

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 近藤 竜彦

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が、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可能性がある。本研究は、AsA および BcA の作用機構の解明を目的として行われたもので、序論とそれに続く 4 章からなる。

まず、序論では、上記の背景を述べたあと、第 1 章では、AsA のアフラトキシン生合成遺伝子の転写に対する影響を調べている。アフラトキシン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 (*afIR*) の転写に与える影響を解析した結果、添加した AsA の濃度に依存してこれらすべての遺伝子の転写が抑制されていることを明らかにした。このことから、AsA の作用点は *afIR* 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。

第 2 章では、アフラトキシン生産菌の炭素代謝に与える影響を調べている。これまでに *afIR* 遺伝子の転写は栄養要因や環境要因によって制御されていることがわかっており、ここでは特に炭素源に注目して実験を行った。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) 培地で培養したところ、AsA は *A. parasiticus* に対し致命的に作用したことから、AsA の作用が炭素代謝に関連していることを示唆した。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ところ、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。この現象は BcA を添加した場合にも認められた。そこで、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。*aldA* (aldehyde dehydrogenase) および *facA* (acetyl CoA synthetase) 遺伝子をクローニングし、その転写レベルへの影響を調べたところ、AsA によって共に抑制されることが明らかになった。このことから、AsA および 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が示唆された。

第 3 章では、アフラトキシン生産菌のビオチン酵素に対する BcA の影響を調べている。BcA と相互作用するタンパク質を探索する過程で、BcA を添加後 12 時間以上経過するとビオチン酵素であるピルビ

ン酸カルボキシラーゼ (PC) とアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) の2本の主要なバンドが消失することがわかった。カビは一般にビオチンを自ら合成でき、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、これらビオチン酵素にビオチンを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) に影響していることが推定された。そこで、BcA 存在下でビオチン化基質に対して *A. parasiticus* の菌体抽出液、ビオチン、ATP を加えてインキュベートしたところ、5 µg/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。

第4章では、BPL のクローニング、およびその大腸菌を用いた大量発現について述べている。これは、BcA が BPL に直接作用することを示すためのものであるが、明確な結果を得るまでには至っていない。

以上、本論文はカビの二次代謝産物であるアフラトキシンを対象にして、その生合成を特異的に阻害するアフラスタチンおよびブラストサイジンの阻害機構をさまざまな角度から検討したもので、学術的、応用的貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。