

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580185

研究課題名(和文) 食の安全を脅かすカビ毒のデトックス法開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Construction of trichothecene detection system and screening system for detoxifying microorganisms

研究代表者

安藤 直子 (ANDO, Naoko)

東洋大学・理工学部・准教授

研究者番号：70360485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：トリコテセンとは、Fusarium属などの糸状菌が重要穀類に感染、あるいは腐生的に生育した場合に生産されるカビ毒の一群である。トリコテセンの汚染は世界的に見られ、食の安全に対する脅威となっている。そこで、本研究ではまず、酵母を用いたトリコテセン高感度検出系の構築を行った。pdr5、erg6、rpb4という3つの遺伝子を破壊した酵母を作成することで、非常に高い感度を持つトリコテセン検出系を構築することに成功した。さらに、土壌微生物を中心に、トリコテセン(T-2 toxin, deoxynivalenolなど)を解毒分解する微生物のスクリーニングを行い、毒性を低減化させる微生物を複数見いだした。

研究成果の概要(英文)：Trichothecenes are mycotoxins which are produced by Fusarium and other genera. They contaminate important crops, and can cause serious health problems in humans and livestock. In this research, we found 22 trichothecene resistance genes in Saccharomyces cerevisiae. We constructed multiple gene deletion mutants, and among them, the triple mutant which deleted pdr5, erg6, and rpb4, showed the highest sensitivity toward various trichothecenes. We constructed an effective detective system using disc diffusion test, which allows us to detect deoxynivalenol contaminated with the provisional level in wheat and wheat flour. Next, we screened for microorganisms which can detoxify T-2 toxin, deoxynivalenol and 4-acetyl nivalenol. We collected ~10,000 microorganisms mainly from soil, and we found that there were more than 10% microorganisms can deacetylate T-2 toxin and 4-acetyl nivalenol, which resulted in reducing toxicity. However, no organisms can detoxify deoxynivalenol.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：カビ毒 トリコテセン 検出系 解毒分解 スクリーニング 食の安全

1. 研究開始当初の背景

Fusarium graminearum 等の糸状菌はコムギ、オオムギ、トウモロコシ等の重要穀類に感染、または腐生的に着生、増殖する過程で、トリコテセンと呼ばれるカビ毒の一群を生産する。トリコテセン類は、12,13-位のエポキシ環と 9,10 位の二重結合を特徴とするセスキテルペンであり、多くの類縁体が存在する。トリコテセンは、真核生物のリボソーム 60S サブユニットに結合することによって、タンパク質合成阻害を起こし、細胞毒性を発揮する。その毒性は、各々の類縁体の構造により大きな差があり、毒性に最も多く寄与しているのは、12,13-エポキシ環であると考えられている。トリコテセンによる汚染の問題は古くから指摘されており、その簡易な検出系の構築、多くの除去法、解毒法が試みられてきた。

トリコテセンの正確な検出には、LC-MS/MS 等の高価で高い技術を要する機器が必要となる。簡易な方法に ELISA が知られるが、deoxynivalenol (DON)と T-2 toxin の ELISA 抗体しか市販されていないのが現状である。微生物を使用した簡易な検出系の構築も試みられているが、感度は十分ではなかった。

また、トリコテセンは一般的に非常に安定で、いったん生産されてしまうと除去しにくいのが特徴である。物理的、化学的除去法の開発も試みられたが、食品の品質保持とコスト抑制を両立できない、という欠点があった。かわって注目されているのが、生物学的解毒法である。そこで、トリコテセンを解毒できる微生物を探索し、その毒性の低減化を図る試みがなされてきた。

トリコテセンは脱エポキシ化されることで、著しくその毒性が低下する(Eriksen et al., *Food Chem. Tox.* **42**, 619-624 [2004])。これまでウシのルーメン(第一胃)などに生息する微生物がこのような脱エポキシ化反応を行なうことが知られてきたが、いずれも嫌気性菌の例であり、脱エポキシ活性を持つ嫌気性微生物が単離されているものの、酵素の単離には至っていなかった(Fuchs et al., *Food Addit. Contam.* **19**, 379-386 [2002])。ここでトリコテセン解毒分解菌の研究や応用利用の障害になっているのは、これらの解毒分解活性を持つ微生物が絶対嫌気性菌で扱いづらいということ、また、脱エポキシ化を担う酵素が電子伝達系とリンクした複合体を形成しているらしいことである。そのため、これらの菌体を用いてトリコテセンを効率的に解毒する系を構築することは、これまで極めて困難であった。

2. 研究の目的

- (1) 本研究の目的の一つは、微生物を用いて、トリコテセンの簡易検出系を構築することである。これまで酵母を用いた簡易検出系の構築が試みられてきたが、各国の定める DON の規制値を検出できる感度の検出系は存在していなかった。そこで、食品中、あるいは、穀類中のトリコテセンを、微生物を用い、検出できる高感度検出系を構築することが、本研究の第一目的である。
- (2) トリコテセンは、非常に安定な化合物ではあるが、微生物酵素により、毒性を下げることが可能と考えられる。もっとも抜本的な毒性の低下には、トリコテセンの脱エポキシ化が必要である。また、現実的に使用に耐えうるのは、好気性・通性嫌気性菌と考えられるので、トリコテセン脱エポキシ化能を持つ好気性・通性嫌気性菌を得ることを目的とする。また、それ以外の解毒反応も当然考えられるので、トリコテセンを変換できる微生物の探索をも目指す。ただし、トリコテセンの変換物質が元のトリコテセンより毒性が強くては意味がない。そこで、(1)の研究で得られる酵母を用いて、その毒性を確認することとする。
- (3) トリコテセンの解毒分解菌が得られたならば、その微生物の同定、酵素の単離とアミノ酸配列の決定を目指す。もし、酵素の単離ができなかった場合には、得られた微生物を用い、トリコテセン毒性の低減化や新たな検出系の構築など、応用利用につながる研究を行うこととする。

3. 研究の方法

本研究では、食の安全性を脅かすトリコテセンを効率的に検出し、生物学的に解毒する試みを、以下の方法で行った。

- (1) 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 株の遺伝子破壊ライブラリーから、強毒性トリコテセンである T-2 toxin と verrucarinaA を用い、トリコテセン耐性遺伝子をスクリーニングした。
- (2) 酵母のトリコテセン耐性遺伝子を多重破壊した株を作製、高感度トリコテセン検出系を構築した(図1)。
- (3) トリコテセン解毒分解菌候補を短時間で多数スクリーニングできる系を構築した。また、パラエティに富んだ微生物種を得られるよう、様々なスクリーニング法を試みた(図2)。
- (4) トリコテセン解毒分解候補微生物を

トリコテセン含有培地で培養し、TLC と (1) の系にアプライした。TLC 上に観察されるスポットが変化し、酵母の増殖能が阻害されない場合、候補微生物がトリコテセンを解毒したと判定した。

- (5) (4) で得られた微生物について、トリコテセンの変換物の同定、微生物の属種の同定を行った。また、粗酵素の調整を行い、その性質について調べた。さらに酵素を単離できれば、そのアミノ配列の決定を試みることにした。
- (6) 最終的には、解毒分解微生物の応用利用の系を構築することを目指した。

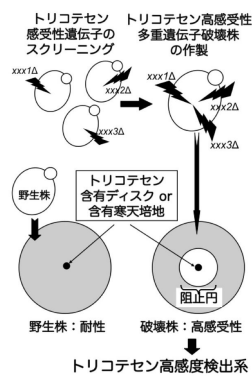


図1 トリコテセン高感受性酵母の作製と高感受性検出系の構築スキーム

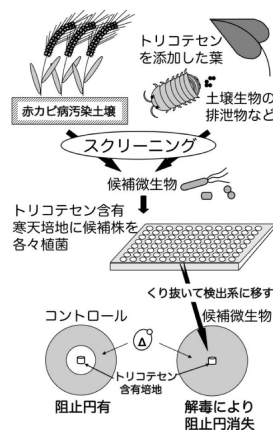


図2 トリコテセン解毒微生物の探索スキーム

4. 研究成果

(1)- *S. cerevisiae* BY4742 遺伝子破壊ライブラリーからトリコテセン耐性遺伝子のスクリーニングを行ったところ、22 遺伝子がトリコテセン耐性を担っている候補遺伝子としてあげられた。そこには ergosterol 生合成酵素、液胞 ATPase に関するタンパク質、ABC トランスポーター等のタンパク質をコードする遺伝子が含まれていた。その中でも、遺伝子破壊をした際の阻害率が大きく、なおかつ酵母の生

育を阻害しにくかったのは、*erg6* と *pdr5* の 2 遺伝子であった。

(1)- そこで、この 2 遺伝子を含む 3 つのトリコテセン耐性遺伝子を破壊した三重遺伝子破壊体の作製を試みたところ、正常に増殖することができたのは 9 株のみであった。それぞれの遺伝子破壊株の T-2 toxin に対する IC₅₀ を求めたところ、*pdr5*、*erg6*、*rpb4* の 3 遺伝子を破壊した株が、増殖も早く、感受性も高かった。図 3 にそれぞれに遺伝子破壊株の増殖阻害率を示す。この株の T-2 toxin IC₅₀ は 0.0015 μg/ml で、DON IC₅₀ は 1.5 μg/ml となり、その他のトリコテセン (nivalenol [NIV], 3-acetyldeoxynivalenol [3-ADON], 15-acetyldeoxynivalenol [15-ADON], 4-acetyl nivalenol [4-ANIV]) についても、今まで報告されただの微生物よりも、高い感受性を示すことが確認できた(図 4)。

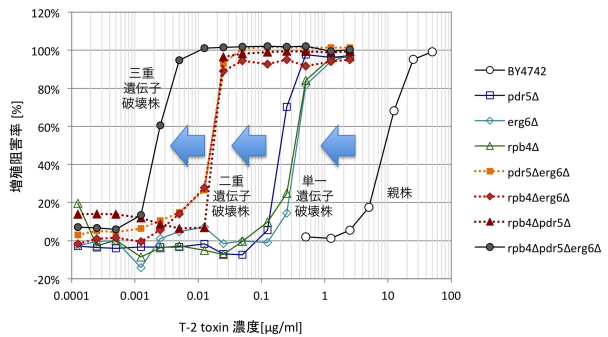


図3 遺伝子破壊酵母株のT-2 toxin耐性

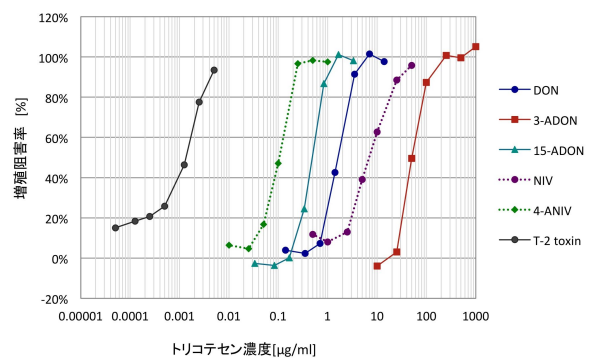


図4 多重遺伝子破壊酵母株の各トリコテセンに対する耐性

(1)- そこで、この三重遺伝子破壊株を用いて、ディスク阻害法を用いたトリコテセン検出系の構築を試みた。その結果、ディスク阻害法では、DON 1.1 ppm (日本の規制値)によって汚染された小麦穀粒 5 g 分 (DON 5.5 μg 含有) と、DON 1 ppm (米国の規制値)によって汚染された小麦粉 5 g 分 (DON 5 μg 含有) から DON を抽出した場合、その汚染を簡易に検出できることがわかった(図 5)。

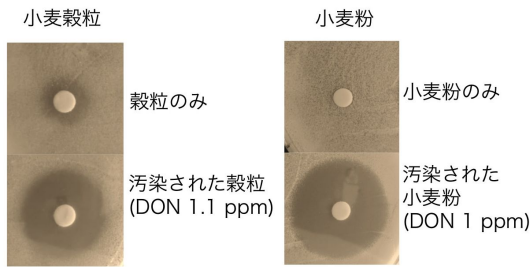


図5. DONに汚染された小麦穀粒及び小麦粉による阻止円
左上は小麦穀粒、右上は小麦粉から抽出したサンプルを5 g分乗せたもの。左下は人工的にDON 1.1 ppmで汚染した小麦穀粒から抽出したサンプルを5 g分乗せたもの。右下は人工的にDON 1 ppmで汚染した小麦粉から抽出したサンプルを5 g分乗せたもの。

以上のことから、本研究により、世界で初めて、規制値レベルのトリコテセンに汚染された小麦粒、小麦粉から、そのトリコテセンを検出する系を構築することに成功したといえる。

- (2)- 次に、土壤微生物を中心に、トリコテセン解毒微生物のスクリーニングを行った。その際、北海道から沖縄まで、日本各地の土壤微生物（埼玉県内の小麦畑の土壤微生物、赤カビ病感染小麦の栽培されていた畑の土壤微生物を含む）、花酵母、埼玉県を中心とした井戸水中の微生物、赤カビ病感染小麦から得た微生物、すでに単離同定された好塩古細菌など、様々な種類の微生物を収集し、a 小麦デンプン培地、b 大豆デンプン培地、c トウモロコシデンプン培地、d 堀越培地、e CMC 培地、f 好塩古細菌用培地に植菌した。その際、a から e の培地については、真核微生物を得るため、バンコマイシンを添加した培地も調整し、植菌を行った。その結果、総数で 10,000 コロニー近くの微生物を得ることができた。それらについて、エッペンチューブに対応する液体培地と T-2 toxin、または DON をそれぞれ 10 μ g/ml の濃度で添加し、5 日から一週間 30 で振とう培養した。その後、同量の酢酸エチルによって 3 回抽出を行い、窒素を吹きかけて乾固し、TLC にアプライして、トリコテセンのエポキシ環に対し呈色反応を起こす NBP-TEPA 法によって、反応生成物を確認した。

その結果、T-2 toxin については、7345 コロニーのうち、代謝されなかったものは 6215 コロニーであり、その他のものは、別の代謝物に変換された、あるいは、スポットが見られなかった。

そこで、代謝物に変換された、あるいは、変換物が検出されなかった菌体について、HPLC と LC-MS/MS によって、トリコテセンの代謝産物を同定することを試みた。その結果、同定されたほとんどの物質は、脱アセチル化体である HT-2 toxin、T-2 triol、

T-2 tetraol であり、残りの代謝物は不明であった。(脱エポキシ化体は検出されなかった。)HT-2 toxin/T-2 triol/T-2 tetraol および、同定できなかった不明代謝物について、(1)のトリコテセン高感度検出系にアプライしたところ、すべての代謝物が、T-2 toxin よりもはるかに毒性が低いことが確認できた。

- (2)- アセチル基を持たない DON についても、同じアッセイを試みた。TLC と HPLC で解析を行ったが、これらのコロニーには、DON を解毒分解する活性がないことが判明した。以上のことから、アセチル基を持つトリコテセンについては、その脱アセチル化を行う微生物が一部程度存在するものの、好気性環境下でトリコテセンのエポキシ環を開環する微生物は存在するとしてもかなり希少であることが判明した。それは、真性細菌、アーキア、酵母・カビなど、広い範囲の微生物において、同じ傾向が見られた。トリコテセンの脱アセチル化を行う真性細菌は、*Bacillus* 属、*Amycolatopsis* 属、*Microbacterium* 属、*Rhodococcus* 属、*Cupriavidus* 属、*Variovorax* 属、*Sphingobacterium* 属など、グラム陽性菌、グラム陰性菌の広い範囲にわたっていた。

- (2)- エポキシ環を開環する微生物を見いだすことができなかったため、脱アセチル化能を持つ微生物について、探索を行った。トリコテセンには、アセチル基が付いている類縁体が多いが、本研究で扱った T-2 toxin については、1 割程度の微生物が脱アセチル化を行うことができた。これらの微生物を遠心し、そのペレットを磨砕して得た粗酵素においても、その活性が見られることが多かったが、その至適 pH は酸性よりのものと、中性部のものとに分かれた。

そこで、本研究では、さらに 4-ANIV と 4,15-diacetylivalenol (4,15-diANIV) について、脱アセチル化能を持つ微生物をスクリーニングした。その結果、4-ANIV と 4,15-ANIV の 4 位の脱アセチル化を行う微生物は互いに共通のものが多かったが、それらの微生物は、必ずしも T-2 toxin の 4 位をアセチル化するとは限らなかった。

- (2)- これらの 4 位脱アセチル化酵素を持つ微生物の応用利用として、NIV 系トリコテセンの検出が考えられる。NIV や 4-ANIV は日本でも多くの農産物にその汚染が見られるものの、抗体が得られていないため、ELISA の系が構築されていない。しかし、3,4,15-triacetylivalenol (3,4,15-triANIV) の抗体は作製されているため、もし、NIV 系トリコテセンを、トリコテセン生合

成酵素を用いて網羅的に 3,4,15-ANIV に変換できれば、NIV 系トリコテセンを簡易に検出できる。しかし、トリコテセン生合成酵素には、すでに 4 位にアセチル基が入っているトリコテセンの 15 位にアセチル基を入れられるものがない。そこで、4-ANIV は一端 NIV に変換される必要がある。現在、(2)- で得られた微生物を用い、粗酵素で 4-ANIV を NIV に変換する系を構築することを目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Akira TANAKA, Yumi YAMANE, Yohei KOMIYA, Kohta YAMAUCHI, Tomoki SUGIYAMA, Akinobu ECHIGO, Ron USAMI, Yasuhiko YOSHIDA, Fumiyoshi ABE, Hiroaki MINEGISHI, Naoko TAKAHASHI-ANDO: Development of a highly sensitive yeast bioassay for trichothecene detection. *Mycotoxins*, 査読有、63, 2013, pp.161-170.

<http://dx.doi.org/10.2520/myco.63.161>
安藤 直子「天然毒素耐性を担う酵母遺伝子の探索と応用利用(2)」工業技術、査読無、第 35 号、2013 年、pp.22-26.

Naoko TAKAHASHI-ANDO, Akira TANAKA, Yohsuke SEKIMOTO, Kohta YAMAUCHI, Akinobu ECHIGO, Ron USAMI, Fumiyoshi ABE, Hiroaki MINEGISHI: Functional screening for resistance genes against trichothecenes in the library of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. *Mycotoxins*, 査読有、63, 2013, pp.9-15.

<http://dx.doi.org/10.2520/myco.63.9>
Kazuyuki MAEDA, Takeshi TOKAI, Hinayo ICHIKAWA, Naoko TAKAHASHI-ANDO, Nobuo OGURA, Katsuyoshi YONEYAMA, Minoru YOSHIDA, Makoto KIMURA: CYP encoded by tri13 of type A trichothecene-producer functions in the type B trichothecene biosynthetic pathway:

3-acetylivalenol production by transgenic *Fusarium graminearum*. *Mycotoxins*, 査読有、62, 2012, pp.83-90.

<http://dx.doi.org/10.2520/myco.62.83>
Ryoichi KUMAZAKI, Hiroyuki MINEGISHI, Akinobu ECHIGO, Yasuhiro SHIMANE, Naoko TAKAHASHI-ANDO, Ron USAMI: Purification and characterization of -cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. strain 149-1. *J. Jpn Soc. Extromophiles*, 査読有、11, 2012, pp.26-32.

安藤 直子「天然毒素耐性を担う酵母遺伝

子の探索と応用利用」工業技術、査読無、第 35 号、2012 年、pp.32-37.

〔学会発表〕(計 10 件)

鎌田賢太郎 他「新規非天然型トリコテセンの同定と毒性評価」日本農芸化学会2014年度大会(2014年3月29日)明治大学生田キャンパス(神奈川県)

田中彰 他「トリコテセンC-4位アセチル化酵素TRI7の発現と性状解析」日本農芸化学会2014年度大会(2014年3月29日)明治大学生田キャンパス(神奈川県)

田中彰 他「多重遺伝子破壊酵母によるトリコテセン簡易検出系の構築」日本マイコトキシン学会第73回学術講演会(2013年9月13日)大阪府立大学(大阪)

多久島遼 他「トリコテセン自己耐性遺伝子 *Tri101* の HEK293 細胞への導入と C-3 位アセチル化体の毒性評価」日本マイコトキシン学会第73回学術講演会(2013年9月13日)大阪府立大学(大阪)

鎌田賢太郎 他「異なる *Fusarium* 属菌の遺伝子破壊株とフィーディングを用いた非天然型トリコテセンの創成」日本マイコトキシン学会第73回学術講演会(2013年9月13日)大阪府立大学(大阪)

杉山智樹 他「トリコテセンC-4位アセチル化酵素TRI7の性状解析」日本マイコトキシン学会第73回学術講演会(2013年9月13日)大阪府立大学(大阪)

杉山智樹 他「出芽酵母の遺伝子多重破壊株によるトリコテセン検出系の構築」日本農芸化学会2013年度大会(2013年3月25日)東北大学(仙台)

Yohei KOMIYA, *et al.* "Screening for resistant genes against trichothecenes and magnetic particles in the library of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants." BNERC and IJAA Joint International Symposium on Advanced Science and Nanotechnology. (2012.12.07-08) Toyo University, Hakusan campus (Tokyo)

Matatoshi KOBAYASHI, *et al.* "Construction of screening system for T-2 toxin detoxifying microorganisms and characterization of crude detoxifying enzymes." BNERC and IJAA Joint International Symposium on Advanced Science and Nanotechnology. (2012.12.07-08) Toyo University, Hakusan campus (Tokyo)

山根 由美 他「出芽酵母の遺伝子多重破壊株によるトリコテセン感受性の解析」日本農芸化学会2012年度大会(2012年3月26日)京都女子大学(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 直子 (ANDO, Naoko)
東洋大学・理工学部・准教授
研究者番号：70360485

(2) 研究分担者

峯岸 宏明 (MINEGISHI, Hiroaki)
東洋大学・バイオ・ナノエレクトロニクス
研究センター・研究助手
研究者番号：30440019