

# 「カビ毒の生産阻害による汚染防除」

東京大学大学院農学生命科学研究科  
作田 庄平

# カビの二次代謝産物とマイコトキシン

カビの種類：

69,000種（1991年）

全体で20万～150万種と推定される

カビの二次代謝産物：

約6,000の既知物質

未知物質の方がはるかに多い（99%以上未知）

約10%の化合物が人や家畜に毒性（マイコトキシン）

# History of mycotoxin research in Japan

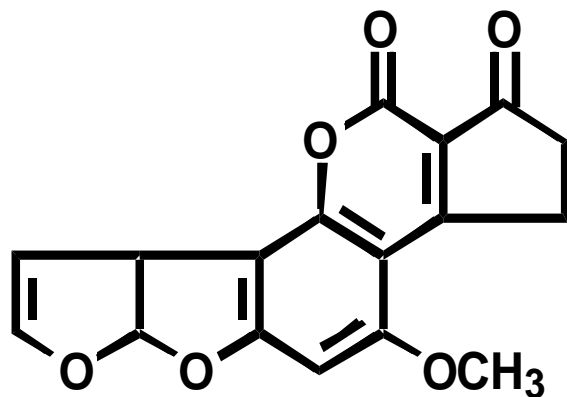
(日本マイコトキシン学会HPより <http://www.jsmyco.org>)

As early as the **1890s** in Japan, with the aim of establishing the role of **“moldy rice” in the beriberi**, certain moldy rice samples were subjected to toxicity tests, and proved to be **neurotoxic to rabbits by Sakaki *et al.*** This experiment suggested the presence of a mycotoxin. Later, a toxic fungus, *Penicillium toxicarium* Miyake (= *Penicillium citreo-viride*) was discovered from the so-called **“yellow rice” imported to Japan and in domestic rice samples by Miyake *et al.*** Citreoviridin was newly isolated from the fungus as a toxic metabolite by **Hirata *et al.* in 1947**, and a series of **toxicological experiments on citreoviridin** was carried out by **Uraguchi *et al.* in 1947-1955**. They concluded that there was close resemblance between the experimental symptoms and clinical manifestations of acute cardiac beriberi which were reported earlier in man by pathologists and doctors in Japan and abroad.

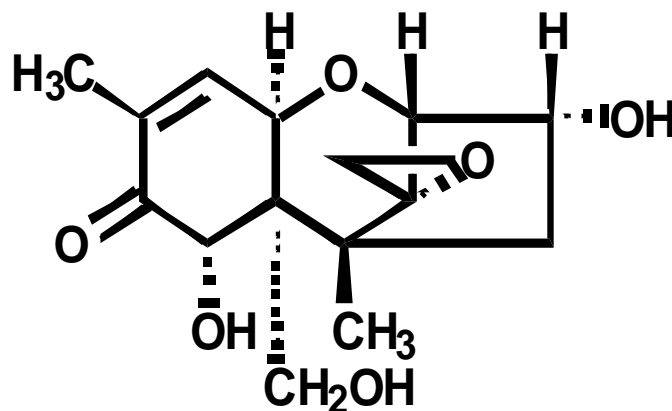
**In 1948**, *Penicillium islandicum* Sopp and its mycotoxins, **luteoskyrin and cyclochlorotine**, were found in the **hepatotoxic yellowed rice** distributed widely throughout the rice-producing countries of the world. In addition, *Penicillium citrinum* Thom, producing citrinin, was isolated from the nephrotoxic yellowed rice found in Southeast Asia. Thus, it should be emphasized that early work in Japan represented the first systematic mycotoxicological research performed in the world.

**In 1950's**, many outbreaks of **“Akakabi” disease** occurred in various places in Japan. It was revealed that the causative foods were diseased wheat and rice. Then, Japanese researchers organized a project regarding to *Fusarium* and its mycotoxins. **In 1966-1969**, **NIV (nivalenol) and its derivatives** were isolated from *Fusarium nivale* Fn2B and their structures were determined (**Tatsuno et al.**, 1968). In 1970, **DON (deoxynivalenol)** was discovered in the metabolites of *Fusarium graminearum* as Rd-toxin, and its structure was determined in 1973 (**Yoshizawa et al.**).

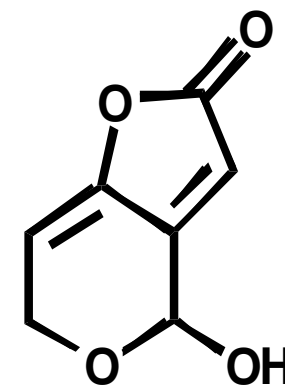
# マイコトキシン汚染被害



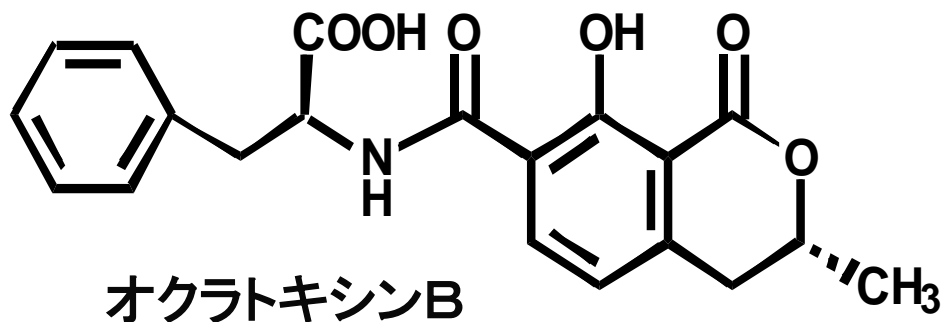
アフラトキシンB<sub>1</sub>



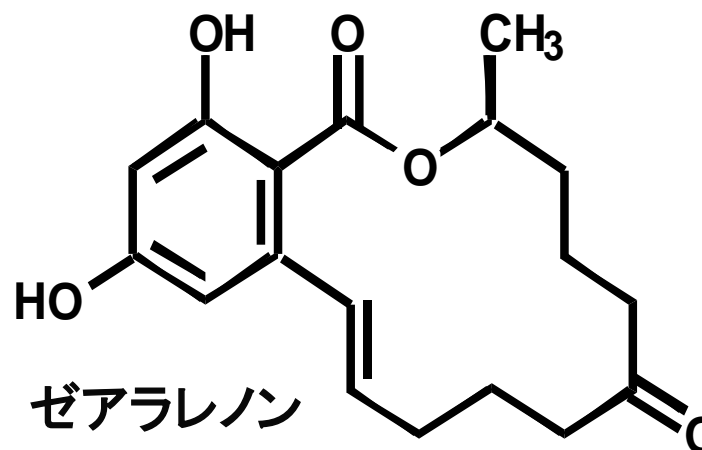
デオキシニバレノール



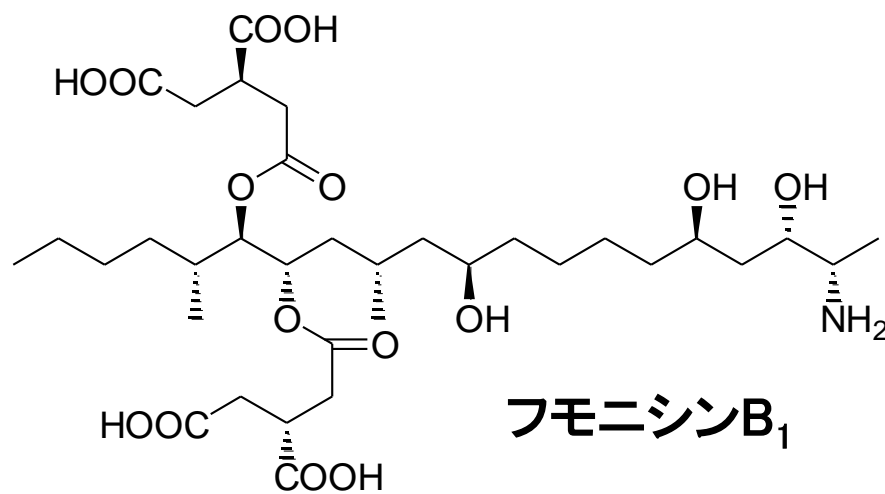
パツリン



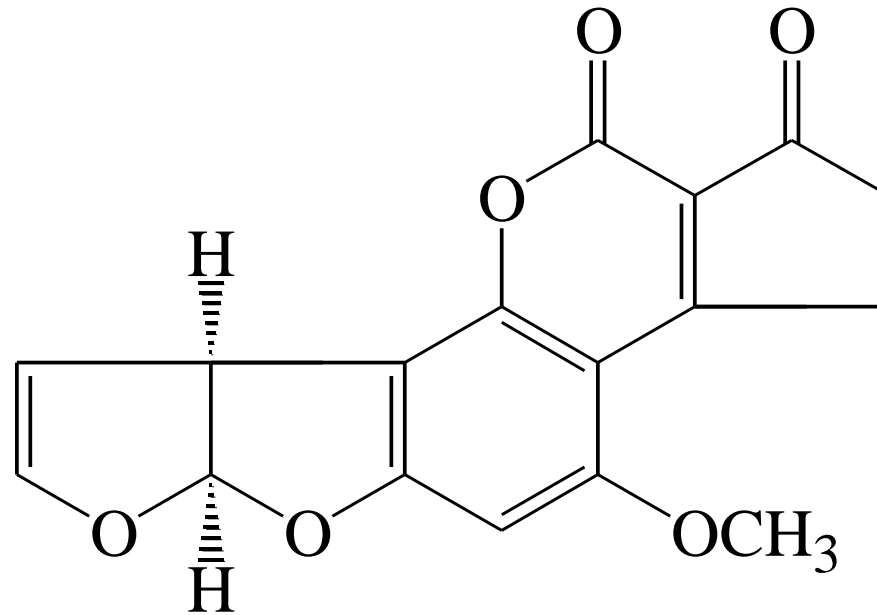
オクラトキシンB



ゼアラレノン



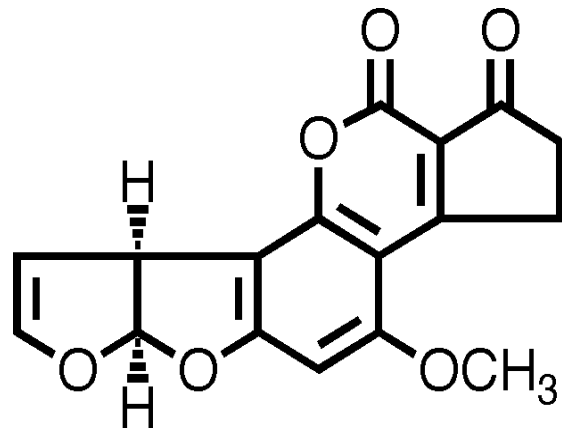
フモニシンB<sub>1</sub>



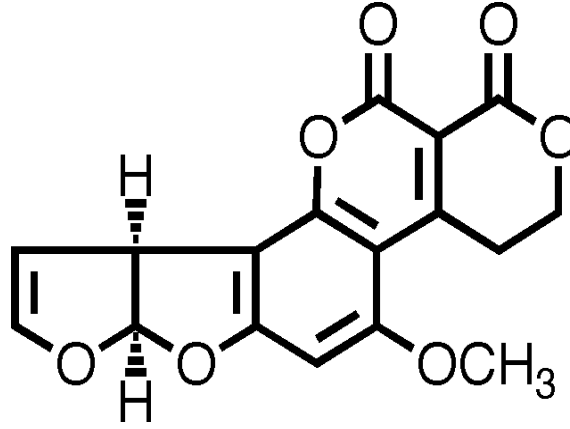
aflatoxin B<sub>1</sub>

- *Aspergillus flavus*、*Aspergillus parasiticus*などによって生産される。
- 1960年にイギリスで発生した、七面鳥の雛が大量に肝臓障害で中毒死した事件の原因物質として単離同定された。
- 天然物質で最強の発ガン性を有する。
- 熱帯、亜熱帯地域において、トウモロコシやナッツ類など、多くの作物が aflatoxinに汚染されている。
- 多くの国で10 ppb程度の厳しい規制値が設定される。

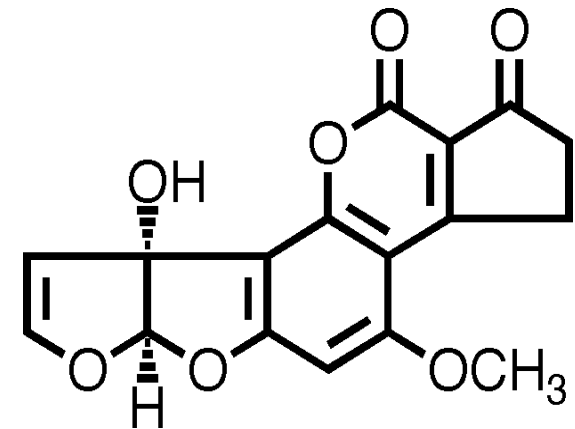
# アフラトキシン類の構造



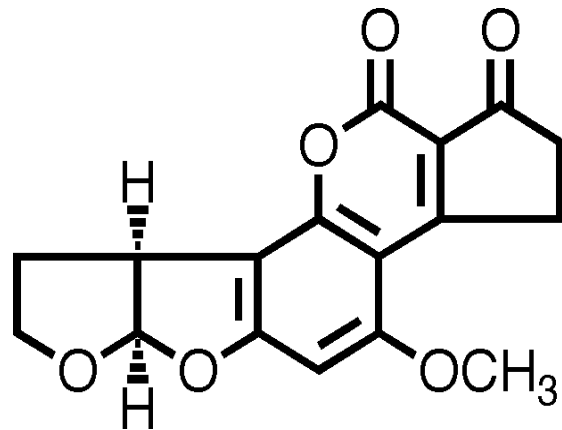
**aflatoxin B<sub>1</sub>**



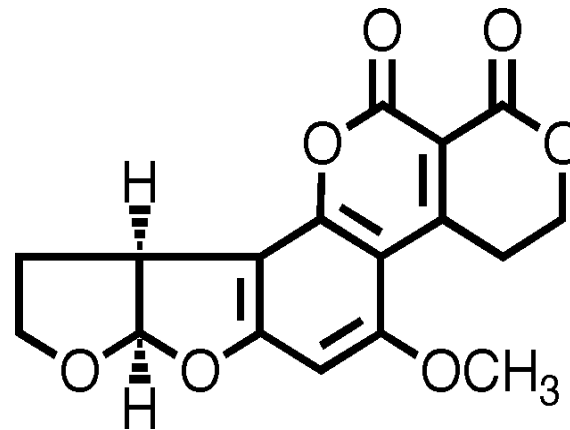
**aflatoxin G<sub>1</sub>**



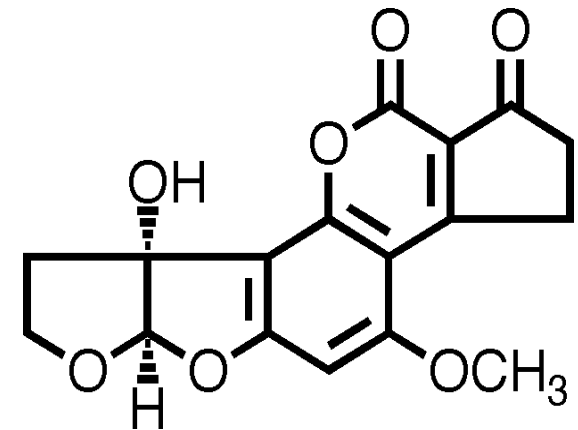
**aflatoxin M<sub>1</sub>**



**aflatoxin B<sub>2</sub>**



**aflatoxin G<sub>2</sub>**

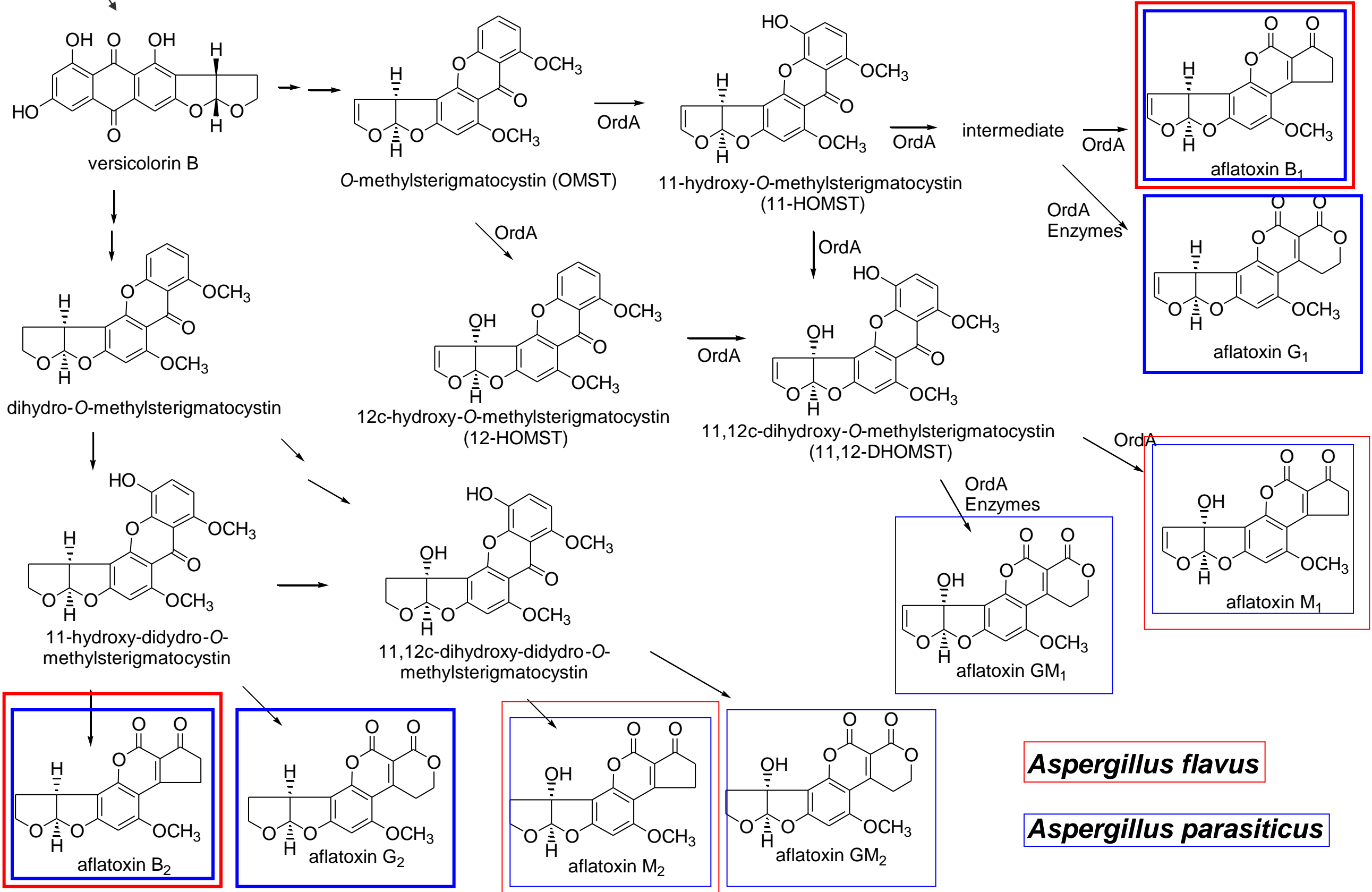


**aflatoxin M<sub>2</sub>**

**Producers :** *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. tamarii*

hexanoyl CoA  
7 × malonyl CoA

# Biosynthesis of aflatoxins (Yabe *et al.*, 2012)



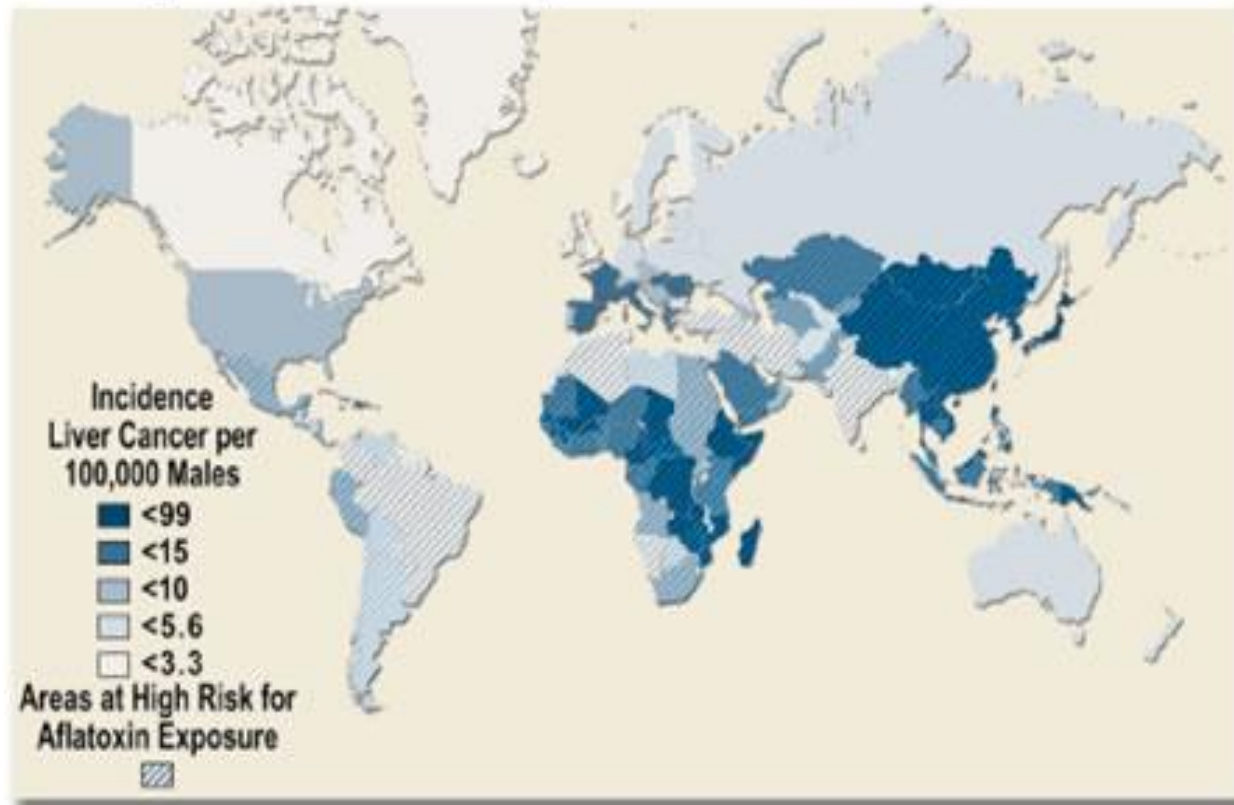
***Aspergillus flavus***

***Aspergillus parasiticus***



# The impact of aflatoxin on human health and economy

Correlation Between Populations with High Liver Cancer Rates and High Risk of Chronic Exposure to Aflatoxin Contamination



Liver cancer data from the GLOBOCAN 2002 database  
([http://www-dep.iarc.fr/GLOBOCAN\\_frame.htm](http://www-dep.iarc.fr/GLOBOCAN_frame.htm))

Aflatoxin data from Williams et al., *Human Aflatoxicosis in Developing Countries*,  
*Am J Clin Nutr* 80:1106–22, 2004.

550,000-600,000 new hepatocellular carcinoma (HCC) cases worldwide each year, about 25,200-155,000 cases attribute to aflatoxin exposure

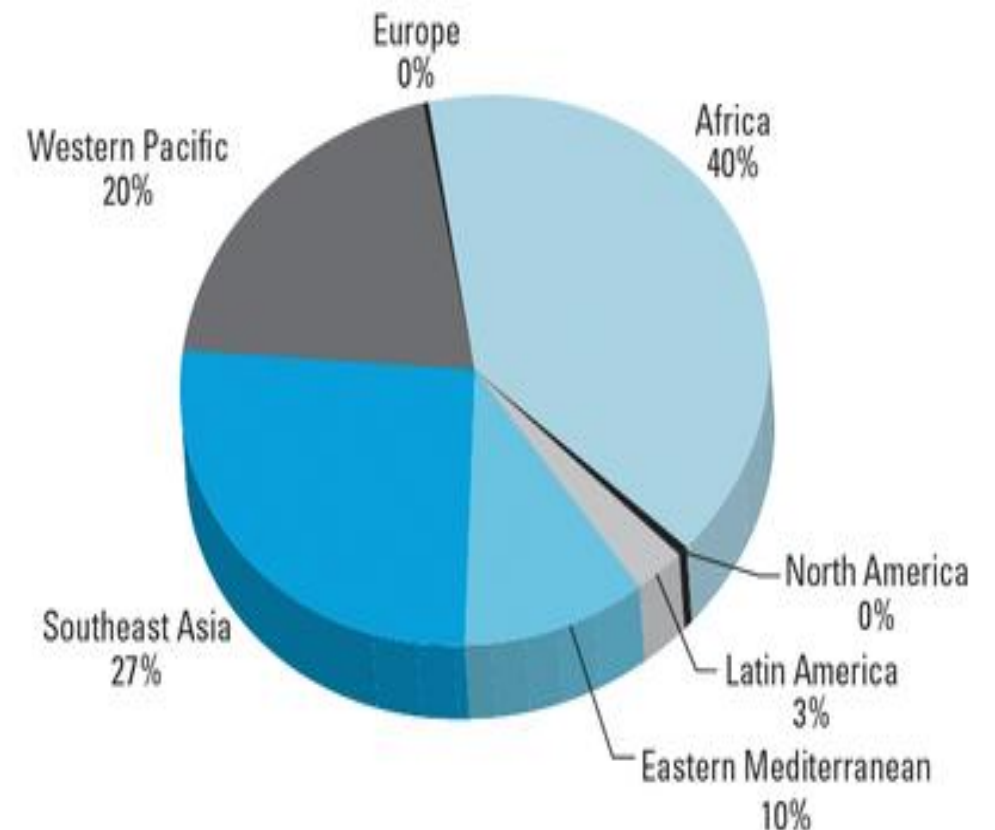


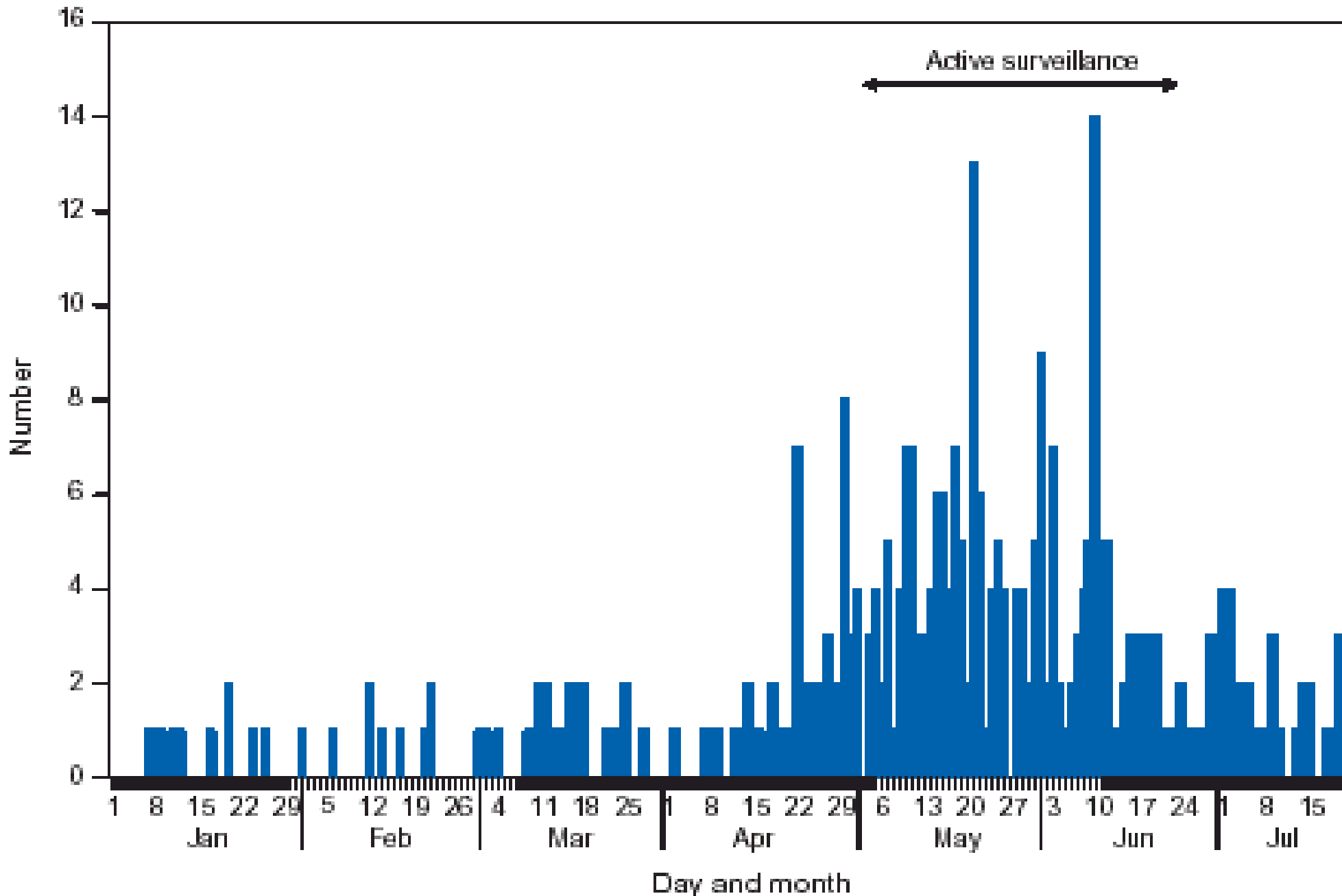
Figure 1. Distribution of HCC cases attributable to aflatoxin in different regions of the world.

- Aflatoxins in maize in the U.S. have been estimated as a \$225 million/year impact.
- Aflatoxins in U.S. peanuts were estimated to cause over \$258 million in losses per year.
- Aflatoxins in three Asian countries (Indonesia, Philippines, and Thailand) were estimated at \$900 million annually impact.

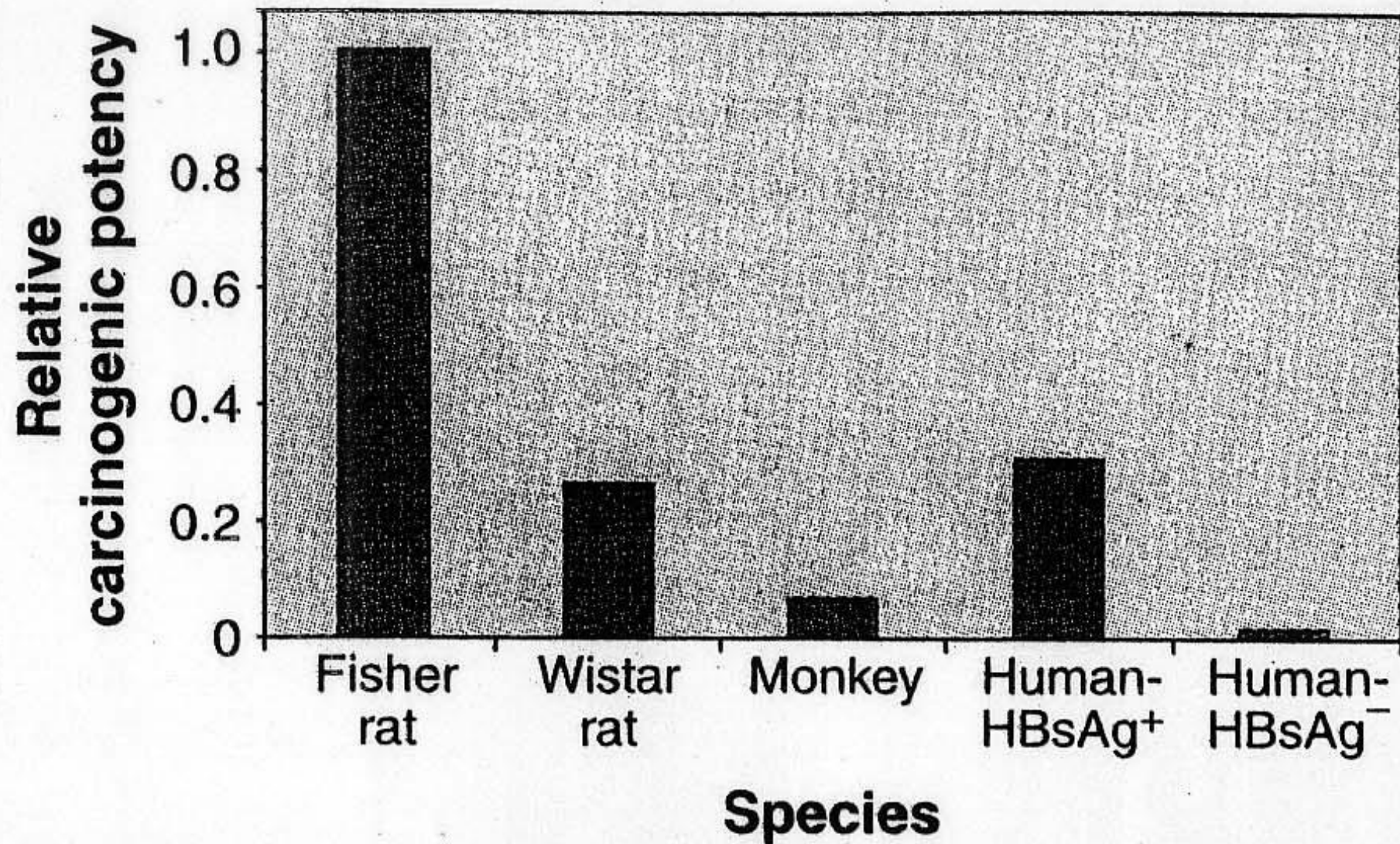
# Outbreak of Aflatoxin Poisoning

## — Eastern and Central Provinces, Kenya, January—July 2004

FIGURE 2. Number of aflatoxicosis cases, by date of reporting — Eastern and Central Provinces, Kenya, January–July 2004



患者 : 31  
 7名  
 死者 : 12  
 5名

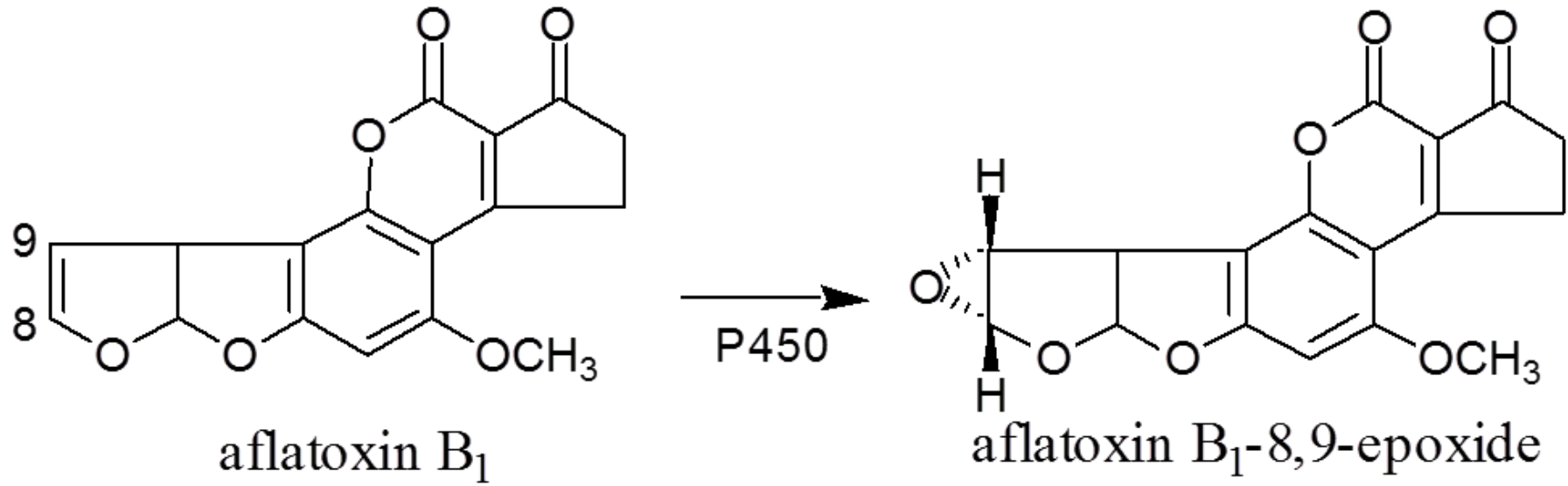


**Fig. 2.** Relative carcinogenic potency in different species.

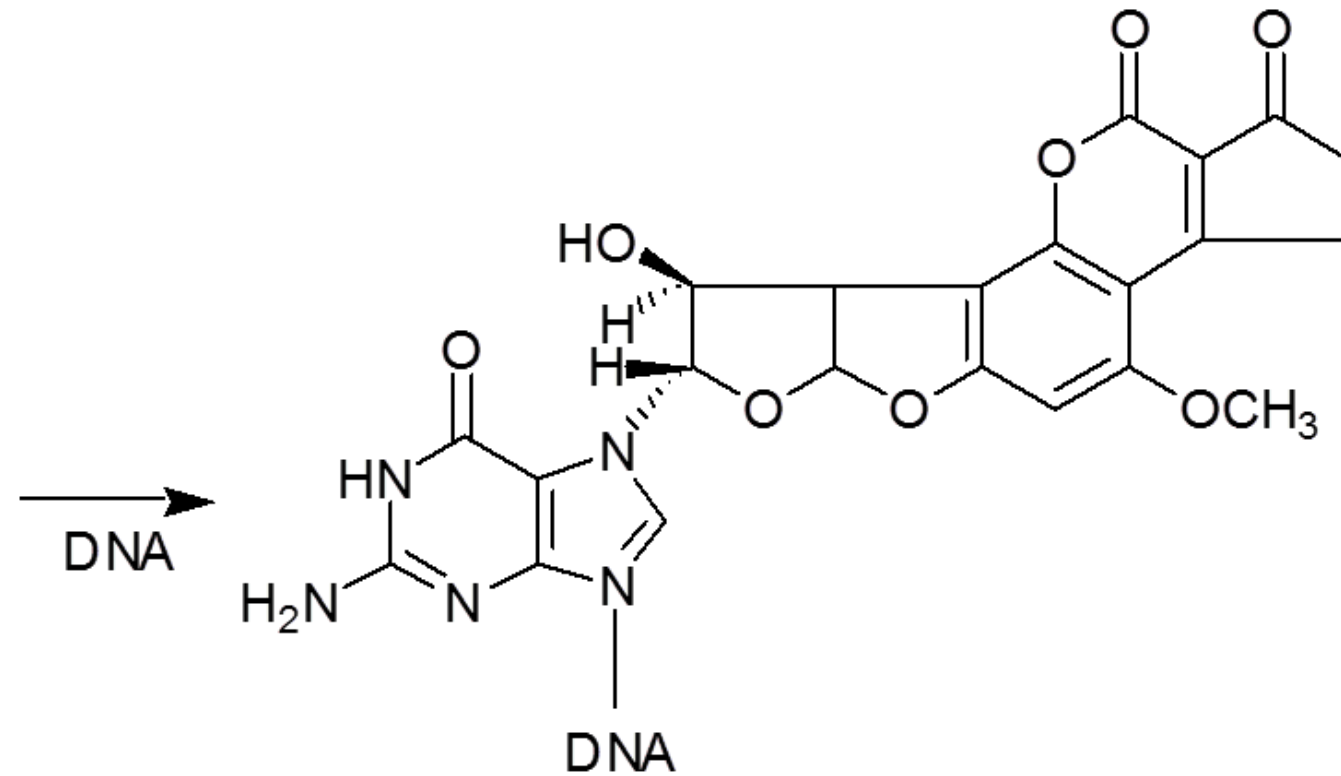
Relative carcinogenic potency : cases/year/ng of aflatoxin B<sub>1</sub>/kg of body weight/day

(Science, 286, 24 DECEMBER 1999, 2453.)

# アフラトキシン - DNA 複合体の形成機構



## GSTに解毒作用



グアニン(G)からチミン(T)への誤読

# Routes for Contamination and Controls

Pre-Harvest



High moisture  
Weather  
Insect infestation  
Drought  
Plant varieties

- Insect and pest control
- Crop resistance
- **Non-toxigenic strains**

Harvesting



Late harvest  
Temperature  
Humidity  
Mechanical damage

- **Timeliness**
- **Clean up**
- **Drying**

Storage



Temperature/Humidity  
Cleaning  
Roofing/Walls  
Ventilation  
Infestation

- **Temperature and humidity control**
- **Chemical methods (ammoniation, ozonization)**
- **Aflatoxin-selective clay (hydrated sodium calcium aluminosilicate)**

# アフラトキシン汚染防除

## 抗カビ剤の利用:

耐性菌の早期蔓延

圃場で効果的な抗カビ剤がない

## アフラトキシン生産の特異的阻害剤:

カビの生育には影響を与えない

耐性菌の早期蔓延の心配が少ない

## 微生物の利用:

非生産株(Afla-guard)

生育阻害菌、分解酵素生産菌、吸着菌 応用例なし

特異的阻害剤生産菌は？

# アフラトキシン生産阻害物質の取得

天然物質を対象に探索:

土壤等の環境中で速やかに分解される

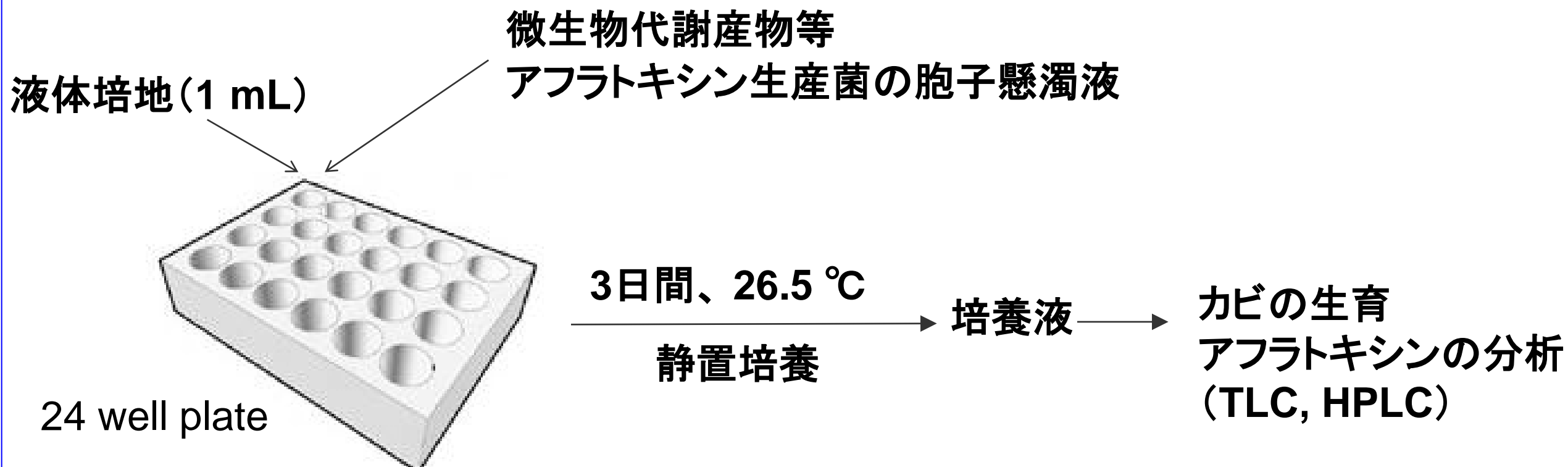
微生物代謝産物: 強い活性、多彩な化合物

培養での調製が可能

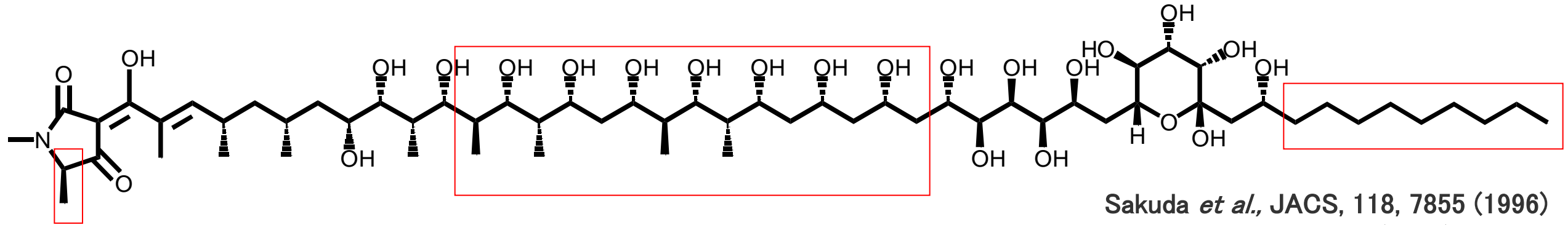
植物成分: 調製が容易

粗抽出物での利用が可能、生合成遺伝子の利用

## アフラトキシン生産阻害物質の探索方法

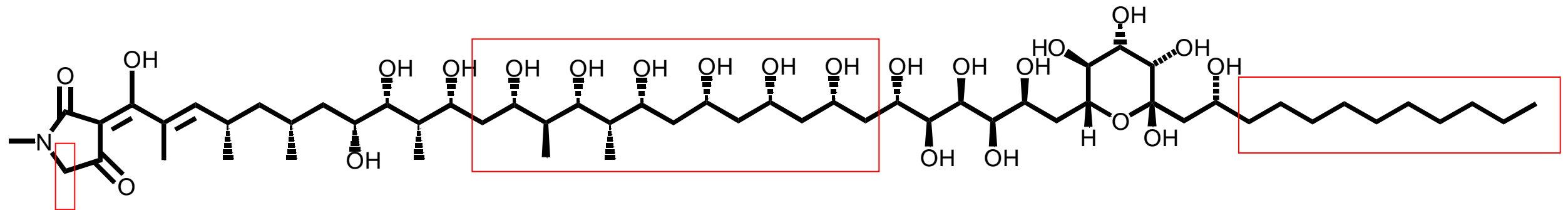


# 放線菌由来のアフラトキシン生産阻害物質



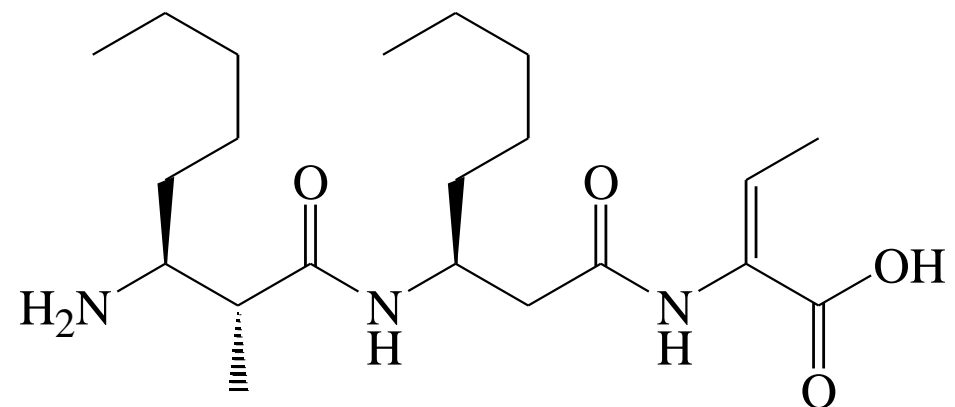
**aflastatin A (AsA)**

Sakuda *et al.*, JACS, 118, 7855 (1996)  
Ono *et al.*, JA, 50, 111 (1997)  
Ono *et al.*, JA, 51, 1019 (1998)  
Ikeda *et al.*, JOC, 65, 438 (2000)  
Sakuda *et al.*, TL, 48, 2527 (2007)



**blasticidin A (BcA)**

Sakuda *et al.*, TL, 42, 7399 (1997)  
Sakuda *et al.*, JA, 53, 1265 (2000)



**dioctatin A (DotA)**

Yoshinari *et al.*, Microbiol. 153, 2774 (2007)



**Effect of Blastocidin A (BcA) and Aflastatin A (AsA)  
on Aflatoxin Production  
by *Aspergillus parasiticus* in liquid culture**

	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>
<b>AsA</b>	<b>0.07</b>
<b>BcA</b>	<b>0.04</b>

<b>BcA (μg/ml)</b>	<b>Aflatoxin (μg/ml)</b>	<b>Mycelial weight (mg/10ml)</b>
<b>0</b>	<b>20.7 ± 2.0</b>	<b>24.1 ± 0.7</b>
<b>0.25</b>	<b>1.1 ± 0.1</b>	<b>24.3 ± 0.3</b>
<b>0.50</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>	<b>23.2 ± 0.6</b>

# Effect of aflastatin A on aflatoxin production by the assay with peanut plants

Peanut seed

Flowering (after 1.5 months)  
Growing of peanuts

Peanut plant (after 6 months)

Application of aflastatin A by spray on leaves  
3 days

Peanuts

Inoculation of *Aspergillus parasiticus*  
27 °C, 7 days

Analysis of aflatoxin contents in the peanuts

# Effects of Aflastatin A on Aflatoxin Production in Peanuts Plants

---

Aflastatin A (mg/plant)	Plant Weight (g)	Peanut Weight (g/7 pieces)
0	485	11.0
2	414	11.6
10	432	11.5

---

---

Aflastatin A (mg/plant)	Growth of <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxin Contents ( $\mu\text{g/g}$ )
0	++	4.15
2	++	2.08
10	++	0.08

---

環境、栄養因子: 炭素源、窒素源、温度、pH、金属 etc.

分生子形成 etc.

G protein cascade

VeA protein

Lae A protein

未知の制御機構

Acetic acid

Primary metabolism

Regulation of *aflR* expression

Secondary metabolism

AFLC

AFLR

AFLT

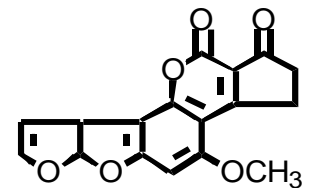
*aflC*

*aflR*

*aflT*

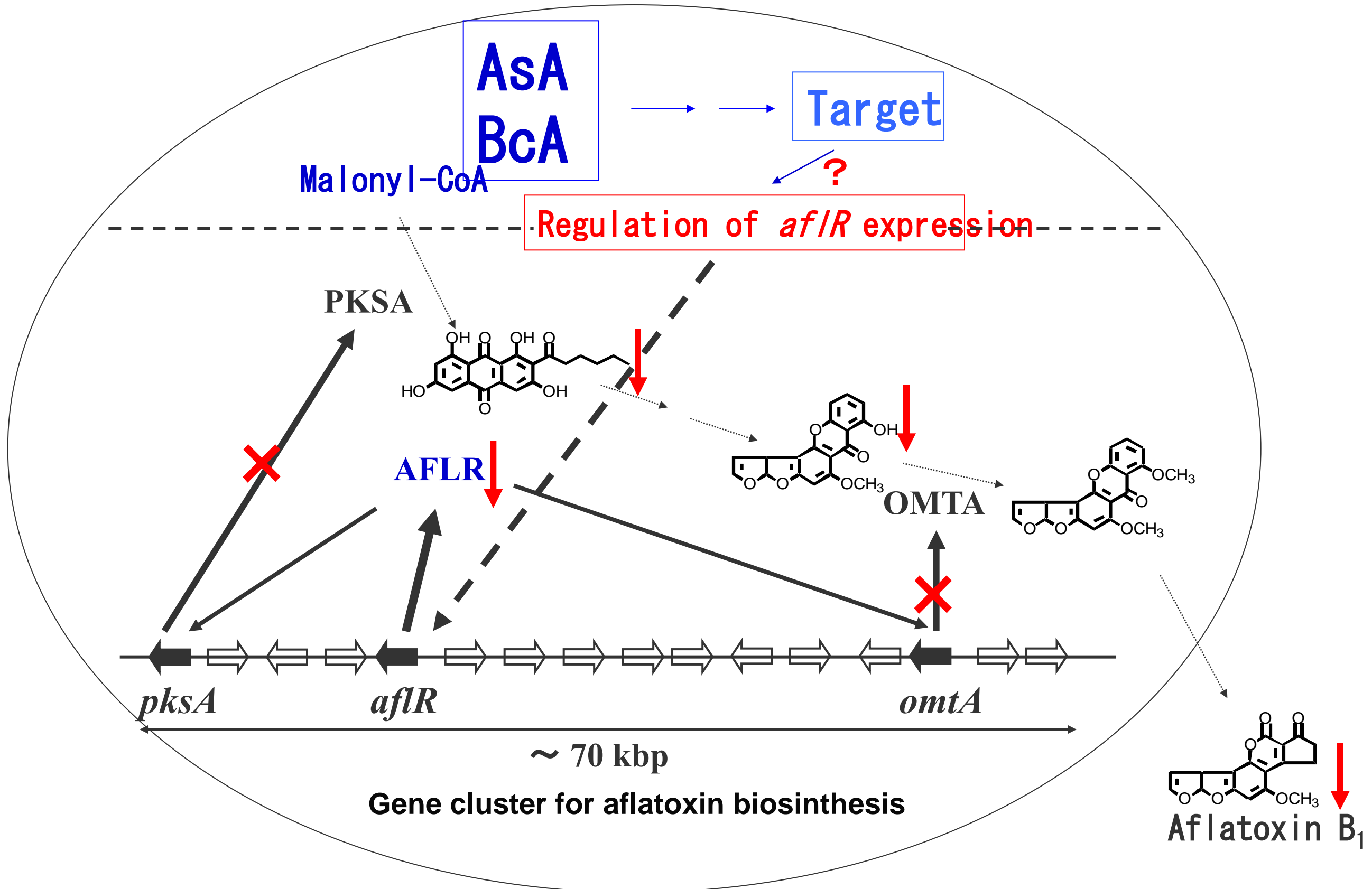
~ 70 kbp

Gene cluster for aflatoxin biosynthesis



Aflatoxin B<sub>1</sub>

# アフラスタチンA、ブラストサイジンAの作用



## アフラトキシン生産阻害物質

化合物	IC <sub>50</sub> (μM)	選択性	作用点	<i>aflR</i> 転写阻害
Aflastatin A	0.25	高	タンパク質合成	+
Blasticidin A	0.25	高	タンパク質合成	+
Blasticidin S	28	高	peptidyl transferase	
G418	20	中	開始複合体形成	
Cycloheximide	24	低	リボゾームの転座	
Diocatin A	4	高	human DPP II	+
Gallic acid	弱	高	抗酸化?	-
Dichlorvos			生合成酵素	
Tricyclazole			生合成酵素	

# *Betula alba*

**Synonyms**---White Birch, Shirakaba (Japanese name)

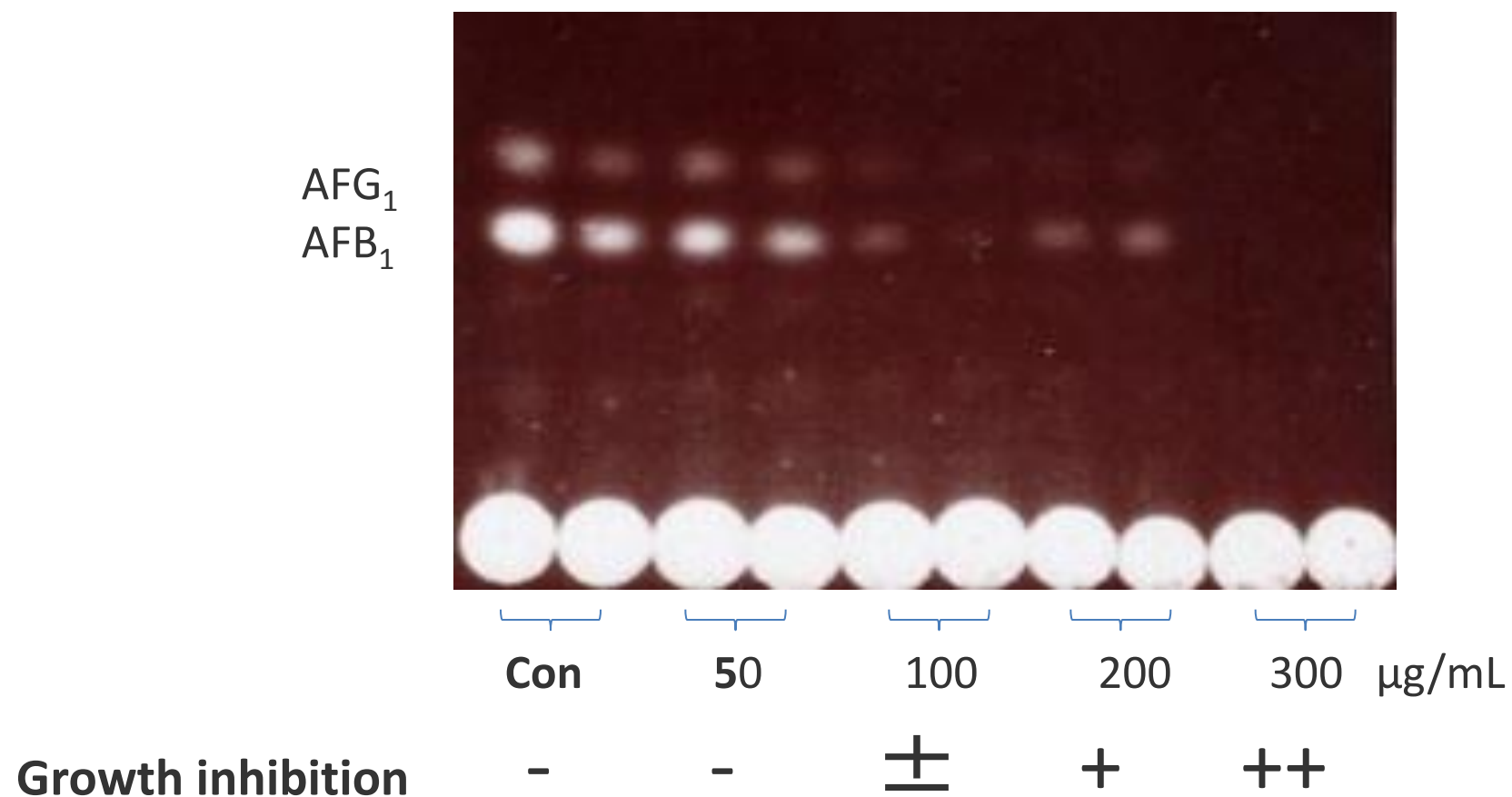
**Parts Used**---Bark and leaves

**Habitat**--- Northern Europe, Asia and North America

**Medicinal action** -- antibacterial and antifungal activities (F. Demirci *et al.*, 2000)



## Bioassay results of crude essential oil



# Isolation procedure of the active component

Crude essential oil 50 g

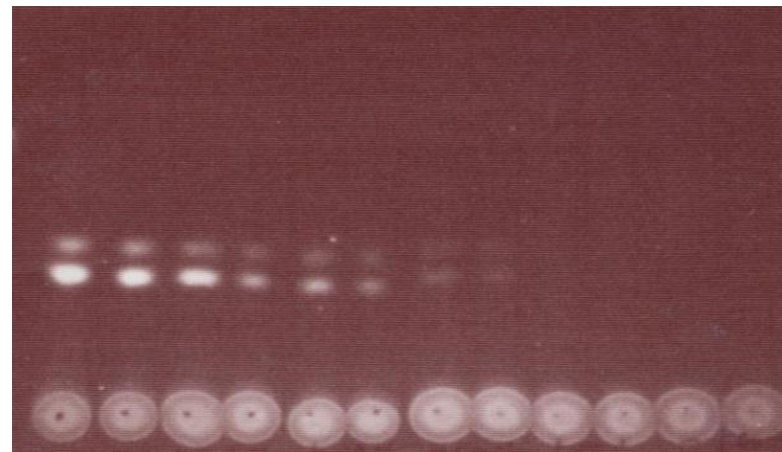
silica gel column chromatography

*n*-hexane/ethyl acetate  
(80:20,v/v) 0.5 g

Normal phase HPLC

Active fraction (148 mg)

AFG<sub>1</sub>  
AFB<sub>1</sub>



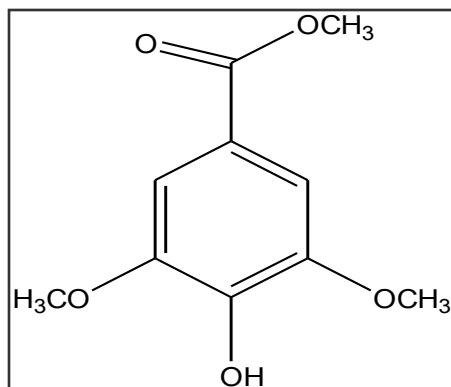
C 25 50 100 200 300 µg/mL

- - - - -

Growth inhibition

Normal phase HPLC

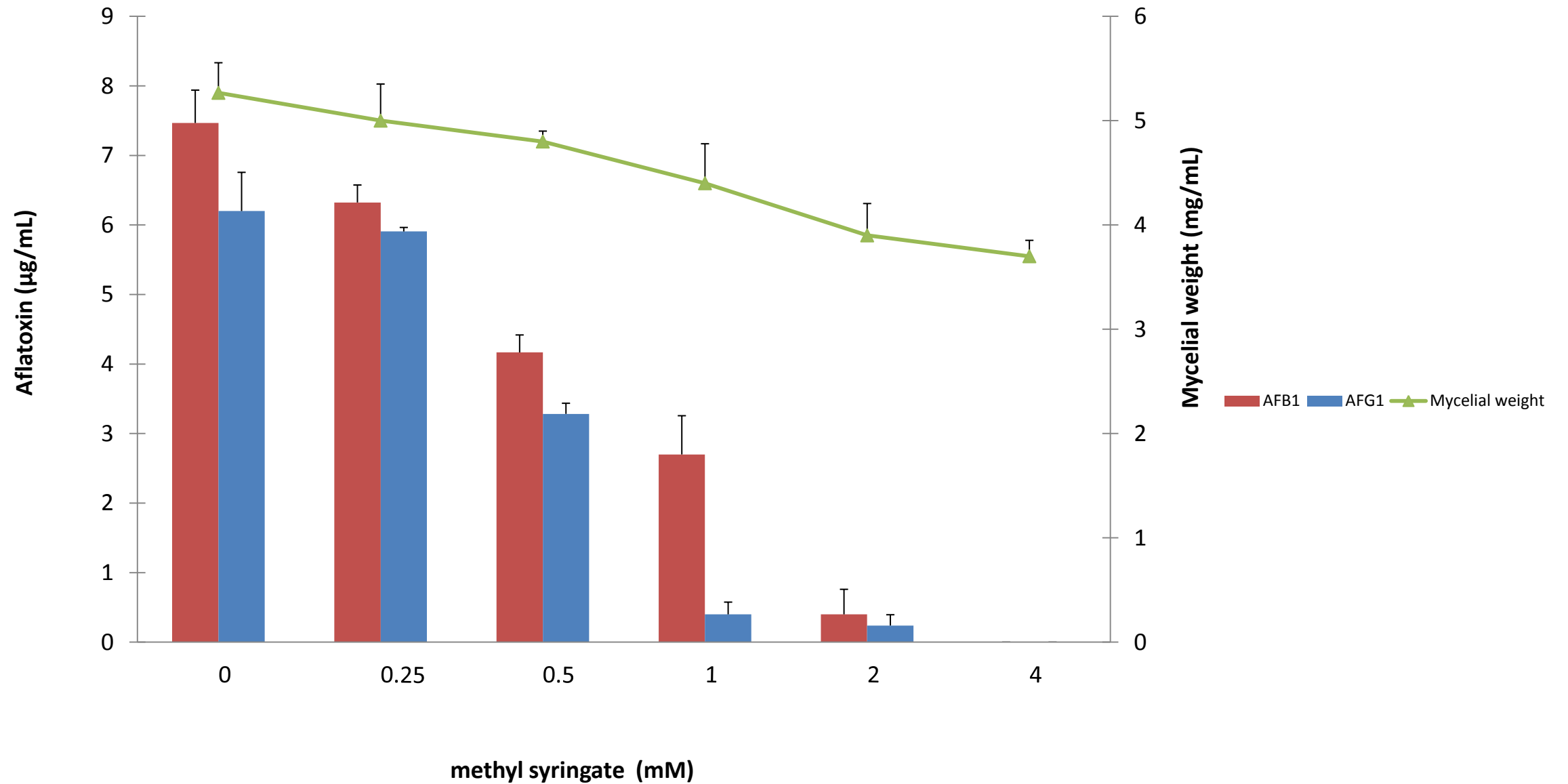
Active component (2 mg)



methyl syringate

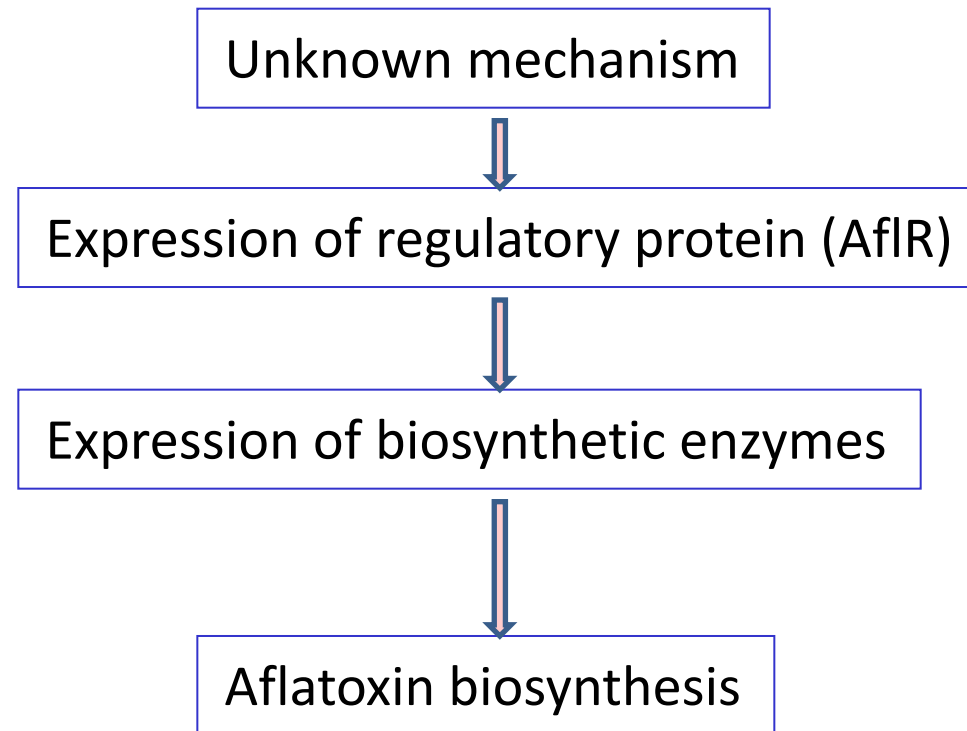


# Effect of methyl syringate on fungal growth and aflatoxin production



n=3, mean  $\pm$  S.D.

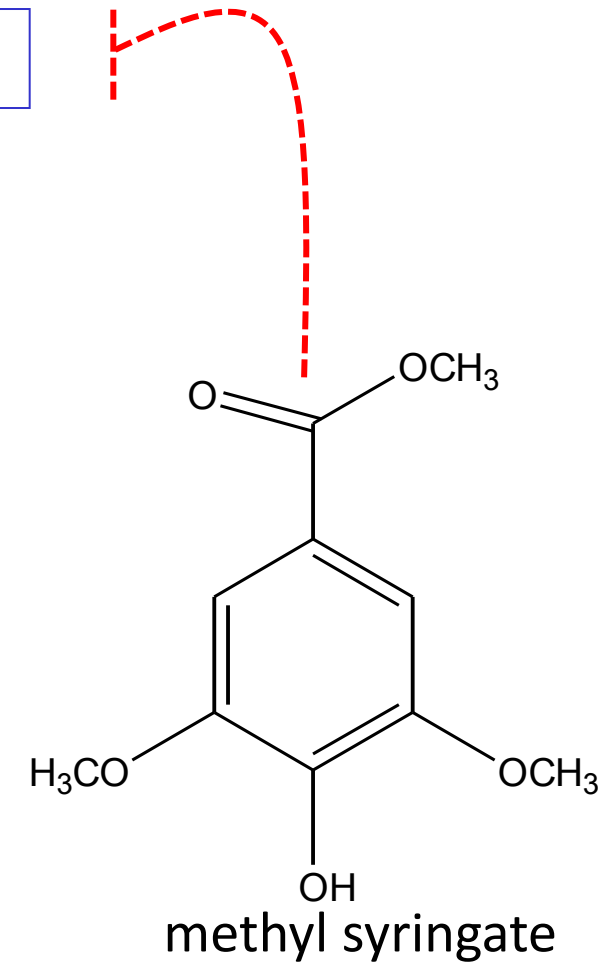
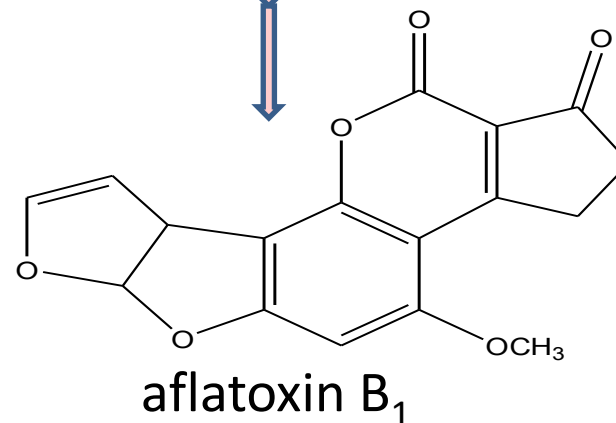
# The proposal of effect of methyl syringate on aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*



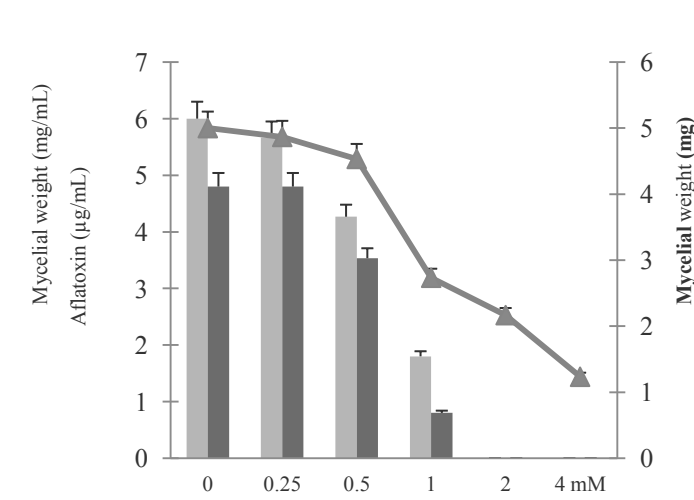
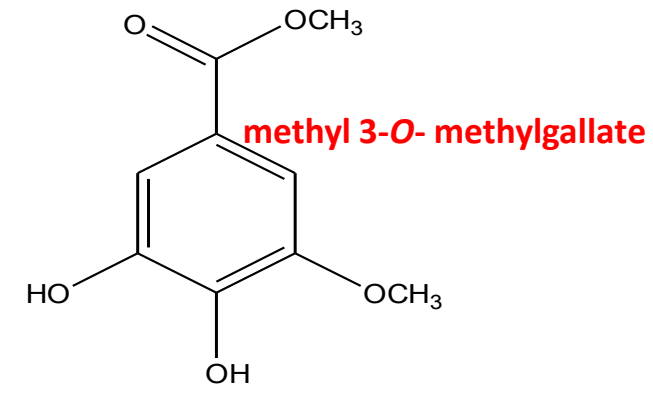
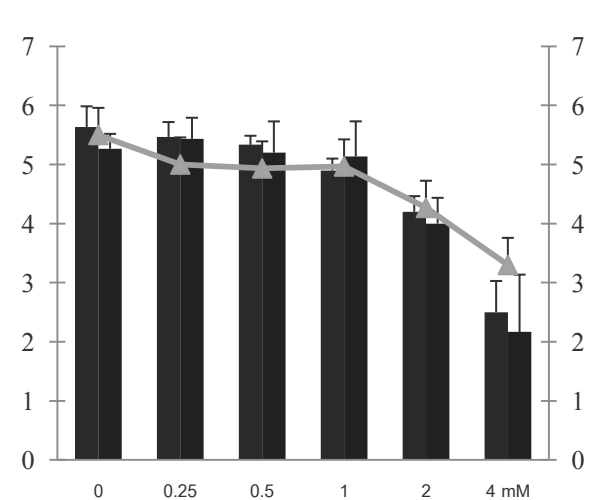
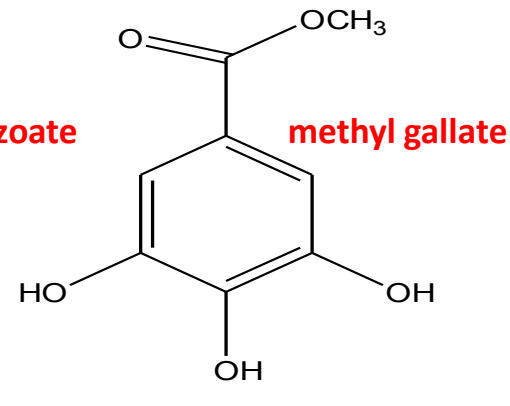
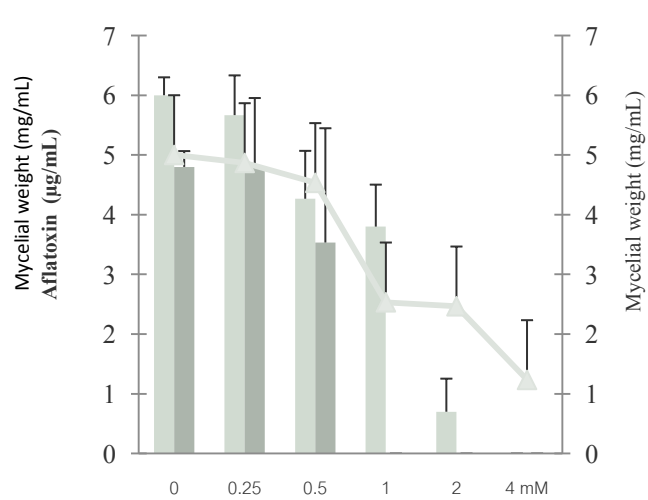
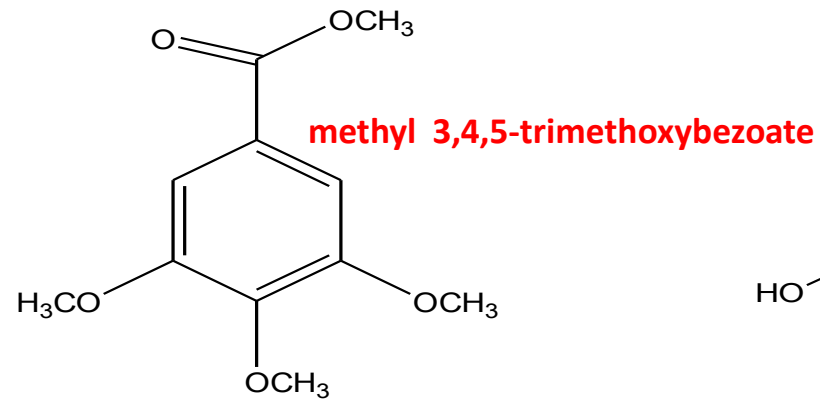
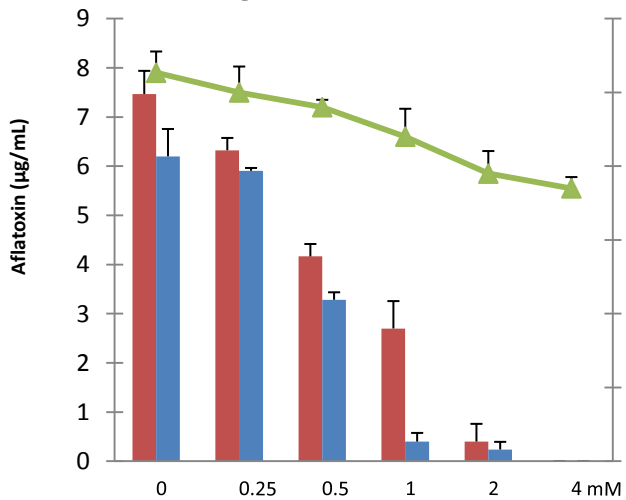
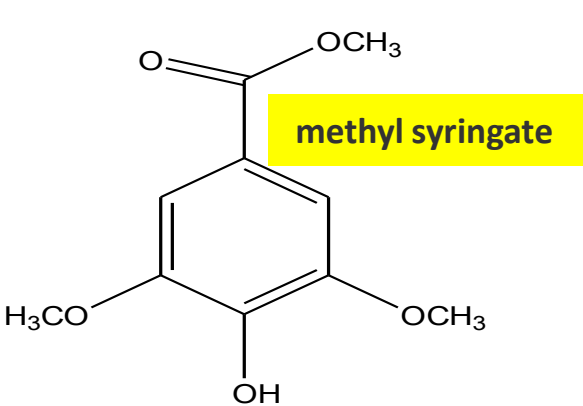
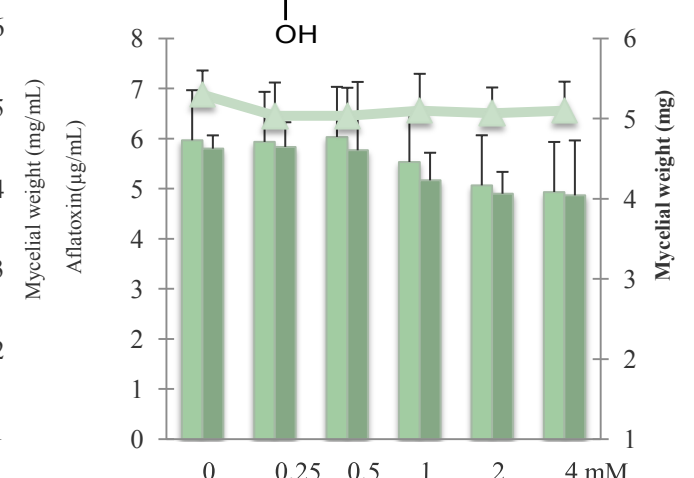
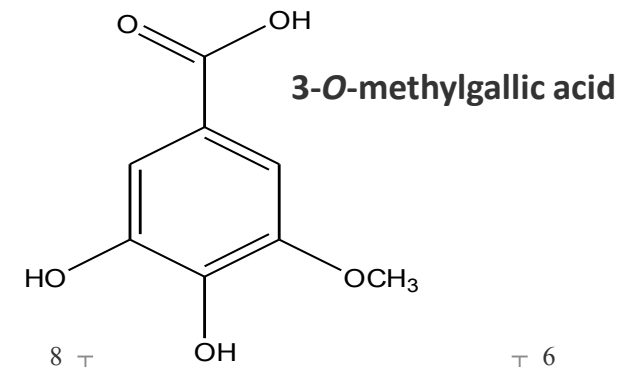
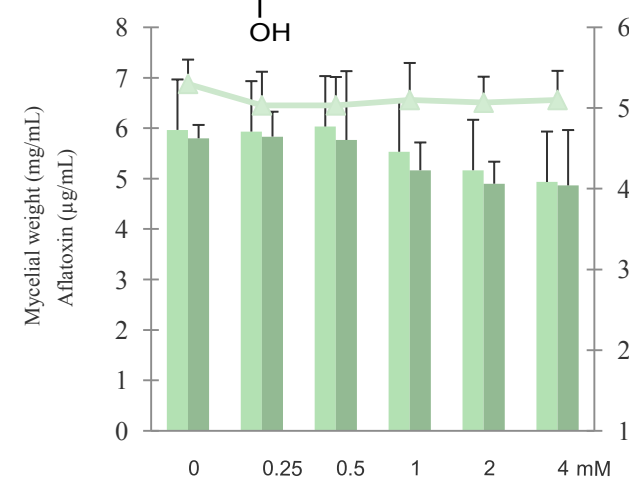
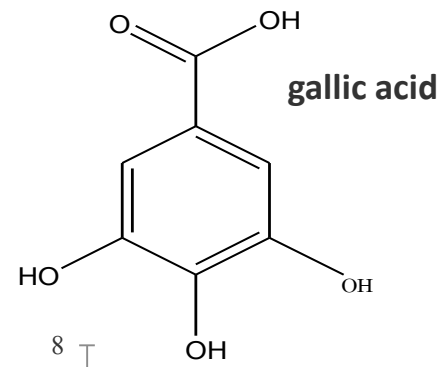
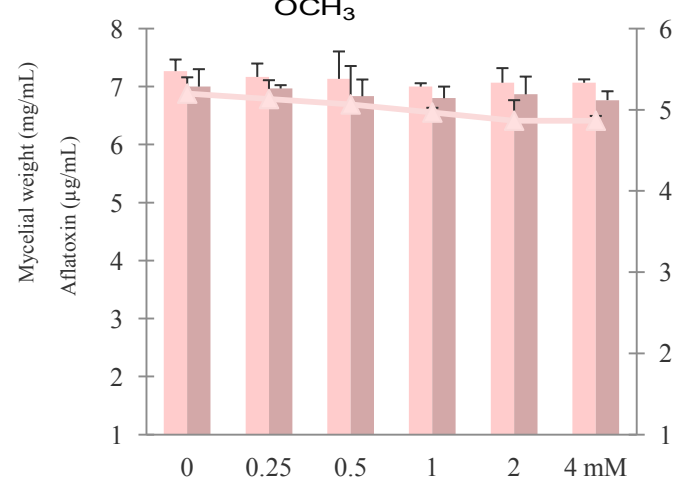
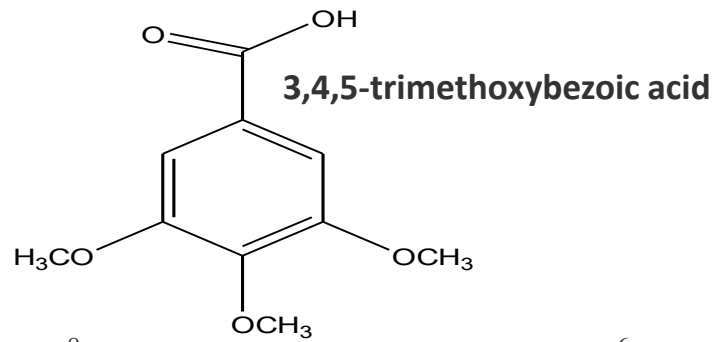
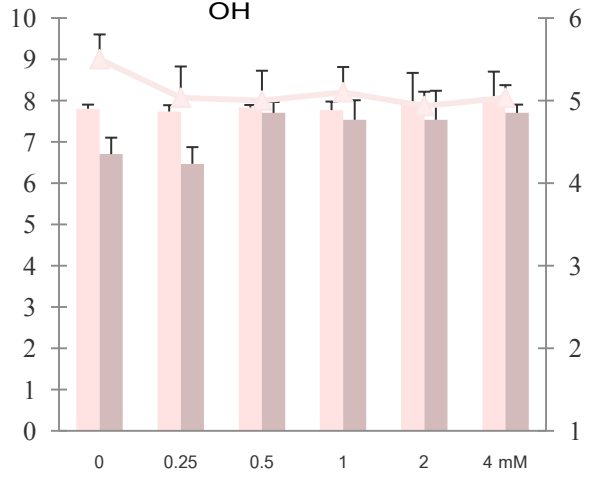
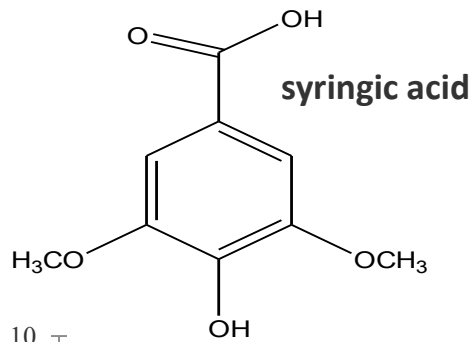
acetate



polyketide



# Effect of 8 compounds on fungal growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*



## Summary of activities of the 8 compounds

Compound	DPPH radical scavenging activity (ED <sub>50</sub> )	Aflatoxin inhibitory activity	Growth inhibitory activity
syringic acid	17.5 μM	-	-
3,4,5-trimethoxybenzoic acid	> 1 mM	-	-
gallic acid	7.4 μM	-	-
3-methoxygallic acid	22.4 μM	-	-
methyl syringate	> 1 mM	++	±
methyl 3,4,5-trimethoxybenzoate	> 1 mM	++	++
methyl gallate	8.9 μM	+	++
methyl 3-methoxygallate	22.9 μM	++	++

カビ毒アフラトキシン

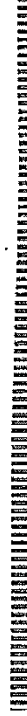
住商、防除技術事業化へ

東大から 実権 細菌活用、生成を阻害

住友商事は、代表的なカビ毒であるアフラトキシンの汚染を細菌を使っ

て防ぐ新技術を獲得、天然農薬や防除剤として事業化する。東京大学が見

いだした技術で、細菌から産出される天然物質がカビのアフラトキシン産



出を特異的に阻害する。東京大学から独自のライセンス実施権の供与を受けており、農薬企業をはじめ幅広い企業や団体と提携、早期にビジネスモデルを構築したい考え。アフラトキシンは強力な急性毒性と発がん性を有し農産物や人体、家畜などに被害をもたらしており、経済的損失、健康被害の両面から抜本的な対策が求められている。

住友商事が事業化を目指すのは、東京大学農学部

の作田庄平准教授が見いだした特許申請した汚染防除に関する技術。ある土壌分離細菌が産出する低分子有機化合物がカビのアフラトキシン生産メカニズムに作用し生成を阻害する。通常、アフラトキシンを生産する菌が繁殖するにたがってアフラトキシン発生量も増加するが、この細菌を使えばアフラトキシン生産

部は、東京大学農学部の作田庄平准教授が見いだした特許申請した汚染防除に関する技術。ある土壌分離細菌が産出する低分子有機化合物がカビのアフラトキシン生産メカニズムに作用し生成を阻害する。通常、アフラトキシンを生産する菌が繁殖するにたがってアフラトキシン発生量も増加するが、この細菌を使えばアフラトキシン生産

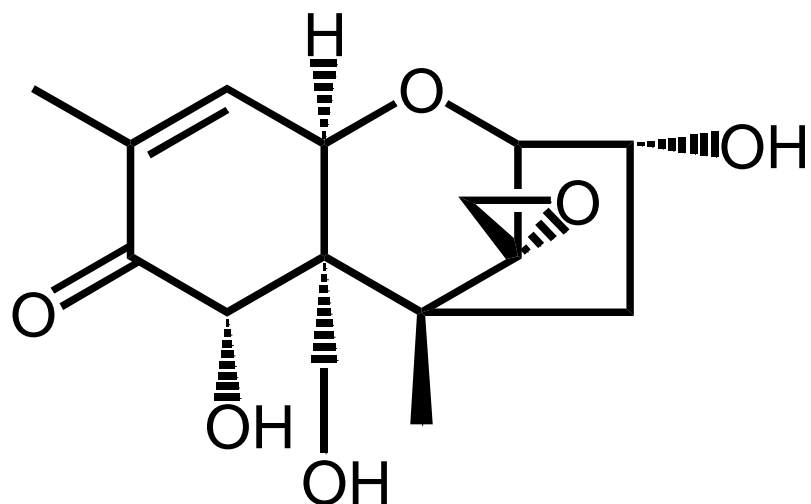
菌の生育に影響を与えずに、アフラトキシンの発生だけを防げる。これによって耐性菌の早期蔓延を回避できる。同准教授らの研究によると、実験室レベルに加え、実地調査でも防除効果を確認。ピーナッツ貯蔵所で調べたもので、殻つきで袋に入れ3週間貯蔵庫に入れた状態で計測したところ、この細菌の培養液を浸した場合と水だけではアフラトキシンの汚染量増加に飛躍的な違いがあったという。現状、アフラトキシンに対しては効果的な抗カビ剤がない。このため、アフラトキシン非生産菌を圃場に撒き、アフラトキシン生成菌と拮抗させて汚染を低下させる手法が用いられている。しかし、効果のばらつき、非生産菌による他の毒性代謝物の生産といった課題も一部で指摘されており、決定的な対処法とは

アフラトキシン 植物を住処とするアスペルギルス・フラバスなどカビ菌の2次代謝物で、カビ毒(マイコトキシン)の一種。栽培や貯蔵の段階で農作物に感染する。付着すると簡単な洗浄や熱処理などでは除去することができず、口にした場合、人間や家畜に対し強力な毒性を発揮する。米国で500億円、タイ・フィリピン・インドネシア3カ国だけで毎年1000億円以上の農作物被害があるとされる。国内では食品衛生法で全食品を対象に検出されてはならないとされている。

なっていない。今回の細菌による防除法は生成菌を殺すことなくアフラトキシン生成だけを抑制するため、耐性菌の早期蔓延を回避できるほか、抗カビ剤にみられる毒性の問題も少なくすむ。また、この細菌は動植物への毒性がなく植物への定着性も強い。アフラトキシン防除に関する決定策となる可能性もある。

住友商事は農薬として登録・商品化するほか、ポストハーベスト用薬剤として実用化するなどの事業化案を考えている。農業関連以外にも集荷業、食品業分野での展開も期待できる。バイオ品のため化学農薬と比べ登録までに期間も比較的短いとみられる。国内外でパートナー企業を募ったうえで、商品化に向けたデータ収集、生産技術の確立、ビジネスモデル作りなどを進めていく構想。

# deoxynivalenol(DON)



deoxynivalenol(DON)

- ・ 世界中の穀倉地帯においてムギ類やトウモロコシなどの主要穀物で検出。
- ・ 低濃度では拒食や吐き気、高濃度においては嘔吐などの症状を引き起こす。
- ・ 日本における規制値は1.1 ppm。



## <DON汚染対策>

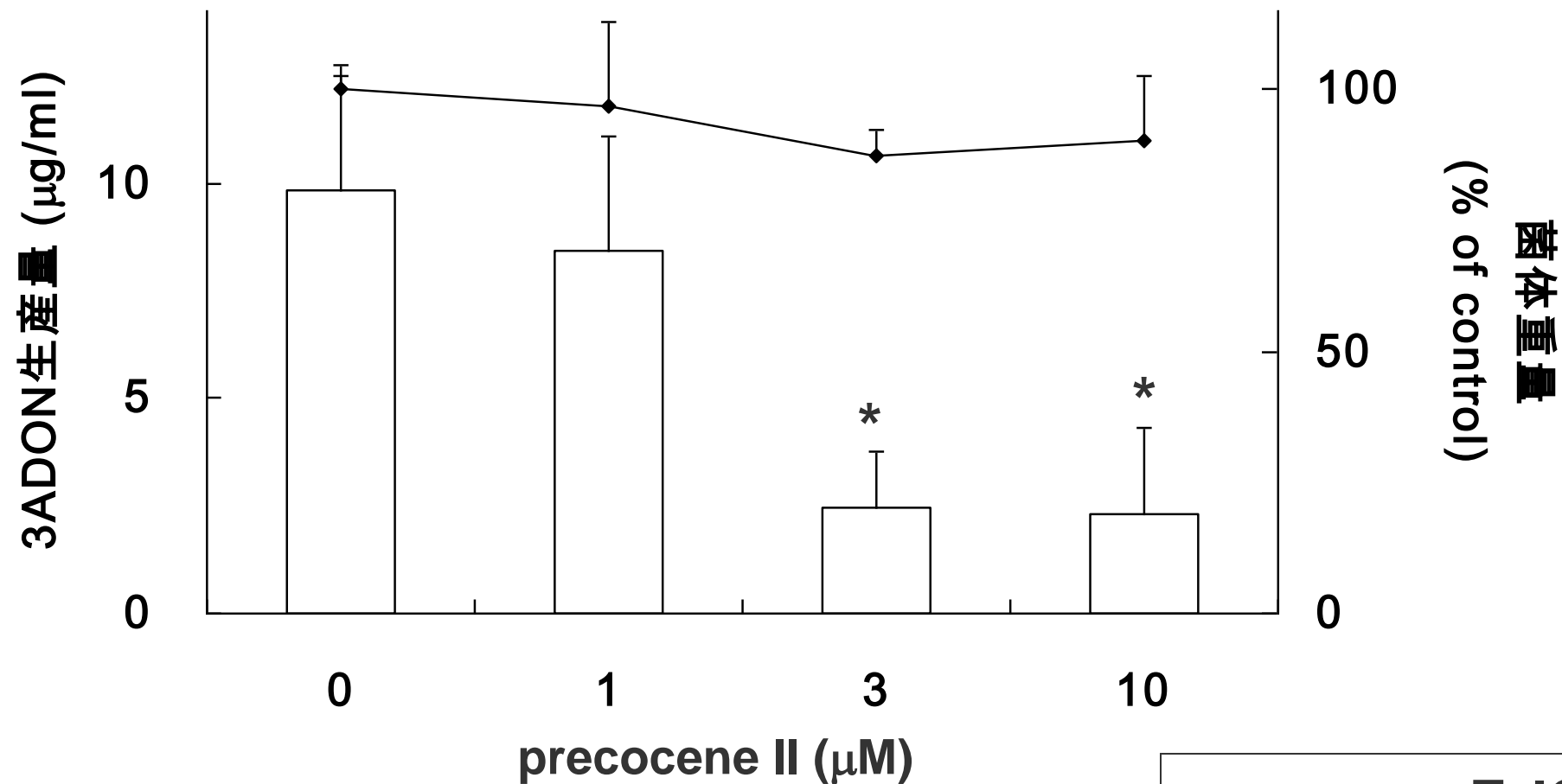
..... 耕種的防除、選別、薬剤防除

## <問題点>

- ・ 抗カビ剤を大量使用。抗カビ剤を用いることで、かえってDON生産が増加することがある。
- ・ 現行の汚染防除法を用いても規制値以上のDONが検出されることがある。

**DON汚染と赤カビ病の両者を同時に防除できる方法が効果的**

# *Fusarium graminearum* の液体培地における precocene 類の 3-ADON 生産阻害活性

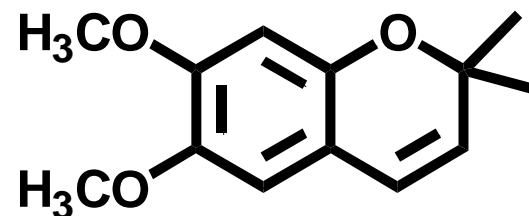


(mean + S.D., n = 3, \* : P < 0.05)

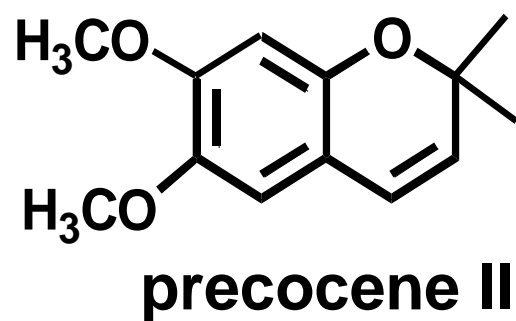
precocene II  $\text{IC}_{50} = 1.2 \mu\text{M}$   
precocene II  $\text{IC}_{50} = 16.6 \mu\text{M}$



precocene I

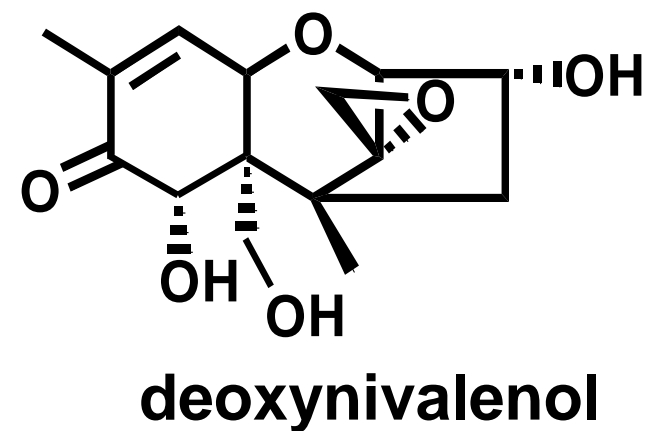
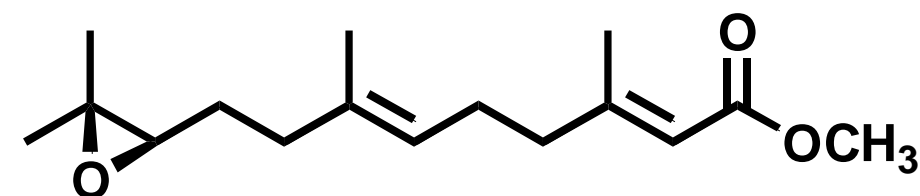
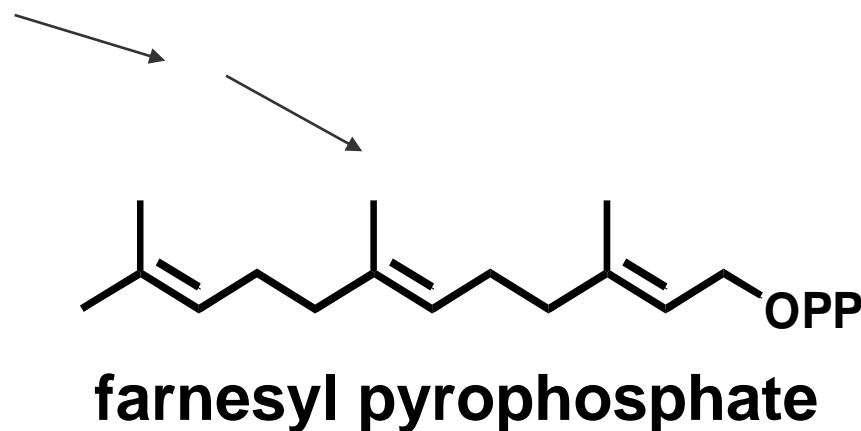


precocene II



**Anti-JH activity**  
Target molecule in insects is unknown.

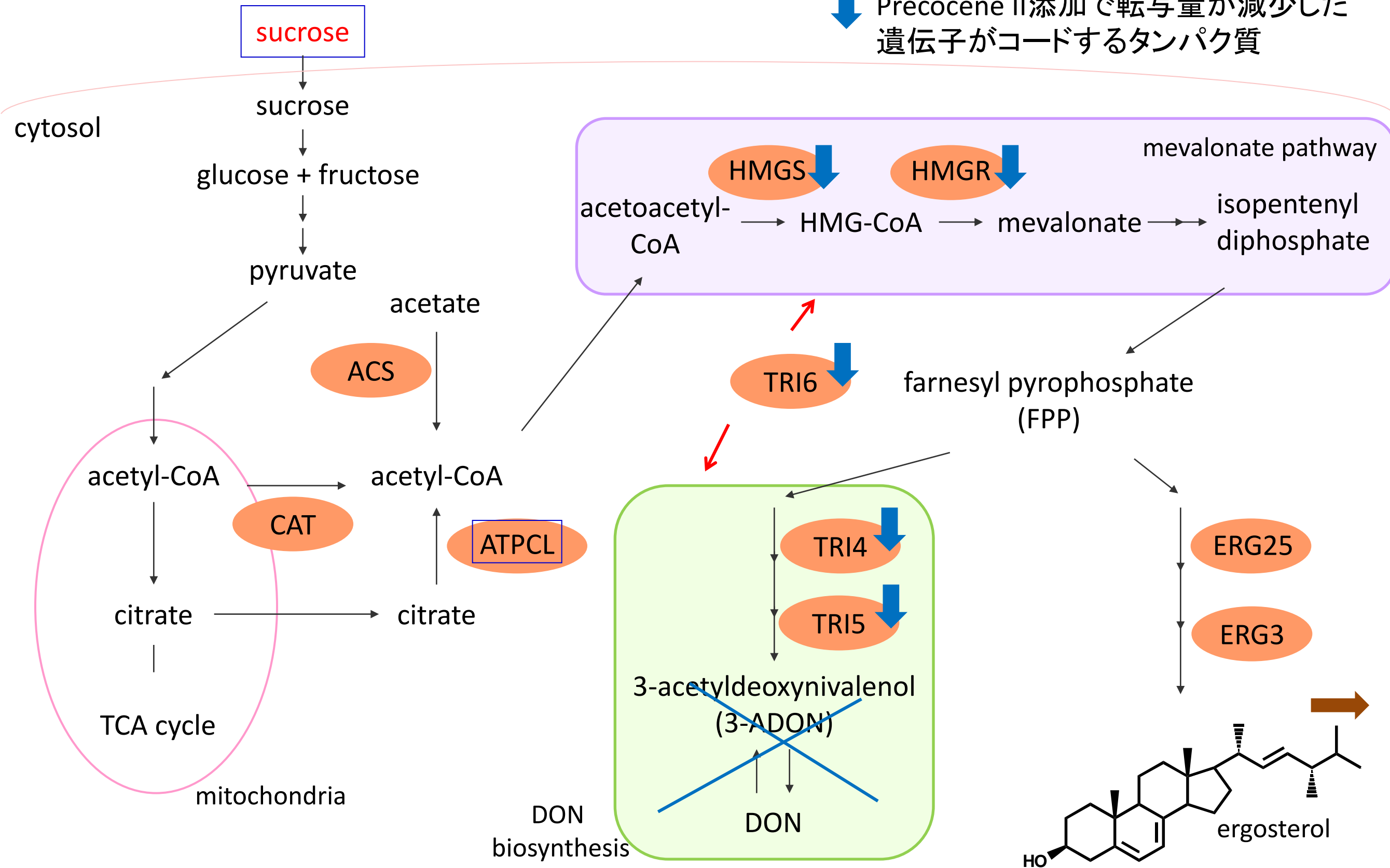
mevalonate





# *F. graminearum*の代謝系に対する precocene IIの影響

→ TRI6の制御  
↓ Precocene II添加で転写量が減少した遺伝子がコードするタンパク質



## まとめとして

- **マイコトキシン汚染のモニターと規制**  
分析法、生産菌、毒性、作用、リスクアセスメント
- **温暖化によるアフラトキシン汚染地域の拡大**  
実用的なアフラトキシン汚染防除法の開発  
生産阻害物質、生産阻害物質生産菌の利用
- **カビの二次代謝物質生産機構の解明**