

### Ⅲ DNA マイクロアレイと酵母細胞を用いたかび毒の 毒性評価法及び DNA マイクロアレイを用いた かび類の網羅的検出法の開発

#### 1. はじめに

かび毒とはかび（糸状菌類）の産生する二次代謝産物で、ヒトあるいは家畜、魚類など高等動物に対して急性もしくは慢性の生理的あるいは病理的障害を与える物質群に与えられた総称である。

食品への混入率が高いかび毒はリスク管理措置の対象として国内外を問わず議論および調査されており、かび毒の毒性評価は、アフラトキシンなど特に急性毒性や発がん性の強いものを中心に、動物実験を通して行われている。現在行われている実験動物を用いた主な毒性影響試験としては、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖毒性試験、催奇形性試験などがある。さらに、変異原性試験ではサルモネラ等を用いた微生物試験が行われる事が多い。

単回投与毒性試験では、大量の実験動物を使うにも関わらず、得られるデータはLD<sub>50</sub>（投与された動物の50%が死亡する量）だけであるとして、動物愛護の観点から問題視され、今後この試験方法は縮小・廃止の方向へ向かわざるをえないと思われる。

かび毒の毒性に関しては、高濃度で摂取した場合の急性毒性はもとより、低濃度での長期曝露による慢性的な健康被害や胎児期に母体がかび毒に曝露された時の胎児への発生毒性や催奇形性などへの懸念が増大している。反復投与毒性試験、生殖毒性試験、催奇形性試験などでは、いずれも実験動物の長期間の飼育、観察が必要であり、生殖や催奇形性試験にいたっては、1個体に留まらない何世代にも渡った試験が必要であるため、経費及び飼育場所等の問題が大きい。さらに、かび毒は誘導体を含め、その種類は現在知られているだけで300種類を越え、その全てについて動物を使つての毒性評価を行うことは、不可能に近い。なぜなら、前述のように実験動物に関する福祉の概念が世界的にますます増大しており、その審査も厳密になっているからである。各国行政でも動物実験代替法の具体的な方策を打ち出しており、我が国でも2005年国立医薬品食品衛生研究所の中に日本動物代替法検証センターが設立されている。また、こうした動きを法律で明文化した動物愛護法が2005年に改正され、科学的利用に供する場合の方法の項に、いままであった苦痛の軽減のほかに、使用数の削減、および動物を用いない他の方法を用いることが記載されている。

そこで我々は、最小限の動物実験で最大限のかび毒の毒性評価を行うため、まず、真核微生物である酵母の遺伝子を用いて、大まかな毒性評価を実施出来る方

法を開発したので紹介したい。

また、DNA マイクロアレイは、特定の DNA を有している生物の網羅的検出にも有効であり、ここでは、食品中に含まれる有害なかびについて、検出する方法についても紹介する。

## 2. 食品中に含まれる主要なかび毒

かび毒の中でも最も有名かつ有害であるものとしては、アフラトキシン群が第一にあげられる。アフラトキシンとは、 $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$  を始めとする 10 数種の関連物質の総称であり、熱帯から亜熱帯地域にかけて *Aspergillus flavus* などのかびにより産生され、紫外線の照射により強い蛍光を発することが特徴的である。熱に強く、通常調理などに用いられる加熱状態では、分解されずに残留する割合が高い。アフラトキシンは、1960 年にイギリスで七面鳥が大量死した際の分析中に発見された。人に対する急性中毒の例としては、1974 年にインドで肝炎のために 106 名が死亡した事件やケニアでの急性中毒事件などがある。日本では検疫所の検査や自治体の衛生研究所などのモニタリング調査により厳重な監視が行われている<sup>1-3)</sup>。

また、ある種類の植物病原菌は作物に病気を起こすだけではなく、人や家畜に健康被害を及ぼすかび毒を産生する。麦類に赤かび病を起こす *Fusarium graminearum* はかび毒を産生する代表的な植物病原菌である。本病原菌の産生する毒素で最も有名なものはデオキシニバレノール (DON) とニバレノール (NIV) というトリコセセン系のかび毒である。図 1 に DON と NIV の構造式を示した。

DON には、アフラトキシンのような明確な発がん性は知られていないが、悪心、嘔吐、腹痛、めまい、下痢、頭痛等の諸症状を伴う中毒症を引き起こす急性毒性があることは昔からよく知られていた。現在問題になっているのは、こうした高濃度の汚染によるものだけではなく、より低濃度の汚染でも、長期間摂取していると成長抑制、体重低下や免疫力低下等ヒトの体に影響を及ぼすような長期毒性である。

このような背景から、FAO (国際連合食糧農業機関) と WHO (世界保健機関) によって設立されたコーデックス委員会では、国際的な政府間機関の間で DON

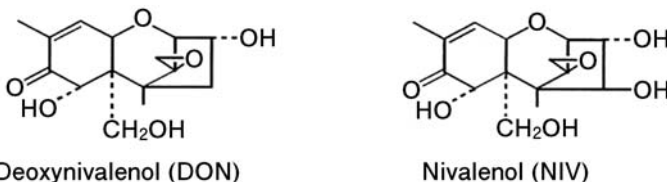


図 1 DON と NIV の構造式

の基準値策定について議論され、我が国でも厚生労働省が2002年にまずDONに関する暫定基準値を1.1 ppm（小麦原粒）に設定した。これにより、現場においては、基準値を越えた場合には自主的に出荷を停止することとなるため、生産者にとっては単なる減収以上の大きな経済的打撃を受けることになり、事態は深刻さを増している。本州、特に西日本ではNIVを産生する赤かび病菌も多く分布していると言われ、今後、NIVも規制に含めるべきかどうか議論されて行く事が予想される。なお、赤かび病に関係のあるかび毒にはDONやNIV以外にも、T-2トキシン等、トリコテセン系のかび毒が知られている。1931～47年、旧ソビエト連邦では、ほ場で越冬させた穀類により中毒事故が発生しており、T-2トキシンが原因と推定されている。我が国でも、T-2トキシンを含むトリコテセン類のかび毒の健康被害が1940～50年代に発生している<sup>4,5)</sup>。

ゼアラレノンも同様に麦類やトウモロコシに寄生した*Fusarium graminearum*などが産生する。作用機序としては、エストロジェンのアゴニストとして作用し、肝臓、消化管粘膜、赤血球あるいは消化管微生物によって代謝され、 $\alpha$ -ゼアラレノールおよび $\beta$ -ゼアラレノールとなり、それぞれはさらに代謝されて $\alpha$ および $\beta$ -ゼアララノールとなる。この代謝反応は動物種によって大きく異なる。家畜の中では豚の感受性が高いため、飼料に含まれることが許容されるゼアラレノンの最大値が1.0 ppmと暫定的に定められている（2002年、農水省畜産部飼料課長通知）。未成熟豚の外陰部の肥大、性成熟豚の発情間隔の延長、妊娠豚の死流産などが見られ、流産や卵巣周期と無関係な発情兆候などがみられることがあり、今後人への影響も含めて十分な監視が必要なかび毒である<sup>6,7)</sup>。

パツリンは、ペニシリウム属（アオカビ類）*Penicillium expansum*等によって作られるかび毒である。一般に腐敗したリンゴで見られ、リンゴ製品のパツリンの量は製品の品質の基準として用いられる<sup>8,9)</sup>。コーデックス委員会では、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （=0.050 mg/kg）の最大基準値が設定されるとともに、りんご果汁及びりんご果汁を原材料とする飲料のパツリン汚染防止及び削減のための行動規範が採択されている。これを受けて、わが国では、食品衛生法（食品、添加物等の規格基準）が平成15年11月26日に改正され、「りんご果汁（濃縮果汁含む）及び原料用りんご果汁」に「0.05 ppm」と基準値が設定された。図2にパツリンの構造式を示した。

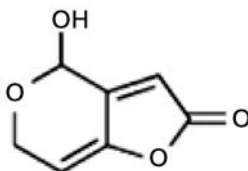


図2 パツリンの構造式

### 3. DNA マイクロアレイと酵母を用いたかび毒の毒性評価

20 世紀末に開発された DNA マイクロアレイ技術は、網羅的な遺伝子発現解析を可能にした。その結果、少数の遺伝子発現解析による微視的な視点の生物反応の研究から、ほぼすべての発現遺伝子の解析を通した、よりグローバルな視点での研究が可能になった。DNA マイクロアレイでは、目的遺伝子の増減をプローブとのハイブリダイゼーションの有無とその量で検出する。基本は調べたい遺伝子（群）と相補性のある配列の一部をスライドやメンブラン上にスポットし、それに対してサンプルの蛍光標識した mRNA (cDNA) をハイブリダイズさせ、シグナルの有無・増減を検出器で検出する方法である。蛍光標識の方法としては、解析したい研究材料や状態により、単色法と 2 色法のどちらかが選択される。単色法は、図 3 のように特定遺伝子の経時的発現量の変化などを解析する場合に有効な手段である。

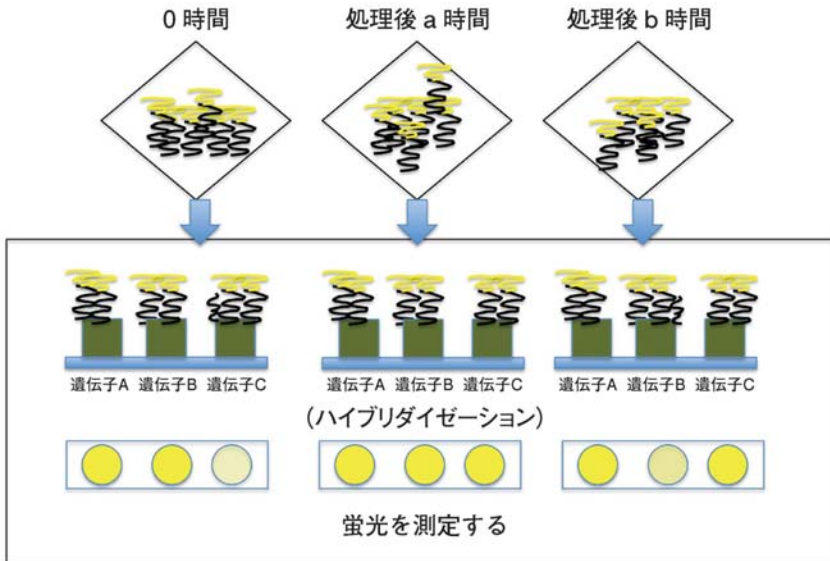


図 3 単色法による DNA マイクロアレイを用いた発現解析

この場合、遺伝子 A に対し、遺伝子 B では 0 時間から b 時間までにその発現量は減少し、遺伝子 C ではその逆に時間の経過とともに、発現量が増加しているのがわかる。

一方 2 色法 (図 4) では、解析したい遺伝子配列と相補な配列 (プローブ) をアレイ基盤上に配置し、そこへ別々の色素で蛍光標識したサンプルの mRNA

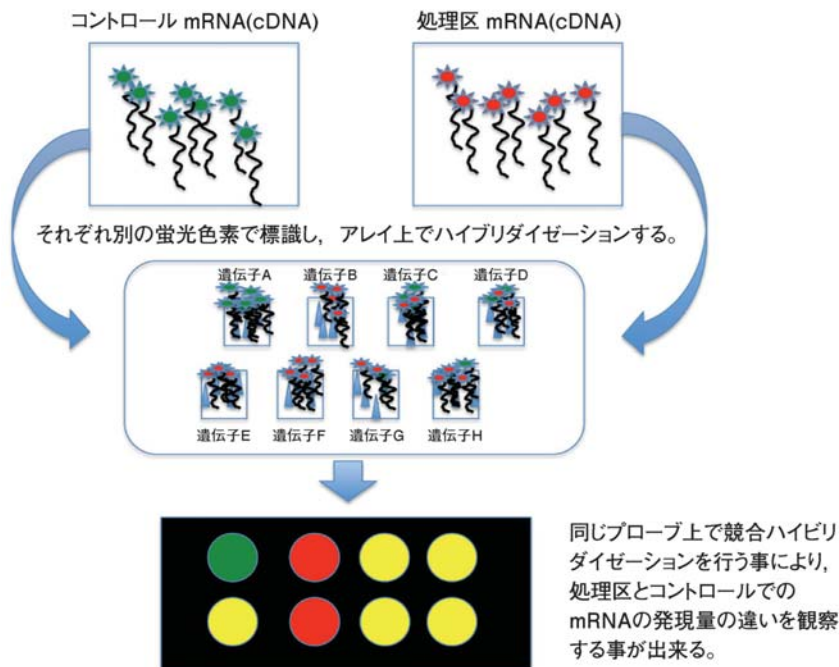


図 4 2色法による DNA マイクロアレイでの発現解析

(cDNA) とコントロールの mRNA (cDNA) をハイブリダイゼーションさせる。コントロールと比べて mRNA 発現量の変化が見られる遺伝子については、蛍光強度の増減と色調の変化の形で検出することが出来、遺伝子発現の量的変化とともに質的变化も同時に捕らえることが出来る。

また、DNA マイクロアレイの作成方法にも数種類の方法が有るが、紙面の都合上割愛させていただきたい。

当研究ユニットでは、かび毒に関する毒性試験を取り巻く背景から、動物試験の前段階での一次スクリーニングを視野に入れ、酵母細胞を用いた DNA マイクロアレイによるかび毒の毒性解明を試みてきた。パンや酒等、発酵を必要とされる食品に用いられる酵母細胞は、一般に増殖が早く（倍加速度 2 時間程度）広く自然界に分布している微生物である。さらに、酵母細胞は、単細胞ではあるが真核生物であり、生きる為のすべての機能を一つの細胞の中に有している。また、約 6,000 種ある遺伝子のすべての 1 次配列が明らかにされており、生物種の中では群を抜いてその遺伝子の機能情報が充実している。遺伝子の機能情報はかび毒の毒性を解析する上で重要であり、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解

析に非常に適した生物種であると考えている。さらに特筆すべきは、上記のように食品等に昔から使われており、その安全性が確立していることから、特段の注意なく使える点で優れている事である。

本研究では 6,037 種類の酵母遺伝子発現解析が可能な ORF (Open Reading Frame) 型 DNA マイクロアレイ (DNA chip research Inc., Yokokawa Japan) 及びオリゴプローブ型 DNA マイクロアレイ (3D-Gene Yeast OligoChip 6K, Toray Industries Inc., Tokyo Japan) を用いた。3D-Gene Yeast Oligo Chip 6K は黒い樹脂製の柱状構造の上端面にプローブを固定し、さらにこの柱状構造を利用して、柱間にビーズを転がすことにより、溶液中のターゲットとプローブ DNA の反応促進を行い、感度をあげる事を可能にしている方法である。

#### 4. 暴露量の決定と暴露方法

まず、DNA マイクロアレイでかび毒の毒性を解析する為には、酵母にかび毒を曝露しなければならない。暴露量の決定方法には様々な方法があるが、当研究ユニットでは、再現性のある mRNA の変化を捉える為には、その毒物により酵母細胞に明らかな障害が出る量が必要であると考えている。この明らかな障害が出るということにも、研究者によって様々な基準が用いられ、単一の基準が決め

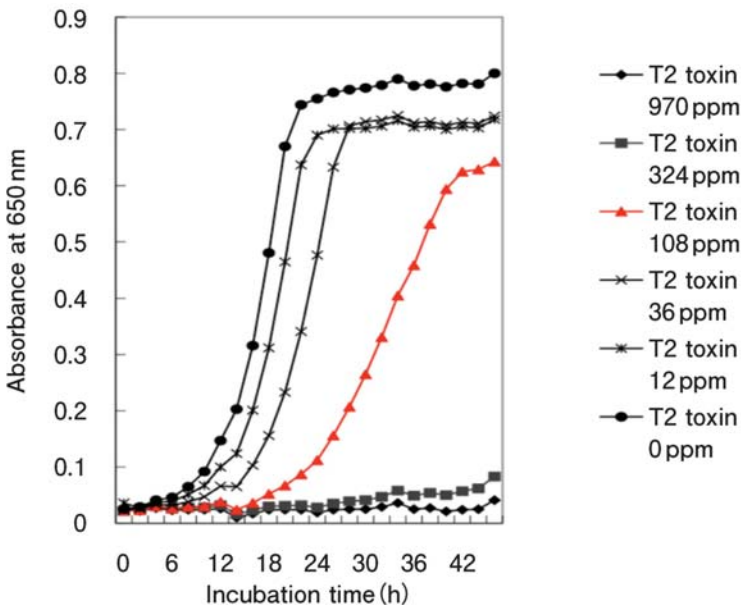


図 5 T-2 トキシン曝露時の増殖曲線の変化

られているという事ではない。一般に、障害を受けた酵母細胞は回復時に生育速度を弱めて修復を優先する。逆に言うと、生育速度が遅くなるということは、何らかの障害を受けて、その修復をしていると考えられ、その時に誘導されている遺伝子群が受けた障害の影響を反映すると考える事が出来る。

以下に T-2 トキシンの添加量に対する、酵母の増殖曲線の変化を示した (図 5)。この図からもわかるように、添加したかび毒の量によって増殖曲線が異なってくる。我々の実験では、一定の基準をもうけるという意味で、増殖曲線に影響を与えない曝露量と全く酵母が増殖しない曝露量の間濃度の濃度 (IC<sub>50</sub>) を用いている。図 5 の増殖曲線では、108 ppm に相当する量である。

曝露量が決定したら、対数増殖期の酵母細胞にかび毒を添加し、2 時間培養を継続したのち、酵母細胞を集菌して mRNA を抽出する。曝露群の mRNA を赤色の蛍光で、被曝露群の mRNA を緑色の蛍光でそれぞれ標識し、DNA マイクロアレイに同時に添加する。各遺伝子に対応したプローブとイゼーションにより、プローブに結合した各遺伝子の量を蛍光色素の量で測定する。これにより、約 6,000 種類の遺伝子それぞれについて、曝露群と被曝露群の発現量の差異を評価することが可能になる。

## 5. パツリンと T-2 トキシンの毒性評価例

パツリンの毒性は、動物実験において、消化管の充血、出血、潰瘍等の症状が観察されている。一方 T-2 トキシンはフザリウムトキシンと呼ばれるトリコテセン系のかび毒の一種であり、動物では、骨髄、胃腸管の粘膜上皮、皮膚、生殖細胞等の細胞分裂が盛んな組織において、特に強く毒性を発揮する。また、細胞膜の構造や機能に影響を与えたり、細胞内のミトコンドリアの呼吸を阻害したり、ある種の酵素を不活化したりといった多くの作用を持っていることが知られている<sup>10)</sup>。

### 5.1 パツリンまたは T-2 トキシンによって発現が変動する遺伝子の特徴

MIPS (Munich International Center for Protein Sequences, <http://mips.gsf.de/projects/>) データベース (2008 年 12 月時点で 6,130 遺伝子掲載) を利用して、パツリンによって発現が変動する遺伝子について、機能別に解析を試みた<sup>11)</sup>。遺伝子の選択は、コントロールに比べて、2 倍以上誘導された遺伝子、あるいは半分以下に抑制された遺伝子を用いている。図 6 には、パツリンと T-2 トキシンそれぞれを曝露した時に変動する遺伝子を機能別に分類したものを載せている。T-2 トキシン曝露では、metabolism, energy, cellular communication, cell rescuer そして development カテゴリーで顕著な遺伝子発現の誘導が見られ、パツリン曝露においては、protein fate, cell rescuer カテゴリーにおいて、顕著な誘導が観察された。

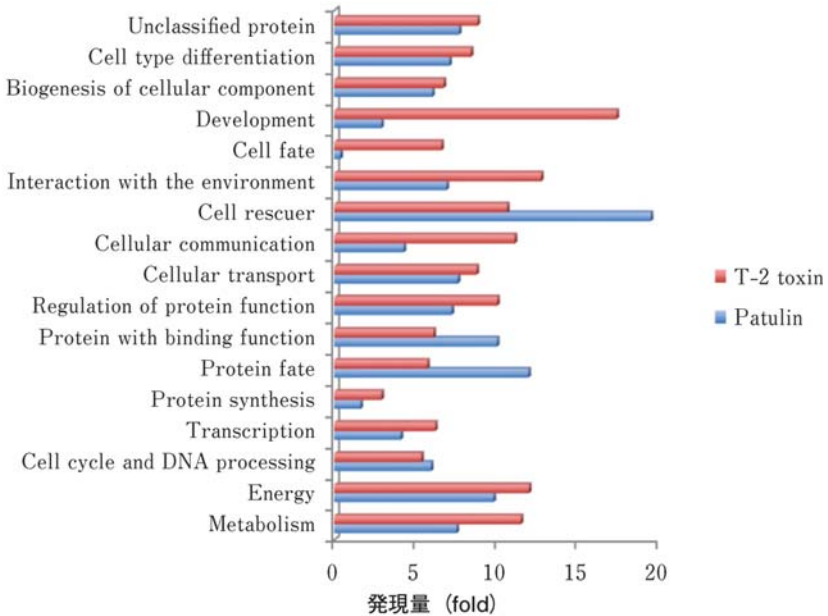


図 6 パツリンとT-2 トキシン曝露後の酵母細胞の遺伝子群の発現量の変動  
(コントロールに比べて、2倍以上発現している遺伝子群のみ抜粋)

このように、曝露した物質によって、酵母細胞の反応は異なる。次に、それぞれのかび毒により変動する遺伝子の特徴とそこから推測される毒性について述べる。

## 5.2 パツリンにより発現量変動する遺伝子の特徴

表1にパツリン曝露により高発現した遺伝子のうち、protein fate カテゴリーに含まれるものを記載した。最も発現が誘導されている遺伝子はDDI1であり、UBC5, UMP1, ATG1, NLP4と続く。このカテゴリーの遺伝子発現が誘導されているということは、タンパク質の分解、代謝が進んでいるということを意味し、実際にプロテアソーム系の遺伝子発現が多く誘導されている。特にDDI1はアルキル化によりDNAがダメージを受けた際に高発現が見られる遺伝子であり、ubiquitin-associated domainを有する遺伝子であることは注目に値する。また、表2にパツリン曝露で高発現する遺伝子群のうち、酸化ストレス及びメチオニン代謝に関する遺伝子を掲載した。GTT2 (glutathione S-transferase), TRX2 (Thioredoxin II), TSA2 (thiol peroxidase)など、酸化ストレスだけではなくSH化合物との関わりを持つ遺伝子が多く発現誘導されていた。同時にシステイ



表 1 パツリンによって発現誘導される遺伝子例 (抜粋)

PROTEIN FATE			
SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YER143W	14.8	DD1	DNA Damage Inducible
YDR059C	7.8	UBC5	Ubiquitin-Conjugating
YBR173C	6.6	UMP1	Ubiquitin-Mediated Proteolysis
YBR170C	5.0	NPL4	Nuclear Protein Localization
YMR174C	4.7	PAI3	Proteinase A Inhibitor
YKL103C	4.2	LAP4	Leucine Amino Peptidases
OXIDATIVE STRESS			
SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YLL060C	14.2	GTT2	Glutathione Transferase
YOL151W	9.3	GRE2	Stress Responsive Genes
YKL086W	5.3	SRX1	Sulfiredoxin
YPL223C	4.7	GRE1	Stress Responsive Genes
YGR209C	4.4	TRX2	Thioredoxin Isoenzyme
YDR453C	4.0	TSA2	Thioredoxin Peroxidase
METHIONINE METABOLISM			
SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YLR303W	11.9	MET17	Methionine and Cysteine Synthase 3'-Phosphoadenylsulfate
YPR167C	8.9	MET16	Reductase
YJR010W	6.4	MET3	ATP Sulfurylase
YIR017C	3.0	MET28	Basic Leucine Zipper
YFR030W	2.8	MET10	Assimilatory Sulfite Reductase
YNL277W	2.6	MET2	L-Homoserine-O-Acetyltransferase

表 2 パツリン曝露により発現誘導される DNA 修復関連遺伝子群

SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YDL059C	5.7	RAD59	Repair of double-strand breaks in DNA
YGL163C	5.3	RAD54	Recombinational repair of double-strand breaks in DNA
YER142C	3.9	MAG1	Protecting DNA against alkylating agents
YAR007C	3.4	RFA1	Replication Factor A
YEL037C	2.8	RAD23	Protein with ubiquitin-like N terminus, recognizes and binds damaged DNA

ン合成関連遺伝子である MET3 (sulfate adenylyl transferase), MET17 (Methionine and cysteine synthase), MET16 (3-phosphoadenylyl sulfate reductase) 等が高発現し、システインから合成されるグルタチオンが増加して、そのグルタチオンによる解毒作用が誘導されていると考えられた。データには示していないが、高濃度のグルタチオン添加により、パツリンの毒性が緩和されることから<sup>11)</sup>、パツリンの解毒に S-化合物が関与していると考えられる。

さらに、表 2 に示すように、組み替え DNA 修復に関する遺伝子 (RAD59, 52, 54 RFA1) 等がパツリン曝露により高度に発現している。組み替え DNA 修復が変異を起こしやすい修復であることから、パツリンには変異原性の疑いがあることを否定する事が出来ない。パツリンがリンゴジュースに混入しやすいこと、リンゴジュースが離乳期の子供に最初に与えられるジュースの一つとして好まれる事を考慮すると、今後パツリンの変異原性については、少量、長期に渡る摂取も含めて、さらなる詳細な検討が必要であると言える。

### 5.3 T-2 トキシンによって変動する遺伝子の特徴

トリコテセン系のマイコトキシンである T-2 トキシン曝露では、糖新生関連遺伝子 (SIP4 等) や物質の移動に関連する遺伝子 (HXT11, 9, 12, PHO89 等) が多く発現誘導され、これらの結果から T-2 トキシンが酵母の膜構造に重大なダメージを与えているのがわかる (表 3)。

さらに、FUS3 (mitogen-activated protein kinase gene) 等、細胞増殖停止に関連する遺伝子が高度に発現誘導され、これは妊娠マウスで mitogen-activated protein kinase gene pathway が誘導されるのと非常に類似したパターンを示している<sup>10)</sup>。

表 3 T-2 トキシンによって誘導された遺伝子群 (抜粋)

SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	DESCRIPTION
YJL089W	15.7	SIP4	Interacts with SNF1 protein kinase
YOL156W	15.7	HXT11	Hxt family protein with intrinsic hexose transport activity
YJL219W	12.8	HXT9	Hxt family protein with intrinsic hexose transport activity
YOL052C-A	12.0	DDR2	Heat shock protein DDRA2
YHR137W	11.4	ARO9	Aromatic amino acid aminotransferase II
YIL170W	10.7	HXT12	Strong similarity to sugar transport proteins
YFL058W	9.4	THI5	Ppyrimidine biosynthesis protein
YBL016W	8.4	FUS3	Mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)
YBR296C	8.2	PHO89	Na <sup>+</sup> /phosphate co-transporter

表 4 T-2 トキシン曝露により発現誘導される DNA 修復関連遺伝子群

SYSTEMATIC	FOLD	COMMON	FUNCTION
YGL163C	1.0	RAD54	Recombinational repair of double-strand breaks in DNA
YDL059C	0.9	RAD59	Repair of double-strand breaks in DNA
YER142C	0.5	MAG1	Protecting DNA against alkylating agents
YAR007C	0.4	RFA1	Replication Factor A
YEL037C	0.5	RAD23	Protein with ubiquitin-like N terminus, recognizes and binds damaged DNA

さらに、表 4 に示したように、T-2 トキシン曝露では組み替え修復関連遺伝子 (RAD54 等) や除去修復関連遺伝子 (RAD 23 等) はほとんど発現誘導されていない。このことから、パツリンとは異なり、T-2 トキシンには強い変異原性はないものと考えられた。

## 6. マイコトキシンの毒性を酵母遺伝子マイクロアレイで解析する際の問題点

以上のように、酵母細胞の DNA マイクロアレイを用いて、その毒性を解析した 2 例を示した。この 2 つのかび毒は酵母細胞の増殖を比較的低濃度で阻害し、反復実験での再現性も納得の出来るものであった。

しかしながら、基本的に酵母はかび毒の毒性に対して耐性であり、著しい毒性の現れないかび毒の方が多かった。そこで、1 遺伝子破壊株プールより選抜した変異株について、かび毒に感受性株の選抜を行うとともに、かび毒の毒性 (取り込み) を増強するような界面活性剤についても検討をおこなっている。数種の変異株では、かび毒に対し感受性が高く、また、0.01% 程度の SDS がさらにかび毒の取り込みを促進させることがわかって来た。現在このような変異株 + 界面活性剤を用いて、多種類のかび毒について DNA マイクロアレイを用いて毒性の解明を行っている<sup>13)</sup>。

## 7. DNA マイクロアレイを用いた、かび類の検出及び同定

現在、食品安全行政の体系は、発生した事故への後追的な対策を主とするものではなく、予想されるあるいは可能性のあるハザードに対する予防的措置に重点を置いている。特に有害微生物が引き起こすハザードに対する対策には、一次生産段階でのハザードの量の把握と同時に流通期間中のハザードの増加等を考慮しなければいけない。食中毒菌等の微生物等をいち早く検出する技術としては、ATP 測定法や PCR 法を用いた検出方法など、様々な方法が開発され、現在キット化されて安価に販売されている。しかしながら、かび毒のような有害な化学物質を生産するかび類の検出・同定には、未だに専門知識が必要とされる平板培養

後の形態観察や一部分の DNA 配列解析からの同定などが行われ、数日を要しながらも実際には正確な判断が出来ない場合も多いのが現実である。

現在ではかび毒そのものの検査には、化学的測定法や免疫学的測定法などが使われ、その結果として汚染食品などの除去が実施されている。しかしながら、かび類の生育特性上、食中毒菌等とは異なり、水ぬれした部分など食品の一部に限定して生育している場合があり、適切なサンプリングが容易ではないことが散見される。また、化学物質そのものは増幅出来ないために、存在している微量のかび毒（生産かび）を見逃し、その後の流通過程でかびが増殖することにより重大な被害をもたらす可能性も指摘されている。また、地球温暖化など環境の変化により、今まで汚染がないとされてきた作物に、新たなかび毒を生産するかびが寄生する可能性が十分に考えられる。この場合、特定のかび毒による汚染があると予測して行う化学的測定法や免疫学的測定法では汚染の検出が不可能である。このような状況を鑑みた場合、今後はかび毒量の検査そのものの微量化を図るだけでなく、かび毒生産かびそのものを網羅的に検出・定量する方が、より現実的に予防という観点に立った食品安全行政に寄与できる方法であると考えられる。

### 7.1 本研究課題の特徴

- ① 測定対象がかびの DNA であるために増幅することが可能で、極微量のかびに汚染されていても検出することが出来る。
- ② 2 色法を採用することによる標準かびとの競合交雑により、検出だけでなく定量が可能になるため、貯蔵・流通時の増殖・汚染拡大予測が可能である。
- ③ エアレーション等孢子の収集法に工夫を加えることにより、かびの生育特性上問題となるまだら汚染にも対応出来、より精度が向上する。

### 7.2 プローブの設計

以下に 2 種類のかび (*Aspergillus flavus* と *Fuzarium graminearum*) を同時に検出・定量する為のマイクロアレイのプローブの設計方法を示した (図 7)。

両者のリボソーム領域及び ITS 領域のゲノム配列を比較し、一致しない部分について、出来るだけ多くのプローブを設計して、マイクロアレイ基盤上に搭載する。

DNA の増幅は共通配列よりプライマーを設計し、その共通プライマーを用いて行うこととする。

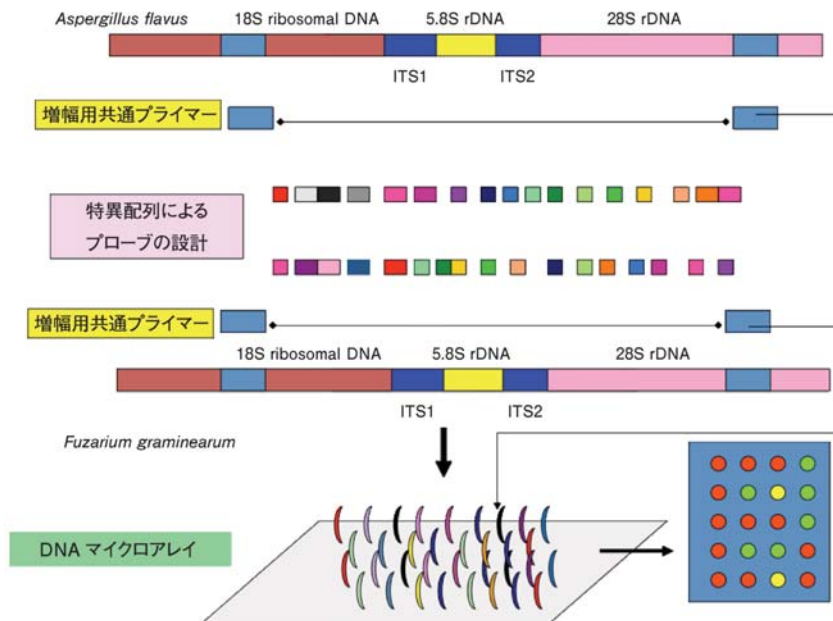


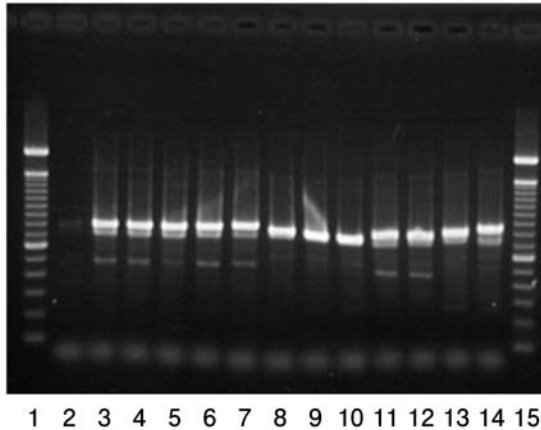
図 7 かび類検出用プローブ及び増幅用共通プライマーの設計図

### 7.3 増幅条件の決定

本法のターゲットが食品であるため、DNA の抽出時に、PCR 反応を阻害するような物質が入り込み、増幅効率が落ちる現象が観察された。そこで、かびの DNA の増幅法は LATE (Linear-After-The-Exponential)-PCR 法を応用した。本方法は、2 種類のプライマーの濃度を変化させ、PCR 反応中において、2 段階反応を行わせようというものである。まず、第 1 段階では、従来の遺伝子増幅反応を用いて 2 本鎖 DNA を生成させ、その後の第 2 段階で濃度の濃いプライマーによる片方鎖だけの増幅反応を行うものである。この 2 段階反応の結果として、2 本鎖 DNA と片方鎖だけが増幅された 1 本鎖 DNA の混合物が蓄積する。マイクロアレイ上でのプローブと DNA の交雑は、2 本鎖に比べて 1 本鎖の方が格段にその反応性がよいため、従来法に比べて約 1000 倍程度の感度の上昇が期待できる。

図 8 は実際に 13 種類のかびについて、LATE-PCR 法を用いて増幅し、その後制限酵素で 2 重鎖を切断して電気泳動を行ったもので、1 種類のプライマーセットで、すべてのかびについて 1 本鎖が合成されているのがわかる。

図 9 は同じ量の *F. tricinctum* と *A. flavus* の DNA をそれぞれ cy3, cy5 で蛍



LANE	SAMPLE
1	100 pb ladder
2	<i>A. clavatus</i>
3	<i>A. parasiticus</i>
4	<i>A. oryzae</i>
5	<i>A. ochraceus</i>
6	<i>A. flavus</i>
7	<i>A. terreus</i>
8	<i>F. tricinctum</i>
9	<i>F. sporotrichioides</i>
10	<i>Gibberella zeae</i> = <i>F. graminearum</i>
11	<i>P. viridicatum</i>
12	<i>P. purpurogenum</i>
13	<i>C. purpurea</i>
14	<i>T. viride</i>
15	100 pb ladder

図 8 LATE-PCR 法で増幅したかび類 DNA の例

光ラベルし、図 7 で設計したような DNA マイクロアレイ上でハイブリダイズしたものである。

この結果は、2 種類のかびの配列の違いをはっきり表している。これらの情報から、DNA マイクロアレイを用いてかびの検出ができるものと考え、この成果をもとに特許を出願した<sup>14)</sup>。

#### 7.4 問題点と展望

本研究で設計したマイクロアレイは、近縁種を明確に分離出来ないという問題点があり、また、食品中からかびの DNA をいかに完全に近い状態で抽出するか

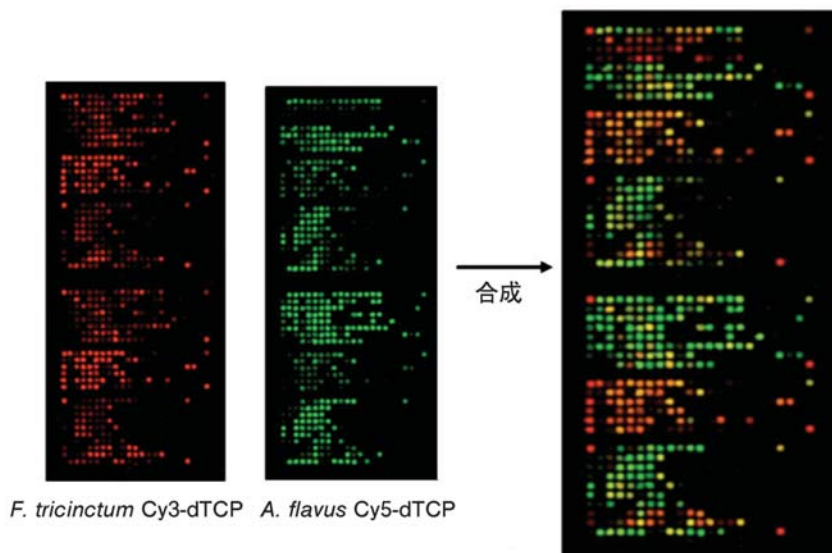


図 9 Microarray from LATE-PCR hybridized with different strains.

という点に問題が残っている。プローブの改良等本研究のさらなる発展により、かび毒生産かび汚染というハザードを今までよりさらに緻密に検出する事が出来るようになり、予防的観点を含むより安全な食品を国民に提供できるものと考えている。

(微生物利用研究領域 微生物評価ユニット 岩橋 由美子)

#### 参考文献

- 1) Incidence of seed-borne fungi and aflatoxins in Sudanese lentil seeds, S. A.F. El-Nagerabi, A.E. Elshafie, Mycopathologia 149, 151-156 (2000)
- 2) Seed borne fungi and mycotoxins associated with some legume seeds in Egypt, E.M. Embaby, M.M. Abdel-Galil, Journal of Applied Science Research 2, 1064-1071 (2006)
- 3) Free fatty acid accumulation and quality loss of stored soybean seeds invaded by *Aspergillus rubber*, O.D. Dhingra, E.S.G. Mizubuti, I.T. Napoleao and G. Jham, Seed Science and Technology 29, 193-203 (2001)
- 4) Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites, G. S. Eriksen, H. Pettersson, T.

- Lundh, Food and Chemical Toxicology, 42, 619-624 (2004)
- 5) Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials, G. Avantaggiato, R. Havenaar, A. Visconti, Food and Chemical Toxicology, 42, 817-824 (2004)
  - 6) Zearalenone production by *Fusarium* species isolated from soybeans, G. Vaamonde, G. Scarmato, N. Bonera, International Journal of Food Microbiology, 4, 129-133 (1987)
  - 7) Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E, L. Ghédira-Chékir, K. Maaroufi, A. Zakhama, F. Ellouz, S. Dhoub, E.E. Creppy, H. Bacha, Chemico-Biological Interactions, 113, 15-25 (1998)
  - 8) Incidence of patulin in apple juices marketed in Turkey. T. Yurdun, G.Z. Omurtag, O. Ersoy, J. Food Prot., 64, 1851-1853 (2001)
  - 9) Development of liquid chromatography electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: investigation of its contamination levels on Japan. R. Ito, H. Yamazaki, K. Inoue, Y. Yoshimura, M. Kawaguchi, H. Nakazawa, J. Agric. Food Chem., 52, 7467-7468 (2004)
  - 10) Microarray analysis of T-2 toxin-induced liver, placenta and fetal liver lesions in pregnant rats, S. Sehata, N. Kiyosawa, F. Atsumi, K. Ito, T. Yamoto, M. Teranishi, K. Uetsuka, H. Nakayama, K. Doi, Microarray analysis of T-2 toxin-induced liver, placenta and fetal liver lesions in pregnant rats. Exp. Toxicol. Pathol., 57, 15-28 (2005)
  - 11) Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. Y. Iwahashi, H. Hosoda, J. Park, J. Lee, Y. Suzuki, E. Kitagawa, S. Murata, N. Jwa, M. Gu, H. Iwahashi, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 1936-1942 (2006)
  - 12) Analysis of mechanisms of T-2 toxin toxicity using Yeast DNA microarrays, Y. Iwahashi, E. Kitagawa, H. Iwahashi, International Journal of Molecular Sciences, 9, 2585-2600 (2008)
  - 13) Mycotoxin toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* differs depending on gene mutations, T. Suzuki, S. Sirisattha, K. Mori, Y. Iwahashi. Food Science and Technology Research, 15, 453-458 (2009)
  - 14) **かびの検出方法, それに用いるマイクロアレイ及び検出用キット** 岩橋由美子, 細田 浩, 岩橋 均, 北河恵美 (特開 2006-179396)