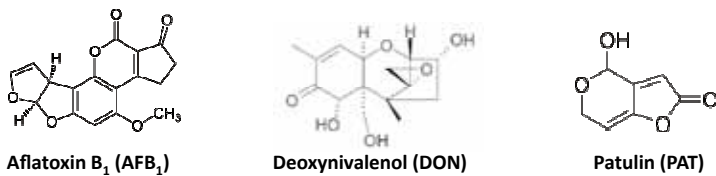


## Ⅱ 微生物細胞を用いたマイコトキシンの毒性評価

### 1. はじめに

我々は様々な微生物に囲まれて生活している。その多くは動物にとって無害であるが、時として影響を及ぼすものも存在する。発酵・醸造に利用される酵母や麹、納豆菌などは食生活に豊かさをもたらす一方で、代謝産物が不快・有害である場合には腐敗・変敗菌と判断される。我々の生活に多大な影響を与えている代謝産物の内、有用な物質としては *Penicillium* の産生する抗生物質ペニシリンが有名であろう。しかし、負の影響を与える物質も存在する。その代表として挙げられるのがカビ毒（以降マイコトキシン）である。マイコトキシンとはカビの二次代謝産物であり、ヒトや家畜等の経済動物、あるいはペットに対する毒性を有する。抗生物質とマイコトキシンの違いは、こうした動物に対する毒性の有無や選択性によって判断されている。その一例として挙げられるのは、ペニシリンと同様に *Penicillium* 属菌が産生するパツリン（Patulin, PAT）である。この物質は抗生物質としての可能性が検討されたが、動物に対する毒性が強いことからマイコトキシんに分類され、現在では規制対象物質となっている。マイコトキシンはこれまで300種以上が報告されており、その構造は実に多様である。しかし、ヒトの暮らしに大きな影響を与える程の汚染が報告されるのは、その中の一部である。ここではそれらの主要なマイコトキシンに関して、過去の知見と我々の実施した研究の結果から推察されるマイコトキシンの毒性メカニズムや毒性の低減について述べる。（図1）



種類(基準値)	代表的な産生菌	検出試料	摂取経路
AFB <sub>1</sub> , G <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> (10 μg/kg)	<i>Aspergillus flavus</i>	穀物、香辛料、豆類	生鮮・加工食品、 家畜飼料
DON (1.1 mg/kg)	<i>Fusarium graminearum</i>	麦類、トウモロコシ	加工食品、 家畜飼料
PAT (50 μg/kg)	<i>Penicillium expansum</i>	リンゴ、ブドウ、モモ	ジュース(果汁)

図1. 本稿で取り上げたマイコトキシンの構造およびその由来・特性

## 2. 食品や作物を汚染する主要なマイコトキシン

### <アフラトキシン>

マイコトキシンとして最も注目を浴びているのはアフラトキシン (Aflatoxin; AF) である。このマイコトキシンは肝臓癌を誘発することが知られており、自然界で生み出される最も強い発癌性物質とされる。強いインパクトを与える物質であるため、しばしばニュースにも取り沙汰されている。近年では2008年にAF汚染米(事故米)が食用に加工されて市場に出回るといった事件が報道され、大きな話題となった。このマイコトキシンを産生する *Aspergillus* 属菌 (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* 等) は世界各地に広く分布し、多くの農産物を輸入する日本においては輸入米などの穀物、胡椒などの香辛料、各種ナッツ類でのAF汚染がしばしば報告されている。世界各地の家畜飼料を対象としたマイコトキシンの汚染実態調査では、アジア・オセアニア地域の飼料は日本国内の基準値 (10 $\mu$ g/kg) を上回る濃度で広範な汚染を示す一方、ヨーロッパ地域においては汚染頻度や濃度が低いという報告がなされている<sup>1)</sup>。同報告ではデオキシニバレノール (DON) やフモニシン (FUM), T-2 トキシンなども同様の傾向であることが報告されており、温帯 - 熱帯地域の作物はマイコトキシン汚染リスクが全体的に高いと想定される。実際にインドのコメのAF汚染調査では7割近いサンプルからアフラトキシン B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) が検出されている<sup>2)</sup>。多くの食品を輸入に頼る我が国では、こうしたAF産生菌の混入に関する実態を把握すると共に、AF産生に適さない輸送・貯蔵環境を構築していく必要がある。AFには構造の違いによりAFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub> など複数の構造体が存在するが、毒性評価研究においてAFB<sub>1</sub>は他のAFの10倍以上の毒性を示すことから、最近まで国内における規制対象のAFはAFB<sub>1</sub>のみであった。そのため上述の事故米混入事件で検出対象となっていたのはAFB<sub>1</sub>であったが、2011年からは食品健康影響評価や国際動向等を鑑み、AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>の4種を「総AF類」として一括で規制している。AFM<sub>1</sub>は主に生体内の代謝作用でAFB<sub>1</sub>から変換され、乳牛からミルク中へ移行したものが検出対象となっている。AFM<sub>1</sub>はAFB<sub>1</sub>より低毒性かつ含有量が低いため、今のところ規制の対象ではない。しかし、ミルクやそれを原料とするチーズなどの製品は若年層が摂取する機会も多いため注意を要する。AFの国内におけるリスク評価は2009年に終えているが、その後規制対象物質も増えているため、今後も継続した評価が求められる。

### <トリコテセン系マイコトキシン>

AFよりも更に広範な汚染被害を引き起こすのがトリコテセン系マイコトキシンである。トリコテセン類を産生するのは *Fusarium* 属菌などである。トリコテセン類は構造毎に分類されており、最も毒性の強いグループがタイプA、次がタイプBとなっている。他にもタイプC,Dなどが存在するが、主要な汚染マイ

コトキシンはタイプ A および B である。タイプ A トリコテセンには T-2 トキシン, HT-2 トキシンなどが含まれる。これらのマイコトキシンは非常に毒性が強く重要であるが, 検出量, 頻度が少ないため, 現在のところ日本では規制の対象とはなっていない。タイプ B トリコテセンとしては DON, ニバレノール (NIV) などが含まれる。これらのマイコトキシンは T-2 トキシン, HT-2 トキシンと比べて低毒性であるが, 最も頻繁かつ広範に麦類やトウモロコシなどを汚染することで, 経済的に大きな損失をもたらす。また, これらのマイコトキシンを産生するカビは赤かび病を引き起こす作物病害菌であるため, マイコトキシン産生の有無に関わらず非常に重要な防除対象カビである。この DON, NIV の産生過程では中間生成物として細胞内にアセチル化体が生成する。これはカビ自身の自家毒性を低減させる意味があると考えられているが, 動物等に対して強い毒性を示し, 高頻度な検出率を示す場合もあるため DON, NIV の誘導体も注目されている。これらの誘導体は農林水産省や厚生労働省のモニタリング調査の対象となっているが, 国内における調査では DON, NIV と比べて低レベルの汚染である。現在はタイプ B トリコテセンの中でも DON のみの基準値 (1.1 mg/kg) が設けられている。

### <パツリン>

国内において基準値の定められたマイコトキシンは AF, DON の他にもう一つあり, 主に果実を汚染する *Penicillium* 属菌等の産生する PAT である。PAT は AF やトリコテセン類と比べて検出率も低く, 国内においては基準値 (50 $\mu$ g/kg) を上回る汚染も報告されていない。それにもかかわらずこのマイコトキシンが規制されているのは, 輸入されることも多い果汁飲料 (特にリンゴ果汁) が乳幼児に好まれるため, 曝露の可能性が高くなることに起因している。PAT の国内リスク評価は 2003 年に報告されている。

これら 3 種の主要なマイコトキシンの他にも AF と合成経路が共通するステリグマトシチン (ST) やフモニシン (FUM), 比較的毒性の強いオクラトキシン (OT) 等も食品や作物, 飼料などを汚染している。(図 2)



図 2. マイコトキシン毎に異なる毒性発現メカニズム

### 3. マイコトキシンの毒性

#### <アフラトキシン>

動物に対する曝露試験において、AFの急性毒性は肝細胞の壊死や変質として表れる。また、細胞異常が誘発された結果、ラットでは慢性毒性として肝臓癌が認められる。その他に精子の運動量減少やホルモン異常による生殖異常も報告されている。ヒトにおいても動物と同様の影響が生じると考えられる。AFは体内に取り込まれた後に代謝を受けて血清アルブミンと結合し、トランスポーターを介して血中へと運ばれる。AFB<sub>1</sub>の場合、肝臓および各細胞ではシトクロム P450 (CYP) を介して AFM<sub>1</sub> や AFQ<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxide に代謝され、特に AFB<sub>1</sub>-exo 8,9-epoxide は DNA や RNA の付加体となることで毒性を発揮する。DNA, RNA への付加は RNA 合成や RNA ポリメラーゼ活性の阻害を通じてタンパク質合成を抑制する。更に肝臓や腎臓における小胞体の分解や細胞の壊死に繋がる。また、肝臓におけるこの代謝プロセスで活性酸素種が生成され、毒性を示すことも示唆されている。これに関連して、肝臓のグルタチオン濃度の減少は AFB<sub>1</sub> の DNA への共有結合を増加させ、複数の酸化防止剤が AFB<sub>1</sub> の DNA 結合性を抑えることが報告されていることから、AFの毒性に対して抗酸化物質の摂取は有効であると思われる。動物モデルにおける毒性低減に最も寄与しているのがグルタチオン S トラंसフェラーゼであり、エポキシド体を抱合して DNA への付加を妨げることで毒性の発現を抑える<sup>3)</sup>。ヒトへの毒性に着目すると、急性毒性として嘔吐、発作、黄疸なども認められる。肝臓癌 (Hepato-cellular carcinoma; HCC) のリスク要因には、AFB<sub>1</sub> 以外に喫煙や B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV) および C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) の感染も挙げられるが、特に HBV 感染と AFB<sub>1</sub> の恒常的な摂取が HCC のリスクを高める<sup>4)</sup>。これらの関連性が完全に明らかとなった訳ではないが、AFを恒常的に摂取している場合、HBV 抗体のキャリアは HCC のリスクが高まるとされている。

#### <デオキシニバレノール>

トリコテセン系マイコトキシンの毒性は ribotoxic stress と呼ばれる。これは RNA 機能を阻害する毒性を指しており、リボソームサブユニットへの結合による翻訳阻害などの特徴が挙げられる。タイプ B トリコテセンとして最も毒性に関する研究が進んでいるのは DON であるため、ここでは DON の情報を基準として話を進める。また、DON はタイプ A トリコテセンである T-2 トキシンよりも毒性が低いとされるが、曝露量が圧倒的に多い場合にはショック性の細胞死を引き起こす<sup>5)</sup>。これが生体では腹痛や不快感、下痢などの急性毒性として表れる。このような背景から、致死性は低い嘔吐や食欲減退の誘発性は T-2 トキシンなどのような強毒性マイコトキシン以上である。下痢や食欲不振といった急性毒性は体重の減少という慢性毒性影響として表れるため、家畜被害が大きいこ

とを鑑みると経済上の大きな脅威である。DONとマイコトキシンの一種であるゼアラレノンによって共汚染された場合、卵母細胞の質を低下させ、肝臓組織の病理的变化を誘発する<sup>6)</sup>。免疫学的には、DONの曝露が転写に関連するサイトカインを誘導する。また、高濃度のトリコテセン曝露は白血球やマクロファージの細胞死を誘発し、免疫抑制を引き起こす<sup>7)</sup>。DONの標的分子の一つは遺伝子の翻訳を担う60Sリボソームサブユニットである<sup>8)</sup>。DON結合による翻訳阻害は普段抑制的な制御を受けているmitogen-activated protein kinases (MAPKs)を誘導し、MAPK経路の誘導によってアポトーシスが引き起こされる。この一連の流れがribotoxic stress responseと呼ばれる<sup>9)</sup>。MAPK経路は細胞死以外にも免疫応答や細胞分裂、生体構成成分合成など、多くの機構を制御している。そのためMAPK経路の制御変化は生体の免疫機構や細胞の維持・増殖に大きく影響することになる。DONの動物に対する感受性はブタ>マウス>ラット>鳥、ウシとなっている<sup>7)</sup>。ブタではDONの細胞への吸収が速いことがその要因のようである。ブタのDON吸収は小腸に至るまでの短時間に進行する<sup>10)</sup>一方、大腸に至るまでには腸内細菌によって脱エポキシ化される<sup>11)</sup>。脱エポキシ化されたDON (de-epoxy DON; DOM-1)はDONよりも毒性が低くなる。生体内に取り込まれたDONの多くは脱エポキシ化された形で糞尿と共に排出されていることから、再びDONに変換される心配は少ない。このため、DONからDOM-1へ効率的に変換される腸内環境がDONの毒性低減に重要である。ブタのように吸収が速いと、胃から十二指腸付近において腸内フローラが効果的な働きをしない場合にはDOM-1への変換が進まないため、DONの毒性が反映されやすいと考えられる。反芻動物において感受性が低いのは、DONが腸内に留まる時間が相対的に長いため、腸内細菌に代謝を受けて脱エポキシ化し易くなることが要因の一つと考えられる。しかし、マウスのDON吸収はブタよりも更に速く<sup>12)</sup>、感受性傾向とは一致しない。このことは、生体ごとのDONに対する毒性影響が完全には同一でないことを示唆している。また、感受性には生物種の他に品種間差、環境差も影響する。これはDONを代謝・抱合しやすい腸内細菌叢や酵素を有しているか否かに大きく左右される。

### <パツリン>

PATの急性毒性はマウスにおいて消化管の出血や潰瘍などであり、慢性毒性や催奇形性は認められていない。発癌性に関してもデータが不十分である。その一方で数々の細胞種に対してDNA合成に障害を及ぼすことが報告されている。PATは細胞膜表層の還元能を持つグルタチオンに結合することで、活性酸素種への抵抗性を失わせる。本来還元されるべき活性酸素種が細胞内に溢れることによってDNA切断などの傷害が誘発され、細胞死を誘発する。一例として、PATはチャイニーズハムスターの線維芽細胞であるV79細胞に対する染色

体異常誘発性を示すことが報告されており<sup>13)</sup>、V79細胞を用いた試験において、PAT曝露は染色体複製開始に係る二本鎖DNA分離の異常により引き起こされる nucleoplasmic bridges (NPB) と呼ばれる症状を引き起こすと同時に、DNAの切断・損傷度を表す Tail DNA 量も増大する<sup>14)</sup>。このほかNPBに近い様態の染色体異常である Micronuclei (MN) もPATによって誘導されるが、アスコルビン酸の添加が症状を緩和すると報告されている<sup>15)</sup>。V79細胞以外の報告としてはヒト結腸癌由来のCaco-2細胞や分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に対するPATの影響を調査した報告があり、PATが細胞膜を流動化させ透過性を高めている<sup>16), 17)</sup>。これらをまとめると、PATは細胞に対して染色体の異常な切断及び修復異常を引き起こし、細胞の維持やストレス抵抗性に重要な細胞膜の恒常性を失わせることで細胞死を引き起こすものと考えられる。(図3)

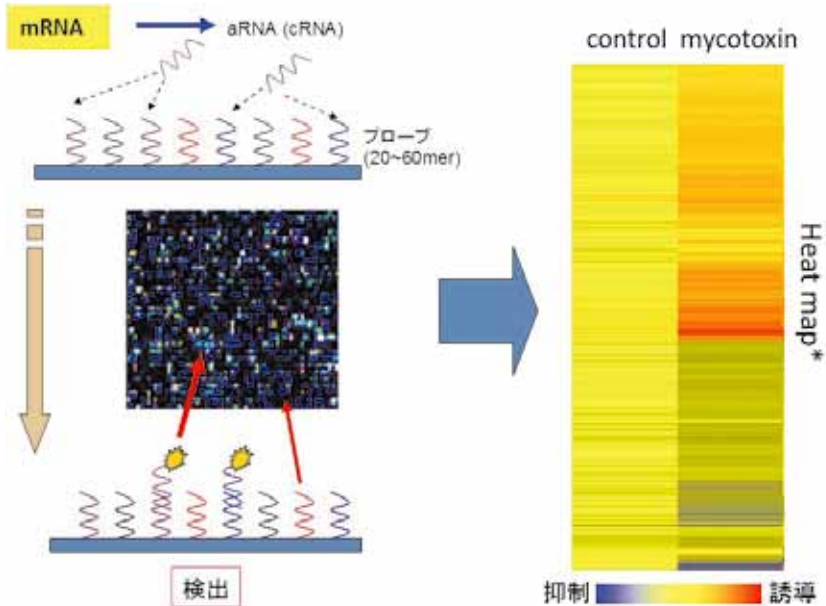


図3. DNA マイクロアレイを用いたマイコトキシン毒性評価の概要

マイコトキシンを曝露した細胞から遺伝子の発現を表す mRNA を抽出し、この mRNA からラベル標識化された合成 RNA (aRNA) を作製して、各遺伝子の相補配列から成るプローブセットを搭載したアレイチップとハイブリダイズさせる。ハイブリダイズされた aRNA はシグナルとして検出され、シグナル強度から aRNA  $\approx$  mRNA 量を計算してコントロール条件と比較を行う。\*Heat map は遺伝子発現量の比較結果であり、線状のイメージとして表された各遺伝子発現の比較結果を積み重ねた図である。

#### 4. DNA マイクロアレイによるマイコトキシンの毒性評価 < AFB<sub>1</sub> の毒性影響 >

AFB<sub>1</sub> の毒性低減試験としてグレープフルーツ果汁の摂取により AFB<sub>1</sub> による肝細胞の DNA 損傷が抑制されたとの報告<sup>18)</sup> があり、この報告では肝臓における AFB<sub>1</sub> の代謝不活性化を通じて毒性発現を抑制している事が示唆されている。しかし、種々の毒性メカニズムに関する報告や同様の毒性緩和に関する報告から、毒性低減には他の要素も貢献している可能性が考えられる。一つの可能性としては、3章で述べたように AFB<sub>1</sub> の毒性が抗酸化物質によって低減されるため、その効果が表れたということである。このような毒性低減に向けたヒントを掴むため、我々は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞を用いた AFB<sub>1</sub> の曝露試験を実施して毒性応答メカニズムの解明に取り組んだ<sup>19)</sup>。この研究では、酵母細胞において細胞壁の  $\beta$  グルカン生合成等に関与している MAPK 経路を抑制的に制御している Ser/Thr フォスファターゼ 2C をコードする *PTCI* 遺伝子を欠失した変異株 ( $\Delta$ *PTCI*) に対し、AFB<sub>1</sub> の曝露試験を実施した。変異株を用いるのは酵母細胞のマイコトキシンの耐性を抑えるためである。酵母細胞には一部のマイコトキシンのトラップにも関与する厚い細胞壁や多剤耐性能を持つ細胞質膜上の排出ポンプが存在するため、動物細胞と比べて抵抗力が強く、野生型株では細胞内の応答反応を捉える事が困難である。これにより、酵母細胞を用いたマイコトキシン毒性評価においては変異株を用いる事が多い。さらに酵母細胞を用いる利点として、酵母細胞が真核細胞の実験系モデルとされていること、全ゲノムが解析されており、遺伝子破壊株のセットが入手可能であるためスクリーニングに適している事等が挙げられる。また動物細胞は各器官に分化した細胞であるため、細胞株毎に異なる応答反応を示す可能性があり、一般性のあるメカニズムを確認するには酵母のような細胞が適している。当該研究では、これに加えてマイコトキシンの細胞内への移行を促進する目的で低濃度のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を培地に添加している。DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果、 $\Delta$ *PTCI* に対し AFB<sub>1</sub> を 2 時間曝露させた細胞では、1200 余りの遺伝子発現が変化した。(表 1)

遺伝子発現の変化を機能遺伝子群毎に分類すると、DNA の構成物質であるプリン<sup>20)</sup>の生合成経路遺伝子の発現抑制や DNA 修復関連遺伝子の発現誘導が見られた。これは動物細胞における DNA 損傷と同様の事態が酵母細胞の中で生じていることを示唆している。また、この研究では解糖系や糖新生、TCA サイクル上の遺伝子にもまとまった変化が見られた。(図 4)

これらの系の一連の流れを追うと、遺伝子発現の変化が糖新生を誘導する傾向を示していた。さらに、糖新生と同時にイノシトール合成遺伝子が誘導されていた。イノシトールとは水溶性のビタミン様物質である。動物では肝臓に多く含まれ、LDL コレステロールを放出して脂肪肝を抑制する働きもある。脂肪肝も酸

表 1. アフラトキシン B<sub>1</sub> 曝露による酵母 *ΔPTC1* 細胞の遺伝子発現変化

Ensembl	遺伝子名	遺伝子発現 変化量(倍)	コードタンパク質	機能分類
YGL234W	<i>ADE5,7</i>	0.42	Aminoimidazole ribotide synthetase	プリン 塩基合成
YLR359W	<i>ADE13</i>	0.51	Adenylosuccinate lyase	
YGR061C	<i>ADE6</i>	0.45	Formylglycinamide-ribonucleotide, (FGAM)-synthetase	
YDR226W	<i>ADK1</i>	0.56	Adenylate kinase	
YNL220W	<i>ADE12</i>	0.46	Adenylosuccinate synthase	
YDR454C	<i>GUK1</i>	0.59	Guanylate kinase	
YHR216W	<i>IMD2</i>	0.02	Inosine monophosphate dehydrogenase	
YLR432W	<i>IMD3</i>	0.34	Inosine monophosphate dehydrogenase	
YGR258C	<i>RAD2</i>	1.83	Subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 3	DNA 修復
YER162C	<i>RAD4</i>	2.36	Subunit of Nuclear Excision Repair Factor 2 (NEF2)	
YJR052W	<i>RAD7</i>	1.54	Subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 4	
YMR201C	<i>RAD14</i>	1.69	Subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 1 (NEF1)	
YBR114W	<i>RAD16</i>	2.88	Subunit of Nucleotide Excision Repair Factor 4	
YPL153C	<i>RAD53</i>	1.84	Protein kinase	
YGL058W	<i>RAD6</i>	1.52	Ubiquitin-conjugating enzyme (E2)	
YJR035W	<i>RAD26</i>	1.64	Homolog of human CSB protein	
YDR030C	<i>RAD28</i>	3.42	Homolog of human CSA protein	
YER095W	<i>RAD51</i>	1.57	Strand exchange protein	
YGL163C	<i>RAD54</i>	3.04	DNA-dependent ATPase	
YDL059C	<i>RAD59</i>	1.83	Homolog of Rad52p	

化ストレスを亢進する特徴があり、イノシトールはこれを解消することで抗酸化にも寄与していると考えられる。酵母細胞において、イノシトールはスフィンゴ脂質代謝経路へと送られる。スフィンゴ脂質代謝経路ではイノシトールリン酸と phytoceramide から mannosyldiinositol phosphoryl -ceramide (MIP2C) が作られる。MIP2C は細胞膜の主要な構成物質であり膜タンパク質の局在を左右する重要な物質である。ところが、phytoceramide の生合成経路上にある複数の遺伝子は、AFB<sub>1</sub> の曝露により発現が抑制されている。セラミドは膜タンパクの構成成分であると同時にその他の細胞維持機能や細胞死シグナルの役割も持っているため、シグナルの供給異常は細胞修復や分裂に異常を誘発する。先に述べたとおり細胞膜上には多剤耐性トランスポーターが存在するものの、これらの影響により細胞の維持機能が有効に機能しないと推測される。他のマイコトキシンに関する報告として、動物細胞に対するフモニシン B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) の曝露によってセラミド合成障害が引き起こされ、スフィンゴ脂質代謝経路の異常によって DNA 合成を補助する葉酸を取り込むためのトランスポーターが機能しない例<sup>20)</sup>がある。AFB<sub>1</sub> の毒性評価においても、FB<sub>1</sub> 同様にスフィンゴ脂質代謝経路の観測から細胞の損傷や修復プロセスに関連する情報を取得可能であろう。上述のグレープフルーツはイノシトールを豊富に含んでいる果物であり、スフィンゴ脂質代謝経路



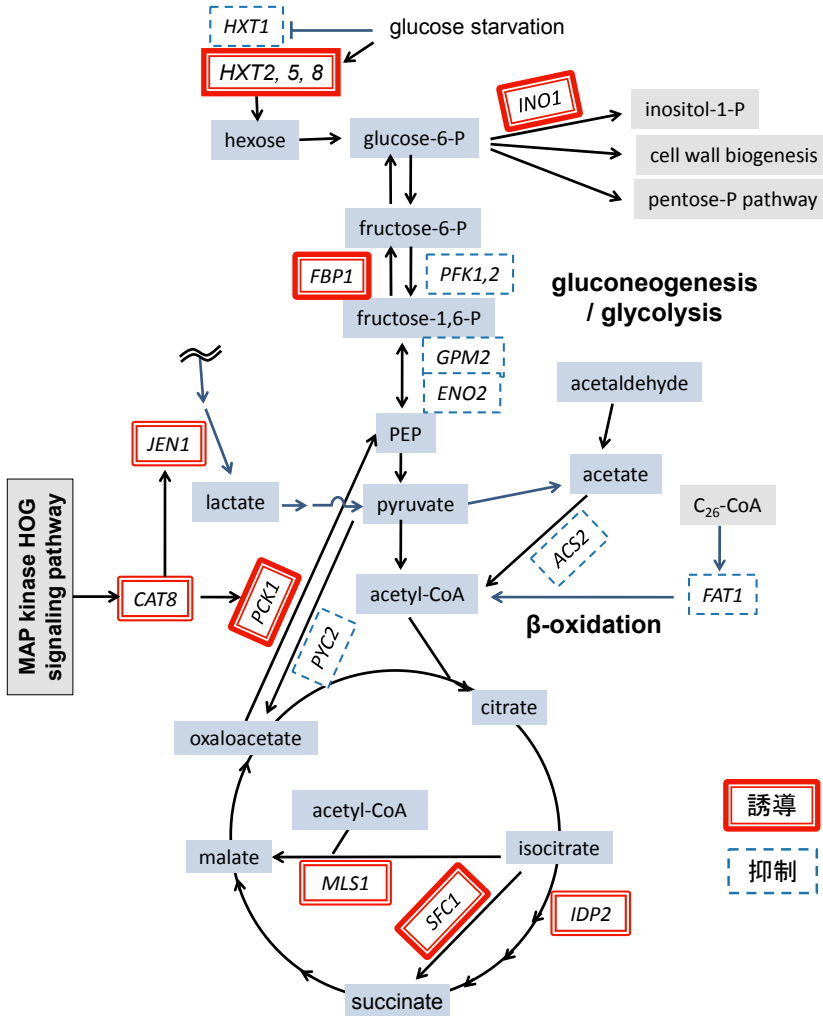


図4. アフラトキシン B<sub>1</sub> の曝露と酵母の糖代謝経路遺伝子の遺伝子発現変化

の正常化に影響することで細胞分裂のシグナル正常化に一役買っているのかもしれない。また、DNA 付加体を形成する AFB<sub>1</sub>-exo-8,9-epoxide は CYP3A による代謝を受けることで生成されるが、グレープフルーツの成分であるフラノクマリン類は CYP3A を不活性化する<sup>21)</sup> ことから、アスコルビン酸の抗酸化、スフィンゴ脂質代謝経路の正常化、CYP3A 不活化という複合的な影響が AFB<sub>1</sub> の毒性を低減しているものと思われる。(図5)

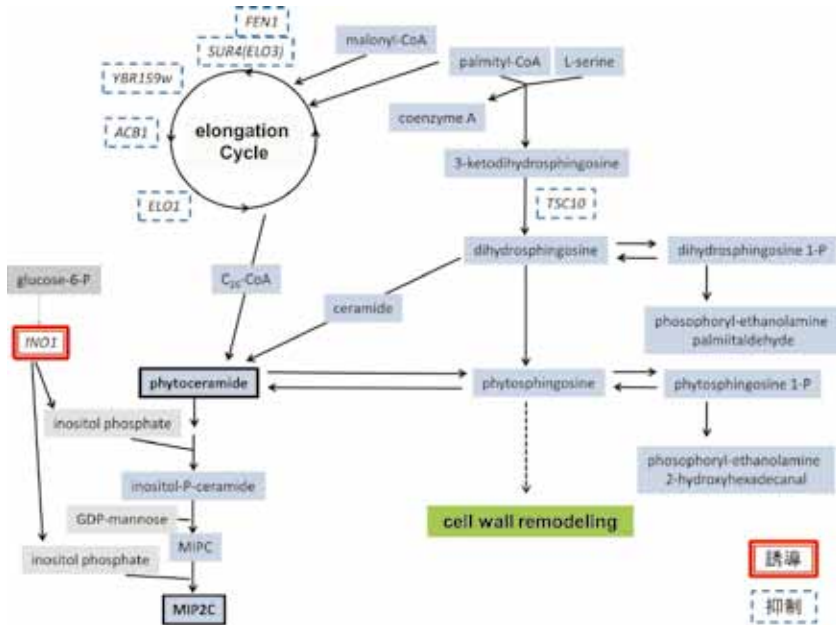


図5. アフラトキシシ B<sub>1</sub> の曝露とスフィンゴ脂質代謝経路遺伝子の遺伝子発現変化

### < DON, NIV 及びその誘導体の毒性比較 >

タイプBトリコテセンの毒性情報や基準値設定は、主にDON, NIVを対象として議論されている。しかし、その中間生成物であるアセチル化体の汚染実態は気候変動に影響されて変化しており、国外の汚染調査ではアセチル化体がDON, NIVに近い汚染量を示す地域も散見されるため、アセチル化体の毒性に関する情報集積も求められている。主に注目されているのは、取り込まれたアセチル化体が生体内で脱アセチル化され、最終産物であるDON, NIVと同様の毒性リスクを生じる可能性である。しかし、腸管上皮細胞のように代謝を受ける前にアセチル化体に曝されるリスクのある細胞にとって、アセチル化体そのものの毒性情報も重要である。動物細胞を用いた試験では毒性の強さのみに着目した比較試験が多いが、毒性メカニズムに違いがある場合には、アセチル化体のリスクを慎重に検討する必要がある。そこで我々は再び酵母細胞を用いたDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した<sup>22)</sup>。ここでは酵母の細胞膜表面に局在する多剤耐性トランスポーター遺伝子*PDR5*の変異株Δ*PDR5*をDNAマイクロアレイに使用した。この細胞はDON, 15アセチルDON (15AcDON), 4AcNIVに対して感受性を示す一方、3AcDON, NIVには感受性を確認できなかった。DNAマイクロアレイの結果から毒性の特徴を調べたところ、顕著に変化していたのは

タンパク質合成遺伝子群であった。これは翻訳阻害に関連した遺伝子発現の変化と考えられた。その他に特徴的な変化を示したのはトリコテセンの標的ともなり得るリボソームの合成遺伝子群であった。興味深いことに、細胞質に局在するリボソーム合成遺伝子群では DON, 15AcDON, 4AcNIV の曝露によって発現が誘導されている反面、ミトコンドリアのリボソーム合成遺伝子群は発現が抑制された。(図6)

トリコテセン系マイコトキシンのモデルとしてトリコテセンを曝露した酵母細胞においてリボソーム合成遺伝子群が大きく変動することは報告されていたが、我々の研究では遺伝子発現変化の傾向が細胞内局在によって正反対になっていることを示唆した。この特異的な変化との関連を持つと想定されるのが DON 曝露と細胞死の関係である。マイクロアレイ解析ではシステインプロテアーゼをコードする遺伝子 *MCA1* の発現も DON などによって誘導されていた。この遺伝子は細胞周期の G1/S 期を促進する働きがあり、G1/S 期細胞の数は減少し、結果として G2/M 期にあたる産物が集積する。この特徴はトリコテセン系マイコ

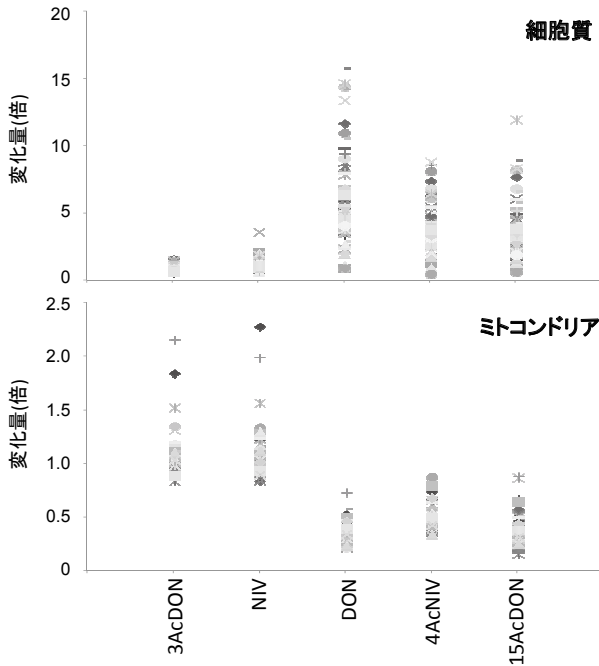


図6. タイプBトリコテセン曝露とリボソーム合成遺伝子群の発現変化

プロットはリボソーム合成遺伝子の各遺伝子がマイコトキシンの曝露によって示した発現量の変化を表す。

キシンの毒性である G2/M arrest に一致する。また、*MCA1* の欠損変異株では短期的に細胞の生存率が上昇する。そのため、この試験で検出された *MCA1* の発現誘導は細胞死（多細胞生物ではアポトーシスに相当）を誘発すると考えられる。細胞死メカニズムの一つとして、ミトコンドリア内で電子伝達に働いているシトクロム C が細胞質へ放出され、これがカスパーゼ 8 のイニシエーターとされる Mca1p の活性を上昇させることで細胞死が誘導される。この結果、細胞質における細胞分解酵素生成やストレス応答遺伝子の活性化が起こる反面、同時期にミトコンドリアの呼吸鎖は断たれ、活性が下がっている可能性が考えられる。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変化の網羅的解析は、個々の遺伝子発現の変化量を測定するツールとしてはノーザンブロット解析やリアルタイム PCR 解析に劣るものの、機能遺伝子群全体の発現傾向を掴むことに長けている。これまでトリコセセン系マイコキシンが G2/M 期停滞を引き起こすことは報告されていたが、その作用機序は深く調べられていなかった。本研究から得られた特徴的な遺伝子発現変化のデータは、そうした毒性症状の作用機序を明らかとするための一助となるであろう。(図 7)

#### < PAT の毒性を抑える抗酸化作用 >

PAT は細胞膜上に存在し、抗酸化機能を担っているグルタチオンに結合し、

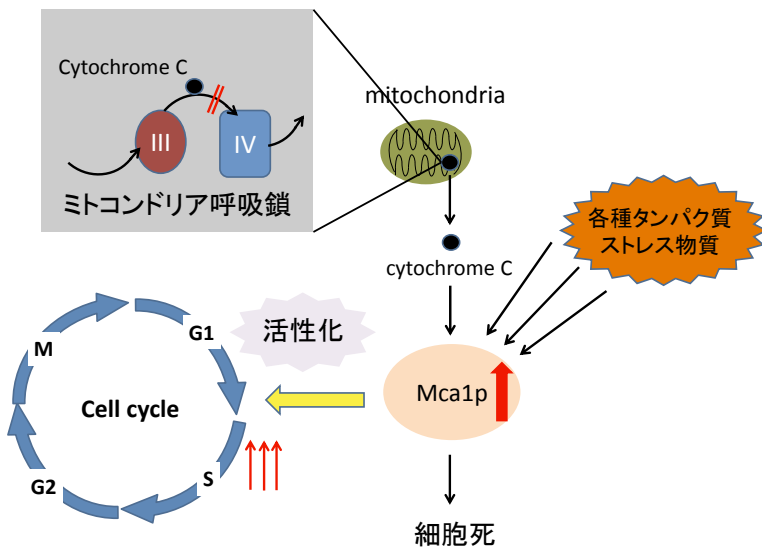


図 7. Mca1p による細胞周期の調節と細胞死の誘導

細胞周期右の赤矢印は G1/S 期の活性化を表し、G1/S 期に留まる細胞数は減少する。

細胞の抗酸化能を低下させる。これにより細胞内の活性酸素種が増加し、DNA に対する傷害やアポトーシスを誘導して細胞を傷つけるとされている。そこで、毒性緩和に関する情報を取得するために、我々は酵母の酸化還元酵素スーパーオキシドジスムターゼ 1 (*SOD1*) を欠損した変異株  $\Delta$ *SOD1* を用いた試験を実施した。これにより、酵母細胞においても PAT の毒性を確認する事が出来る。当該研究において、我々はカテキンやケイ皮酸メチル、没食子酸、L-システインなどの抗酸化物質を培地に加え、生育遅延の改善効果や DNA 発現量の変化を観察した。この中で顕著な生育改善効果を示したのがアスコルビン酸であった。アスコルビン酸はビタミン C として認知されている一般的な抗酸化物質であり、柑橘類の果汁にも豊富に含まれている。前章で述べたとおり、チャイニーズハムスター V79 細胞の実験系においてもアスコルビン酸が染色体異常を緩和しており、酵母でも同様の結果が得られた。また、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、アスコルビン酸を同時に添加した PAT 曝露条件の酵母細胞では、DNA ダメージ応答遺伝子や DNA 修復遺伝子の発現量の変化が PAT のみを曝露した条件と比べて抑えられた<sup>23)</sup>。これはアスコルビン酸の抗酸化作用によって細胞内の活性酸素種が抑えられたために DNA ダメージが抑えられたことを示唆している。また、鉄代謝系の遺伝子が増加し、多くの場合アスコルビン酸の添加によって PAT 曝露由来の遺伝子発現変化が抑えられた。(図 8)

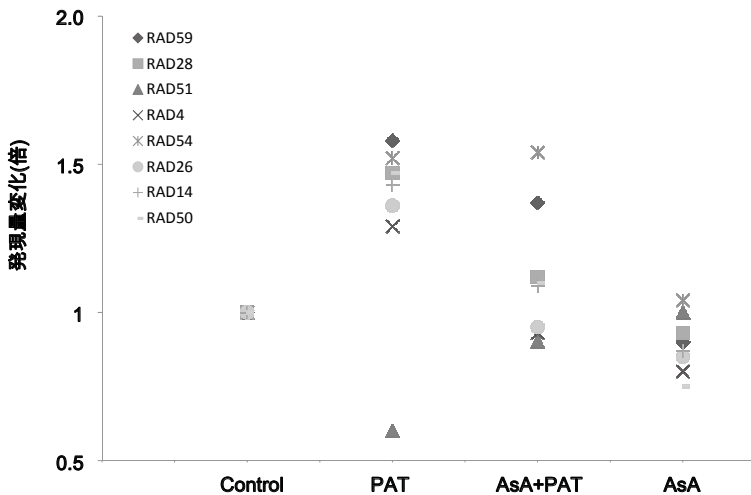


図 8. パツリン (PAT) 曝露及びアスコルビン酸 (AsA) 添加条件における DNA 修復遺伝子群の発現変化

PAT(-), AsA(-) = control=1 倍として、各条件における遺伝子発現変化を表示。

酵母の細胞膜上には3価の鉄イオンを取り込むトランスポーターと2価の鉄イオンを取り込むトランスポーターが存在し、PATの曝露によって2価の鉄イオントランスポーターの発現が抑制されていた。また細胞質内では3価となった鉄イオンが2価に変換されてミトコンドリアに取り込まれ、鉄硫黄クラスターが形成され、再び細胞質に放出されてクラスターを完成させるが、ミトコンドリア内の鉄硫黄クラスター形成遺伝子も発現が抑制されていた。これにより細胞内の酸化還元状態の更なる悪化が引き起こされ、活性酸素種の増加に繋がるのではないかと考えられた。動物細胞において観察されているNPBやMNといった染色体の切断を伴う異常にも、これと同様のメカニズムに起因する酸化還元状態の変化が影響しているものと思われる。では、動物における毒性症状と酵母細胞内の影響はどのようにリンクしているのか？(図9)

ヒトや動物において、鉄は3価のイオンとして摂取されて腸管へと至る。同様にマイコトキシンも十二指腸を始めとする腸管上皮細胞に到達する。動物は3価の鉄イオンを取り込む事が出来ないが、腸管上皮細胞表面には3価の鉄を2価に還元し、細胞内に取り込む仕組みが存在する<sup>24)</sup>。この2価の鉄イオンは更に門脈中へ放出された後、3価の鉄イオンに変換されてトランスフェリンによって各種組織や臓器へと運ばれるのである。しかし、PATの毒性によって腸管上皮における還元力が低下すると、鉄イオンは3価のまま還元されず、鉄欠乏の症状を呈すものと考えられる。酵母細胞における鉄代謝遺伝子の変化もこれと同様に細胞表面の還元力低下に起因する症状であると推測される。一方アスコルビン酸は還元作用を有するため鉄イオンを2価に還元し、細胞内に取り込み易くする効果がある。(図10)

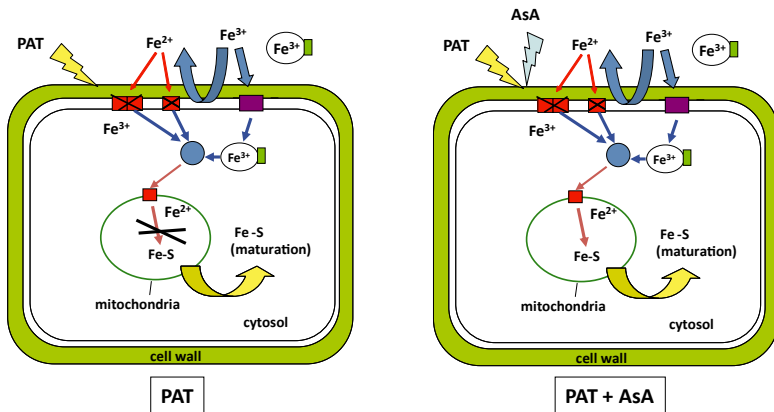


図9. 酵母細胞内における鉄イオン代謝とパツリン (PAT) 及びアスコルビン酸 (AsA) の影響

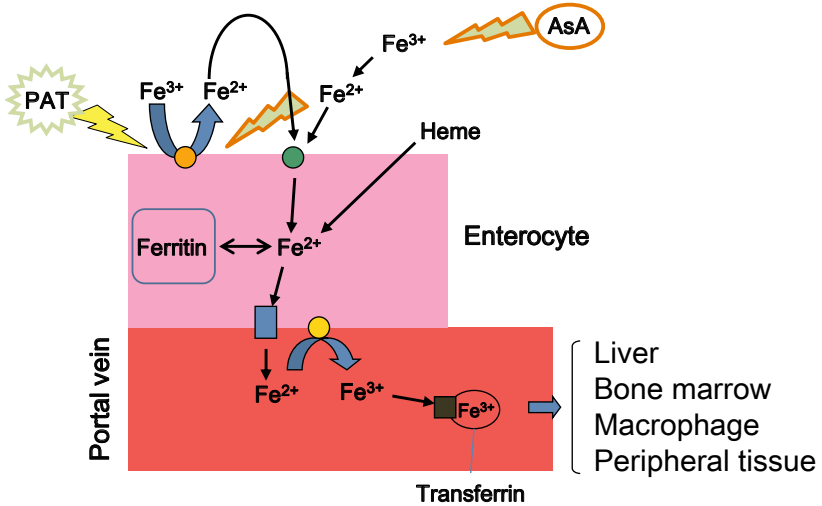


図 10. 生体内鉄イオンの取り込み機構におけるパツリン (PAT) の阻害作用とアスコルビン酸 (AsA) による緩和

実際に、ヒトリンパ球系の培養細胞である U-937 細胞では、アスコルビン酸の添加によって 2 価鉄イオンの取り込みが増加する<sup>25)</sup>。チャイニーズハムスターの V79 細胞におけるアスコルビン酸の添加効果もこうした還元作用が影響しているものと思われ、酵母細胞のみならず動物細胞における鉄代謝異常にも有効性を示す可能性が高い。我々の知見と過去の報告をまとめると、PAT の曝露に起因する鉄代謝異常に関してはアスコルビン酸の存在によって緩和される。しかし、動物細胞および酵母細胞においても、アスコルビン酸の添加のみによる完全な回復は観察されていない。これは V79 細胞の報告でも、我々の遺伝子発現変化のデータからも確認できる。鉄取り込みに関連する遺伝子の発現変化異常もある程度残ったままとっている。PAT の毒性を完全に抑えるため、こうした遺伝子に着目すると毒性メカニズムの解明を進める助けになるだろう。しかし、PAT の研究において、酵母細胞で検出されたミトコンドリアにおける鉄硫黄クラスター形成遺伝子の変化に対して動物における対応したデータが無い。これはマイコトキシンの毒性評価に用いる動物細胞が分化した組織に由来するため、マイコトキシンの直接的な攻撃対象となる腸管上皮細胞や、染色体異常など特定の症状を観察しやすい細胞が研究対象となりやすいことに起因している。動物細胞を用いた試験の場合、鉄代謝異常のような一連の流れは複数の組織を横断的にモニタリングする必要があるが、これは培養細胞試験では再現できず、時として見逃される可能性がある。このような面から、酵母細胞のような基礎的な細胞試験

系を用いる試験でも、動物細胞試験では補いきれない知見を獲得する事が可能と考えられる。

## 5. 藻類を用いたマイコトキシンの毒性評価

マイコトキシンの毒性は主としてヒトや家畜等の経済動物、あるいはペットへの影響を想定して調査されている。しかし、マイコトキシンの動物に対する毒性というものは、カビのライフサイクルに対して必須の存在ではない。その生存・繁栄に必須の生体は寄生対象となる植物である。実際に小麦赤かび病の原因菌も産生する DON が葉片の白化や根の伸長抑制に影響している事が報告されており、一方で、植物体の防御応答に呼応してマイコトキシンの産生が開始するという報告も上がっている。つまり、繁殖に適した環境を整えるためにマイコトキシンが細胞傷害を誘発し、植物の防御応答を無効化している可能性がある。現在までのところ、こうした寄生メカニズムとマイコトキシンの役割に関する研究の情報は限られているが、今後多くのマイコトキシンについてメカニズムが明らかになっていくだろう。では、植物体は為す術もなくカビに寄生されるのかというと、そうではないようだ。植物が体外へ放出する防御応答物質の一種としてグルコシルトランスフェラーゼが挙げられる。この酵素はマイコトキシンにグルコースを結合させる働きがあり、グルコシド化されたマイコトキシンは元のマイコトキシンと比べて大幅に毒性が下がるという報告がなされている<sup>26)</sup>。これまで検出技術が確立していなかったためにグルコシド体の存在は注目されていなかったが、近年複数のマイコトキシンにグルコシド体が存在することが示唆されている。今後動植物に対する影響の評価も進むであろう。

では、こうした防御応答機構以外にマイコトキシンの毒性に作用する要因は存在しないのであろうか？マイコトキシンの挙動は化学構造に左右される面が多いため、基本的には生物種を問わずその毒性メカニズムは共通している。一方で、植物組織として最も特徴的と言えるのは光合成や光感受性に関わるメカニズムであるが、これらの機構は動物細胞に存在しないため、マイコトキシンがどのように影響するのか評価が進んでいない。そこで、我々は光感受性や光合成研究のモデル細胞として用いられている単細胞の微細藻類であるクラミドモナスに対するマイコトキシンの毒性を調査している。これは Alexander ら<sup>27)</sup> が以前クラミドモナスを使用した実験系でトリコテセン系マイコトキシンの毒性評価を実施しており、利用可能と思われたためである。また、モデル生物でもあるため組換え体の入手容易性や近年光合成関連遺伝子群を網羅的に搭載したマイクロアレイチップも報告されたこと、さらには高等植物と異なり藻類であるため、細胞が均質で培養も短期間で済むことが利点である。更にクラミドモナスが藻類の中でも優れているのは、光条件を失っても培地から栄養を取り込み生育する事が出来るヘテロトロフであり、光合成関連の機能を欠損しても細胞の維持が可能な事である。



この特徴は完全暗所条件におけるマイコトキシン曝露試験が実施可能なことを意味しており、光合成経路の働かない植物細胞におけるマイコトキシンの曝露影響を評価可能ということである。実際に光条件の有無を設定してタイプBトリコテセンの曝露試験を実施したところ、光条件の有無によらず感受性の傾向は一致した。(図 11)

次に光の波長について着目した。クラミドモナスはクロロフィル a, b を持っており、一般的な高等植物と同様である。また、これらのクロロフィルは 450-470nm 付近の青色光及び 660nm 付近の赤色光を効率的に利用する。我々はこれらの波長域に対応した LED 光と、コントロールとして白色 LED を準備し、さらに赤：青 = 3：1 のミックス光それぞれを光条件としてマイコトキシンの曝露を実施した<sup>28)</sup>。しかし、波長ごとの増殖効率は異なるものの、マイコトキシンに対する感受性の傾向に大きな変化は見られなかった。光の有無および波長の変化が感受性の傾向に変化を示さなかったことで、マイコトキシンの曝露影響は光合成系にはまったく影響していないものと考えたが、一部のマイコトキシンの感受性が大きく上がっている事を見出した。光の有無や波長帯の違いではなく、光の強さの変化がマイコトキシン感受性に影響するかもしれないということが想定され、光の強さを变化させた曝露試験を実施し、4AcNIV や 15AcDON などは光強度が強まると感受性が高くなる傾向を示した(ここで言う光強度とは光合成光量子束密度と呼ばれるもので、光合成に利用される 400 ~ 700nm の波長帯の放射照度に係数を掛けて波長ごとに算出する数値であり、目視による明るさとは異なる)。これが他の植物細胞でも再現される現象であるならば、作物の栽培環境における光条件の影響がマイコトキシン抵抗性を変化させ、カビの感染を誘発、あるいは抑制するかもしれない。光の強さは植物の生長だけでなくストレスにも関わる重要なファクターである。こうした研究もまた、作物の栽培現場におけるカビ感染の低減に役立てるものと考えている。(図 12)

## 6. おわりに

近年、国内はもとより世界各地で極端な気象現象が頻発しており、農産物の安定的な栽培に悪影響を与えている。また、新興国の消費拡大や農地の劣化によって、安価で良質な農産物の安定供給にも問題が生じ始めている。このような状況

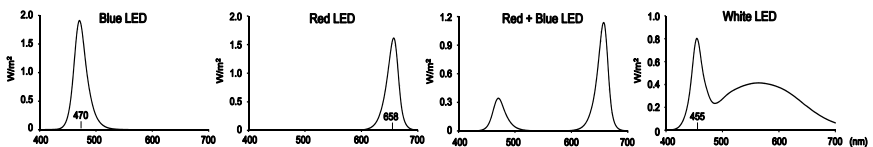


図 11. クラミドモナスの生育に用いた LED 光源の波長特性

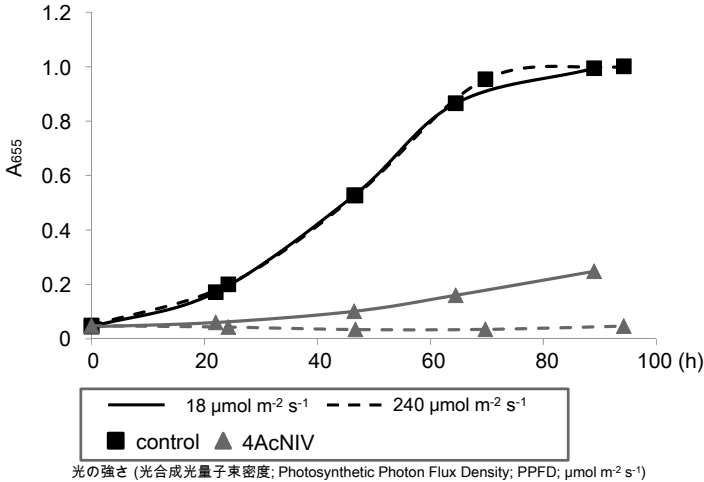


図 12. クラミドモナスの 4AcNIV 感受性に対する光条件の影響

が、国産・輸入を問わずマイコトキシン汚染農産物の流通する可能性を、若干ながら高めつつある。また、地産地消やインターネットの発達によって、メジャーな流通経路を経ないで取引される農産物も増えている。これらはマイコトキシン汚染の実態が調査されていないため、消費者のマイコトキシンの曝露リスクを増加させ、リスクファクターを複雑化させている。これを解決するためには消費者自身が正しい情報を認識した上で、それらのリスクと向き合う必要がある。マイコトキシンの毒性やその低減に関する情報の提供は、今後消費者のリスク管理に資する判断材料になると考えている。

(応用微生物研究領域 微生物評価ユニット 鈴木 忠宏)

## 7. 参考文献

- 1) Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., (2007) Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* **137**, 265-282.
- 2) Reddy, K. R., Reddy, C. S., Muralidharan, K., (2009) Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. *Food Microbiol* **26**, 27-31.
- 3) Guengerich, F. P., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Yamazaki, H., Shimada, T., (1996) Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ Health Perspect* **104**, 557-562.
- 4) Moudgil, V., Redhu, D., Dhanda, S., Singh, J., (2013) A review of molecular

- mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **32**, 165-175.
- 5) Forsell, J.H., Jensen, R., Tai, J.H., Witt, M., Lin, W.S., Pestka, J.J., (1987) Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. *Food Chem Toxicol* **25**, 155-162.
  - 6) Alm, H., Brüssow, K.P., Torner, H., Vanselow, J., Tomek, W., Dänicke, S., Tiemann, U., (2006) Influence of *Fusarium*-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reprod Toxicol* **22**, 44-50.
  - 7) Pestka, J.J., (2007) Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* **137**, 283–298.
  - 8) Ueno, Y., (1984) Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol* **4**, 124-132.
  - 9) Laskin, J.D., Heck, D.E., Laskin, D.L., (2002) The ribotoxic stress response as a potential mechanism for MAP kinase activation in xenobiotic toxicity. *Toxicol Sci* **69**, 289-291.
  - 10) Prelusky, D.B., Hartin, K.E., Trenholm, H.L., Miller, J.D., (1998) Pharmacokinetic fate of <sup>14</sup>C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam Appl Toxicol* **10**, 276-286.
  - 11) Yoshizawa T., Cote L.M., Swanson S.P., Buck W.B., (1986) Confirmation of DOM-1, a Deepoxidation Metabolite of Deoxynivalenol, in Biological Fluids of Lactating Cows. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 227-229.
  - 12) Azcona-Olivera, J.I., Ouyang, Y.L., Warner, R.L., Linz, J.E., Pestka, J.J., (1995) Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) and cycloheximide on IL-2, 4, 5 and 6 secretion and mRNA levels in murine CD4+ cells. *Food Chem Toxicol* **33**, 433-441.
  - 13) Thust, R., Kneist, S., Mendel, J., (1982) Patulin, a further clastogenic mycotoxin, is negative in the SCE assay in Chinese hamster V79-E cells in vitro. *Mutat Res* **103**, 91-97.
  - 14) Glaser, N., Stopper, H., (2012) Patulin: Mechanism of genotoxicity. *Food Chem Toxicol* **50**, 1796-1801.
  - 15) Alves, I., Oliveira, N.G., Laires, A., Rodrigues, A.S., Rueff, J., (2000) Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis* **15**, 229-234.
  - 16) Horváth, E., Papp, G., Belágyi, J., Gazdag, Z., Vágvölgyi, C., Pesti, M., (2010) In vivo direct patulin-induced fluidization of the plasma membrane of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Food Chem Toxicol* **48**, 1898-1904.
  - 17) Mohan, H.M., Collins, D., Maher, S., Walsh, E.G., Winter, D.C., O'Brien, P.J.,

- Brayden, D.J., Baird, A.W., (2012) The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability *in vitro*. *Food Chem Toxicol* **50**, 4097-4102.
- 18) Miyata, M., Takano, H., Guo, L.Q., Nagata, K., Yamazoe, Y., (2004) Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B<sub>1</sub>-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis* **25**, 203-209.
- 19) Suzuki, T., Iwahashi, Y., (2009) Gene expression profile of MAP kinase PTC1 mutant exposed to Aflatoxin B<sub>1</sub>: dysfunctions of gene expression in glucose utilization and sphingolipid metabolism. *Chem-Bio Informatics Journal* **9**, 94-107.
- 20) Stevens, V.L., Tang, J., (1997) Fumonisin B<sub>1</sub>-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *J Biol Chem* **272**, 18020-18025.
- 21) Lown, K.S., Bailey, D.G., Fontana, R.J., Janardan, S.K., Adair, C.H., Fortlage, L.A., Brown, M.B., Guo, W., Watkins, P.B., (1997) Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* **99**, 2545-2553.
- 22) Suzuki, T., Iwahashi, Y., (2012) Comprehensive gene expression analysis of type B trichothecenes. *J Agric Food Chem* **60**, 9519-9527.
- 23) Suzuki, T., Iwahashi, Y., (2011) Gene expression profiles of yeast *Saccharomyces cerevisiae* sod1 caused by patulin toxicity and evaluation of recovery potential of ascorbic acid. *J Agric Food Chem* **59**, 7145-7154.
- 24) Muñoz, M., Villar, I., García-Erce, J.A., (2009) An update on iron physiology. *World J Gastroenterol* **15**, 4617-4626.
- 25) May, J.M., Qu, Z.C., Mendiratta, S., (1999) Role of ascorbic acid in transferrin-independent reduction and uptake of iron by U-937 cells. *Biochem Pharmacol* **57**, 1275-1282.
- 26) Nagl, V., Schwartz, H., Krska, R., Moll, W.D., Knasmüller, S., Ritzmann, M., Adam, G., Berthiller, F., (2012) Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats. *Toxicol Lett* **213**, 367-373.
- 27) Alexander, N.J., McCormick, S.P., Ziegenhorn, S.L., (1999) Phytotoxicity of selected trichothecenes using *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system. *Nat Toxins* **7**, 265-269.
- 28) Suzuki, T., Iwahashi, Y., (2014) Phytotoxicity evaluation of type B trichothecenes using a *Chlamydomonas reinhardtii* model system. *Toxins* **6**, 453-463.