

## *Fusarium graminearum* ニバレノールアセチル化酵素 *Tri7* の異種発現

生命分子化学講座 応用菌学分野

船田真人

【背景と目的】赤カビ病が発生した穀物には、*Fusarium graminearum* が産生するカビ毒が含まれる。カビ毒の中でもデオキシニバレノール(DON)やニバレノール(NIV)は、摂取した生物に対し急性的・慢性的症状を引き起こす。NIVはDONと違い、暫定基準値は設定されていないが毒性は高いとされており、早急な基準値の設定、それに伴う検出・定量法の簡便化が必要不可欠である。NIVの定量法の1つにELISA法があり、前処理として化学的なアセチル化が必要なことが問題である。微生物酵素を用いることで迅速かつ簡便なアセチル化が期待できる。*F. graminearum*はDONやNIVの生合成経路でアセチル化を行っており、酵素遺伝子は特定されているが、酵素としての学的研究はなされていない。そこで本研究では、NIV C-4位のアセチル化酵素 *Tri7* を様々な宿主に発現させ、前処理に応用することを目指した。

【方法】*F. graminearum* KU1697株から *Tri7* 遺伝子のcDNAを得て、種々の宿主に特異的な発現用ベクターを構築した。発現宿主には大腸菌 *Escherichia coli*、麹菌 *Aspergillus oryzae*、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、酵母 *Pichia pastoris* を用いた。宿主に発現用ベクターを導入し、形質転換体を発現用培地で培養した。菌体と培養液をそれぞれ回収してSDS-PAGEを行い、染色およびWestern blottingで *Tri7* の発現確認を行った。また基質と酵素を反応させ、薄層クロマトグラフィー(TLC)で酵素活性を確認した。

【結果】大腸菌および麹菌による発現では、SDS-PAGE後の染色で目的タンパク質を示すバンドは確認できなかった。酵母 *S. cerevisiae* で発現させ、Western blottingで目的酵素の存在を調べたところ、不溶性画分にのみシグナルが見られたため酵素反応を行ったが、アセチル化反応は進行しなかった。酵母 *P. pastoris* で発現培養した後、ゲル染色およびWestern blottingを行ったところ、目的酵素のバンドが確認できた。酵素反応を行ったところ、4位アセチルニバレノールではないが、何らかの反応産物が検出された。

【考察と結論】アミノ酸配列から、*Tri7*は8回膜貫通の膜酵素だと推定された。そのため一般的なタンパク質発現宿主である大腸菌や麹菌、酵母では、膜酵素の発現は困難であったと考えた。酵母 *P. pastoris* は膜タンパク質を細胞外に分泌した報告もされており、今回も目的の酵素は発現されたものの、酵素反応が進行していないことから推定化合物以外の化合物の合成を促した可能性がある。膜酵素を可溶性画分に発現させ、かつ酵素活性を有したまま取り出すためには、培養条件や酵素反応の条件を検討する必要がある。