

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07459

研究課題名(和文)ニバレノール系カビ毒の側鎖統一に向けた技術創成とその検出への応用利用

研究課題名(英文)Technology development to acetylate nivalenol-type trichothecenes to tri-acetyl nivalenol for a collective detection method

研究代表者

安藤 直子 (Naoko, Takahashi-Ando)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：70360485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Fusarium graminearum等の赤カビ病菌は、nivalenol (NIV)等のトリコテセン系カビ毒を生産するが、簡易検出系のELISAに必要な抗体が得られないため、事実上放置されている。しかし、NIV系トリコテセンをアセチル化することで、3,4,15-triacetyl nivalenolに変換でき、この生産物はELISAで測定が可能である。本研究では、NIV系トリコテセンの3, 4, 15位をアセチル化する酵素を、F. graminearumと土壌微生物から得て、それらを効率的に反応させることにより、一括変換する条件を見いだすことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Filamentous fungi such as Fusarium graminearum produce trichothecene mycotoxins including nivalenol (NIV). However, since effective antibodies necessary for ELISA to detect NIV-type trichothecenes have not been obtained yet, these mycotoxins are not regulated properly. Thus, we assumed that NIV-type trichothecenes can be converted to 3,4,15-triacetyl nivalenol by acetylase, and this product can be measured by ELISA. In this study, we attempted to acquire enzymes that acetylate at positions C-3, C-4, and C-15 of NIV-type trichothecenes, from F. graminearum we purchased and modified by genetic engineering, and soil microorganisms we screened for. We succeeded in finding the proper conditions for collective conversion of NIV-type trichothecenes to 3,4,15-triacetyl nivalenol, which is detectable by ELISA. This research may contribute to the construction of a collective detection system of NIV-type trichothecenes.

研究分野：食品科学 食品毒性学 微生物工学

キーワード：カビ毒 トリコテセン ニバレノール ELISA 食の安全 生合成酵素

1. 研究開始当初の背景

Fusarium graminearum 等の糸状菌はトリコテセン系カビ毒を生産し、食の安全を脅かす。我が国でも、nivalenol (NIV; 図1)、deoxynivalenol (DON)、それらの類縁体が農作物において頻繁に検出され、問題となっている。中でも、NIV系トリコテセンはDONと毒性が同等か、それ以上であるにもかかわらず、簡易検出系であるELISA用の抗体が作製できないため、その検出が困難である。そのため、DONとは異なり、未だに適切な法的規制がなされていないという現状があり、食の安全性を守るといった観点から考えても、由々しき問題と言えよう。

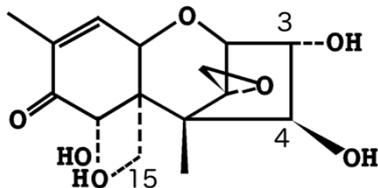


図1. nivalenol (NIV)の構造式

2. 研究の目的

本研究では、NIV またはそのアセチル化体をすみやかに検出するために、NIV系トリコテセンの側鎖修飾を一括で行い、一分子種に統一する技術の構築を目指すこととした。すなわち、NIV に対してはELISAに用いることができる高い結合能を持った抗体が生産されていないものの、そのC-3、C-4、C-15位にアセチル基が付加した3,4,15-triacetylnivalenol (3,4,15-triANIV) に対しては、ELISAに使用可能なグレードの抗体が存在することが知られている。そのため本研究では、NIVとその類縁体を酵素的に3,4,15-triANIVに変換し、NIV系トリコテセンを簡易に一括検出する系の構築を目的とした。

(1) この目的のために、各種トリコテセン合成酵素に着目した。C-3、C-4、C-15位をそれぞれアセチル化するトリコテセン合成酵素はTRI101、TRI7、TRI3であるが、TRI101とTRI3はすでに大腸菌などを利用した異種発現が成功している。しかし、C-4位アセチル化を担うとされるTRI7は未だに謎が多く、異種発現にも大量生産にも成功していない。そこで、本研究ではまずTRI7の機能・性状解析と大量発現を目指すこととした(図2の経路A)。

(2) 次に、C-15位のアセチル化を担うTRI3については、C-4位にアセチル基が付加したトリコテセンに対して活性がないという強い基質特異性が問題となっている。そこで、C-4位がアセチル化した4-acetylnivalenol (4-ANIV)に対し、そのC-15位をアセチル化

する酵素活性をもつ土壤微生物のスクリーニングを行った(経路B)。また逆に、4-ANIVを脱アセチル化する酵素活性を持った土壤微生物のスクリーニングも並行して行った(経路C)。これは、経路Bを行う微生物酵素を得られなかった場合、これを迂回する経路が必要と考えたためである。

(3) 最終的に、C-3、C-4、C-15位の各アセチル化酵素を生産・精製し、NIV系トリコテセンを3,4,15-triANIVに変換、ELISAで簡易検出できる系を構築することを目的とした。

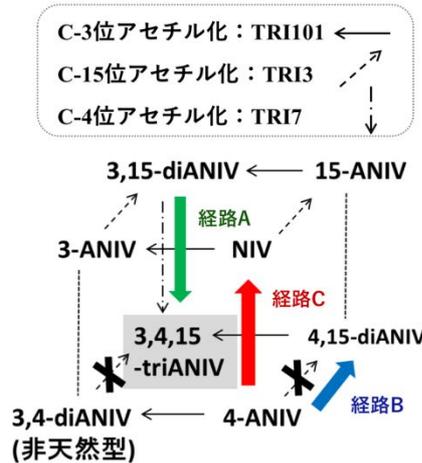


図2. NIV系トリコテセンの側鎖統一へのスキーム

3. 研究の方法

(1) NIVのC-4位アセチル化酵素であるTRI7を発現させるために、NIV生産菌のMAFF 111233株のwild type (WT)を用いて、粗酵素の抽出を試みた。また、脱アセチル化酵素のTRI8、TRI104がTRI7の反応に干渉する可能性を考慮し、Tri8単一遺伝子破壊株とTri8/Tri104二重遺伝子破壊株を作製し、その粗酵素の抽出とTRI7活性の検証を行った。基質としてTRI7本来の基質である3,15-diacetylnivalenol (3,15-diANIV)を、アセチル化の補酵素にはアセチルCoAを用い、反応pHを7.0に、反応温度を30℃として反応を行った。

次に、遠心分画によって粗酵素を分画し、どの部分に活性がより強く存在するかの確認を行った。また、Tri7遺伝子を元々持たないDON生産菌JCM 9873株に、Tri7をTEF promoter下流につなぎ、強発現させた遺伝子組換え株を作製し、上記と同様の実験を行った。

また、TRI7酵素が最も効率的に反応を触媒できる条件と、活性保持が可能な保存条件を検証した。前者では、至適pH、至適温度、バッファー、金属イオンの添加の有無、プロテアーゼ阻害剤の添加の有無、BSAの添加の有無などで条件を振り、粗酵素の活性確認を行った。また、保存条件としては、glycerolの添加の有無、BSAの添加の有無、および保

存温度を 4、-30、-80 で検討を行った。

(2) C-4 位にアセチル基が付加したトリコテセンに対し、C-15 位をアセチル化できる土壤菌体と、逆に C-4 位アセチル基を脱アセチル化できる土壤菌体をスクリーニングした。その際、4-ANIV、4,15-diacetyl-nivalenol (4,15-diANIV)、3,4,15-triANIV を基質として用いた。これは、基質を脱アセチル化する際、4,15-diANIV であれば、あとは TRI101 による C-3 位アセチル化の一段階で目的産物の 3,4,15-triANIV に変換できるので、4-ANIV を脱アセチル化しても 4,15-diANIV を脱アセチル化しない基質特異性の高い微生物酵素が望ましいためである。また、同じ酵素が最終産物である 3,4,15-triANIV を脱アセチル化しないことも重要である。

同時に、3,15-diANIV を基質とし、TRI7 酵素の代替となる酵素を持つ微生物のスクリーニングも行った。

3 年間で約 3000 個の土壤微生物のコロニーを検証し、その *in vivo*、及び *in vitro* の活性を TLC、HPLC、LC-MS/MS で確認した。*in vitro* での活性が見られた場合は、さらに硫酸分画を行い、粗酵素の活性を再度確認した。

(3) TRI101 と TRI3 については、それぞれの遺伝子を pCold ベクターに組み込み、大腸菌 (BL21 (DE3) 株) に遺伝子組換えして、TRI 酵素を発現させた。その際、大腸菌由来の酵素を除去するために、硫酸分画を行い、場合によってはさらに HiTrapQ カラムを用いて簡単な精製を行った。続いて、rTRI101 と rTRI3 を用いて、段階的に、あるいは同時に NIV から 3,15-diANIV への変換を試みた。その活性の測定は、(2) と同様に TLC と HPLC を用いて行った。

また、(2) で得られた土壤微生物由来の粗酵素を用い、4-ANIV の C-4 位のアセチル基を脱離し、上記の rTRI101 と rTRI3 を添加し、3,15-diANIV への変換を試みた。

最終的に、3,15-diANIV に対し、(1) で得られた TRI7 を用い、3,4,15-triANIV へと変換することを試みた。

4. 研究成果

(1) TRI7 の高活性粗酵素の取得の試み：TRI7 粗酵素を生産する株について検証を行った。その結果、WT 由来の粗酵素を用いたところ、3,15-diANIV を 3,4,15-triANIV へ変換することができたが、その活性は余り高くなく、しかも WT に存在する脱アセチル化酵素により、4,15-diANIV と 4-ANIV へ変換されてしまった。また、その粗酵素の TRI7 活性は非常に失活しやすいことがわかり、極めて慎重に粗酵素を取り扱わなければならないことが示された。

そこで、Tri8 単一遺伝子破壊株由来の調製粗酵素を用いたところ、3,4,15-triANIV への変換率は高まり、4-ANIV までの変換はみら

れなくなったが、4,15-diANIV への脱アセチル化を防ぐことはできなかった。さらに、Tri8/Tri104 二重遺伝子破壊株の粗酵素を用いたところ、最も活性が高かったものの、4,15-diANIV への脱アセチル化が見られた。以上のことから、MAFF 111233 株には TRI8 と TRI104 以外にも脱アセチル化酵素が存在することが示唆された。

混入している脱アセチル化酵素を除くため、5,800×g で遠心し、さらに 100,000×g で超遠心を行い、粗酵素の分画を行った。その結果、5,800×g の上清を 100,000×g で遠心した沈殿画分に、最も高い TRI7 活性が見られ、脱アセチル化活性が最も低く抑えられた。この条件であれば、Tri8/Tri104 二重遺伝子破壊株の粗酵素遠心画分を用い、酵素反応系に添加した 3,15-diANIV をほぼ全量 3,4,15-triANIV に変換できることがわかった。

次に、Tri7 遺伝子を持たない DON 生産菌 JCM 9873 株に、Tri7 を TEF promoter 下流に接続して遺伝子導入し、強発現を目指した遺伝子組換え株を作製し、同様の実験を行った。その結果、5,800×g の上清画分に非常に強い活性が見られた。この株から得られた粗酵素の 5,800×g の上清画分には、MAFF 111233 株の WT や脱アセチル化酵素遺伝子破壊株から得られた粗酵素、それらの遠心画分に比べてはるかに強い活性があった。しかし、MAFF 111233 株由来の粗酵素とは異なり、100,000×g の沈殿部分には強い活性が見られなかった。この粗酵素画分 (5,800×g 上清画分) は、温度を 15℃ まで下げても強い C-4 位アセチル化活性が見られ、その温度では脱アセチル化酵素が働くことができないためか、TRI7 活性のみを見ることに成功した。ただし、酵素の性状解析を行ったところ、至適温度は 15℃ より 20℃ 以上高い 37℃ 付近、至適 pH は 7.5 から 8.0 という結果になった。

反応バッファの組成については、100 mM のリン酸カリウムバッファを用い、5 mM の EDTA と 1 mM の PMSF を添加した場合、他の条件よりも活性が高くなる傾向が示された。

長期保存の条件を調べたところ、最終濃度で 0.1% の BSA を加え、50% のグリセロールを添加し、-80℃ で保存した場合、6 ヶ月後であっても全く失活が見られなかった。しかし、同条件で -30℃ で保存した場合、1 ヶ月後に既に失活し始め、6 ヶ月後には活性が半分以下になってしまった。4℃ では全く活性を保持できないこともわかった。

(2) NIV 系トリコテセン変換微生物のスクリーニングと粗酵素の調製：

3 年間で約 3000 個の菌体を調べたところ、*in vitro* の条件下で 4-ANIV をアセチル化する菌体は 11 菌体存在したが、それらすべてが 4-ANIV の C-3 位をアセチル化しており、目的の C-15 位をアセチル化する菌体は一つ

も無かった。C-15 位アセチル化酵素 TRI3 が 4-ANIV の C-15 位をアセチル化できないのは、立体障害が原因と言われている。よって、土壤微生物酵素であっても、この反応を行うものは非常に希少と考えられる。

次に C-4 位アセチル基を脱離する菌体を探索したところ、5 菌体に *in vitro* で脱アセチル化活性が見られた。詳細に検討したところ、その中で No. 884 と名付けられた菌体は 4-ANIV を特異的に脱アセチル化し、4,15-diANIV と 3,4,15-triANIV に対しては脱アセチル化活性を示さないことがわかった。4-ANIV からの 3,15-diANIV、さらには 3,4,15-triANIV への変換には、この酵素が使用できると考えられた。この菌体の 16S rRNA の塩基配列を解析したところ、*Pseudomonas* sp. であることがわかった。

この実験と並行し、3,15-diANIV を 3,4,15-triANIV に変換する TRI7 と同じ活性を示す菌体の探索も行った。その結果、No. 3010 と名付けた菌体が C-4 位アセチル化活性があることがわかった。粗酵素の性状解析の結果、その至適 pH は 7 付近で、至適温度は 40 °C であった。この菌体は、TRI7 に比べるとはるかに安定で失活しづらかったが、活性は劣っていた。すなわち、TRI7 は好条件であれば 100 µl の反応混合液に含まれる 2 µg の 3,15-diANIV を 10 分程度で 100% 変換できるが、No. 3010 の場合は、24 時間で 30% 程度の反応しか進まず、100% 反応させるには 5 日間かかった。しかし、安定性は非常に高く、30 °C で 5 日間置いても、50% の活性が残っていた。(TRI7 の場合、30 °C、30 分で完全に失活する。) また、この菌体粗酵素には脱アセチル化酵素の混入もなく、その点はこの粗酵素の長所と言える。よって、さらなる濃縮が可能となれば、TRI7 の代替酵素としての使用が期待できよう。

(3) NIV 及び 4-ANIV の 3,4,15-triANIV への変換系構築の試み：

本実験では rTRI101、rTRI3、TRI7 粗酵素を用いて、NIV を 3,4,15-triANIV へ、さらに No. 884 粗酵素を加えて、4-ANIV を NIV を通じて 3,4,15-triANIV に変換する系の構築を目指した。

rTRI101 と rTRI3 を高発現で得ることは容易であったが、大腸菌由来の脱アセチル化酵素が混入していたためか、両酵素を NIV に添加しても、3,15-diANIV に 100% 変換することはできず、4,15-diANIV が生産されてしまった。そこで、硫安分画や HiTrapQ での粗酵素の精製を行った。その結果、硫安分画後の各酵素の活性を調べたところ、脱アセチル化は抑えられることがわかった。つまり、大腸菌由来の脱アセチル化酵素は硫安沈殿で回収されないことが示唆され、膜分画の可能性もある。しかし、これらの硫安分画をさらに HiTrapQ で精製すると、肝心のアセチル化活性が低下してしまうことがわかった。そ

こで、硫安分画のみを行った rTRI101 と rTRI3 を混交し、pH 7.5 の条件で NIV に添加したところ、45 分で 3,15-diANIV に 100% 変換することが示された。

次に、4-ANIV を No. 884 の粗酵素を添加して NIV に変換した後、熱失活させ、上記と同様に rTRI101 と rTRI3 の混合酵素を添加して 3,15-diANIV へ変換することを試みた。その結果、最初のステップで 30 分、5 分の熱失活後、後半のステップで 30 分インキュベートしたところ、こちらでも 92% の NIV を 3,15-diANIV に変換することに成功した。No. 884 粗酵素は 4-ANIV に対しては活性があるが、3,4,15-triANIV には活性がないため、途中の熱失活は必要ない可能性もある。

(1) の実験から、3,15-diANIV から 3,4,15-triANIV への変換は既に成功している。現在、この系を用いて連続的に反応を行い、最終的に 3,4,15-triANIV への変換系の構築を試みているところである。

以上の結果から、天然に最もよく存在する NIV 系トリコテセンである NIV と 4-ANIV を一括で変換し、簡易に ELISA 検出する系の構築が進んだと言える。他の NIV 系トリコテセンであっても、この系で 3,4,15-triANIV に変換できると考えられるので、本研究の成果は包括的な NIV 系トリコテセン変換系に貢献したと言えよう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 6 件)

Kamata, K., Sato, H., Maeda, K., Furihata, K., Aikawa, S., Adachi, K., Tanaka, A., Tokai, T., Nakajima, Y., Yoshida, Y., Sakuda, S., Kimura, M. & Takahashi-Ando, N. Exploring an artificial metabolic route in *Fusarium sporotrichioides*: Production and characterization of 7-Hydroxy T-2 toxin. *J. Nat. Prod.* 2018 (in press) doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00398 査読あり

Matsui, K., Shinkai, K., Adachi, K. & Takahashi-Ando, N. Possibility of novel hexose conjugation of a d-type trichothecene by trichodiene synthase gene-disrupted mutants of *Fusarium* species. *JSM Mycotoxins*, 2018, 68 (1), 27-29. doi: 10.2520/myco.68-1-6. 査読あり

Nakajima, Y., Tanaka, Y., Matsui, K., Maeda, K., Kitou, Y., Kanamaru, K., Ohsato, S., Kobayashi, T., Takahashi-Ando, N. & Kimura, M. Accumulation of an unusual trichothecene shunt metabolite in liquid culture of *Fusarium graminearum* with

methionine as the role nitrogen source. *JSM Mycotoxins*, 2017, 67(1), 7-9. doi: 10.2520/myco.67-1-9. 査読あり

Tanaka, A., Saikawa, S., Suzuki, T., Echigo, A., Maeda, K., Sato, M., Fujimura, M., Tokai, T., Usami, R., Yoshida, Y., Kimura, M. & Takahashi-Ando, N. Acetyltransferase activity in *Pseudomonas* sp. capable of acetylating C-4 hydroxyl group of nivalenol-type trichothecenes. *J Gen Appl Microbiol.* 2017, 62(6), 326-329. doi: 10.2323/jgam.2016.05.002. 査読あり

Nakajima, Y., Maeda, K., Jin, Q., Takahashi-Ando, N., Kanamaru, K., Kobayashi, T., & Kimura, M. Oligosaccharides containing an α -(1→2) (glucosyl/xylosyl)-fructosyl linkage as inducer molecules of trichothecene biosynthesis for *Fusarium graminearum*. *Int. Food Microbiol.* 2016, 238, 215-221. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.011. 査読あり

Maeda, K., Tanaka, A., Sugiura, R., Koshino, H., Tokai, T., Sato, M., Nakajima, Y., Tanahashi, Y., Kanamaru, K., Kobayashi, T., Nishiuchi, T., Fujimura, M., Takahashi-Ando, N., Kimura, M. Hydroxylations of trichothecene rings in the biosynthesis of *Fusarium* trichothecenes: evolution of alternative pathways in the nivalenol chemotype. *Environ Microbiol.* 2016, 18(11), 3798-3811. doi: 10.1111/1462-2920.13338. 査読あり

〔学会発表〕(計 28 件)

鈴木将、小川雅義、安藤直子：「TRI 酵素の精製とトリコテセンの効率的なアセチル化系の構築」平成 29 年度工業技術研究所研究発表会 (2018 年)

貞松和樹、足立健太郎、鈴木将、安藤直子：「MS/MS ライブラリーを用いたトリコテセン汚染サンプルのパイロット調査」平成 29 年度工業技術研究所研究発表会 (2018 年)

松井宏介、足立健太郎、新海航輝、安藤直子：「非 *Fusarium* トリコテセンの *Fusarium* 属菌への添加とその代謝経路の解明」日本マイコトキシン学会 第 81 回学術講演会(2018 年)

田中佑弥、杉浦涼介、田中彰、前田一行、新海航輝、松井宏介、中嶋佑一、吉成知也、金丸京子、小林哲夫、安藤直子、木村真：「トリコテセン C-4 位水酸化酵素の欠損がもたらす側鎖多様性」第 113 回日本食品衛生学会 (2017 年)

足立健太郎、新海航輝、貞松和樹、田中

佑弥、木村真、安藤直子：「網羅的トリコテセン系かび毒 MS/MS データベース構築に向けた取り組み」第 38 回 日本食品微生物学会 (2017 年)

前田一行、田中佑弥、中嶋佑一、新海航輝、松井宏介、足立健太郎、安藤直子、木村真、大里修一：「多様な A 型トリコテセン類を生産する NBRC 9955 株の再同定と培養特性の解析」日本マイコトキシン学会 第 80 回 学術講演会 (2017 年)

島村拓実、小川雅義、鈴木将、中嶋佑一、前田一行、木村真、安藤直子：「トリコテセン生合成酵素を用いた nivalenol 系トリコテセンの一括変換と検出系の構築」第 38 回 日本食品微生物学会 (2017 年)

新海航輝、田中彰、前田一行、木村真、安藤直子：「TLC, HPLC, LC-MS-MS を用いた B 型トリコテセン汚染米培地の定量」日本分析化学会第 66 年会 (2017 年)

松井宏介、新海航輝、吉田泰彦、相川俊一、田中佑弥、木村真、安藤直子：「かび毒トリコテセンの前駆体の同定と毒性評価」日本食品化学学会 第 23 回総会・学術大会 (2017 年)

島村拓実、杉江雄太、小川雅義、田中彰、木村真、安藤直子：「Nivalenol 系トリコテセン検出のためのアセチル化法の構築」第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス (2016 年)

杉江雄太、島村拓実、小川雅義、田中彰、木村真、安藤直子：「トリコテセン C-4 位アセチル化酵素 TRI7 の安定性の検証と発現解析」第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス (2016 年)

島村拓実、田中彰、杉江雄太、前田一行、中嶋佑一、吉田泰彦、木村真、安藤直子：「トリコテセン生合成酵素 TRI7 の安定的保存法の条件検討」日本マイコトキシン学会 第 79 回学術総会 (2016 年)

島村拓実、松井宏介、杉江雄太、安藤直子：「トリコテセン生合成酵素 TRI7 の安定な精製法・保存法の確立」平成 27 年度 工業技術研究所 研究発表会 (2016 年)

田中彰、杉江雄太、前田一行、中嶋佑一、島村拓実、吉田泰彦、木村真、安藤直子：「FLAG 抗体を用いた TRI7 の精製と性状解析」日本マイコトキシン学会第 75 回学術講演会 (2015 年)

他 14 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ：

<http://ris.toyo.ac.jp/profile/ja.081e31a2227269e9801d37838b335bdf.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

安藤 直子 (TAKAHASHI-ANDO, Naoko)
東洋大学・理工学部・応用化学科・教授
研究者番号：70360485

(2)研究分担者

木村 真 (KIMURA, Makoto)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：20261167