

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 吉成 知也

アフラトキシン類は、*Aspergillus flavus* や *A. parasiticus* などが生産する天然有機化合物中で最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世界的な問題となっており、早急な防除法の開発が求められている。放線菌が産生する diocatin A(DotA)及び blasticidin 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抑制する。従ってこれらの化合物は耐性菌の蔓延しにくい実用的な汚染防除剤としての応用が期待される。本研究は、DotA 及び BcA の作用機構の解析を行い、現在不明であるアフラトキシン生産調節機構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寄与することを目的にしたものである。

序論で背景を述べた後、第1章では、DotA が *A. parasiticus* に対してアフラトキシン生産抑制活性を示すことを見出したことを述べている。DotA は、アフラトキシン生合成経路の中間体である norsolorinic acid の生産も阻害したことから、それより上流の生合成過程に作用することが示された。定量 PCR 法により調べた結果、DotA はアフラトキシン生合成酵素 PKSA、OMTA、VER-1 及び転写調節因子 AFLR をコードする遺伝子の転写を抑制したことから、DotA はアフラトキシン生合成酵素を阻害するのではなく、その生産調節機構に作用することが示された。また、*Saccharomyces cerevisiae* に対しては最少培地で生育抑制活性を示した。これらの結果から DotA は真菌の一次代謝、二次代謝及び分化に対し多面的な効果を示す化合物であることが明らかとなった。

第2章では、DotA のフォトアフィニティープローブを調製し、これを用いて DotA の標的分子を探索したが、DotA の作用と関連すると考えられるタンパク質を同定することは出来なかった。一方、酵母に対する生育抑制活性を指標とし、cDNA 発現ライブラリーを用いた DotA 耐性株の取得を試みた結果、*cup9*、*rad13*、*pho2* が DotA 耐性遺伝子として得られた。しかし、解析の結果、いずれも DotA の取り込みの抑制による耐性であると推定された。

第3章では、BcA の作用機構解析を行っている。BcA は酵母に対して生育抑制作用を示すことから、ゲノムライブラリーを用いたマルチコピーサプレッサーの取得実験を行ったところ、多剤耐性のトランスポーターである *ylr046c* が BcA 耐性遺伝子として

得られたことから、直接の作用とは関係ないと考えられた。次に、cDNA 発現ライブラリーを用いて耐性株のスクリーニングを行った結果、新たに *bmh1/2* 及び *cmk2* が BcA の生育抑制作用に対するマルチコピーサプレッサーとして得られた。解析の結果、両者ともにリン酸化タンパク質に関与する可能性が考えられた。次に、BcA による酵母菌体内のタンパク質のリン酸化レベルや発現量の変化を網羅的に解析するために、2D-DIGE による解析を試みている。その結果、BcA 処理によって4種のリボソーム構成タンパク質の発現量の減少が見られ、またイニシエーションファクター、リリースファクター、リボソーム結合シャペロンの各タンパク質についてリン酸化によると予想される等電点のシフトが観察された。このことから、BcA はリボソームに影響を与え、タンパク質翻訳を阻害することが予想された。事実、BcA はタンパク質合成阻害活性を有することが明らかになったが、既知のタンパク質合成阻害剤とは異なる様式で阻害していると推定された。

第4章では、BcA 及び DotA が *A. flavus* の菌体内タンパク質に与える影響を2D-DIGEにより解析した。DotA、BcA、blasticidin S (BcS)を添加し、菌体内のタンパク質を比較した結果、いずれの薬剤添加サンプルにおいてもコントロールに比べ、アフラトキシン合成酵素の発現量の減少が確認された。DotA 添加によってカタラーゼおよびグルタチンレダクターゼが減少していた。両者は酸化ストレスに応答するタンパク質であることから、DotA は酸化ストレス応答に関与する転写因子等の活性を調節する機構に作用する可能性が考えられた。また、DotA 添加サンプルにおいて、アシル CoA シンターゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ATP-クエン酸リアーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼなどの TCA サイクルに関与するタンパク質量の減少が見られた。これは DotA により酸化ストレス応答タンパク質が減少した結果、過酸化物を生産する電子伝達系の活性が低下したためであると考えられた。

以上、本論文は酵母に対する生育抑制およびアフラトキシン生産菌に対するアフラトキシン生産抑制の機構の一端を解明したもので、学術上、応用上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。