

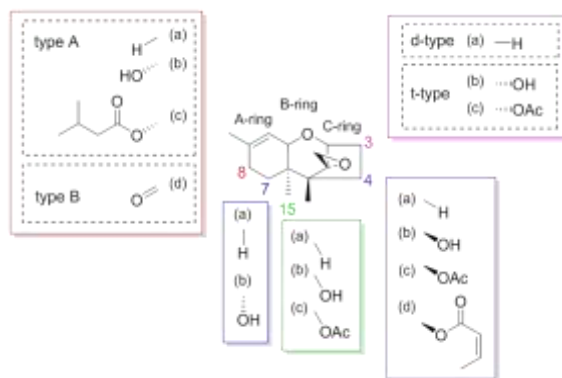
主論文の要約

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
氏名 松井 宏介

論文内容の要約

1. トリコテセンについて

ムギ類赤かび病原菌 *Fusarium graminearum* (*Fg*) は重要穀物に感染し、収穫量を大きく減少させる。さらに、*Fg* は感染した穀物宿主において、マイコトキシンのトリコテセン系かび毒を種子に蓄積させ汚染する。トリコテセンは熱や圧力に安定な低分子化合物であり、一般的な調理過程で取り除くことは困難である。トリコテセンに汚染された食品を接種すると熱、嘔吐、下痢などの症状を引き起こす危険性があり、特に *F. sporotrichioides* (*Fs*) が生産する T-2 toxin は ATA 症（食中毒無白血球症）の原因物質と考えられており、過去には死亡例もある。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、*Fusarium* 以外にも *Trichothecium*、*Spicellum*、*Trichoderma* などの真菌が生産し、様々な側鎖修飾を受けたトリコテセンがこれまでに 300 種以上報告される。トリコテセンは側鎖化学構造の違いに基づき type A、type B、type C、type D に分類される。ほかにも、トリコテセン生産菌の自己耐性における C-3 位の重要性に基づき d-type と t-type に分類される。トリコテセンは真核生物のメバロン酸経路で生産されるファルネシルピロリン酸を基質として生合成され、酸素を受け取る回数の違いによって C-3 位の水酸基の有無が異なる。t-type トリコテセンを生産する *Fusarium* 属菌は C-3 位に水酸基を持つ isotrichodermol (ITDmol) を最初の EPT として合成し、その直後に *Tri101* のコードする酵素 *Tri101p* による C-3 位のアセチル化が自己耐性として働き、以後の生合成が進めることで *Fg* は 4-acetylnivalenol (4-ANIV) を生産し、*Fs* は T-2 toxin を生産する。一方、C-3 位に水酸基を持たない d-type トリコテセンを生産する非 *Fusarium* 属菌は *Tri101p* に

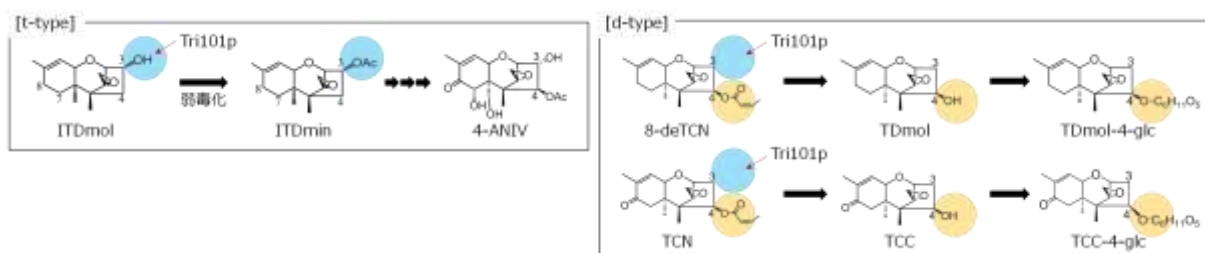


り除くことは困難である。トリコテセンに汚染された食品を接種すると熱、嘔吐、下痢などの症状を引き起こす危険性があり、特に *F. sporotrichioides* (*Fs*) が生産する T-2 toxin は ATA 症（食中毒無白血球症）の原因物質と考えられており、過去には死亡例もある。トリコテセンは 12,13-epoxytrichothec-9-ene (EPT) 骨格を持つかび毒の総称で、*Fusarium* 以外にも *Trichothecium*、*Spicellum*、*Trichoderma* などの真菌が生産し、様々な側鎖修飾を受けたトリコテセンがこれまでに 300 種以上報告される。トリコテセンは側鎖化学構造の違いに基づき type A、type B、type C、type D に分類される。ほかにも、トリコテセン生産菌の自己耐性における C-3 位の重要性に基づき d-type と t-type に分類される。トリコテセンは真核生物のメバロン酸経路で生産されるファルネシルピロリン酸を基質として生合成され、酸素を受け取る回数の違いによって C-3 位の水酸基の有無が異なる。t-type トリコテセンを生産する *Fusarium* 属菌は C-3 位に水酸基を持つ isotrichodermol (ITDmol) を最初の EPT として合成し、その直後に *Tri101* のコードする酵素 *Tri101p* による C-3 位のアセチル化が自己耐性として働き、以後の生合成が進めることで *Fg* は 4-acetylnivalenol (4-ANIV) を生産し、*Fs* は T-2 toxin を生産する。一方、C-3 位に水酸基を持たない d-type トリコテセンを生産する非 *Fusarium* 属菌は *Tri101p* に

よる C-3 位のアセチル化ができないため自己耐性の獲得が不可能である。本研究ではトリコテセン合成に関する知見を深めることに目的に、トリコテセンを生産する *Fusarium* の野生株および *Tri101* 破壊株に様々なトリコテセンをフィーディングし、その代謝様式を解析した。

2. *Fusarium* 属菌への d-type トリコテセンのフィーディング

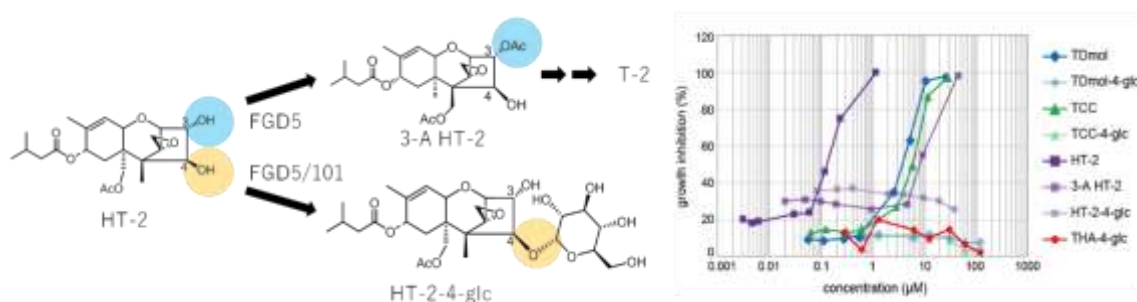
生合成経路初発遺伝子 *Tri5* を破壊した *Fusarium* 属菌はトリコテセン生産能力を失うが、Tri 酵素生産能力は保持したままである。*Tri5* を破壊した t-type トリコテセン生産菌 *Fs* および *Fg* (それぞれ *FsΔTri5* 株、FGD5 株と命名) に d-type トリコテセン trichodermol (TDmol) をフィーディングすると、TDmol は *FsΔTri5* 株、FGD5 株が生産する Tri 酵素の作用を一切受けることなく、各菌体の生合成経路に組み込まれることはなかった。しかし、各菌体の培地からは TDmol にヘキサース 1 個分の分子量が増加したピークが検出された。この変換物質を精製して NMR で構造解析したところ、予想通り TDmol-4-glucoside (TDmol-4-glc) であった。次に、TDmol の C-4 位ブテノイル化体である 8-deoxytrichothecin (8-deTCN) を各菌体にフィーディングしたところ TDmol-4-glc に変換された。さらに、側鎖置換基の影響を検証するために、TDmol の C-8 位にケト基を持つ TCC および TCC の C-4 位ブテノイル化体である TCN を各菌体にフィーディングしたところ TCC-4-glucoside (TCC-4-glc) に変換された。いずれの実験においてもブテノイル化体は脱ブテノイル化体に比べて糖抱合を受けるまでの時間が遅く、C-8 位ケト基の存在は C-4 位ブテノイル基ほど糖抱合反応を遅らせることはなかった。これより、d-type トリコテセンをフィーディングした場合、*Tri101p* による C-3 位アセチル化による自己耐性が獲得できない t-type トリコテセン生産 *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。



3. *Tri101* 遺伝子破壊 *Fusarium* 属菌への t-type トリコテセンのフィーディング

d-type トリコテセンをフィーディングされたトリコテセン生産 *Fusarium* 属菌は *Tri101p* による C-3 位アセチル化トリコテセン耐性を獲得できない状況では、新たな自己耐性として C-4 位糖抱合活性を示すことが示された。これにより、自己耐性遺伝子 *Tri101* を破壊することでこれまで明かされてこなかった *Fusarium* 属菌による t-type トリコテセンの糖抱合が生じる可能性が考えられた。そこで、FGD5 株および FGD5 株の *Tri101* 遺伝子を破壊した FGD5/101 株に C-3 位、C-4 位ともに水酸基を有する t-type トリコテセンの HT-2 toxin

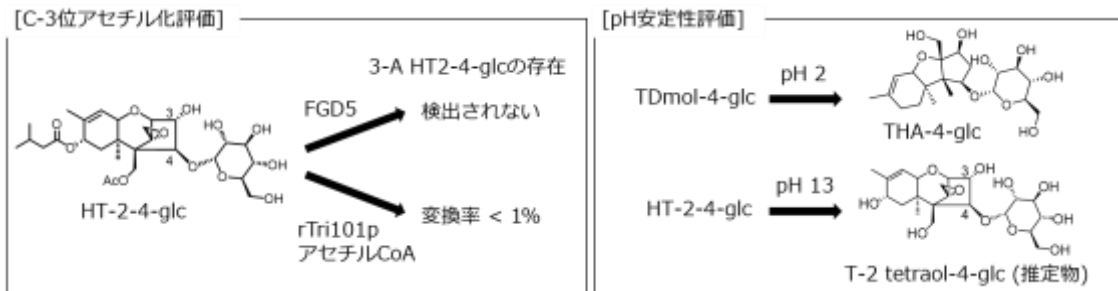
(HT-2) をフィーディングした。FGD5 株は HT-2 を 3-acetyl HT-2 (3-A HT-2) および T-2 toxin に変換した。一方、FGD5/101 株は HT-2 を HT-2-4-glucoside (HT-2-4-glc) に変換した。これにより、トリコテセン生産 *Fusarium* 属菌は自己耐性遺伝子 *Tri101* が機能しない場合には C-4 位を選択的に糖抱合することが明らかとなった。また、本研究で得られた TDmol-4-glc、TCC-4-glc、HT-2-4-glc の C-4 位糖抱合体は 20 μ M でも出芽酵母や動物細胞の成長阻害を示さず、TDmol、TCC、HT-2 よりも大幅に毒性が低減していた。このことから、t-type トリコテセン生産 *Fusarium* 属菌による C-4 位糖抱合活性は自己耐性酵素 Tri101p の代わりとなる第二の自己防御機構であると予想された。



4. C-4 位糖抱合体のアセチル化および pH 安定性

HT-2-4-glc の C-3 位アセチル化を評価するために FGD5 株にフィーディングしたところ、3-acetyl HT-2-4-glc (3-A HT-2-4-glc) への変換は認められなかった。また、大量の精製 Tri101p とアセチル CoA を用いて反応させても、極微量の 3-A HT-2-4-glc 候補物質が LC-MS/MS で検出されるに過ぎなかった。これらの結果から、C-3 位アセチル化と C-4 位グルコシド化は実質的に同時にはほとんど生じないことが結論付けられた。

C-4 位糖抱合体の pH 安定性を pH 2-13 の範囲で 1 pH ずつ変更し解析した結果、TDmol-4-glc は pH 2-4 の範囲でトリコテセン骨格をアポトリコテセン骨格に変形した trihydroxyapotriconothecene-4-glucoside (THA-4-glc) に変換した。しかし、TCC-4-glc はアポトリコテセン骨格に変形しなかったことから、C-8 位ケト基の存在がアポトリコテセン骨格への変形において障壁となっていると考えられる。また、pH 10-13 の範囲では HT-2-4-glc の C-8 位および C-15 位のエステル結合が加水分解され T-2 tetraol-4-glc 候補化合物が生じていた。しかし、どの pH においても C-4 位グルコシド結合は加水分解されず、化学的に安定であることが示唆された。



5. 遺伝子破壊および異種発現による C-4 位糖抱合遺伝子の探索

シロイヌナズナ由来の UDP-glucosyltransferase (UGT) 遺伝子 DOGT1 はトリコテセンの C-3 位を糖抱合すると報告されている。*Fg* PH-1 株のゲノム情報をもとに DOGT1 と類似性のある 16 個の *FgUGT* 候補遺伝子の単一破壊株を作製した。しかし、TDmol をフィーディングしたところ、TDmol-4-glc を生産しなくなる株は存在せず、複数の *FgUGT* 遺伝子が C-4 位糖抱合活性を担っていると考えられた。そこで、*FgUGT* 候補遺伝子を発現させた酵母に TDmol をフィーディングすることで C-4 位抱合酵素遺伝子の同定を試みたが、糖抱合活性を示す遺伝子は得られなかった。ポジティブコントロール遺伝子として DOGT1 を酵母に導入したが、強く発現したにもかかわらず糖抱合活性は示さなかった。今後は、組換え酵素を調整し、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必要がある。