

学位申請論文

Fusarium sporotrichioides T-2 トキシン 産生株
に関する研究

[要 旨]

深 谷 宣 仁

1 9 9 5

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生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 ribosome 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ン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 株を用いたアスパ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 trichogiene 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) (μ g/ml) の産生効果を観察した。

M-1-1 株における 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 *Emmericella 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 と同じシーケンスを示すが、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 蛋白質に 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 *Mytilus edulis* のミトコンドリアの 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)-dioxygenase に 46.7% の相同性を示した。スポッ

ト 6 は *Arachins 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クエ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, 19.7 kDa の蛋白質は、peptidyl-prolyl cis-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, 42.6 kDa 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360 nm 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 社のレーザースキャナーを用いて 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 と 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 (H6H) 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-trans isomerase a (PPIase a)(等電点 7.0, 19.7 kDa) および peptidyl-prolyl cis-trans isomerase b (PPIase b)(等電点 6.4, 19.7 kDa) 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つ目の蛋白質は 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残基までのアミノ酸配列も *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(H6H, PPIase, GPDase)の存在が確認された。これらの知見は、T-2トキシン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。