

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15760

研究課題名（和文）ミトコンドリアから探るアフラトキシン産生制御メカニズム

研究課題名（英文）Mitochondria-based regulatory mechanism of aflatoxin production

研究代表者

古川 智宏（Furukawa, Tomohiro）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・研究員

研究者番号：20826052

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）：アフラトキシンは、一部のアスペルギルス属かびが農産物中に産生する強力な発がん性かび毒であり、世界中で深刻な健康・経済被害をもたらしている。アフラトキシン産生阻害物質の作用機構の解析から、ミトコンドリアの代謝経路の抑制により、アフラトキシン産生を抑制できることがわかった。逆に、消毒剤としても用いられる一部のアルコールは、かびに取り込まれてアフラトキシン産生の炭素源として利用されてしまい、アフラトキシン産生を増加させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アフラトキシン汚染の防除法開発にはアフラトキシン産生制御機構の解明が肝要だが、未だ解明されていない点が多くある。本研究により、ミトコンドリアの代謝タンパク質の阻害によりアフラトキシン産生が抑制できることがわかったが、これはミトコンドリアの機能とかびの二次代謝を繋ぐ新奇の発見である。また、アルコール発酵とアフラトキシン産生の炭素代謝レベルでの繋がりを示すとともに、“代謝されないアルコール”によるアフラトキシン汚染防除法開発への道筋をつけることができた。

研究成果の概要（英文）：Aflatoxins are potent carcinogens produced by some *Aspergillus* species. Aflatoxin contamination of food and feed poses a threat to human and animal health and causes enormous economic losses. Analysis of the mode of action of aflatoxin production inhibitors revealed that inhibition of mitochondrial metabolism leads to suppression of aflatoxin biosynthesis. Conversely, some alcohols used as disinfectants were found to increase aflatoxin production by being exploited by fungi as a carbon source for aflatoxin production.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アフラトキシン アスペルギルス・フラバス 産生制御メカニズム 作用機構 ミトコンドリア アルコール

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) アフラトキシンは一部の *Aspergillus* (アスペルギルス) 属真菌により産生される強力なかび毒であり、アフラトキシン産生菌が感染したトウモロコシや落花生、ナッツ類等の農産物に産生、蓄積される。とりわけアフラトキシン B₁ は既知の天然物質で最も強い発がん性があるとされ、全世界で発症する肝臓がんの 25% はアフラトキシンを原因とすると推定されている。現状では、農産物のアフラトキシン汚染に対する防除策は少なく、効果的な防除策の開発が強く求められている。1960 年代から始まった精力的な研究により、アフラトキシンの生合成経路および生合成に関わる遺伝子群の機能は一部を除き解明されているが、研究開始当初においても、アフラトキシンの産生に繋がる産生制御メカニズムはほとんど未解明であった。

(2) 申請者は、産生菌の生育を阻害せず、アフラトキシン産生を阻害する特異的阻害物質の作用メカニズムを解析し、アフラトキシン産生に至る制御メカニズムの解明を目指してきた。アフラトキシン産生阻害作用を持つジオクタチンについて、アフィニティー磁気ナノビーズを用いた結合タンパク質の精製と同定を行ったところ、ミトコンドリア内プロテアーゼである ClpP が同定された。大腸菌発現系による組換えタンパク質と蛍光標識二次元ゲル電気泳動法を組み合わせた方法により、ジオクタチンは ClpP を異常に活性化し、シャペロンタンパク質の介在なしで呼吸鎖複合体やクエン酸シンターゼ等のミトコンドリアタンパク質の分解を誘導することがわかった。ここから、ミトコンドリアタンパク質の異常分解と、アフラトキシン産生阻害の関係性を解明する必要があった。

2. 研究の目的

ジオクタチンはミトコンドリア ClpP を活性化し、*in vitro* にて呼吸鎖複合体等の過剰な分解を引き起こすことがわかったが、これとアフラトキシン産生阻害の関係性は不明であった。本研究では、ジオクタチンの作用をより詳細に解析し、ミトコンドリアの機能からアフラトキシン産生制御メカニズムを探ることを当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) アフラトキシン産生性の *Aspergillus flavus* を液体または平板培地にて培養し、有機溶媒にて抽出したアフラトキシンを HPLC または LC/MS にて分析した。ジオクタチンを添加して培養した *A. flavus* から抽出した全代謝物質について、CE-MS により分析し、得られたデータを多変量解析に供してジオクタチンが *A. flavus* の代謝系に与える影響を調べた。また、リアルタイム PCR 法によってジオクタチンによる遺伝子の発現変動を解析するとともに、ウェスタンブロット法により各種タンパク質の変動を調べた。これらの実験を、ClpP 遺伝子を破壊した *A. flavus* 変異株についても同様に実行した。

(2) エタノールの作用については、購入した安定同位体標識エタノールを添加して培養し、抽出したアフラトキシンを(1)と同様に LC/MS 分析した。また、エタノール代謝に関連する代謝物質についても LC/MS により分析した。得られた分析データについて、確率分布のあてはめを行い、エタノールの取り込みモデルを解析した。これらの実験を、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊した変異株についても同様に実行した。

4. 研究成果

(1) ClpP タンパク質は、単独ではβカゼインをほとんど分解しないが(図1, レーン3-5)、ジオクタチンを添加するとβカゼインを素早く分解するようになる(図1, レーン6-11)。ミトコンドリアタンパク質にジオクタチンおよび ClpP を加えた場合、呼吸鎖複合体のサブユニットやクエン酸シンターゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼが特に強く分解を受けた。

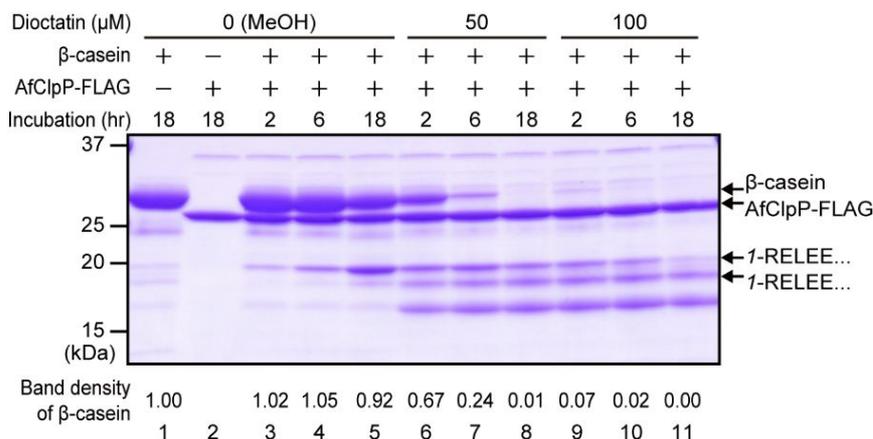


図1. ジオクタチンによるClpPのβ-casein分解活性の異常活性化

(2) ジオクタチンにより

ミトコンドリアのクエン酸回路や電子伝達系による ATP 産生が攪乱されていると予想されたので、細胞抽出物を CE-MS 分析に供した。標準物質との突合により 151 代謝物質が同定・定量さ

は低濃度では逆にアフラトキシン産生を増加させることがわかった。

(9) 前述のように、*A. flavus* はアルコール発酵に
関与する遺伝子群を有して
いるので、エタノールが代
謝された可能性を考え、安
定同位体標識エタノール
([1-¹³C]-エタノール) を用
意し添加したところ、アフ
ラトキシンへ添加した ¹³C
が取り込まれていることが
確認された(図4)。

(10) アセチルCoAに ¹³C
が取り込まれていたため、
エタノールは酢酸を経てア
セチルCoAに変換され、こ
れがアフラトキシン生成
に用いられると考えられ
た。実際、アフラトキシンの

各アイソトープピーク面積に確率モデルをあてはめ、¹³Cの取り込み様式を推定したところ、アフラトキシンへの¹³C取り込み率とアセチルCoAの¹³C標識率は一致することがわかった。また、アフラトキシンへの¹³C取り込み率から、[1-¹³C]-エタノール添加時のアフラトキシン産生量の増加分は[1-¹³C]-エタノールの取り込みにより生じていることがわかり、エタノールがアフラトキシン生成の炭素源になることを示していた。アルコールデヒドロゲナーゼIの遺伝子破壊株では、[1-¹³C]-エタノール添加によるアフラトキシン産生の増大、およびアフラトキシンへの¹³Cの取り込みはほぼ確認されず、アルコールデヒドロゲナーゼIが外部添加したエタノール代謝において主要な役割を果たしていることがわかった。

(11) 安定同位体標識2-プロパノールを用いた実験から、2-プロパノールもまたアセチルCoAを経てアフラトキシン生成に利用されることがわかった。しかしながら、エタノールに比べアフラトキシンへの¹³C取り込み率は低く、2-プロパノール添加によるアフラトキシン産生量の増加は、2-プロパノールの炭素源としての取り込みだけでは説明できないと考えられた。また、2-プロパノールによるアフラトキシン産生量の増加はアルコールデヒドロゲナーゼI破壊株においても損なわれず、2-プロパノールの代謝は別の酵素が担うと考えられた。

(12) 上記(8)~(11)で得られた成果のうち、低濃度からアフラトキシン産生阻害作用を示したアルコールについて、国内特許出願を行った。また、成果の全体を学術誌に投稿中である。本成果は、通常殺菌作用物質として見做されていたエタノール、2-プロパノールが、低濃度ではかび毒産生の増大という逆効果をもたらしてしまうことを示しており、農業応用上インパクトが大きいと考えている。とりわけ、2-プロパノールが取り込まれ二次代謝産物の炭素源として利用されうるとの知見は、基礎科学上の新奇性も高いと言える。今後、他の有用物質産生真菌に対しても、エタノールおよび2-プロパノールによる産生増加作用が見られるか検証する必要があるだろう。

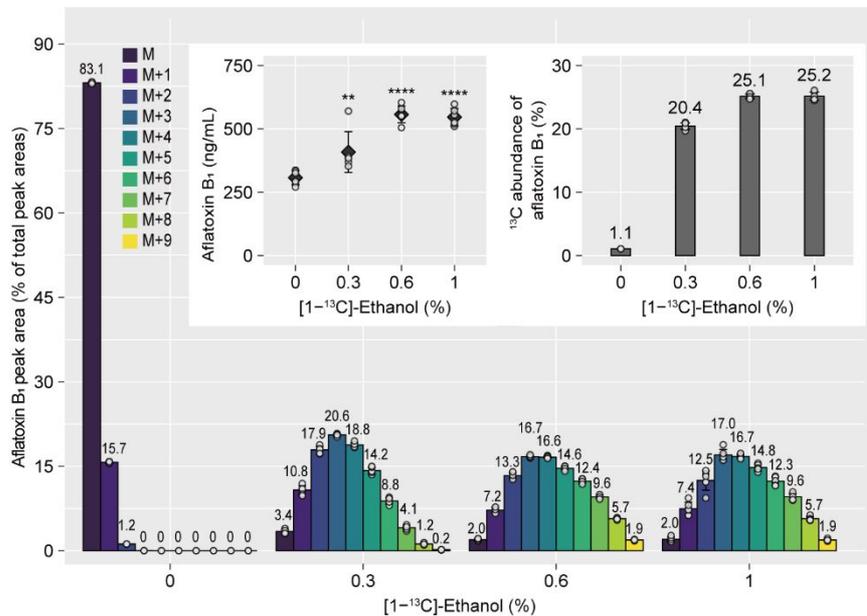


図4. アフラトキシン分子への安定同位体標識エタノールの取り込み

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Furukawa Tomohiro, Katayama Hidekazu, Oikawa Akira, Negishi Lumi, Ichikawa Takuma, Suzuki Michio, Murase Kohji, Takayama Seiji, Sakuda Shohei | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Diocstatin Activates ClpP to Degrade Mitochondrial Components and Inhibits Aflatoxin Production | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cell Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 1396 ~ 1409.e10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2020.08.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 譚承堯, 大日向光暉, 古川智宏, 作田庄平 |
| 2. 発表標題 アフラトキシン生産量とエタノール生産量との関連性 |
| 3. 学会等名 日本マイコトキシン学会第84回学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 古川 智宏, 片山 秀和, 及川 彰, 根岸 瑠美, 市川 琢磨, 鈴木 道生, 村瀬 浩司, 高山 誠司, 作田 庄平 |
| 2. 発表標題 アフラトキシン産生阻害物質ジオクタチンによるメタボロームの変動とヒストンアセチル化および遺伝子発現への影響 |
| 3. 学会等名 日本マイコトキシン学会第85回学術講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---------------------------------|-------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 アフラトキシン産生抑制用組成物 | 発明者 古川智宏, 久城真代 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-014052 | 出願年 2022年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 | | | |
|---------|-----------------------|--|--|--|
| カナダ | University of Toronto | | | |