

始めにアフラトキシン生合成に関与する酵素のひとつ VHA reductase の単離、精製を試みた。VHA、VOAc、VOH、VHOH はアフラトキシン生合成経路の途中で metabolic grid を形成している(図1)が、VHA と VOAc の間及び VHOH と VOH の間の変換はいずれもアフラトキシン生合成条件下で誘導される VHA reductase が触媒していると推測されている。本研究ではアフラトキシン誘導培地で培養した *A. parasiticus* の細胞質画分からアフラトキシン生合成に関与する2つの VHA reductase の精製を行い、それらの諸性質について検討した。

VHA から VOAc への変換を触媒する酵素は、DEAE 陰イオン交換カラムで分離される VHA reductase I 及び VHA reductase II の2種類が存在した。いずれの非変性タンパク質の分子量も 390kDa で、およそ 10 個程度のモノマーから形成されるホモオリゴマーとして機能していた。基質の2つの光学異性体に対する光学特異性も同じであった。これらのことから2つの VHA reductase はアイソザイムであると推定した。VHA reductase 活性はアフラトキシン生産菌をアフラトキシン誘導条件下で培養した時発現誘導され、活性が 40 倍に上昇した。アフラトキシン生合成は培地中の炭素源などの誘導条件によって発現が制御されており、VHA reductase もそのシステムに則って発現制御される酵素であると考えられた。

アフラトキシン生合成制御についてさらに調べるため、醸造菌 *A. sojae* と比較しながらそのメカニズムを検討した。まず *A. sojae* 10 株を選定し、それらを形態的・生理的特徴から再分類を試みた。分生子の大きさ、色、表面の形状について *A. parasiticus* と比較して、いずれも *A. sojae* であることを確認した。さらにブレオマイシン感受性の違いも確認した。アフラトキシン生産性を調べるためアフラトキシン生合成誘導培地 (YES 培地) および醤油麴におけるアフラトキシン生産を調べたところ、

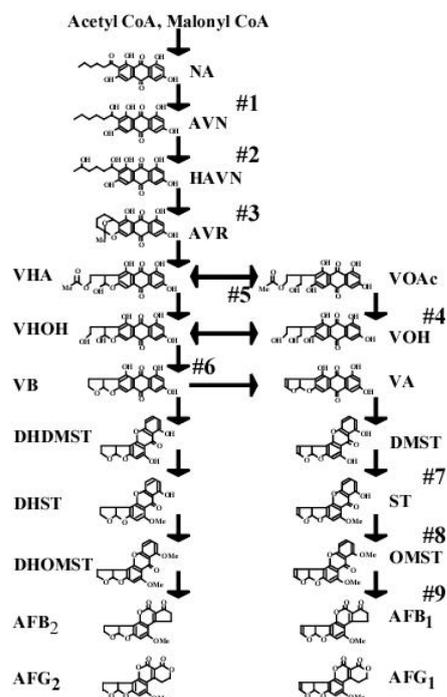


図1. Biosynthetic pathway of Aflatoxins in *Asparagillus parasiticus*. NA, norsolorinic acid; AVN, averantin; HAVN, 5'-hydroxyaverantin; AVR, averufin; VHA, versiconal hemiacetal acetate; VHOH, versiconal; VOAc, versiconol acetate; VOH, versiconol; VA, versicolorin A; VB, versicolorin B; DMST, demethylsterigmatocystin; ST, sterigmatocystin; OMST, O-methylsterigmatocystin; DHD MST, dihydrodemethylsterigmatocystin; DHST, dihydrosterigmatocystin; DHOMST, dihydro O-methylsterigmatocystin; AFB1;G1; B2 ; G2, aflatoxin B1;G1; B2; G2

A.parasiticus に分類されるアフラトキシン生産菌は YES 培地および醤油麴においてアフラトキシンを生産したのに対し、*A.sojae* に属する菌を培養してもアフラトキシンは検出されなかった。以上のように選択された *A.sojae* 菌株は分類学的に *A.parasiticus* とは別種であるとともに、これらはアフラトキシンを生産しないことを確認した。

次に *A. sojae* のアフラトキシン生合成停止がアフラトキシン生合成経路を触媒する個々の酵素の不活性化によるものかどうかを調べるため、各段階の酵素活性を測定した。試験には醤油麴菌として当社保存菌株である *A. sojae* strain477 を、アフラトキシン生合成菌として NRRL2999 の変異株 NIAH-26 を使用した。YES 培地で培養した NIAH-26 の無細胞抽出物はアフラトキシン生合成の全てのステップの酵素活性を示したのに対し、strain477 の無細胞抽出物からは上記の酵素活性は認められなかった。唯一 VOAc esterase 活性が認められたが、これは構成的な活性と考えられ、アフラトキシン生合成に特異的な esterase の発現は *A. parasiticus* を YES 培地で培養した時に限られていた。以上のようにアフラトキシン生合成誘導条件下においても生合成に必要な酵素群は *A. sojae* では発現していないことが分かった。

次にノーザン解析で転写レベルの遺伝子発現が行われているかどうかを調べた。プローブには Acetyl-CoA から NA を合成する途中の polyketide synthase をコードする *pksA*、NA から AVN を生産する reductase をコードする *nor-1*、アフラトキシン生合成の調節因子をコードする遺伝子 *afIR* を用いた。YES 培地で培養した NIAH-26 では *pksA*、*nor-1* はいずれも転写されていたが、strain477 ではこれらアフラトキシン生合成に関係する遺伝子の転写産物は検出されなかった。また同様に種々の醤油麴由来の *A. sojae* の *afIR* の転写発現を調べたところ、いずれも *afIR* は検出されなかった。このことから *A. sojae* ではアフラトキシン誘導条件下において生合成を促進する機能になんらかの欠損があり、そのために遺伝子の転写が行われず、アフラトキシン生合成酵素が生産されないと考えられた。また調べた全ての醤油麴由来の *A. sojae* の *afIR* の転写産物が検出されなかったことから、これらの菌株においてもアフラトキシン生合成関連遺伝子はすべて発現が停止していることが示唆された。

afIR はアフラトキシクラスター中の遺伝子にコードされた Zinc Finger タンパク質で、GAL4 タイプ因子の転写因子であり、アフラトキシン生合成遺伝子の上流域の結合領域に結合してアフラトキシン生合成を正方向に調節する。*A.sojae* の *afIR* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、ふたつの変

異があることがわかった(図2)。ひとつは 111-114 残基目に渡るヒスチジンとアラニンの重複(HAHAモチーフ)で、もう一つが 385 残基目のアルギニンが停止コドンになったプレターミネーションである。そのために *A. sojae* の *aflR* 遺伝子の翻訳産物(AflRas)は *A. parasiticus* のもの(AflRap)に較べてカルボキシル末端の 62 アミノ酸を失っている。この変異は *A. sojae* 特異的なもので、全ての *A. sojae* の *aflR* で存在するのに対し、*A. oryzae* や他の *Flavi* 節の種ではみられなかった。本研究ではこの *A. sojae* 特異的な変異を持つ AflR に着目し、その機能について検討した。酵母中において *GAL1::lacZ* 遺伝子の発現システムを利用して、AflR タンパク質の転写活性化部位の GAL4 転写活性を測定した結果、AflRas は AflRap に比べて転写活性が 15% にまで低下していることがわかった。また *in vivo* での AflRas の機能を検証するため、アフラトキシン生産菌に *aflR* 遺伝子を導入しその影響を調べた結果、AflRap を過剰発現するとアフラトキシン合成が促進されるのに対し、AflRas を過剰に発現してもアフラトキシン合成に影響はなかった。すなわち *A. sojae* においては転写因子 AflR がその特異的な変異のために、機能を失っており、そのためにアフラトキシン生合成経路は機能しないと思われる。

A.

		acg cct cat get cat acc cag gcc cac act cat get --- --- cat tct cat cag caa cag cat cca	
<i>A. parasiticus</i>	101	T P H A H T Q A H T H A - - H S H P Q P H P	120
<i>A. sojae</i>	101	T P H A H T Q A H T H A H A H S H P Q P H P	122
		acg cct cat get cat acc cag gcc cac act cat get <u>cat get</u> cat tct cat cag caa cag cat cca	

B.

		cga gtg gcg gca cag ctt gtt ctg agt gaa ctg cac cga gtg cag tgg ctg gcg aac cta	
<i>A. parasiticus</i>	371	R V A A Q L V L S E L H R V Q S L A N L	390
<i>A. sojae</i>	373	R V A A Q L V L S E L H *	384
		cga gtg gcg gca cag ctt gtt ctg agt gaa ctg cac <u>tga</u> gtg cag tgg ctg gcg aac cta	

図2. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the *aflR* genes of *A. parasiticus* and *A. sojae*.

A. The *aflR* gene of *A. sojae* contains a duplication of six nucleotides (underlined), forming a duplicated HA at His113 and Ala114.

B. The transition in the codon of Arg385 (double-underlined) results in the pre-termination of AflR; the truncated protein lacks 62 amino acids, including the transcription-activating domain, at the carboxy-terminal end.

今後は麹菌の二次代謝について、特にさらに上流域の制御について明らかになることが期待される。*Aspergillus* 属菌において様々の菌種、菌株においてゲノム解析が終了しており、それらの比較ゲノム研究、メタボロミクス研究が進行することによって麹菌の二次代謝生産の誘導、シグナル伝達系についてのメカニズムが明らかとなることが期待される。