

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05870

研究課題名(和文) 外的ストレス要因による新規カビ毒産生菌の出現とその分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanisms of emergence of novel mycotoxin-producing fungi due to external stress factor

研究代表者

小林 直樹 (Kobayashi, Naoki)

麻布大学・生命・環境科学部・准教授

研究者番号：90447558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：一部のカビが産生するカビ毒は様々な農作物・食品を汚染しており、世界的に食品衛生上の大きな問題となっている。また、地球温暖化などの環境変化がカビ毒産生性に変化をもたらし、カビ毒による汚染が増大する可能性が考えられる。本研究では環境変化としてpHの変化に着目し、様々なpH条件における成長速度、カビ毒産生性、および遺伝子発現の変化を解析した。その結果、低pH条件でカビ毒の生合成遺伝子群の発現が高くなり、カビ毒産生性が増大する菌株の存在が明らかになった。土壌の酸性化などのストレスにより農作物などのカビ毒汚染が増加する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カビ毒産生性変化に関わるメカニズムを明らかにすることで、カビ毒による食品汚染を防ぐための手法開発への足がかりとなる。特に、今回対象としたカビ毒はコメを汚染する主要なカビ毒のひとつであり、本国における主食の安全性担保に関わる重要な手法の開発に結び付くと考える。さらに、同様の手法で研究を進めることで他のカビ毒についても制御法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mycotoxins produced by some fungi contaminated to various foods and feeds, and the mycotoxin contamination is of great concern to human health around the world. Furthermore, environmental changes such as global warming may lead to changes in productivity of mycotoxins of some fungi and increase mycotoxin-contaminations. In this study, I focused on changes in pH as an environmental change and analyzed growth rate, mycotoxin production, and gene expression of mycotoxin-producing fungi under various pH conditions. Our results revealed that some strains increased their gene expression of mycotoxin biosynthesis genes with the decreasing pH. And their mycotoxin productions were elevated under low pH conditions. It was suggested that the mycotoxin contamination might become a more serious problem, if the environmental changes, such as global warming, cause pH-decreases.

研究分野：分子生物学

キーワード：カビ毒 ステリグマトシスチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球温暖化等の環境変化によりカビ毒汚染が増大

カビ毒はカビが産生する毒(二次代謝産物)で、ヒトや家畜に対して発がん性や腎・肝毒性などを示す。米や麦等の主食となる穀類をはじめ幅広い農作物、食品を汚染しており、食品衛生上重要な自然毒のひとつとして世界的に問題となっている。カビ毒産生菌は熱帯地域を好んで生息するものが多いが、地球温暖化に伴いその汚染地域の広がりが懸念されている。更に、カビ毒産生菌は高い培養温度においてそのカビ毒産生性が増大するとの報告があり、地球温暖化によって起こる気温の上昇により、カビ毒の汚染濃度も増加する可能性がある。

(2) 新たなカビ毒産生菌種が生じる可能性

筆者らは先行研究において、これまでカビ毒を産生しないとされてきた菌種の中に、潜在的なカビ毒産生能を持つ菌種が存在することを見出した。一般に、カビ毒の生合成に関わる遺伝子はゲノムの一領域に集まってクラスターを形成している。カビ毒を産生しない菌種の中には、カビ毒生合成遺伝子クラスターを保有しているものがあり、調節因子により抑制されていると考えられた。地球温暖化による気温上昇などの外的要因によりカビ毒産生のトリガーが引かれ、新たなカビ毒産生菌種が生じる可能性がある。これまで、地球温暖化によりカビ毒産生菌種のカビ毒産生性が強まる可能性は示唆されてきたが、非産生菌種が新たに産生能を獲得する可能性については議論されておらず、検証が必要と考えた。更にこの場合、新たなカビ毒産生菌種は温帯にも適応して汚染域をより拡大する可能性があり、更なる脅威となる。

(3) ヒトに発がん性を示すステリグマトシスチンとその産生菌種

ステリグマトシスチン(**STC**)というカビ毒と、その産生菌種が多数含まれるグループである *Aspergillus section Versicolores* を対象とした。**STC**には発がん性が報告されており、コーデックス委員会食品汚染物質部会が策定した **FAO/WHO** 合同食品添加物専門家会議においても優先的にリスク管理を行うべき危害要因として検討されている。

筆者らは、国内の様々な食品や環境から *Aspergillus section Versicolores* を多数分離し、その分布と近縁種間での **STC** 産生能の多様性を明らかにしてきた (**Kobayashi, N. et al, 2018, Food Safety, 6, 67-73**)。 *Aspergillus section Versicolores* は、互いに遺伝的に非常に近縁なグループ内において、**STC** を産生する菌種と産生しない菌種が混在しており、また、**STC** を産生する菌種内においても **STC** 産生性に強弱のバリエーションがある。更に、**STC** の生合成に関わる遺伝子群の保有状況を **PCR** ベースで調べたところ、**STC** 非産生菌株の多くが生合成関連遺伝子を保有する「潜在的なカビ毒産生菌種」であった。

2. 研究の目的

本研究では、地球温暖化などによる外的ストレス(温度変化、**pH** 変化、塩濃度変化など)により、これまでカビ毒を産生しないと考えられている菌種がカビ毒産生能を獲得するかを検証することを目的とした。外的な刺激によって眠っているカビ毒産生能が呼び起こされてカビ毒産生菌種となる可能性を検証するとともに、カビ毒の産生性を制御する因子の特定を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 様々な条件での培養とカビ毒産生性の変化

Aspergillus section Versicolores に属する菌種の中から **18** 菌株について様々な培養条件(寒天培地の種類、培養温度、**pH** 条件)で培養を行った。**STC** 産生性の大きく異なる **3** 菌株を選定し、経時的なコロニーの形態変化、サイズ変化、および **STC** 産生性の変化を詳細に調べた。特に、**pH** 条件を変えることで顕著に **STC** 産生性の変化が見られたため、**pH** の変化に注目して進めた。**STC** 産生性については、培養コロニーからメタノール: クロロホルム=1:2 混液を用いて **STC** の抽出を行い、薄層クロマトグラフィー(**TLC**)および液体クロマトグラフィー質量分析(**LC-MS/MS**)により定量を行った。

(2) 遺伝子発現の網羅的な比較

STC 産生性の異なる菌株のうち、**STC** 高産生菌株、**STC** 体産生菌株、**STC** 非産生菌株を選定して、これらの菌株について **pH** 変化による遺伝子発現の変化を調べた。**pH** 条件として本邦の通常の土壌 **pH** レベルおよび土壌酸性化を模した **pH** レベルの **2** 点で比較を行った。培養菌体から **RNA** を抽出して逆転写を行った後、**RNA-seq** 解析により遺伝子発現を網羅的に調べた。**pH** 条件間での遺伝子発現の変化を解析するとともに、**STC** 産生性の異なる菌株間での遺伝子発現レベルの比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) 低 pH 条件において STC 産生性が增大

供試菌株の内、STC 産生性が大きく異なる 3 菌株について、異なる pH 条件で培養を行った。pH 条件は、日本の一般的な土壌でみられる pH5.6、土壌の酸性化を考慮した pH4.0、対照として中性および弱アルカリ性の pH7.2 および 7.9 とした。コロニーサイズを経時的に調べたところ、いずれの pH 条件においても培養日数の経過に伴いコロニーが大きくなったが、pH4.0 においてはほかの条件に比べて成長が遅くなった (図 1)。

一方で、STC の産生量は pH が低くなるほど高くなった。特に、一般的な土壌 pH では産生量の低かった菌株 (低産生菌株) においては顕著に増大し、その産生量は同条件の高産生菌株と同等であった (図 2)。STC 非産生菌株は低 pH 条件においても STC の産生は観察されなかった。

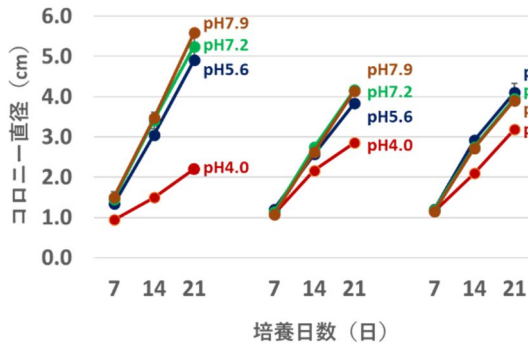


図 1. pH 条件による成長速度の違い

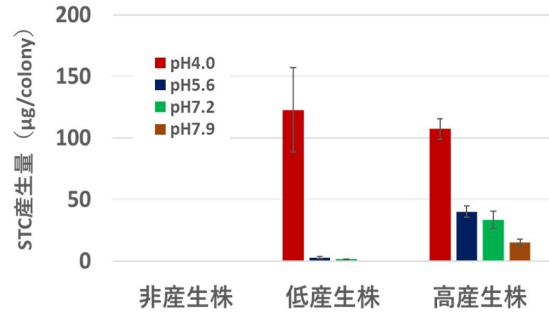


図 2. pH 条件による STC 産生性の違い

(2) 低 pH 条件で多くの遺伝子発現が変化

STC 低産生菌株と STC 高産生菌株について、一般的な土壌条件と低 pH 条件での遺伝子発現を RNA-seq 解析により網羅的に比較した。その結果、どちらの株においても、pH 条件の違いによって発現が異なる遺伝子が多く検出されたが、その発現量の変化は低産生菌株で顕著に大きかった (図 3)。この大きな遺伝子発現の変化は、低産生菌株の STC の産生性の変化に関連していると考えられた。

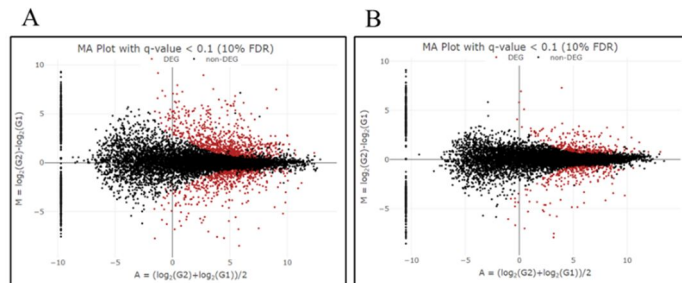


図 3. RNA-seq における MA-plot

A: 低産生株 B: 高産生株

STC の生合成に関わる遺伝子群

は、同じ STC 産生菌種として知ら

れる *Aspergillus nidulans* において報告があり、ゲノムの一領域に 25 の遺伝子がクラスターを形成していることが知られている。本研究において、*Aspergillus section Versicolores* のゲノムにおいて同様の領域を検索したところ、当該菌種においても *A. nidulans* の遺伝子群と相同と考えられる遺伝子群が見つかり、ゲノム中でクラスターを形成していた。これらの遺伝子群を *Aspergillus section Versicolores* の STC 生合成遺伝子クラスターであると考え、このクラスターに含まれる遺伝子群に着目して遺伝子発現を比較した。

pH4.0 において顕著に STC 産生量が增大した低産生菌株においては、STC 生合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子のほとんどにおいて、その遺伝子発現レベルが pH4.0 において高くなっていた (図 4)。

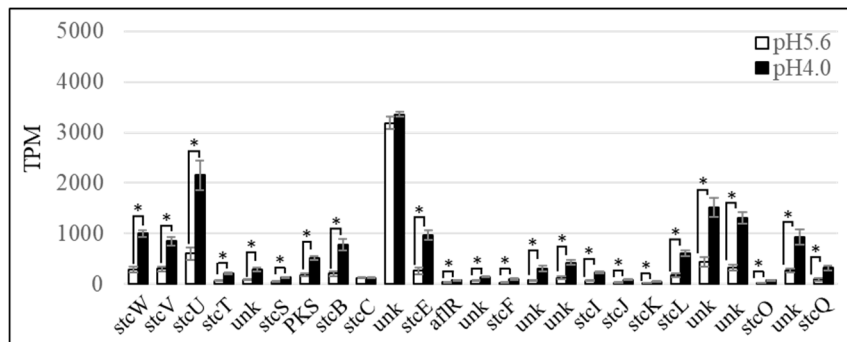


図 4. STC 生合成遺伝子クラスターにおける遺伝子発現変化 (低産生菌株)

本研究において、一般的な土壌 **pH** ではほとんど **STC** を産生しない低産生菌株について、低 **pH** 条件においては **STC** 生合成遺伝子クラスターの遺伝子発現が増大し、**STC** 産生性が強くなることが示された。温暖化等の影響で土壌の酸性化が起こった場合、農作物の **STC** 汚染が深刻化する可能性がある。

今後は、**STC** 生合成関連遺伝子群の発現を増大させている調節因子の特定を進める。**RNA-seq** 解析による網羅的なデータをもとに、候補を絞り込む。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 與那覇まい、吉成知也、小西良子、小林直樹
2. 発表標題 低pH条件下におけるAspergillus versicolorのステリグマトシスチン産生と遺伝子発現
3. 学会等名 第43回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mai Yonaha, Tomoya Yoshinari, Yoshiko Sugita-Konishi, Naoki Kobayashi
2. 発表標題 Effects of environmental changes on sterigmatocystin production in Aspergillus section Versicolores
3. 学会等名 ISMYCO 2022 & ICM 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 與那覇まい、吉成知也、小西良子、小林直樹
2. 発表標題 pH変化がAspergillus section Versicoloresのステリグマトシスチン産生に与える影響
3. 学会等名 第118回 日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------