

2016 年度東洋大学審査学位論文

要約

トリコテセン系カビ毒の新たな検出系構築にむけた
基盤研究

工学研究科バイオ・応用化学専攻博士後期課程

46B0130001 番 田中 彰

第1章 序論

マイコトキシン（カビ毒）とは、糸状菌（カビ）が生産する二次代謝産物の中で、ヒトや家畜の健康に害を及ぼす化合物の総称である。そのうち、12,13-エポキシトリコテカ-9-エン骨格を有するものはトリコテセン系マイコトキシンと総称される。これをヒトや家畜が摂取すると下痢や嘔吐、皮膚炎症、敗血性出血症、食中毒性無白血球症などの中毒症状を引き起こす。代表的なトリコテセン系マイコトキシンとしてはT-2トキシンやデオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)が知られている。トリコテセン系マイコトキシンは主に *Fusarium* 属などが生産する。

そのなかでも食品で問題となるのは、赤カビ病菌である *Fusarium graminearum* が生産する DON や NIV である。また、現在も *F. graminearum* が生産する新規のトリコテセンは発見されている。*F. graminearum* は小麦や大麦に感染し、赤カビ病を引き起こすことで穀物の生産量を減少させ、同時に穀物をトリコテセンで汚染する。現在、多くの国で DON に対する規制は行われているが、NIV に対する規制は行われていない。日本では、毎年全国各地の小麦や大麦から DON と NIV が検出されている。これは、トリコテセン生産菌が普遍的に存在していることを表す。そのため、全国各地で赤カビ病菌によるパンデミックが起こる可能性がある。

トリコテセンによる被害を防ぐためには、迅速にその汚染を検出できる分析法を用いて食料や飼料サンプルを分析し、汚染状況を常にモニタリングする必要がある。そのため、近年の食品中の有毒物質検出では、短時間で分析が可能であり、また持ち運びに適しているイムノアッセイに基づく分析法により汚染サンプルのスクリーニングを行い、その後に機器分析で詳細に定量する方法が広く一般的に用いられている。

イムノアッセイキットとしては、DON や T-2 トキシンを対象としたものは市販されているが、NIV を対象としたものは存在しない。これは、NIV に対する結合能の高い抗体が存在しないためである。そのため、NIV 汚染サンプルのイムノアッセイによる迅速なスクリーニングができず、規制の遅れを招いている。また、イムノアッセイや機器分析は精度が良い反面、食品中の総合的な毒性評価や未知の毒素による汚染の検出には向かない。そのため、赤カビ病菌のパンデミックにより NIV や未知毒素を中心とした汚染が起きた場合は、健康に害を及ぼすレベルのトリコテセンをヒトが摂取してしまう危険性がある。

そこで本研究では、サンプルの毒性を観測することで汚染の有無を調べ、その汚染を総合毒性の観点から検出することが可能な系の構築を行った。また、イムノアッセイによって NIV を迅速に検出するための基盤研究も行った。

第2章 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 株の多重遺伝子破壊と

トリコテセン簡易検出系の構築

<序論>

トリコテセン系マイコトキシンには、多くの種類が存在するが、現在基準値が定められているのは DON のみである。また、トリコテセン系マイコトキシンには未発見のものも存在することが示唆されている。そのため、NIV や未知毒素を含有することを前提として食品の総合的な毒性を評価することが、食品の安全性を高め、人々が安心して暮らせる社会の実現に必要となる。

毒性を検知する方法としては、培養細胞や酵母を用いる系が知られているが、培養細胞は高感度であるが取り扱いが繁雑であり、酵母は扱い易いが培養細胞に比べて著しく感度が低い。しかしながら Abolmaali らは、遺伝子操作技術を用いることで酵母の毒素感受性を大きく上昇させることに成功した。彼らは、遺伝子機能から出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のトリコテセン耐性遺伝子を推測し、これらを 6 つ破壊することで感度の高い菌株の作製を行った。また、Takahashi-Ando らは、T-2 トキシンなどを用いて *S. cerevisiae* BY4742 株の遺伝子破壊株ライブラリーから、実際にトリコテセン耐性遺伝子をスクリーニングした。

そこで本研究では、*S. cerevisiae* BY4742 株のトリコテセン耐性遺伝子を多重に破壊してトリコテセンに対する感受性を高め、ディスク阻害法による汚染サンプルのスクリーニング系の構築を行った。特に、薬剤への耐性に関与していることが広く知られている *PDR5* および *ERG6* に注目し、それらの遺伝子を破壊することとした。

<方法>

S. cerevisiae BY4742 遺伝子破壊株ライブラリー由来の単一遺伝子破壊株を親株として、遺伝子破壊を行った。この際、Takahashi-Ando らが見出したトリコテセン耐性遺伝子を破壊している株を親株に用いた。*PDR5* および *ERG6* の遺伝子破壊は、*PDR5* はロイシン合成遺伝子の 1 つである *LEU2* で置換してロイシン要求性を補わせ、*ERG6* はウラシル合成遺伝子の 1 つである *URA3* で置換してウラシル要求性を補わせることで行った。遺伝子組換えは酢酸リチウム法にて行った。ここで得られた遺伝子破壊株については、T-2 トキシンにおける生育阻害率を求め、感受性の向上を確認した。生育阻害率は、OD₆₂₀ による培養液の濁度を指標に算出した。

作製した三重遺伝子破壊株を用いてディスク阻害法による検出限界を調べた。添加するトリコテセンとしては、DON と NIV、それらのアセチル化体、T-2 トキシンを用いた。三

重遺伝子破壊株を寒天培地に SDS と共に塗布し、その上に各種トリコテセンを染み込ませたペーパーディスクを置いて培養し、阻止円を確認した。

このディスク阻害法を用いて、DON により汚染された小麦からの毒素検出を行った。人工的に DON で小麦粉を 1.0 ppm に、小麦穀粒を 1.1 ppm に汚染し、それぞれの 5 g 分の抽出液を農林水産省推奨のプロトコールで精製した。精製した溶液を乾固させ、DMSO に溶解した後、ディスク阻害法に供した。

<結果および考察>

まずは、ライブラリー由来の単一遺伝子破壊株の *PDR5* 遺伝子を破壊した。次に、先で作製した二重遺伝子破壊株の *ERG6* 遺伝子を破壊した三重遺伝子破壊株を作製した。Fig. 1 の様に遺伝子破壊を繰り返すことで、トリコテセン感受性は大きく向上した。

ここで作製した三重遺伝子破壊株の中で、*rpb4Δpdr5Δerg6Δ* 株がトリコテセン感受性と生育速度が最も良かった。この株の IC₅₀ 値は DON で 1.5 μg/mL となり、現在報告されているどの酵母よりも感受性を向上させることに成功した。

また、この株を用いたディスク阻害法によってトリコテセン汚染サンプルの簡易スクリーニング系の構築を行った。この酵母では、DON 1 μg/disk から阻止円を確認できた。そこで、小麦粉や小麦穀粒を人工的に DON に汚染させ、その抽出物によって阻止円が形成されるかを確かめた。その結果、人工的に日本の暫定基準値である DON 1.1 ppm に汚染した小麦穀粒や、アメリカ合衆国の基準値である 1.0 ppm に汚染した小麦粉において、非常に

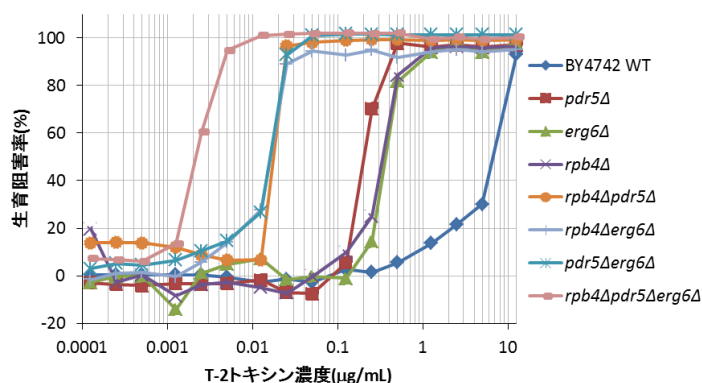


Fig. 1. *S. cerevisiae* BY4742 *rpb4Δpdr5Δerg6Δ* 株とその関連株の T-2 トキシンによる生育阻害

菌体は *S. cerevisiae* BY4742 の WT、*pdr5Δ*、*erg6Δ*、*rpb4Δ*、*rpb4Δpdr5Δ*、*pdr5Δerg6Δ*、*rpb4Δerg6Δ*、*rpb4Δpdr5Δerg6Δ* 株を使用した。T-2 トキシンの最終濃度は 0.000125~12.5 μg/mL で生育阻害率を求めた。

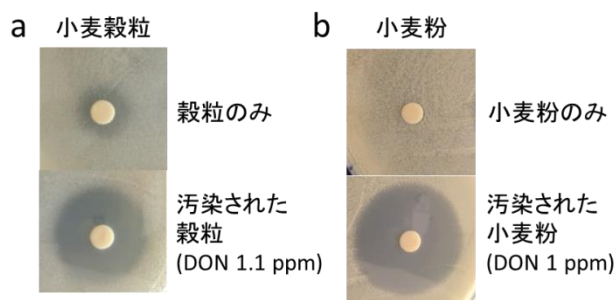


Fig. 2. DON に汚染された小麦による阻止円

a: 小麦穀粒からの抽出物。b: 小麦粉からの抽出物。それぞれ、上は汚染していないコントロール。下は人工的に DON で汚染したサンプル。

大きな阻止円を確認できた(Fig. 2)。これらの結果から、この方法は DON の汚染サンプルのスクリーニング系として、十分に実用に耐えうる感度を持つことが明らかとなった。

<まとめ>

本章では、*S. cerevisiae* BY4742 株のトリコテセン耐性遺伝子を多重に破壊することによって、トリコテセンに対してより高い感受性を持つ菌株の作製、および汚染サンプルの簡易スクリーニング系の構築を行った。

S. cerevisiae BY4742 株を親株とする遺伝子破壊株ライブラリーの単一遺伝子破壊株の *PDR5* および *ERG6* 遺伝子を破壊して三重遺伝子破壊株を作製した。作製した三重遺伝子破壊株の中で、最も実用性が高かったのは *rpb4Δpdr5Δerg6Δ* 株であった。この株の IC₅₀ 値は DON で 1.5 μg/mL であった。

また、ディスク阻害法を用いたトリコテセン汚染サンプルの簡易スクリーニング系の構築を行った。*rpb4Δpdr5Δerg6Δ* 株では、DON 1 μg/disk から阻止円を確認できた。また、人工的に日本の暫定基準値である DON 1.1 ppm に汚染した小麦穀粒や、アメリカ合衆国の基準値である 1.0 ppm に汚染した小麦粉において、非常に大きな阻止円が形成された。

ここで構築したトリコテセン簡易スクリーニング系は、トリコテセンに起因する酵母の生育阻害を観測することでその毒性を検出している。そのため、DON に限らず未知毒素を含む様々なトリコテセンの総合的な毒性の検知に利用できる。

第 3 章 土壤微生物からのトリコテセン C-4 位アセチル化酵素の探索と 性状解析

<序論>

トリコテセンによる被害を防ぐためには、食料や飼料サンプルの汚染状況を常にモニタリングする必要がある。そのためには、イムノアッセイにより汚染サンプルを圃場などでスクリーニングすることが望ましい。現在、DON や T-2 トキシンを検出するイムノアッセイキットは市販されているが、NIV を対象としたものは存在しない。これは、実用に耐えうる NIV の抗体が存在しないためである。そして、これは NIV に対する規制が遅れている理由の 1 つと言われている。NIV のアセチル化体である 3,4,15-トリアセチルニバレノール (3,4,15-triANIV) を対象とした抗体は存在するものの、これを用いるには NIV を 3,4,15-triANIV に変換しなければならない。NIV をアセチル化する方法としては、ジメチルアミノピリジンと無水酢酸を用いる方法が知られているが、これらの試薬は毒性を持っており、また C-7 位もアセチル化してしまうため、圃場などでの使用には適さない。有機

化学合成を行わずにアセチル化を行うには、トリコテセン生合成酵素を用いる方法が考えられる。その場合は C-3 位アセチル化酵素である TRI101 や C-15 位アセチル化酵素である TRI3、C-4 位アセチル化酵素 TRI7 を作用させればよい。そのうち、TRI3 や TRI101 は異種発現による大量生産が可能である。しかし、TRI7 は未だに *in vitro* での活性を確認できていない。

土壌微生物の中には、トリコテセンの脱アセチル化やエポキシ環の開裂等、トリコテセンの構造を変化させるものが存在する。そのため、土壌微生物の中にはトリコテセンをアセチル化するものも存在すると期待できる。そこで、本研究では TRI7 の代替酵素をもつ微生物を土壌から探索し、得られた酵素の性状解析を行った。

<方法>

日本各地から土を採取し、滅菌水で希釈した後に寒天培地で培養し、コロニーを選別した。ここで得た菌株を 3,15-ジアセチルニバレノール(3,15-diANIV)を含んだ液体培地で培養し、トリコテセンをアセチル化した菌株を選別した。解析は TLC で行った。3,15-diANIV をアセチル化した菌体を更に希釈して寒天培地で培養し、単離した。

得られた候補株から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。ここで得られた塩基配列を基に、属種の推定を行った。また、形態学試験も実施した。

候補株を超音波破碎して粗酵素を調製した。この粗酵素を用いて、至適 pH および至適温度を調べた。また、熱安定性や K_m 、基質特異性についても解析した。反応系には、アセチル基供与体としてアセチル CoA を添加した。分析は HPLC にて行った。

<結果および考察>

土壌より単離した 434 菌株中、6 菌株が 3,15-diANIV の C-4 位をアセチル化した。この中で、*in vivo* アッセイにて最も活性を強く示したのは 3010 株であった。この 3010 株の 16S rRNA 遺伝子配列を解析したところ、*Pseudomonas vancouverensis* と 99.8%の相同性を示した。そのため、この 3010 株は *Pseudomonas* 属であることが明らかとなった。

3010 株から粗酵素を調製して詳細な分析を行った結果、この粗酵素の至適 pH は 6.4 付近であった(Fig. 3)。また、この粗酵素の至適温度は 40°C 付近であった(Fig. 4)。しかしながら、この粗酵素は 40°C では安定性が低く、1 日でその活性が 65%ほど低下し、5 日間ではほぼ失活してしまった(Fig. 5)。対して 30°C では、1 日ではその活性が 27%ほど低下したものの、5 日経っても約 50%の活性を保持しており、比較的安定であった。この粗酵素の 3,15-diANIV に対する K_m は 107 μM であった。

基質特異性に関しては、C-3 位がアセチル化された NIV 系トリコテセンにのみ活性を示

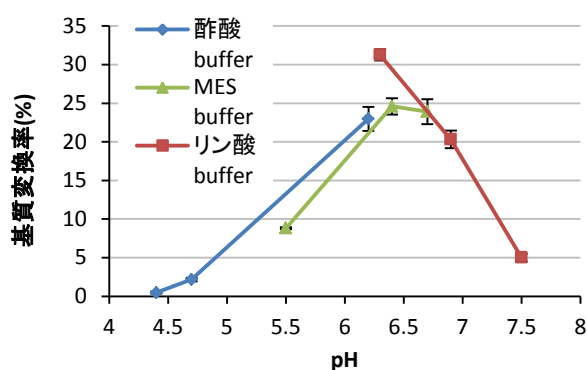


Fig. 3. 3010株のC-4位アセチル化酵素の至適 pH

3010株から調製した粗酵素の至適 pH を調べた。pH は酢酸 buffer で 4.4~6.2、MES buffer で 5.0~6.8、リン酸 buffer で pH 6.3~7.5 に調整した。反応は 30℃で 24 時間行った。

した。また、本来の生合成経路では合成されない 3-アセチルニバレノール (3-ANIV) よりも、3,15-diANIV に対してより強い活性を示した。

<まとめ>

本章では、免疫アッセイによる NIV 検出系の構築のために、トリコテセン C-4 位アセチル化酵素を土壤微生物から探索し、詳細な性状の解析を行った。

その結果、土壌より単離した 434 菌株中 6 菌株が 3,15-diANIV の C-4 位をアセチル化した。最も *in vivo* アッセイにて活性を強く示した 3010 株は、*Pseudomonas* 属であった。この 3010 株の粗酵素の至適 pH は 6.4 付近であり、至適温度は 40℃付近であった。この粗酵素の 3,15-diANIV に対する K_m は 107 μM であった。基質特異性に関しては、C-3 位がアセチル化された NIV 系トリコテセンにのみ活性を示した。

ここで単離した 3010 株の粗酵素は、30℃において比較的高い安定性を示すものの、活性が弱く、スクリーニングの前処理に使用するには適さなかった。しかしながら、今後この酵素の単離や精製、異種発現や大量生産が可能になれば、比較的高い安定性の高いこの酵素は

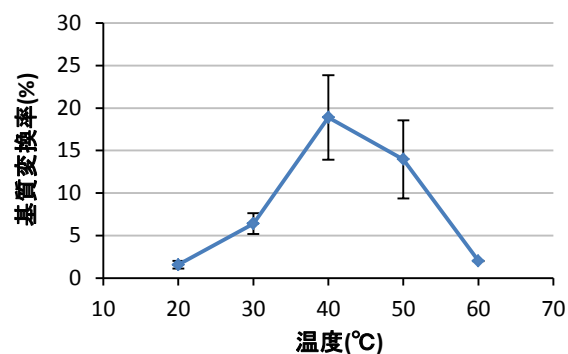


Fig. 4. 3010株のC-4位アセチル化酵素の至適温度

3010株の粗酵素を用いて C-4 位アセチル化酵素の至適温度を調べた。pH はリン酸 buffer を用いて 6.3 に調整し、20~60℃で 6 時間反応を行った。

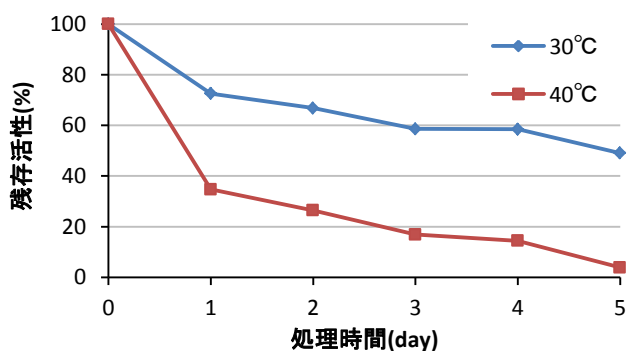


Fig. 5. 3010株C-4位アセチル化酵素の熱安定性

3010株のC-4位アセチル化酵素を0~5日間30℃と40℃で処理して熱安定性を調べた。処理した後、40℃で6時間反応を行った。HPLC 解析により温度処理後の基質変換率を求め、0日目の変換率と比較して残存活性を求めた。

NIV 汚染のスクリーニングに大いに役立つ可能性を有している。

第 4 章 トリコテセン C-4 位アセチル化酵素 TRI7 の性状解析

<序論>

第 4 章では、第 3 章と同様にトリコテセンの C-4 位アセチル化酵素の取得を、別のアプローチから試みた。トリコテセンの生合成において C-4 位のアセチル化を行う TRI7 酵素は、これまで *in vitro* における活性の確認が行われておらず、その詳細は不明なままであった。そこでこの章では、トリコテセン生産菌の C-4 位アセチル化酵素である TRI7 の *in vitro* での活性確認と性状解析を行った。

<方法>

DON 生産菌のトリコテセン生産能を失わせた *F. graminearum* JCM 9873 $\Delta Tri5$ 株(JCM $\Delta Tri5$ 株)に、FLAG-HA タグと融合させた *Tri7* を導入して JCM 9873 $\Delta Tri5$ *tef* *FH Tri7* 株(JCM $\Delta Tri5$ *tef* *FH Tri7* 株)を作製した。この JCM 9873 株は *Tri7* と C-4 位水酸化酵素 *Tri13* が欠損、あるいは偽遺伝子化しており機能しない。この遺伝子組換え株に 3,15-diANIV を添加して *in vivo* アッセイを行った。分析は HPLC にて行った。

JCM $\Delta Tri5$ *tef* *FH Tri7* 株および *F. graminearum* MAFF 111233 $\Delta Tri8$ 株(MAFF $\Delta Tri8$ 株)を摩砕して粗酵素を調製し、3,15-diANIV と反応させて *in vitro* での活性確認を試みた。この MAFF $\Delta Tri8$ 株は、NIV 生産菌の脱アセチル化酵素 TRI8 の遺伝子を破壊した株である。反応系には、アセチル基供与体としてアセチル CoA を添加した。分析は HPLC と LC-MS にて行った。更に、MAFF $\Delta Tri8$ 株から調製した粗酵素を遠心分画した。ここで得られた 100,000×*g* のペレットを用いて、TRI7 の熱安定性を調べた。

JCM $\Delta Tri5$ *tef* *FH Tri7* 株を摩砕して粗酵素を調製し、FLAG アフィニティーゲルと混合して 4°C で 30 分間、TRI7 とゲルを結合させた。このゲルを洗浄し、競合溶出によって TRI7 を溶出して精製を行った。得られた TRI7 は SDS-PAGE で確認した。この精製した TRI7 を用いて、TRI7 の至適 pH や至適温度、3,15-diANIV に対する K_m を調べた。

<結果および考察>

まずは、JCM $\Delta Tri5$ 株と JCM $\Delta Tri5$ *tef* *FH Tri7* 株に 3,15-diANIV を添加して *in vivo* アッセイを行った。その結果、3,4,15-triANIV は検出されなかったものの、その C-3 位脱アセチル化体である 4,15-ジアセチルニバレノール(4,15-diANIV)が検出された。これは、3,15-diANIV の C-4 位がアセチル化されて 3,4,15-triANIV になり、その後 C-3 位が脱アセチル化した結果であると考えられた。この結果から、FLAG-TRI7 融合酵素の発現に成功

したことが明らかとなった。

そこで、JCM $\Delta Tri5$ tef FH *Tri7*株および MAFF $\Delta Tri8$ 株から粗酵素を調製し、*in vitro*での活性確認を試みた。その結果、どちらの株由来の粗酵素でもトリコテセンの C-4 位アセチル化体を確認することができた。

*in vitro*における TRI7 活性の確認に成功したため、より良い粗酵素の調製方法を探った。そのために、MAFF $\Delta Tri8$ 株を用いて粗酵素を調製し、TRI7 のおおよその性状を調べた。その結果、TRI7 は非常に不安定であり、常温でも速やかに失活してしまうことが明らかとなった。そこで、粗酵素の調製を全て 4°Cで行ったところ、得られた粗酵素の活性は劇的に向上した。

高活性の粗酵素が調製できるようになったため、JCM $\Delta Tri5$ tef FH *Tri7*株から FLAG アフィニティーゲルを用いて TRI7 の精製を試みた。その結果、TRI7 の単離・精製に成功した。精製した FLAG-TRI7 を用いて、TRI7 の詳細な性状解析を行った。その結果、至適温度は 35°C付近であることが明らかとなった。しかしながら、長時間の反応では最終的な変換率が 35°Cよりも 30°Cの方がわずかに優れていた。至適 pH は 8.0 付近であった。

以上の結果を踏まえ、実際に NIV を 3,4,15-triANIV へと変換することを想定した条件で、TRI7 の 3,15-diANIV に対する K_m を調べた。そのため、pH はトリコテセンの化学的脱アセチル化が起こらない pH 7.0 で反応を行った。また、反応温度は 30°Cで行った。その結果、TRI7 の K_m は 30.6 μM となった。

<まとめ>

本章では、免疫アッセイによる NIV 検出系の構築のために、トリコテセン生合成酵素である TRI7 の *in vitro*での活性確認と詳細な性状の解析を行った。

まずは、JCM $\Delta Tri5$ tef FH *Tri7*株に 3,15-diANIV を添加して *in vivo* アッセイを行ったところ、トリコテセンの C-4 位アセチル化体が検出された。そこで、JCM $\Delta Tri5$ tef FH *Tri7*株および MAFF $\Delta Tri8$ 株から粗酵素を調製し、*in vitro*での活性確認を試みたところ、粗酵素でもトリコテセンの C-4 位アセチル化体を確認することができた。

次に、JCM $\Delta Tri5$ tef FH *Tri7*株から FLAG アフィニティーゲルを用いて TRI7 の精製を試みたところ、TRI7 の単離・精製に成功した。精製した TRI7 を用いた性状解析の結果、至適温度は 35°C付近であり、至適 pH は 8.0 付近であることが明らかとなった。TRI7 の 3,15-diANIV に対する 30°C、pH 7.0 での K_m は 30.6 μM となった。

TRI7 は 2001 年の発見以降、未だに *in vitro*での活性の確認に成功した例はなく、本研究において初めて TRI7 の *in vitro*での C-4 位アセチル化活性の確認と性状解析に成功した。

これらの成果は、TRI7 の利用による NIV のイムノアッセイ法の構築や、新規トリコテセンの合成などへの応用利用が期待できる。また、未だに謎の多いトリコテセン後期生合成経路の解明にも貢献できる。

第 5 章 トリコテセン生合成酵素を用いた NIV のアセチル化

<序論>

トリコテセンによる被害を防ぐためには、食料や飼料サンプルの汚染状況を常にモニタリングする必要がある。そのためには、イムノアッセイにより汚染サンプルを圃場などでスクリーニングすることが望ましい。しかし、NIV をイムノアッセイによって検出するには、NIV のアセチル化体である 3,4,15-triANIV に変換しなければならない。化学反応によってこのアセチル化を行う場合に使用する試薬には毒性が有り、圃場などでの使用には適さない。有機化学合成を行わずにアセチル化を行うには、トリコテセン生合成酵素を用いる方法が考えられる。その場合は C-3 位アセチル化酵素である TRI101 や C-15 位アセチル化酵素である TRI3、C-4 位アセチル化酵素を NIV に作用させればよい。TRI3 や TRI101 は異種発現による大量生産が可能である。また、C-4 位アセチル化酵素は第 3 章および第 4 章において、*Pseudomonas* sp. 3010 株由来のものとトリコテセン生合成酵素である TRI7 を得ることに成功した。

そこで、実際に第 3 章や第 4 章の結果を踏まえて NIV を 3,4,15-triANIV へと酵素的に変換する系の構築を行った。

<方法>

TRI3 と TRI101 は、それぞれの遺伝子を pColdIII ベクターに組み込み、*Escherichia coli* BL21 (DE3) 株を形質転換して発現させた。トリコテセン C-4 位アセチル化酵素としては、活性が強い TRI7 を用いることとした。TRI7 は、MAFF Δ Tri8 株由来のものを使用した。

NIV 溶液に TRI3 と TRI101 を加えて反応を行い、その後に TRI7 を加えて反応を行った。その後、さらに TRI101 を加えて反応を行った。反応系には、アセチル基供与体としてアセチル CoA を添加した。

<結果および考察>

TRI101 は NIV と 3-ANIV の両方を基質として認識し、TRI3 は 3-ANIV を基質として認識した。そこで、TRI 酵素を混合することでこの 2 つの酵素によるアセチル化は 1 段階で行えると考えた(Fig 6, Step 1)。実際に反応を行ったところ、NIV の 66.8% を 3,15-diANIV へと変換できた。更に、ここに MAFF Δ Tri8 株由来の粗酵素を TRI7 として添加して反応

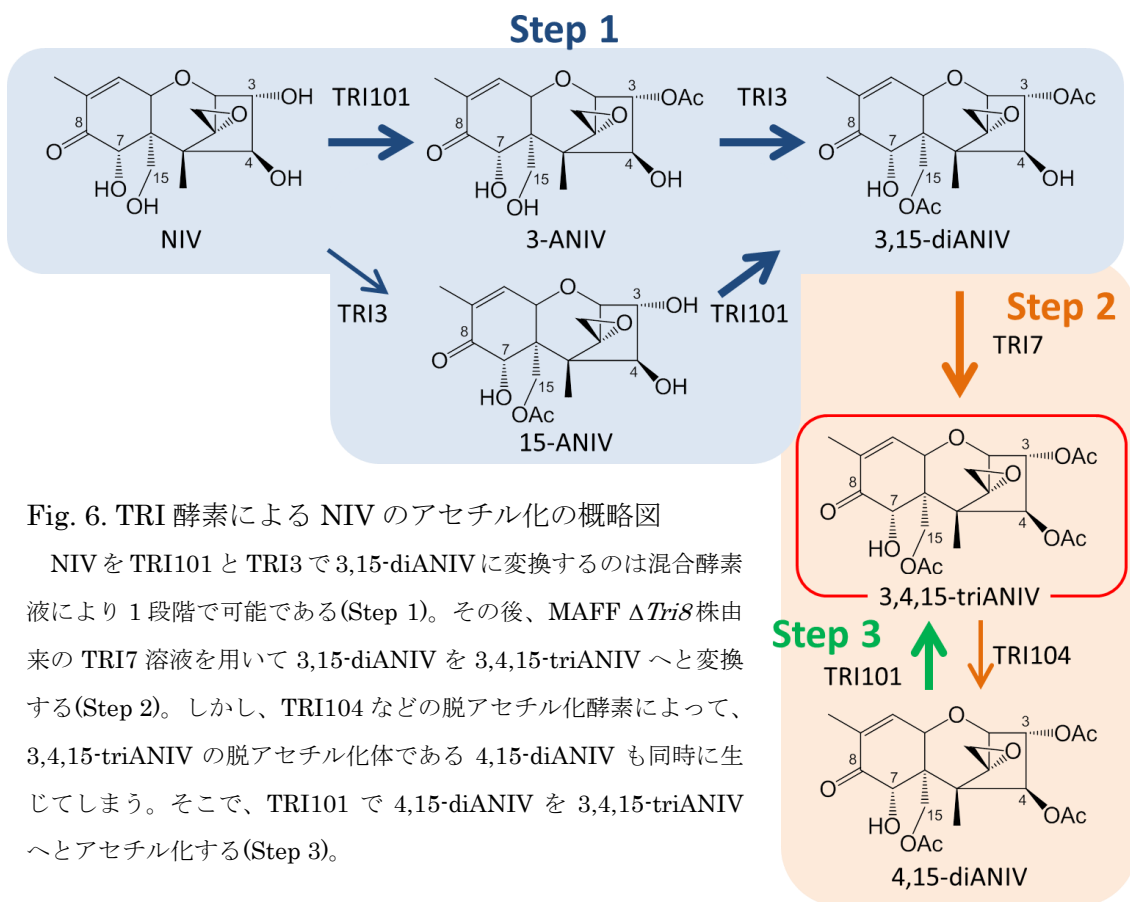


Fig. 6. TRI 酵素による NIV のアセチル化の概略図

NIV を TRI101 と TRI3 で 3,15-diANIV に変換するのは混合酵素液により 1 段階で可能である (Step 1)。その後、MAFF $\Delta Tri8$ 株由来の TRI7 溶液を用いて 3,15-diANIV を 3,4,15-triANIV へと変換する (Step 2)。しかし、TRI104 などの脱アセチル化酵素によって、3,4,15-triANIV の脱アセチル化体である 4,15-diANIV も同時に生じてしまう。そこで、TRI101 で 4,15-diANIV を 3,4,15-triANIV へとアセチル化する (Step 3)。

を行うことで、NIV の 66.6% を 3,4,15-triANIV へと変換した (Fig 6, Step 2)。この際、TRI104 などの脱アセチル化酵素の働きにより 4,15-diANIV が生じてしまった。そのため、最後に TRI101 によって 4,15-diANIV を 3,4,15-triANIV に再度アセチル化した (Fig 6, Step 3)。この結果、NIV の 78.5% を 3,4,15-triANIV へと変換できる系の構築に成功した。

<まとめ>

TRI3 と TRI101、MAFF $\Delta Tri8$ 株由来の TRI7 を組み合わせることで、NIV の 78.5% を 3,4,15-triANIV へと変換することに成功した。この成果は、3,4,15-triANIV の抗体を用いた NIV 汚染の迅速なスクリーニングのための前処理として活用でき、NIV 汚染の防除に貢献できる。

第 6 章 総括

本研究では、トリコテセン系マイコトキシンの新たな検出系を構築するための基盤研究を行った。その結果、*S. cerevisiae* BY4742 *rpb4* Δ *pdr5* Δ *erg6* Δ 株を用いた高感度検出法の構築に成功した。この系は、サンプルの毒性を指標とした検出系であるため、未知毒素を含む毒素成分の総合的な毒性の検知が可能である。加えて、本研究で得られたトリコテセ

ン C-4 位アセチル化酵素を用いることで、NIV を 3,4,15-triANIV へと変換することが可能な系の構築にも成功した。この系を応用することで、3,4,15-triANIV の抗体を用いたイムノアッセイによる NIV の迅速な検出を可能とする。

本研究の成果は、複合的なトリコテセン汚染の検知とその総合的な毒性の評価や、圃場などでの NIV 汚染サンプルの迅速なスクリーニングを可能とする。そのため、本研究はトリコテセンの防除に寄与し、食の安全を守ることに大きく貢献できるものである。