

研究ノート

食用きのこを用いたアフラトキシンB₁の分解中川 博之, 矢部 希見子[§]

食品総合研究所, 305-8642茨城県つくば市観音台2-1-12

[§] コレスポンディングオーサーDegradation of aflatoxin B₁ by edible mushroomsHiroyuki Nakagawa and Kimiko Yabe[§]

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

[§] Corresponding author, Kimiko Yabe

Abstract

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most potent carcinogenic and toxic substance among many kinds of mycotoxins. We did screening for AFB₁ degradation activity from some edible mushrooms. When AFB₁ was incubated with culture medium of each edible mushroom at 30°C for 5 days, amount of AFB₁ remarkably decreased; instead, another fluorescent substance was newly formed, which was placed under AFB₁ on thin layer chromatography plate. The same degradation activities were also observed when culture media of *Pleurotus ostreatus* strains were used. The AFB₁ degradation activity could be precipitated by 85% ammonium sulfate fractionation, indicating that a certain enzyme was likely involved in the degradation reaction.

アフラトキシンは *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus tamarii* などの一部の糸状菌が産生するかび毒 (Mycotoxin) である¹⁾. アフラトキシンは強力な毒性と発ガン性を有しているため, 穀物などの農作物における汚染は世界中で深刻な問題となっており²⁻³⁾, アフラトキシン汚染が原因で廃棄されている穀物の量は莫大である. アフラトキシンにはアフラトキシンB₁, アフラトキシンB₂, アフラトキシンG₁, アフラトキシンG₂の4つの異性体が存在することが知られているが, 中でもアフラトキシンB₁ (AFB₁) は最も毒性が強く, また糸状菌が産生する量も特に多いため, 最も注目されており, 世界各国で規制値が設定されている. 食品中のアフラトキシンを除去あるいは無毒化する方法として物理的, 化学的, 微生物学的手法など, さまざまな方法が提案されている⁴⁾.

現在広く採用されているアフラトキシンの無毒化方法はアンモニアガスによる処理であるが, この手法は特殊な装置が必要であるだけでなく, アルカリ性条件であるため, 処理された農作物の品質劣化や栄養成分の損失が起こる可能性がある⁵⁻⁶⁾. 室温, 中性条件下のような温和な条件で利用可能な, かつ特別な装置を必要としない簡便なアフラトキシンの処理法が確立されれば, 食品産業に大変有用である.

一方, 木材腐朽菌として知られるきのこ (担子菌) の一部にはマンガンペルオキシダーゼ, リグニンペルオキシダーゼ, ラッカーゼのような有害物質を分解する酵素を産生するものが報告されており, 中にはダイオキシンやPCB, ポリエチレンやナイロン, ビスフェノールAなどの難分解性物質の分解活性を有するものもある⁷⁻¹⁰⁾. 筆者らは木材腐朽菌である担子菌の中でも,

2006年12月22日受付, 2007年1月29日受理

[§] 連絡先 (Corresponding author)

特にヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を中心とする食用きのこのに注目し、結果としてこれらの培養上清にAFB₁分解活性があることを見出した。

実験方法

1. 使用菌株

ヒラタケ標準菌4株 (*Pleurotus ostreatus* ATCC32783, ATCC38537, ATCC38538, ATCC52947) は農業・食品産業技術総合研究機構森林総合研究所中村雅哉博士より、ヌメリシギタケモドキ *Pholiota aurivella* IFO30265 は食品総合研究所小林秀行博士より供与頂いた。

2. きのか培養上清の調製

きのこの培養には0.5%酵母エキスを含むポテトデキストロース (PD) 培地を用いた。PD培地粉末 (カタログ番号 254920, Difco laboratories, アメリカ合衆国) 4.8g と酵母エキス (カタログ番号15838-45; ナカライテスク株式会社) 1.0gを蒸留水 200 ml に加えた後、電子レンジにて加熱溶解した。これを 10ml ずつ 100ml 容三角フラスコに分注し、アルミホイルを2枚重ねたもので蓋をしてオートクレーブ滅菌 (121℃, 15分) した。ここに各菌株の菌糸を5mm 四方×2mm程度の厚さで保存用スラントから切り取ったものを4切片接種した。培養には暗室型人工気象器LH-200RDS (日本医化器械製作所) を使用し、28℃, 湿度70%にて培養を行った。菌糸が液体培地表面を完全に覆った時点 (培養10-12日目) で菌糸を取り除き、回収した培養液をMillex-HV親水性フィルター (ポアサイズ 0.45 μm, 13mm, カタログ番号 SLHV013SL; Millipore, アメリカ合衆国) で濾過したものを反応に用いた。また、使用後は-80℃にて凍結保存した。

菌株の保存にはポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地スラントを使用した。PDA培地粉末 (カタログ番号213400, Difco laboratories) 39g に1Lの蒸留水を加え、加熱溶解した後試験管に分注した。綿栓をした後、オートクレーブ滅菌して斜度をつけた状態で放冷固化させ、スラントにしたものをを用いて定期的に植え継ぎを行った。

3. アフラトキシンB₁の分解

2種類の組成の異なる反応液でAFB₁分解試験を行った。a) きのか培養上清380 μl に Tween80 を2.5% (w/v) 含む100mMクエン酸リン酸緩衝液 (McIlvaine緩衝液; pH6.0)¹¹⁾ 100 μl, 100mM MgSO₄ 水溶液 10 μl, 蒸留水

5 μlを添加して反応液を調製した。b) きのか培養上清380 μlにTween80を2.5% (w/v) 含む100mMクエン酸リン酸緩衝液 (pH4.5) 100 μl, 100mM MnSO₄水溶液10 μl, 50mM過酸化水素水溶液5 μlを添加して反応液を調製した。各々の成分を1.5mlマイクロチューブに分取し、30℃にて保温した後、1.6mM AFB₁ジメチルスルホキシド (DMSO) 溶液を5 μl添加して反応を開始した。反応開始時における反応溶液 (500 μl) 中の各成分の濃度は、金属イオン (Mg²⁺ およびMn²⁺) 2mM, 過酸化水素 (反応条件bのみ使用) 0.5mM, AFB₁ 16 μM, Tween80 0.5% (w/v) である。反応条件aはLiuら¹²⁾ により報告されている糸状菌 *Armillariella tabescens* の培養液によるAFB₁の分解条件に合わせたものであり、反応条件bはきのこ由来の酵素でしばしば難分解性物質の分解に利用が報告されているマンガンペルオキシダーゼの典型的な反応条件¹³⁾ に合わせたものである。

所定の時間反応後、反応液の一部 (50-100 μl) を採取して、等量のクロロホルムで抽出後、遠心分離 (10,000 g × 2分) を行った。得られたクロロホルム層 (下層) のうち2 μlをシリカゲルプレート (Silica gel 60, カタログ番号5721; Merck, ドイツ) にスポットして、薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析を行った。展開溶媒にはクロロホルム-酢酸エチル-90%ギ酸の混合液 (6:3:1 v/v/v) を用いた。検出は溶媒をドラフト内にて蒸発乾燥させた後、暗所にて紫外線ランプ光 (365 nm) を照射し、AFB₁の青色蛍光により確認した。TLCプレート画像の撮影は Fluor-S/MAX マルチイメージングシステム (Bio-rad Laboratories, アメリカ合衆国) により行った。

4. 硫酸アンモニウム沈殿・脱塩

硫酸アンモニウムを乳鉢で擦り、微細な粉末にしたものを用意した。これを1.824g 量りとり、きのこ培養上清3mlに徐々に添加して溶解した。これは硫酸アンモニウム飽和濃度の85%に相当する。3時間氷浴上で冷やした後、遠心分離 (4℃, 10,000 g × 30分) を行った。得られた沈殿を100mMクエン酸リン酸緩衝液 (pH6.0) 300 μlに溶解し、4℃にて保存した。

硫酸アンモニウム沈殿後の溶液には高濃度の硫酸アンモニウムが残存しているので、これを除くために透析操作による脱塩を行った。透析はBio-Tech 透析カップ MWCO8000 (再生セルロース膜) とBio-Tech 微量透析装置低速タイプ (第一化学薬品株式会社) を用いて、装置使用説明書に準じて行った。すなわち、沈殿の溶液150 μlを透析カップ中にセットして、あらかじめ冷や

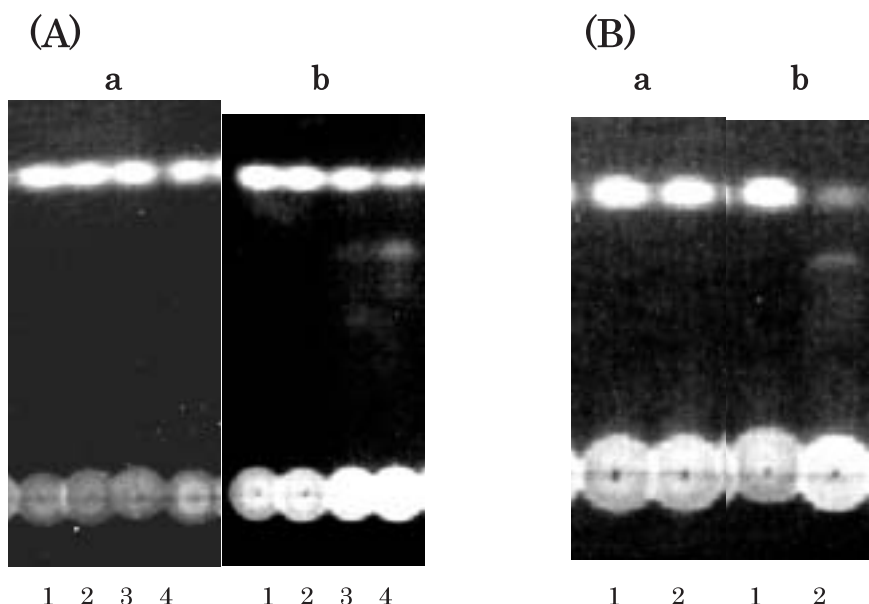


Fig. 1 TLC analyses of AFB₁ degradation products. AFB₁ was incubated with the culture medium of *Pleurotus ostreatus* ATCC52947 (A) and *Pholiota aurivella* IFO30265 (B) in the presence of 2 mM MgSO₄ at pH 6.0 (Condition a), or in the presence of 2 mM MnSO₄ and 0.5mM H₂O₂ at pH 4.5 (Condition b). Incubation time was 0 day (lane 1), 1 day (2), 3 days (3), or 5 days (4) in the panel (A), and 0 day (1) or 5 days (2) in the panel (B).

しておいた 10mMクエン酸リン酸緩衝液 (pH 7.0) 約 250 mlをチャンバーに満たし, rate 2にて60分間の透析を行った. チャンバー内のクエン酸リン酸緩衝液を新しいものに入れ替え, 再度行い, 合計 2 回透析を行った. 2 回の透析により, 150 μ lだった沈殿溶液の容量は約250 μ lに増加した. 透析後のサンプルは-80℃にて凍結保存した.

実験結果

1. アフラトキシンB₁の分解

一例として, 反応条件a (中性条件, マグネシウムイオン存在下) と反応条件b (酸性条件, マンガンイオンおよび過酸化水素存在下) における*Pleurotus ostreatus* ATCC52947と*Pholiota aurivella* IFO30265の培養上清を用いた反応のTLC結果を Fig. 1 に示した. 反応条件a (Fig. 1 各パネル中左側の写真) ではAFB₁の残量に特に変化は見られなかったが, 反応条件b (Fig. 1 各パネル中右側の写真) においては5日後に明らかにAFB₁が減少していることが確認された. また, 同時にAFB₁よりも小さいRf値をもつ別の蛍光物質が生成していることが観察された. Rf値がAFB₁よりも小さいことから, この生成物質はAFB₁よりも高極性の物質であると思われる.

コントロールとしてきのこの代わりに滅菌水を用いた反応液を調製して同様な実験を行ったが, AFB₁の減少や蛍光物質の生成は見られなかった. 同様に, 反応液からAFB₁を除いた場合にも, 蛍光物質の生成は認められなかった. したがって, AFB₁の減少と蛍光物質の生成は, きこの培養上清とAFB₁が共存した場合にのみ起こったといえる. また, 反応条件aではAFB₁がほとんど減少しなかったことから, これらの反応にはマンガンイオンや過酸化水素が必要である可能性が示唆された.

各種食用きのこの培養上清を用いて, 反応条件a, bにおけるAFB₁分解試験を行った結果をTable 1に示す. AFB₁分解活性は *Pleurotus ostreatus* ATCC 4 株のうち3株において検出された. また, いずれの菌株においても反応条件bにおいて分解活性が見られ, 反応条件aでは有意な活性を示す菌株は見られなかった. 反応条件bにおいてAFB₁分解活性を示したきのこの培養液についてMnSO₄を加えない反応系で試験を行ったところ, 全ての菌株の培養液においてAFB₁分解活性は保持されていた (データ表示なし). したがって, 今回筆者らがこれらのきのこの培養液に見いだしたAFB₁分解活性はマンガンペルオキシダーゼに由来するものではないと思われる. また, Table 1 に挙げた標準菌株以外にも当研究室保有の食用きのこのについて同様な試験を行ったと

Table 1 AFB₁ degradation with edible mushroom culture medium

Mushroom	Activity	
	Condition a	Condition b
— ^a	—	—
<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC38537	—	—
<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783	—	+
<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC38538	—	+
<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC52947	—	+
<i>Pholiota aurivella</i> IFO 30265	—	+

^a Distilled water was added in place of mushroom culture medium

ころ、いずれも反応条件bにおいて、*Pleurotus ostreatus* 28株中20株が AFB₁ 分解活性を示した。この他にもトキイロヒラタケ *Pleurotus salmoneostramineus* 6 株、タモギタケ *Pleurotus cornucopiae* 8 株について試験を行ったが、後者で反応条件bにおいて弱い活性を示したものが1株得られたのみで、有意な活性を有する菌株はほとんどなかった（中川、未発表）。

2. 硫酸アンモニウム沈殿の影響

きのこ培養上清からAFB₁分解活性成分を濃縮・回収するために、硫酸アンモニウム沈殿を行った。硫酸アンモニウム沈殿と脱塩操作により、およそ6倍に濃縮されたタンパク質溶液を従来と同じ方法でAFB₁分解に使用した。ただし、今回は反応条件bのみで反応を行った。また、*Pleurotus ostreatus*の反応2日目まで明確なAFB₁の減少と、それに伴う高極性の蛍光物質の生成が確認された。すなわち、AFB₁分解活性は硫酸アンモニウム沈殿や脱塩操作後も保持されており、きのこ培養液中の低分子物質によるものではなく、分子量8000以上の高分子物質（酵素などのタンパク質）に由来するものであるといえる。一方、*Pholiota aurivella* IFO30265の培養上清を硫酸アンモニウム沈殿と脱塩操作に供したところ、AFB₁分解活性はほとんど検出されなくなった。この結果から、*Pholiota aurivella* で報告されたAFB₁分解活性は*Pleurotus ostreatus*の培養上清に含まれるものとは性質が異なるものであることが示唆された。

考 察

TLC分析においてAFB₁分解活性が確認された反応液中にはいずれの培養液を用いた場合でもAFB₁よりも小さいRf値を持つ（AFB₁よりも極性が高い）蛍光物質が生成していることが確認された（詳細省略）。一般に、

マンガンペルオキシダーゼによる反応はMn²⁺の酸化によって生じたMn³⁺が強力な酸化剤となって基質を酸化する非特異的酸化反応である¹⁴⁾ ため、特定の構造を有する反応生成物が蓄積する可能性は低いと思われる。このことと、MnSO₄を加えない反応系でAFB₁分解活性が保持されていたことを考えると、マンガンペルオキシダーゼ型の反応である可能性は否定される。一方、AFB₁分解活性に対する過酸化水素の影響については、過酸化水素を添加していない反応条件aにおいてほとんどAFB₁分解活性が見られなかったことを考えるとその依存性は高いと思われる。異なる菌株由来の培養液を用いたにもかかわらず、同じRf値と蛍光を有する反応生成物が確認されていることから、今回筆者らが見いだしたAFB₁分解活性は、食用きのこ、特にヒラタケ類に共通して見られる酵素由来のものであると思われる。マンガンペルオキシダーゼ産生菌である *Pholiota aurivella* IFO30265の培養液にマンガンペルオキシダーゼ以外の活性に由来すると思われる AFB₁分解活性が見られたのは予想外の結果であったが、同菌株はラッカーゼやリグニンペルオキシダーゼのような酸化酵素も産生する事が知られており、マンガンペルオキシダーゼ以外の酵素が優位に産生されている可能性は十分考えられる。

Motomura ら¹⁵⁾ は、*Pleurotus ostreatus* 菌株の培養液にAFB₁分解活性を見だし、硫酸分画と2段階のカラムクロマトグラフィー操作により、当該活性を有する分子量90kDaの酵素を精製している。本酵素はAFB₁分解にマンガンイオンを必要としないことから、マンガンペルオキシダーゼではないと思われる。また、AFB₁の分解活性に過酸化水素は必ずしも必要ではないと報告されている。本酵素は *Pleurotus ostreatus* の培養上清から得られているので、筆者らのAFB₁分解活性はMotomuraらの報告と同じ酵素由来である可能性も考え

られる。しかし、筆者らの実験ではAFB₁分解が見られた反応液中には蛍光を示す反応生成物が共通して検出されているが、Motomuraらの報告ではそのような蛍光物質の生成は確認されていない。したがって、筆者らの注目しているAFB₁分解活性はMotomuraらの報告例とは異なるものであると結論できる。

食用担子菌類は長年食用として利用されてきているため安全性は確認されており、きのこを用いてAFB₁分解系が構築できれば、実用化が期待される。本研究では、食用きのこのAFB₁分解活性を調べ、その結果、*Pleurotus ostreatus*の培養上清に高いAFB₁分解活性を見出した。しかし、蛍光物質として検出された反応産物や最終分解産物の構造及びこれらの物質の安全性の確認については今後の課題である。現在までのところ、AFB₁の変異原性がこれらの処理によって消失するという予備的結果を得ているが、今後さらに確認していく予定である。

要 約

食用きのこの培養上清についてアフラトキシンB₁ (AFB₁) 分解試験を行った。きのこの培養ろ液を用いてAFB₁を30℃にて5日間処理したところ、薄層クロマトグラフィーによりAFB₁の分解が確認され、同時にAFB₁よりもRf値が小さい蛍光物質が生成された。AFB₁分解活性は特に*Pleurotus ostreatus*から高頻度で検出された。*P. ostreatus*のAFB₁分解活性は硫酸アンモニウム沈殿や脱塩処理後も回収されたことから、当該活性は培養上清中に含まれる酵素に由来するものと結論した。

謝 辞

ヒラタケ標準菌4株*Pleurotus ostreatus* ATCC32783, ATCC38537, ATCC38538, ATCC52947 を分与頂きました農業・食品産業技術総合研究機構森林総合研究所きのこ・微生物研究領域中村雅哉主任研究員に、また、ヌメリシギタケモドキ*Pholiota aurivella* IFO30265を供与頂きました食品総合研究所食品バイオテクノロジー研究領域小林秀行研究領域長に深謝いたします。

本研究の一部は、農林水産省委託プロジェクト研究「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発」の助成により行われたものである。

文 献

- 1) Dvorackova, I. (1990) Aflatoxins and Human Health. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 2) Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Brown, R.L., Cary, J. W., Yu, J., and Chang, P. K., Preharvest aflatoxin contamination: elimination through biotechnology. In: Dhaliwal GS, Arora R, Randhawa NS, Dhawan AR (eds) Ecological agriculture and sustainable development, vol. 1. Indian Ecological Society. Ludhiana, India, pp 100-129 (1997).
- 3) Cleveland, T. E. and Bhatnagar, D., Molecular strategies for reducing aflatoxin levels in crops before preharvest. In: Bhatnagar D, Cleveland TE (eds) Molecular approaches to improving food quality and safety. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 205-228 (1992).
- 4) Doyle, M. P., Applebaum, R. S., Brackett, R. E., and Marth, E. H. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *J. Food. Prot.*, **45**, 964-971 (1982).
- 5) Park, D. L., Lee, L. S., Price, R. L., and Pohland, A. E. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: Current status and regulation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 685-703 (1988).
- 6) Park, D. L. Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food Addit. Contam.*, **10**, 49-60 (1993).
- 7) Takada, S., Nakamura, M., Matsuda, T., Kondo, R., and Sakai, K., Degradation of dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4323-4328 (1996).
- 8) Dietrich, D., Hickey, W. J., and Lamar, R., Degradation of 4-4' -dichlorobiphenyl, 3,3' ,4,4' -tetrachlorobiphenyl, and 2,2' 4,4' ,5,5' -hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete crysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3904-3909 (1995).
- 9) 西田友昭, リグニン分解菌及びその酵素によるポリエチレンとナイロンの分解, 化学と工業, **54**, p.903-906 (2001).
- 10) Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., and Kuwahara, M., Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1958-1962 (2000).
- 11) D. D.ベリン, B. デンプシー, 「緩衝液の選択と

- 応用」，辻啓一 訳，（講談社サイエンティフィク，東京），p. 152（1981）.
- 12) Liu, D. L., Yao, D. S., Liang, Y. Q., Zhou, T. H., Song, Y. P., Zhao, L., and Ma, L., Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifying enzyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food and Chem. Toxicol.*, **39**, 461-466（2001）.
 - 13) Morisaki, K., Fushimi, T., Kaneko, S., Kusakabe, I., and Kobayashi, H., Screening of phenoloxidases from edible mushrooms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2334-2336（2001）.
 - 14) Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M. H., Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, **28**, 6017-6023（1989）.
 - 15) Motomura, M., Toyomasu, T., Mizuno, K., and Shinozawa, T., Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Microbiol. Res.*, **158**, p. 237-242（2003）.