

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05428

研究課題名(和文)新規糖抱合masked mycotoxin—その生産機構と食へのリスク検証

研究課題名(英文) Novel masked mycotoxins-glucoside conjugates of trichothecenes and their risks for food

研究代表者

安藤 直子 (Takahashi-Ando, Naoko)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：カビ毒トリコテセン類の糖抱合体は、従来の検出法で検出が困難であること、哺乳類の腸内環境でトリコテセンが遊離する可能性があることから、そのリスクが懸念されている。本研究では、これまで知見が殆どなかったFusarium属菌によるトリコテセンC-4位糖抱合について、検証を行った。その結果、Fusarium graminearumから、C-4位のグルコース転移酵素遺伝子をクローニングし、その活性を実証することができた。また、得られた配糖体はそのアグリコンに比べ、はるかに毒性が低いことも示された。さらに、trichodermolのC-4位配糖体の構造は非常に安定であることも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリコテセン配糖体は、検出が難しい上に、体内でトリコテセンを遊離し毒性を発揮する可能性があるため、食の安全上、重大な問題となっている。これまでは、トリコテセン生産菌に感染された植物が解毒するために、C-3位を糖抱合することが知られていたが、本研究では、新たにC-4位糖抱合体が見出された。本研究では、最もメジャーなトリコテセン生産菌であるFusarium graminearumが有するグルコース転移酵素遺伝子をクローニングし、さらに生産された配糖体について構造・性状解析を行った。配糖体の農業経済的、食品衛生上のインパクトは大きいと、その調査は学術的、社会的行きが大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glucosylated trichothecene mycotoxins are difficult to detect by conventional detection methods, and are possibly hydrolyzed to release trichothecenes in the intestinal environment of mammals, raising serious concerns about their risk to food safety. Thus, in this study, we investigated trichothecene glucosylation at the C-4 position, which was newly found in trichothecene-producing fusaria. We performed cloning of a responsible gene for the C-4 glucosyltransferase in Fusarium graminearum and successfully confirmed the activity of the recombinant enzyme obtained in E. coli. We also obtained several glucosides of trichothecenes and found that they were far less toxic than their corresponding aglycones. Furthermore, it was shown that the structure of trichodermol-4-glucoside was very stable in a wide range of pH and in artificial digestive fluids and resistant to several α -glucosidases.

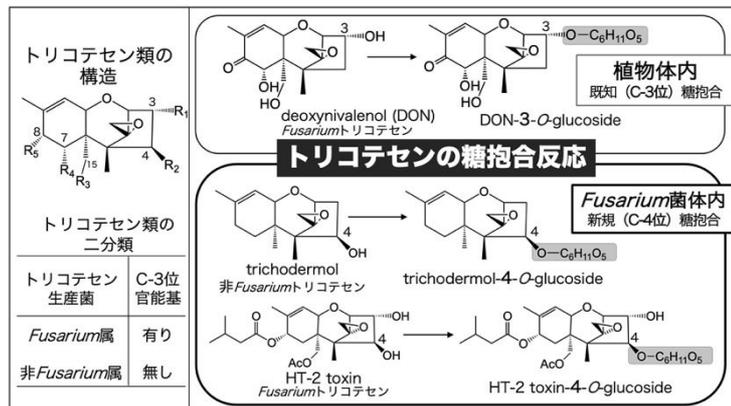
研究分野：食品化学

キーワード：トリコテセン Fusarium 二次代謝産物 糖抱合 phase II 解毒 アグリコン

1. 研究開始当初の背景

かび毒(マイコトキシン)は農産物を汚染するため、農業上また食品衛生上、重大な問題と言える。中でもトリコテセン系マイコトキシンは、主に **Fusarium** 属菌が重要穀類に感染した際に生産されるカビ毒で、人や家畜への健康被害が強く懸念されている。**Fusarium** 属菌に感染され、トリコテセンで汚染された植物の中には、その防御機構により、トリコテセンの **C-3** 位を糖抱合して低毒化することが知られている。しかし、このトリコテセン配糖体は、従来の検出を免れてしまう上に、近年、この配糖体が哺乳類の腸内環境で加水分解され、アグリコンであるトリコテセンが遊離して毒性が復活する可能性が示された。従来の検出法を免れ、しかも、その毒性を復活させるカビ毒配糖体の存在は、食の安全を管理する行政側に多大な衝撃を与えた。さらに

本研究室では、**Fusarium** 属菌自らが **C-4** 位の糖抱合を行うことを見出した。この知見は新規のもので、新規配糖体の食の安全上のリスク検証、検出方法の構築、糖抱合の担当酵素の性状解析等を早急に実施する必要があると考え、本研究を実施することとした。



2. 研究の目的

これまで、**Fusarium**属菌が、自らが生産するトリコテセンに対し糖抱合する酵素を持つ、という事実はほとんど知られていなかった。しかも、新たに見つかった配糖体は、これまで多くの研究がなされた**C-3**位にはなく、**C-4**位に糖抱合する配糖体であり、**Fusarium**特有のグルコース転移酵素**UGT (Fg UGT)**が存在すると考えられた。**C-3**位配糖体と同様、もしこの配糖体のグルコシド結合が哺乳類の消化器官で容易に切断されるのであれば、トリコテセンが糖から離れて遊離し、重大な危害要因になる可能性がある。現在まで、このトリコテセン**C-4**位糖抱合体については、毒性やその加水分解のしやすさなどについて、情報が著しく乏しい。よって本研究の最大の目的は、重要穀類を汚染するカビ毒から食の安全を守るために、この糖抱合体の食へのリスクを検証し、検出系を構築するとともに、**Fg UGT**の性状の詳細を明らかにすることとした。

そのためにまず、各種トリコテセン配糖体の生産、精製と同定が必要となった。その上で始めて、検出系の構築が可能となるためである。検出系の構築には、これまで本研究チームが長年にかけて作成してきたトリコテセン**MS/MS**ライブラリーに、新たに見出されるトリコテセン配糖体群の**MS/MS**を加えていくこととした。さらに、それら配糖体とアグリコンの毒性の比較検証も同時に行い、その上で、各種配糖体の加水分解のしやすさも確認することとした。このように、本研究では構造解析と性状解析を並行して行っていくことが必須と考えた。

また、本研究チームではこれまで、**Fusarium graminearum**のトリコテセン生合成の初発遺伝子である**Tri5**を破壊し、トリコテセン生産能を失わせた株(**Fg Tri5**)、さらにトリコテセン解毒遺伝子**Tri101**(トリコテセン**C-3**位アセチル化酵素**TRI101**をコードする遺伝子)をも二重に破壊した株(**Fg Tri5ΔTri101**)を作製してきた。興味深いことに、単一遺伝子破壊株**Fg Tri5**に**Fusarium**型トリコテセンを添加すると**TRI101**によるアセチル化が起き、二重遺伝子破壊株

に添加して始めて新規配糖体は生産された。すなわち *Fusarium* 属菌にとって、この糖抱合反応は自ら生産する毒物に対する自己耐性機構として働くものの、**TRI101**の補完的役割の可能性があると考えられ、糸状菌の自己耐性機構のあり方として学術的にも非常に興味深いと言える。

さらにこの糖抱合反応は、将来、トリコテセン類の直接的防除につながる可能性がある。もし既知の**C-3**位配糖体とは異なり、**C-4**位配糖体がヒトや家畜の消化器官においても安定であるならば、*Fg* **UGTs**遺伝子を穀類に形質転換することで、トリコテセンに汚染された食料中、特に飼料中のトリコテセン解毒が実現する可能性がある。

これらの疑問と課題を解明、解決していくことで、食の安全に貢献することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、トリコテセン **C-4** 位配糖体のリスク検証が大きな目的の一つである。そこでまず、トリコテセン配糖体を得る目的で**(1)**と**(2)**を実施した。**(1)**と**(2)**の結果を元に、**(3)**の配糖体の毒性評価、**(4)**の配糖体の加水分解に対する安定性の検証を行った。その結果を踏まえ、実際の検出の実施に結びつけることとした。また、**(5)**で *Fusarium* 属以外のトリコテセン生産糸状菌での糖抱合活性についても検証を行った。

- (1)** 本研究チームは、多数のトリコテセンを保有しているため、それらを *Fg* **Tri5** **Tri101** 株、あるいは、次項**(2)**で得られた **recombinant FgUGT** に添加した。得られた糖抱合体を生産・精製単離し、**NMR** により同定した。その後、**LC-MS** にアプライして **MS/MS** スペクトルを得て **MS/MS** ライブラリーに加えた。
- (2)** *Fusarium* 属菌の **C-4** 位糖抱合酵素 (*Fg* **UGTs**) 遺伝子のクローニングとその異種発現を試みた。まず、**NCBI** でのキーワード検索や **BLAST** での **UDPGT**、**GT** ドメインを持ちグルコース付加を行う可能性がある遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子のトリコテセン添加時の発現解析と共に、候補遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、糖抱合活性が失われるかを確認した。次に、**RNA-seq** 解析により、**trichodermol** 添加で発現レベルが誘導され、かつ **TMP** 値が増加した遺伝子の中で、糖転移に関与する遺伝子を探索した。最終的には、見出された遺伝子について、大腸菌に異種発現させ、**recombinant** タンパク質を生産させ、活性を確認した。
- (3)** 上記で生産された **C-4** 位糖抱合体について、そのアグリコンと毒性を比較した。その際、ヒトの培養細胞(**HL-60**)とトリコテセン高感受性酵母(**Mycotoxins 63, 161-70 (2013)**)を用い、各々のトリコテセンとその配糖体の毒性を検証した。
- (4)** **C-4** 位糖抱合体の加水分解に対する安定性の検証も行った。**pH** の異なる溶液に配糖体を添加する、各種 **-glucosidase** を配糖体に添加する、あるいは、人工消化液中に配糖体を添加し、トリコテセン **C-4** 位糖抱合体がどの程度安定かを検証した。
- (5)** 当初の計画と共に、*Fusarium* 以外のトリコテセン生産菌に異属、異種の生産するトリコテセンを添加し、トリコテセン配糖体の生産を試みた。

4. 研究成果

本研究の特筆すべき成果として、トリコテセン C-4 位糖抱合酵素のクローニングに成功した点が挙げられる。NCBI でのキーワード検索や BLAST での UDPGT、GT ドメインを持つ遺伝子について検索を行ったところ、33 種類の遺伝子に絞り込むことができた。しかし、trichodermol の添加時の発現解析や、各遺伝子破壊株の作製による配糖体が活性の喪失については、ポジティブな結果が得られず、目的の遺伝子は発見できなかった。このことから、既存の UGT とは異なる可能性が示唆された。そこで、RNA-seq 解析を行ったところ、発現レベルが 100 倍以上誘導され、かつ、TPM 値が 3,000 を越えた遺伝子のうち、糖転移に関与すると考えられる遺伝子が 1 つ見出された。F. graminearum に trichodermol を添加したところ、ノザンプロットにおいて、この遺伝子の強い発現誘導が見られた。そのため、この遺伝子を TGT1 と命名した。Tgt1 遺伝子破壊株は、その親株に比べ、trichodermol 添加時の基質消失は顕著に遅れた。(しかし、消失は見られたため、糖抱合反応の他に、親水性を増す第 II 相反応が行われていることが示唆された。) さらに、この Tgt1 を大腸菌に遺伝子導入した株を作製した。ここから recombinant TGT1 を生産させ、そこに trichodermol を添加したところ、C-4 位配糖体への変換が見られ、この酵素が C-4 位糖抱合を担っていることが証明された。

次に、トリコテセン配糖体の生産について述べる。C-3位に水酸基を持たないtrichodermol, trichothecin, trichothecolon, 8-deoxytrichothecinをFg Tri5株、および、FgΔTri5ΔTri101株に添加することで、すべて糖抱合体になることが示された。C-3位に修飾基を持つトリコテセンのうち、FgΔTri5ΔTri101株に添加して糖抱合が起きたのは、HT-2 toxin, 3-acetyl HT-2 toxin (ごく微量)、nivalenol, 15-acetylnivalenolとなった。recombinant TGT1については、現在までに、15-acetylscirpenol, 15-acetylnivalenol, HT-2 toxinでの変換が確認されている。トリコテセン糖抱合の構造解析については、MS/MSにおいて、C₆H₁₂O₆の付加がはっきりとわかる状況であったため、糖抱合はまず間違いないと考えられる。大量精製できたものについては順次NMRでの同定を行っている。

トリコテセン配糖体の毒性検証については、ヒト培養細胞のHL-60とトリコテセン超高感度酵母 (BY4742 pdr5 erg6 rpb5) を使用した。精製できたトリコテセン配糖体とそのアグリコンであるトリコテセン単体の比較検証を行っている。HT-2 toxinとtrichodermolの配糖体をそれぞれ調べたが、どちらも配糖体での毒性はアグリコンよりもはるかに低下していた。

trichodermolの配糖体については、広範囲のpH、各種-glycosidase、人工消化液に対して、高い安定性を示した。この配糖体は、哺乳類の腸内微生物により加水分解される可能性もあり、さらなる検証の必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsui K, Takeda H, Shinkai K, Kakinuma T, Koizumi Y, Kase M, Yoshinari T, Minegishi H, Nakajima Y, Aikawa S, Takahashi-Ando N, Kimura M.	4. 巻 22 (24)
2. 論文標題 4-O-Glucosylation of trichothecenes by Fusarium species: A phase II xenobiotic metabolism for t-type trichothecene producers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 13542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222413542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠崎康一朗、佐野広空、小泉慶明、安藤直子
2. 発表標題 Fusarium属菌におけるC-4位糖抱合活性の網羅的解析
3. 学会等名 2023年度 工業技術研究所研究発表会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 栗田一輝、荻原廉、加瀬正浩、篠崎康一朗、小泉慶明、木村真、安藤直子
2. 発表標題 Isotrichodermolとtrichodermolの配糖体とその毒性検証
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会 第90回 学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤友哉、高橋珠理、篠崎康一朗、栗田一輝、并能沙也加、小泉慶明、木村真、安藤直子
2. 発表標題 Myrothecium属菌のFusarium系トリコテセンに対する代謝活性の検証
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会 第90回 学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田眞也、小泉慶明、長坂実咲、松井宏介、前田一行、中嶋佑一、安藤直子、木村 真
2. 発表標題 Fusarium graminearum の trichodermol 配糖体化酵素遺伝子の同定と解析
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会 第89回 学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栗田一輝、佐藤友哉、加瀬正浩、并能沙也加、小泉慶明、木村 真、安藤直子
2. 発表標題 15-acetylivalenol の効率的生産と配糖体取得の試み
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会 第89回 学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 栗田一輝、加瀬正浩、并能沙也加、安藤華蓮、佐藤友哉、小泉慶明、安藤直子
2. 発表標題 Fusarium graminearum における糖抱合酵素の基質特異性の検証
3. 学会等名 2022年度工業技術研究所研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤友哉、并能沙也加、加瀬正浩、栗田一輝、小泉慶明、木村真、安藤直子
2. 発表標題 最終生産物の異なるMyrothecium verrucaria類の自己耐性機構の検証
3. 学会等名 2022年度工業技術研究所研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 并能沙也加、佐藤友哉、加瀬正浩、栗田一輝、小泉慶明、木村真、安藤直子
2. 発表標題 Myrothecium属菌が有する非生産トリコテセンへの糖抱合活性
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会 第88回学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加瀬正浩、安藤華蓮、并能沙也加、栗田一輝、木村真、安藤直子
2. 発表標題 カビ毒トリコテセンのpH安定性の検証およびアポトリコテセンの毒性評価
3. 学会等名 日本食品衛生学会第118回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 并能 沙也加、武田 博音、加瀬 正浩、楠本 和史、高橋 華奈、荻原 廉、小泉 慶明、木村 真、安藤 直子
2. 発表標題 Myrothecium属菌が有する異属トリコテセンの側鎖修飾機能
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 武田博音、加瀬正浩、清水正人、古川柊、安藤直子
2. 発表標題 非Fusarium属トリコテセン生産菌の自己耐性機構について
3. 学会等名 2021年度東洋大学工業技術研究所研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加瀬正浩、武田博音、清水正人、古川柊、相川俊一、安藤直子
2. 発表標題 かび毒トリコテセン類及びアポトリコテセン類の毒性評価
3. 学会等名 2021年度東洋大学工業技術研究所研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井宏介、武田博音、中嶋佑一、西内巧、安藤直子、木村 真
2. 発表標題 フザリウムのトリコテセンC-4位糖抱合活性に関する研究
3. 学会等名 日本マイコトキシソ学会第87回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加瀬 正浩、武田 博音、菅崎 晶高、清水 正人、古川 柊、荻原 廉、高橋 華奈、松井 宏介、木村 真、安藤 直子
2. 発表標題 Fusarium属菌の長期培養によるトリコテセン配糖体生産の検証
3. 学会等名 日本食品衛生学会第117回学術講演会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	木村 真 (Kimura Makoto) (20261167)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	

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
---------	---------