

重要穀類を汚染するカビ毒トリコテセンの簡易検出法の構築

東洋大学 理工学部 応用化学科
安藤 直子

【研究の目的と背景】

トリコテセンとは, *Fusarium* 属等の糸状菌類が生産するカビ毒の一群で, トリコテセン骨格を持つものを総称する. A 型から D 型に分類されるが, 食品を汚染するのはおもに A 型と B 型であり, 細胞毒性が強く強毒性であることが知られている. しかし, 日本ではカビ毒に対する関心は低く, deoxynivalenol (DON) と nivalenol (NIV) という二種類の B 型トリコテセンしか規制対象になっていない (化学構造式を図 1 に示す). 日本の食を汚染するトリコテセンはこの二種だけではなく, 他にいくつかの誘導体の混入が知られているが, その強毒性にもかかわらず, 日本では規制対象から外れており, 食の安全に対する脅威となっている.

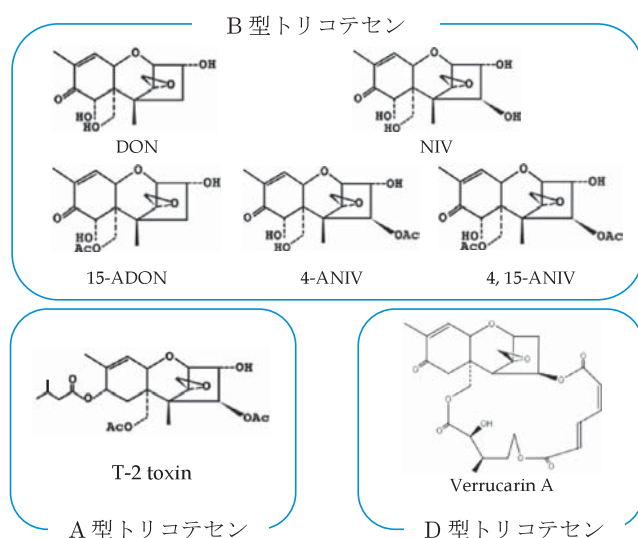


図 1 様々なトリコテセン

日本でのトリコテセン規制が遅々として進まないのには, カビ毒のリスクに対する認識の低さとともに, トリコテセンに誘導体が多く (200 種類近いと言われている), その検出に困難が伴う, という理由も挙げられよう. 現在, トリコテセンの検出には, HPLC や GC-MS 等の機器分析, 抗体を利用した ELISA などが行われている. HPLC や GC-MS は非常に感度や精度が高いものの, 高い技術や高価な機器の設置が必要である. 一方, ELISA は簡易ではあるが高価であり, 市販されている ELISA キットは DON, NIV, T-2 toxin (図 1 参照) のわずか 3 種類のトリコテセンにしか対応していない. 本研究室の過去の研究より, 同等の毒性のあるいくつかのアセチル化体はこの

ELISA 法では検出できないこともわかっている. さらに, これらの検出法は毒性を基にした検出ではなく, 食の安全性の見地から考えると不十分な側面もある. そこで, 本研究では, 微生物を用いたトリコテセンの毒性に基づく生物学的検出法の構築を試みた.

微生物や細胞培養を用いたトリコテセンの生物学的検出法の構築は, これまでにも, いくつか試みられてきた. しかし, 感度が十分でなかったり, あるいは, 取り扱いが難しく擬陽性の反応が多かったりと, 現実的な生物学的検出法は構築できていない. そこで, 本研究では, 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた簡易, 安価, 高感度な検出法の構築を目指すこととした. 本研究で使用した *S. cerevisiae* BY4742 株のトリコテセン感受性は, *Kluyveromyces marxianus* などのトリコテセン高感受性酵母に比べれば, それほど高いとは言えない. しかし, BY4742 株は約 5000 株の遺伝子破壊ライブラリーが構築されており, それらの感受性を調べることで, トリコテセン耐性を担う遺伝子を決定することができる. そこから, 遺伝子を複数破壊することで, トリコテセンに対し, 高い感受性を持つ酵母の変異体を得ることも可能と考えられる. そのようにして作成した変異体を用いて, 穀類中のトリコテセンを簡易に検出できるような系を構築することが, 本研究の目的である.

【研究の方法】

1) verrucaric A によるトリコテセン耐性遺伝子の網羅的解析

本研究では, *S. cerevisiae* BY4742 株の ORF (open reading frame) の 96% を網羅した遺伝子破壊ライブラリーを用いて, 各々の遺伝子破壊株のトリコテセン感受性を網羅的に解析した. 約 5000 株の遺伝子破壊ライブラリーは, 各々 96 well plate の well 内で培養を行った. その際, 毒性の強い D 型トリコテセンである verrucaric A (図 1 参照) を 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え, vehicle を加えたものと並行して培養を行い, 18 時間後の OD₆₂₀ を測定することで, verrucaric A による増殖阻害を測定した. 生育阻害が 60% 以上かかるものを高感受性株と考え, これらの選抜された遺伝子破壊株に, 0.1 または 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え, その阻害率から, 特に高い感受性を示す破壊株を決定した. さらに, 選抜されてきた遺伝子破壊株について, A 型トリコテセンである T-2 toxin への感受性も確認した.

2) 二重遺伝子破壊株, 三重遺伝子破壊株の作成

1) の実験から選ばれてきたトリコテセン高感受性株において, 破壊された遺伝子がトリコテセン耐性を担うものと判断した。そこで, それらの遺伝子を二重, 三重に破壊する多重遺伝子破壊株の作成を試みた。BY4742 株は *ura2⁻*, *leu3⁻* であり, ウラシルとロイシンに対し, 栄養要求性を持つ。そこで, 標的遺伝子を *ura2* あるいは, *leu3* 遺伝子によって置換し, 栄養要求性の喪失によって遺伝子破壊株を選抜した。その際, 各々の遺伝子は, YCpURA, YCpLEU のプラスミドを鋳型とした PCR によって得, エレクトロポレーション法によって遺伝子の導入を行った。

3) T-2 toxin による多重遺伝子破壊株の選抜

上記で作成した二重, 三重遺伝子破壊株について, 今度は 0.1 ng/ml ~ 1 µg/ml の T-2 toxin を用いて, 増殖阻害の IC₅₀ を求めた。その結果からより高いトリコテセン感受性を持つ多重遺伝子破壊株を選抜した。

4) B 型トリコテセンによる多重遺伝子破壊株の感受性試験

3) で選抜された多重遺伝子破壊株について, 日本で特に問題が指摘されている B 型トリコテセンについて, その感受性試験を行った。用いられた B 型トリコテセンは, DON, 15-acetyl deoxynivalenol (15-ADON), 4-acetyl nivalenol (4-ANIV), 4,15-acetyl nivalenol (4, 15-ANIV) (図 1 参照) の 4 種類であり, 濃度は, 0.5 ~ 50 µg/ml の範囲を用いた。

5) コーンスターチを用いたモデル検出系の構築

実際の農作物に対する検出系を構築するために, コーンスターチに人工的に T-2 toxin を添加し, 3) で作成したトリコテセン高感受性の多重遺伝子破壊株を用い, モデルサンプルから高感度に T-2 toxin を検出する系の構築を試みた。

【研究結果と考察】

1) verrucarín A によるトリコテセン耐性遺伝子の網羅的解析

0.5 µg/ml の verrucarín A を添加した際の増殖阻害率が 60% に達した遺伝子破壊体は, 全遺伝子破壊株約 5000 株中, 約 109 株であった。それらの遺伝子機能を分類してみたところ, RNA polymerase 関係が 15 株, 液胞型 ATPase 関連が 10 株, エルゴステロール生合成関連が 4 株, エンドサイトーシス関連が 4 株, といった結果になり, ある特定の遺伝子グループの発現タンパク質が verrucarín A 耐性を担っていることが強く示唆された。特に, 液胞型 ATPase 関連の遺伝子が, 薬剤耐性に深く関与するという報告は希少であり, 興味深いと言える。

さらに, verrucarín A 濃度を下げ, 高感受性株を探索した結果, 17 株の遺伝子破壊株がこのトリコテセンに対し, 高い感受性を示すことがわかった。また, これらの

株の T-2 toxin 耐性を調べたところ, T-2 toxin に対しても同様に高い感受性を示すことがわかった。verrucarin A と T-2 toxin 双方に高い感受性を示す遺伝子破壊株を選抜したところ, *atp2Δ*, *chc2Δ*, *erg4Δ*, *erg6Δ*, *gall1Δ*, *gon7Δ*, *pdr5Δ*, *rpb4Δ*, *vma5Δ*, *ykll18wΔ* が選抜された。

2) 多重遺伝子破壊株の T-2 toxin による増殖阻害

上記で選ばれた遺伝子破壊株で破壊された遺伝子は, トリコテセン耐性を担う遺伝子であると考えられる。そこで, これらの二重破壊株の作成を試みた。その際, 特にトリコテセン感受性が高かった *pdr5Δ* を基に, 二番目の標的遺伝子を *ura3*, または *leu2* で置換した。二重遺伝子破壊株の作成に成功したのは, *pdr5Δ :erg6Δ*, *pdr5Δ :taf14Δ*, *pdr5Δ :chc1Δ*, *pdr5Δ :gon7Δ*, *pdr5Δ :gall1Δ*, *pdr5Δ :vma5Δ*, *pdr5Δ :ykll18wΔ* であり, その中でも, *pdr5Δ :erg6Δ* は 2 つの遺伝子を破壊することで, それぞれの遺伝子を破壊した場合よりも, はるかに高い T-2 toxin 感受性を示した (図 2)。*pdr5Δ :erg6Δ* の IC₅₀ は 0.01 µg/ml となり, この値は, これまで最も感受性が高いとされてきた酵母 *Kluyveromyces marxianus* の系 (IC₅₀ = 0.09 µg/ml) よりも, 10 倍近く感受性が高いことがわかる。(ちなみに親株 BY4742 の IC₅₀ は 5 µg/ml 以上であった。)

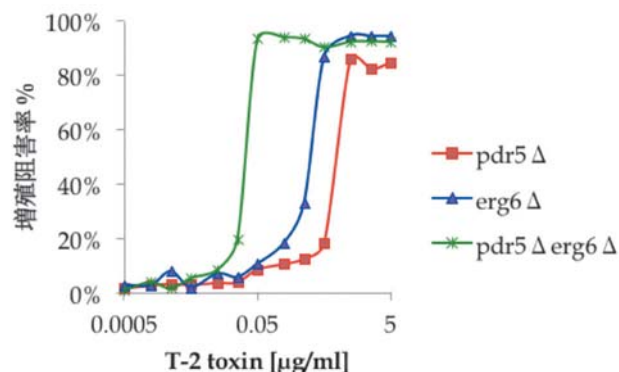


図 2 遺伝子破壊による T-2 toxin 感度の変化

そこで, *pdr5Δ :erg6Δ* を基に, 三番目の標的遺伝子を *leu2* で置換することを試みている。現在まで, *pdr5Δ :erg6Δ :gon7Δ*, *pdr5Δ :erg6Δ :gall1Δ*, *pdr5Δ :erg6Δ :ykll18wΔ* の 3 株の三重遺伝子破壊株の作成に成功している。しかし, これら三重遺伝子破壊株に関しては, 二重破壊株の *pdr5Δ :erg6Δ* と比較して, トリコテセン感受性に大差がないことがわかった。また, *pdr5Δ :erg6Δ* を基にしたさらなる遺伝子破壊はかなり効率が悪いことも示された。(薬剤耐性に関与する遺伝子を二重に破壊した *pdr5Δ :erg6Δ* は, エレクトロポレーション法に弱いと思われる。)そこで, 現在, *pdr5Δ* を基に, 三番目の標的遺伝子を先に破壊し, その後, *erg6* を *ura3* で置換して破壊する方法を試みている。

3) 二重遺伝子破壊株 pdr5Δ :erg6Δ の B 型トリコテセンによる増殖阻害

現在の所まで, pdr5Δ :erg6Δ よりも高い感受性を示す多重遺伝子破壊体が作成されていないため, この pdr5Δ :erg6Δ を用いて, B 型トリコテセンによる増殖阻害を調べた. B 型トリコテセンは, A 型トリコテセン, D 型トリコテセンに比べると, その細胞毒性は強くない. しかし, 日本の食に最も多く混入してくるのはこの B 型トリコテセンである. そこで規制対象になっていないアセチル化体を含め, その増殖阻害を調べた (図 3). DON に対し, これまで最も高い感受性を見せていたのは, Abolmaali et al. が発表した五重遺伝子破壊体についてで, その IC₅₀ が 5 μg/ml であった (Aolmaali et al., J. Microbiol. Meth. [2008] 72, 306-312). それに比べても, pdr5Δ :erg6Δ はやや感受性が高いことが示されている. また, この株は他の B 型トリコテセンに対しても, DON よりも高い感受性を示した.

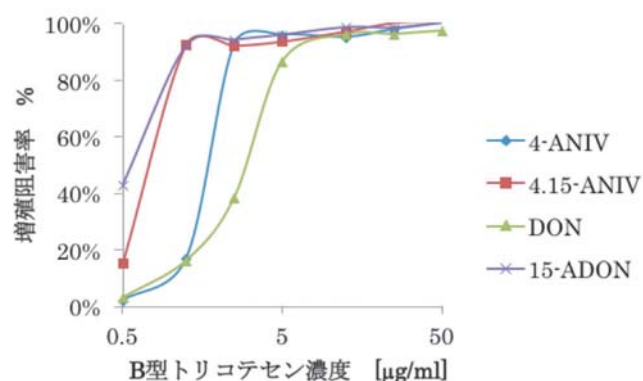


図 3 pdr5Δ :erg6Δ の B 型トリコテセンによる増殖阻害

4) 二重遺伝子破壊株を用いたモデル検出系におけるトリコテセンの検出

現在, モデル検出系として, T-2 toxin をコーンスターチに加え, どの程度の感度まで検出できるかについて, 研究を進めているところである. コーンスターチの場合, T-2 toxin をはじめとするトリコテセンの抽出がやや難しく, HPLC での検出においても, 安定した値が得られていない. そこで, まず安定したトリコテセン抽出方法の確立が重要である. 毒性の強い T-2 toxin においては, 抽出法が確立できれば, 今回の遺伝子破壊株を用いた検出系を使用することで, 現実的な汚染レベルに対し簡易な検出が可能であることが示唆されている. 一方, より毒性の低い DON においては, 現在の二重破壊体ではまだ感度が十分とは言えない. よって, さらに感度の高い多重破壊体の作成が急務である.

【残された問題, 今後の課題】

本研究において, トリコテセン耐性遺伝子が決定でき, 今まで薬剤耐性に深い関与が示唆されていなかった液胞型 ATPase 関連の遺伝子の役割が示されたことは, 新規な知

見であった. さらに, pdr5 と erg6 という 2 つの遺伝子を破壊した場合, 従来高感受性として公表されていた酵母に比べ, 10 倍程度高い感受性を持つ二重遺伝子破壊株を得られたことは, トリコテセン高感度検出系の構築の上で, 重要な成果と言えよう. しかし, 毒性の強い A 型トリコテセンはともかく, 現実的な B 型トリコテセンの検出を考えるには, まだ感度が低いのが現状である. 本研究室では, 現在, より高い感受性を持つ三重遺伝子破壊株の作成を続けており, 早急の課題は上記の pdr5Δ :erg6Δ よりも感受性の高い多重遺伝子破壊体を得ることである.

また, トリコテセン高感受性遺伝子破壊株が得られただけでは, 実際のサンプルには応用できない. コーンスターチを用いたモデル系では, 抽出の所で困難が生じ, その解決が必要である. また, 上記同様, 実際の B 型トリコテセンの検出にはさらに高い感度が必要である. ただし, より感受性の高い遺伝子破壊体が得られれば, これらの問題は解決されると考えられる. 現在, 日本の食の安全を脅かすトリコテセンの規制はやや不十分に見受けられるが, 簡易な検出法が構築されれば, より適切に規制する道が開けると思われる. そのためにも, 今後もこの研究をさらに発展させていく所存である.

【学会・シンポジウム発表】

1. Yamauchi, K., Sekimoto, Y., Minegishi, H., Usami, R. and Takahashi-Ando, N. (2010/12) High-throughput screening of trichothecene resistance genes in the library of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. Hawaii.
2. Ono, Y., Watai, T., Mingeishi, H., Usami, R. and Takahashi-Ando, N. (2010/12) Development of screening method of soil microorganisms which deactivate trichothecenes. The 8th International Symposium on Bioscience and nanotechnology. Tokyo.
3. 渡井智裕, 小野雪穂, 峯岸宏明, 越後輝敦, 宇佐美論, 安藤直子 (2011 年 2 月) 「トリコテセンの簡易検出法の確立と分解菌の探索」平成 22 年度東洋大学工学技術研究所研究発表・ポスターセッション