

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 12 年度博士課程入学

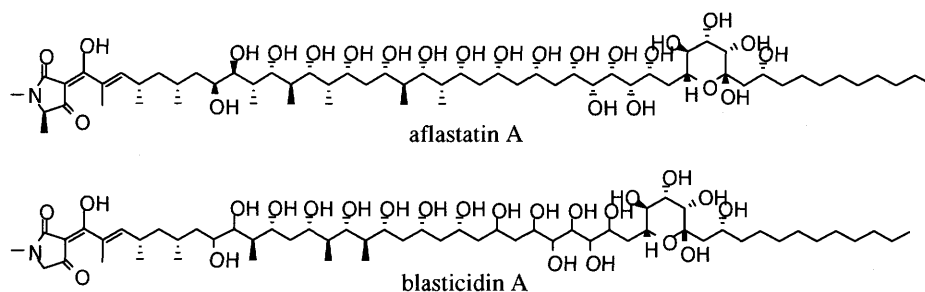
氏名 近藤 竜彦

指導教官名 長澤 寛道

## 論文題目

アフラトキシン生産阻害物質アフラスタチン A、ブラストサイジン A の作用機作の解析

アフラトキシン類は、*Aspergillus flavus* や *Aspergillus parasiticus* などが生産するカビ毒で、天然有機化合物中でもっとも強い発ガン性を有する。現在、熱帯、亜熱帯地域における農作物のアフラトキシン汚染は大きな経済的、人的被害をもたらす世界的な問題となっている。しかしアフラトキシン汚染に対する防除法は確立されておらず、早急な防除法の開発が求められている。放線菌が生産するアフラスタチン A (AsA) およびブラストサイジン A (BcA) は *A. parasiticus* の生育をほとんど阻害することなく、そのアフラトキシン生産を特異的に阻害する。したがってこれらの化合物は耐性菌の蔓延しにくい有用な汚染防除剤として応用が期待される。これらの化合物の作用点の解析は、現在不明であるアフラトキシン生産調節機構の解明への手がかりを与え、さらにより効果的なアフラトキシン汚染防除剤の開発につながる。本研究では、AsA および BcA の作用機構の解明を目的として以下の実験を行った。



### (1) アフラトキシン生合成遺伝子の転写に対する影響

これまでに AsA は、アフラトキシン生合成経路のごく初期の中間体である norsolorinic acid の生産を 0.25  $\mu\text{g/ml}$  の低濃度で阻害することが知られ、AsA は norsolorinic acid より上流の生合成過程に作用していることが示唆されていた。アフラトキシンの生合成に関してはこれまで多くの研究が行われ、その生合成遺伝子は約 75 kbp の大きなクラスターを形成してお

り、そのクラスター内にコードされた DNA 結合タンパク質 AfIR の働きにより生合成酵素をコードする遺伝子群の転写が活性化されることが明らかになっている。

そこで、AsA がアフラトキシン生合成酵素をコードする遺伝子 (*pksA*, *ver-1*, *omtA*) とその調節遺伝子 (*aflR*) の転写に与える影響について RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、添加した AsA の濃度に依存してすべての遺伝子の転写が抑制されていることが明らかになった。さらに *aflR* に関しては、TaqMan PCR 法を用いて mRNA の定量を行い、RT-PCR 法による解析結果を確認した。また、BcA を添加した際にもこれらの遺伝子の転写は抑制されていた。AsA および BcA がアフラトキシン生合成という二次代謝を開始するためのマスタースイッチである *aflR* 遺伝子の転写を抑制していることから、これら化合物の作用点はこれまでほとんど知見の得られていない *aflR* 遺伝子発現よりも上流のアフラトキシン生産調節機構であることが示唆された。

## (2) アフラトキシン生産菌の炭素代謝に与える影響

これまでに *aflR* 遺伝子の転写を制御する機構に関する分子レベルでの知見はほとんど得られていないが、アフラトキシンの生産は炭素源、窒素源などの栄養要因、温度、pH などの環境要因によって制御を受けていることが報告されている。中でも炭素源の重要性が知られていることから、一次代謝系での炭素代謝と AsA の作用の関係に着目し実験を行った。まず、炭素源としてグルコースだけを含むグルコース無機塩 (GMS) 培地で *A. parasiticus* を培養したところ、AsA は *A. parasiticus* に対し致命的に作用した。この結果は AsA の作用が炭素代謝に関連していることを示唆していた。そこで AsA が *A. parasiticus* のグルコース消費とエタノール生産に与える影響を調べた。AsA の添加により菌の生育阻害が認められないポテトデキストロース培地で AsA 存在下 (1.0 µg/ml) および非存在下で *A. parasiticus* を培養し、培養上清サンプル中のグルコースとエタノールの濃度をそれぞれ TLC、酵素を用いた定量法によって調べた。その結果、AsA 非添加区ではアフラトキシン生産が活発な培養 2 日目を除いて培養上清中にはほとんどエタノールが蓄積されなかったのに対し、添加区では培養 6 日目まで培養上清中のエタノールの濃度は上昇し、7 日目から急激にその濃度が低下した。また、添加区では菌体のグルコース消費が活発になっており、エタノール濃度が低下する 7 日目にはほぼ完全に消費されていた。このグルコースとエタノールについての代謝変化は BcA を添加した場合にも同様に認められた。

このエタノールの蓄積という現象の原因を調べるために、エタノールの代謝に関連する遺伝子の転写に対する AsA の影響を調べた。*A. parasiticus* のエタノール代謝系遺伝子の配列は未知であったため、まず、*Aspergillus nidulans* の *aldA* (aldehyde dehydrogenase) および *facA* (acetyl CoA synthetase) 遺伝子の塩基配列をもとにプライマーを作製し、*A. parasiticus* 由来遺伝子におけるそれぞれの PCR 増幅断片の塩基配列を解析した。得られた断片は、*A. nidulans* の対応する塩基配列といずれも 80%前後の相同性を有していたことから、それぞれ *A.*

*parasiticus* の *aldA*、*facA* であると判断した。そこで、これらのプライマーを用いて AsA 存在下、非存在下における *aldA*、*facA* 遺伝子の転写について RT-PCR 法により解析した。その結果、AsA の添加によって *aldA*、*facA* の転写が抑制されることが明らかになった。

以上の結果は、AsA あるいは BcA はアフラトキシン生産菌の一次代謝系の炭素代謝に大きな影響を与え、その結果としてアフラトキシンの生産を抑制することを示唆した。

### (3) アフラトキシン生産菌のビオチン酵素に対する BcA の影響

BcA と相互作用するタンパク質を探索するため、BcA のヘミアセタール部分にスペーサーを導入し、光反応性のアリルアジド基とビオチンが結合した BcA の誘導体を調製した。この誘導体を菌体抽出液とインキュベートし、BcA と特異的に相互作用するタンパク質を、ビオチン残基を HRP-avidin を用いたウェスタンブロッティングで検出する実験の過程で、内在性のビオチン酵素に関する次のような現象を見いだした。

アフラトキシン生産非誘導性のペプトン無機塩 (PMS) 培地からアフラトキシン生産誘導培地である GMS 培地へ置換培養する際に、培地に BcA を添加し、菌体抽出液中のビオチン化酵素のビオチン化の様子を HRP-avidin を用いたウェスタンブロッティングによって経時的に観察した。その結果、BcA の添加により、培地を置換してから 12 時間以上経過するとビオチン酵素に対応する 2 本の主要なバンドが消失することがわかった。生体内で発現量の多いビオチン酵素は、一次代謝に関連するピルビン酸と二酸化炭素からオキサロ酢酸を合成する反応を触媒し、クエン酸回路に C4 化合物を供給する役割を果たすピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) と、アセチル CoA と二酸化炭素からマロニル CoA を生成する反応を触媒するアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) が知られる。マロニル CoA は脂肪酸だけでなく、ポリケタイド化合物の前駆体でもある。よって ACC はアフラトキシン生産の前駆体供給の面で重要な役割を担っていると考えられることから、ビオチン酵素の代謝系と BcA の作用との関連が示唆された。前述のように、BcA は GMS 寒天培地上では *A. parasiticus* に対し致死的に作用するが、GMS 寒天培地に脂肪酸を添加した培地ではこの致死性が消失した。出芽酵母のビオチントランスポーター欠損株は脂肪酸要求性となるという報告があり、この結果も BcA の作用とビオチン酵素の代謝系との関連性を示唆するものであった。

カビは一般にビオチンを自ら合成できることが知られており、また GMS 培地にビオチンを添加しても BcA の致死性が消失しなかったことから、これらの現象の原因がビオチン合成やビオチン輸送の阻害などにより菌体内でビオチンが欠乏したためである可能性は低い。ビオチン酵素の代謝系の 1 つの酵素には、ビオチンをビオチン酵素に結合する酵素であるビオチン-アポプロテインリガーゼ (BPL) があり、BcA の作用点として BPL の阻害が考えられた。そこで BPL の活性を検出する系を確立し、BPL 活性に BcA が与える影響を調べることにした。まず、配列が明らかになっている出芽酵母の PC のうちビオチン化される残基を含む C 末端側約 100 残基のペプチドを大腸菌で大量発現して精製し BPL の基質を得た。A.

*parasiticus* の菌体抽出液に基質とビオチン、さらに結合反応に必要な ATP を加えてインキュベートした。アセトン沈殿により基質を回収し、SDS-PAGE で展開後 HRP-avidin を用いたウェスタンブロッティングを行った結果、菌体抽出液中の BPL により基質がビオチン化されることが確認された。そこで、BcA 存在下で同様の実験を行ったところ、5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で基質のビオチン化が阻害されることがわかった。

BcA を培地に添加することによって培養上清にエタノールが蓄積されるという現象と、一次代謝におけるビオチン酵素の役割とを関連づけて考えると、BcA の作用と菌体の応答について次のようなモデルが考えられる (図)。BcA 存在下では BPL の働きが阻害されることによってビオチン酵素の活性が低下し、脂肪酸合成能力が低下すると同時に、TCA サイクルを活発に回転させるためのコンポーネントが不足している。その結果、グルコースから解糖によって生じたピルビン酸をアセチル CoA を経てクエン酸回路により好氣的に代謝することも、脂肪酸やアフラトキシンの合成に利用することもできず、還元反応を経てエタノールに代謝しているというものである。

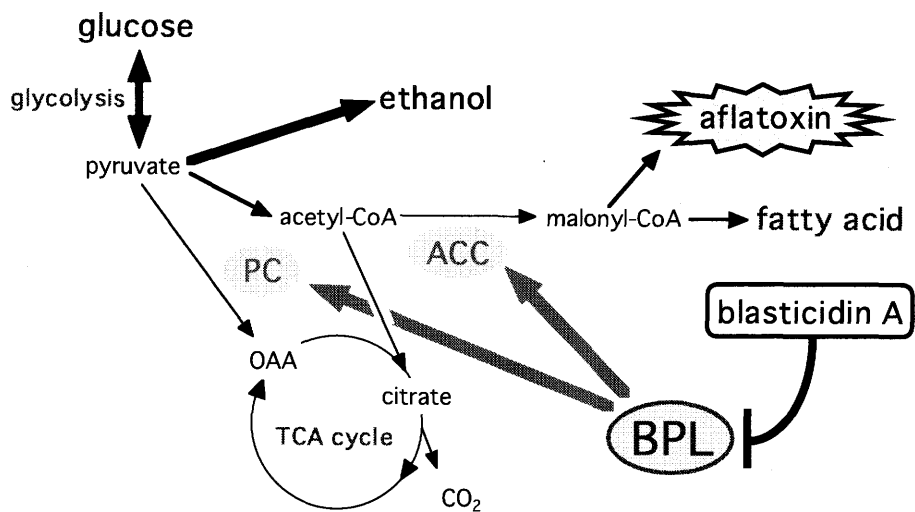


図 BcA の炭素代謝とビオチン酵素、ビオチン-アポプロテインリガーゼ (BPL) 系に対する作用モデル