid to 3-fold fermentation broth to acidify to pH 1.5 and stirring 2 hours. The filtrate was then applied to HP-20 resin column, which was eluted with a linear gradient from 15 % to 50 % acetone. Daunomycin was eluted with about 30 % acetone as almost pure fractions which were free from 13-dihydrodaunomycin, a major by-product. After extraction with  $\text{CHCl}_3$ , daunomycin powder which was less than 2 % in analog content was obtained with overall recovery yield of about 70 %.

**Key words:** daunomycin, antitumor antibiotic, fermentation, iron ion, recovery, purification