

機関番号：82111

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580116

研究課題名 (和文) イネ着生フザリウム属糸状菌におけるマイコトキシン産生性の解析

研究課題名 (英文) Analysis of mycotoxin producibility by rice adherent *Fusarium* fungi

研究代表者

久城 真代 (KUSHIRO MASAYO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・主任研究員

研究者番号：40353932

研究成果の概要 (和文)：イネ着生の可能性があるフザリウム属糸状菌 *Fusarium graminearum* より新規マイコトキシン生合成関連遺伝子の候補遺伝子を見出した。本クローンは、ポリケタイド合成酵素全長と思われる、異種糸状菌 (*Aspergillus oryzae*) 発現系での機能発現を試みた結果、空のベクター (コントロール) には無い化合物の産生が認められた。また、各種フザリウム菌株を培養して、各種機器分析によりそれらのマイコトキシン産生性を精査した結果、これまでフモニシン産生の報告が無い菌で、フモニシンの産生を見出した。

研究成果の概要 (英文)：A full-length clone of putative polyketide synthase responsible for unknown mycotoxin biosynthesis was isolated from *Fusarium graminearum*, one of the rice adherent fungi. This clone was served for a heterologous expression in a transformed *Aspergillus oryzae*, which suggested this clone to be a novel polyketide synthase. Also, *in vitro* cultures of various *Fusarium* fungi followed by chromatographic analysis revealed the production of fumonisins by the fungus that had not been reported as a fumonisin-producer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：糸状菌, イネ, フザリウム, マイコトキシン

## 1. 研究開始当初の背景

マイコトキシン (カビ毒) は、全世界の穀物の約 1/4 に被害をもたらすとされる大きなリスク要因である。フザリウム属糸状菌は、一般に赤カビ病菌と総称される糸状菌である。アスペルギルス属糸状菌は亜熱帯～熱帯に生息するのに対し、フザリウム属糸状菌は比較的冷涼な地域にも生息し、日本各地のイネ科植物体上より分離されている。

近年日本を含めた世界各国において、麦類

赤カビ病菌 (*Fusarium graminearum*) 産生マイコトキシンの一種、デオキシニバレノールの暫定基準値が敷かれたことにより、コムギ着生フザリウム属糸状菌については、国内外で研究が進んでいる。一方で、日本のイネ着生フザリウム属糸状菌とマイコトキシン産生の関係は、これまでのところほとんど明らかにされていない。しかしながら、「フザリウム属糸状菌は、イネの圃場において、イモチ病菌に次ぐ大きな病原糸状菌である」と

いう知見を圃場の研究者より得ていた。また近年イネで、新たなフザリウム属糸状菌産生マイコトキシンの一種・フモニシンによる汚染が懸念されている。その理由は、イネに着生する主な病原糸状菌であるイネ馬鹿苗病菌(*F.fujikuroi*) が、フモニシンを多く産生するトウモロコシ赤カビ病菌(*F.verticillioides*) と近縁関係にあり、フモニシン産生の報告があること、また両糸状菌種ともに、日本を含む温帯から熱帯地域に広く分布し、圃場からも分離されていることによる。

## 2. 研究の目的

本課題では、イネにおけるマイコトキシンの産生機構、イネ着生フザリウム属糸状菌からマイコトキシンの生合成に関わる遺伝子クラスターなど、生産糸状菌に関する基礎的な知見を遺伝子レベルで得るとともに、国内のイネ着生フザリウム属糸状菌におけるマイコトキシンの産生性を、各種機器分析により解析することを目的とする。

フザリウム属糸状菌産生マイコトキシンのうち、デオキシニバレノール等のトリコセ系化合物ならびに、ゼアラレノンの生合成遺伝子については研究が進んでおり、ムギ植物体における生合成遺伝子の発現量とマイコトキシンの産生量の相関を見る研究も行われている。一方、比較的最近 1988 年に同定された新たなフザリウム属糸状菌産生マイコトキンであるフモニシンは、その化学構造から還元型ポリケタイドとよばれるが、還元型ポリケタイドについては研究途上であり、還元型ポリケタイドの一種・高脂血症の治療薬であるロバスタチンに関しては、生合成遺伝子クラスターが米国の Hutchinson らにより同定された (Science 1999; 284(5418):1368-72)。これらの情報を基に、本課題において、還元型ポリケタイド合成酵素の候補遺伝子を同定する。

またこれまでに、イネでフザリウム属糸状菌産生マイコトキシンの汚染が網羅的に調べられたことはない。本課題では、日本のイネ着生フザリウム属糸状菌におけるマイコトキシンの産生性、特にフモニシンの産生能を解析する。

## 3. 研究の方法

2. の研究目的の達成のために、3 年間で以下 (1) (2) を実施する。

(1) 「イネ着生フザリウム属糸状菌のマイコトキン産生関連遺伝子クラスターの探索と同定」(2008~2009 年度) を行うために、以下の実験を行う。

①イネ着生の可能性があるフザリウム属糸状菌：麦類赤カビ病菌 *F. graminearum*、トウモロコシ赤カビ病菌 *F. verticillioides*、イネ馬鹿苗病菌 *F. fujikuroi* 等について、千葉

大学真菌医学研究センターまたは独立行政法人農業生物資源研究所ジーンバンクに分与を申し込み、菌株を入手する。各々の菌株を培養して、フモニシン産生性ならびにそのタイムコースを解析し、遺伝子抽出に適した培養時期の菌体より遺伝子 cDNA を調製する。

②既知の還元型ポリケタイド化合物であるロバスタチンの生合成遺伝子配列の情報等に基づいて、それらの相同性からマイコトキシンの一種であるフモニシンの基本炭素骨格を形成すると推定される生合成遺伝子=還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子の取得に適したプライマーの設計を行う。

③調製した cDNA ならびに設計したプライマーを用いて、PCR 法を基本とした遺伝子増幅・サブクロニング法により、フモニシン骨格形成に関わると予測されるポリケタイド合成酵素の候補遺伝子を取得する。

得られた候補遺伝子を発現解析用のベクターにサブクロニングし、異種糸状菌である麹菌 (*Aspergillus oryzae*) の系でその機能の発現を試みる。

(2) 「イネ着生フザリウム属糸状菌におけるマイコトキン産生性の解明」(2009~2010 年度) を行うために、以下を実験を行う。

①これまでに入手を続けているイネ着生の可能性があるフザリウム属糸状菌の各菌株を培養して、これら各種フザリウム属糸状菌をコメ培地にて培養し、マイコトキン等二次代謝産物を多く作っていると思われる時期の培養物を収穫する。前処理 (有機溶媒にて抽出、精製など) 後、HPLC、LC-MS/MS 等の各種機器分析により、各菌株のマイコトキン産生性を精査する。特に新たなフザリウム属糸状菌産生マイコトキシンの一種・フモニシンについては、これまでにトウモロコシにおける分析法が有るのみで、イネまたはコメで効率的な分析法が無いことから、イネまたはコメにおける実質的な分析法を検討しつつ解析を行う。

②マイコトキン産生能と、フザリウム属糸状菌における種との関連を解析する。各菌株を培養してゲノム DNA を調製し、種または亜種の同定に用いられる遺伝子領域について遺伝子配列を解読し、相同性から種を確定する。

③ ②の遺伝子解読の結果ならびに①の各種機器分析により取得したマイコトキン産生能の結果を比較することにより、フザリウム属糸状菌におけるマイコトキン産生能と、種との関連を解析する。併行して、フザリウム属糸状菌は元来植物病原菌であることから、各菌について病原性の検定を行い、フザリウム属糸状菌におけるマイコトキン産生能と、植物病原性との関連を解析する。

#### 4. 研究成果

(1) 「イネ着生フザリウム属糸状菌のマイコトキシン産生関連クラスターの探索と同等」については、イネ着生の可能性のあるフザリウム属糸状菌より新規マイコトキシン生合成関連遺伝子の候補遺伝子を見出した。本遺伝子は、ポリケチド合成酵素全長と思われるクローンであり、異種糸状菌 (*A. oryzae*) 発現系での機能発現を試みた結果、空のベクター (コントロール) には無い化合物の産生が認められた。本化合物が、新規の構造を持ったマイコトキシンまたは糸状菌由来二次代謝産物であれば、当該クローンが新規のポリケチド生合成酵素遺伝子の一部である可能性が高く、現在各種機器分析により構造情報の取得を試みている。また LC-MS/MS を用いて、効率的かつ高感度な分析系を確立でき、国産稲モミで初めてフモニシンの自然汚染を見出した (図1)。

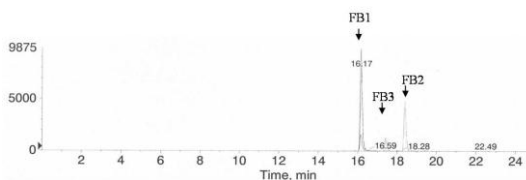


図1. 国内で初めて見出されたフモニシン自然汚染稲モミの LC-MS/MS プロファイル

(FB1: fumonisin B1, FB2: fumonisin B2, FB3: fumonisin B3)

(2) 「イネ着生フザリウム属糸状菌におけるマイコトキシン産生性の解明」については、これまでに独立行政法人農業生物資源研究所ジーンバンク等より入手を続けているイネ着生の可能性のあるフザリウム属糸状菌 (麦類赤カビ病菌 *F. graminearum*、トウモロコシ赤カビ病菌 *F. verticillioides*、イネ馬鹿苗病菌 *F. fujikuroi* 等) の各菌株を培養して、各種機器分析によりそれらのマイコトキシン産生性を精査した結果、これまでフモニシン産生の報告が無い菌で、フモニシンの産生を見出した。これらはコメやコムギなどの穀類に着生する可能性が有り、汚染防除の意味からもマイコトキシン産生能と、フザリウム属糸状菌における種との関連の解析が必要である。さらにこれまでフモニシンは、トウモロコシ中の汚染が顕著であり、国産米や国産小麦中の汚染は知られていなかったが、今回初めて国産小麦中の汚染を検出した (M. Kushiro M. et al., J. Food Prot. 2009)。各種穀物 (コメ、コムギ、トウモロコシ) 培地でのフモニシン産生能を比較した結果、一般的にはトウモロコシ培地が最適であることが示された。フモニシンは、トウモロコシ中の汚染が顕著である事実と関連しており植物と糸状菌の生理的相互作用の面から興味深い。さらにコメにおいては、長粒種 (タイ米など)

と短粒種 (ジャポニカ米) で産生条件等に違いが見出された。これらの成果は論文化し受理された (Awaludin N. et al., Toxins, 2010)。

これまでに調査したイネ着生フザリウム属糸状菌のうち、国内外でイネから単離はされているがイネ植物体上で病原性を示す報告が無い *F. proliferatum* に焦点を絞り、新たに菌株の調査と入手の手続きを取り、主要マイコトキシンであるフモニシン産生能の調査、ならびに *F. proliferatum* のイネでの生理作用の解析を行った。日本各地域ならびに海外のイネ圃場由来の *F. proliferatum* 7 株のうち 6 株でフモニシン産生能が認められた。またジーンバンクの研究スタッフの協力を得て、由来が明らかに国産である *F. proliferatum* 3 株を用いて登熟過程のイネ植物体へ人工的に接種・感染させる実験を実施した結果、人工接種実験検体において、感染部位での変色ならびにフモニシン蓄積を観察することができた。*F. proliferatum* はトウモロコシの病原菌であり、イネで生理的変化を起こすという知見はこれまでになく、また LC-MS/MS を用いた高感度な分析系による *in vivo* のイネ植物体でのフモニシン蓄積の検出も初めての知見である。これまでに報告した研究成果も含めて国際マイコトキシン学会 (ISM 主催、マレーシア) に応募したところ、口頭発表演題に選抜された。現在、今回イネ植物体上で見られた生理的変化がイネの過敏反応によるものではないことを検証中であり、近く論文化を行う。

#### 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 2 件)

- ① Masayo Kushiro (筆頭著者), Yazhi Zheng, Reiko Nagata, Hiroyuki Nakagawa, Hitoshi Nagashima, Limited surveillance of fumonisins in brown rice and wheat harvested in Japan, Journal of Food Protection, 査読有, 2009, 72(6), 1327-1331.
- ② Norhafniza Awaludin, Reiko Nagata, Tomomi Kawasaki, Masayo Kushiro (責任著者), Preparation of an in-house reference material containing fumonisins in Thai rice and matrix extension of the analytical method for Japanese rice, Toxins, 査読有, 2010, 1(2), 188-195.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 久城真代、川崎友美、中川博之、長嶋等 : イネ着生フザリウム属糸状菌におけるフモニシン産生性の解析, 日本マイコトキシン学会 第 64 回学術講演会, 2008.8.29, 名古屋市立大学薬学部.

- ② 久城真代、永田礼子、中川博之、長嶋等：  
国産稲モミでのフモニシン検出，第7回フ  
ザリウム研究会，2009.8.27，岐阜県長良川  
温泉旅館多賀。
- ③ Masayo Kushiro, Hiroyuki Nakagawa,  
Hitoshi Nagashima: Surveillance of  
fumonisins in brown rice and wheat harvested  
in Japan, The 123<sup>rd</sup> AOAC International  
Annual Meeting and Exposition, 2009.9.15,  
Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- ④ 久城真代：インハウスかび毒分析用コメ  
標準物質の作製とコメ中フモニシン分析  
法の開発，食総研・産総研ジョイントシン  
ポジウム 2010，2010.7.23，EBIS303，東京  
都渋谷区。
- ⑤ Masayo Kushiro, Norhafniza Awaludin,  
Hiroyuki Nakagawa, Hitoshi Nagashima:  
Detection of possible fumonisin  
contamination in rice, International  
Mycotoxin Conference 2010, 2010.12.3, Park  
Royal Hotel, Penang, Malaysia.
- ⑥ 北嶋美葉、スコット暁子、久城真代、  
中島隆、景山幸二、百町満朗、須賀晴久：  
*Fusarium fujikuroi* のフモニシン産生遺伝  
子クラスターの構造解明，日本マイコト  
キシン学会第 69 回学術講演会，2011.1.7，  
タワーホール船堀，東京都江戸川区。

〔図書〕（計1件）

- ① 小西良子、久城真代：サイエンスフォー  
ラム，「微生物孢子-制御と対策-」2011  
年，370 ページ，第 6 章第 4 節カビ毒  
p155-161

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）  
○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.nfri.affrc.go.jp/guidance/so  
shiki/anzen/kagaku.html](http://www.nfri.affrc.go.jp/guidance/so<br/>shiki/anzen/kagaku.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久城 真代 (KUSHIRO MASAYO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究  
機構・主任研究員

研究者番号：40353932

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者