

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 26 年度博士課程進学

氏名 古川智宏

指導教員名 高山誠司

論文題目

マイコトキシン生産阻害物質の作用機構に関する研究

序論

マイコトキシンとは農作物に感染したカビの生産する有毒二次代謝産物の総称であり、毎年世界で生産される農作物の約 25%が何らかのマイコトキシンに汚染されていると推定されている。中でも、*Fusarium graminearum* の生産するトリコテセン系マイコトキシンの一種、デオキシニバレノール (DON) による小麦等の汚染と、*Aspergillus* 属の生産するアフラトキシンによるナッツ類及び穀類の汚染は広範囲にわたり、深刻な経済的被害および人類や家畜への健康リスクをもたらしている。現在では、DON 汚染防除のため防カビ剤の施用が行われているが、過剰な施用による耐性菌の蔓延が懸念される。一方のアフラトキシン汚染防除では、圃場においてアフラトキシン生産菌に対し有効な防カビ剤は見出されておらず、実用的な防除法の開発が求められている。

そこで、より効果的な防除策として、これらマイコトキシン生産を特異的に抑制する物質の利用が期待される。特異的なマイコトキシン生産阻害物質は、実用的な汚染防除剤として有効だけでなく、それらの作用機構を明らかにすることは、未解明な部分の多いマイコトキシン生産の分子機構を理解する手がかりとなる。そこで、本研究ではマイコトキシン汚染に対する有効な防除策の確立に寄与することを最終目的として、DON 生産阻害物質である precocene II と、アフラトキシン生産阻害物質である dioctatin およびシリリング酸アルキルの作用機構を解明し、マイコトキシン生産阻害に至る経路の解析を行った。

第一章 DON 生産阻害物質 precocene II の作用機構

precocene II の作用機構を解明するに当たり、まず *F. graminearum* における precocene II の結合タンパク質の同定を行った。precocene II の構造活性相関の情報をもとに precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを調製した。precocene II の活性に関するこれまでの報告から precocene II の作用部位はミトコンドリアに存在することが示唆されたため、*F. graminearum* のプロトプラスより分離したミトコンドリアの抽出タンパク質を対象に、固定化ビーズを用いて precocene II 結合タンパク質の精製を行った。精製での各画分を SDS-PAGE で分析したところ、ビーズに結合したタンパク質を precocene II を含む溶液により溶出した画分に、抽出タンパク質に前もって precocene II を加え競合阻害を行った場合には見られないバンドが確認された。バンドのタンパク質を解析した結果、ミトコンドリア外膜のチャンネルタンパク質 voltage-dependent anion channel (VDAC) が同定された。組換え VDAC は precocene II 固定化ナノ磁気ビーズに選択的に結合し、precocene II と VDAC の相互作用が確かめられた。

VDAC はミトコンドリアで発生するスーパーオキシドの細胞質基質への放出に関与している。そこで、precocene II と VDAC、DON 生産阻害の関係を明らかにするため、スーパーオキシドに着目した。スーパーオキシドの発生試薬である paraquat が DON 生産を抑制した一方、抗酸化物質である α -tocopherol は DON 生産を増加させ、precocene II による DON 生産阻害を覆した。次に、スーパーオキシドの存在により特異的に酸化され蛍光を発する試薬を用いて菌体の観察を行ったところ、precocene II はミトコンドリア局在性の蛍光試薬の蛍光を増大させる一方、細胞質基質局在性の蛍光試薬の蛍光には影響を与えないことがわかった。precocene II の添加によって脂質の過酸化およびミトコンドリアタンパク質のカルボニル化が増加しており、precocene II による活性酸素の増加が裏付けられた。

スーパーオキシドと DON 生産の関連を更に調べるため、スーパーオキシド分解酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) のうち、ミトコンドリアへの局在が予想される MnSOD1 および MnSOD2 の遺伝子を破壊した変異株を split-marker approach により作製した。MnSOD1 破壊株および MnSOD2 破壊株は野生株と同等の生育を示したが、DON 生産量および DON 生産関連遺伝子の転写量が減少していることが確認された。更に、特に MnSOD2 破壊株において、ミトコンドリア局在性のスーパーオキシド検出試薬の蛍光が野生株に比べ大きく増加していることがわかり、スーパーオキシドの増加が DON 生産の減少に結びつくことが示された。以上から、DON 生産はミトコンドリアのスーパーオキシド量と関連があり、precocene II は VDAC に結合し、ミトコンドリア内のスーパーオキシドを増加させることで DON 生産の減少を引き起こすことがわかった。

第二章 アフラトキシン生産阻害物質 dioctatin の作用機構

dioctatin 固定化ナノ磁気ビーズを用いてアフラトキシン生産菌 *Aspergillus flavus* における dioctatin 結合タンパク質の同定を試みた。*A. flavus* から抽出したタンパク質と調製したビーズを混合後、ビーズに結合したタンパク質を dioctatin 溶液を用いて溶出したところ、抽出タンパク質と dioctatin を前以て混合した場合には見られないタンパク質のバンドが確認された。バンドに含まれるタンパク質を解析した結果、ミトコンドリアに局在する Clp protease の触媒サブユニット (ClpP) が同定された。ClpP の部分配列ペプチドを抗原とした抗 ClpP ペプチド抗体により、バンドのタンパク質が ClpP であることを確認した。また、大腸菌発現系により FLAG タグつきで調製した組換え ClpP も、dioctatin 固定化ナノ磁気ビーズに結合後 dioctatin により溶出され、ClpP と dioctatin の特異的結合が示された。ClpP の *A. flavus* における局在を確認するため、*A. flavus* の細胞小器官の粗分画を行い、各画分の抽出タンパク質を dioctatin 固定化ビーズに結合させたところ、ミトコンドリア画分抽出タンパク質のみに ClpP が検出され、ClpP のミトコンドリア局在性が示された。

セリンプロテアーゼである ClpP は7量体が2つ重なった14量体として存在し、プロテアーゼ活性部位は複合体の中心部に秘匿されており、ClpP 14量体の上下に存在する ClpX シャペロンが基質となるタンパク質のアンフォールディングを行うことではじめてタンパク質を分解することができる。そのため、タンパク質の分解には ClpP と ClpX の複合体が必要で、ClpP 単独では10残基程度の短いペプチドしか分解できない。ClpP の活性に対する dioctatin の影響を調べるため、まず組換え ClpP のオリゴペプチド分解活性を調べたところ、dioctatin は組換え ClpP のオリゴペプチド分解活性には大きな影響を与えなかった。次に、 β -カゼインを基質として ClpP のタンパク質分解活性を調べたところ、dioctatin なしでは β -カゼインの分解はほとんど見られなかった一方で、dioctatin の添加により濃度依存的に β -カゼインの分解が強く促進されることがわかった。

A. flavus のミトコンドリアから抽出したタンパク質と組換え ClpP を混合し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析によって dioctatin 添加により分解が促進されるタンパク質を探索した結果、ミトコンドリア呼吸鎖複合体のサブユニットおよびクエン酸回路を構成する酵素が複数同定された。すなわち、これらのタンパク質は dioctatin の結合した ClpP により無秩序に分解されることが示唆された。

以上より、dioctatin が ClpP に結合することで引き起こされるミトコンドリア内のタンパク質の過剰な分解がシグナルとなり、アフラトキシン生産のスイッチが入らずアフラトキシン生産が抑制されることが考えられた。

第三章 シリング酸アルキルおよび類縁化合物のアフラトキシン生産阻害活性

アフラトキシン生産阻害活性を有するシリング酸アルキルの類縁化合物である没食子酸アルキルは、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II 阻害活性を示すことが知られる。一方で、筆者らのグループは呼吸鎖複合体の阻害剤にはアフラトキシン生産阻害活性を有するものが存在することを見出していた。そこで、シリング酸アルキルの複合体 II 阻害活性と、没食子酸アルキルおよびアルキルパラベンのアフラトキシン生産阻害活性を調べた。その結果、シリング酸アルキルの複合体 II 阻害活性はアルキル鎖が長くなるほど強くなり、それはアフラトキシン生産阻害活性と平行であること、またアルキルパラベンおよび没食子酸アルキルも同様のアフラトキシン生産阻害活性を持つことが示された。没食子酸アルキル類には食品添加物として広く利用される化合物が含まれ、それらのアフラトキシン生産制御剤としての実用化が期待できる。

総合討論

本研究では、DON 生産阻害物質 precocene II およびアフラトキシン生産阻害物質 dioctatin の作用機構について解析を行い、更に産業応用上有用と考えられるシリング酸アルキル類縁化合物のアフラトキシン生産阻害活性を見出した。precocene II はミトコンドリア外膜のチャネルタンパク質に結合し、スーパーオキシドの増加を引き起こし DON 生産を抑制することを示した。dioctatin は ClpP に結合しミトコンドリア内で異常なタンパク質分解を引き起こすことでアフラトキシン生産を抑制すると考えられた。更に、シリング酸アルキルおよび類縁化合物の呼吸鎖複合体 II の阻害活性とアフラトキシン生産阻害活性の相関を示した。本研究で解明されたマイコトキシン生産阻害剤の新規作用点は、新たな汚染防除法を開発する上で有用な情報となることが期待される。今後、ミトコンドリアの機能とマイコトキシン生産の関連を解析することで、マイコトキシン生産の調節機構の更なる理解に繋がると考えられる。

発表論文

Furukawa T, Sakamoto N, Suzuki M, Kimura M, Nagasawa H, Sakuda S (2015) Precocene II, a Trichothecene Production Inhibitor, Binds to Voltage-Dependent Anion Channel and Increases the Superoxide Level in Mitochondria of *Fusarium graminearum*. *PLOS ONE* **10**(8): e0135031.

Furukawa T, Iimura K, Kimura T, Yamamoto T, Sakuda S (2016) Inhibitory Activities of Alkyl Syringates and Related Compounds on Aflatoxin Production. *Toxins* **8**(6): 177.