

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	第	号
------	---	---

氏 名 松井 宏介

論 文 題 目 トリコテセン生産フザリウム属菌による
新規 C-4 位糖抱合活性に関する研究

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	木村 真
委 員	名古屋大学教授	吉村 徹
委 員	名古屋大学教授	浅川 晋
委 員	名古屋大学准教授	邊見 久
委 員	名古屋大学准教授	岩崎 雄吾

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

ムギ類赤かび病菌 *Fusarium graminearum* は重要穀類に感染し、穀物の生産性を大きく減少させるとともにトリコテセン系かび毒を種子に蓄積させて汚染し、食の安全を脅かす。トリコテセンは 12,13-epoxytrichothec-9-ene (EPT) 骨格を持つかび毒の総称で、60S リボソームと作用して真核生物のタンパク質合成を阻害する。*Fusarium* 以外にも *Trichothecium*, *Myrothecium* などの多様な真菌が生産する。基本骨格 EPT の側鎖が様々な修飾を受けたものが報告され、側鎖化学構造の特色 (type A – type D) や C-3 位の生産菌自己耐性における重要性 (d-type と t-type) に基づいて分類される。t-type トリコテセン生産菌では C-3 位に水酸基を持つ isotrichodermol (ITDmol) が最初の EPT 骨格を有するトリコテセンとして合成され、その直後に *Tri101* がコードする酵素 Tri101p によって ITDmol の C-3 位がアセチル化される。このアセチル基付加が生産菌に対する自己耐性を付与すると同時に、以後の生合成酵素がトリコテセンを基質として反応を進めることができるようにする極めて重要なステップである。一方、C-3 位の水酸基を欠く d-type トリコテセン生産菌では、3-Oアセチル化による自己耐性機構が存在しない。本論文は *Fusarium* 属菌が糖抱合によるトリコテセン代謝活性を有していることを明らかにし、その反応の解明を目指して実施された研究をまとめたものである。様々な d-type および t-type トリコテセンをフィーディングし、遺伝的背景の違いによる代謝産物の違いを解析することでトリコテセン生合成に関する知見も深まったと評価できる。以下に各章で得られた成果を要約する。

第二章 t-type トリコテセン生産 *Fusarium* 属菌による C-4 位糖抱合活性

生合成経路の初発酵素をコードする *Tri5* 遺伝子を破壊した *F. graminearum* (FGD5 株) に ITDmol の構造異性体の d-type トリコテセン trichodermol (TDmol) をフィーディングすると TDmol は生合成経路には組み込まれず、ヘキソース分の分子量が増加する。そこで第一節ではこの変換産物を精製し、NMR で構造を決定した。その結果、変換産物はグルコース付加した TDmol-4-glucoside (TDmol-4-glc) であることが証明された。また、d-type トリコテセン 8-deoxytrichothecin (8-deTCN) をフィーディングすると TDmol-4-glc に変換され、trichothecin (TCN)、trichothecolone (TCC) は TCC-4-glucoside (TCC-4-glc) に変換された。このことから、Tri101p によって耐性を得ることができない d-type トリコテセンをフィーディングした場合に *Fusarium* 属菌は C-4 位糖抱合活性を示すことが明らかとなった。

Fusarium 属菌が d-type トリコテセンの C-4 位を糖抱合したことから、第二節では C-3 位アセチル化機構が存在しなければ t-type トリコテセンを生産する *Fusarium* 属菌自身による糖抱合が起こる可能性を検証した。まず、FGD5 株の *Tri101* をさらに破壊した FGD5/101 二重破壊株を作成し、HT-2 toxin (HT-2) を

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

フィーディングした。FGD5 株では HT-2 を 3-acetyl HT-2 toxin (3-A HT-2) および T-2 toxin に変換するのに対し、FGD5/101 株は HT-2 をヘキソース分の分子量が増加したと考えられる化合物に変換した。この変換産物を精製して構造を NMR で決定したところ、HT-2-4-glucoside (HT-2-4-glc) であることが明らかとなった。

次に C-3 位アセチル化と C-4 位グルコシド化が同時に起こるかどうかを調べた。まず HT-2-4-glc を FGD5 株にフィーディングしたが、C-3 位のアセチル化は認められなかった。また大量の精製 Tri101p とアセチル CoA を加えて反応させても、極微量の 3-A HT-2-4-glc 候補物質が LC-MS/MS 解析で検出されるにすぎなかった。さらに、C-3 位がアセチル化された各種 nivalenol 系トリコテセンを FGD5/101 株にフィーディングして生じる産物を解析した実験から、C-3 位アセチル化と C-4 位グルコシド化は同時には起こらないと結論付けられた。これらの結果より、t-type トリコテセンを生産する *Fusarium* 属菌の C-4 位を糖抱合する活性は、*Tri101* が働かない時にのみ発現する第二の弱毒化機構であることが強く示唆された。

そこで本研究で得られた t-type トリコテセン配糖体の安定性を評価した。NMR で構造を決定した TDmol-4-glc、TCC-4-glc、HT-2-4-glc を pH 2~13 に調整した溶液 (pH を 1 ずつ変更したもの) と 3 日間反応させ、アグリコン (TDmol、TCC、HT-2) が遊離するかどうかを検証した。アグリコンはどの pH においても検出されなかったが、TDmol-4-glc を pH 2~4 溶液で処理したところ、LC-MS/MS 解析において新たな TIC ピークが検出された。この新しいピークの組成式は $C_{21}H_{34}O_9$ であり、TDmol-4-glc の組成式は $C_{21}H_{32}O_8$ であるため、水素原子 2 個、酸素原子 1 個が増加した化合物であると判明した。変換産物の NMR 解析から、TDmol-4-glc + H_2O 付加体のアグリコン部分は 2,4,13-trihydroxyapotriconothecene (THA) であり、TDmol-4-glc + H_2O 付加体は EPT 骨格が失われ、新たな骨格構造へと変化した THA-4- α -glucopyranoside (THA-4-glc) であることが確定した。この結果から、酸性条件下で TDmol-4-glc のトリコテセン骨格は加水分解して一旦環を開き、C-12 位を C-11 位酸素が求核付加攻撃して再び環を巻きアポトリコテセン骨格へ再構築されるものと考えられた。この反応は C-4 位が酸素付加されていないトリコテセン合成反応での EPT 骨格形成のような C-11 位を C-2 位酸素が求核付加攻撃して脱水が起こる反応とは大きく異なっている。そこで酸性条件下で TDmol-4-glc への H_2O 付加、開環、骨格の再構築が進むことに、C-4 位を介して糖抱合していることが関与しているのかを検証するため、アグリコン部分の TDmol を同様の条件で反応させた。TDmol の場合でも組成式 $C_{15}H_{22}O_5$ に水分子 1 個増加した $C_{15}H_{24}O_6$ に対応する XIC ピークが得られ、 H_2O が付加する際に C-4 位のグルコースは必要ないことが明らかとなった。

HT-2-4-glc は 20 μ M の濃度でも出芽酵母や動物細胞の成長を阻害することはない

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

かった。また、TDmol や TCC でも C-4 位が糖抱合された変換産物は毒性が消失していた。3-A HT-2 は培地中で C-3 位が容易に脱アセチル化してしまうため、HT-2 よりも毒性は低減化するものの、HT-2-4-glc と比較するとより毒性が高かった。以上のことから、トリコテセン生産 *Fusarium* 属菌が生来有する糖抱合による第二のトリコテセン弱毒化機構は C-3 位アセチル化による自己耐性機構よりも安定に耐性を付与できることが示唆された。

第三章 t-type トリコテセン生産 *Fusarium* 属菌の C-4 位糖抱合遺伝子の探索

シロイヌナズナは代表的トリコテセンである 4-deoxynivalenol (DON) の C-3 位を糖抱合して DON-3-glc に変換し、タンパク質合成阻害活性を不活化してトリコテセン耐性を獲得している。また、穀類を含む様々な植物はトリコテセンの C-3 位を糖抱合する UDP-glucosyltransferase (UGT) を有し、トリコテセンに対する耐性を獲得していることが明らかになってきた。そこで *Fusarium* が有する C-4 位糖抱合にかかわる UGT 遺伝子を同定、単離し、真菌の異物代謝に関する新しい機構を解明する手がかりを得ることを目指した。

第一節では *F. graminearum* PH-1 株のゲノム情報をもとに、17 個の *FgUGT* 遺伝子候補の単一遺伝子破壊株の作製を行った。破壊することが困難であった 1 つを除いた 16 個の遺伝子破壊体それぞれに TDmol をフィーディングして配糖体へ変換しなくなる株を探索したが、すべての遺伝子破壊体において野生株とほぼ同じ速さで TDmol が消失し TDmol-4-glc が生じた。このことから (1) 多数の *FgUGT* 遺伝子が C-4 位糖抱合を担っていて単一遺伝子の破壊では表現型が出にくい、(2) 破壊できなかった残り 1 つの候補遺伝子が生育に必須でかつトリコテセン C-4 位糖抱合も担っている、のいずれかもしくは両方の可能性が考えられた。

そこで第二節では、17 個の候補遺伝子を発現させた分裂酵母および出芽酵母それぞれに TDmol をフィーディングすることで C-4 位糖抱合酵素遺伝子の同定を試みた。しかし糖抱合活性を示す形質転換体は得られず、目的の遺伝子の同定には至らなかった。この原因として、酵母を宿主としたのでは UGT の基質となる UDP-glucose が十分な量、供給することができない可能性が考えられた。

そこで第三節では糖抱合活性を示す *F. graminearum* を宿主に、強力な Tef プロモーターから候補 UGT 遺伝子を高発現させ、TDmol のより迅速な消失を指標に同定を試みることにした。まずポジティブコントロール遺伝子としてシロイヌナズナの DON を配糖体化する *DOG1* 遺伝子を導入したが、DON に対する糖抱合活性は示さなかった。原因は明らかになっていないが、植物に由来する異種遺伝子を *Fusarium* 属菌で発現させるためには転写後の mRNA の安定性向上やコドンの使用頻度の至適化に留意して、注意深く発現系を構築する必要がある。ポジティブ

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

コントロール遺伝子の機能発現が確認できなかったためこれ以上の実験を進めていないが、大腸菌を宿主とした組換え酵素を調整して試験管内反応系によって活性を示すものを同定するなど、他の方法を試みる方が効率的に目的遺伝子の同定が可能であると考えられた。

以上のように本研究では、真菌においては、自己の生産する二次代謝産物をグルコース抱合によって低毒化する機構が存在することを見出した。動物においては、第二相反応でグルコースの C-6 位が酸化されたグルクロン酸を用いて抱合反応を行うが、グルコースを用いる反応は極めて稀である。t-type トリコテセン生産菌は自らが生合成する二次代謝産物に対して C-3 位アセチル化という自己耐性機構を有しているにもかかわらず、さらに第二の低毒化機構として糖抱合機構を有していることを明らかにした初めての研究であり、真菌の二次代謝、異物代謝の機構を理解する上で重要な基盤となるであろう。関与する UGT 遺伝子の同定には至らなかったものの、遺伝子同定にむけた研究戦略の方向性を明白に示しており、今後の当該研究分野の発展に大きく貢献するものである。このように本論文は高度の学術的価値を有することから、博士（農学）の学位を授与するにふさわしい内容であると認められる。