

カビ毒配糖体（マスクドマイコトキシン）の探索

農研機構 食品総合研究所 ^{なか}中 ^{がわ}川 ^{ひろ}博 ^{ゆき}之

はじめに

ムギやトウモロコシの植物病原菌として知られる赤かび病菌 (*Fusarium* 属菌) の一部はカビ毒 (マイコトキシン) を産生する。近年, これらのカビ毒について「マスクドマイコトキシン」と呼ばれる配糖体の存在が報告されている。マスクドマイコトキシンは分子量や物理化学的性質が元の化合物とは異なるため従来の分析法では検出できないが, 加水分解などによりカビ毒を遊離する。このためカビ毒の潜在ハザードの懸念がある。本稿ではマスクドマイコトキシンについて, 筆者らがこれまでに検出した化合物を紹介しながら概説する。

I マスクドマイコトキシンとは

赤かび病はムギ類やトウモロコシ等の主要作物の植物病原菌として知られる *Fusarium* 属菌によって引き起こされる病害である。感染した穀粒はコムギの場合, 白変から桃色を呈してしわ粒になる (図-1)。温帯地域に位置する我が国ではムギやトウモロコシの生育期に降雨が多いため, 赤かび病が発生しやすい。*Fusarium* 属菌の一部はマイコトキシンを産生することが知られており, トリコテセン系カビ毒と呼ばれる一連の化合物 (構造によりタイプ A, タイプ B に分類される) (図-2) やゼアラレノン (ZEA, 図-3) がその代表例としてあげられる。なかでもタイプ B トリコテセン (C-8 位にケトン基をもつ) の一つであるデオキシニバレノール (DON; 図-2) は世界各地で汚染が発生することから, 多くの国で基準値が設定されている (FAO, 2004)。我が国を含むアジアでは, もう一つのタイプ B トリコテセンであるニバレノール (NIV; 図-2) が DON とともに汚染の報告例が多いことから重視されている (TANAKA et al., 1988)。国内では 2002 年にコムギ中の DON について 1.1 mg/kg の暫定基準値が設定された (厚生労働省通知, 2002)。2008 年には汚染低減のための指針が策定され (農林水産省消費・安全局, 生産局, 2008), ムギ類にお

ける DON, NIV 汚染低減への取り組みがなされている。コムギ, オオムギにおける DON, NIV 含有実態調査も 2002 年以降農林水産省が実施している。ZEA に関しては我が国では食品における最大基準値は設定されていないが, 2005 年以降にコムギ, オオムギ等における含有実態調査が行われている。また, 家畜飼料については 1 mg/kg の暫定許容値が農林水産省により設定されている (農林水産省 消費・安全局農産安全管理課, 2008)。近年, DON や ZEA にグルコースが付加した配糖体の存在が報告されている (BERTHILLER et al., 2005; SCHNEWEIS et al., 2002; 図-4)。これらの配糖体は分子量や物理化学的性質が元の化合物とは異なるため従来の分析法では検出できないが, 生体内に取り込まれると腸内細菌などによって加水分解されてカビ毒を遊離する (GAREIS et al., 1990; DALL'ERTA et al., 2013)。このため, マスクドマイコトキシン (masked mycotoxin) とも呼ばれ, カビ毒の潜在ハザードとして懸念されている。マスクドマイコトキシンを見逃すことはカビ毒リスクの過小評価につながる恐れがあることから, 食品安全保持の観点からも注目されている。また, マスクドマイコトキシンは抗原/抗体反応を利用するカビ毒定量分析キット (ELISA) の抗体に交差反応することで, 正確な定量分析を妨げるともいわれている (GORACHEVA and DESAEGER, 2012)。*Fusarium* 属菌のような植物病原菌がマイコトキシンを産生する理由の一つとして, 感染時に植物体内 (穀類など) への菌糸の侵入をより容易にするためともいわれて



図-1 小麦の健全粒 (左) と赤かび病感染粒

Screening for Mycotoxin Glucosides (masked mycotoxins).

By Hiroyuki NAKAGAWA

(キーワード: カビ毒, 配糖体, マスクドマイコトキシン, LC-MS, フザリウム, mycotoxin, glucosides, masked mycotoxin, LC-MS, *Fusarium*)

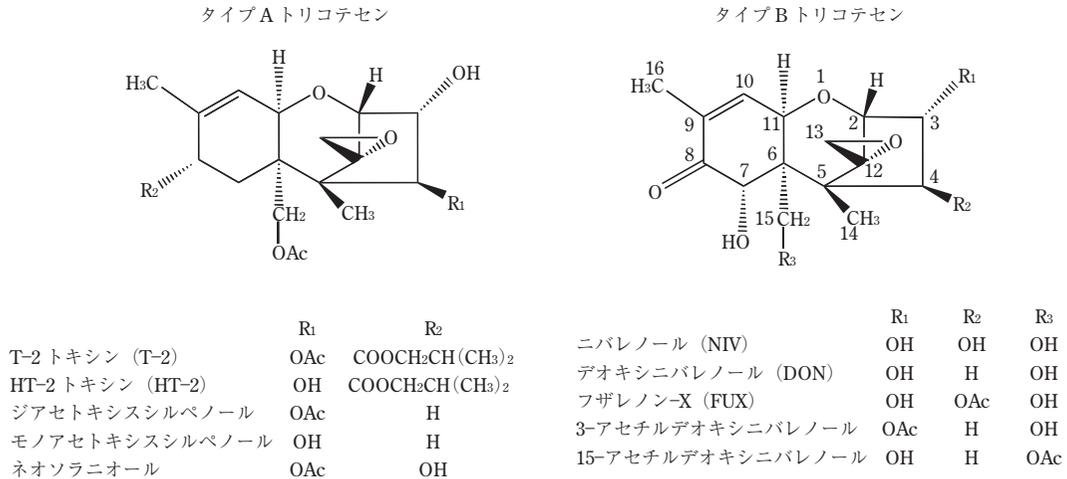


図-2 トリコテセン系カビ毒

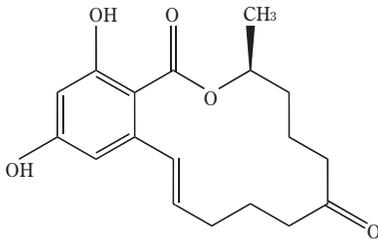


図-3 ゼアラレノン (ZEA)

いる。これに対して植物は外来異物の解毒機構として配糖化やマロニル化等の修飾反応をして液胞の中に蓄積することが知られている (COLEMAN et al., 1997)。DONのグルコシル化に関しては、反応に関与すると思われるUDP-グルコシルトランスフェラーゼの遺伝子もクローニングされている。DON感受性酵母に同酵素遺伝子を導入すると感受性が弱くなることから、当該酵素がマイコトキシンの無毒化に関与していると考えられている (POPENBERGER et al., 2003)。コムギの育種においては、赤かび病の進展抵抗性に関与するQTL (量的形質遺伝子座) を持つ小麦系統ではDONをグルコシル化してマスクドマイコトキシンを産生する活性が高いという報告もなされており (LEMMENS et al., 2005)、QTLとUDP-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子の関係についても興味を持たれる。

II マスクドマイコトキシンの探索

図-2, 3に示したように *Fusarium* 属菌は複数種のマイコトキシンを産生するが、代表的なマスクドマイコトキシンとしては DONGlc および ZEAGlc が知られてい

る。一方、*Fusarium* 属菌が植物 (農作物) に感染するような状況下では、DONやZEA以外のマイコトキシンに関しても配糖体が産生される可能性が十分あると予想された。このような経緯から、新規マスクドマイコトキシンの探索を試みた。本研究を実施するにあたりまず課題となったのが、分析試料の入手であった。試料としては「*Fusarium* 属菌が植物 (栽培中のもの) に感染し比較的高濃度でカビ毒汚染が起こる条件」で調製された農作物が望ましいと考えられた。農研機構では赤かび病 (菌) を人為的に感染させたムギ類を栽培可能な実験圃場を有しており、農林水産省リスク管理型委託プロジェクト (生産工程プロ, 2008~12年) の研究でDONおよびNIVによる高濃度汚染を受けたコムギを栽培していた (図-5)。そこで、この玄麦を分析試料とした。試料確保の次の課題は、存在が明らかでない化合物 (新規マスクドマイコトキシン) を検出する分析手法であった。この問題を解決する手段として筆者らは、高速液体クロマトグラフィー・オービトラップ型質量分析装置 (LC-Orbitrap MS) (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製, 商品名: Exactive) (図-6) を使用した。同装置の特徴は、高分解能の特徴を活かした精密質量による化合物検出ができることである。通常、質量分析装置による未知化合物の検出では、予想される化合物の分子量 (組成式) に基づくイオンで探索を行うと複数の候補ピークが現れるため、その中から目的化合物を判別するのが困難である場合が多い。これに対してLC-Orbitrap MSでは精密質量による精度の高いイオンの識別が行われるため、分子量 (組成式) の情報のみで候補ピークの数絞り込まれる。さらに特徴的なフラグメントイ

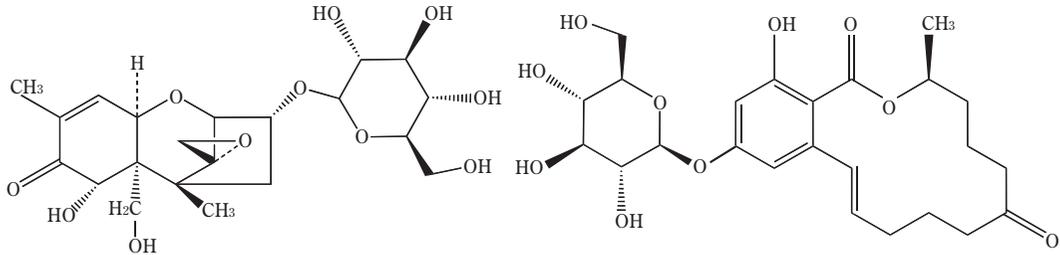


図-4 代表的なカビ毒配糖体 DON-グルコシド (DONGlc) と ZEA-グルコシド (ZEAGlc)

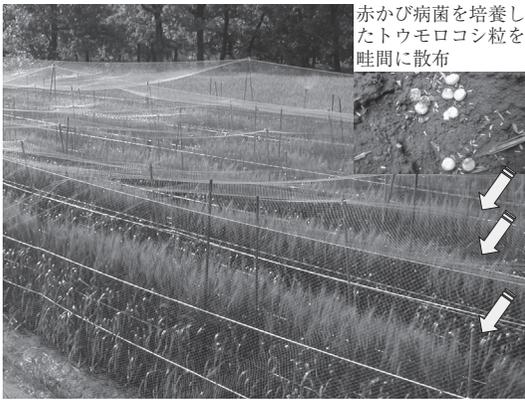


図-5 実験圃場における赤かび病菌感染コムギの栽培
(農研機構・九州沖縄農業研究センター提供)



図-6 高速液体クロマトグラフィー・オービトラップ型
質量分析装置 (LC-Orbitrap MS)

オン(標的化合物の構造から生じる特徴的なイオン断片)を同様に精密質量により検出することで、存在の判別が可能になる (NAKAGAWA et al., 2011; 2012)。このような高分解能質量分析装置を用いて、DON および NIV による高濃度汚染を受けたコムギ玄麦を粉砕した試料の抽出物(水/アセトニトリル/酢酸混合溶液で粉末試料を抽出し、遠心分離により得られた溶液を固相抽出カラムと呼ばれる精製用カラムに通して夾雑物質を除去し、さらに窒素ガス噴霧により乾燥した後に LC-Orbitrap MS 分析用溶媒に再溶解したもの)中に新規マスクドマイコトキシンである NIV-グルコシド (NIVGlc)、さらに NIV の前駆体であるフザレノン-X (FUX) 由来のマスクドマイコトキシンである FUX-グルコシド (FUXGlc) を検出した (NAKAGAWA et al., 2011; 図-7)。

DON, NIV, FUX はいずれもタイプ B トリコテセンであったことから、次に筆者らはタイプ A トリコテセン (図-2) 由来のマスクドマイコトキシンの探索を試みた (NAKAGAWA et al., 2012)。分析試料としては、代表的なタイプ A トリコテセンである T-2 トキシシン (T-2) と HT-2 トキシシン (HT-2) を高濃度に含有する精度管理用

自然汚染トウモロコシ粉末試料を米国 Trilogy 社から購入した。精度管理用試料を用いるメリットとして、①カビ毒産生菌を農作物に接種して培養する手間がかからないこと、②試料の均一性とカビ毒濃度の正確さが担保されていること等がある。我が国では T-2 と HT-2 に関しては食品における最大基準値は設定されていないが、リスク管理措置の必要性を判断するため、2012 年から農林水産省が国産麦類の含有実態調査を行っている。入手したトウモロコシ粉末試料について上記と同様な手法を用いて分析を行ったところ、T-2-グルコシド (T2Glc) と HT-2-グルコシド (HT2Glc) がそれぞれ検出された (NAKAGAWA et al., 2012; 図-8)。この試料からは T2Glc, HT2Glc にさらにグルコースが付加した T-2-ジグルコシド (T2GlcGlc) と HT-2-ジグルコシド (HT2GlcGlc) も検出された (NAKAGAWA et al., 2013 a; 図-8)。このようなグルコースが複数付加した例は DON についても報告されていることから (ZACHARIASOVA et al., 2012)、マスクドマイコトキシンは一連のクラスター (一つのトリコテセン系カビ毒についてグルコースが一つ~それ以上結合した複数種存在し、グループを形成している) として

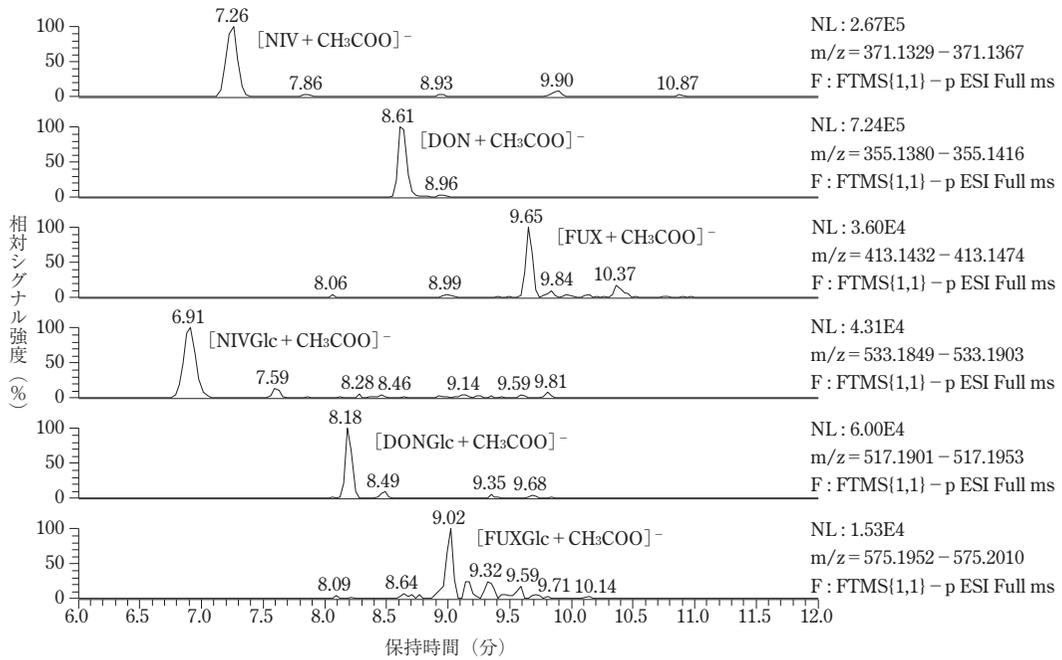


図-7 DON, NIVによる汚染を受けたコムギ試料を分析した際のマスクロマトグラム
(NAKAGAWA et al., 2011)

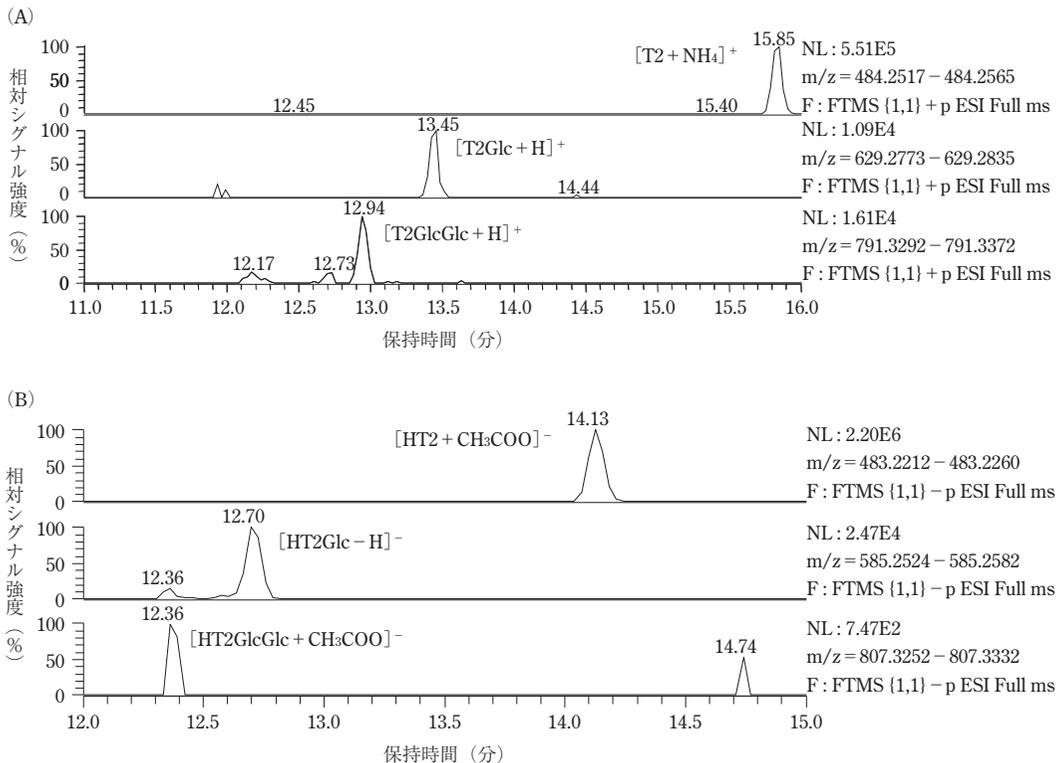


図-8 T-2, HT-2による汚染を受けたトウモロコシ粉末試料を分析した際のマスクロマトグラム

存在するのではないか、と筆者は考えている (NAKAGAWA et al., 2011)。さらに同トウモロコシ粉末試料において別のタイプ A トリコテセンであるネオソラニオール (NES)、ジアセトキシシルベノール (DAS)、モノアセトキシシルベノール (MAS) についてもグルコシドを検出した (NAKAGAWA et al., 2013 a, b; 図-9)。これらの発見により、マスクドマイコトキシンが DON や ZEA のような特定のカビ毒だけではなく、他のトリコテセン系カビ毒についても広く存在することが示された。筆者らがこれまでに検出した各種マスクドマイコ

キシンの構造を図-9, 図-10 に示す。

これらのマスクドマイコトキシンはいずれも試薬標品が入りできない化合物であったため、検量線を用いた定量分析ができなかった。そこで、各試料中に共存する DONGlc/DON の割合を調べた (DONGlc と DON は試薬標品が市販されている) と、前者の汚染コムギ試料では重量比で 15% 程度、後者の精度管理用自然汚染トウモロコシ粉末試料ではモル比で 6% 程度がグルコシル化されていることがわかった。各種トリコテセン系カビ毒における構造の類似性を考えると、NIV, FUX, T-

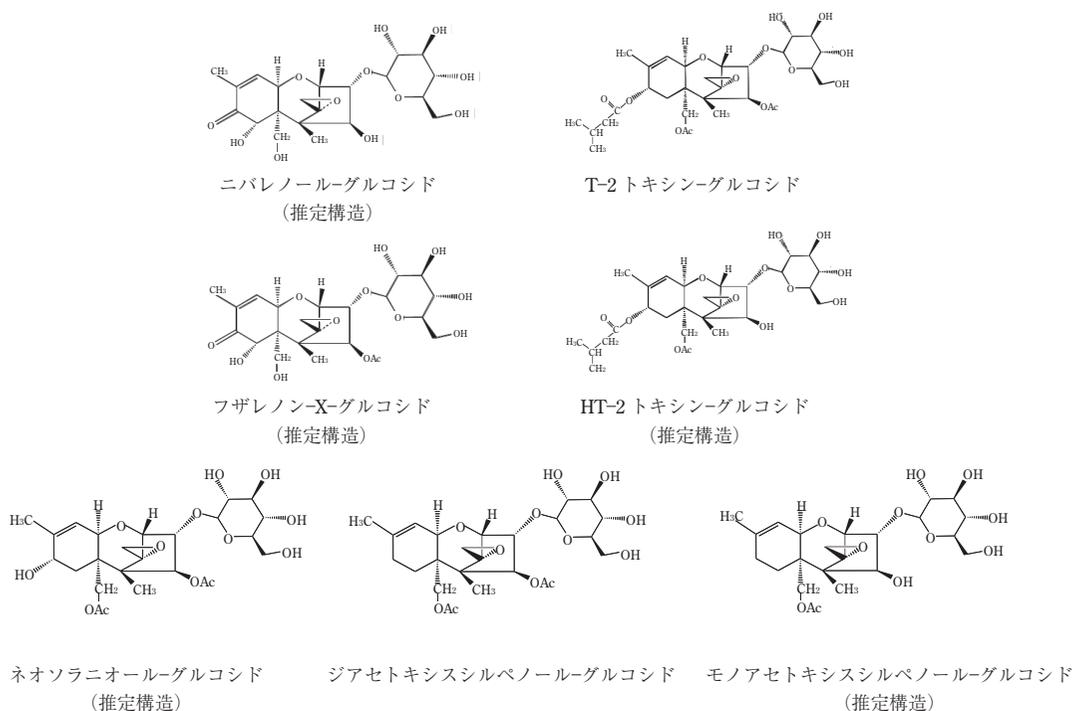


図-9 筆者らがこれまでに検出したマスクドマイコトキシン (モノ-グルコシド)
(NAKAGAWA et al., 2011; 2012; 2013 a; 2013 b)

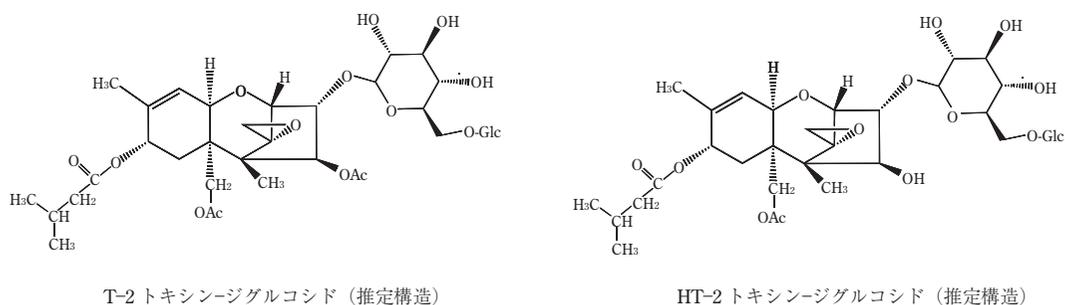


図-10 筆者らがこれまでに検出したマスクドマイコトキシン (ジ-グルコシド)
(NAKAGAWA et al., 2013 a)

2, HT-2, NES, DAS等についても同等程度の割合でグルコシル化が起きていると推定された (NAKAGAWA et al., 2011; 2012; 2013 b)。

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) では2010年にDONリスクの再評価が行われ, DONとDONのアセチル化誘導体を併せたグループPM-TDI (暫定最大耐容一日摂取量) が定められた。一方, DONGlcに関しては (毒性などの) 情報が不足しているということでグループPM-TDIへの算入が見送られた (JECFA, 2010)。リスク評価は科学的根拠に基づいた情報が揃って初めて議論ができる。欧州ではラットに経口投与したDONおよびDONGlcの代謝を調べる研究も行われており, 投与したDONのうち約15%が尿中に移行し, このうち半分以上がグルクロン酸抱合体に変換されていた。これに対しDONGlcはほぼ完全に消化管内で加水分解され, 遊離されたDONの一部がデエポキシ体やグルクロン酸抱合体に変換されていた。これらの結果はDONGlcがDONよりも消化管内で吸収されにくい (毒性がDONよりも弱い) ことを示唆している (NAGL et al., 2012)。欧州では加工食品などにおけるマスクドマイコトキシンの含有量を調査する研究も行われているが, 調査対象となっているのは試薬標品が入手可能なDONGlcが中心である。DONGlcは穀物およびその加工品等について汚染調査が行われており, 平均的な濃度はDON濃度の20%程度と推定されているが (BERTHILLER et al., 2013), なかには70%相当に達する例 (DE BOEVRE et al., 2012) やビールにおいてはDONを上回るケースもある (KOSTELANSKA et al., 2009) とのことであった。一方, 欧州食品安全委員会 (EFSA) はT-2/HT-2のリスク評価のためのデータ募集を2013年に開始しており (EFSA, 2013), その際にグルコシドの存在量に関する情報も募集している (Commission Recommendation 2013/165/EU)。これには筆者を含む複数の研究者が近年相次いでT2Glc, HT2Glcを自然汚染試料から検出したことが背景にあると思われる (LATTANZIO et al., 2012; VEPRIKORA et al., 2012)。今後, マスクドマイコトキシンがPM-TDIへ算入されるか否かは不明であるが, 各種カビ毒の適切なリスク評価に資することを目標として, 引き続き分析法の開発と高精度化に取り組んでいきたい。

謝辞 本研究の一部は平成20~23年度農林水産省リスク管理型委託プロジェクト (生産工程プロ) の一環として実施したものである。関係各位に深謝申し上げる。

引用文献

1) BERTHILLER, F. et al. (2005): *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3421 ~

3425.
 2) ——— et al. (2013): *Molecular Nutrition and Food Research* **67**: 165 ~ 186.
 3) COLEMAN, J. O. D. et al. (1997): *Trends in Plant Science* **2**: 144 ~ 151.
 4) DALL'ERTA, A. et al. (2013): *Chemical Research in Toxicology* **26**: 305 ~ 312.
 5) DE BOEVRE, M. et al. (2012): *Food Additives and Contaminants Part A* **29**: 819 ~ 835.
 6) European Food Safety Authority (EFSA) (2013): *Commission Recommendation on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products*, Official Journal of European Union, L91/12 ~ 15.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:091:0012:0015:EN:PDF>
 7) Food and agriculture organization of the United Nations (FAO) (2004): *FAO Food and nutrition papers 81: Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*, Rome, FAO.
<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.HTM>
 8) GAREIS, M. et al. (1990): *Journal of Veterinary Medicine Series B* **37**: 236 ~ 240.
 9) GORYACHEVA, I. Y. and S. DE SAEGER (2012): *World Mycotoxin Journal* **5**: 281 ~ 287.
 10) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2010): *Summary and Conclusions the Seventy-second Meeting of Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA/72/SC)*, Rome, FAO, p.10 ~ 11.
http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf
 11) KOSTELANSKA, M. et al. (2009): *J. Agric. Food Chem.* **57**: 3187 ~ 3194.
 12) 厚生労働省通知 (2002): 小麦中のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について (平成14年5月21日, 食発第0521001号), 厚生労働省, 東京。
 13) LATTANZIO, V. M. T. et al. (2012): *Journal of Mass Spectrometry* **47**: 466 ~ 475.
 14) LEMMENS, M. et al. (2005): *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1318 ~ 1324.
 15) NAGL, V. et al. (2012): *Toxicology Letters* **213**: 367 ~ 373.
 16) NAKAGAWA, H. et al. (2011): *Food Additives and Contaminants Part A* **28**: 1447 ~ 1456.
 17) ——— et al. (2012): *World Mycotoxin Journal* **5**: 271 ~ 280.
 18) ——— et al. (2013 a): *Toxins* **5**: 590 ~ 604.
 19) ——— et al. (2013 b): *Food Additives and Contaminants Part A* **30**: 1407 ~ 1414.
 20) 農林水産省 消費・安全局, 生産局 (2008): 麦類のデオキシニバレノール・ニバレノール汚染低減のための指針 (平成20年12月), 農林水産省, 東京。
<http://www.maff.go.jp/j/press/syuan/nouan/pdf/081217-01.pdf>
 21) ———消費・安全局 農産安全管理課: いろいろなカビ毒: ゼアラレノン (最終更新: 平成26年7月28日), 農林水産省, 東京。
http://www.maff.go.jp/j/syuan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/kabi_iroiro.html#ZEN
 22) POPPENBERGER, B. et al. (2003): *Journal of Biological Chemistry* **278**: 47905 ~ 47914.
 23) SCHNEWEIS, I. et al. (2002): *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1736 ~ 1738.
 24) TANAKA, T. et al. (1988): *ibid.* **36**: 979 ~ 983.
 25) VEPRIKOVA, Z. et al. (2012): *World Mycotoxin Journal* **5**: 231 ~ 240.
 26) ZACHARIASOVA, M. et al. (2012): *J. Agric. Food Chem.* **60**: 9280 ~ 9291.