

氏名(本籍)	深谷 宣 仁 (東京都)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	甲第71号
学位授与の番号	学位規則第3条第1項該当
学位論文の要件	<i>Fusarium sporotrichioides</i> T-2 トキシン産生株に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 田 淵 清 (副査) 教授 古 泉 巖 教授 藤 谷 英 男 助教授 木 内 明 男

論文内容の要旨

Trichothecene系マイコトキシンは、*Fusarium* 属を初め、*Baccharis*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Trichothecium* および *Trichoderma* 属等の植物病原真菌によって産出される有毒二次代謝産物であり、世界各国の麦・米・トウモロコシなど多くの穀類を汚染して深刻な問題となっている。Trichothecene は1949年に trichothesisin 抗真菌性物質として最初に発見され、次いで1961年に Brian らが *Fusarium equiseti* から diacetoxyscirpenol を植物に対する毒性物質として単離して以来、その産生菌と代謝産物が世界各地で分離・同定され、現在では約200種に及ぶ化合物が確認されている。これらの trichothecene の多くは、食品や飼料の自然汚染、たとえばアメリカでのかびトウモロコシ中毒症や旧ソ連での食餌性無白血球症 (alimentary toxic aleukia, ATA)、また、日本での赤かび中毒症等の関連事例から単離されてきた。Trichothecene は、人畜に対し悪心・嘔吐・下痢・皮膚粘膜刺激性の他、白血球減少症や再生不良性貧血などの症状を引き起こす。また、病理学的には細胞増殖の盛んな臓器である腸管上皮・骨髄・脾臓・精巣・卵巣などの増殖性組織に対して、細胞破壊および核破壊を引き起こす。これらの毒性発現は真核細胞における DNA や蛋白質の生合成阻害によるもので、特に蛋白質の生合成阻害はリボソームとの強い親和性に依存し、この作用は trichothecene 骨格の活性中心とされる 12, 13-epoxytrichothecene 環が重要な役割を果たすものと考えられている。

Trichothecene は化学的には酸素原子を含む sesquiterpene であり、その生合成経路に関しては多くの研究がなされている。酢酸から生じるメバロン酸を前駆体としイソプレネル則に従って生合成されるが、その過程に酸素添加反応やメチル基および水素の転移反応が含まれることが様々な中間体の同定より明らかになった。今日まで trichothecene 生合成に関与する酵素としては、Hohn らにより *F. sporotrichioides* から分離された trichodiene synthase のみである。今なお、trichothecene 系マイコトキシンによる人および家畜への汚染は確実に存在する。この現状において、trichothecene の中でも最も強い細胞毒性を示す T-2 トキシンの生合成とその調節に関連する蛋白質の究明は極めて重要であると考え本研究に着手した。

本論文では、T-2 トキシンの高い産生能を有する *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 株を用いたアスバラギン添加実験を発端とし、二次元電気泳動法を導入することによって *F. sporotrichioides* M-1-1

株の菌体蛋白質を分離して数種の蛋白質についてアミノ酸配列分析し、*Fusarium* 属菌で初めての菌体蛋白質の存在およびそのN-末端アミノ酸部分配列を明らかにした。また、この結果から trichothecene synthase に続く新たな trichothecene 生合成過程に関連すると推察された数種の蛋白質について、いくつかの興味ある結果を得たのでその概要について報告する。

1. アスパラギン添加による *F. sporotrichioides* (M-1-1 株と R2301 株) の trichothecene 産生性の変動

F. sporotrichioides M-1-1 株および R2301 株を用いて、アスパラギンの3濃度 (0.01%, 0.03%, 0.05%) における T-2 トキシシン (T-2), diacetoxyscirpenol (DAS) および neosolaniol (NS) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) の産生効果を観察した。

M-1-1 における T-2, DAS, NS のアスパラギン添加による産生性の上昇は、trichothecene 産生がアスパラギン添加濃度に比例して上昇した ($P < 0.05$)。一方、R2301 株では、アスパラギン添加による trichothecene 産生性の上昇は若干見られたものの、アスパラギンの添加濃度による trichothecene 産生性の大きな差異は見られなかった。

2. アスパラギン添加による *F. sporotrichioides* M-1-1 株の菌体発育と菌体蛋白質量の変動

アスパラギン添加 (0.05%) による M-1-1 株の菌体発育と菌体蛋白質量の影響を、培養 2 日目から 7 日目まで経時的に測定した。

菌体重量はアスパラギンを添加した翌日 (培養 3 日目) から増加傾向を示し、4 日目にわずかに増加したあと急速に減少傾向を示したが、7 日間培養では菌体重量の増加を示した。 ($P < 0.05$)。

菌体蛋白質量はアスパラギンの添加・無添加にかかわらず測定開始の培養 2 日目から 7 日目まで一様に減少傾向を示したが、総体的にはアスパラギン添加培養菌体の蛋白質量は無添加と比べ上回っていた ($P < 0.05$)。

3. *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質の電気泳動と N-末端アミノ酸配列分析

trichothecene 産生性の高い *F. sporotrichioides* M-1-1 株を選び、菌体蛋白質の解析を電気泳動により行った。二次元電気泳動によっておよそ 1,244 スポットの *Fusarium* 蛋白質が検出された。そのうち、25 種類の *Fusarium* 蛋白質について N-末端アミノ酸配列分析を行った結果、13 種類の *Fusarium* 蛋白質を明らかにした。

スポット 7 と 13 および 21 の N-末端アミノ酸部分配列は、それぞれ *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) の malate dehydrogenase, *Trichoderma koningii* の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase および *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) の triose-phosphate isomerase のアミノ酸配列にいずれも 100% 一致した。スポット 1 は *Emericella nidulans* のリボソーム S16 蛋白質に 83.3% の相同性を示した。スポット 23 は *S. cerevisiae* の phosphopyruvate hydratase に 72.7% の相同性を示した。スポット 3 と 9 は *S. pombe* の alcohol dehydrogenase と *Neurospora crassa* (*N. crassa*) の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase にそれぞれ 66.7% の相同性を示した。スポット 12 は、スポット 9 と同じシークエンスを示すが、スポット 9 より等電点が 0.6 ほど酸性側にあった。スポット 2 は *Chlamydomonas reinhardtii* のリボソーム S12 蛋白質の 60% の相同性を示した。スポット 5 は *Coccidioides immitis* の serine proteinase に 58.3% の相同性を示した。スポット 14 は mitochondrion *Mytilus edulis* の NADH dehydrogenase chain 5 に 55.6% の相同性を示した。スポット 19 は *Hyoscyamus*

niger の hyoscyamine (6 β)-dioxxygenase に46.7%の相同性を示した。スポット6は *Arachis hypogaea* の arachin 25K protein に若干(36.8%)の相同性を示した。

12個のスポット(4, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25)蛋白質はそのN-末端がブロックされていた。

4. *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質におけるN-末端ブロックアミノ酸の無水ヒドラジン分解およびアミノ酸配列分析

F. sporotrichioides M-1-1 株の菌体蛋白質におけるN-末端アミノ酸配列分析の結果、そのN-末端がブロックされていた12スポット(4, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25)について、各N-末端の無水ヒドラジン分解を行った。無水ヒドラジン分解の施された全ての蛋白質は、バルスリキッド型シーケンサーによって再びアミノ酸配列分析を試みた。その結果、スポット4, 8, 10, 11, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25, の11種蛋白質におけるN-末端のブロックは除去されなかったが、スポット15はN-末端から15残基まで解読した。そのアミノ酸配列は QTVSXMRLXXXVXDN/であった。このアミノ酸配列に対して、PIR 蛋白質のデータベースによる相同性検索を実施したが、これらの情報からは検索はできなかった。

5. アスパラギン添加における2種蛋白質の変動

F. sporotrichioides M-1-1 株菌体蛋白質の二次元電気泳動において、アスパラギン添加により明らかに変動を認めた2つの蛋白質スポットのうち、等電点7.0, 19.7kDaの蛋白質は、peptidyl-prolylcis-trans isomerase (PPIase)であることがわかった。変動を認めた第2の蛋白質スポット、等電点6.2, 42.6kDaの蛋白質は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDase)であることがわかった。

アスパラギンの添加により変動を認めたPPIaseは、更に、o-phthaldialdehyde (OPA) 反応処理によるアミノ酸配列分析によって、41ステップまでのアミノ酸配列が明らかになった。

また、M-1-1株の菌糸体から抽出した細胞抽出上清を用い、プロリンペプチド結合のcis-trans異性化に触媒作用をおよぼす能力についてPPIaseの酵素活性を測定した。キモトリプシン添加後、0分、1分、2分、3分目に経時的に分光光度計にて360nmの波長で測定したところ、1分目から活性を示し最終測定である3分目までその活性は持続した。また、その活性は、アスパラギンを添加した3日間および4日間培養において高い活性を示した($P < 0.05$)。

アスパラギン添加における2種蛋白質の変動は、アスパラギン無添加の培養2日目から4日目(以下control-2, 3, 4と略す)とアスパラギンを添加した培養3日目から4日目(以下N-3, 4と略す)までの二次元電気泳動ゲル上での変動を、Molecular Dynamics社のレーザーキャナを用いてPDQUEST™ softwareにより解析し、そのOD値を基に分析を試みた。OD値は、できるだけ誤差を少なくするために、比較しあう2つのゲル中でアスパラギンの添加によって誘導されない5つのinternal standard(内部標準蛋白質)を決め、それらの増減の相対値の平均から増減の相対値を算出した。

PPIaseの変動は、control-2からcontrol-3における増減の相対値は0.31で僅かに減少傾向を示したもののほとんど変化は見られなかった。Control-2からN-3における相対値は1.17で増加傾向を示した。N-3からN-4における相対値が0.41で僅かに減少傾向を示したがほとんど変化は見られなかった。また、

control-3 と N-3 では3.15でN-3はcontrol-3に比べ増加傾向を示した。Control-4 と N-4 では3.49でN-4はcontrol-4に比べ増加傾向を示した。

GPDaseの変動は、control-2からcontrol-3における増減の相対値は52.67で増加傾向を示した。Control-2からN-3における相対値は57.25で、増加傾向を示した。N-3からN-4における相対値は0.83で僅かに減少傾向を示したがほとんど変化は見られなかった。また、control-3とN-3では0.92でN-3はcontrol-3と比べ、僅かに減少傾向を示したがほとんど変化は見られなかった。Control-4からN-4では15.00でN-4はcontrol-4に比べ増加傾向を示した。

本研究は、T-2トキシンの高い産生能を有する *Fusarium sporotrichioides* M-1-1株を用いたアスパラギン添加実験を発端とし、二次元電気泳動法を導入して行われた。前述の実験結果より、M-1-1株培養におけるアスパラギンの添加は菌体蛋白質の合成を亢進して菌体発育の活性化を促進し、trichothecene生合成に関連する酵素あるいは蛋白質の誘導による trichothecenes (T-2, DAS, NS) 産生の上昇へと一貫した関連性を引き起こしている。

F. sporotrichioides M-1-1株菌体蛋白質における初の二次元電気泳動法の導入から、およそ1,244種の *F. sporotrichioides* M-1-1株細胞質蛋白質の存在が証明された。また、25種類の *Fusarium* 蛋白質についてアミノ酸配列分析を行った結果、*Fusarium* 属菌にとって初めての報告になる細胞質蛋白質13種類が確認され、それぞれのN-末端アミノ酸部分配列を決定することができた。その中でも、*Hyoscyamus niger* の hyoscyamine (6 β)-dioxygenase (H 6 H)と46.7%の相同性を示した *Fusarium* 蛋白質は trichothecene 骨格の活性中心とされる12,13-epoxy trichothecene 環の形成初期反応における epoxide 体形成前段階の水酸化反応に関連している可能性を提示している。

また、アスパラギンの添加により明らかに上昇の認められた2つの蛋白質の1つが、*F. sporotrichioides* では初めての報告となる、2種類の peptidyl-prolyl cis-transisomerase a (PPIase a) (等電点7.0, 19.7kDa) および peptidyl-prolyl cis-transisomerase a (PPIase b) (等電点6.4, 19.7kDa)であることを明らかにし、PPIase aはマイナータイプのものであることがわかった。そして、M-1-1株におけるN-末端から41残基までのアミノ酸配列は *Fusarium* 属における PPIase のアミノ酸部分配列としても初めての報告であり、*Fusarium* 属菌における PPIase の存在から、菌体発育における生命活動の支配は cyclosporin A との化学的相互作用の介在によって調節されている可能性が期待された。上昇を認めた2つの蛋白質は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDase) であることが *Fusarium* 属で初めて明らかにされ、M-1-1株におけるN-末端から24残基までアミノ酸配列も *Fusarium* 属における GPDase のアミノ酸部分配列として初めての報告であった。これら、アスパラギン添加における PPIase と GPDase の上昇は、菌体産生量の増加およびT-2トキシンの産生性の上昇と一貫した関連性が伺われ、GPDase が trichothecene 生合成の発端であるメバロン酸の合成過程における開始原料の増加誘発に関連している可能性からも、ここに trichothecene 生合成に関与する蛋白質として、新たに3種類 (H 6 H, PPIase, GPDase) の存在が確認された。これらの所見は、T-2トキシンの生合成のメカニズムを研究する上で有効な手がかりになるばかりでなく、今後、T-2トキシンの産生に関与する酵素系の発現を支配する遺伝子群の特定とその存在様式を明らかにする上で大変有用であり、T-2トキシンの産

生を支配する遺伝子群が特定できれば、他の多くの有毒真菌株についても類似手法での解析が可能となり、家畜・家禽におけるマイコトキシン中毒症の診断・予防対策に役立つことであろう。

論文審査の結果の要旨

テルペノイド族トリコテセン系マイコトキシンは植物寄生性の *Fusarium* 属並びに類縁の *Trichothecium* 属、*Trichoderma* 属などによって産生される二次代謝産物であって、酢酸からメバロン酸経路により生成される12,13-epoxytrichothecene系化合物とされ、現在約200種類が知られている。このうちT-2トキシンは最も強い細胞毒性を示し、特に造血器障害性を顕すことから免疫不全症との関連が注目されている。

マイコトキシン産生菌種とされているものにも無毒株と有毒株があり、マイコトキシンの生合成とその調節機構については不明な点が多い。

著者はT-2トキシンの産生の機序究明を目的とする基礎的研究を企図した。すなわち、*Fusarium sporotrichioides* T-2トキシンの産生株はアスパラギン添加培養でトリコテセン産生を増進することに着目し、菌体から二次元電気泳動法により分離した蛋白質について分析し、*Fusarium* 属菌体蛋白質の存在とそのN-末端アミノ酸部分配列を明らかにした。本論文の概要は次のとおりである。

1. アスパラギン添加による *Fusarium sporotrichioides* (M-1-1株とR2301株)のトリコテセン産生性の変動

Fusarium sporotrichioides のM-1-1株(有毒株)とR2301株(変異減毒株)を用いてアスパラギン添加培養におけるT-2トキシ(T-2)、diacetoxyscirpenol (DAS) および neosolaniol (NS) の産生効果を検討した結果、M-1-1株はアスパラギン添加濃度によりT-2、DASおよびNSの産生が上昇したが、R2301株ではアスパラギン添加による効果を認めなかった。

2. アスパラギン添加による *F. sporotrichioides* M-1-1株菌体発育と菌体蛋白質量の変動

アスパラギン添加(0.05%)によるM-1-1株の菌体発育および菌体蛋白質の量的経時的に検討した結果、菌体重量は培養3~4日でアスパラギン添加効果を認めた。菌体蛋白質重量はアスパラギン添加群で相対的に多い傾向にあったが、アスパラギン添加に関係なく培養経時的に減少した。

3. *F. sporotrichioides* M-1-1株菌体蛋白質の電気泳動とN-末端アミノ酸配列分析

F. sporotrichioides M-1-1株のアスパラギン添加培養菌体の蛋白質は二次元電気泳動により1,244スポットとして検出された。

このうち、25スポットの蛋白質についてN-末端アミノ酸配列を分析した結果、13種類の *Fusarium* 蛋白質を明かとなり、特にスポット19(hyoscyamine(6 β)-hydroxylase: H6H)はトリコテセンの活性中心である12,13-epoxytrichothecene環の生成初期反応に関連するものと推定された。

他の12スポット蛋白質はそのN-末端がブロックされていた。

4. *F. sporotrichioides* M-1-1株菌体蛋白質におけるN-末端ブロックアミノ酸の無水ヒドラジン分解およびアミノ酸配列分析

N-末端がブロックされていた12種類の蛋白質について無水ヒドラジン分解ならびにN-末端アミノ酸配列分析の結果、スポット15の蛋白質はpyrrolidone carboxylic acid基によるブロックであり、N-末端

から15残基まで解読した。他の11種蛋白質はアセチル基によるアシル化を受けていた。

5. アスパラギン添加における2種蛋白質の変動

F. sporotrichioides M-1-1株菌体蛋白質の二次元電気泳動において、アスパラギン添加により明らかに増加した2つの蛋白質スポット(9と13)のうち、スポット9(等電点7.0, 19.7kDa)の蛋白質は o-phthaldialdehyde 反応処理によるアミノ酸配列分析にて41ステップまでアミノ酸配列が解読され、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase-)と同定された。

スポット13(等電点6.2, 42.6kDa)の蛋白質はN-末端から24残基のアミノ酸配列が解読され、PIR蛋白質データベースにて glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDase)と同定された。

アスパラギン添加における PPIase の酵素活性は培養3日目および4日に最も高い活性を示し、菌体発育重量およびT-2トキシシン産生性の上昇と強い関連性が窺われ、GPDaseがトリコテセン合成の発端であるメバロン酸の合成過程における開始原料の増加誘発に関連している可能性が示唆された。

著者は本研究によって、T-2トキシシン産生性 *Fusarium sporotrichioides* の菌体蛋白質のN-末端アミノ酸配列などを分析し、トリコテセン合成過程に関連すると推定される3種の蛋白質の存在を明らかにした。本研究結果はトリコテセン系マイコトキシシン産生性に関する基礎的新知見として重要であり、かつ今後の研究に有用であると判断される。

本研究の成果は、病原微生物学なかつく真菌の生化学に貢献するところ大であり、博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしい業績であると評価する。