

研究ノート

アフラトキシンB₁とアフラトキシコールの変換反応に関与する肝臓酵素後藤 真生, 東 照雄*, 矢部 希見子[§]

食品総合研究所, 茨城県つくば市観音台2-1-12

*水産総合研究センター中央水産研究所, 栃木県日光市中宮祠2482-3

[§] コレスポンディングオーサーLiver enzymes for interconversion of aflatoxin B₁ and aflatoxicolMasao Goto, Teruo Azuma*, and Kimiko Yabe[§]

National Food Research Institute, 2-1-12 Kan-nondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642,

*National Research Institute of Fisheries Science, 2482-3 Chugushi, Nikko, Tochigi 321-16.

[§] Corresponding author, Kimiko Yabe

Abstract

Enzyme activities of aflatoxin B₁ (AFB₁) reductase catalyzing the reaction from AFB₁ to aflatoxicol (AFL) and AFL dehydrogenase catalyzing the reaction from AFL to AFB₁ were investigated using cell-free systems from livers of rat *Rattus norvegicus*, horse mackerel *Trachurus japonicus*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. The rat liver showed slight AFB₁ reductase activity, whereas the latter two fish livers showed remarkable activities. No significant differences in the enzyme activities were observed between male and female of the rainbow trouts. Characterization of the two enzyme activities suggested that they were different enzymes in the cells, which were exclusively involved in the different reactions, respectively.

アフラトキシン (AF) は主として *Aspergillus flavus* と *Aspergillus parasiticus* に属する一部のカビが生産する二次代謝産物であり, 極めて高い発がん性と毒性を有する¹⁾. カビが生産する種々のアフラトキシン誘導体の中で AFB₁ は最も発がん性が高く毒性も強い物質であるため, AFB₁ による発がん性機構はこれまで多く調べられてきた^{2,3)}. AFB₁ を摂取すると, 肝臓の多種のチトクローム P450 モノオキシゲナーゼによって AFM₁, AFQ₁, AFP₁ 等種々の誘導体に変換される (図 1). アフラトキシン B₁-8,9-エポキシドが生じると, これが DNA のグアニン塩基に結合し, 癌化や毒性発現につながる事が明らかとなっている.

肝臓には AFB₁ をアフラトキシコール (AFL) に変換する活性がある. さらに, AFL から AFB₁ が生成する活

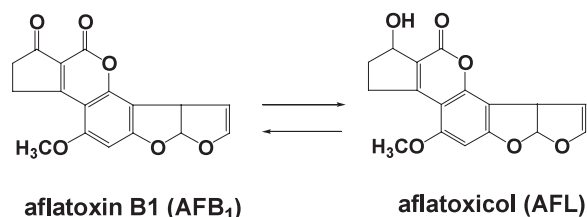


図 1 肝臓におけるアフラトキシンB₁とアフラトキシコールの反応

AFB₁は肝臓のcytosol酵素によってAFLに変換される。また、AFLがAFB₁に変換される活性もある。

性もあるため, AFLは細胞内でAFB₁ のリザーバーとして発がんに関与するという可能性が示唆されてきているが, その詳細は明らかになっていない⁴⁻⁶⁾. 一方,

2006年12月22日受付, 2007年1月29日受理

[§] 連絡先 (Corresponding author)

AFB₁ に対する発がん感受性は動物種によって大きく異なっており、ニジマスは高感受性生物として知られており発がん機構研究の実験生物として使われてきた。このようなAFB₁ に対する感受性の違いは、種における代謝酵素の違いによるものであることが示唆されている。

野菜や果物など種々の食品には発がん抑制作用等を示す機能性成分が含まれていることが知られている。これら機能性成分の効果を調べるためにも、肝臓における代謝機構を調べることは重要である⁷⁾。そこで、本研究では、ニジマス等の肝臓抽出液を用いて、AFB₁ reductase活性 (AFB₁ → AFL) とAFL dehydrogenase活性 (AFL → AFB₁) の性質を検討した。

実験方法

1. 肝臓からcell extract及びcytosolの調製

ラット肝臓は摘出後、-80℃で保存し、研究に用いた。アジとニジマス (活性比較用) は市販されている鮮魚から肝臓を摘出した。ニジマス、ラット、またはアジの肝臓を細断後、1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) を含む0.2M リン酸バッファー (pH 7.5) 中、ポッターホモジナイザーを用いてホモジナイズした。

一方、中央水産研究所日光庁舎にて継代飼育されたドナルドソンニジマス活魚 (♀: N=2, 尾叉長351±17mm, 体重526±91g; ♂: N=2, 尾叉長363±16mm, 体重576±115g; 平均±標準誤差) から以下の要領で摘出した肝臓を用いてcell extractとcytosolの大量調製を行った。75ppmベンゾカイン (benzocaine) 麻酔下で尾叉長、体重を測定後、開腹して、生殖腺より性判別を行い、肝臓を摘出しその重量を電子天秤で秤量した。摘出した肝臓は、液体窒素で凍結後 -80℃で保存し、研究時に解凍し、ポリトロンによる破碎の後、ポッターホモジナイザーを用いてホモジナイズした。その後、10,000 x g, 4℃, 20分間遠心してcell extractを調製し、グリセロール (最終濃度10% (v/v)) を添加し、使用時まで-80℃で保存した。さらに、150,000 x g, 4℃, 30分間遠心してcytosolを調製し、実験時まで-80℃で保存した。

タンパク質濃度はBradfordの方法 (Protein Assay Solution, Bio-Rad) で定量した。

2. 酵素活性測定法

(1) AFB₁ reductase活性

肝臓 cell extract (最終濃度15 mg/ml) を60 mM リン酸

カリウムバッファー (pH 7.5), 10%グリセロール, 2 mM NADPH, 46 μM AFB₁ (Sigma-Aldrich) に添加し (最終容量50 μl), 37℃で反応後, 反応産物を70 μl クロロホルムで抽出し, 抽出液をシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) または高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。TLCの展開溶媒は chloroform-ethyl acetate-90% formic acid (6:3:1, v/v/v) を用いた。HPLCにはシリカゲルカラム (0.46 by 15cm; Shim-pack CLC-SIL; Shimadzu), 溶出液 (toluene, ethyl acetate, formic acid (90%)), and methanol (178:15:4:3, v/v/vv) を用い, 蛍光測定 (excitation wavelength, 365nm; emission wavelength, 425nm; Shimadzu model RF-535) で検出した。

(2) AFL dehydrogenase活性

AFB₁の代わりに16 μM AFL (AFLI, Sigma-Aldrich) を添加し, NADPHの代わりにNADPを添加して (1) と同様に分析した。

3. 性質検討

(1) 温度及びpH依存性: AFB₁ reductase反応では, ニジマスcell-extract (0.62mg/ml) とTris-HClバッファー (pH9.0) を用いる以外は上述と同様の反応を20~70℃で行った。AFL dehydrogenase反応は, リン酸ナトリウムバッファー (pH6.5)を用いて同様に行った。pH依存性は, pH6~10のTris-HClバッファーを用いて, 同様に実験した。

(2) 精製条件の検討

ドナルドソンニジマスcytosolに種々の濃度の硫酸アンモニウムを添加して塩析後, 遠心し, 上清の酵素活性を測定し, 硫酸分画条件 (30-60%カット) を決定し

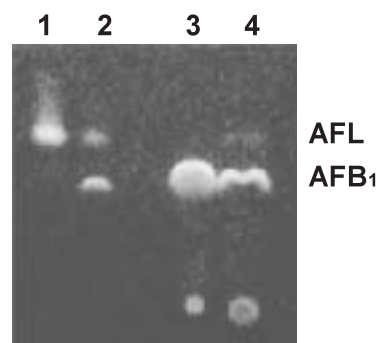


図2 ニジマスの肝臓cytosolによる酵素反応
NADPH存在下にアフラトキシンコロール (AFL) とドナルドソンニジマスの肝臓cytosolを反応させる (1, 反応前; 2, 反応後). NADP存在下にアフラトキシンB₁ (AFB₁) とcytosolを反応させた (3, 反応前; 4, 反応後).

た. Phenyl-Sepharose及びDEAE-Sepharoseを詰めた微小カラムによって, 活性の分画条件を検討した.

結果と考察

1. 種による活性の違い

ドナルドソンニジマス肝臓のcytosol画分にAFLをNADP存在下に添加し60分間反応させると, 顕著にAFB₁が生成した(図2). 同様に, 同画分にAFB₁をNADPH存在下に添加すると, AFLが生成した.

系統による違いを比較するため, 市販のニジマス肝臓のcell extract画分を用いて同様に両酵素活性を比較すると, AFB₁ reductase活性は, AFL dehydrogenase活性より低かったが, 顕著な活性が確認された(図3). また, 種による違いとして, 市販アジの肝臓cell extractはニジマスよりわずかに活性が低かったが, ニジマスと同様, 両酵素について有意な活性が検出された. ラットの肝臓から調製したcell extractの場合は, AFL dehydrogenase反応はニジマスと同様の高い活性が得られたが, AFB₁ reductase活性は極めて低かった.

したがって, AFL dehydrogenase活性は少なくとも3種の肝臓においては種の差は見られなかったが, AFB₁ reductase活性は動物種によって大きく異なることが示唆された. ラットはAFB₁に対して比較的抵抗性の生物であり, ニジマスは高感受性生物である. AFB₁をAFLに変換する酵素の活性と種によるAFB₁の感受性との関連する可能性が示唆された.

2. 両反応の性質検討

また市販ニジマスのcell extractを用いて, 酵素活性の25℃から75℃までの温度依存性を調べたところ, AFB₁ reductaseの反応では, 40℃前後の比較的狭い温度範囲で高い活性を示したが, 35度以下だと活性が低いことが明らかとなった. 一方, AFL dehydrogenase反応は45~55℃で最も高い活性を示したが, 35~60℃の広範囲でも比較的高い活性を示した. また, AFB₁ reductase活性についてpH依存性を調べると, pH6~7.5で高い活性を示したのに対して, AFL dehydrogenase反応はpH6~10の範囲でいずれも活性が検出され, アルカリ側に行くにつれ活性が高くなったことから, より高いpH側に至適条件があると予想された. 以上のように, 両酵素活性は性質が異なり, 異なる酵素によってそれぞれの活性が触媒されることが示唆された.

ドナルドソンニジマスの肝臓を用いて両酵素活性の雌雄の差を検討した. AFL dehydrogenase反応はpH9.0で

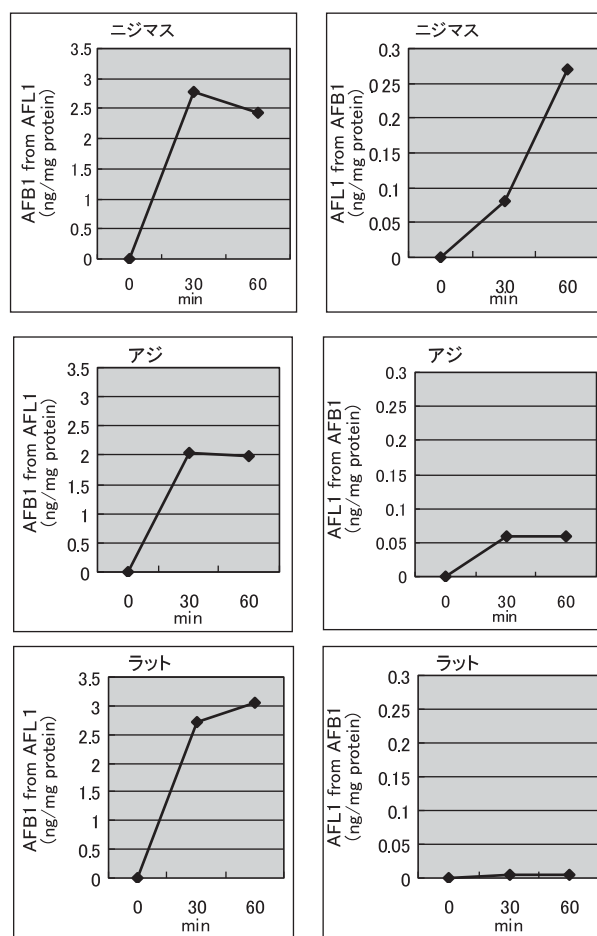


図3 ニジマス(市販), アジ(市販), ラットの肝臓cell extractの酵素活性(左: AFL dehydrogenase活性; 右: AFB₁ reductase活性), 縦軸はタンパク質量あたりの生産量.

行ない, AFB₁ reductase反応はpH6.5で行なった. その結果, 雌雄で両方の酵素活性について有意な差は認められなかった(図4).

3. 酵素の精製条件の検討

ドナルドソンニジマスの肝臓からcytosolを調整した. 酵素精製のための予備実験として, スモールスケールのカラムを利用し樹脂への結合条件を検討した. cytosolを脱塩後, DEAE Sepharose (GE Healthcare Bioscience) に流すと, 両方の酵素活性とも塩を含まない溶液条件でDEAEに結合することが明らかとなった. DEAE Sepharoseのスモールスケールカラムを用いて, 0~0.5MのKClのグラディエントで溶出すると, 約0.3M KClの条件でAFL dehydrogenase活性が溶出され, AFB₁ reductase活性は0.5MのKClで溶出した. 一方, Phenyl

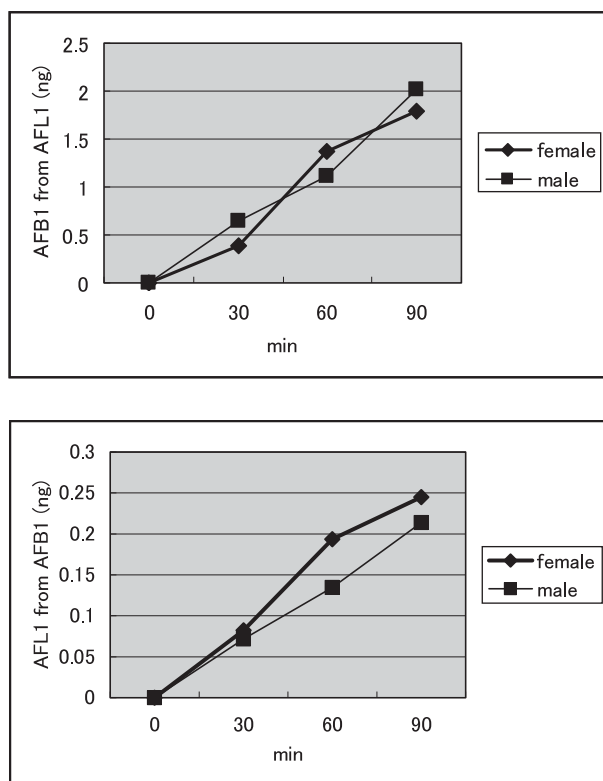


図4 ドナルドソンニジマス肝臓cytosol酵素活性の雌雄の比較

上段, AFL dehydrogenase活性; 下段, AFB₁ reductase活性

Sepharose (GE Healthcare Bioscience) を用いた際, AFL dehydrogenase活性は0.8~0Mの硫酸のグラディエントで溶出された。しかし, AFB₁ reductase活性は, 0.8M硫酸ではカラムに保持されずフロースルー画分に認められた。以上, 二つの活性は異なる挙動を示すことから, 異なる酵素であることが示唆された。

これまでAFB₁ reductase活性とAFL dehydrogenase活性が同一酵素の可逆反応である可能性も示唆されていたが, 本研究によって細胞中には別々の酵素が存在することが示唆された。いずれも可溶性酵素であり, 市販魚の肝臓でも活性が検出できることから安定な酵素であると推察された。したがって比較的精製は容易であると予想され, 今後, 酵素精製を行っていく予定である。さらに, 発がん抑制機能を有する食品由来の機能性成分の作用機作を調べるため⁷⁾, 本研究で確立した酵素活性検出系の利用を検討していく予定である。

要 約

ニジマス, アジ, ラットの肝臓cytosolを用いて, ア

フラトキシシンB₁ (AFB₁) からアフラトキシコール (AFL) への変換及びその逆反応の酵素活性を調べた。AFL形成活性は魚類において顕著な活性が見られたが, ラットではほとんど活性が認められなかった。それに対してAF生産反応はいずれの種でも顕著な活性が認められ, 3種で大差はみられなかった。ニジマス肝臓の酵素活性には雌雄差は認められなかった。ニジマスの肝臓cytosolでは両酵素活性は異なるpH依存性や温度依存性を示し, さらに両酵素活性について部分精製を試みたところ, 精製過程で両活性は異なる挙動を示した。以上の結果から, これらの活性は異なる酵素によって触媒されることが示唆された。

謝 辞

ラット肝臓を御供与頂いた食品総合研究所八巻幸二博士 (現 (独) 国際農林水産業研究センター) に深謝いたします。

文 献

1. Payne, G. A., and M. P. Brown. 1998. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**:329-362.
2. Campbell, T.C., and J.R. Hayes. 1976. The role of aflatoxin metabolism in its toxic region. *Appl. Pharmacol.* **35**:199-222.
3. Eaton, D. L., and J. D. Groopman (Ed.). 1994. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, San Diego, Calif.
4. Robens J.F. and J.L. Richard. 1992. Aflatoxins in animal and human health. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, No. 127:69-94
5. Mclean M. and M.F. Dutton. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol Ther.* **65**:163-192.
6. Gallagher E.P., and D.L. Eaton. 1995. In vitro biotransformation of aflatoxin B₁ (AFB₁) in channel catfish liver. *Toxic. Appl. Pharmacol.* **132**:82-90.
7. Lee, S.-E., E.C. Campbell, R.J. Molyneux, S. Hasegawa, and H.-S. Lee. 2001. Inhibitory effects of naturally occurring compounds on aflatoxin B₁ biotransformation. *J. Agric. Food Chem.* **49**:5171-5177.