

氏名	さくの えみ 作野 えみ
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	乙第41号
学位授与年月日	平成16年 3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies on aflatoxin biosynthesis and its control (アフラトキシン生合成とその制御に関する研究)
学位論文審査委員	(主査) 中島 廣光 (副査) 尾添 嘉久 尾谷 浩 森 信寛 松井 健二

## 学位論文の内容の要旨

アフラトキシンは、*Aspergillus flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. tamarii*などのカビが生産する発癌性二次代謝産物である。アフラトキシンの生合成経路についてはこれまで精力的に研究が行われてきており、14種類以上の酵素が関わることが明らかとされた。また生合成に関わるほぼ全ての遺伝子がクローニングされている。アフラトキシン生合成初期において、5'-hydroxyaverantin (HAVN)は、HAVN dehydrogenase によって averufin (AVR)に変換される。最近、遺伝子破壊実験によって、アフラトキシン生合成遺伝子クラスター内の *adhA* 遺伝子が HAVN dehydrogenase をコードすることが報告された。しかし、この酵素の性質や、反応メカニズムについては、まだ明らかとなっていない。そこで、この反応の詳細を明らかにするために、HAVN dehydrogenase を精製し、その性状検討を行うことにした。さらに、新しいアフラトキシン汚染防御法の開発を目的として、土壤糸状菌代謝産物中に HAVN dehydrogenase 阻害物質を検索した。

*A. parasiticus* NIAH-26 からサイトソルを調製し、HAVN dehydrogenase の精製を試みた。その過程で、HAVN から AVR への反応は中間体が存在する二段階反応であり、HAVN dehydrogenase ともうひとつの酵素が関与していることが明らかとなった。HAVN dehydrogenase は HAVN からこの新規な中間体への反応を触媒していた。部分精製した HAVN dehydrogenase を用い HAVN からこの中間体を調製し、精製後各種機器分析を行った。その結果、この中間体は HAVN の 5'位の水酸基がケトンになった 5'-oxoaverantin (OAVN)であることが明らかとなった。また、新規の酵素は、この OAVN を AVR に変換する酵素であることから OAVN cyclase と命名した。OAVN は、酸性条件や高温、室温での長時間の放置によって非酵素的に AVR に変換する不安定な物質であった。

*A. parasiticus* NIAH-26 のサイトソルから各種カラムクロマトグラフィーによって HAVN dehydrogenase を精製した。この酵素は、28 kDa のサブユニット 2 つからなるタンパクであり、NADP ではなく NAD を補酵素とする。また、HAVN dehydrogenase をトリプシンで処理後、MALDI-TOFMS による peptide mass fingerprinting を行った。この結果、精製した HAVN dehydrogenase が *adhA* によってコードされることが確認された。

次に、*A. parasiticus* NIAH-26 のサイトソルから OAVN cyclase の精製を行った。この酵素は 79 kDa のサブユニット 2 つからなるタンパクであり、その活性には補酵素を必要としない。精製した OAVN cyclase について N 末アミノ酸配列の決定を試みたところ、25 個のアミノ酸配列を決定することができた。Blast によるホモロジー検索の結果、驚いたことに、この配列は *vbs* 遺伝子によってコードされる versiconal (VHOH) cyclase の推定アミノ酸配列の一部と完全に一致した。VHOH cyclase は VHOH を versicolorin B (VB) に変換するアフラトキシン生合成酵素である。OAVN cyclase の精製過程において OAVN cyclase 活性を示す酵素は常に一つであったこと、精製した OAVN cyclase によって VHOH が VB に変換されたことから、OAVN cyclase と VHOH cyclase は同一の酵素であると考えられた。そこで、両酵素の関係を明らかにするために次のような実験を行った。OAVN と VHOH の競合実験では、*A. parasiticus* NIAH-26 のサイトソルに対して VHOH と OAVN の競合が見られた。酵母での VHOH cyclase 発現実験では、*vbs* 発現酵母の細胞抽出液によって OAVN が AVR に変換された。*vbs* 遺伝子破壊実験では、O-methylsterigmatocystin 蓄積変異株である *A. parasiticus* KIH の *vbs* 遺伝子破壊によって、OAVN と VHOH が蓄積した。また、遺伝子破壊株の細胞抽出液はどちらの cyclase 活性も示さなかった。以上の結果から、*vbs* 遺伝子によってコードされる同一の酵素がアフラトキシン生合成において OAVN から AVR への反応と VHOH から VB への反応に関わっていることが明らかとなった。

アフラトキシン汚染防御法の一つとして酵素阻害剤の利用を考え、HAVN dehydrogenase 阻害物質を検索した。この酵素に対する阻害活性を指標に土壌糸状菌についてスクリーニングを行い、*Trichoderma hamatum* を選抜した。この菌の培養濾液から阻害活性を示す淡黄色粉状物質 TAEMC161 を単離し、各種機器分析データに基づいてその化合物を 4,6-dihydroxy-5-methoxy-6a-methylcyclohexa[de]indano [7,6-e]cyclopenta[c]2H-pyran-1,9-dione と決定した。TAEMC161 (viridiol) は、250  $\mu$ M で、HAVN dehydrogenase を 50% 阻害したが、HAVN dehydrogenase と同じ補酵素を要求するリンゴ酸脱水素酵素に対しては、3 mM の濃度でも活性を阻害しなかった。*in vivo* でのアフラトキシン生合成阻害実験においては、1 mM の濃度でもアフラトキシンの生合成は阻害されなかった。

## 論文審査の結果の要旨

アフラトキシンは、*Aspergillus flavus*、*A. parasiticus* などのカビが生産する発癌性二次代謝産物である。農作物のアフラトキシンによる汚染は人間だけでなく家畜の健康に対する脅威となっており、その生合成機構の解明やそれに基づく汚染防御法の開発が求められている。そのためアフラトキシンの生合成経路について多くの研究が行われてきており、14 種類以上の酵素がその生合成に関わること、さらに生合成に関わるほぼ全ての遺伝子がクラスターを形成していることなどが明らかにされている。アフラトキシン生合成経路初期の 5'-hydroxyaverantin (HAVN) から averufin (AVR) への変換反応は HAVN dehydrogenase によって触媒される反応であると言われている。きわめて最近、遺伝子破壊実験によってクラスター内の *adhA* 遺伝子が HAVN dehydrogenase をコードすることが報告された。しかしながら、この酵素の性質や反応メカニズムについては、まだ明らかにされていない。この反応の詳細を明らかにするために本研究では、HAVN dehydrogenase を精製し、その性質を調べ、以下の結果を得ている。さらに、新しいアフラトキシン汚染防御法の開発を目指し、土壌糸状菌代謝

産物中にこの酵素の特異的阻害物質を求め、活性物質を得ることに成功している。

まず HAVN dehydrogenase を *A. parasiticus* NIAH-26 のサイトソルから精製し、28 kDa のサブユニット 2 つからなり、NAD を補酵素として要求することを明らかにした。また、MALDI-TOFMS による peptide mass fingerprinting を行い、この酵素が *adhA* によってコードされることを確認している。一方、この酵素の精製過程で、HAVN dehydrogenase が HAVN から新規な中間体への反応を触媒し、別の酵素がこの中間体から AVR への反応を触媒することを見出した。そこで部分精製した HAVN dehydrogenase を用いて HAVN からこの中間体を調製し、各種機器分析データに基づいて、これが 5'-oxoaverantin(OAVN)であることを示した。第 2 の酵素は OAVN を AVR に変換する環化酵素であることから OAVN cyclase と命名した。次に OAVN cyclase を精製し、79 kDa のサブユニット 2 つからなり、その活性には補酵素を必要としないことを明らかにした。精製した OAVN cyclase の N 末端 25 個のアミノ酸配列を決定した。この配列は *vbs* 遺伝子によってコードされる versiconal (VHOH) cyclase の推定アミノ酸配列の一部と完全に一致した。VHOH cyclase はアフラトキシン生合成経路において VHOH を versicolorin B (VB)に変換する酵素である。精製した OAVN cyclase によって VHOH が VB に変換されたこと、精製過程において OAVN cyclase 活性を示す酵素は常に一つであったことから、OAVN cyclase と VHOH cyclase は同一の酵素であると考えられた。そこで、OAVN と VHOH の競合実験、酵母での *vbs* 発現実験、*vbs* 遺伝子破壊実験を行い、*vbs* 遺伝子によってコードされる同一の酵素が OAVN から AVR への反応と VHOH から VB への反応を触媒するということを実験的に証明した。

アフラトキシン汚染防御法の一つとしてアフラトキシン生合成酵素の阻害に着目し、HAVN dehydrogenase の阻害物質の検索も行っている。この酵素に対する阻害活性を指標に土壌糸状菌をスクリーニングし、*Trichoderma hamatum* を選抜した。この菌の培養濾液から阻害活性を示す物質 TAEMC161 を単離し、各種機器分析データに基づいてその化学構造を決定した。TAEMC161 は 250  $\mu$ M で HAVN dehydrogenase 活性を 50%阻害したが、3 mM の濃度でもリンゴ酸脱水素酵素の活性を阻害しなかった。

以上のように、本研究ではアフラトキシン生合成経路上の、これまでひとつの酵素が触媒すると考えられていた反応に 2 つの酵素が関与することを見出し、新たな中間体を同定すると同時に 2 つの酵素の性質も明らかにしている。また、ひとつの酵素が同じ生合成経路の別々の 2 つの反応を触媒することを発見しており、これはカビの二次代謝ではきわめて珍しいことである。一方、アフラトキシン汚染防御法のひとつとして生合成酵素の特異的な阻害剤の利用を考え、実際に特異的な阻害剤の単離にも成功している。

本論文に含まれるこれらの成果は、アフラトキシンにとどまらず糸状菌の二次代謝産物の生合成について重要な知見を与え、学術的にきわめて高い価値を持つだけでなく、アフラトキシン汚染防御法の開発における新たな方向性を示すものである。このようなことから本論文が学位論文として十分な価値を有するものと判断した。