

氏名(本籍地)	田中 彰 (埼玉県)		
学位の種類	博士(工学)		
報告・学位記番号	甲第401号(甲工第107号)		
学位記授与の日付	平成28年9月25日		
学位記授与の要件	本学学位規程第3条第1項該当		
学位論文題目	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		
論文審査委員	主査 教授	工学博士	吉田 泰彦
	副査 教授	Ph.D.	安藤 直子
	副査 教授	博士(理学)	福島 康正
	副査 名古屋大学准教授	博士(農学)	木村 真

【論文審査】

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。中でも、赤カビ病菌である *Fusarium graminearum* が生産するデオキシニバレノール(DON)やニバレノール(NIV)は重要穀類を汚染し、これを摂取したヒトや家畜に健康被害をもたらすことで知られている。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、短時間で分析でき、運搬にも適しているイムノアッセイ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用いられている。

しかし、DONを対象とした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市販されていない。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り、NIV汚染サンプルの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、ヒトや家畜の健康を害するレベルのトリコテセン汚染が起こりうる。そこで本研究では、サンプルの毒性を総合的に検出することが可能な系の構築を行い、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

行っている。

本論文は次の5章より構成されている。

第1章 序論

本章では、マイコトキシンの中でも、トリコテセン系マイコトキシンとその生産菌による被害とその歴史、トリコテセンの毒性の発現機構、種々の測定方法等についてまとめている。トリコテセンはその構造によってA型、B型、C型、D型に大別される。食品で主に問題となるのは *Fusarium* 属によって生産されるA型とB型のトリコテセンである。歴史的に、*Fusarium* 属の糸状菌は農産物に大きな被害を及ぼしてきたが、その際に発生するトリコテセンによってヒトや家畜が中毒症状を起こした事例がいくつも知られている。そういった歴史的事実を踏まえると、*Fusarium* 属菌のパンデミックに伴うトリコテセンの汚染は、食の安全を揺るがすゆゆしき問題といえるが、その迅速な測定方法は確立しているとは言い難い。また、未だに新しいトリコテセンの発見が相次いでいることから、単に既知のトリコテセンの測定のみを重視するべきではないと考えられる。よってこの章では、現在簡易で迅速な検出法がないNIVの測定法の構築や、トリコテセン汚染を総合毒性の観点から検出できる系の構築の重要性について述べている。

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

この章では、サンプル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について述べている。*S. cerevisiae* BY4742株のトリコテセン耐性に関与する遺伝子を多重に破壊することで、トリコテセンに対して高い感受性を持つ菌株を作製し、この菌株を用いた汚染サンプルの簡易スクリーニング系の構築を行っている。

まず、トリコテセン耐性遺伝子の中でABCトランスポーターに関与する *PDR5* 遺伝子とエルゴステロール生合成に関与する *ERG6* 遺伝子に着目した。そして、トリコテセン耐性への関与が判明している *CHC1*、*TAF14*、*VMA5*、*RPB4*、*SPT10*、*SAC1*、*SRB5*、*SWI3*、*HF11*、*REF2* 遺伝子を破壊した *S. cerevisiae* BY4742単一遺伝子破壊株を用いて、それらの *PDR5* 遺伝子、続いて、*ERG6* 遺伝子を破壊した。これらの三重遺伝子破壊株の中で、トリコテセン感受性と生育速度が最も優れていた株は *rpb4Δpdr5Δerg6Δ* 株であった。この株の IC_{50} 値はDONで1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となり、現在報告されているどの酵母よりも高感度であることを示した。

この *rpb4Δpdr5Δerg6Δ* 株を用いて、ディスク阻害法による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。この系でのDONの検出限界は1 $\mu\text{g}/\text{disk}$ であり、実用に耐える可能性を示した。そこで実際に、小麦粉や小麦穀粒を人工的にDONで汚染したサンプルからの抽出物で阻止円が形成されるかを確認した。汚染サンプルの精製は農林水産省推奨のプロトコールに沿って行った。その結果、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を確認できた。以上のことから、この *rpb4Δpdr5Δerg6Δ* 株を用いたディスク阻害法は 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。また、同様の毒性を持つトリコテセンやその複合汚染に対しても、総合的に毒性を検出できることを明らかにしている。

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

本章では、NIV をイムノアッセイで迅速に検出するための前処理に必要となる酵素を土壤微生物から探索し、その微生物酵素の性状を解析した結果について述べている。イムノアッセイに用いる抗体について、NIV に対する実用的な抗体は存在しないが、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) に対して高い結合能をもつ抗体は存在する。そのため、NIV を3,4,15-triANIV へとアセチル化すれば、この抗体を用いて NIV の迅速な検出が可能となる。トリコテセンのアセチル化酵素としては、C-3 位アセチル化酵素の TRI101 や、C-15 位アセチル化酵素の TRI3 が知られており、これらの酵素は大腸菌による異種発現に成功している。しかし、トリコテセンの C-4 位アセチル化酵素については活用できるものが存在しなかった。そこで、トリコテセン C-4 位アセチル化酵素を土壤微生物より探索した。

その結果、土壤より単離した434菌株中6菌株が3,15-ジアセチルニバレノール (3,15-diANIV) を3,4,15-triANIV へと変換した。この6菌株の中で、最も活性が強かったのは3010株であった。この3010株の16SrRNA 遺伝子の塩基配列を解析したところ、この株は *Pseudomonas vancouverensis* の近縁種であり、*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性状解析を行った結果、この粗酵素の至適 pH は6.4 付近であり、リン酸ナトリウム緩衝液で強い活性を示した。また、この粗酵素の至適温度は40℃付近であった。しかし、この粗酵素は40℃では安定性が低く、対して30℃では、5日経っても約50%の活性を保持しており、高い安定性を示した。この粗酵素の3,15-diANIV に対する K_m は107 μ M であり、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。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、NIV の生合成中間体である3,15-diANIV に対してより強い活性を示した。

3010株の粗酵素の活性は高くはなかったが、精製や異種発現等によって高濃度の酵素溶液が得られれば、比較的安定性の高いこの酵素は十分に実用に耐えうると思う。

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

本章では、トリコテセン生産菌の C-4 位アセチル化酵素と推定される TRI7 に関し、その *in vitro* での活性確認と性状解析の結果について述べている。TRI7 の詳しい性状解析はこれまで成功しておらず、また、*in vitro* で高活性を示す粗酵素を調整できれば、NIV

の3,4,15-triANIV 変換系に使用できる可能性がある。そこでまず、TRI7を持たないDON生産菌である *F. graminearum* JCM 9873株のトリコテセン生産能を失わせ、*Tri7*をFLAG-HA タグと融合させて導入したJCM $\Delta Tri5$ *tef* FH *Tri7*株を用い、生合成経路上でTRI7の基質であると考えられている3,15-diANIVを添加して *in vivo* アッセイを行った。その結果、3,15-diANIVが4,15-ジアセチルニバレノール (4,15-diANIV) に代謝された。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、その後にC-3位が脱アセチル化した結果であると考えた。この結果から、TRI7発現の直接的観察に初めて成功したことが明らかとなった。またその際、トリコテセン脱アセチル化酵素がTRI7と競合してしまうため、この酵素の除去が重要であることも示唆された。

In vivo によるTRI7活性を確認できたため、菌糸を摩砕して粗酵素を調製し、*in vitro*での活性確認を試みた。この際、JCM $\Delta Tri5$ *tef* FH *Tri7*株の他に、元々 *Tri7*を有するNIV生産菌 *F. graminearum* MAFF 111233株を用い、トリコテセン脱アセチル化酵素TRI8の遺伝子を破壊したMAFF $\Delta Tri8$ 株を作製し、同様に粗酵素を調製して、TRI7活性の確認を行った。その結果、どちらの株由来の粗酵素においてもトリコテセンのC-4位アセチル化活性を確認することに成功した。しかし、これらの粗酵素の活性は弱かったため、より良い粗酵素の調製方法を探った。MAFF $\Delta Tri8$ 株の方が、JCM $\Delta Tri5$ *tef* FH *Tri7*株よりもTRI7活性の確認が容易であったため、この株を用いて粗酵素を調製し、TRI7の熱安定性を調べた。その結果、TRI7は非常に不安定であり、30℃では30分、4℃でも1日程度で失活してしまうことが明らかとなった。そこで、粗酵素調製時の温度管理を徹底し、操作を氷上で行ったところ、得られた粗酵素の活性は劇的に向上し、温度管理を徹底する前の100倍以上になった。

そこで今度は、FLAG-HA タグ融合型のTRI7を発現できる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、FLAG-TRI7融合タンパク質の精製に成功した。この精製したFLAG-TRI7を用いてTRI7の詳細な性状解析を行ったところ、至適温度は35℃付近、至適pHは8.0付近であった。また、TRI7の3,15-diANIVに対する K_m はpH 7.0、30℃の条件で、30.6 μ Mであることを示した。

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と言えよう。

第5章 トリコテセン整合性酵素を用いたニバレノールのアセチル化

本章では、トリコテセンのC-15位アセチル化酵素であるTRI3やC-3位アセチル化酵素であるTRI101および本研究によって得られたC-4位アセチル化酵素を用いて、NIVを

実際に 3,4,15-triANIV へと変換する系の構築を行った。本研究では、*Pseudomonas* sp. 3010株由来の酵素と *F. graminearum* 由来の TRI7 酵素の 2つのトリコテセン C-4 位アセチル化酵素の取得に成功している。これら 2つの酵素は、本研究で調製した粗酵素の状態では TRI7の方が変換率は遥かに高かった。そこで、ここではトリコテセン C-4 位アセチル化酵素として MAFF $\Delta Tri8$ 株由来の TRI7 を使用することとした。

まず、大腸菌に発現させたリコンビナント TRI 酵素 (rTRI) である rTRI3 と rTRI101 の基質特異性を調べた。その結果、rTRI101は NIV と 15-アセチルニバレノール (15-ANIV) の両方に強い活性を示すのに対して、rTRI3 は 3-アセチルニバレノール (3-ANIV) に強い活性を示した。この結果から、この 2つの rTRI 酵素を用いた NIV の C-3 位と C-15 位のアセチル化は 1段階で行えると考えた。そこで、実際にこれらの rTRI 酵素を混合して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 $\Delta Tri8$ 株由来の粗酵素を TRI7 として添加して反応を行うことで、NIV の 66.6% を 3,4,15-triANIV へと変換した。この際、脱アセチル化酵素の働きにより 4,15-diANIV も生じてしまった。そこで、更に rTRI101を添加して反応を行うことで、4,15-diANIV を 3,4,15-triANIV へとアセチル化した。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。また、本研究では TRI104などの脱アセチル化酵素により 4,15-diANIV を生じたと考えたが、MAFF $\Delta Tri8$ 株の *Tri104* 遺伝子を破壊した株を作製すれば脱アセチル化を抑えられ、より多くの NIV を 3,4,15-triANIV へと変換することが可能になると考えている。

第 6 章 総括

本章では第 2 章から第 5 章の結果を要約し、まず、トリコテセンの総合的毒性評価を行う系の構築について総括を述べた。また、本研究で初めて *in vitro* 活性を示すことが出来た TRI7 酵素とともに他の既存の TRI 酵素を用いることで、NIV を 3,4,15-triANIV に変換することに成功した成果について述べた。その結果、これまで不可能だった NIV の簡易検出法の構築が実現する可能性を示したと言える。

【審査結果】

現在、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、その迅速な検出が可能ではなく、ヒトや家畜の健康を害するレベルのトリコテセン汚染が起ころう。そこで本研究では、サンプルの毒性を総合的に検出することが可能な系の構築を行った。また、これまで適切な規制を行えなかった NIV を迅速に検出するために、イムノアッセイ前の酵素による前処理法を構築することを目指した。本論文で特に評価される点を以下にまとめる。

- 1) 出芽酵母 *S. cerevisiae* BY4742 のトリコテセン耐性遺伝子を複数破壊することで、

より簡易で高感度なトリコテセン検出系を構築する事に成功した。すなわち、BY4742 *rpb4Δ pdr5Δ erg6Δ* 株を作製し、その感度が非常に高く、実用に耐えることを示した。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、NIVなどの既存のトリコテセンに限らず、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出にも利用できる。

- 2) トリコテセン C-4 位アセチル化酵素である TRI7 の *in vitro* 活性を初めて確認することに成功した。これは未だに謎の多いトリコテセン後期生合成経路に新たな知見を加えるものである。また、この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。この系を前処理として利用すれば、3,4,15-triANIV 抗体を使用して NIV を迅速に検出することが可能になると考える。

これらの成果から、本研究は重要穀類のトリコテセン汚染からの防除に寄与し、食の安全を守ることに大きく貢献するものと言える。

以上のことから、工学研究科（バイオ・応用化学専攻）の博士学位審査基準に照らしても妥当な研究内容であると認められる。従って、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致を以って田中彰氏の博士学位請求論文は、本学博士学位を授与するに相応しいものと判断する。