

博士論文（要約）

マイコトキシン生産阻害物質の作用機構に関する研究

古川 智宏

## 略語一覽

2D-DIGE: 2 dimensional differential gel electrophoresis

APS: ammonium persulfate

ATP: adenosine triphosphate

BCA: bicinchoninic acid

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

BLAST: basic local alignment search tool

Boc: *tert*-butoxycarbonyl

BPB: bromophenol blue

BSA: bovine serum albumin

CBB: coomassie brilliant blue

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CoA: coenzyme A

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FADH<sub>2</sub>: flavin adenine dinucleotide

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPLC: high-performance liquid chromatography

HRP: horseradish peroxidase

IC<sub>50</sub>: half maximal inhibitory concentration

IPTG: isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

KLH: keyhole limpet hemocyanin

LB: luria-broth

LC: liquid chromatography

MIC: minimum inhibitory concentration

mRNA: messenger ribonucleic acid

MS: mass spectrometry

NADH: nicotinamide adenine dinucleotide

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NBT: nitro blue tetrazolium

OD: optical density

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PCI: phenol/chloroform/isoamyl alcohol

PCR: polymerase chain reaction

PDB: potato dextrose broth

PVDF: polyvinylidene difluoride

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

RNA: ribonucleic acid

SD: standard deviation

SDH: succinate dehydrogenase

SDS: sodium dodecyl sulfate

TBTA: tris[(1-benzyl-1H-1, 2, 3-triazol-4-yl)methyl]amine

TCA: trichloroacetic acid

TEMED: *N,N,N',N'* -tetramethylethylenediamine

THF: tetrahydrofuran

TLCK: Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

UV: ultraviolet

X-gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

略語一覧

目次

序論	1
第一章 トリコテセン生産阻害物質 precocene II の作用機構	32
1-1 precocene II 結合タンパク質の同定	32
1-1-1 precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの調製	32
1-1-2 <i>F. graminearum</i> の細胞小器官の粗分画	32
1-1-3 ウェスタンブロットィングによる分画の確認	33
1-1-4 ミトコンドリア画分からの precocene II 結合タンパク質の同定	34
1-1-5 核・未破碎画分からの precocene II 結合タンパク質の同定	35
1-1-6 細胞質基質画分からの precocene II 結合タンパク質の探索	35
1-1-7 大腸菌を用いた組換え VDAC の調製	36
1-1-7-1 His-VDAC の発現	36
1-1-7-2 精製 His-VDAC の調製	36
1-1-8 His-VDAC と precocene II の結合実験	37
1-1-9 酵母抽出物からの precocene II 結合タンパク質の同定	37
1-2 活性酸素の発生と <i>F. graminearum</i> の 3-ADON 生産量の関係	38
1-2-1 活性酸素関連試薬が 3-ADON 生産量に与える影響	39
1-2-2 抗酸化物質が 3-ADON 生産量に与える影響	40
1-2-3 precocene II が細胞内のスーパーオキシド量に与える影響	41
1-2-4 precocene II の添加による酸化ストレスマーカーの変化	42
1-2-5 precocene II が菌体内アセチル CoA 量に与える影響	43
1-2-6 3-ADON 生産量、 <i>Tri6</i> 発現量、ミトコンドリアスーパーオキシド量の経時変化 と precocene II が与える影響	44
1-2-7 <i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊株の作製	46
1-2-7-1 MnSOD の遺伝子の同定	47
1-2-7-2 Split-marker アプローチによる <i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊株の作製	47
1-2-7-3 サザンブロットィングによる <i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊の確認	48
1-2-7-3-1 <i>MnSOD1</i> 破壊の確認	48
1-2-7-3-2 <i>MnSOD2</i> 破壊の確認	49

1-2-8	<i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊株の生育	50
1-2-8-1	<i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊株の孢子形成	50
1-2-8-2	<i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊株の寒天培地上の生育	50
1-2-9	<i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊株の 3-ADON 生産量	51
1-2-10	<i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊株の <i>Tri6</i> および <i>Tri5</i> 発現量	51
1-2-11	<i>MnSOD1</i> および <i>MnSOD2</i> 破壊株のスーパーオキシド量の経時変化	52
1-3	考察	52
	実験の部	90
第二章	アフラトキシン生産阻害物質 dioctatin の作用機構	120
2-1	dioctatin A が代謝と遺伝子発現に与える影響	120
2-1-1	dioctatin A が代謝に与える影響	120
2-1-2	dioctatin A が遺伝子発現に与える影響	121
2-2	dioctatin 結合タンパク質の精製と同定	123
2-2-1	dioctatin 固定化ビーズの調製	124
2-2-2	dioctatin 結合タンパク質の精製	124
2-2-2-1	加熱による溶出	125
2-2-2-2	dioctatin 溶液による溶出	125
2-2-3	dioctatin 結合タンパク質の同定	126
2-2-3-1	LC/MS/MS による分析	126
2-2-3-2	抗 ClpP ペプチド抗体による確認	128
2-2-3-3	組換え ClpP と dioctatin の結合実験	128
2-2-3-3-1	組換え ClpP-FLAG の発現	128
2-2-3-3-2	ClpP-FLAG の精製	129
2-2-3-3-3	ClpP-FLAG と dioctatin の結合実験	129
2-3	ClpP の細胞内局在の解析	130
2-3-1	<i>A. flavus</i> の細胞小器官の粗分画法の検討	130
2-3-2	各画分の抽出タンパク質からの ClpP の検出	131

2-4 ClpP の活性に対する dioctatin の影響	131
2-4-1 dioctatin が ClpP のオリゴペプチド分解活性に与える影響	132
2-4-2 dioctatin が ClpP のタンパク質分解活性に与える影響	133
2-5 2D-DIGE を用いた dioctatin がミトコンドリアタンパク質の分解に与える影響の解析	133
2-5-1 2D-DIGE 解析	134
2-5-2 dioctatin 添加が影響を与えるタンパク質の同定	135
2-6 考察	136
実験の部	172
第三章 シリング酸アルキルおよび類縁化合物のアフラトキシン生産阻害活性	189
3-1 シリング酸アルキルがアフラトキシン生産および菌体重量に与える影響	190
3-2 アルキルパラベンおよび没食子酸アルキルがアフラトキシン生産および菌体重量に与える影響	190
3-3 シリング酸アルキルおよび類縁化合物が呼吸鎖複合体 II の活性に与える影響	191
3-4 考察	192
実験の部	200
総合討論	202
参考文献	209
謝辞	223

## 序論

### マイコトキシン

国土の大部分が温暖な気候に恵まれた日本は、樹木の豊富な山林が広い面積を占めつつも、平野部は雨の多い農耕に適した土地となっており、米を始めとした豊かな農産物をもたらしてくれる。その分、高湿、高温の梅雨の時期を、人々は豊作の証として耐えてきた。住環境には黒カビが生え、食物を放置すれば青カビが生えてくる。これらのカビは多くの場合、急性毒性をもたらすような毒物は生産しないが、一部のカビにはヒトや家畜に強力な中毒を引き起し得る毒物を産生し、農作物を汚染するものがある。カビの生産する有毒な二次代謝産物を真菌(myco-)の生産するトキシンとの意味でマイコトキシン (mycotoxin) と呼ぶ [1]。

現在では、300 種類以上のマイコトキシンが報告されており、大部分が *Aspergillus* 属、*Fusarium* 属または *Penicillium* 属のカビによって生産される [1]。マイコトキシンによる穀物の汚染、とりわけ小麦、トウモロコシ、ナッツ類といった主要穀物の汚染は広く世界的に認知されており、国際連合食糧農業機関 (FAO) による試算では毎年世界で生産される農作物の 25%が何らかのマイコトキシンに汚染され、毎年 10 億トンの食糧が失われている [2]。

マイコトキシン汚染と人間の社会との関係は古く、すでに紀元前 6 世紀のアッシリアにカビに汚染されたライ麦の中毒の記録が見られるが、正確な記録は紀元 994 年にフランスのアキテーヌ地方で起きた中毒に残されており、当時の人口の半分に当たる約 2 万人が亡くなったとされている [3]。その後の研究により、ライ麦の急性中毒は麦角菌 *Claviceps purpurea* の生産する ergotamine (図 0-1) をはじめとする数種類のアルカロイドが原因であるとわかり、アルカロイドの血管収縮作用が壊疽、流産、痙攣を引き起こすことがわかった [4]。

日本においてはカビ毒の研究が早くから行われており、昭和 12 年には三宅らにより黄色に変色した米から *Penicillium* 属のカビが単離され、感染した米に毒性物質が存在することが示されていた。黄変米の問題は戦後の食糧難で再び注目され、食糧生

産の逼迫のため輸入された台湾産の米に黄変米が見つかり、マイコトキシンの研究が精力的に行われる運びとなった。*Penicillium citrinum* から見つかった citrinin (図 0-1) は、黄変米に含まれるマイコトキシンの中で最も早く分離されたものであり、化学構造は 1948 年にクラムらにより明らかにされていた [5]。その後の動物実験により、citrinin は強い腎毒性を有し、毒性は腎臓での水の再吸収を抑制するために生じマウスでの半数致死量は体重 1 kg あたり 35 mg であることが明らかにされた [6]。のちに、伊藤らにより citrinin は肝臓における発癌性を有することも示された [7]。

本研究で対象とした *Fusarium* 属の生産するトリコテセン類の研究も日本人により精力的に行われてきた。麦類に感染した *Fusarium* 属のカビにより赤色の代謝物質の蓄積が見られるため、この麦の病変を麦類赤カビ病と呼ぶ。日本では小麦の開花期が梅雨と重なるため、現在においても麦類赤カビ病の防除の徹底が図られている。1953 年には初夏から天候不順が続き麦類赤カビの大発生が生じ、汚染麦を食したヒトや家畜での嘔吐や下痢を主症状とする中毒が報告された。これに伴って行われた研究の結果、原因菌の *Fusarium graminearum* から角田らにより nivalenol (NIV) (図 0-2) [8]が、吉澤らにより deoxynivalenol (DON) (図 0-2) [9]が単離同定されている。*Fusarium* 属菌によるマイコトキシン汚染がもたらした人的被害は第二次大戦後のソビエトにおいても見られ、配給された保存穀物により食中毒性無白血球症 (alimentary toxin aleukia, ATA) と呼ばれる中毒が起きたが、この原因は *Fusarium sporotrichioides* の生産する T-2 toxin (図 0-2) であった [10]。トリコテセン類は特徴的なトリコテセン骨格を基本骨格とするセスキテルペン類であり、これまでに 100 種類以上が同定されている。構造の違いによりタイプ A から D の 4 種類に分けられるが、日本ではタイプ B の deoxynivalenol (DON) が食品から検出されることが多く、2001 年の WHO/FAO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) により DON の暫定最大耐用量が体重あたり 1 日 1  $\mu\text{g}$  と定められたのに合わせ、2002 年に厚生労働省は玄麦における DON の暫定基準値を 1.1 ppm と定めた [11]。トリコテセン系マイコトキシンによる汚染は比較的中緯度、高緯度地域で見られ [12]、アメリカでは小麦の DON 汚染により毎年 6.5 億ドル

の経済的被害が生じていると見積もられている [1]。トリコテセン系マイコトキシンによる中毒はリボソームのタンパク質生合成を阻害することにより生じることが知られ、その毒性には C-9 と C-10 の二重結合、C-12 と C-13 のエポキシドを有した骨格が必要である [13]。認められる病状として消化器障害による強い吐き気や下痢、 $\beta$  細胞系リンパ球が消失し B 細胞の生産が止まることによる免疫不全、白血球、血小板の顕著な減少などがある。DON は T-2 toxin や NIV と比較すると急性毒性は低いが、吐き気や下痢性中毒の強さ [14]、広範な汚染により最も重要なトリコテセン系マイコトキシンと考えられる。DON の生合成経路、調節メカニズム、防除方法を後述する。図 0-1 に示した zearalenone は DON 同様 *F. graminearum* の生産するマイコトキシンであるが、DON と異なりポリケチド経路で生合成される。女性ホルモンと類似した作用をもつ内分泌かく乱物質であり、子宮細胞内のエストロゲン受容体と強い結合親和性を有することが報告されている [15]。ヒトよりも豚などの家畜に対する被害が多く報告され、zearalenone に汚染されたトウモロコシを食べたメスの豚の外陰部が赤くはれ上がる中毒事故の報告がある。

ochratoxin A (図 0-1) は *Aspergillus ochraceus* の培養物から単離されたマイコトキシンであり、肝臓や腎臓に強い毒性を示すことが報告されている [16]。北欧諸国で報告されていた豚の腎障害や、バルカン諸国でのヒトの腎疾患への関与が指摘されている。

DON 同様に本研究で対象としたアフラトキシン類は、マイコトキシンが世界的に注目される端緒となったいわゆる「ターキー X 病事件」後の調査により発見された。イギリスでクリスマス用に飼育していた七面鳥数万羽が肝臓障害により中毒死した 1960 年の事件は、*Aspergillus flavus* が感染したブラジル産のピーナッツミールが原因であることが突き止められた [17]。その後の研究から *A. flavus* によってアフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>(図 0-3)が生産されることがわかり、アフラトキシンが中毒の原因物質であることが確かめられた [18]。これらの毒物を摂取した家畜の乳汁からは、アフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>が体内で水酸化された代謝産物としてアフラトキシン M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>(図 0-3)も単離された。また *A. flavus* 以外のアフラトキシン生産菌として見出された *Aspergillus parasiticus* はアフラトキシン B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>以外にアフラトキシン G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>(図 0-3)

を生産することがわかった。アフラトキシンは急性毒性として肝機能障害、慢性毒性として肝臓がんを引き起こすことが判明しているが [19]、中でもアフラトキシン B<sub>1</sub> の発がん性は既知の天然物質で最強と言われている。アフラトキシン B<sub>1</sub> の毒性の本体は肝臓内のシトクロム P450 モノオキシゲナーゼにより変換されて生じたアフラトキシン B<sub>1</sub>-8,9-エポキシドにあり、これが DNA 中のグアニン残基の N-7 位に付加することで変異が生じると考えられている [20]。中緯度、高緯度地域に汚染が見られる DON と比べ、アフラトキシンの汚染は発展途上の国々が多い熱帯、亜熱帯を中心に見られ、インドネシア、フィリピン、タイの東南アジアの 3 カ国だけでも毎年 9 億ドル以上の被害が生じ [1]、世界全体では約 45 億人が慢性的にアフラトキシンに曝されていると見積もられている [21]。実際に、タイ、フィリピン、インドネシアの農耕地の土壌からアフラトキシン生産菌の検出を行ったところ、約半数のサンプルからアフラトキシン生産能を有する *A. flavus* または *A. parasiticus* が見つかったのとの報告がある [22]。ケニアでは 2004 年にアフラトキシンに汚染されたトウモロコシを食べたことによる大規模な急性中毒が起こり、317 人の症例と 125 人の死亡が報告された [23]。温帯に位置する日本では、沖縄の一部地域を除き *A. flavus* は検出されてもアフラトキシン生産能はほとんど検出されないが、今後地球規模の温暖化が進めばアフラトキシン汚染が広がるケースは十分に考えられる。現在においても、食料の多くを輸入に依存していることから、アフラトキシンに汚染された穀物が混入するリスクが常に存在し、日本においては 10 ppb の厳しい規制値が設けられている。アフラトキシンによる汚染は、その強い毒性、世界規模の汚染から最も深刻な問題であると考えられている。アフラトキシンの生合成経路、調節メカニズム、防除方法を後述する。

#### DON の生合成経路および調節機構

図 0-4 にトリコテセンの生合成経路を示した [24]。トリコテセン生合成に特有の反応は、TRI と名付けられたトリコテセン生合成酵素群によってなされる。トリコテセン生合成の出発物質はアセチル CoA であり、アセチル CoA からメバロン酸経路を経て生合成されるファルネシル二リン酸が一次代謝と二次代謝の分岐点となる。ファル

ネシルニリン酸は真菌の細胞壁の主成分であるエルゴステロールの合成にも用いられるが、トリコテセン生合成においては TRI5 による複雑な環化反応により trichodiene が生成し、TRI4 による多段階反応によって isotrichotriol が生成後、更に複数段階の反応が行われ二次代謝産物である DON が生産される。NIV を生産する一部の *F. graminearum* および *Fusarium sporotrichioides*、また T-2 toxin を生産する *F. sporotrichioides* においては、Tri7 および Tri13 が機能することで calonectrin から DON 生合成とは別の経路をたどる [24, 25]。生合成経路中の 3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON)は脱アセチル化によって DON を与える DON の生合成前駆体であるが、DON のアセチル化によっても生成することが知られている。これは、DON を毒性の弱い 3-ADON にしておくという菌のもつ耐性機構ではないかと考えられている。3,15-ADON の C-15 位を脱アセチル化し 3-ADON を与える酵素は同定されていない [24]。

これまでに知られている DON 生産の調節機構の概略を図 0-5 に示した。DON の生合成の大部分を担う TRI 酵素群をコードする *Tri* 遺伝子群の大半は、ファルネシルニリン酸から trichodiene を生合成する酵素をコードする *Tri5* を含む *Tri5* クラスタ内に存在する [24]。このクラスタ内に存在する *Tri6* は Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> の zinc finger 型の転写調節因子 TRI6 をコードするが、TRI6 はこれまで明らかになった範囲では DON 生合成調節機構において最も上流に位置する転写調節因子だと考えられている [26]。ノーザンブロット解析の結果から TRI6 は *Tri10* を除くすべての *Tri* 遺伝子群の発現を制御していることが示されており [27]、さらに *Tri6* の破壊株では *Tri* 遺伝子群だけでなく、メバロン酸経路の遺伝子である *HMGS* (hydroxymethylglutaryl-CoA synthetase をコードする遺伝子) と *HMGR* (hydroxymethylglutaryl-CoA reductase をコードする遺伝子) の転写量も減少していたことから、TRI6 はアセチル CoA からトリコテセンまでトリコテセン生合成に関わるすべての遺伝子の発現を制御していると考えられている。TRI10 も TRI6 同様転写調節因子であり、TRI6 と複合体を形成し *Tri* 遺伝子群の発現活性化を補助している可能性が考えられているが [26]、実験的な証拠は得られていない。TRI6 をタグつきで発現させ、タグを認識する抗体により TRI6 を沈降させ

て TRI6 の結合する DNA 配列を探索したクロマチン免疫沈降実験の結果から、TRI6 は *Tri* 遺伝子群のみならず 200 近い遺伝子の転写に関わっていること示されており、さらに *Tri6* 遺伝子自身の転写も制御することがわかっている [28]。

*Tri6* 遺伝子をはじめとした *Tri* クラスターの遺伝子の転写に影響を与え、DON 生産を調節する環境因子として pH や光、炭素源、窒素源が知られている。*F. graminearum* は *in vitro* における培養において培地の酸性化が見られるが、培地の pH を中性またはアルカリ性に保って培養すると *Tri* 遺伝子の発現が見られなくなり、トリコテセン生産が停止する [29, 30]。pH によりトリコテセン生産が制御される要因として pH に依存して遺伝子発現を調節する機能を持つ Pac1 タンパク質の関与が報告されており、Pac1 を恒常的に発現させた変異株では *Tri* 遺伝子の発現が抑制されること、Pac1 の結合サイトと考えられる配列が *Tri6* を含む複数の *Tri* 遺伝子に見られることがわかっている [31]。二次代謝における光作用のメカニズムは Bayram らにより *Aspergillus nidulans* においてはじめて示されたが、それには VelB、VeA、LaeA の 3 つのタンパク質からなる velvet 複合体が関与している [32]。光条件下では VeA が細胞質基質に局在するのに対し、暗黒下では velB/VeA 複合体として核内に移行し、二次代謝全体の調節因子として働く LaeA と結合して velvet 複合体を形成し、二次代謝に関わる遺伝子の発現を増加させると考えられている [32]。*F. graminearum* においても、VelB の破壊株 [33]、VeA の破壊株 [34]でトリコテセン生産が減少したとの報告があり、velvet 複合体がトリコテセン生産を正に制御するメカニズムが示唆される。炭素源に関しては、スクロース培地でトリコテセン生産が見られる一方、グルコース培地ではトリコテセン生産が見られないとの報告がある [35]。*A. nidulans* で同定された CreA タンパク質はグルコース存在下で特定の遺伝子の発現を減少させることが知られるが [36]、*F. graminearum* において CreA タンパク質の機能についての報告はない。窒素源に関しても、*A. nidulans* で同定された AREA タンパク質のホモログの関与が示唆されるが、現在その報告はない。

また、過酸化水素を培地に添加すると 15-ADON 生産が増加したとの報告があり [37]、過酸化水素によりもたらされる酸化ストレスが DON 生産に影響する可能性が

考えられている。一方で、NIV を生産する *F. graminearum* に対しては過酸化水素が NIV 生産を抑制したとの報告もあり [38]、*F. graminearum* のタイプによる応答性の違いが示唆されている。最近、ヒストンアセチルトランスフェラーゼのひとつの触媒サブユニットである酵母 ELP3 の *F. graminearum* における変異株においてトリコテセン生産と *Tri* 遺伝子の発現が減少していたとの報告があり [39]、変異株においてはヒストン H3 のアセチル化の減少が見られていたことから、ヒストンのアセチル化と *Tri* 遺伝子の発現の関連が示唆されている。

以上述べたように、*Tri* 遺伝子の発現は種々の因子により制御が行われていることがわかってきているが、報告の大部分が破壊株を用いて行われた実験結果に基づくものである。

前述したように、DON は生産者である *F. graminearum* の細胞自身に対しても、リボソームの阻害による毒性を発揮し得る。自身に対する毒性を回避するとともに、一次代謝と二次代謝を空間的に分離するメカニズムとして、トキシソームと名付けられた DON 生合成の工場となる小胞の存在が示唆されている [40]。Menke らは、DON 生合成が誘導される条件下で GFP の蛍光タグをつけた TRI1、TRI4 および HMGR が 3-4  $\mu\text{m}$  の小胞に共局在することを見出した。さらに小胞内で DON が生合成された後、TRI12 を含む小胞が分離して細胞膜と融合し、DON が細胞外へ放出されるメカニズムの存在を示唆した。HMGR は前述のようにファルネシル二リン酸の合成に関わるメバロン酸経路の酵素であり、トキシソーム内では HMGR 以降のトリコテセン生合成の反応が全て起こっていることが予想される。しかしながら、原料となるアセチル CoA がどのように運ばれるのか、エルゴステロール合成に用いられるファルネシル二リン酸も同様に小胞内で合成されるのか等はわかっていない [40]。

### DON の生産阻害物質

*F. graminearum* による農作物の汚染に関する規制として、厚生労働省によって 2002 年に、小麦に含有される DON の暫定基準値 1.1 ppm が設定され、さらに農林水産省によって 2003 年、小麦の赤かび粒混入率 0.0% が設定されている。DON は熱安定性

が高く、環境の変化や加熱により生産菌が死滅したあとも食品中に残存し、除去が困難である。そのため、汚染を防除する以外に方法はなく、現在では DON の汚染および赤かび病対策として品種の改良や播種時期の変更といった「耕種的防除」や、抗カビ剤であるテブコナゾール、メトコナゾール、チオファネートメチルを農場に散布する「薬剤防除」、粒子の大きさや重さから罹病した小麦を判別する「選別」の 3 つの方法が行われている。これらの方法により DON の検出値は 1.1 ppm を下回る場合が多いが、基準値を上回るような年もあり [41]、さらなる汚染防除法の開発が求められている。殺菌剤による防除は現在最重要視されているが、これらの薬剤はカビに対し殺菌的に働くため、ひとたび薬剤耐性菌が生じると急激に蔓延する恐れがある。2002 年に Bai らにより、trichodiene 合成酵素をコードする *Tri5* を破壊しトリコテセン非生産とした *F. graminearum* の分生子を圃場において小麦に散布したところ、小麦への初期感染は見られるものの、赤かび病の発症が見られた穂の数が野生株に比べ大きく減少したとの報告がなされた [42]。つまり、トリコテセン生産は *F. graminearum* の小麦への初期の感染には関与しないが、小麦中の細胞の細胞壁を貫通して広がり、赤かび病の症状を示すまで感染を拡大させる上で必須であることが示唆されている。つまり、DON 生産の抑制は赤かび病の防除にも繋がる可能性がある。ここから、DON 生産を特異的に抑制する薬剤は DON 汚染および赤かび病に対し有用であるとの考えのもと、植物成分、無機化合物および合成化合物といった種々のスクリーニング源から DON 生産阻害剤が探索された [43]。スクリーニング源のなかでも、植物由来の精油には比較的複雑でない化合物が含まれるため同定が迅速に行えること、生合成遺伝子を利用した組換え体作物への展開が可能であること、精油自体を用いた実用化が可能なことなどの利点がある。市販の精油について *F. graminearum* の 3-ADON 生産阻害活性を指標にスクリーニングが行われた結果、矢口、吉成らによりジャーマンカモミール *Matricaria recutita* の精油から precocene I、precocene II および(*E*)-、(*Z*)-spiroether (図 0-6) [44, 45]が、ユーカリペパーミントガムの精油から(-)-piperitone が活性物質として単離同定された(図 0-6) [44]。(*E*)-、(*Z*)-spiroether の 3-ADON 生産阻害活性は TRI4 を阻害することで生じることが、酵母を用いた TRI4 活性測定系により判明している [45]。

これら阻害物質の中でも、precocene II は *F. graminearum* の生育を阻害することなく、IC<sub>50</sub> 1.2 μM の低濃度で 3-ADON 生産を阻害する強い活性を示す。precocene I および precocene II は抗幼若ホルモン活性物質としても知られる物質である。この precocene I または II を半翅目および直翅目昆虫に塗布すると、幼若ホルモンの産生器官であるアラタ体を摘出したのと同様の早熟変態が起こる。この抗幼若ホルモン活性においても precocene II は precocene I よりも強い活性を有することが知られる [46]。以下にこれまでに判明している precocene II の 3-ADON 生産阻害活性における作用を示す。

### precocene II の既知の作用

precocene II は図 0-7 に示したように、スクロースを含む液体培地における 3-ADON 生産および *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* の転写量を濃度依存的に大きく減少させる [44]。その後、*Cryptococcus neoformans* において Co<sup>2+</sup> がエルゴステロール生合成の制御機構に影響を与えるとの報告と [47]、エルゴステロール生合成の前駆体であるファルネシル二リン酸の生合成遺伝子が *TRI6* の制御下にある事実を考え合わせ、露木らにより Co<sup>2+</sup> が 3-ADON 生合成に与える影響が調べられた [48]。Co<sup>2+</sup> は 30 μM の添加で 3-ADON 生合成を増加させ、*Tri* 遺伝子である *Tri4*, *Tri6* の転写量、メバロン酸経路の遺伝子である *HMGS*, *HMGR* の転写量、ファルネシル二リン酸からエルゴステロールへの生合成に関わる酵素遺伝子である *erg3*, *erg25* の転写量を増大させたが、これらの増加は precocene II 300 μM の共添加で抑制され、precocene II の作用点が Co<sup>2+</sup> の作用点の上流に存在することが示唆された。更に、坂本、露木らは、蛍光色素を用いた二次元電気泳動解析 (2D-DIGE) から、precocene II の添加によってエタノール発酵に関与するアルコールデヒドロゲナーゼおよびピルビン酸デカルボキシラーゼと、解糖系酵素のエノラーゼのタンパク質レベルが増大するとともに、ミトコンドリア由来のクエン酸をアセチル CoA に変換する細胞質基質の酵素である ATP クエン酸リアーゼ (ATPCL) のタンパク質レベルが減少すること報告した [49]。前述したように、スクロースを含む培地で 3-ADON の生産が見られる一方、グルコースおよびフルクトースの培地では 3-ADON はほとんど生産されない [35]。坂本らは、ATPCL をコードす

る遺伝子の転写量がグルコースおよびフルクトース培地に比べスクロース培地で有意に増加しており、precocene II の添加によってスクロース培地での転写量が減少することを見出した [49]。また、30  $\mu\text{M}$  の  $\text{Co}^{2+}$  の添加により ATPCL をコードする遺伝子の転写量が増加し、300  $\mu\text{M}$  の precocene II の共添加により転写量の増加が抑制されることを示した。しかし、ATPCL をコードする遺伝子のプロモーター領域には TRI6 の認識配列は存在しないため、転写量増減のメカニズムは不明であり、precocene II が DON 生産阻害をもたらす直接的な原因は未解明である。

### アフラトキシンの生合成経路および調節機構

アフラトキシンの生合成経路を図 0-8 に示す。アフラトキシン誘導体は主としてアフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン G<sub>1</sub>、アフラトキシン G<sub>2</sub> であるが (図 0-2)、家畜の乳汁からは代謝産物としてアフラトキシン M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> (図 0-2) も単離される。アフラトキシン B<sub>1</sub>、アフラトキシン B<sub>2</sub>、アフラトキシン M<sub>1</sub> および M<sub>2</sub> は difurocoumarocyclopentenone 構造を有するために紫外光により青色の蛍光を発するのに対し、アフラトキシン G<sub>1</sub>、アフラトキシン G<sub>2</sub> は difurocoumaro- $\delta$ -lactone 構造を有し、グリーンの蛍光を示す。アフラトキシンの生合成経路は遺伝子導入実験や遺伝子破壊実験、in vitro での酵素反応系の構築などにより一部を除きほとんどが理解されている [50, 51]。アフラトキシンは acetyl-CoA を出発物質とし、菌体細胞内で 28 段階以上の酵素反応によって生合成されている。まず、脂肪酸合成酵素 Fas-1 および Fas-2 の働きにより acetyl-CoA と malonyl-CoA から hexanoyl-CoA が合成され、hexanoyl-CoA はポリケタイド合成酵素 Pks の働きにより malonyl-CoA を基質として伸長され、アンスロン骨格を有する hexanoyltetrahydroxyanthone (HexAT) が生成する。HexAT のアンスロン骨格内に酸素原子が導入され鮮やかな赤色を示す norsolorinic acid (NA) が生成するが、この反応が酵素により触媒されるのか自然に生じるのかは確定されていない。その後の *nor-1* のコードする酵素による還元は厳密な立体特異性があり、NA からは (1S) 体の averantin (AVN) が生じる。AVN からは更に複雑な酸化還元や脱水反応を経て versicolorin B が生成し、versicolorin B が *verA* のコードする酵素により

versicolorin A に変換された場合の最終産物がアフラトキシン B<sub>1</sub> またはアフラトキシン G<sub>1</sub> となる一方、versicolorin B のまま反応が進んだ場合の最終産物はアフラトキシン B<sub>2</sub> またはアフラトキシン G<sub>2</sub> となる。その後、複雑な骨格転移反応および2回のメチル化を経て、*ordA* のコードする多機能酵素によりアフラトキシン B<sub>1</sub> (またはアフラトキシン B<sub>2</sub>) が生成する。*ordA* に加え、*cypA*、*nadA* のコードする酵素が加わった場合、最終産物はアフラトキシン G<sub>1</sub> (またはアフラトキシン G<sub>2</sub>) となる。

図 0-9 にアフラトキシン遺伝子クラスターの模式図および調べられている *aflR* の発現制御機構を記した。アフラトキシン生合成に関わる約 25 個の遺伝子は *A. flavus* の 8 つの染色体のうち第三染色体上で約 70 kb のクラスター構造を形成しており、Cys<sub>6</sub> の zinc finger 型の転写因子である AfIR は各酵素遺伝子のプロモーター領域に結合し発現をポジティブに制御している [52]。*aflR* の近傍に位置する *aflJ* のコードするタンパク質もまた転写調節を行うと考えられているが、既知の転写因子の構造をとらず、また破壊株においてもアフラトキシン生産は見られないにも関わらず *pksA*、*nor-1*、*ver-1*、*omtA* の発現が確認され、その機能は確定していない [53]。トリコテセン生合成における TRI10 と同様、AfIR と複合体を形成する可能性が考えられ、AfIR の核内移行を補助することで効率的な転写活性化を行っていることが示唆されている [54]。

これらアフラトキシン生合成に影響を与える因子として、環境要因として光、pH、酸化ストレス、栄養因子として炭素源や窒素源が調べられているが、これらの条件はトリコテセン生合成の調節における条件と同様、多くのエネルギーを必要とする二次代謝を好ましい環境条件下のみで行う真菌の対応戦略であると考えられる [55]。アフラトキシンは酸性 pH 条件下で合成される。アルカリ性条件下では転写因子 PacC がアフラトキシン生合成酵素遺伝子の発現を抑制することが知られる [56]。トリコテセン生合成の場合と類似して、アフラトキシン生合成酵素遺伝子のプロモーターの配列の解析によって炭素源によりアフラトキシン生合成を調節する転写因子として CreA が、窒素源による調節因子として AreA の働きが示唆されている [57]。A.

*parasiticus* を用いた Reverberi らの実験により、酸化ストレスもまたアフラトキシン生産に関与していることが示されている。酵母の *yap1* タンパク質は細胞質基質局在性であるが、酸化ストレス条件下では核内に移行し、抗酸化酵素であるチオレドキシンやグルタチオンシンターゼなどの発現を上昇させることが報告されている [58]。 *A. parasiticus* の酵母 *yap1* ホモログである *ApyapA* の破壊株においては、アフラトキシンが早期に蓄積するとともに、過酸化水素に感受性となり過酸化水素により生育が阻害されることが示されている [59]。この結果から、破壊株では細胞内の酸化ストレスが増大した結果、アフラトキシンの生産が促進されたと考えられた。後に述べるように、アフラトキシン生産を抑制する抗酸化物質が見出されていることから、酸化ストレスとアフラトキシン生産の関係性が窺われる。

トリコテセン生合成の調節機構と同様、ヒストンのアセチル化とアフラトキシン生合成の関連を示す報告がある。アセチル化したヒストン H4 を認識する抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験から、*pksA*、*omtA*、*ver-1* のプロモーター領域のヒストン H4 アセチル化の進行と、アフラトキシン生産の増加が時間的に相関することが見出された [60]。また、AfIR に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験により、AfIR の *omtA* プロモーター領域への結合レベルとヒストン H4 のアセチル化レベルに相関が見出された。Roze らはこの結果から、以下のようなモデルを提唱している。菌体の増殖により減少した培地中のグルコース (またはスクロース) を GPCR が感知し、cAMP/PKA 経路の活性が低下、CreA の脱リン酸化に伴いヒストンアセチルトランスフェラーゼとの複合体が形成され、アセチル化が進行、アフラトキシン生産が進行するとのモデルである [60]。

また、トリコテセン同様、アフラトキシン生合成もまたアフラトキシソームと名付けられた小胞内で起こることが示されている。Chanda らは分画した小胞にアフラトキシン生合成の前駆体であるステリグマトシスチンを添加するフィーディング実験により、液胞、小胞画分に *OmtA*、*Ver-1*、*Vbs* の少なくとも 3 つの生合成酵素が分画されていることを見出すとともに、顕微鏡観察からアフラトキシン生産の誘導時に小胞が蓄積することを示した [61]。現在では、アフラトキシン生合成のステップの多く

がペルオキシソーム、ゴルジ体などから由来する小胞が融合したアフラトキシソーム内で起こり、その後細胞膜との融合によりアフラトキシンは放出されると考えられているが、原料となるアセチル CoA はどのように輸送されるかは不明であり、ミトコンドリアから細胞質基質に放出され輸送されるものと、ペルオキシソーム内で $\beta$ -酸化により生成したものが含まれると考えられている [62]。

### アフラトキシシンの生産阻害物質

アフラトキシシンは DON 同様食品中に含まれる状態で非常に安定性が高く、通常の食品加工・調理の温度では分解されず、大部分が残存する [63]。トウモロコシ中のアフラトキシシンをアンモニアにより分解する手法も考慮されたが [64]、処理後の臭いや変色の問題があり、実用化に至っていない。アフラトキシシン非生産菌を圃場にまき、アフラトキシシン生産菌と競合させることで綿花などの汚染に効果があるとの報告もあるが [65]、カビの胞子を大量に圃場にまくことの抵抗感に加え、効果のある作物に限りがあるなどの問題がある。更に、アフラトキシシン生産菌は上記のトリコテセン生産菌と比べ薬剤に対する抵抗性が強く、効果的な殺菌剤が存在しない。また、殺菌剤の施用には耐性菌蔓延のリスクが存在する。このため、薬剤耐性菌の早期の蔓延の懸念の少ない、アフラトキシシン生産特異的な阻害物質の利用は有効な汚染防除方法となると期待できる。このような考えのもと、アフラトキシシン生産阻害物質がさまざまなスクリーニング源から探索されてきた [66, 43]。図 0-10 には植物由来のアフラトキシシン生産阻害物質、図 0-11 には微生物由来のアフラトキシシン生産阻害物質の一部を例として示した。

*methyl syringate* はシラカバの精油から単離され、*A. parasiticus* と *A. flavus* のアフラトキシシン生産を IC<sub>50</sub> 値がそれぞれ 0.9 mM と 0.8 mM で阻害することが見出された [67]。*methyl syringate* は *aflR*、*pksA*、*omtA* の転写量を減少させたが、それはラジカル消去による抗酸化活性が原因ではないことが示された。*methyl syringate* の誘導体と構造類縁体に関しては、第三章に詳しく述べる。

*caffeine* は液体培地に 2%の濃度で添加することにより *A. parasiticus* のアフラトキ

シン生産を完全に阻害するが、その作用はグルコースの取り込みの阻害による炭素代謝系に与える異常であることが示唆されている [68]。

Dillapiol はイノンド (Dill) の精油から単離されたアフラトキシン G<sub>1</sub> 生産特異的阻害剤であり、*A. parasiticus* のアフラトキシン G<sub>1</sub> 生産を IC<sub>50</sub> 0.15 μM の低濃度で阻害する一方で、アフラトキシン B<sub>1</sub> および菌体の生育には影響を与えない。dillapiol はヒトのシトクロム P4503A4 の阻害剤であることが知られており [69]、*A. parasiticus* においてはアフラトキシン G<sub>1</sub> の生産のみに関わるシトクロム P450 酵素である CypA を阻害することが考えられる。(E)-、(Z)-spiroether もまた *A. parasiticus* のアフラトキシン G<sub>1</sub> 生産の特異的阻害剤として見出され、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 2.8 μM と 20.8 μM であった [45]。先ほど述べた (E)-、(Z)-spiroether の TRI4 の阻害による 3-ADON 生産阻害活性は、*A. parasiticus* の CypA と *F. graminearum* の TRI4 の相同性に基づいて見出されたものである。

dioctatin A は *Streptomyces* 属の SA-2581 株より単離された化合物である。詳細は後述する。

ジケトピペラジンの一種である cyclo(L-Ala-L-Pro) は *Stenotrophomonas* 属の細菌の培養液から単離され、*A. flavus* のアフラトキシン生産に対する阻害活性は強くないが、同培養液からは単離されたジケトピペラジシン cyclo(L-Val-L-Pro) もアフラトキシン生産阻害活性を有していたため、有用なアフラトキシン阻害剤を開発するリード化合物となりうると期待される [70]。cyclo(L-Ala-L-Pro) の作用機構については未解明である。

aflastatin A は、1996 年に作田、小野らにより微生物から単離された最初のアフラトキシン生産阻害物質であり、*Streptomyces* 属の MRI142 株の培養液から発見され、*A. parasiticus* のアフラトキシン生産を培地中の濃度 0.5 μg/mL で完全に阻害する強い活性を有していた [71]。aflastatin A と類似した構造を有する blastcidin A の抗真菌活性は福永らにより 1955 年に見出されていたが [72]、*A. parasiticus* に対するアフラトキシン生産阻害活性が見出されるとともに構造の決定がなされた [73]。aflastatin A の作用機構についてはその後近藤らにより解析が進められ、*pksA*、*omtA*、*ver-1* の転写量

を減少させること、培地中のグルコースの消費量を増大させ、かつ培地中のエタノール量を増加させることが示された [74]。blastcidin A に関してはその後吉成らにより酵母のタンパク質合成を阻害することが示された [75]。他のタンパク質合成阻害剤にもアフラトキシン生産阻害活性を示す物質が見出されたことから、blastcidin A のアフラトキシン生産阻害活性はタンパク質合成の阻害によるものと考えられたが、標的タンパク質に関しては不明である。

また、理化学研究所の化合物ライブラリーを対象としたスクリーニングの結果、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体阻害剤に *A. parasiticus* のアフラトキシン生産を強く阻害するものが複数見出されている [76]。これまでに調べられた呼吸鎖複合体阻害剤の分類、標的部位、化合物名および *A. parasiticus* のアフラトキシン生産に対する IC<sub>50</sub> 値を表 0-1 にまとめている。呼吸鎖複合体の阻害剤に関しては、第三章に詳述する。

#### diocatin A の既知の作用

diocatin A は、上記の blastcidin A を酵母に添加するとある種のジケトピペラジンが減少するとの発見を糸口として見出されたアフラトキシン生産阻害物質である。ジケトピペラジンは細胞内で N 末端から二番目のアラニンまたはプロリンを認識し、その C 末端を切断する酵素であるジペプチジルペプチダーゼ (DPP) により生産されるジペプチドが環化して生じると考えられる。上記の発見から blastcidin A の DPP 阻害活性が考えられたため、blastcidin A の DPP 阻害活性と既知の DPP 阻害剤のアフラトキシン生産阻害活性が調べられた。その結果、blastcidin A はヒトの DPP II および DPP IV に対し阻害活性を示さなかったが、1991 年に竹内らにより DPP II の阻害剤として報告された diocatin A は、菌体の生育を阻害せず *A. parasiticus* のアフラトキシン生産を IC<sub>50</sub> 値 4.0 μM の低濃度で阻害した [77, 78]。diocatin A の液体培地への添加により *A. parasiticus* の *aflR*、*pksA*、*omtA*、*ver-1* の転写量の減少が確認されたことから、アフラトキシン生産の減少はこれら生合成酵素の減少によるものであると考えられた。また、diocatin A は *A. nidulans* のステリグマトシスチン生産を阻害するとともに、*A. parasiticus* の PDA 寒天培地上の分生子形成を大きく減少させたため、これらの経路

の上流に作用することが考えられる。

diocatin A 誘導体の合成およびアフラトキシン生産阻害活性が調べられており、表 0-2 に diocatin 誘導体の構造および *A. parasiticus* のアフラトキシン生産に対する IC<sub>50</sub> 値を示す [79]。誘導体の多くが強いアフラトキシン生産阻害活性を維持していることがわかった。

更に、吉成は diocatin A を添加して培養した場合の *A. flavus* の菌体内タンパク質の変動を 2D-DIGE 解析により調べ、これまで転写レベルでの減少しか確認されていなかったアフラトキシン生合成酵素 VBS、OmtA、Nor-1、Ver-1 のタンパク質レベルでの減少を確認するとともに、抗酸化酵素であるカタラーゼ、グルタチオンレダクターゼと、ATPCL の減少を見出した [80]。これらの結果から、diocatin A による酸化ストレスの増加と、菌体内アセチル CoA 量の減少を示唆した。しかしながら、実際に diocatin A が菌体内で直接のターゲットとする作用点の解明には至らず、これらの現象を結びつけることには至っていない。

### 生物活性物質の標的分子の同定

生物活性物質の作用のメカニズムの全体像を理解するには、活性物質が直接的に結合し、相互作用を及ぼす標的分子を同定する必要がある。脂質膜と結合することが知られる比較的分子量の大きい非リボソーム性ペプチド類やポリエンマクロライド類等を除き [81]、低分子の生物活性物質が直接相互作用する分子はタンパク質であると考えられる [82, 83]。生物活性物質の結合タンパク質を同定することは、その活性物質の作用機構の理解に繋がるだけではない。生物活性物質の作用機構研究は ‘gold mine’ であると言われるように、結合タンパク質の未知の機能や、注目する生命現象のメカニズムの解明に繋がるブレークスルーをもたらすことが期待できる [84]。

その最も顕著な例として、1989 年に行われた免疫抑制剤 FK506 (タクロリムス) の結合タンパク質の同定がある [85]。FK506 と FKBP-12 の結合を示した研究を端緒として、FK506 と FKBP-12 の複合体がカルシニューリンに結合してその脱リン酸化活性を阻害し、転写因子の核内移行が阻害され T 細胞の分化増殖が抑制されることが

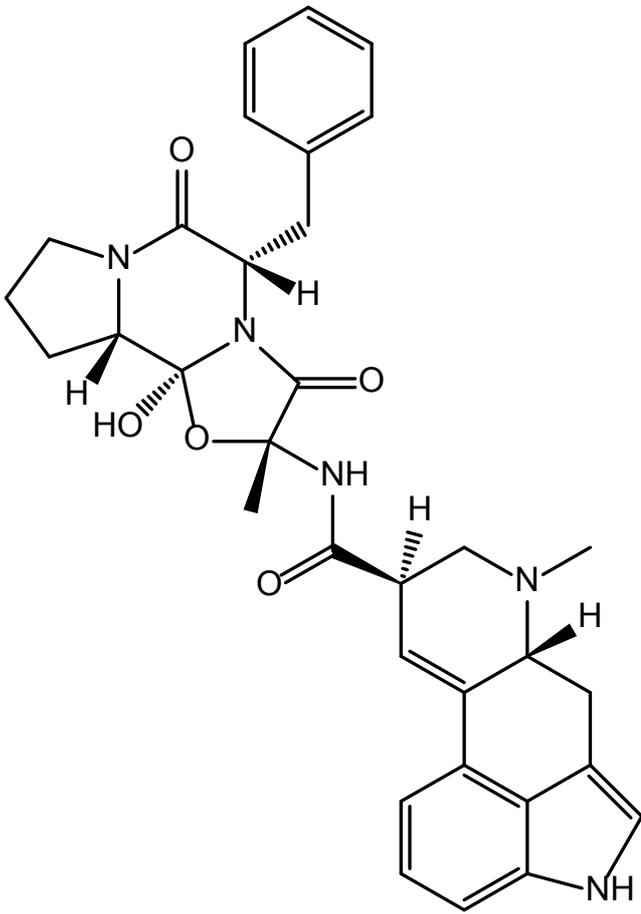
わかり、免疫システムにおけるカルシニューリンの重要性が示された [86]。

1996年には、ヒトにおける trapoxin の結合タンパク質が酵母の転写抑制因子 Rbd3p の相同タンパク質であることが示された [87]。現在では、このタンパク質は少なくとも9つあるヒストンデアセチラーゼの1つであることがわかっている。trapoxin がヒストンの脱アセチル化を阻害すること、および細胞周期の進行を阻害することは1996年以前の研究で示されていたが、この研究がこの2つの事象を繋ぐいわばミッシング・リンクとなり、ヒストンデアセチラーゼが真核生物の遺伝子発現に深く関与することが明らかとなっていた [88]。

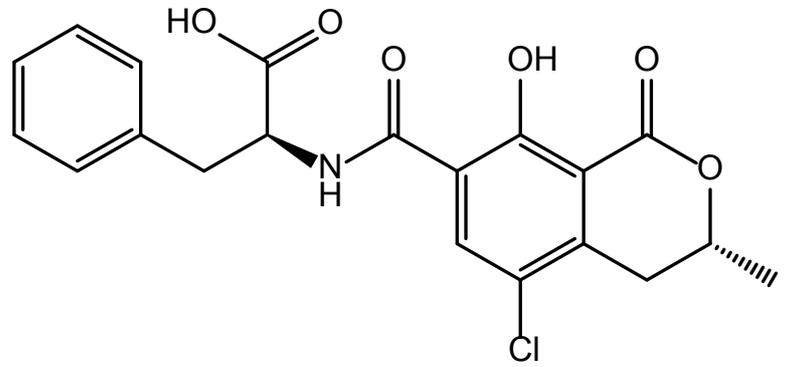
本研究ではこのような前例を鑑み、マイコトキシン生産阻害物質が直接的な相互作用を行う結合タンパク質を同定し、その作用機構の解明を通してマイコトキシン生産の分子機構における新たな知見を得ることを目的とした。

生物活性物質の結合タンパク質を同定する方法として、生物活性物質と結合タンパク質のもつアフィニティーを利用して精製する方法が1950年代から行われてきた [89]。従前のアフィニティー精製法では、多くの非特異的なタンパク質が結合してしまい、真の結合タンパク質を見分けることが困難である場合が多い。そのような非特異的なタンパク質の共雑を極力減らしたアフィニティー担体として、半田らはナノ磁気ビーズの開発を報告した [90]。サリドマイドは半世紀前に鎮痛剤として広く処方された薬剤だが、催奇性を有することが判明し世界的な問題となった。現在ではハンセン病や多発性骨髄腫の治療薬として限定的に用いられているが、その催奇性のメカニズムは未解明だったため、催奇性を有しない誘導体の開発のためにもその結合タンパク質の解明が強く望まれていた。半田らはナノ磁気ビーズにサリドマイドを固定化したビーズによりアフィニティー精製を行い、サリドマイドに特異的に結合するタンパク質として cereblon を同定した [91]。さらに、cereblon がユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットであり、サリドマイドはユビキチンリガーゼの活性を阻害することで催奇性をもたらすことを示し、催奇性を有さない次世代新薬の開発に道を開いた。

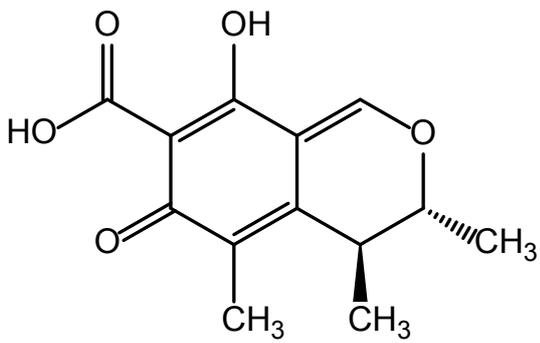
本論文では、第一章においては *F. graminearum* の DON 生産を阻害する precocene II について、第二章においては *A. flavus* および *A. parasiticus* のアフラトキシン生産を阻害する dioctatin および dioctatin A について、これら生物活性物質を固定化したナノ磁気ビーズを作製して結合タンパク質の同定を行い、結合タンパク質を通して作用機構の解明を試みた。その結果、precocene II はミトコンドリア外膜のチャンネルタンパク質に結合し、ミトコンドリア内のスーパーオキシドを増加させて DON 生産を阻害することを見出した。dioctatin はミトコンドリア内のプロテアーゼの触媒サブユニットに結合することを見出し、異常なプロテアーゼ活性を付与することでアフラトキシン生産の阻害に至るとのメカニズムを提唱した。さらに第三章において、methyl syringate の誘導体および構造類縁体のアフラトキシン生産阻害活性と呼吸鎖複合体 II 阻害活性の関連を示し、アフラトキシン生産阻害剤として産業応用に至る可能性を示した。



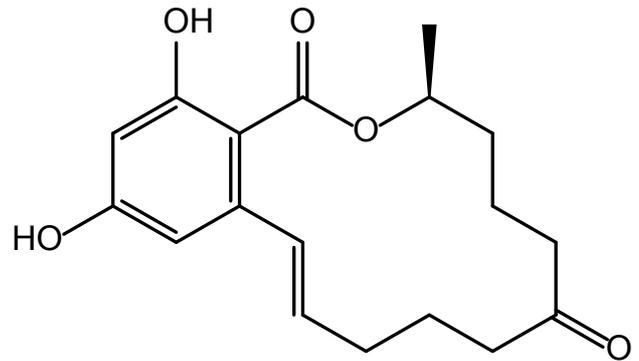
ergotamine



ochratoxin A



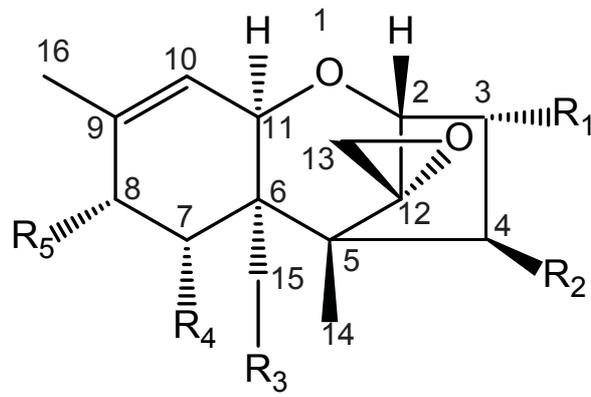
citrinin



zearalenone

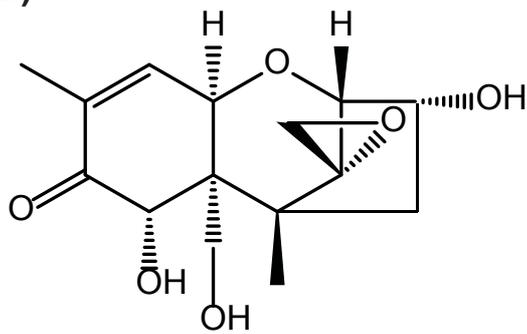
図 0-1. 序論で取り上げたマイコトキシンの構造

(a)

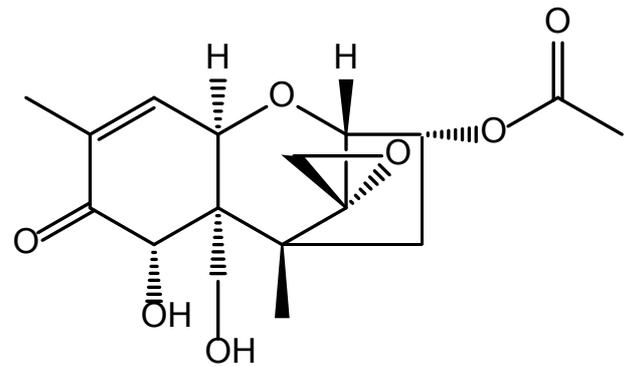


- Type A  $R_4: -H$   
Type B  $R_5: =O$   
Type C  $R_1: -H, R_4, R_5: -O-$   
Type D  $R_1: -H, R_4: -H, R_5: -H$   
 $R_2, R_3: C-4 \text{ と } C-5 \text{ を結ぶ多員環}$

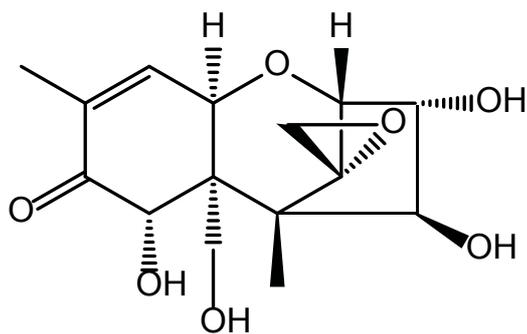
(b)



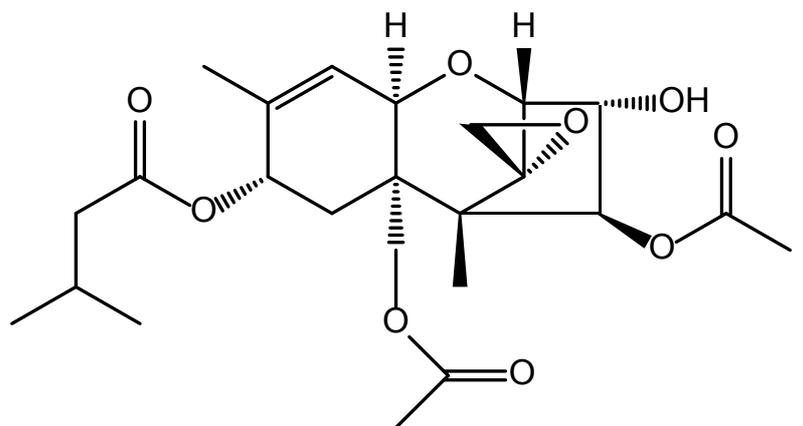
deoxynivalenol (DON)



3-acetyldeoxynivalenol (3-ADON)



nivalenol (NIV)

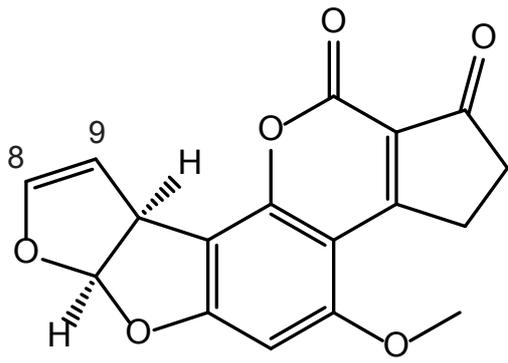


T-2 toxin

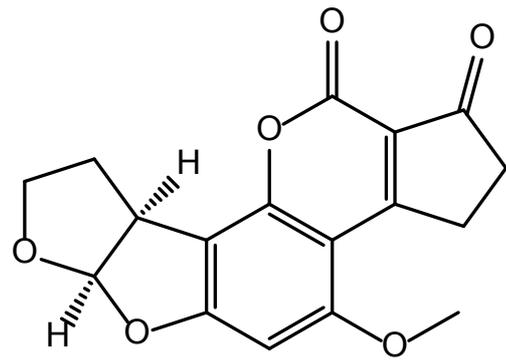
図0-2. トリコテセン系マイコトキシンの構造

(a) トリコテセン骨格

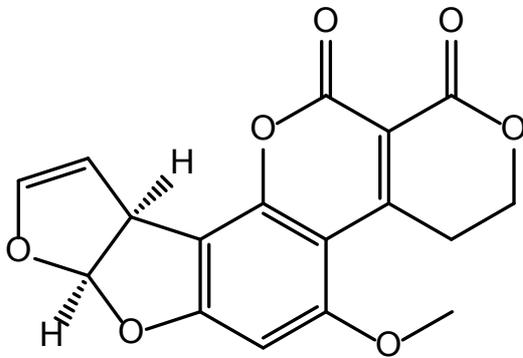
(b) 主なトリコテセン系マイコトキシンの構造



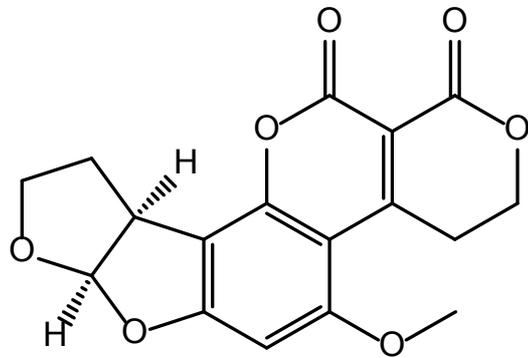
aflatoxin B<sub>1</sub>



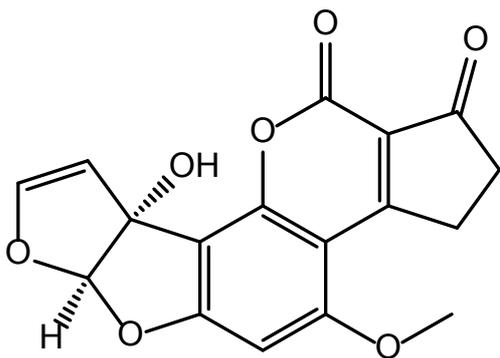
aflatoxin B<sub>2</sub>



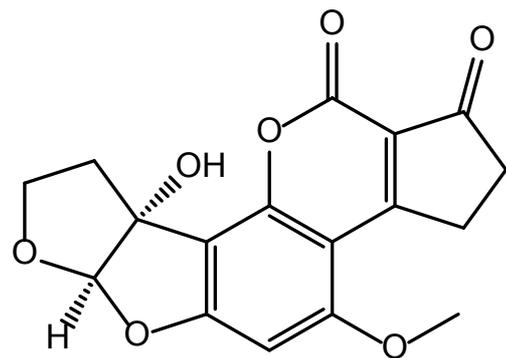
aflatoxin G<sub>1</sub>



aflatoxin G<sub>2</sub>



aflatoxin M<sub>1</sub>



aflatoxin M<sub>2</sub>

図 0-3. aflatoxin 類の構造

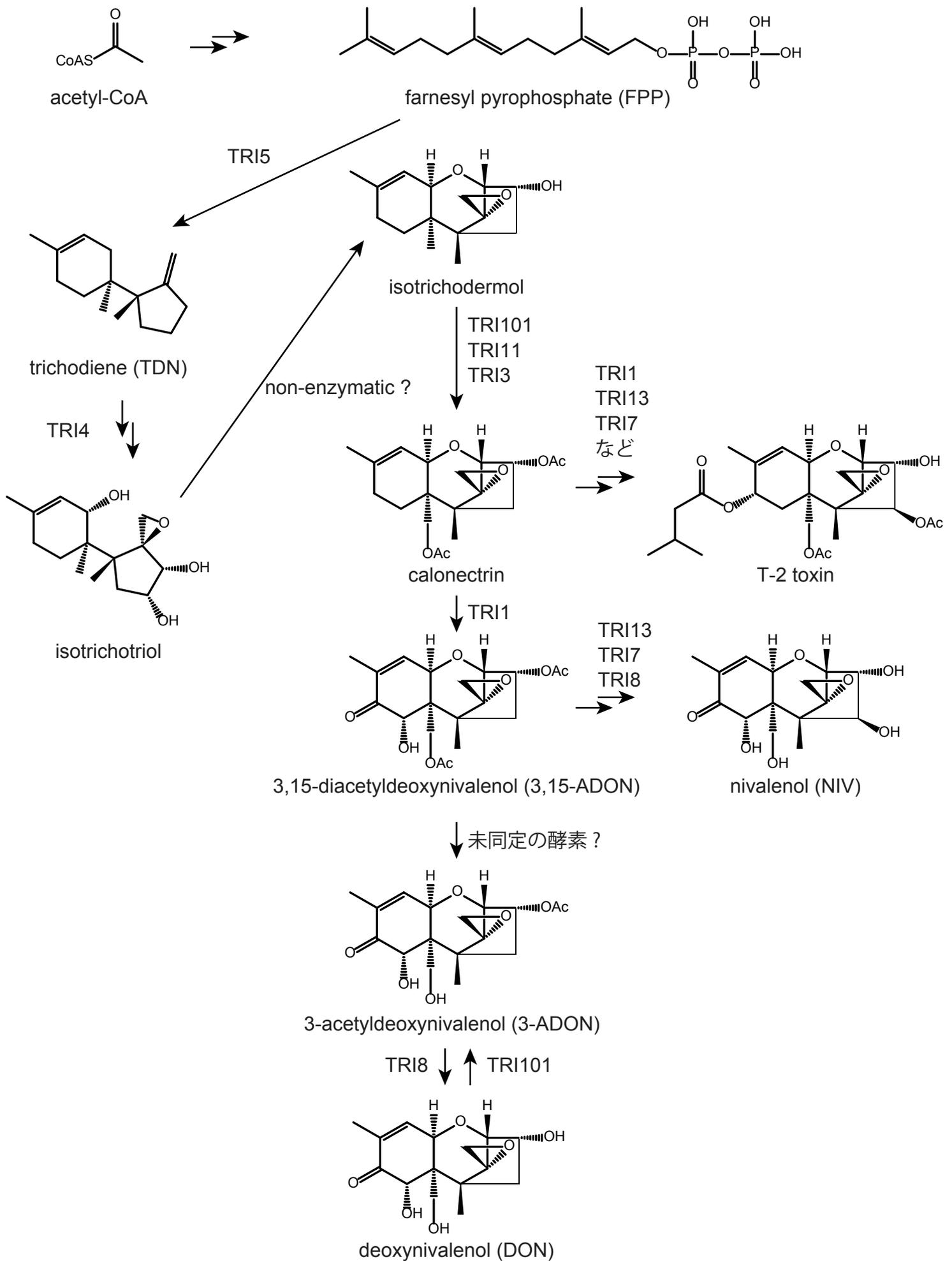


図 0-4. トリコテセンの生合成経路および生合成遺伝子

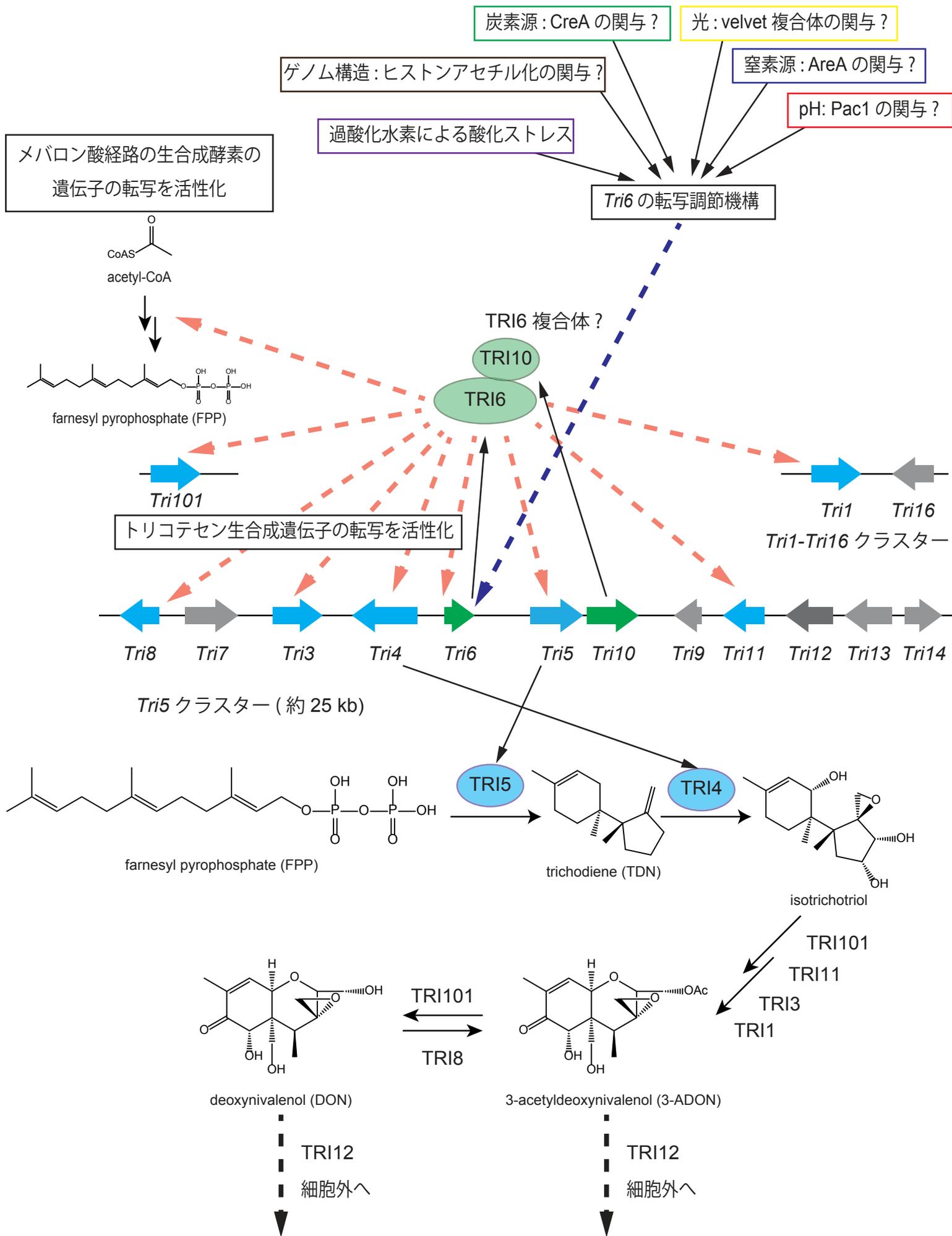
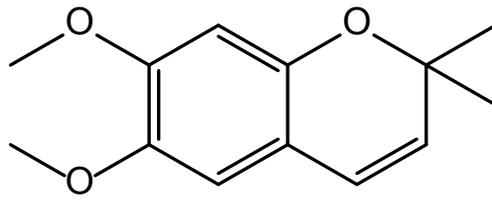
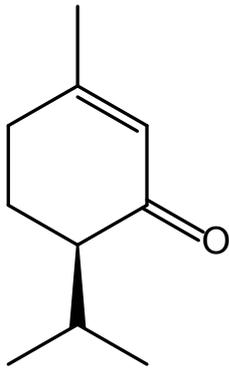


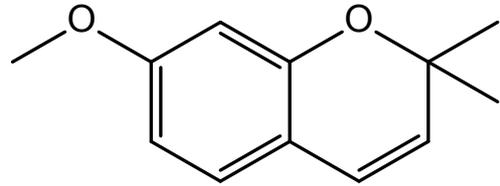
図 0-5. DON 生産の調節機構



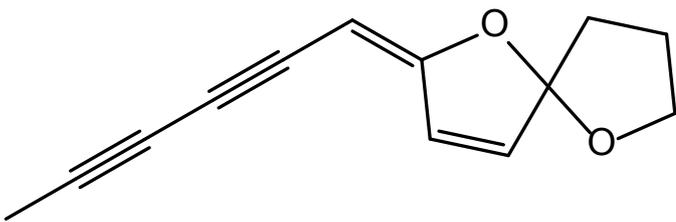
precocene II



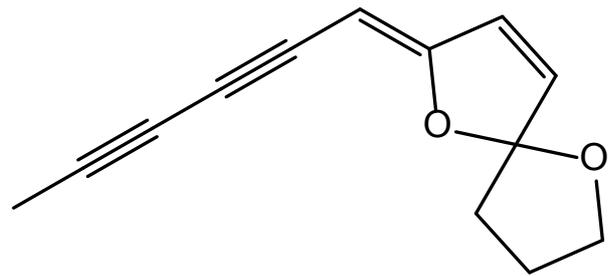
(-)-piperitone



precocene I



(E)-spiroether



(Z)-spiroether

図 0-6. 精油から見出された DON 生産阻害物質

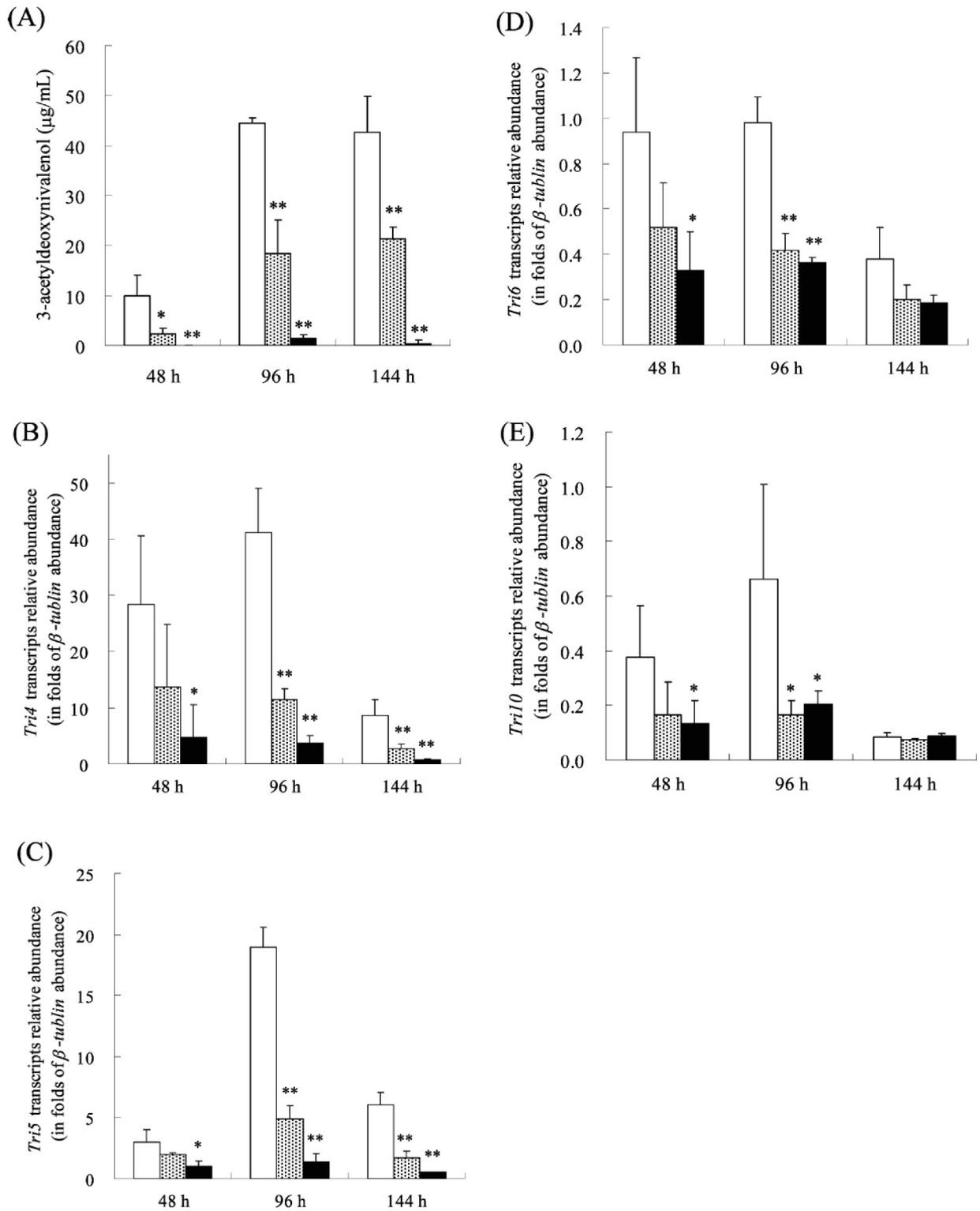


図 0-7. precocene II が 3-ADON の生産量と DON 生合成関連遺伝子の転写量に与える影響

(A) 3-ADON 量 (B) *Tri4* 転写量 (C) *Tri5* 転写量 (D) *Tri6* 転写量 (E) *Tri10* 転写量

白棒: control 灰色棒: precocene II 3  $\mu$ M 黒棒: precocene II 30  $\mu$ M

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. control.

[44] より転載

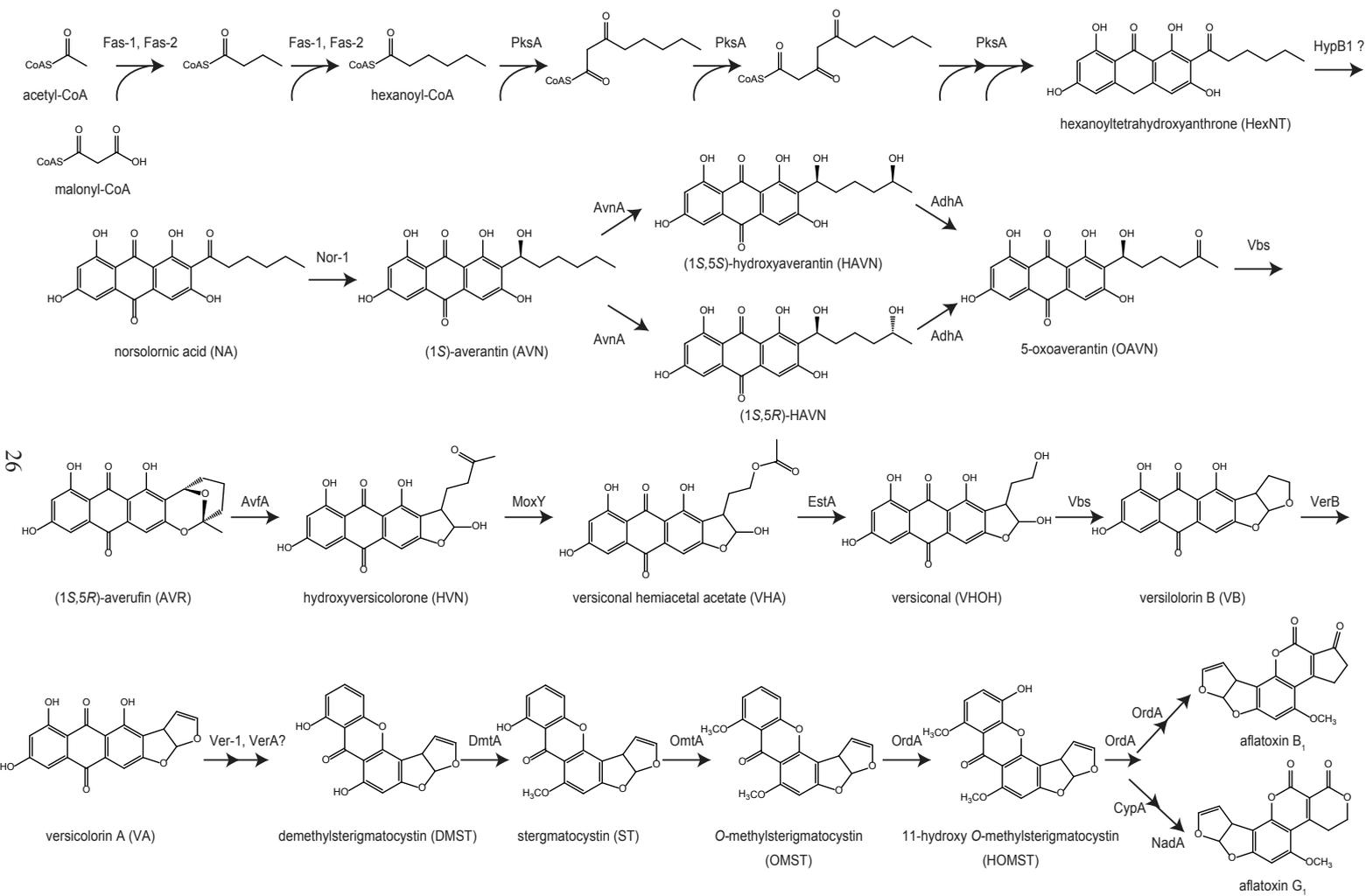


図 0-8. aflatoxin B<sub>1</sub> および aflatoxin G<sub>1</sub> の生合成経路および生合成酵素遺伝子

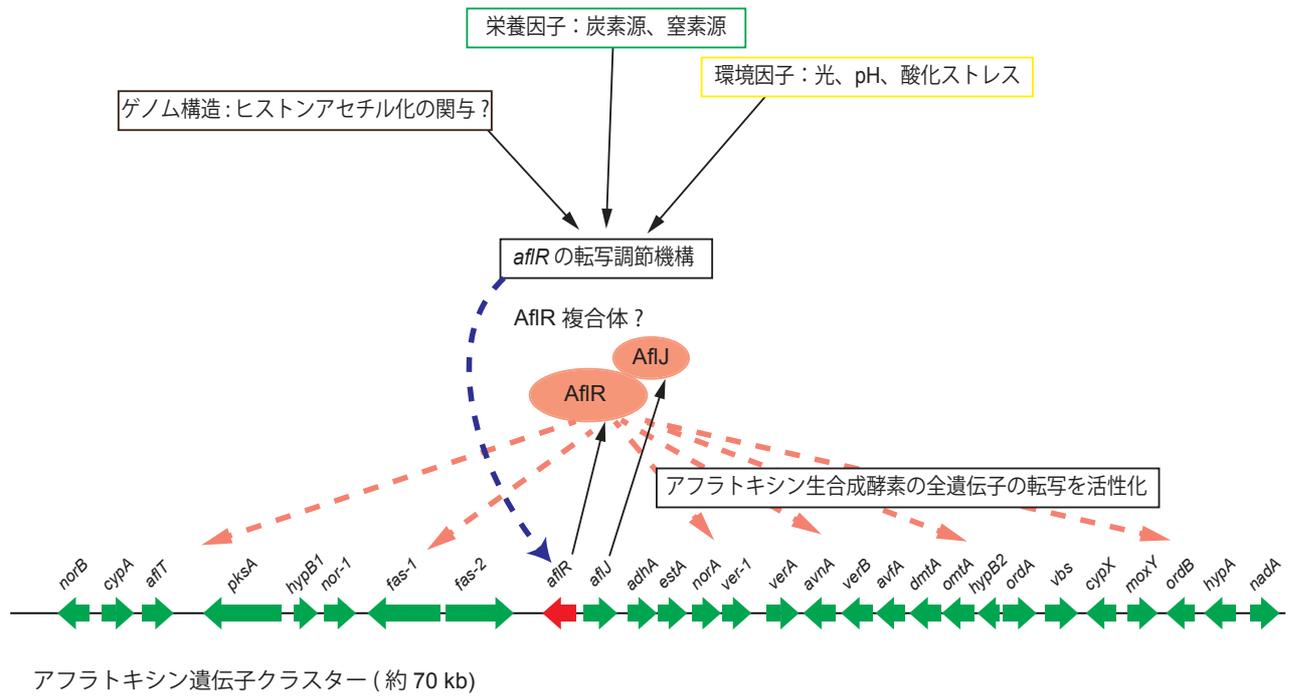
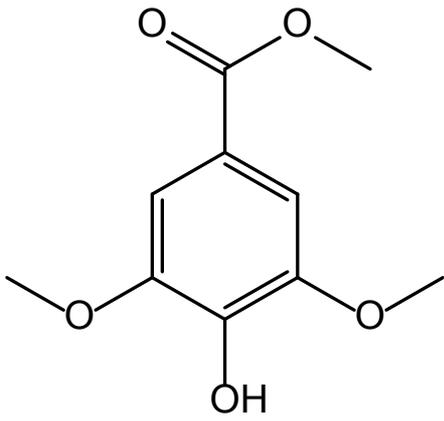
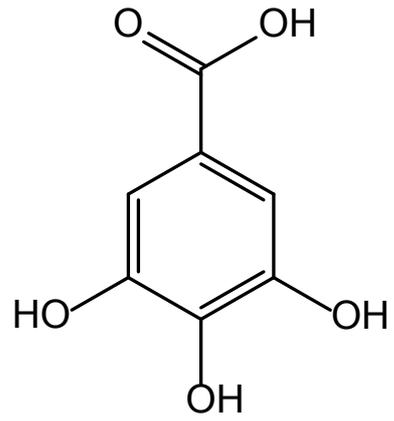


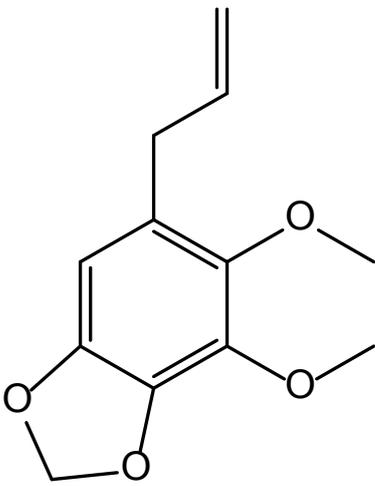
図 0-9. アフラトキシン遺伝子クラスターおよび aflR 発現制御機構



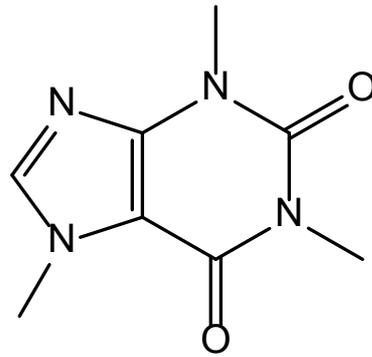
methyl syringate



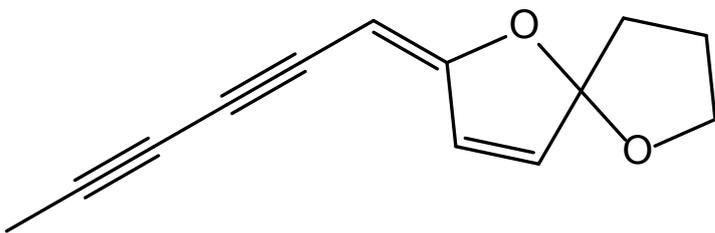
gallic acid



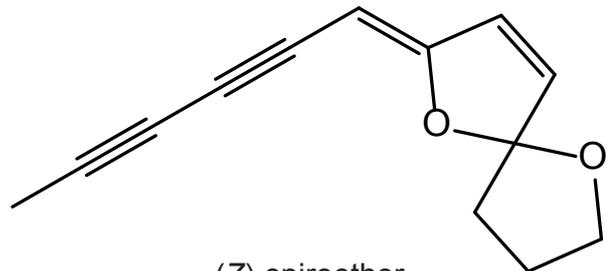
dillapiol



caffeine

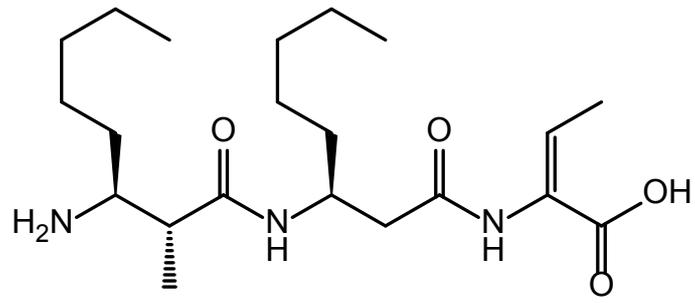


(E)-spiroether

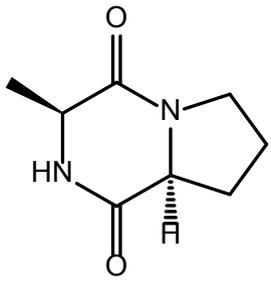


(Z)-spiroether

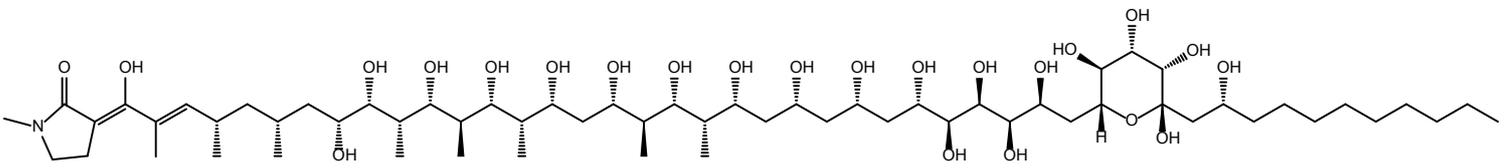
図 0-10. 植物成分から見出されたアフラトキシン生産阻害物質



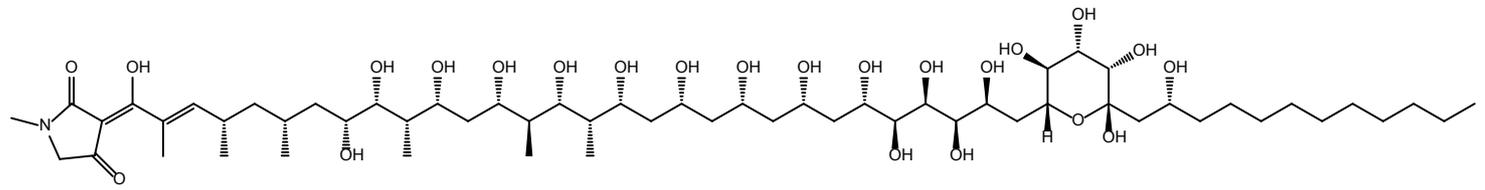
dioctatin A



cyclo(L-Ala-L-Pro)



aflastatin A



blastcidin A

図 0-11. 微生物の代謝産物から見出されたアフラトキシン生産阻害物質

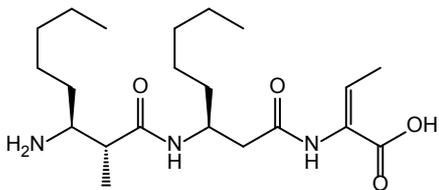
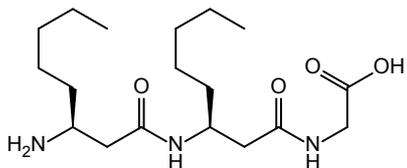
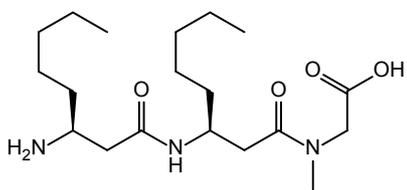
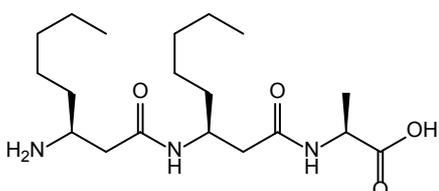
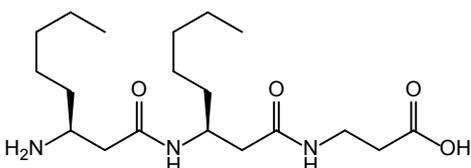
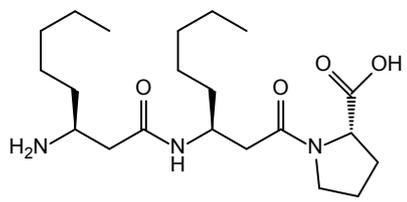
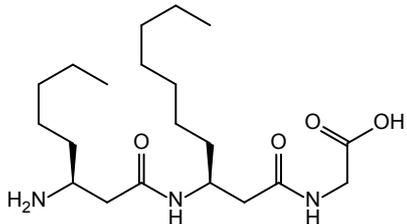
表 0-1. 呼吸鎖複合体阻害剤の *A. parasiticus* に対するアフラトキシン生産阻害活性

分類	標的	化合物名	IC <sub>50</sub> (μM)
天然物	複合体 I	rotenone	13
	複合体 II	siccanin	13
		atpenin A5	9.7
複合体 III	antimycin A	7.2	
合成殺ダニ剤	複合体 I	pyridaben	0.01
		tolfenpyrad	0.18
	複合体 II	mepronil	23
	複合体 III	fluacrypyrim	0.07
		acequinocyl	1.7
bifenazate	20		
合成殺菌剤	複合体 II	boscalid	<0.01
	複合体 III	pyridbencarb	0.43
		cyazofamid	0.7
		pyraclostrobin	0.06
		kresoxim-methyl	0.06
		azoxystrobin	0.4
		trifloxystrobin	0.9
		picoxystrobin	8.6
metominostrobin	9.9		

IC<sub>50</sub> 値は総アフラトキシン量 (アフラトキシン B<sub>1</sub> および G<sub>1</sub>) に対する 50% 阻害濃度を示す。

[76] より改変

表 0-2. dioctatin 誘導体の *A. parasiticus* に対するアフラトキシン生産阻害活性

化合物の構造	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
 <p style="text-align: center;">dioctatin A</p>	4.6
 <p style="text-align: center;">dioctatin</p>	2.5
	2.9
	1.4
	3.7
	0.5
	4.0

IC<sub>50</sub> 値は総アフラトキシン量 (アフラトキシン B<sub>1</sub> および G<sub>1</sub>) に対する 50% 阻害濃度を示す。

## 第一章 トリコテセン生産阻害物質 precocene II の作用機構

本章では、序論で述べた *Fusarium graminearum* の 3-ADON 生産を阻害する precocene II (図 0-6) について行った作用機構解析の詳細を述べる。なお、1-1-1、1-1-2、1-1-4、1-1-5、1-1-6 の内容は筆者が修士論文で記した結果であり、図 1-1、図 1-3、表 1-1、図 1-4、表 1-2、図 1-5 は修士論文で使用した図表を引用し改変している。1-1-1、1-1-2、1-1-4、1-1-5、1-1-6 の文章は修士論文で記した文章を要約して記述した。

### 1-1 precocene II 結合タンパク質の同定

*F. graminearum* の存在すると推測される precocene II 結合タンパク質を明らかにするために、precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを調製し、precocene II 結合タンパク質を精製することにした。

#### 1-1-1 precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの調製

precocene II の構造活性相関に関して [92]、6 位をエトキシあるいはブトキシに置換した誘導体は活性を維持していたため、6 位を水酸基とした化合物 **1** を磁気ビーズに結合させることにした。化合物 **1** と、リンカーの末端にエポキシドが導入された市販のナノ磁気ビーズを DMF 中  $K_2CO_3$  存在下で反応させ、precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを調製した (図 1-1)。

#### 1-1-2 *F. graminearum* の細胞小器官の粗分画

precocene II の結合タンパク質が存在すると考えられる細胞小器官として、ミトコンドリアに着目した。その理由として、以下の 2 点が挙げられる。

1. 卵黄形成期のメスのチャバネゴキブリのアラタ体を precocene II とともにインキ

キュベートすると、巨大化したり凝集したりしたミトコンドリアをもつ異常細胞が観察されるとの報告があった [93]。

2. ラット肝細胞に対する precocene II の毒性は、添加から短時間で生じるミトコンドリア膜電位の喪失、グルタチオン量の減少、ATP 量の減少と関連することが報告されている [94]。

そこで、*F. graminearum* の細胞小器官を粗分画し、ミトコンドリアタンパク質を抽出後、1-1-1 で作製した precocene II 固定化ナノ磁気ビーズによる結合タンパク質の精製を行うことにした。SYEP 液体培地中 26.5°C で *F. graminearum* を 2 日間培養し、ろ過により菌体を回収した。糸状菌細胞壁溶解酵素を含む 1.5 M NaCl 中で 3 時間インキュベートし、菌体のプロトプラスト化を行った。遠心分離によりプロトプラストを沈殿として回収し、細胞と等張としたバッファーに懸濁してホモジナイザーにより手で破碎した。懸濁液を 900 x g で遠心分離して核、細胞壁断片および未破碎の細胞を沈殿させた (この沈殿を核・未破碎画分と呼ぶ)。上清を更に 10,000 x g で遠心分離してミトコンドリアを沈殿させ (この沈殿をミトコンドリア画分と呼ぶ)、上清はミクロソームおよび細胞質基質画分として回収した (これを細胞質基質画分と呼ぶ)。

### 1-1-3 ウェスタンブロッティングによる分画の確認

1-1-2 の方法によりミトコンドリアが目的通りミトコンドリア画分に分離されたことを確認するため、各画分のタンパク質を等量ずつ SDS-PAGE により分離し、膜にブロッティング後ミトコンドリアのマーカースとして用いられるシトクロム c に対する抗体により検出を行った。結果を図 1-2 に示す。シトクロム c のバンドはミトコンドリア画分で最も濃いバンドとして見られ、ミトコンドリアがミトコンドリア画分に濃縮されていることを示している。核・未破碎画分にもわずかにバンドが見られ、未破碎細胞由来のミトコンドリアのシトクロム c であると考えられた。

#### 1-1-4 ミトコンドリア画分からの precocene II 結合タンパク質の同定

1-1-2 で沈殿として回収したミトコンドリア画分をバッファーに溶解し、タンパク質濃度を測定後、タンパク質 0.5 mg を 1-1-1 で調製した precocene II 固定化ナノ磁気ビーズに加えた。低温でインキュベート後、磁気分離によりビーズを分離した。ビーズのバッファーへの分散、磁気分離によるビーズの分離と上清の破棄を繰り返すことで、ビーズを 3 回洗浄した。3 回目の洗浄後の上清を洗浄上清として回収した。ビーズに 5 mM の precocene II 溶液を加えて低温でインキュベート後、磁気分離を行った上清を precocene II 溶出画分として回収し、有機溶媒によりタンパク質を沈殿後 SDS サンプルバッファーに溶解させ、SDS-PAGE に供した。泳動後銀染色を行った像を図 1-3 に示す。precocene II 溶出画分を泳動したレーン 2 の約 30 kDa の位置に、洗浄上清を泳動したレーン 1 ではほぼ見られないバンドが確認された。ビーズとのインキュベート前にタンパク質溶液に終濃度 5 mM の precocene II を加え、競合阻害を行った場合のレーン 3 ではこのバンドは消失していた。このことから、約 30 kDa のバンドは precocene II に特異的に結合するタンパク質を含むと考えられた。

このタンパク質を同定するため、図 1-3 のレーン 2 の約 30 kDa のバンドを含むようゲルを切り出し、銀染色の脱色後、DTT およびヨードアセトアミド処理、トリプシンによるゲル内消化を行った。ゲルからペプチドを抽出し、LC/MS/MS による解析および公開されている *F. graminearum* のタンパク質配列データベースとの解析ソフトウェアによる照合を行った。その結果、表 1-1 に示すように、アクセッション番号 FGSG\_09933 のタンパク質が最も高いスコアで同定された。FGSG\_09933 は mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel, VDAC) としてアノテーションされているタンパク質であった。mitochondrial porin との名はグラム陰性細菌が外膜に有する porin タンパク質との構造的類似性から付けられたが、実際の機能は porin とは大きく異なり、voltage-dependent anion channel の名が適当であるため、以下 FGSG\_09933 を VDAC として記す。

VDAC は真核生物のミトコンドリアの外膜に存在するチャンネルタンパク質であり、

ミトコンドリア外膜を透過できない代謝物質は VDAC の約 3.2 nm の孔を通してミトコンドリア内外を移動する。in vitro において、VDAC の物質透過性は膜内外の電位差に依存することが報告されており [95]、VDAC が “開いた”状態では ATP などの陰イオン性の物質に高い透過性を示すのに対し、“閉じた”状態では陰イオン性物質はほとんど透過できず陽イオンのみが透過性を示す。そこから、電位依存性のアニオンチャンネルと名づけられた。現在までのところ、VDAC と *F. graminearum* の DON 生産を関連付ける報告は存在しない。

#### 1-1-5 核・未破砕画分からの precocene II 結合タンパク質の同定

ミトコンドリア画分以外にも precocene II 結合タンパク質が存在する可能性を検証するため、1-1-2 で沈殿として回収した核・未破砕画分をバッファーに溶解し、タンパク質 0.5 mg に対し 1-1-4 と同様の方法により precocene II 固定化ナノ磁気ビーズによる精製を行った。結果を図 1-4 に示す。1-1-3 と同様に、precocene II 溶出画分を泳動したレーン 2 の約 30 kDa の位置に、洗浄上清を泳動したレーン 1 および競合阻害を行ったレーン 3 では見られないバンドが確認された。このタンパク質の同定を行った結果を表 1-2 に示す。最も高いスコアを示すタンパク質として 1-1-4 と同様に VDAC が同定された。VDAC はミトコンドリアの外膜に局在すると考えられるタンパク質であるが、細胞膜にも存在する可能性が示唆されている [96]。核・未破砕画分には破砕されなかった細胞も含まれると考えられるため、ミトコンドリアが混入し VDAC が同定されたか、細胞膜に存在する VDAC が同定された可能性が考えられる。

#### 1-1-6 細胞質基質画分からの precocene II 結合タンパク質の探索

細胞質基質画分から precocene II 結合タンパク質を探索するため、タンパク質 0.5 mg に対し 1-1-4 と同様の方法により precocene II 固定化ナノ磁気ビーズによる精製を行った。結果を図 1-5 に示す。precocene II により溶出されると考えられるバンドは確

認められず、細胞質基質画分には precocene II 結合タンパク質は存在しないと考えられた。

#### 1-1-7 大腸菌を用いた組換え VDAC の調製

1-1-6 までの実験から、precocene II と *F. graminearum* の VDAC との特異的な結合が示唆された。そこで、VDAC の組換えタンパク質を作製し、precocene II との結合を更に調べることにした。

##### 1-1-7-1 His-VDAC の発現

SYEP 液体培地で培養した *F. graminearum* の菌体を回収後凍結乾燥し、液体窒素下で粉碎した。total RNA を抽出後精製し、逆転写酵素により cDNA を合成した。精製を容易にするため、VDAC を N 末端に 6x His タグを付加した組換えタンパク質として発現させることにした。末端に制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて VDAC の配列を PCR により増幅し、クローニング用ベクターへ挿入したのち、制限酵素切断およびライゲーションを行って発現用ベクター pPRO HTb に組み込んだ。発現用大腸菌 BL21 (DE3) の形質転換後、形質転換した大腸菌の培養、IPTG による組換えタンパク質の発現誘導を一晩行い、菌体を回収した。超音波による破碎を行い、遠心分離を行った上清と沈殿を SDS-PAGE に供した。培養温度、IPTG 濃度の検討を行った結果を図 1-6 に示す。His-VDAC は不溶性沈殿として回収された。そのため、以降の実験で His-VDAC の可溶化と精製を行った。

##### 1-1-7-2 精製 His-VDAC の調製

1 L の LB 液体培地中で、形質転換した大腸菌を 37°C で OD<sub>600</sub> が 0.4 になるまで培養した後、IPTG を終濃度 1 mM で添加して一晩培養した。菌体を回収後超音波によ

り破碎し、遠心分離を行った沈殿を 8 M 尿素を含むバッファーにより可溶化させた。溶液をニッケルセファロースカラムに通し、カラムを十分に洗浄後 500 mM のイミダゾールを通した溶出液を回収した。溶出液を尿素およびイミダゾールを含まないバッファーを外液として一晩透析した。透析内液を回収し、一部を SDS-PAGE に供した結果を図 1-7 に示す。His-VDAC が単一のバンドとして回収された。

赤パンカビ *Neurospora crassa* の VDAC を大腸菌発現系で 6x His タグつきで発現させた報告 [97]によれば、精製 His-VDAC を沈殿後 3.5 mM SDS/ 30 mM 1-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM) を含むバッファーで可溶化すると、ネイティブの VDAC と同様の CD スペクトルを示した。そこで、His-VDAC を含む透析内液を回収後、アセトンにより His-VDAC を沈殿させ、3.5 mM SDS/30 mM DDM バッファーにより可溶化を行い、以下の実験に供した。

#### 1-1-8 His-VDAC と precocene II の結合実験

1-1-7 で得られた精製 His-VDAC 5  $\mu$ g を 1-1-1 で調製した precocene II 固定化ナノ磁気ビーズまたは precocene II を固定化していないコントロールビーズに加え、低温でインキュベート後、磁気分離によりビーズを分離した。上清はフロースルーとして回収した。ビーズを 5 回洗浄後、SDS サンプルバッファーを加えて加熱してタンパク質を溶出させ、SDS-PAGE に供した。泳動後膜に転写し、抗 6x His 抗体により検出を行った結果を図 1-8 に示す。

レーン 3 の precocene II 固定化ナノ磁気ビーズに結合した His-VDAC のバンドに比べ、レーン 4 のコントロールビーズに結合した His-VDAC のバンドは薄く、His-VDAC は precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの precocene II 部分に多く結合したことがわかった。

#### 1-1-9 酵母抽出物からの precocene II 結合タンパク質の同定

1-1-8 までの結果から、*F. graminearum* の VDAC は precocene II の結合タンパク質であると考えられた。1-1-4 で述べたように、VDAC は真核生物のミトコンドリアに広く存在するタンパク質である。VDAC と precocene II の特異的結合が他の生物でも存在するかどうかを調べるために、真菌のモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* から precocene II の結合タンパク質を探索することにした。

酵母を 1 L の YPD 液体培地で培養し、遠心分離により菌体を分離した。菌体をソルビトールにより細胞と等張としたバッファーに懸濁し、酵母細胞壁分解酵素で処理してスフェロプラストとした。スフェロプラストを手動で破碎後、1-1-2 と同様の手法によりミトコンドリア画分を得た。ミトコンドリア画分をバッファーにより溶解後、1 mg のタンパク質をとり、1-1-4 と同様の方法で precocene II 固定化ナノ磁気ビーズによる precocene II 結合タンパク質の精製を行った。SDS-PAGE 後銀染色を行った結果を図 1-9 に示す。precocene II 溶出画分を含むレーン 2 の約 29 kDa の位置に、洗浄上清を泳動したレーン 1 および前もって競合阻害を行ったレーン 3 では見られないバンドが確認され、precocene II 結合タンパク質が含まれると考えられた。

このバンドを含むようゲルを切り出し、1-1-4 と同様の方法で処理したのち、公開されている *S. cerevisiae* のタンパク質配列データベースとの照合を行った。解析の結果を表 1-3 に示す。最も高いスコアを示したタンパク質としてアクセッション番号 YNL055C が提示され、これは出芽酵母の VDAC としてアノテーションされているタンパク質であった。ここから、precocene II は *F. graminearum* 同様出芽酵母の VDAC にも結合すると考えられた。

## 1-2 活性酸素の発生と *F. graminearum* の 3-ADON 生産量の関係

1-1 の実験から、precocene II の直接の結合タンパク質として VDAC が同定された。1-1-4 で述べたように、VDAC はミトコンドリア外膜の物質透過孔として働いているが、VDAC と *F. graminearum* の DON 生産との関連を示唆する報告はない。よって、precocene II と VDAC の結合がどのように 3-ADON 生産の阻害に至るのかは明らかで

ない。precocene II、VDAC、3-ADON 生産の三者の関連を調べる上で、筆者は活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS)、中でも特にスーパーオキシドアニオンラジカル (以下スーパーオキシド) に注目した。ROS は好気呼吸の代償として発生する高い反応性をもつ酸素化合物の総称であり、タンパク質や核酸、脂質など種々の生体分子と反応しこれを損傷する [98]。スーパーオキシドはミトコンドリアの呼吸鎖複合体で起こる酸素の還元において、不十分な還元が起きた際に生じる不可避の副産物である。スーパーオキシドは除去酵素である superoxide dismutase (SOD) により過酸化水素に変換され、過酸化水素はカタラーゼなどの酵素により更に水に分解されるが、分解から逃れたこれらの ROS から、更に反応性の高い ROS であるヒドロキシラジカルが生じる。

呼吸鎖複合体で発生し内膜と外膜の膜間腔に放出されたスーパーオキシドは、VDAC を通って細胞質基質に移動することが、ラットあるいはマウスの単離ミトコンドリアを用いた *in vitro* の実験により示唆されている [99, 100]。

一方、ROS と *F. graminearum* の関係としては、過酸化水素の添加によって DON 生産タイプの *F. graminearum* の DON 生産が増加する一方、NIV 生産タイプの *F. graminearum* の NIV 生産量が減少するとの報告がある [38]。それとは逆に、スーパーオキシド発生試薬として知られる paraquat は、本章で用いた *F. graminearum* MAFF101551 とは異なる株である *F. graminearum* CBS185.32 の 15-ADON 生産を低濃度で阻害したとの報告があった [37]。

これらの報告から、precocene II が VDAC に結合し、VDAC のスーパーオキシド調節機能に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられた。

### 1-2-1 活性酸素関連試薬が 3-ADON 生産量に与える影響

そこで、まず本章で用いた *F. graminearum* MAFF101551 株の 3-ADON 生産および菌体の生育に、種々の活性酸素関連試薬が与える影響を調べた。

5 mL の SYEP 培地に *F. graminearum* の胞子を植菌し、薬剤を添加後、26.5°C で 4 日

間培養した。培養後ろ過により上清と菌体を分離し、上清から 3-ADON を抽出後、LC/MS により 3-ADON 量を定量した。菌体は凍結乾燥を行い、乾燥菌体重量を秤量した。結果を図 1-10 に示す。前述したように、paraquat はスーパーオキシド発生試薬として知られ、複数の酵素により還元されて生じた paraquat radical が paraquat に戻る際に、酸素を不完全に還元しスーパーオキシドが発生する [101]。paraquat は CBS185.32 株の場合と同様、MAFF101551 株の 3-ADON 生産を菌体の生育にほとんど影響を与えることなく低濃度で阻害した。menadione もまたスーパーオキシド発生試薬として知られる物質であるが [102]、培地中に終濃度 20  $\mu\text{M}$  で加えることで 3-ADON 生産を有意に減少させた。一方、過酸化水素の 1 mM までの添加は 3-ADON の生産に有意な変化をもたらさず、3 mM の過酸化水素の添加によって菌体の生育が完全に阻害された。

## 1-2-2 抗酸化物質が 3-ADON 生産量に与える影響

1-2-1 から、スーパーオキシド発生試薬により 3-ADON 生産が阻害されることがわかったため、次に種々の抗酸化物質が 3-ADON 生産に与える影響を調べた。

$\alpha$ -tocopherol はビタミン E と呼ばれ、生体膜で生じた過酸化脂質を還元したり、スーパーオキシドと直接反応し消去していると考えられている [103]。このとき生じたビタミン E ラジカルは ascorbic acid などにより元の  $\alpha$ -tocopherol に戻される。ascorbic acid はビタミン C と呼ばれる水溶性の抗酸化物質であり、スーパーオキシドを含む種々の酸化性物質と反応しこれを消去する。glutathione は、自身の持つチオール基によるタンパク質のシステイン残基の酸化抑制や、グルタチオンペルオキシダーゼの基質として過酸化脂質や過酸化水素の還元に関与している。

1-2-1 と同様に、薬剤を添加して SYEP 培地中で *F. graminearum* を培養し、培養後上清から 3-ADON を抽出し、菌体は凍結乾燥後重量を秤量した。図 1-11 に示すように、50  $\mu\text{M}$  の  $\alpha$ -tocopherol、3 mM の ascorbic acid、1 mM の glutathione の添加により 3-ADON 生産量は有意に増加した。さらに、これらの抗酸化物質は、3  $\mu\text{M}$  の precocene

II の添加によって減少した 3-ADON 生産量を有意に増加させた。特に、 $\alpha$ -tocopherol の添加は、precocene II 存在下でも precocene II なしで  $\alpha$ -tocopherol を添加した場合に近い量の 3-ADON を生産させた。これらの抗酸化物質の添加は菌体重量には有意な変化をもたらさなかった。

### 1-2-3 precocene II が細胞内のスーパーオキシド量に与える影響

1-2-1 および 1-2-2 から、スーパーオキシド発生試薬は 3-ADON 生産を阻害する一方、抗酸化物質は 3-ADON 生産を増大させ、precocene II の効果を一部覆すことがわかった。そこで、precocene II が細胞内のスーパーオキシド量に与える影響を調べるため、スーパーオキシドにより特異的に酸化され、酸化に伴い蛍光を発する蛍光試薬を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡により観察することにした。

dihydroethidium (図 1-12 (a)) はスーパーオキシドと特異的に反応し、反応産物の励起波長および蛍光波長が長波長側にシフトする。細胞内において特定の局在を持たず、主に細胞質基質のスーパーオキシドを検出する試薬として用いられている [104]。一方、mitoSOX (図 1-13 (a)) は dihydroethidium にヘキシル鎖とその先のトリフォスフォニウム基 (TPP<sup>+</sup>) を結合させた誘導體である。TPP<sup>+</sup> の脂溶性と正電荷は負の膜ポテンシャルを有するミトコンドリア膜の透過に適しているため、mitoSOX はミトコンドリア選択的な局在を示し、ミトコンドリアのスーパーオキシド検出試薬として用いることができる [105]。

*E. graminearum* を SYEP 培地中で 24 時間培養後、precocene II またはスーパーオキシド発生のポジティブコントロールとして paraquat を加え、更に 24 時間培養した。菌体をろ過により回収し、蛍光試薬により処理して直ちに蛍光顕微鏡により観察を行った。dihydroethidium で処理して観察を行った結果を図 1-12 (b) に、mitoSOX で処理して観察を行った結果を図 1-13 (b) に示す。

薬剤無添加のコントロールおよび precocene II 30  $\mu$ M の処理では、dihydroethidium

の蛍光はほとんど観察されなかった一方、paraquat 100  $\mu\text{M}$  処理により明確な赤色蛍光の増大が観察され、paraquat によって細胞内のスーパーオキシドが増加することが確認された (図 1-12 (b))。

一方、mitoSOX 蛍光においては、precocene II 30  $\mu\text{M}$  の処理でコントロールに比べ明確な赤色蛍光の増大が観察された。蛍光の増大は paraquat 100  $\mu\text{M}$  の処理によっても観察された (図 1-13 (b))。これらの結果から、paraquat は細胞質基質とミトコンドリアの別なくスーパーオキシドを増加させる一方、precocene II は細胞質基質のスーパーオキシド量には大きな変化を与えず、ミトコンドリア内のスーパーオキシドを増加させることが考えられた。

#### 1-2-4 precocene II の添加による酸化ストレスマーカーの変化

1-2-3 から、precocene II の添加によってミトコンドリアのスーパーオキシドが増加すると考えられた。1-2-1 で述べたように、スーパーオキシドを含む ROS はその高い反応性のために脂質、核酸、タンパク質などと反応し、可逆的、または不可逆的な酸化損傷を与える。precocene II によるスーパーオキシドの増大を裏付けるため、生体分子の酸化損傷の指標を調べた。

タンパク質の酸化損傷マーカーとして、側鎖のカルボニル化がある。プロリンやアルギニンの側鎖は ROS によるカルボニル化を受けやすく、カルボニル化した側鎖は比較的安定であり、かつ 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) との反応により安定で特徴的な吸光を示す dinitrophenylhydrazone 化合物を与える [106]。

precocene II を添加または無添加で培養した *F. graminearum* の菌体を回収し、1-1-2 で述べた方法によりミトコンドリア画分を得た。バッファーによりタンパク質を抽出し、DNPH と室温で反応後、タンパク質を全て沈殿させた。沈殿をよく洗って残存する DNPH を除いたのち、タンパク質を可溶化させ、366 nm の吸光度を測定してカルボニル化タンパク質を定量した。結果を図 1-14 (a) に示す。30  $\mu\text{M}$  の precocene II の添加によってミトコンドリアタンパク質のカルボニル化が有意に増加しており、ミト

コンドリアにおける酸化ストレスの増大が裏付けられた。

次に、脂質の酸化損傷の指標であるチオバルビツール酸反応性物質(Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) 量を測定した。生体膜中の脂質が ROS により酸化されると、種々の過酸化脂質が形成されるが、これら脂質の酸化の最終産物としてマロンジアルデヒドが知られる。マロンジアルデヒドとチオバルビツール酸を高温化で反応させると特徴的な吸光を示す付加化合物が得られるため、この吸光を測定することで、脂質の酸化損傷の程度を知ることができる。precocene II を添加または無添加で培養した *F. graminearum* の菌体を回収後凍結乾燥し、乾燥菌体を液体窒素下で粉碎後チオバルビツール酸溶液を加え、1 時間煮沸した。冷却後、有機溶媒により反応物を抽出し、532 nm の吸光度を測定して TBARS 量を調べた。結果を図 1-14 (b) に示す。300  $\mu\text{M}$  の precocene II の添加によって、TBARS 量の有意な増加が見られ、脂質の酸化をもたらす ROS の発生が裏付けられた。30  $\mu\text{M}$  の precocene II によっては有意な変化は確認されなかった。

#### 1-2-5 precocene II が菌体内アセチル CoA 量に与える影響

序論で述べたように、アセチル CoA は TCA 回路、脂肪酸合成やヒストンなどのタンパク質アセチル化に関わる必須代謝産物であると同時に、DON 生合成の出発物質でもある [24]。アセチル CoA は、ミトコンドリアにおけるピルビン酸デヒドロゲナーゼによるピルビン酸の変換、細胞質基質におけるアセチル CoA シンターゼ (ACS) による酢酸の変換および ATP citrate lyase (ATPCL) によるクエン酸の変換、ミトコンドリアやペルオキシソームにおける脂肪酸の $\beta$ 酸化などにより生成している。*Aspergillus nidulans* などの糸状菌においては、糖を炭素源とした培地で生育させた場合、細胞質基質のアセチル CoA は ATPCL によるミトコンドリア由来のクエン酸からの変換が主要であることが示されている [107]。すなわち、アセチル CoA の生成におけるミトコンドリアの重要性は非常に大きいことが考えられる。

1-2-4 までの実験から、precocene II がミトコンドリアの酸化損傷を引き起こしてい

ることがわかったため、precocene II の添加により細胞内のアセチル CoA が減少することが考えられた。そこで、precocene II 添加または無添加で培養した *F. graminearum* の菌体を凍結乾燥し、乾燥菌体を粉碎し過塩素酸水溶液により抽出を行った。K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液による中和後、遠心分離を行った上清を回収し、LC/MS によるアセチル CoA 量の定量を行った。結果を図 1-15 に示す。30 μM の precocene II の添加によりアセチル CoA 量が有意に減少しており、precocene II によるミトコンドリアの損傷が細胞全体でのアセチル CoA 量の減少を引き起こしていると考えられた。

#### 1-2-6 3-ADON 生産量、Tri6 発現量、ミトコンドリアスーパーオキシド量の経時変化と precocene II が与える影響

図 1-16 は、precocene II 添加または無添加の SYEP 培地 5 mL に植菌した *F. graminearum* を培養時間毎に回収し、上清の 3-ADON 量および乾燥菌体重量を測定したものである。3-ADON 量は培養 60 時間目から多くなり、培養 96 時間目まで増加し続けた。菌体重量は培養 24 時間目から 48 時間目まで最も大きく増加し、それ以降はなだらかに増加した。培地に precocene II を添加すると、3-ADON の生産がほぼ完全に阻害される一方、菌体重量は無添加の場合とほぼ同様の増加を示した。次に、precocene II を添加する時間を変えて、培養 96 時間目に培養液を回収して培養上清中の 3-ADON 量および乾燥菌体重量を測定した結果を図 1-17 に示した。培養 48 時間目までに precocene II を添加した場合、3-ADON の生産はほぼ完全に阻害され、培養開始時に precocene II を添加した場合と同様の結果となった。一方、培養 60 時間目、72 時間目、84 時間目に precocene II を添加した場合は 3-ADON が検出されたが、図 1-16 との比較から、これは precocene II を添加した時点ですでに培地中に生産された 3-ADON であることが考えられ、precocene II は培地に添加直後から強い 3-ADON 生産阻害活性を発揮することが示唆された。

次に、トリコテセン生合成遺伝子クラスターの調節因子である *Tri6* の発現量の経時変化を調べた。序論に述べたように、TRI6 は DON 生産の最も上流に位置すると考

えられる転写因子であり、precocene II の添加によってその発現量が減少することが調べられている [44]。各培養時間で回収した菌体から 1-1-7-1 と同様に total RNA を抽出後 cDNA を合成し、Tri6 遺伝子の配列に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR 法によって Tri6 の mRNA 量を定量した。結果を図 1-18 に示す。薬剤無添加区において、Tri6 の mRNA 量は培養時間の経過に伴い増加し、培養 72 時間目で最大となった。図 1-16 で示したように、3-ADON の生産は培養 72 時間目から 84 時間目で最も活発であり、Tri6 の発現と関連していると考えられた。一方、precocene II を培地に添加した場合、Tri6 の発現は培養期間全体に渡って低レベルに抑制されており、3-ADON 生産の阻害と一致していた。薬剤無添加で培養を開始し、培養 48 時間目に precocene II を添加後、添加の直後、1 時間後、2 時間後、3 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後で菌体を回収し、同様の方法により Tri6 の mRNA 量を定量した結果を図 1-19 に示す。薬剤無添加は precocene II 添加区と同時に回収した菌体の Tri6 mRNA 量を示す。図 1-18 の結果と一致して、薬剤無添加での Tri6 の発現量は 24 時間後の回収、すなわち培養 72 時間目まで上昇していた一方で、precocene II の添加により Tri6 mRNA 量の上昇は見られなくなり、precocene II 添加後 3 時間目から薬剤無添加の場合より Tri6 mRNA 量は有意に減少していた。図 1-17 の結果と合わせて、precocene II は添加後直ちに Tri6 の発現を抑制することで、3-ADON 生産を阻害することが考えられた。

1-2-2 から 1-2-4 の実験より、スーパーオキシド発生試薬は 3-ADON 生産を抑制すること、および precocene II はミトコンドリアのスーパーオキシドを増加させることで 3-ADON 生産を阻害すると考えられることがわかった。ROS の発生と生育の関係については、ROS の蓄積と生物の寿命の観点から調べられている [108]。出芽酵母においては、copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) 破壊株の寿命が野生株に比べて顕著に減少し、かつその減少は嫌氣的条件下の培養では大きく緩和されたとの報告がある [109]。上記の 3-ADON 生産量および Tri6 発現量の経時変化が、ミトコンドリアのスーパーオキシド量の経時変化となんらかの関連がある可能性を考え、培養時間

ごとのスーパーオキシドの定量を行うことにした。

蛍光画像を用いた定量方法の概要を図 1-20 (a) に示す。カルコフルオールは細胞壁のキチンやセルロースに結合する非特異的蛍光色素であり、画像中の全細胞を染色するために用いた。カルコフルオールの蛍光画像を二値化し、黒領域を画像中の全細胞の面積とした。一方、同じ箇所でも撮影した mitoSOX 蛍光画像も同様に一定の閾値により二値化し、黒領域をミトコンドリアスーパーオキシドの蓄積箇所として定量した。得られた値をカルコフルオールの値で除算することで、画像中のスーパーオキシド量とした。この方法は画像の二値化を含むため、スーパーオキシドの量そのものを測定することはできないが、スーパーオキシドの増減の目安とすることはできると考えられる。

図 1-20 (a) の方法を用いて、precocene II 添加または無添加で培養し各時間で回収した菌体のミトコンドリアスーパーオキシド量を定量した結果を図 1-20 (b) に示す。薬剤無添加で培養した菌体のミトコンドリアスーパーオキシド量は培養 24 時間で最大であり、その後単調に減少し、培養 60 時間目以降蛍光はほとんど見られなくなった。一方、precocene II を添加して培養した菌体のミトコンドリアスーパーオキシド量は薬剤無添加に比べて各時間で有意に増加し、培養 60 時間目以降では蛍光は大きく低下したが、60 時間目、72 時間目において無添加の場合より有意に増加していた。これらの結果より、スーパーオキシド量の減少と 3-ADON 生産および *Tri6* 発現量の増加に関連があることが示唆された。

#### 1-2-7 *MnSOD1* および *MnSOD2* 破壊株の作製

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

#### 1-2-8 *MnSOD1* および *MnSOD2* 破壊株の生育

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

#### 1-2-9 *MnSOD1* および *MnSOD2* 破壊株の 3-ADON 生産量

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

#### 1-2-10 *MnSOD1* および *MnSOD2* 破壊株の *Tri6* および *Tri5* 発現量

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

#### 1-2-11 *MnSOD1* および *MnSOD2* 破壊株のスーパーオキシド量の経時変化

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

### 1-3 考察

DON 汚染は北米地域をはじめ多くの地域で見られ、小麦の DON 汚染によりもたらされる経済被害はアメリカ合衆国だけでも年 6 億 5 千万ドルに達すると見られており [2]、より優れた DON 汚染防除法の開発は喫緊の課題である。本章では、カメムシ類の抗幼若ホルモン活性物質として見出され [46]、のちに *F. graminearum* の DON 生産阻害活性が見出された [44] precocene II の作用機構の解析を行った。生物活性物質の *in vivo* における作用機構を理解する上で、活性物質の標的分子を同定することは第一の目標であり [83, 84]、本章においてもまず precocene II の結合タンパク質の

探索を行った。precocene II に関しては、その作用について細胞レベルでの解析が複数行われており、チャバネゴキブリのアラタ体において、とりわけミトコンドリアの形態に異常を生じさせること [93]、ラット肝細胞に対しミトコンドリア膜電位の喪失、グルタチオン減少、ATP 減少に起因すると考えられる細胞死をもたらすことが報告されており [94]、これらの生物において precocene II の作用点がミトコンドリアに存在することが示唆されていた。*F. graminearum* においても、precocene II の作用点がミトコンドリアに存在する可能性を考え、ミトコンドリア抽出タンパク質から precocene II の標的分子を探索した結果、VDAC が同定された。VDAC は核・未破碎細胞画分からも同定されたが、未破碎細胞に含まれるミトコンドリア由来であることが考えられる。

大腸菌発現系から作製した His-VDAC は、precocene II 固定化ナノ磁気ビーズに結合後、ネイティブの VDAC のように precocene II 溶液による溶出ができなかった (データは示していない)。その理由として、組換えタンパク質において、膜タンパク質である VDAC の正確な立体構造が再現されていなかった可能性がある。また、N 末端部位に 6x His タグを導入した影響である可能性がある。すなわち、VDAC の機能に関する構造生物学的解析から、ミトコンドリア外膜を貫通する VDAC の $\beta$ -バレル構造においては、それぞれ 46 度の角度に傾いた 13 本の $\beta$ -ストランドがバレルの内壁を構成し、結果として中央に直径約 2.5 nm の孔が開いていると考えられ [95]、一方、N 末端部分は両親媒性の $\alpha$ -ヘリックスを形成し、他のタンパク質や低分子による認識部位になっていると考えられている [112]。このため、N 末端に 6x His タグを導入したことが、VDAC と precocene II の結合特性に影響を与えた可能性が考えられる。しかしながら、His-VDAC はコントロールビーズよりも precocene II 固定化ナノ磁気ビーズに多く結合したことから、precocene II と His-VDAC は強固な結合を示すと結論づけた。

出芽酵母のミトコンドリアから抽出したタンパク質に対し precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを用いた精製実験を行った結果でも、ビーズに結合し precocene II により特異的に溶出されるタンパク質として VDAC が同定された。図 1-28 に *F. graminearum*

の VDAC と出芽酵母の VDAC の配列のアラインメントを示した。配列の一致度は 41%程度であるにも関わらず precocene II が両種の VDAC に結合したことは、VDAC 内の保存された部分構造に precocene II が結合していることを示唆している。上記のヒスチジンタグが存在する場合の結合状態を理解するためにも、今後 precocene II と VDAC の結合部位を調べるとともに、立体構造を明らかにする必要があるだろう。

VDAC は細胞質基質とミトコンドリア膜間腔をつなぐ主要なチャンネルを形成しており、ミトコンドリアで生成された代謝物質の多くはミトコンドリアマトリックスから膜間腔へ輸送されたのち、VDAC を通って細胞質基質へ移行する。VDAC は、その名の通り、*in vitro* で膜を再構成した実験において、膜間の電位差に応じて”閉じた”状態と”開いた”状態が存在していることが知られる。開閉のメカニズムには正に荷電した可動性のセンサードメインが関与している。開いた状態ではセンサードメインは孔の内壁を構成するため、負電荷をもつ ATP、クエン酸、コハク酸といった多くの代謝物質がこれを透過できる [113]。一方、閉じた状態では正に荷電したセンサードメインが孔の上部に移動し、同時に孔の直径が狭まる。これによって、孔の内部は負に荷電した状態となり、多くの代謝物質は VDAC を透過できない。

*in vivo* では電位に応じた VDAC の開閉に関する実験的証拠は見つかっていないが、VDAC の開閉を調節する物質、たとえば低分子物質としてグルタミン酸、NADH、Mg-NADPH などが、タンパク質として Bcl-xL、mtHSP70 などが見出されている [112, 114]。precocene II もまた VDAC の開閉に影響を与えている可能性を考え、*F. graminearum* から単離したミトコンドリアを用いて、precocene II が NADH のミトコンドリア内への透過に与える影響を調べたが、有意な変化を見出すことはできなかった (修士論文に記載)。

VDAC は、代謝物質だけでなくミトコンドリアで発生するスーパーオキシドの放出にも関与していることが報告されている。スーパーオキシドは酸素の不完全な還元によりミトコンドリア呼吸鎖複合体で不可避免的に生成する副産物であるが [115]、内膜の呼吸鎖複合体で生成後、ミトコンドリアマトリックスまたは膜間腔に放出されている。マトリックスのスーパーオキシドはマトリックスに局在する MnSOD により過

酸化水素に変換され、過酸化水素は速やかに膜を拡散するが、スーパーオキシドは脂質膜を透過できず、膜間腔に放出されたスーパーオキシドは VDAC を透過して細胞質基質に拡散していることが示されている [99, 100]。 *F. graminearum* CBS185.32 株において、過酸化水素が 15-ADON 生産を増加させた一方、スーパーオキシド発生試薬の paraquat はこれを阻害したとの報告があったことから [37]、筆者は precocene II とスーパーオキシドの関係性に着目した。

蛍光試薬を用いた観察から、precocene II はミトコンドリアのスーパーオキシドを大きく増加させたが、細胞質基質のスーパーオキシド量には大きな変化をもたらさなかった。precocene II によるミトコンドリアのスーパーオキシドの増大は、ミトコンドリアタンパク質の酸化損傷が増加していることにより確認された。一方、本研究で用いた MAFF101551 株の 3-ADON 生産を低濃度で阻害した paraquat は、ミトコンドリアと細胞質基質の両方のスーパーオキシドを大きく増加させていた。さらに、抗酸化物質は 3-ADON 生産を増加させ、precocene II の効果を抑制した。また、ミトコンドリアに局在することが予想される MnSOD1 と MnSOD2 の遺伝子破壊株のうち、MnSOD2 破壊株はミトコンドリアスーパーオキシド量の増加、Tri6 転写量の減少、3-ADON 生産量の減少を示し、ミトコンドリアスーパーオキシドと 3-ADON 生産量が関係していることを明確に示していた。以上の実験事実から、precocene II は VDAC に結合し、ミトコンドリアのスーパーオキシドを増加させることで 3-ADON 生産を阻害していると結論付けた (図 1-29)。

3-ADON 生産量、菌体重量、Tri6 転写量、ミトコンドリアスーパーオキシド量の経時変化を解析したところ、スーパーオキシド量は菌体の増加する培養 24 時間目に最も多く、その後単調に減少する一方、Tri6 の転写量はスーパーオキシド量とは反対に培養 24 時間目に最も少なく、その後 72 時間目まで単調に増加することがわかった。3-ADON 量は Tri6 転写量が多くなる培養 48 時間目から 60 時間目に生産が開始されていた。ミトコンドリアのスーパーオキシドの増加が 3-ADON 生産を阻害することと考え合わせると、*F. graminearum* は通常の生育時においても、生育の進行と同期したミトコンドリアのスーパーオキシドの減少に合わせ、Tri6 の転写および 3-ADON 生

産を開始する調節メカニズムを有する可能性が考えられる。

本研究では過酸化水素の添加は DON 生産に有意な変化はもたらさず、3 mM の添加で菌体の生育が見られなくなった。過酸化水素の添加により DON 生産が増大したとの報告は CBS185.32 株の他に INRA 605 株 [110]、INRA 349 株 [38]、8/1 株 [116] などに見られるが、過酸化水素の添加により *F. graminearum* の NIV 生産株において NIV 生産が減少するとの報告もあり [38]、過酸化水素が与える影響の詳細はわかっていない。

また、*MnSOD1* 破壊株においては、培養 72 時間目までミトコンドリアのスーパーオキシド量に有意な変化が見られず、培養 24 時間目に細胞質基質のスーパーオキシドが大きく増加しているのみであったが、*Tri6* および *Tri5* 転写量と 3-ADON 生産量の減少が見られた。本研究の途上で、*F. graminearum* PH-1 (NRRL 31084) 株において細胞質基質に存在する SOD である CuZnSOD の遺伝子破壊株の作製が報告され、*CuZnSOD* 破壊株は小麦小花に対する病原性の低下とともに DON 生産量が減少していた [117]。*CuZnSOD* 破壊株の細胞内スーパーオキシドの定量に関するデータはないが、*CuZnSOD* は細胞質基質局在性であることからミトコンドリア内のスーパーオキシドには影響を与えていないことが考えられ、*MnSOD1* 破壊株の結果と合わせて細胞質基質のスーパーオキシド量の増大もまた DON 生産を阻害することが予想された。

本研究では、スーパーオキシドの増大が *Tri6* 転写量の減少および DON 生産の減少に結びつく直接の経路を明らかにすることはできていない。最近、*F. graminearum* において、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) ファミリー内の触媒サブユニットである酵母 ELP3 のオーソログの遺伝子変異株が、異常な形態を示す孢子、*Tri5* および *Tri6* 転写量の減少、トリコテセン生産量の大幅な減少、小麦に対する病原性の低下を示すことが報告された [39]。哺乳類の ELP3 はヒストン H3 および H4 のアセチル化を行うことが知られており、*ELP3* 変異株においてもヒストン H3 の 14 残基目リジンのアセチル化の減少が示された。また、*TRI6* は *Tri6* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、自身の発現を増大させる self-regulation を行うことが示唆されている [28]。ヒストンのアセチル化においては、細胞質基質および核内のアセチル CoA 量、

さらに原料となるミトコンドリア由来のクエン酸が豊富に存在することが重要であると考えられる [107, 118]。

また、DON 生合成が行われる細胞内区画としてトキシソームと名づけられた小胞の存在が示唆されている [40]。DON 生合成の誘導条件においては中間体のファルネシルニリン酸の生合成に関わる HMG-CoA レダクターゼのトキシソームへの移動が観察されているが、HMG-CoA レダクターゼより前の生合成段階が生じる細胞内区画は定かではない。DON 生合成において利用されるアセチル CoA の主要な供給源がミトコンドリアであるか、細胞質基質またはペルオキシソームであるかは明確ではない、*A. nidulans* における ATPCL の重要性を考慮すると、DON 生合成に必須のアセチル CoA の供給にミトコンドリアが果たす影響は大きいと考えられる。

序論に述べたように precocene II の添加は未知のメカニズムにより ATPCL の転写量およびタンパク質量の減少をもたらすことがわかっている。以上の結果と考え合わせると、precocene II の添加によるミトコンドリアのスーパーオキシドの増加がミトコンドリアの機能不全によるクエン酸の減少を引き起こし、ATPCL の減少と合わさってアセチル CoA 量の減少をもたらし、DON 生合成に利用可能なアセチル CoA のプールを減少させるとともに、*Tri6* 遺伝子周辺を含むヒストンのアセチル化レベルを減少させ、*Tri6* 遺伝子発現量の減少と DON 生産の減少をもたらすメカニズムが示唆される (図 1-29)。しかしながら、precocene II の添加は菌体重量への影響をもたらさないことを考えると、ミトコンドリアの異常に起因する何らかのシグナルが直接的に *Tri6* 転写量の減少と DON 生産の阻害を導く可能性もあり、今後更に解析する必要があると考えられる。

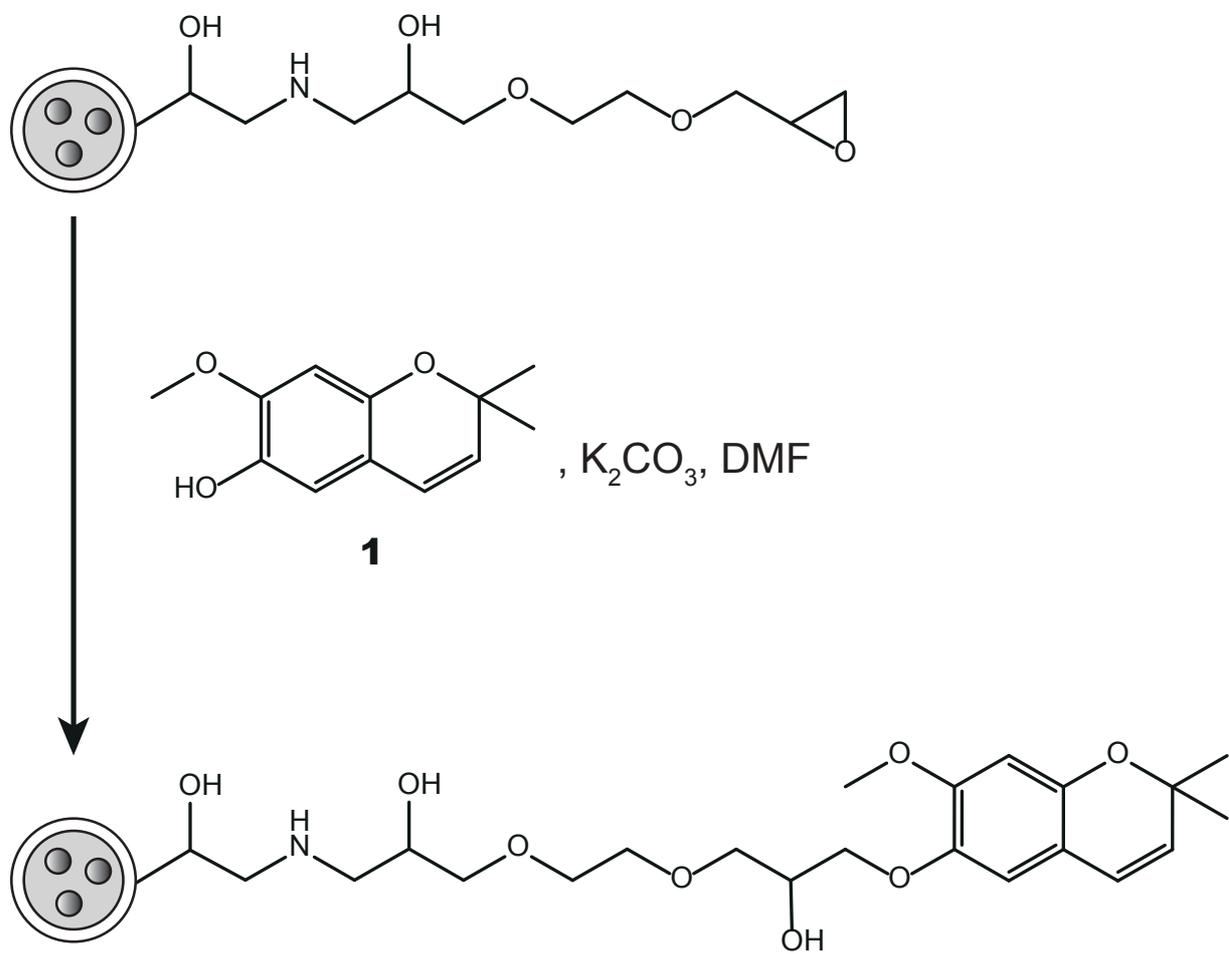


図 1-1. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの調製

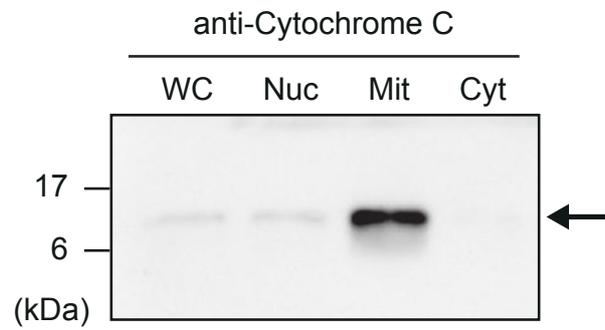


図1-2. シトクロムc に対する抗体を用いた免疫ブロッティングによる細胞粗分画の確認

WC: 全細胞抽出物 Nuc: 核・未破碎画分抽出物

Mit: ミトコンドリア画分抽出物 Cyt: 細胞質基質画分

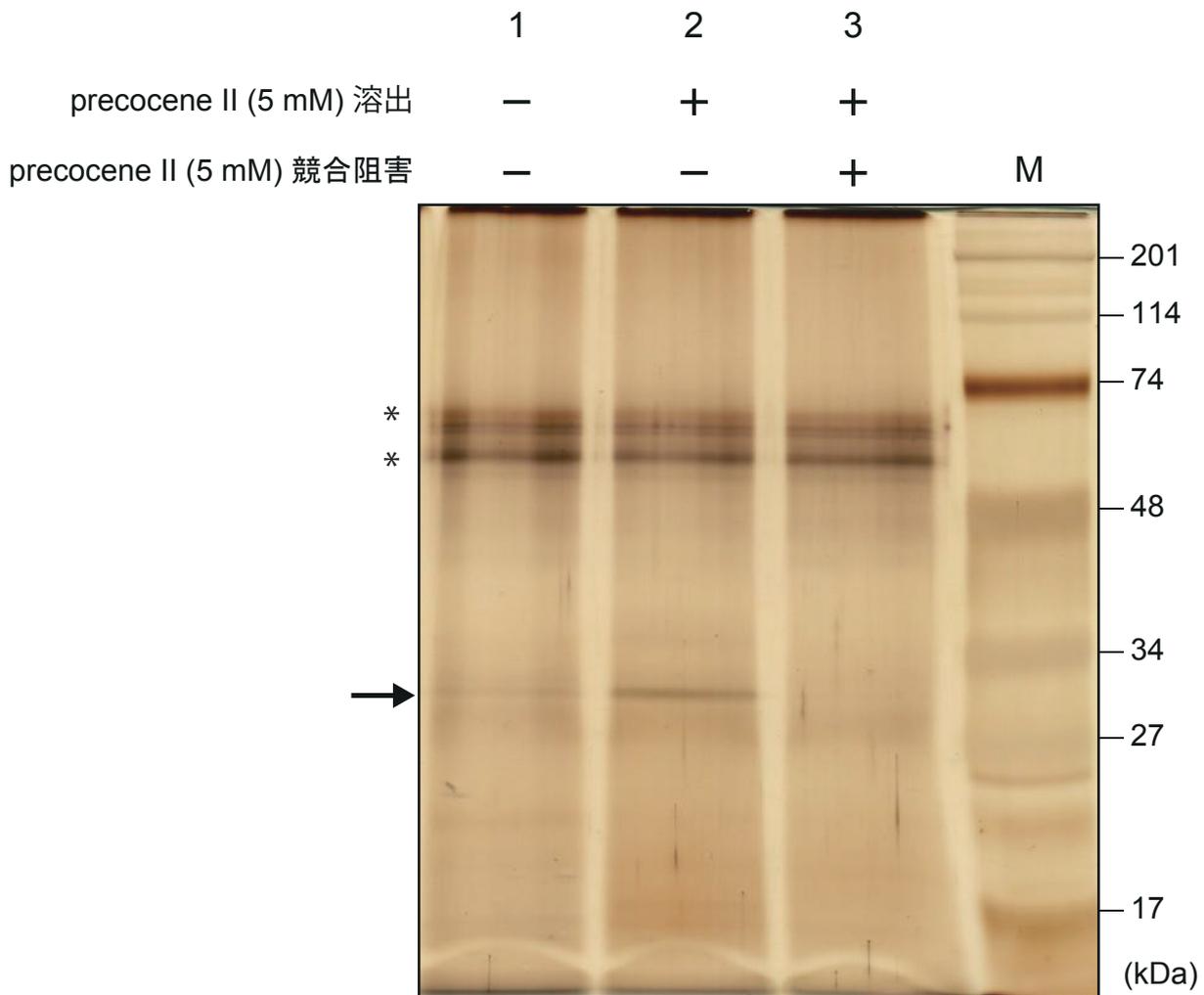


図 1-3. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを用いたミトコンドリア画分抽出タンパク質からの precocene II 結合タンパク質の精製と同定

レーン 1 は 3 回目の洗浄時の上清を泳動したもの。

レーン 2 は続いて precocene II 溶液により溶出したもの。

レーン 3 はタンパク質溶液と precocene II をあらかじめインキュベートしたもの。

M: 分子量マーカー \* : 混入したケラチンと考えられるバンド

表 1-1. 図 1-3 のレーン 2 の約 30 kDa のバンドの LC/MS/MS 解析結果

No.	Accession	Description	Score	Coverage	MW [kDa]	calc. pI	obtained peptides
1	FGSG_09933	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel)	75.25	58.66%	29.8	8.84	YTDKPTGLTLTQWNTANALDTK GPVANVDVVGHEGFLAGASAGYDANK LEGLFNFLPATAAK GIAALAYNVLRL EGVTLGLGGSFDTQK TGNVGLLEVASK SSHEKATSAIEGK VNSQVEAGAK YRIDPVSF TK ATSAIEGK AFFDLK LDQATHK IEVADSLAK IDPVSF TK ATWNSK
2	FGSG_06246	probable heat-shock protein hsp60	2.66	2.04%	61.4	5.72	VGGSSEVEVGEK
3	FGSG_06693	related to phospholipase C	2.32	1.42%	70.1	5.58	VLHGYLTK
4	FGSG_01558	related to regulator of deoxyribodipyrimidine photo-lyase PHR1	1.95	2.98%	168.4	8.07	QWYSIQADARRFEAAMK MDTSEYTPERCHEELER (C11(Carboxymethyl)) RGAeFQcSQKK (C4(Carboxymethyl); C7(Carboxymethyl))

Obtained peptide は LC/MS/MS において高い確度で検出されたペプチド断片を表す。

Score は検出されたペプチドの正確性の和として計算される、タンパク質の同定の確からしさを示す。

Coverage はタンパク質の配列のうち検出されたペプチドの占める割合を示す。

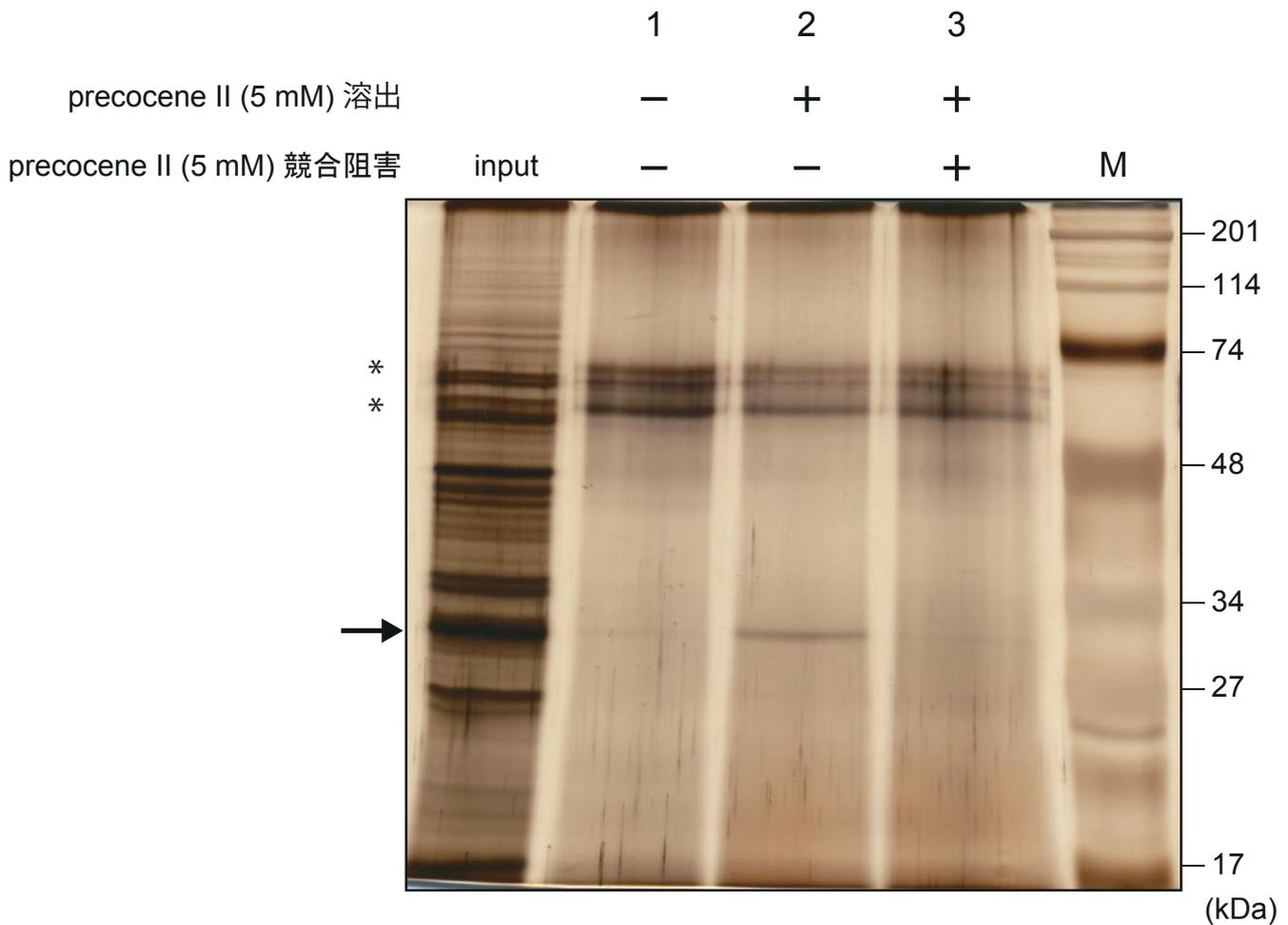


図 1-4. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを用いた核・未破碎画分抽出タンパク質からの precocene II 結合タンパク質の精製と同定

レーン 1 は 3 回目の洗浄時の上清を泳動したもの。

レーン 2 は続いて precocene II 溶液により溶出したもの。

レーン 3 はタンパク質溶液と precocene II をあらかじめインキュベートしたもの。

M: 分子量マーカー input: 精製に供した抽出タンパク質 \*: 混入したケラチンと考えられるバンド

表 1-2. 図 1-4 のレーン 2 の約 30 kDa のバンドの LC/MS/MS 解析結果

No.	Accession	Description	Score	Coverage	MW [kDa]	calc. pl	obtained peptides
1	FGSG_09933	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel)	44.63	54.06%	29.8	8.84	YTDKPTGLTLTQTWNTANALDTK EGVTGLGGSFDTQK LEGLFNFLPATAAK GPVANVDVAVGHEGFLAGASAGYDANK TGNVAVGLEVASK GIAALAYNVLRLR IEVADSLAK AFFDLLK VNSQVEAGAK ATSAIEGK LEGLFNFLPATAAKGAK VTGKSSHEK IEVADSLAKGLK
2	FGSG_13180	hypothetical protein	0.00	20.00%	11.4	10.58	QMRTSGEKSGVK QmRTSGEKSGVK (M2 (oxidation)) FIRDWV/mR (M7 (oxidation))

Obtained peptide は LC/MS/MS において高い確度で検出されたペプチド断片を表す。

Score は検出されたペプチドの正確性の和として計算される、タンパク質の同定の確からしさを示す。

Coverage はタンパク質の配列のうち検出されたペプチドの占める割合を示す。

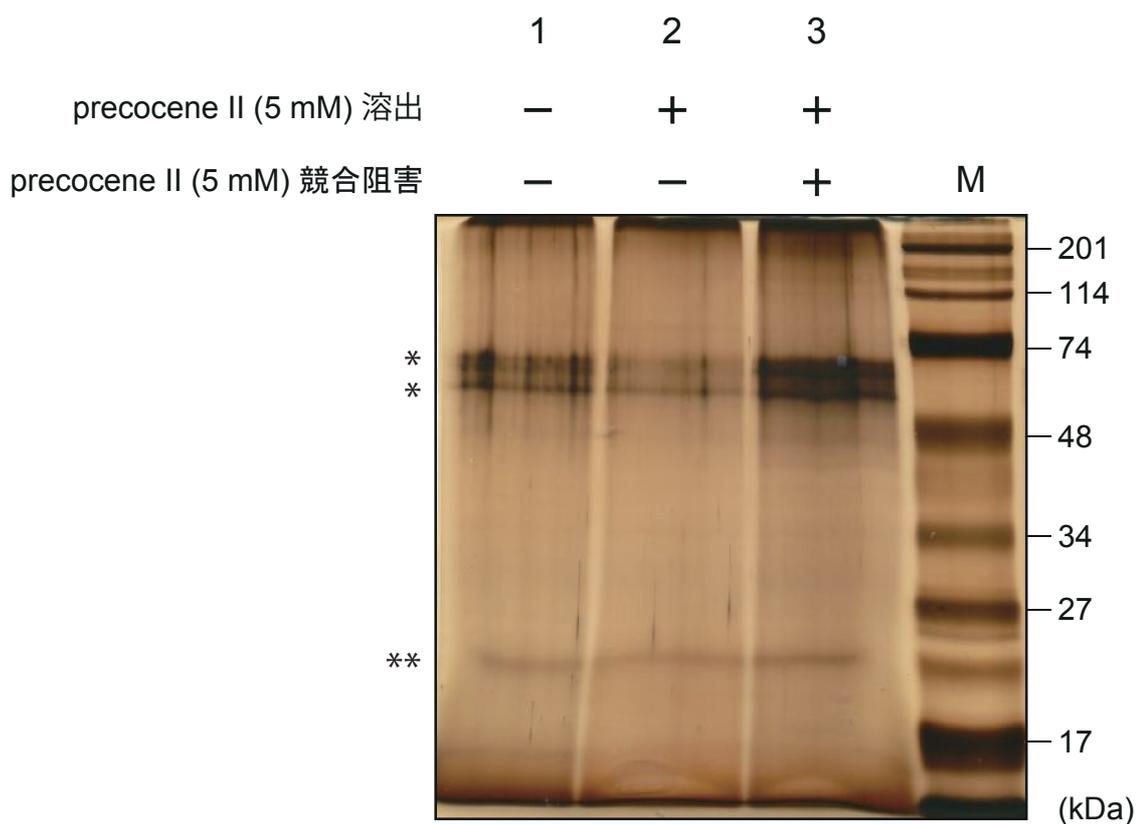


図 1-5. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを用いた細胞質基質画分からの precocene II 結合タンパク質の探索

レーン 1 は 3 回目の洗浄時の上清を泳動したもの。

レーン 2 は続いて precocene II 溶液により溶出したもの。

レーン 3 はタンパク質溶液と precocene II をあらかじめインキュベートしたもの。

M: 分子量マーカー \* : 混入したケラチンと考えられるバンド

\*\* : LC/MS/MS 解析により候補タンパク質が存在しなかったバンド

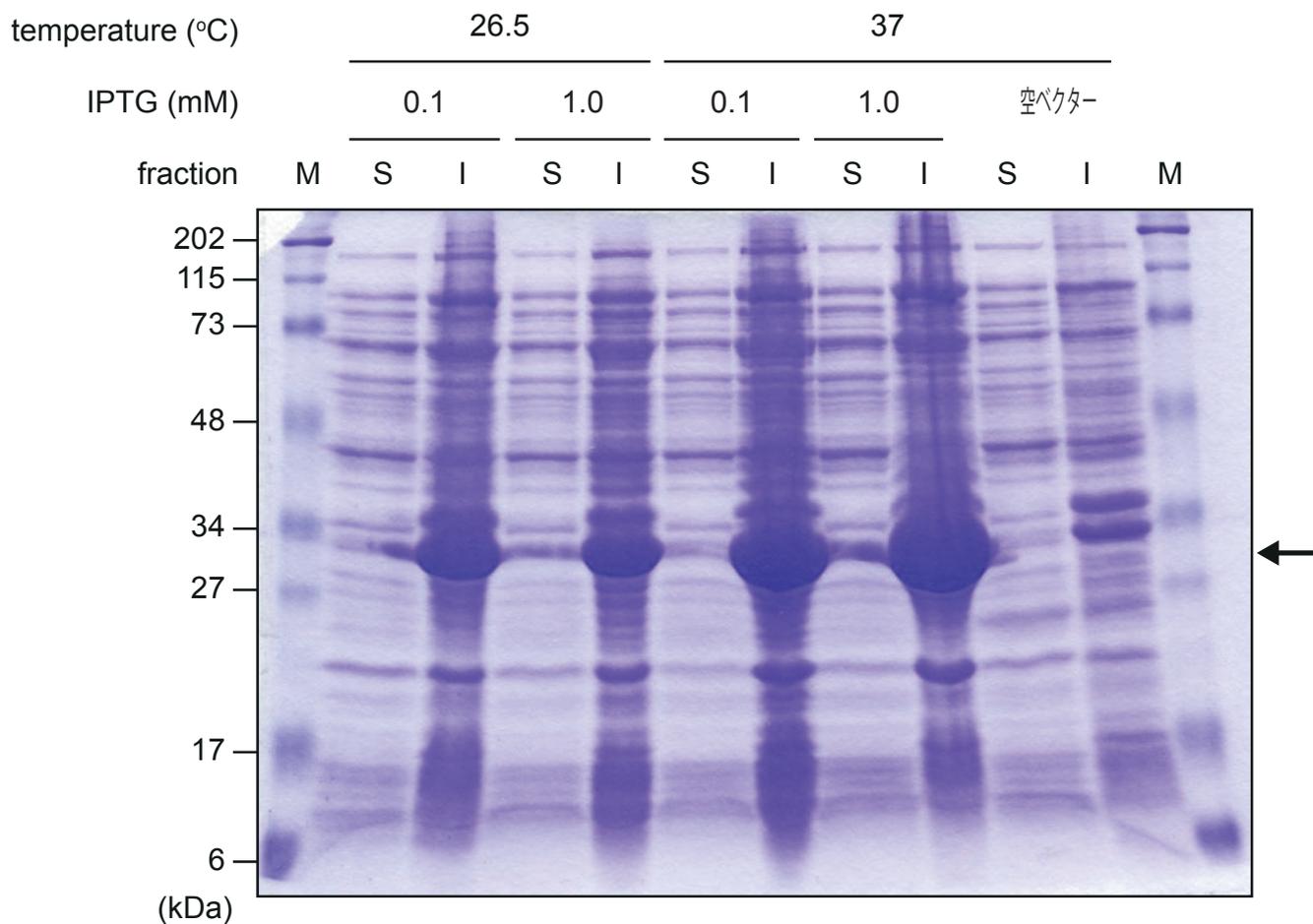


図1-6. 大腸菌発現系によるHis-VDACの発現条件の検討

各条件で培養した大腸菌の破碎後の上清または沈殿の SDS-PAGE 像

S: 上清 I: 沈殿

His-VDAC の推定分子質量 : 33.0 kDa

M: 分子量マーカー

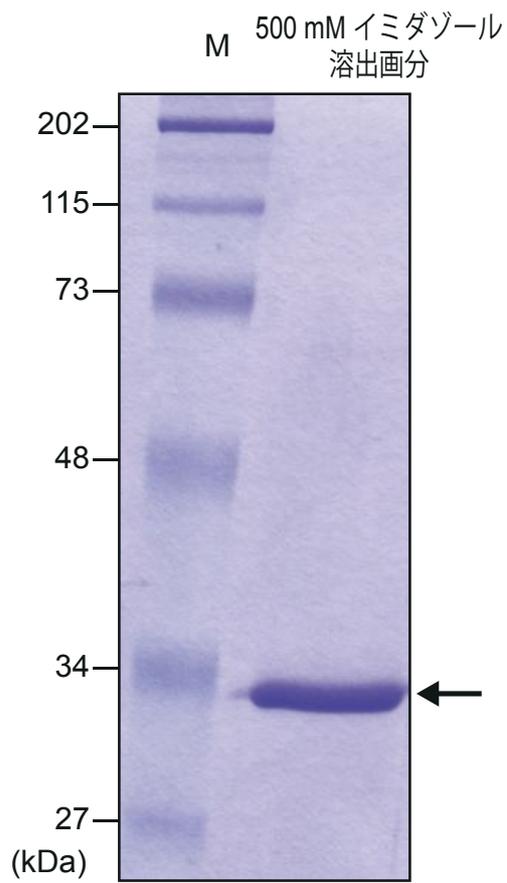


図1-7. His-VDACの精製および透析

Ni セファロースカラムによる精製後透析を行った画分の泳動像

His-VDAC の推定分子質量 : 33.0 kDa

M: 分子量マーカー

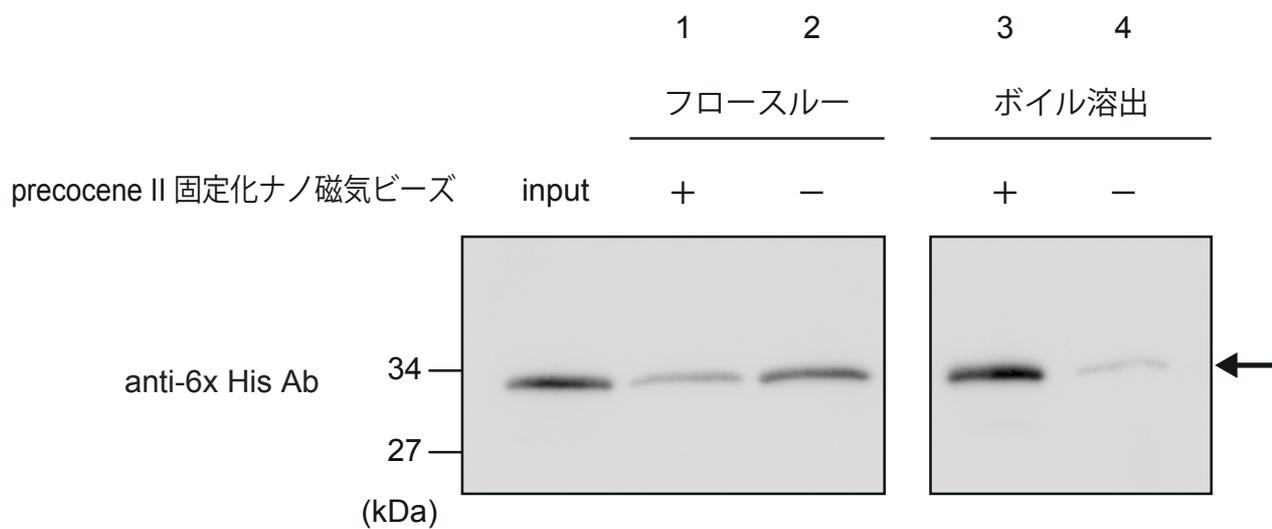


図1-8. His-VDACとprecocene II 固定化ナノ磁気ビーズとの結合実験

フロースルーはビーズを磁気分離後の上清を泳動したもの

input: 結合実験に供した His-VDAC

His-VDAC の推定分子質量 : 33.0 kDa

M: 分子量マーカー

	1	2	3
precocene II (5 mM) 溶出	—	+	+
precocene II (5 mM) 競合阻害	—	—	+

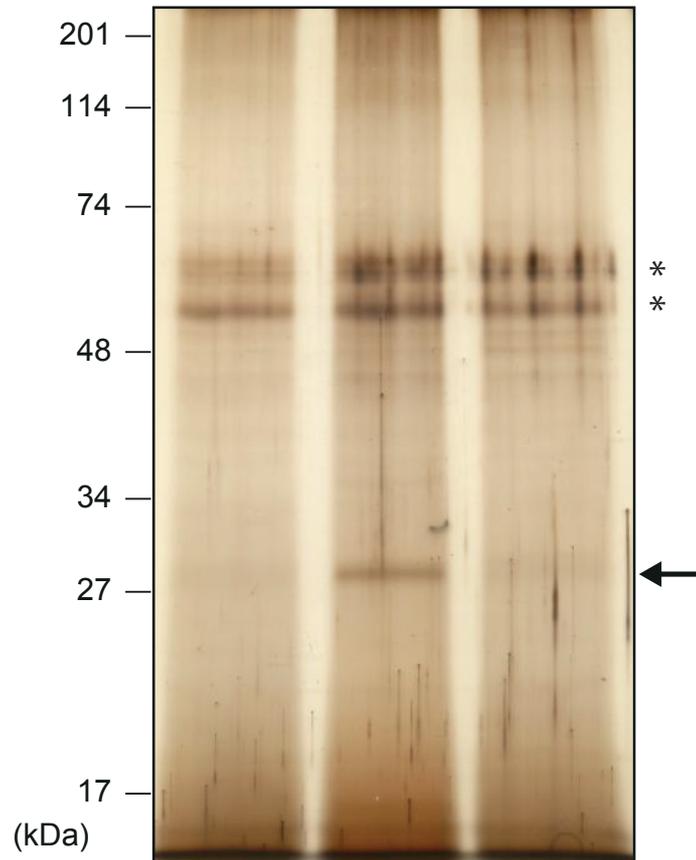


図 1-9. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを用いた出芽酵母ミトコンドリア画分抽出タンパク質からの precocene II 結合タンパク質の精製と同定

レーン 1 は 3 回目の洗浄時の上清を泳動したもの。

レーン 2 は続いて precocene II 溶液により溶出したもの。

レーン 3 はタンパク質溶液と precocene II をあらかじめインキュベートしたもの。

\*: 混入したケラチンと考えられるバンド

表 1-3. 図 1-9 のレーン 2 の約 30 kDa のバンドの LC/MS/MS 解析結果

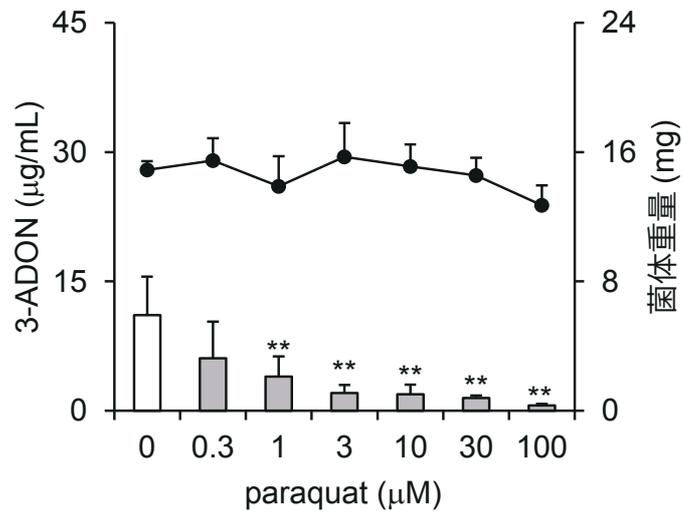
No.	Accession	Description	Score	Coverage	MW [kDa]	calc. pI	obtained peptide
1	YNL055C	Mitochondrial porin (voltage-dependent anion channel)	52.77	45.58%	30.4	7.93	SAVLNTTFTQPFFTAR LNDKQTGLGLTQGWSNTNINLQTK LEFANLTPGLKNELTSLTPGVAK QTGLGLTQGWSNTNINLQTK AKQPVKDGPLSTNVEAK LPNSNVNIEFATR QLLRPGVTLGVGSSFDALK QPVKDGPLSTNVEAK DGPLSTNVEAK LSEPVHK LEFANLTPGLK YLPDASSQVK
2	YGL086W	Coiled-coil protein involved in the spindle-assembly checkpoint	1.65	5.07%	87.6	5.44	KEcLIITDMNDKLR (C3(Carboxymethyl)) SLKERSANSmNDK (M10(Oxidation)) QFEQEVFKSNK

Obtained peptide は LC/MS/MS において高い確度で検出されたペプチド断片を表す。

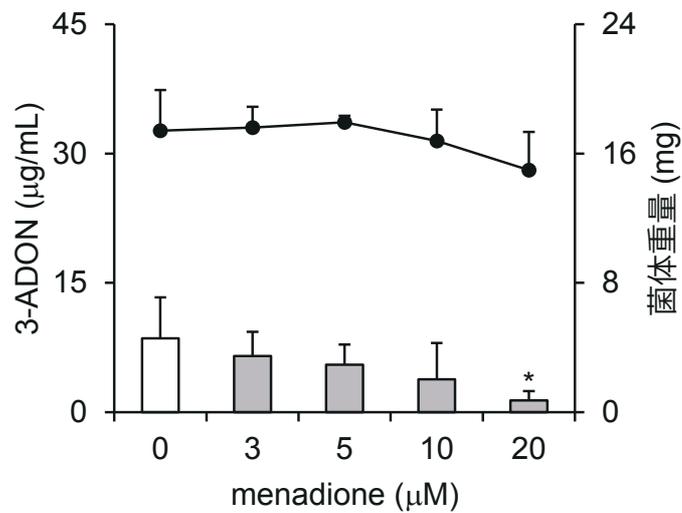
Score は検出されたペプチドの正確性の和として計算される、タンパク質の同定の確からしさを示す。

Coverage はタンパク質の配列のうち検出されたペプチドの占める割合を示す。

(a)



(b)



(c)

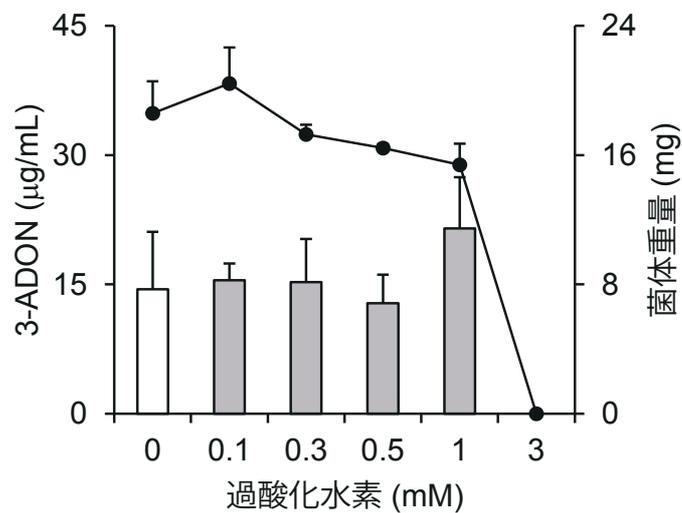


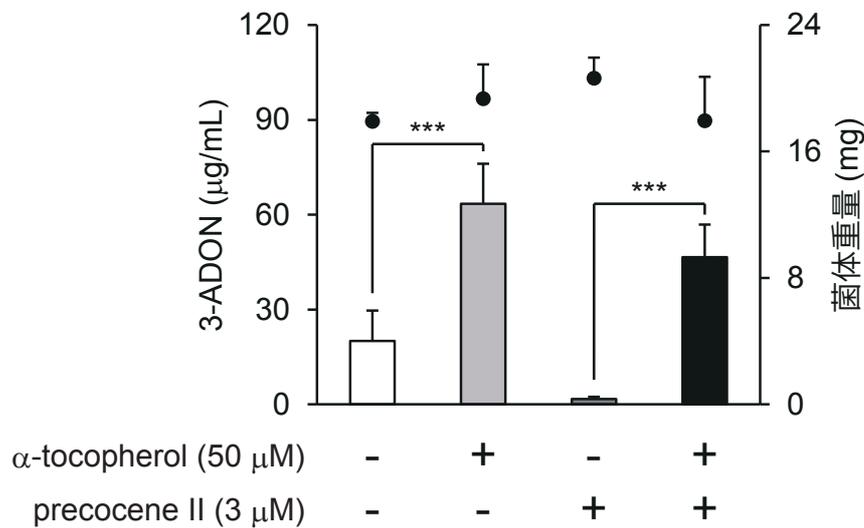
図1-10. 活性酸素関連試薬が*F. graminearum* の3-ADON生産量および菌体重量に与える影響

(a): paraquat, (b): menadione, (c): 過酸化水素

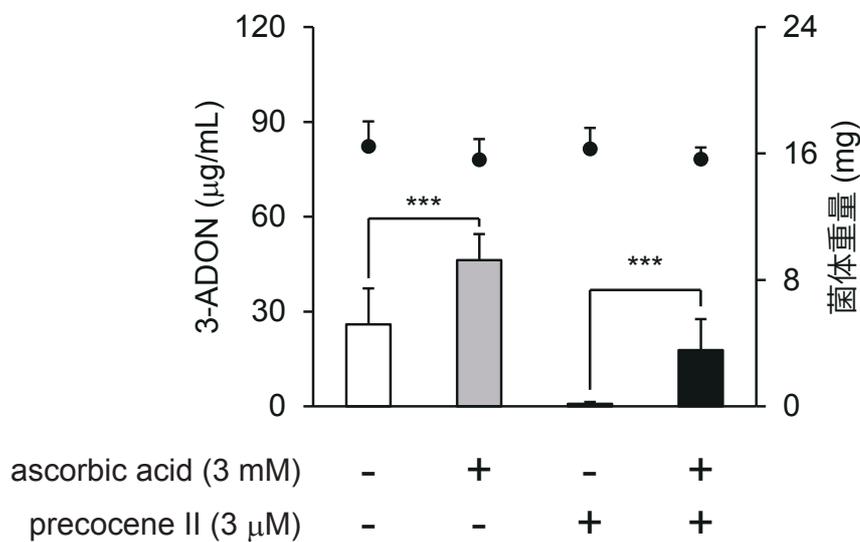
棒: 3-ADON量 折れ線: 乾燥菌体重量

mean + SD,  $n = 4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control, Dunnett test.

(a)



(b)



(c)

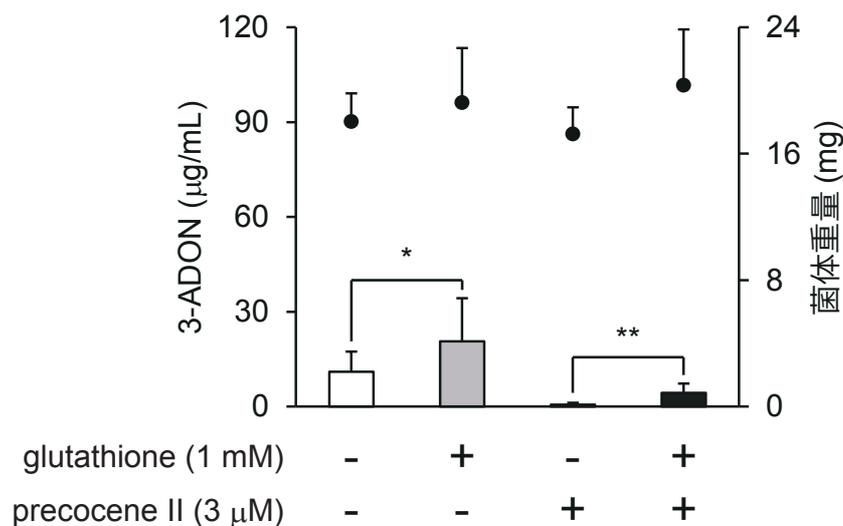


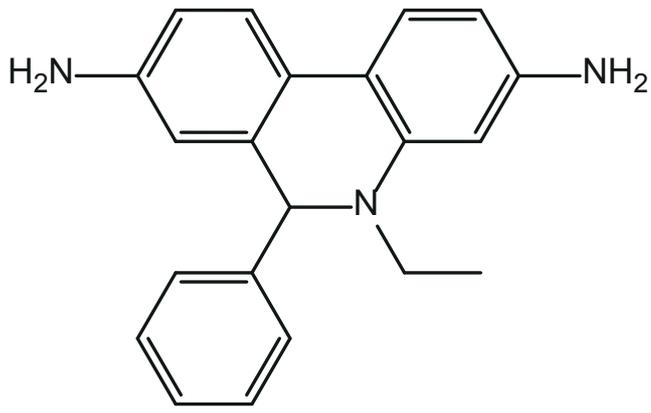
図1-11. 抗酸化物質が*F. graminearum*の3-ADON生産量および菌体重量に与える影響

(a):  $\alpha$ -tocopherol, (b): ascorbic acid, (c): glutathione

棒：3-ADON量 黒点：乾燥菌体重量

mean + SD,  $n \geq 4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$  vs control, t-test.

(a)



(b)

dihydroethidium

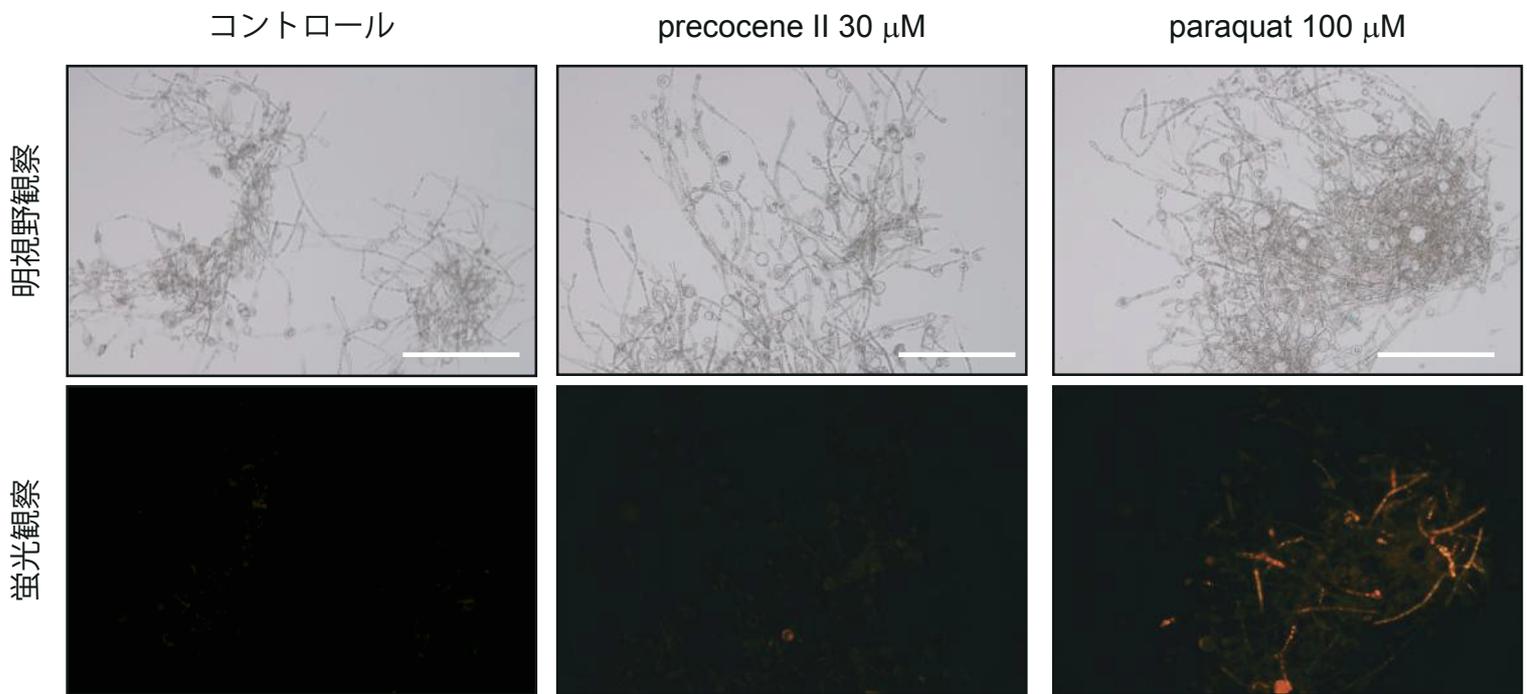


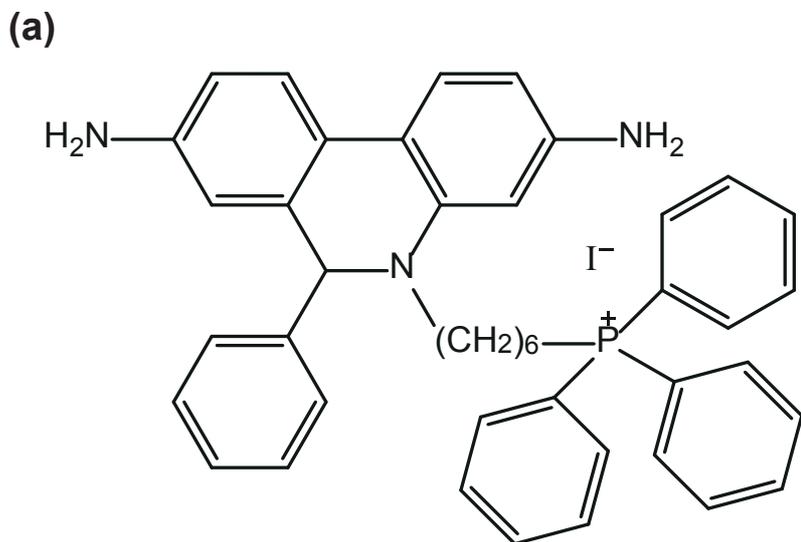
図1-12. スーパーオキシドアニオン検出試薬を用いた蛍光観察

(a): スーパーオキシド検出試薬 dihydroethidium の構造

(b): dihydroethidium を用いたスーパーオキシドの検出

上段は明視野観察像を示し、下段は同じ箇所の蛍光観察像を示す

スケールバー：200  $\mu$ m



**(b)** MitoSOX

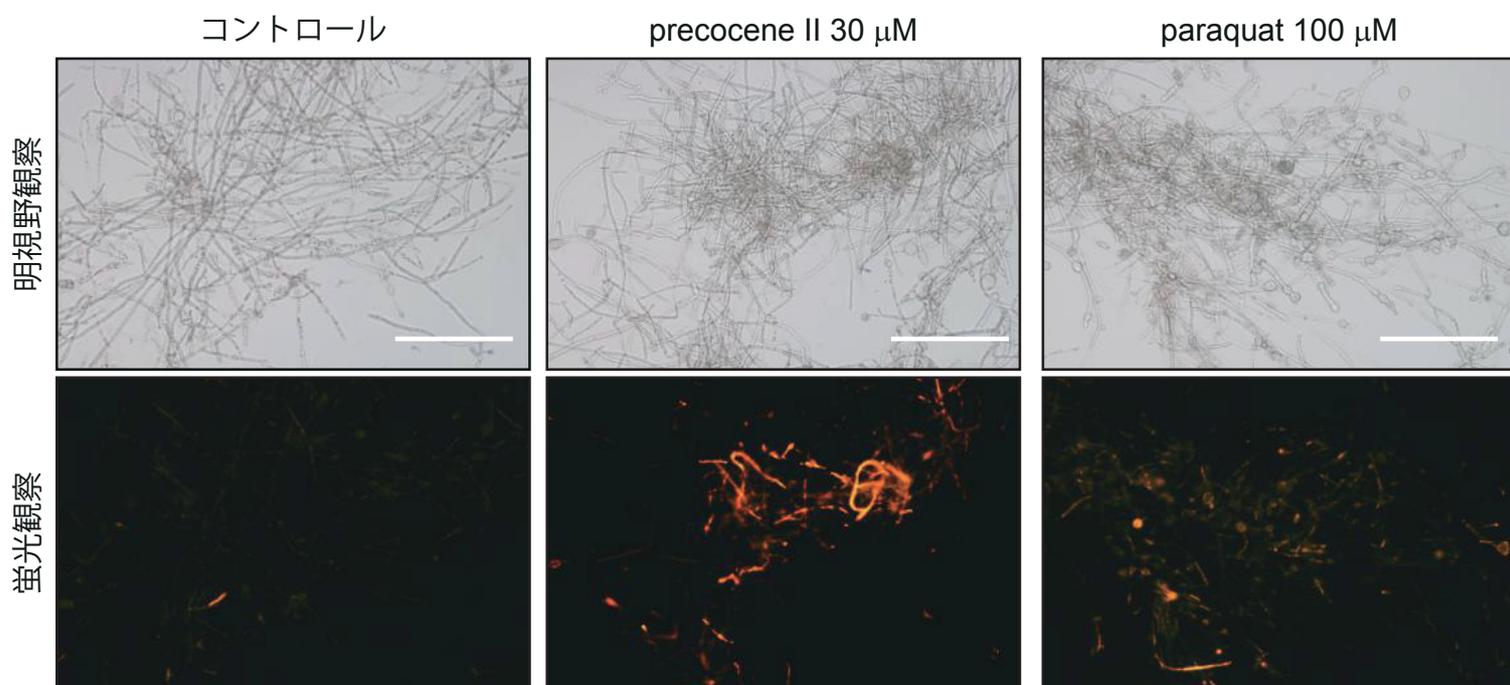


図1-13. ミトコンドリアのスーパーオキシドアニオン検出試薬を用いた蛍光観察

**(a):** ミトコンドリア特異的スーパーオキシド検出試薬 mitoSOX の構造

**(b):** mitoSOX を用いたスーパーオキシドの検出

上段は明視野観察像を示し、下段は同じ箇所の蛍光観察像を示す

スケールバー：200  $\mu\text{m}$

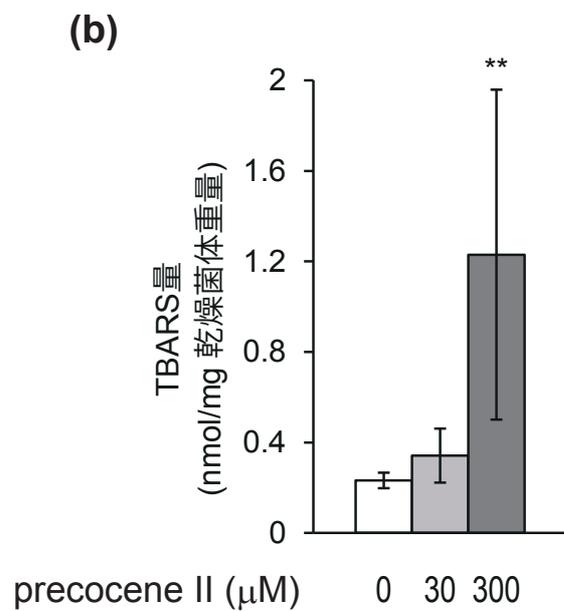
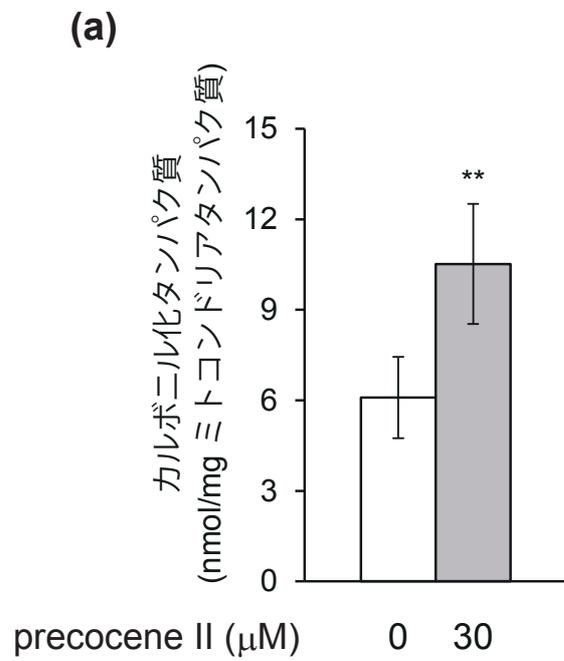


図1-14. precocene II が細胞の酸化ストレスマーカーに与える影響

**(a)**: ミトコンドリアタンパク質のカルボニル化 **(b)**: 乾燥菌体の TBA 反応物量

mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\*  $P < 0.01$ , vs control, t-test **(a)** or Dunnett test **(b)**.

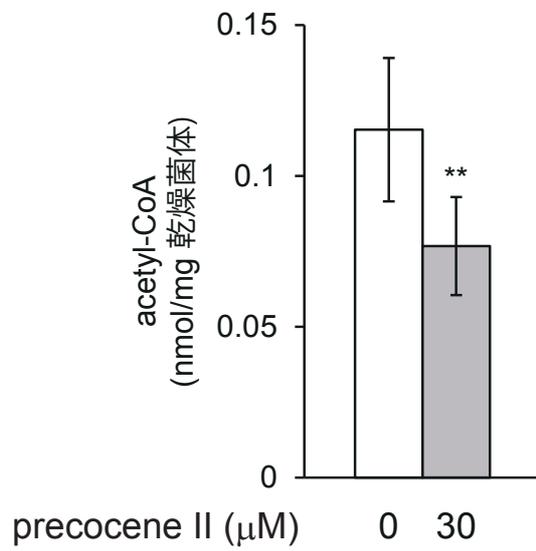


図1-15. precocene II が菌体のアセチルCoA量に与える影響  
mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \*\*  $P < 0.01$ , vs control, t-test.

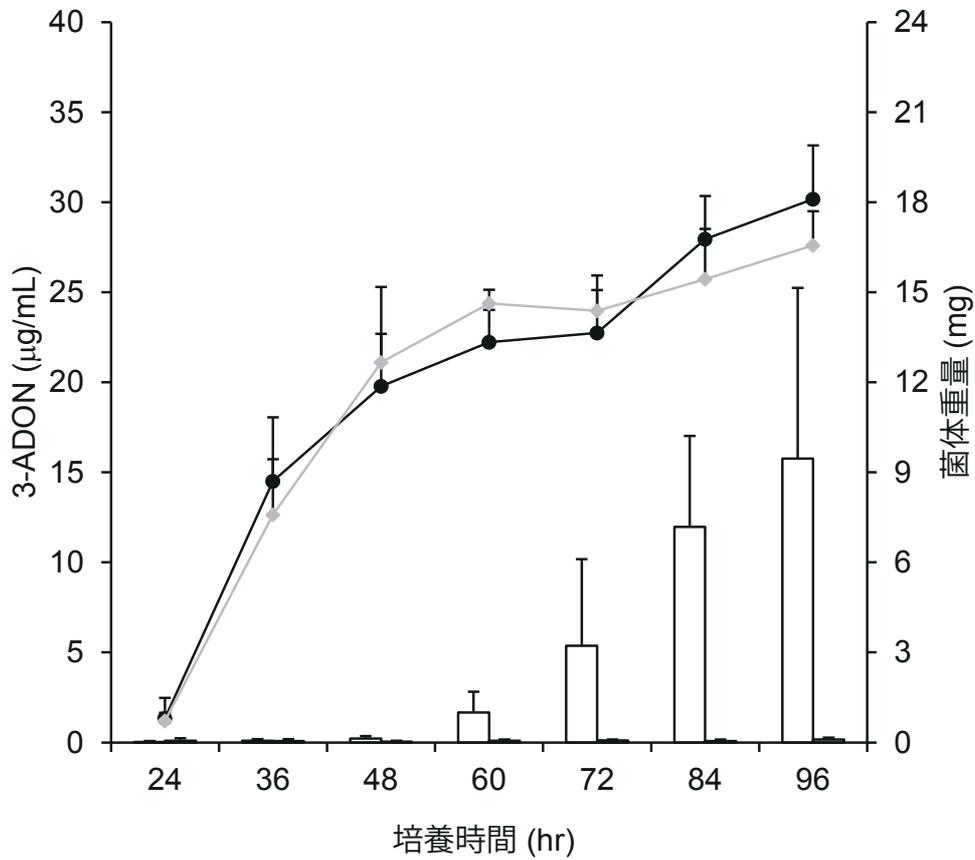


図1-16. 3-ADON生産量の経時変化およびprecocene II 添加が与える影響

白棒：3-ADON 量 ( 薬剤なし )、灰色棒：3-ADON 量 (precocene II 30 µM)

黒点：乾燥菌体重量 ( 薬剤なし )、灰色点：乾燥菌体重量 (precocene II 30 µM)

mean + SD,  $n = 6$ .

(precocene II 添加により3-ADON生産量は検出限界程度になるため、黒棒はほぼ見えない)

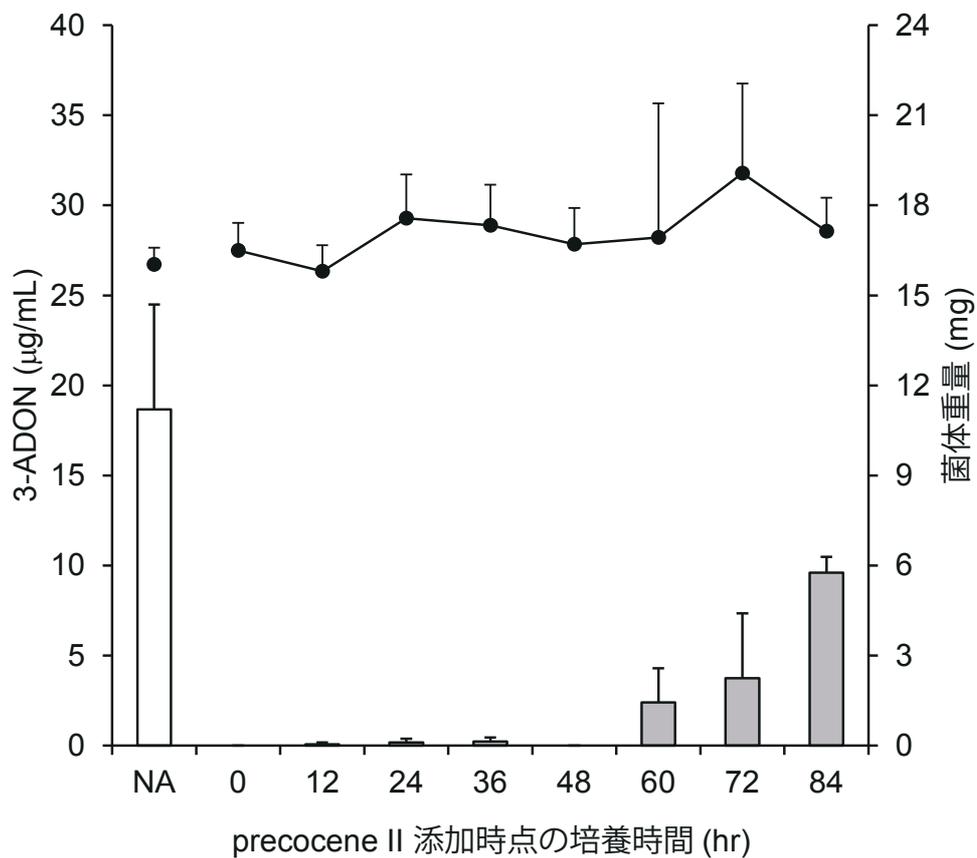


図1-17. 時間を変えて添加した場合にprecocene II が3-ADON生産に与える影響

棒：3-ADON 量 黒点：乾燥菌体重量

横軸に示す培養時間の時点で precocene II を終濃度 30 µM で添加

NA：precocene II添加なし

mean + SD,  $n = 3$ .

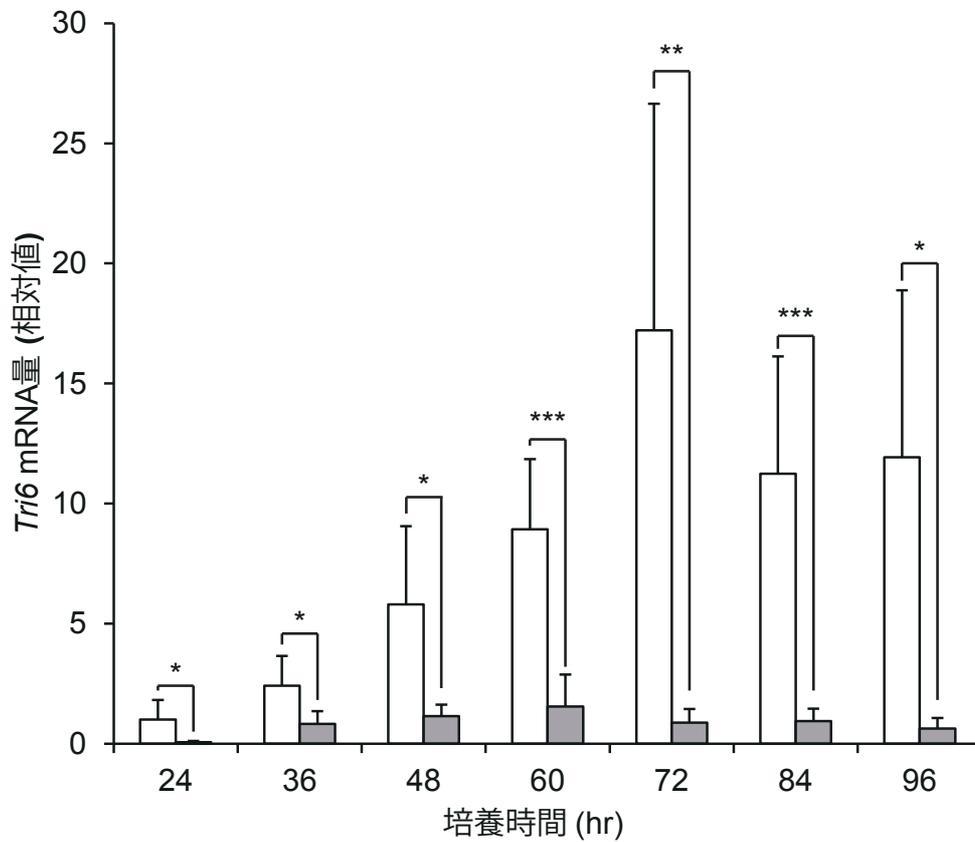


図1-18. *Tri6* 発現量の経時変化とprecocene II 添加が与える影響

白棒：*Tri6* mRNA 量 (薬剤なし)

灰色棒：*Tri6* mRNA 量 (precocene II 30 μM)

mean + SD,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , vs control, t-test

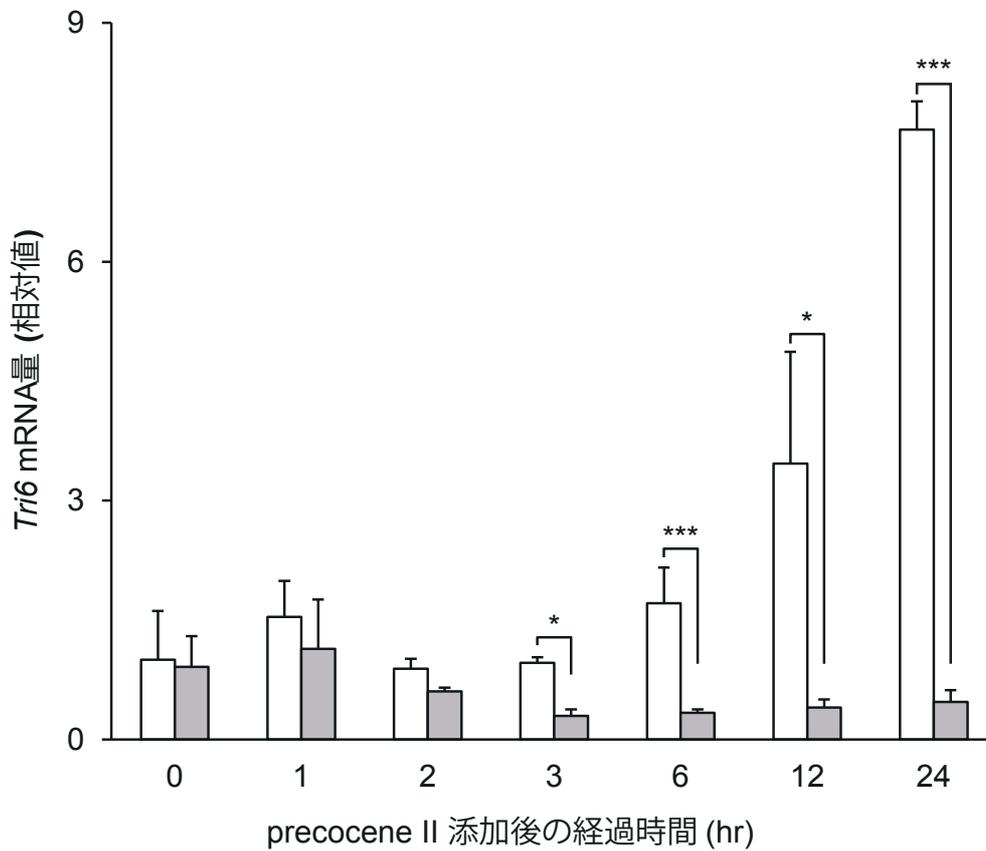
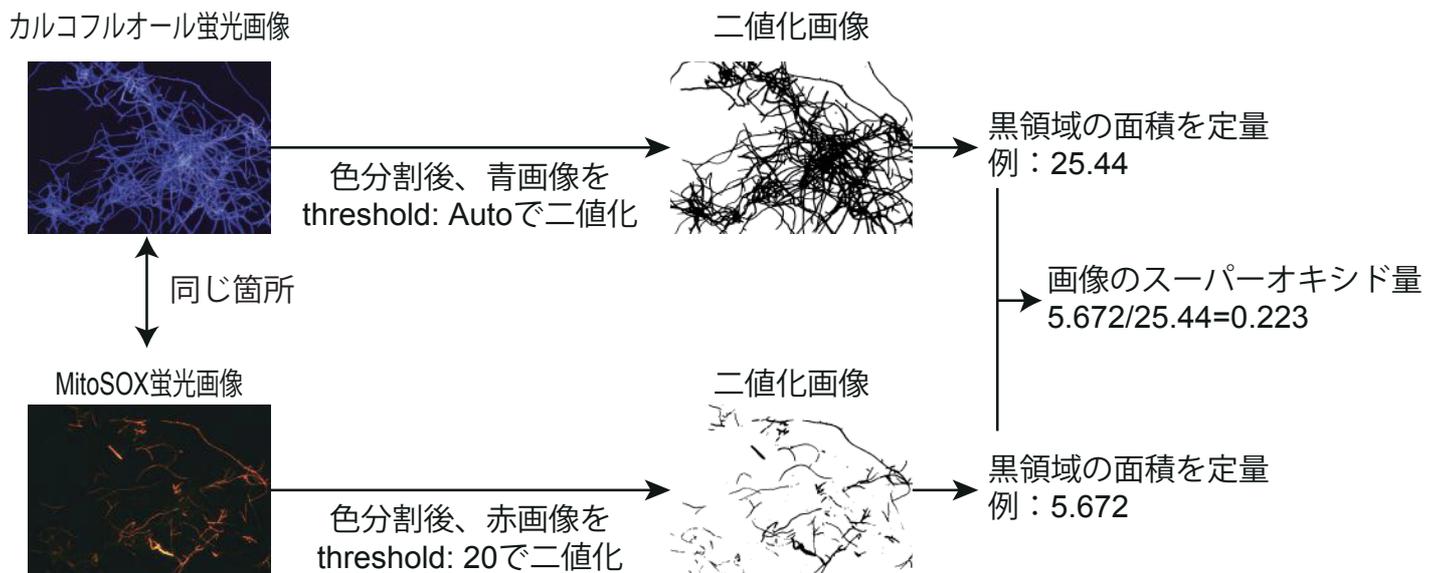


図1-19. 培養48時間目に添加したprecocene II が *Tri6* 発現量に与える影響  
 白棒： *Tri6* mRNA 量 ( 薬剤なし )  
 灰色棒： *Tri6* mRNA 量 (precocene II 30 μM)  
 mean + SD,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , vs control, t-test

(a)



(b)

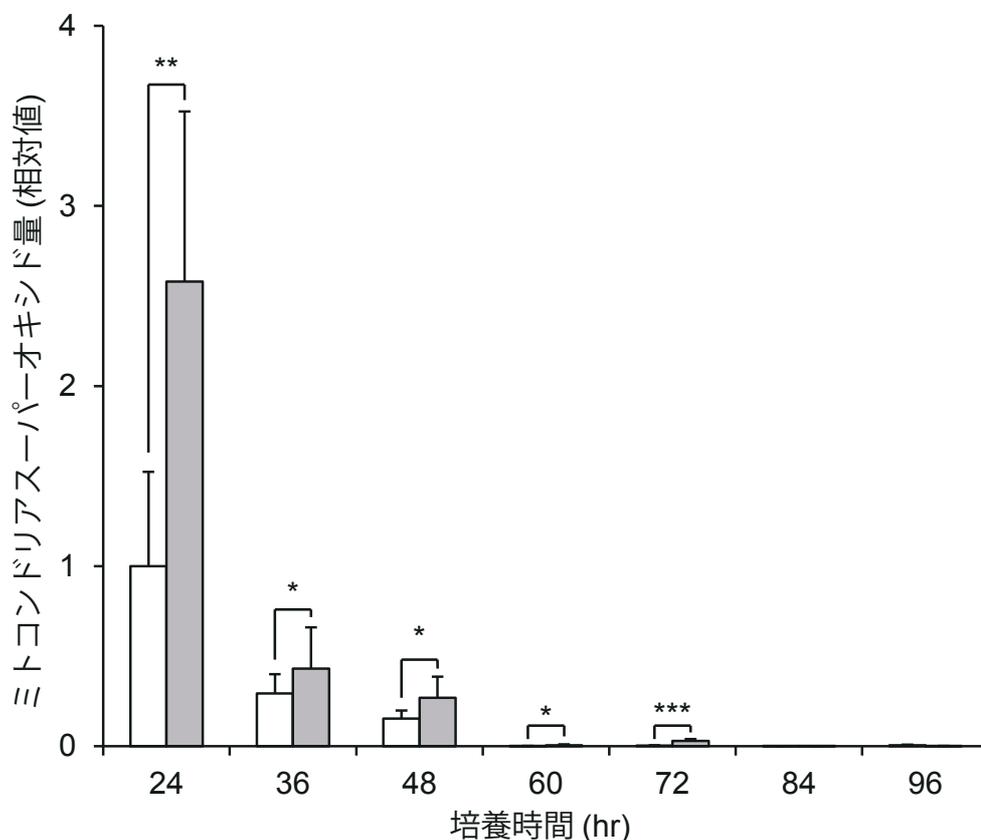


図1-20. 蛍光画像を用いたミトコンドリアスーパーオキシドの定量と経時変化

(a): 2種類の蛍光画像を用いたミトコンドリアスーパーオキシドの定量法の概要

(b): ミトコンドリアスーパーオキシド量の経時変化と precocene II が与える影響

24時間、薬剤なしの値を1とした相対値を表示

白棒：ミトコンドリアスーパーオキシド量 (薬剤なし)

灰色棒：ミトコンドリアスーパーオキシド量 (precocene II 30  $\mu$ M)

mean + SD,  $\geq 6$  photos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , vs control, t-test

<i>F. graminearum</i> VDAC	1	MSVPAFSDIAKPANDLLNKDFYHLSATTFEFKDTAPNGVAFKVTGK-SSHEKATSAAIEG	59
		..   ..            ... . .. ..  .  ...  . . .  ... .	
<i>S. cerevisiae</i> VDAC	1	MSPPVYSDISRININDLLNKDFYHATPAAFDVQTTTANGIKFSLKAKQPVKDGPLSTNVEA	60
<i>F. graminearum</i> VDAC	60	KYTDKPTGLTTLTQTWNTANALDTKIEVADSLAKGLKLEGLFNFLPATAAKGAKFNLHFKQ	119
		.  .    .    .    .    .   .  .     .. ..  ...    .   .   .	
<i>S. cerevisiae</i> VDAC	61	KLNDKQTGLGLTQGWSNTNNLQTKLEFAN-LTPGLK-NELITSLTPGVAKSAVLNNTTFTQ	118
<i>F. graminearum</i> VDAC	120	PGFHGRAFFDL-LKGPVANVDAVVGHEGFLAGASAGYDANKAALTAYSAAVGYAAPQYSA	178
		. .        .     ...   ...  .     . ....  .  ..    .	
<i>S. cerevisiae</i> VDAC	119	PFFTARGAFDLCLKSPTFVGDLTMAHEGIVGGAIEFGYDISAGSISRYAMALSIFYAKDYSL	178
<i>F. graminearum</i> VDAC	179	AITASDNLSVFAASYHVKVNSQVEAGAKATWNSK-TGNAVGLEVASKYRIDPVSFTKVKI	237
		.   ... . .....  . ...      .  . .... ..   ..   .   . .  .	
<i>S. cerevisiae</i> VDAC	179	GATLNNE-QITTVDFQNVNAFLQVGAKATMNCKLPNSNVNIEFATRYLPDASSQVKAKV	237
<i>F. graminearum</i> VDAC	238	NDRGIAALAYNVLLREGVTLGLGGSFDTQKLDQATHKLGASFTFEG	283
		. .  ..   .          . .   .   ...     .. ..	
<i>S. cerevisiae</i> VDAC	238	SDSGIVTLAYKQLLRPGVTLGVGSSFDAKLSLSEPVHKLGSLSFDA	283

図1-28. *F. graminearum* のVDACと*S. cerevisiae* のVDACのアミノ酸配列の比較

縦棒は同一のアミノ酸、点は性質の似たアミノ酸を示す。

配列の Identity: 120/286 (41%), Similarity: 234/286 (81%)

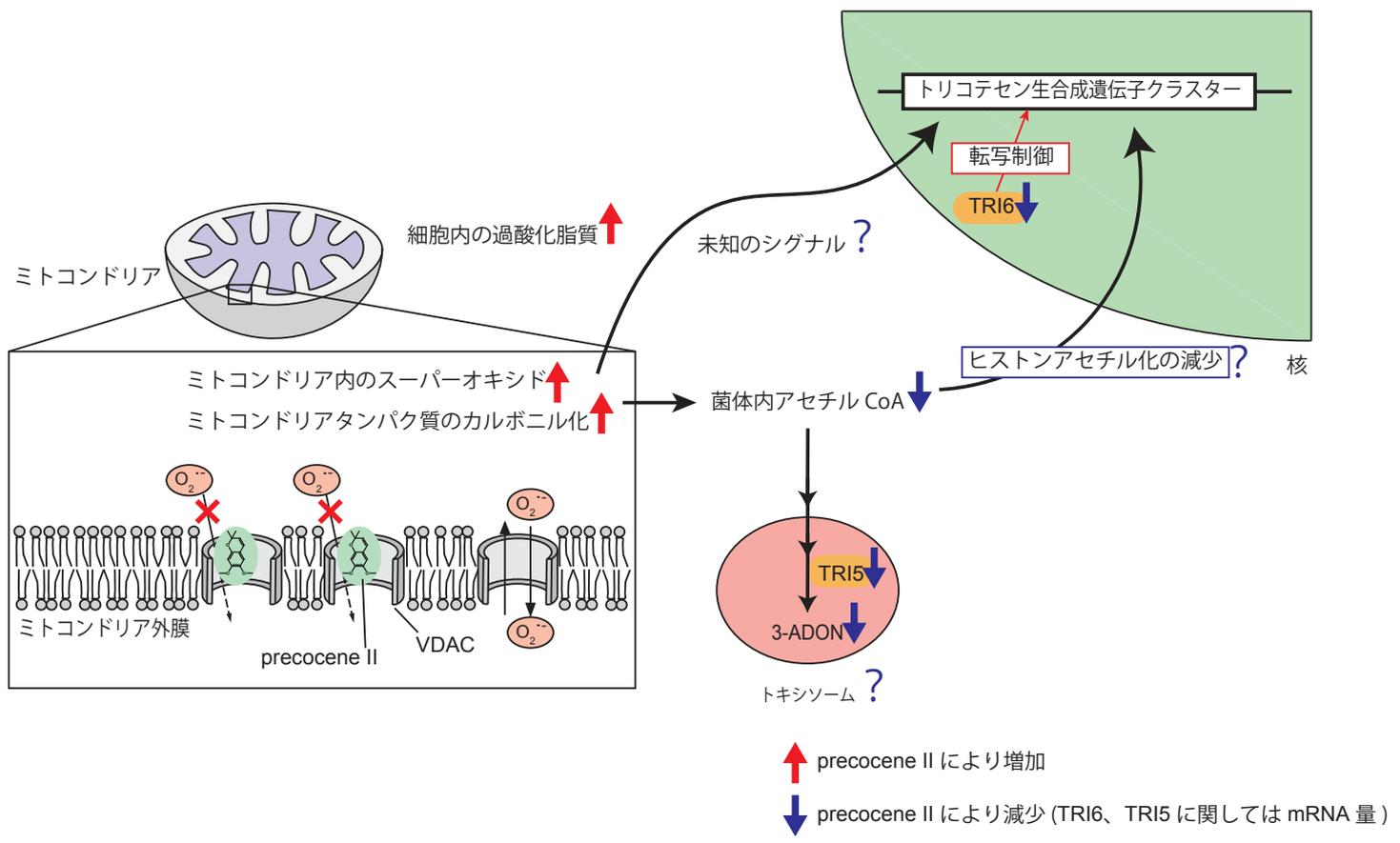


図1-29. precocene II の推定作用機構

## 実験の部

### 試薬

試薬は断らない限り、関東化学の特級品、Sigma-Aldrich、ナカライテスクまたは和光純薬工業の製品を用いた。

### 本文中で省略した各種溶液の組成

CMC 培地 : 1.5% carboxymethyl cellulose, 0.1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Bacto™ yeast extract (BD)

SYEP 液体培地 : 5% sucrose, 0.1% Bacto™ yeast extract (BD), 0.1% Bacto™ peptone (BD)

細胞破碎バッファー : 250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.2 mM EDTA

TNE バッファー : 1% Nonidet-P40, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA  
使用時に protease inhibitor cocktail for yeast を終濃度 1% で加えた。

2xSDS サンプルバッファー : 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.02% BPB, 4% SDS, 20% glycerol, 200 mM DTT

1xSDS サンプルバッファー : 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.01% BPB, 2% SDS, 10% glycerol, 100 mM DTT

1xSDS 泳動バッファー : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS

CBB 染色液 : 0.1% CBB R-250, 30% methanol, 10% acetic acid

CBB 脱色液 : 20% methanol, 5% acetic acid

Western blotting 用転写バッファー:

A 液: 300 mM Tris, 0.05% SDS, 20% methanol

B 液: 25 mM Tris, 0.05% SDS, 20% methanol

C 液: 25 mM Tris, 0.05% SDS, 40 mM 6-aminohexanoic acid, 20% methanol

TBS: 50 mM Tris, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl (pH 7.5)

T-TBS: 上記 TBS に Tween-20 を終濃度 0.05% で加えたもの

ビーズ結合バッファー : 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2

mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 0.1% Nonidet P-40

SOC 培地: 2% Bacto™ trypton (BD), 0.5% Bacto™ yeast extract (BD), 10 mM NaCl, 166 mM NaOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucose

LB 液体培地: 1% Bacto™ trypton (BD), 1% NaCl, 0.5% Bacto™ yeast extract (BD)

LB 寒天培地: 1% Bacto™ trypton (BD), 1% NaCl, 0.5% Bacto™ yeast extract (BD), 2% agar  
プラスミド調製試薬

Solution I: 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA

Solution II: 0.2 M NaOH, 1% SDS

Solution III: 5 M potassium acetate (pH 4.8)

TE バッファー: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA

PBS: 10 mM potassium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl

His 結合バッファー: 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 500 mM NaCl, 8 M urea, 0.1% Nonidet P-40, 10 mM imidazole

His 溶出バッファー: 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 500 mM NaCl, 8 M urea, 0.1% Nonidet P-40, 500 mM imidazole

3.5 mM SDS/30 mM DDM バッファー: 3.5 mM SDS, 30 mM *n*-dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM), 20 mM HEPES-NaOH pH 7.2

YPD 液体培地: 1% Bacto™ yeast extract (BD), 2% Bacto™ peptone (BD), 2% glucose

Tris-SO<sub>4</sub> バッファー: 100 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 9.4), 10 mM DTT

ソルビトールバッファー: 1.2 M sorbitol, 20 mM potassium phosphate (pH 7.4)

酵母破碎バッファー: 0.6 M sorbitol, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% protease inhibitor cocktail

RIPA バッファー: 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM HEPES-KOH (pH 7.2), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% protease inhibitor cocktail

DNPH 溶液: 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), 2 M HCl

グアニジン塩酸塩溶液: 6 M guanidine hydrochloride, 2 M HCl

TBARS アッセイ溶液: 0.3% thiobarbituric acid (TBA), 0.01% dibutylhydroxytoluene, 5%

SDS, 7.4% acetate-NaOH (pH 3.5)

核溶解バッファー : 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM EDTA pH 8.0, 2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)

DNA 単離バッファー : 350 mM sorbitol, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA

DNA 抽出バッファー : 上記の核溶解バッファー、DNA 単離バッファー、5% N-lauroylsarcosine sodium 水溶液を 1:1:0.4 で混合

YEPD 液体培地 : 2% glucose, 1% Bacto™ peptone (BD), 0.3% Bacto™ yeast extract (BD)

1x STC : 1.2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM CaCl<sub>2</sub>

1x PTC : 1x STC にポリエチレングリコール 4000 を終濃度 40% で溶解し、フィルターろ過したもの

TB3 溶液 : 0.3% Bacto™ yeast extract (BD), 0.3% casamino acids (BD), 10% sucrose

TB3 アガロース : 上記 TB3 溶液に低融点アガロースを 0.7% で含むもの

V8 ジュース寒天培地 : 20% V8® vegetable and fruit juice (Cambell's), 0.2% CaCO<sub>3</sub>, 1.5% agar

mung豆培地の調製: 40 g mung豆 (GABAN) を 750 mL 超純水中で 30 分間煮沸し、ろ過したろ液を超純水で 1 L にし、15 g agar を加えてオートクレーブした。

TBE バッファー : 89 mM Tris borate (pH 8.3), 2 mM EDTA

変性溶液 : 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

中和溶液 : 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl

20x SSC : 3 M NaCl, 300 mM sodium citrate (pH 7.0)

10x SSC : 1.5 M NaCl, 150 mM sodium citrate (pH 7.0)

2x SSC : 0.3 M NaCl, 30 mM sodium citrate (pH 7.0)

低ストリンジェンシーバッファー : 0.1% SDS, 2x SSC

高ストリンジェンシーバッファー : 0.1% SDS, 0.5x SSC

洗浄バッファー : 0.1 M malate (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 0.3% tween-20

ブロッキング溶液 : 2% blocking reagent (Roche Molecular Systems), 0.1 M malate (pH 7.5), 0.15 M NaCl

検出バッファー：0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1 M NaCl

5x YEG 寒天培地：0.5% Bacto™ yeast extract (BD), 2% glucose, 1.5% agar

complete medium (CM) 寒天培地：3% sucrose, 0.25% casamino acids (BD), 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 1% MEM Vitamin Solution (100X) (Thermo Fisher Scientific), 0.1% Bacto™ yeast extract (BD), 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, 0.05% KCl, 0.02% trace element solution\*, 1.5% agar

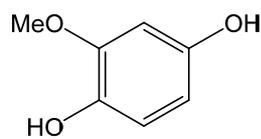
\*trace element solution：5% citric acid, 5% ZnSO<sub>4</sub>, 1% Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0.25% CuSO<sub>4</sub>, 0.05% MnSO<sub>4</sub>, 0.05% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05% Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>

以下の 1. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの調製、2. *F. graminearum* の孢子懸濁液の調製、3. *F. graminearum* の細胞小器官の粗分画、6. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを用いた precocene II 結合タンパク質の精製、7. precocene II 結合タンパク質の同定は修士論文の記述を改変して記載した。

## 1. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの調製

### 1-1. vanilline から化合物 **1** に至る化合物の合成

合成はスキーム 1-1 に示すように行った。反応の経過は TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub> (Merckmillipore)で確認した。

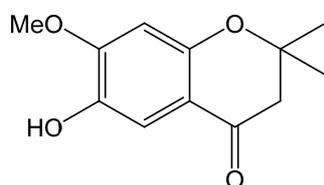


**2**

vanilline (東京化成工業) 6g (1 eq)、30%過酸化水素 8.9 mL (2.2 eq)、二酸化セレン 0.35 g (0.08 eq)を氷冷下ジクロロメタン 100 mL 中で2時間攪拌混合し、その後室温で6時間攪拌した。反応液を濾過後、ろ液に100 mLの蒸留水を加えて分液した。ジクロロメタン層を10% NaHSO<sub>3</sub> (ナカライテスク)水溶液 100 mL で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで一晩脱水した。脱水後の溶液に全量が約 100 mL になるようジクロロメタ

ンを加え、6 M NaOH 20 mL (3 eq)を加えて 20 分間攪拌した。反応後、蒸留水 100 mL を加えて分液し、水層を回収して 6 M HCl により pH 4.5 に調整した。調整後酢酸エチルにより分液して有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで一晩脱水後エバポレーターにより濃縮した。濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、**2** を 1.3 g 得た(29.7%)。クロマトグラフィーは、シリカゲル Wakosil C-200 (Wako) 150 g、酢酸エチル：*n*-ヘキサン (15：85)で行った。

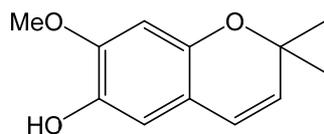
$\delta_{\text{H}}$ (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : 6.76 (1H, d, *J*=8.25 Hz), 6.45 (1H, d, *J*=2.75 Hz), 6.32 (1H, dd, *J*=8.25 and 2.75 Hz), 3.85 (3H, s)



**3**

**2** 1.16 g (1 eq)、3-メチルクロトン酸(東京化成工業)912 mg (1.1 eq)、ポリリン酸(Across Organics) 2.204 g を 300 mL のナスフラスコにとり、薬さじを用いてよく攪拌混合した。オートクレーブを用いて 110°C で 20 分間反応させた。室温に冷却後、100 mL の飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルにより分液して有機層を回収し無水硫酸ナトリウムにより脱水した。エバポレーターにより濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーにより **3** を 567 mg 得た(31.3%)。クロマトグラフィーは、シリカゲル 25 g、酢酸エチル：*n*-ヘキサン (15：85)で行った。

$\delta_{\text{H}}$ (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : 6.55 (1H, s), 5.85 (1H, s), 3.80 (3H, s), 2.63 (2H, s), 1.30(6H, s)



**1**

**3** 567 mg (1 eq)、LiAlH<sub>4</sub> 126 mg (1.3 eq)、有機合成用 THF 27 mL を混合し、窒素存

在下で 6 時間還流させた。反応液に氷上で 15% NaOH 水溶液 2 mL、蒸留水 100 mL を加えて反応を停止させた。反応液を濾過後、酢酸エチルによる分液を行って有機層を回収し、無水硫酸ナトリウムで一晩脱水した。エバポレーターで濃縮後、THF 20 mL、4 M HCl 1 mL を加えて室温で 30 分間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 100 mL を加えて反応を停止し、酢酸エチルで分液後有機層を回収して無水硫酸ナトリウムで脱水した。濃縮後、シリカゲルクロマトグラフィーにより **1** を 390 mg 得た(74.2%)。クロマトグラフィーは、シリカゲル 30 g、酢酸エチル：*n*-ヘキサン (15 : 85)で行った。

$\delta_{\text{H}}$ (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) : 6.58 (1H, s), 6.40 (1H, s), 6.22 (1H, d, *J*=9.46 Hz), 5.49 (1H, d, *J*=9.46 Hz), 3.85 (3H, s), 1.42 (6H, s)

#### 1-2. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの調製

FG<sup>®</sup> beads Linker beads (多摩川精機株式会社) を用い、ホームページ上に公開されているプロトコルに従い precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの調製を行った。リンカービーズ 2.5 mg を 1.5 mL チューブにとり、15,000 x g、5 分間の遠心分離を行い、上清を破棄した。DMF 500  $\mu$ L を添加し、超音波洗浄機を用いてビーズを分散させ、15,000 x g、5 分間の遠心分離を行い、上清を破棄した。この DMF による洗浄操作をさらに 2 回繰り返した。化合物 **1** を 50 mM の濃度で含んだ DMF 溶液 500  $\mu$ L を加え、超音波によりビーズを分散させた。35 mg の K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加え、遮光して 60°C で 24 時間振盪した。15,000 x g、5 分間の遠心分離を行い、上清を破棄した。50% DMF 500  $\mu$ L を添加し、超音波洗浄機を用いてビーズを分散させ、15,000 x g、5 分間の遠心分離を行い、上清を破棄した。この 50% DMF による洗浄を更に 1 回繰り返した。蒸留水 500  $\mu$ L により、同様の洗浄操作を行い、更に 50% MeOH による洗浄操作を 3 回行った。50% MeOH 100  $\mu$ L にビーズを分散させて、4°C で保存した。

## 2. *F. graminearum* の孢子懸濁液の調製

本章では、3-ADON 生産菌として *F. graminearum* MAFF101551 株を使用した。*F. graminearum* を CMC 液体培地 100 mL に植菌し、26.5°C、180 rpm の振盪培養機上で 5 日間培養した。培養後 Miracloth (Merckmillipore) によりろ過し、ろ液中の孢子数を血球計数盤により測定した。2,500 x g の遠心分離により孢子を沈殿させ、20% グリセロールに  $10^5$  spore/ $\mu$ L になるように懸濁して -80°C で保存した。

## 3. *F. graminearum* の細胞小器官の粗分画

100 mL の SYEP 液体培地に 2 で調製した孢子懸濁液を加え、28°C で一晚培養した。培養した菌体を Miracloth (Merckmillipore) によりろ過して回収し、プロトプラスト化溶液 (100 mg Yatalase (TaKaRa)、100 mg Glucanex<sup>®</sup>、5 mL 1.5 M NaCl) を加えて 28°C で 3 時間インキュベート後、900 x g の遠心分離によりプロトプラストを沈殿として回収した。プロトプラストを 3 mL の細胞破碎バッファーに懸濁し、懸濁液をポッターエルベジエム型ホモジナイザーに移し、氷上で手動により細胞を破碎した。懸濁液を 900 x g、4°C、10 分間遠心し、上清と沈殿を分離した。沈殿には 400  $\mu$ L の TNE バッファーを加えて懸濁させ、15,000 x g、4°C、10 分間遠心分離した上清を回収して核・未破碎細胞画分抽出タンパク質とした。900 x g の遠心分離の上清は別の 1.5 mL チューブに回収し、10,000 x g、4°C、10 分間遠心して上清と沈殿を分離した。上清は別の 1.5 mL チューブにとって細胞質基質タンパク質とした。沈殿には 100  $\mu$ L の TNE バッファーを加えて懸濁させ、4°C で 1 時間ローテーターにより転倒攪拌したのち、15,000 x g、4°C、10 分間遠心分離の上清を回収してミトコンドリア画分抽出タンパク質とした。Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) により、BSA をスタンダードとして溶液のタンパク質濃度を定量した。

## 4. SDS-PAGE

電気泳動を行うタンパク質サンプルが水溶液である場合、等量の 2x SDS サンプルバッファーを加えて混合し、5 分間煮沸した。サンプルが沈殿物である場合、沈殿に

1x SDS サンプルバッファーを加えてボルテックスにより混合して溶解させ、5 分間煮沸して泳動に供した。分離ゲルのアクリルアミド濃度が 10% のものを作製した。以下に組成を示す。

分離ゲル (アクリルアミド濃度 10%)

30% アクリルアミド/	3.3 mL
0.8% <i>N,N'</i> -メチレンビスアクリルアミド水溶液	
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 mL
超純水	4.1 mL
10% APS 水溶液	50 $\mu$ L
TEMED	7 $\mu$ L
合計	10 mL

濃縮ゲル (アクリルアミド濃度 4%)

30% アクリルアミド/	0.65 mL
0.8% <i>N,N'</i> -メチレンビスアクリルアミド水溶液	
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 mL
超純水	3.05 mL
10% APS 水溶液	25 $\mu$ L
TEMED	7 $\mu$ L
合計	5 mL

分子量マーカーとして Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range (BIO-RAD) を用いた。泳動はゲル 1 枚の場合 20 mA の定電流、2 枚の場合 40 mA の定電流で 1x SDS 泳動バッファー中で行った。

銀染色を行う場合、SilverQuest™ Silver Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて製品付属のプロトコルに従いゲルを染色した。CBB 染色を行う場合、CBB 染色液を用いて室温で 30 分間振盪して染色後、染色液を CBB 脱色液に入れ換え、バックグ

ラウンドが十分に脱色されるまで室温で振盪した。ウェスタンブロッティングを行う場合、ゲルをそのまま転写に供した。

## 5. ウェスタンブロッティング

使用した一次抗体および二次抗体のメーカー、製品番号および希釈濃度を記す；抗シトクロム c 抗体 (マウスモノクローナル, Abcam, ab110325, 1/5000), Anti-6×Histidine 抗体 (マウスモノクローナル, BioDynamics Laboratory, F008, 1/1000), HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 二次抗体 (ThermoFisher Scientific, 32430, 1/2000)

Western blotting 用転写バッファー A 液、B 液、C 液にブロッティング用ろ紙 (ATTO) をそれぞれ 2 枚、1 枚、3 枚ずつ浸し、ブロッティング用 PVDF 膜 (ATTO) をメタノールに 1 分間浸したのち Western blotting 用転写バッファー B 液に 30 分以上振盪させながら浸した。SDS-PAGE 後のゲルをとり、ブロッティング装置の陰極側から C 液に浸したろ紙 3 枚、ゲル、PVDF 膜、B 液に浸したろ紙 1 枚、A 液に浸したろ紙 2 枚の順で重ね、100 mA 定電流で 1 時間通電した。転写後の膜を T-TBS で洗浄後、5% スキムミルク/TBS-T を加え室温で 1 時間振盪した。液を破棄し、一次抗体を上記の濃度で含んだ 5% スキムミルク/TBS-T に膜を入れ、4°C で一晩または室温で 2 時間振盪した。液を破棄し、TBS-T で 3 回洗浄したのち、二次抗体を上記の濃度で含んだ 5% スキムミルク/TBS-T に入れ、4°C で一晩または室温で 2 時間振盪した。液を破棄し、TBS-T で 5 回洗浄したのち、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare) の混合液を膜にかけ ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare) により化学発光を検出した。

## 6. precocene II 固定化ナノ磁気ビーズを用いた precocene II 結合タンパク質の精製

1-2 で調製したビーズを 0.2 mg 分 1.5 mL チューブにとり、ビーズ結合バッファーを 300  $\mu$ L 加え、チューブを上下に振ってビーズを分散させた。磁気によりビーズをチューブの底に集め、上清を破棄した。ビーズ結合バッファーによる洗浄を更に 2 回行った。3 で調製した抽出タンパク質 1 mg を含むビーズ結合バッファー 300  $\mu$ L をビーズに加え、ビーズを分散させて、4°C で 4 時間ローテーターにより転倒攪拌した。

4 時間後、磁気によりビーズを分離し、上清を破棄した。ビーズ結合バッファーを 300  $\mu\text{L}$  加え、チューブを上下に振ってビーズを分散させ、磁気によりビーズを分離して上清を破棄した。ビーズ結合バッファーによる洗浄を更に 2 回繰り返した。洗浄後の上清を回収した後のビーズに、5 mM の precocene II を含む 300  $\mu\text{L}$  のビーズ結合バッファーを加え、4°C で 1 時間ローテーターにより転倒攪拌したのち、磁気分離を行い、上清を回収して precocene II 溶出画分とした。precocene II による競合阻害は、抽出タンパク質溶液に precocene II を終濃度 5 mM となるよう加え、4°C で 1 時間ローテーターにより転倒攪拌してからビーズに加えることで行った。

回収した洗浄上清および precocene II 溶出画分に、800  $\mu\text{L}$  のメタノール、200  $\mu\text{L}$  のクロロホルム、600  $\mu\text{L}$  の超純水を加えて混合後、20,000  $\times g$  で遠心分離した。二層に分かれた上層を慎重に破棄したのち、下層に 600  $\mu\text{L}$  のメタノールを加えて混合後、20,000  $\times g$  で遠心分離し、上清を破棄して沈殿を減圧下乾燥させた。沈殿に 1x SDS サンプルバッファーを 50  $\mu\text{L}$  加え、100°C で 5 分加熱して SDS-PAGE に供した。4 で述べた方法により電気泳動後、銀染色を行った。

## 7. precocene II 結合タンパク質の同定

銀染色後、目的のバンドを含むようゲルをメスにより切り出し、1.5 mL チューブに入れ、超純水でよく洗浄した。SilverQuest™ Silver Staining Kit 付属の脱色液により銀染色を脱色し、200  $\mu\text{L}$  のアセトニトリルを加えて 15 分間置いた。上清を破棄し、減圧遠心濃縮機でゲル片を乾燥させたのち、100  $\mu\text{L}$  の還元溶液 (10 mM DTT, 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) を加え 56°C で 1 時間インキュベートした。上清を破棄し、100  $\mu\text{L}$  のアルキル化溶液 (55 mM ヨードアセトアミド, 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) を加え、室温で 45 分置いた。上清を破棄し 200  $\mu\text{L}$  の 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を加え 10 分室温、上清を破棄し 200  $\mu\text{L}$  のアセトニトリルを加え 15 分室温という操作を計 2 回行った。最後のアセトニトリルを除いた後、減圧遠心濃縮機でゲル片を乾燥させ、20  $\mu\text{L}$  のトリプシン溶液 (10 ng/ $\mu\text{L}$  Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade (Promega), 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) を加えゲルを膨潤後、20  $\mu\text{L}$  の 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  を加えて 37°C で一晩静置した。翌日、上清を 1.5

mL チューブに回収した。残ったゲル片に超純水 40  $\mu$ L を加え 20 分間マイクロミキサーで攪拌後、上清を上記チューブに加えた。同様に、20 分間マイクロミキサーで攪拌後上清を上記チューブに加える操作を 0.1% TFA、60% アセトニトリル 40  $\mu$ L、0.1% TFA、80% アセトニトリル 40  $\mu$ L、0.1% TFA、99.9% アセトニトリル 40  $\mu$ L の順番に行った。集めた抽出液を 20,000 x g で遠心分離後、上清を新しい 1.5 mL チューブにとって減圧遠心濃縮機により 10  $\mu$ L 程度に濃縮し、Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific) によりペプチドの分析を行った。機器の操作は東京大学 分子細胞生物学研究所 根岸瑠美博士に依頼した。検出されたペプチド断片からのタンパク質の同定は Proteome Discoverer 1.4 ソフトウェアに搭載されたアルゴリズムにより行われた。ソフトウェアにインプットする配列データとして、*F. graminearum* PH-1 株のゲノム配列からアノテーションされ [110]、Fusarium Comparative Database (Broad Institute) において公開されているタンパク質配列データを用いた。

## 8. His-VDAC の調製

### 8-1. total RNA の抽出および cDNA の合成

SYEP 液体培地 5 mL で培養した *F. graminearum* 菌体をろ過により回収後、液体窒素で凍結し、凍結乾燥機により乾燥させた。乾燥菌体を液体窒素下で粉碎し、Trizol® (ThermoFisher Scientific) 500  $\mu$ L を加えて 1.5 mL チューブにとった。クロロホルム 100  $\mu$ L を加えて混合後、20,000 x g で遠心分離し、回収した上清中の RNA を PureLink® RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific) により精製した。精製した total RNA 1  $\mu$ g を ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) により製品付属のプロトコルに従って逆転写し、cDNA を得た。

### 8-2. 発現用プラスミドベクターの調製

VDAC の配列に *Nco* I 認識部位および *Sal* I 認識部位を付加した下記プライマー；

VDAC F: 5' - GGGCCATGGGATCTGTCCCCGCCTTCTC - 3'

VDAC R: 5' - GGGGTCGACTTAACCCTCGAAGGTGAAGC - 3'

により、8-1 で調製した cDNA をテンプレートとして TaKaRa Ex Taq®を用いて PCR 反応を行った。PCR 溶液の組成および反応条件は製品付属のプロトコルに従った。PCR 産物 50 ng 分と pGEM®-T Easy Vector (Promega) 25 ng を混合し、DNA Ligation Kit (TaKaRa) を用いて一晩 16°C でライゲーション反応を行ったのち、大腸菌 XL-1 blue コンピテントセル (アジレント) の形質転換に用いた。形質転換は以下の手順で行った。コンピテントセルにライゲーション反応液を加え、氷上で 30 分間静置し、42°C のヒートショックを 45 秒間行ったのち氷上で 2 分間静置した。これに SOC 培地を加え、37°C で 1 時間インキュベートしたのち、50 µg/mL アンピシリンナトリウム 30 µL、0.1 M IPTG 30 µL、2% X-gal 30 µL を塗布した LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。

生じたシングルコロニーを爪楊枝でつつき、Go Taq master mix (Promega) および pGEM®-T Easy Vector 由来の 2 種のプライマー；

T7 promoter F: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'

M13 R: 5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3'

を含む PCR 反応液に加えて、PCR 反応を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動に供し、プラスミド内部に目的のインサートが存在するかどうかを確認した。インサートが確認できたコロニーを終濃度 50 µg/µL のアンピシリンを含む LB 液体培地に加え、37°C で一晩培養した。

培養後の大腸菌菌体を遠心分離により回収し、Solution I を加えてボルテックスにより懸濁し、Solution II を加えて穏やかに懸濁後、Solution III を加えて混合し、20,000 x g で遠心分離した。上清を回収し、エタノールおよび 3 M 酢酸ナトリウムを加えて混合後 20,000 x g で遠心分離し、上清を破棄した。沈殿を 70%エタノールで洗浄後、TE バッファーに溶解し、RNase A で処理した。

調製したプラスミドをテンプレートとして BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。プライマーは上記の T7 promoter F および M13 R を用い、反応組成および条件は製品に付属するプロトコルに従った。反応後の産物をエタノール沈殿により精製し、風乾後、シーケンス

解析に供した。サンプルのシーケンス解析は株式会社ファスマックに委託した。

正確な塩基配列のインサート DNA の挿入が確認されたプラスミドについて、*Nco*I および *Sal*I で処理した。N 末端に 6x ヒスチジンタグが導入された組換えタンパク質を調製するためのプラスミドベクターとして、pPROEX HTb vector (Invitrogen) を用い、同様に *Nco*I および *Sal*I で処理した。これらの制限酵素処理産物をアガロースゲル電気泳動に供し、泳動後のゲルから目的の DNA 断片を含むようゲルの切り出しを行ったのち、QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA 断片を抽出した。抽出後のインサート DNA およびプラスミド DNA のライゲーションのため、Ligation Kit (TaKaRa) を用いて一晩 16°C でライゲーション反応を行ったのち、上記の方法と同様に大腸菌 XL-1 blue コンピテントセルの形質転換を行った。形質転換後の培養、インサートチェック、プラスミドの抽出は上記の方法と同様である。ただし、形質転換後の培養は 50 µg/mL アンピシリンナトリウム 30 µL を塗布し、IPTG および X-gal を塗布していない LB 寒天培地で行った。これにより、発現用プラスミドベクターを調製した。

### 8-3. 発現の条件検討

8-2 で調製した発現用プラスミドベクターにより、発現用大腸菌コンピテントセル BL21 (DE3) の形質転換および培養を上記と同様の方法により行った。生育したシングルコロニーを 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 液体培地に加え、37°C で一晩培養し前培養液とした。前培養液を 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 液体培地に加え、OD<sub>600</sub> が 0.4 になったところで IPTG を加え、条件ごとに温度、IPTG 濃度を変え培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、PBS に懸濁して超音波破碎機により菌体を破碎した。20,000 x g で遠心後、上清と沈殿を分離した。上清は等量の 2x SDS サンプルバッファーと混合、沈殿は 1x SDS サンプルバッファーに溶解後、4 で示した方法により SDS-PAGE を行い CBB 染色した。

#### 8-4. His-VDAC の大量発現

上記の前培養液を 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 液体培地 1 L に加え、OD<sub>600</sub> が 0.4 になったところで IPTG を終濃度 1 mM になるように加え、37°C で一晩培養を行った。培養後、培養液を 50 mL チューブに分注し、4,800 x g で遠心分離して菌体を分離し、PBS に懸濁して -20°C で保存した。

#### 8-5. His-VDAC の精製

8-4 で調製した菌体を PBS に懸濁し、超音波破碎後、2,500 x g で遠心分離した沈殿を回収した。沈殿を 0.1% Triton X-100/PBS で 2 回洗浄したのち、His 結合バッファーを加えてインキュベートして全て溶解させた。Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE healthcare) を空カラムに詰め、製品に付属するプロトコルに従い平衡化処理を行ったのち溶液を全てアプライし、His 結合バッファーで十分に洗浄後、His 溶出バッファーをアプライして溶出液を回収した。溶出液を 1 L のビーズ結合バッファーを外液として 4°C で一晩透析し、透析内液を回収した。精製の程度を 4 に述べた方法により SDS-PAGE で確認した。

#### 8-6. His-VDAC の沈殿および可溶化

8-5 で得られた精製 His-VDAC に氷冷したアセトンを加えて混合し、20,000 x g で遠心分離後上清を破棄した。沈殿を風乾し、3.5 mM SDS/30 mM DDM バッファーを加えて 4°C でローテーターにより一晩混合後、20,000 x g で遠心分離した上清を回収し、Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) により BSA をスタンダードとして溶液のタンパク質濃度を定量した。

#### 9. His-VDAC と precocene II 固定化ナノ磁気ビーズの結合実験

8 で調製した精製 His-VDAC を 5 µg とり、6 で述べた方法と同様に precocene II 固定化ナノ磁気ビーズとの結合実験を行った。ただし、precocene II を固定化していないリンカービーズをコントロールビーズとして用いた。また、精製 His-VDAC とビー

ズのインキュベート後磁気分離を行った上清をフロースルーとして回収した。フロースルーは、6で述べた方法によってメタノールおよびクロロホルムによる沈殿後、40  $\mu\text{L}$  の 1x SDS サンプルバッファーを加えて煮沸し SDS-PAGE に供した。また、ビーズ結合バッファーによるビーズの5回の洗浄後、ビーズに 40  $\mu\text{L}$  の 1x SDS サンプルバッファーを加えて煮沸し、磁気分離を行った上清を回収して SDS-PAGE に供した。4で述べた方法により電気泳動後、5で述べた方法により Anti-6  $\times$  Histidine 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

## 10. 出芽酵母抽出物からの precocene II 結合タンパク質の同定

*S. cerevisiae* INVSc1 株 (Invitrogen) を YPD 液体培地 5 mL に加え、26.5°Cで一晩培養して前培養液とした。1 L の YPD 液体培地に前培養液を加え、26.5°Cで OD<sub>600</sub> が 1.0 になるまで培養後、900 x g の遠心分離により菌体を回収した。菌体を 50 mL の Tris-SO<sub>4</sub> バッファーに懸濁して 30°Cで 30 分間インキュベート後、900 x g の遠心分離により回収し、ソルビトールバッファーで洗浄した。菌体を 50 mg の zymolyase-20T (ナカライテスク) を含むソルビトールバッファーに懸濁し、30°Cで 1 時間インキュベートした。形成されたスフェロプラストを 900 x g の遠心分離で回収し、15 mL の酵母破碎バッファーに懸濁して氷上でホモジナイザーにより手動で破碎した。3と同様の方法によりミトコンドリアを単離、タンパク質を抽出し、6および7で述べた方法により precocene II 結合タンパク質の同定を行った。ただし、Proteome Discover v1.4 ソフトウェアにインプットする配列データとして、*Saccharomyces* GENOME DATABASE (Stanford University) により公開されている *S. cerevisiae* S288C 株の ORF の翻訳データを用いた。

### 10.3-ADON の定量および乾燥菌体重量の秤量

#### 10-1. *F. graminearum* の培養

試験管中の 5 mL の SYEP 培地に 2で調製した孢子懸濁液を 1  $\mu\text{L}$  植菌した。薬剤を添加する場合は最大で 5  $\mu\text{L}$  とし、薬剤無添加として等量の溶媒を加えたコントロール

ールを用意した。26.5°C、振盪培養機上 300 rpm で培養した。特に断らない限り 4 日間培養した。培養後、Miracloth (Merckmillipore) によりろ過して上清と菌体を分離した。

### 10-2. 3-ADON の抽出と定量

分離した培養上清 1 mL に酢酸エチル 400  $\mu$ L を加えて混合し、20,000 x g で遠心分離して酢酸エチル層を別のチューブにとった。減圧遠心濃縮機により濃縮した残渣を 50  $\mu$ L のメタノールに溶解し、10  $\mu$ L をとって 190  $\mu$ L の 10 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル (9:1) 溶液と混合した。溶液中の 3-ADON 量を LC/MS により定量した。条件を以下に記す。

HPLC 条件 ;

装置: Waters 2695 HPLC system (Waters)

カラム: Capcell-Pak C<sub>1</sub> 4.6 mm $\phi$  x 35 mm (SHISEIDO) および

Capcell-Pak C<sub>18</sub> 2 mm $\phi$  x 250 mm (SHISEIDO)

流速: 0.2 mL/min

移動相: A 液: 10 mM 酢酸アンモニウム

B 液: アセトニトリル

グラジエント:

time (min)	A 液 (%)	B 液 (%)
0-2	90	10
2-20	90→10	10→90
20-25	10	90

検出波長: 254 nm

Retention time: 16.1 min

MS 条件;

装置: Waters Micromass ZQ (Waters)

ESI: ポジティブ

ソース温度: 120°C

脱溶媒温度: 350°C

コーン電圧: 30 V

脱溶媒ガス量: 600 L/h

コーンガス量: 50 L/h

キャピラリー電圧: 2800 V

検出: 3-ADON  $m/z$  339 (M+H)<sup>+</sup>

濃度既知の 3-ADON 標品のピーク面積から検量線を作成し、サンプル中の 3-ADON 量を定量した。グラフには培養液中の 3-ADON 濃度に換算した値を表示した。

ただし、*MnSOD1* および *MnSOD2* 破壊株の 3-ADON 生産量の定量は国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部第四室 吉成知也博士に依頼した。

### 10-3. 乾燥菌体重量の秤量

回収した菌体をあらかじめ重量を測定したチューブごと液体窒素により凍結し、凍結乾燥機により乾燥させた。重量を測定し、チューブの重量を減算することで乾燥菌体重量を測定した。

## 11. 蛍光顕微鏡による観察

### 11-1. mitoSOX を用いたミトコンドリアスーパーオキシドの観察

mitoSOX (Molecular Probes) の DMSO ストック溶液を製品付属のプロトコルに従い Hank's バッファー (HBSS, Gibco) に終濃度 5  $\mu$ M となるよう溶解して用いた。10-1 と同様に *F. graminearum* を培養し、24 時間後に薬剤を添加し更に 24 時間培養した。ろ過により菌体を回収し、超純水で洗浄後、上記の mitoSOX 溶液中に加えて 37°C で 10 分間インキュベートした。HBSS で菌体を洗浄後、スライドガラスに載せ蛍光顕微鏡

により観察した。条件を下記に記す。

顕微鏡: BX53 (Olympus)

撮影装置: DP70 (Olympus)

蛍光ミラーユニット: U-FBW (Olympus)

露光時間: 1 秒

### 11-2. dihydroethidium を用いた細胞質基質スーパーオキシドの観察

dihydroethidium (Molecular Probes) の 30 mM DMSO ストック溶液を Hank's バッファー (HBSS, Gibco) に終濃度 30  $\mu$ M となるよう溶解して用いた。他の条件は全て 11-1 と同様である。

### 11-3. mitoSOX 蛍光画像を用いたミトコンドリアスーパーオキシド量の定量

細胞壁を染色するカルコフルオール溶液として、Fluorescent Brightener 28 (Sigma-Aldrich) を終濃度 3  $\mu$ M で含む HBSS 溶液を用いた。10-1 と同様に precocene II 添加または無添加で培養した菌体を各時間でろ過により回収し、超純水で洗浄した。11-1 と同様に mitoSOX 溶液とインキュベート後、菌体を上記カルコフルオール溶液に加えて 37°C で 2 分間インキュベートし、顕微鏡観察に供した。条件は 11-1 と同様であるが、カルコフルオールの蛍光観察の際は蛍光ミラーユニットを U-FUW (Olympus)、露光時間を 5 ミリ秒とした。

得られた蛍光画像の処理は Image J ソフトウェア (US National Institutes of Health) により行った。カルコフルオールの蛍光画像を 3 色の色要素に分割し、青色要素の画像について閾値を auto に設定し二値化画像を得たのち、面積を定量して画像中の菌体量の指標とした。mitoSOX の蛍光画像については、バックグラウンド減算後、同様に色要素に分割し、赤色要素の画像について閾値を 20 に設定して二値化後、面積を定量した。mitoSOX の面積をカルコフルオールの面積で除算することで画像中のス

ーパーオキシド量とし、各画像で同様の処理を行ったのち、培養 24 時間、薬剤無添加のスーパーオキシド量を 1 とした相対値をグラフに表示した。

#### 11-4. dihydroethidium 蛍光画像を用いた細胞質基質スーパーオキシド量の定量

dihydroethidium 蛍光画像をバックグラウンド減算後、色要素に分割し、赤色要素の画像を閾値 15 で二値化した。他の点は 11-3 と同様である。

#### 12. カルボニル化タンパク質の定量

precocene II 添加または無添加の SYEP 培地 100 mL に 2 で調製した孢子 20  $\mu$ L を植菌し、3 で述べた方法によりミトコンドリアを単離した。ミトコンドリアを RIPA バッファーに懸濁し、ストレプトマイシン硫酸塩を終濃度 1% で加えて室温で 10 分間静置し、20,000 x g で遠心分離して核酸を沈殿させた。上清を回収して Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) により BSA をスタンダードとして溶液のタンパク質濃度を定量した。200  $\mu$ g のタンパク質を別のチューブにとって、DNPH 溶液を加えて室温で 1 時間インキュベートした。TCA 水溶液を終濃度 20% になるよう加えて氷上で 10 分間静置し、20,000 x g で遠心分離した沈殿を 20% TCA 水溶液で 1 回、エタノール/酢酸エチル (1:1) 溶液で 3 回洗浄して余剰の DNPH を除去した。200  $\mu$ L のグアニジン塩酸塩溶液に溶解後、366 nm の吸光度を測定し、22,000  $M^{-1} cm^{-1}$  のモル吸光係数を用いてカルボニル化タンパク質を定量した。

#### 13. TBARS の定量

10-1 で述べた方法により precocene II 添加または無添加で *F. graminearum* を培養し、乾燥菌体を得た。乾燥菌体を液体窒素下で乳棒により破碎し、TBARS アッセイ溶液 800  $\mu$ L を加えて氷上で 20 分静置した。30 分間煮沸により加熱し、室温に冷却後、ブタノール/ピリジン (1:1) を 1 mL 加えてよく混合し、20,000 x g で遠心分離した上清を回収した。上清の 532 nm での吸光度を測定し、156,000  $M^{-1} cm^{-1}$  のモル吸光係数を

用いて TBARS を定量した。

#### 14. 菌体内アセチル CoA の定量

10-1 で述べた方法により precocene II 添加または無添加で *F. graminearum* を培養し、乾燥菌体を得た。液体窒素下で乳棒により菌体を粉砕し、5%過塩素酸水溶液 200  $\mu$ L を加え混合後 1.5 mL チューブに取った。LC/MS の内部標準物質として 3,4-ジメトキシアニリンを 1  $\mu$ mol 加え混合後、20,000 x g で遠心分離した上清を回収した。1 M トリエタノールアミンを終濃度 100 mM になるよう加え、3 M  $K_2CO_3$  水溶液により pH が 7 前後になるよう調整し、よく混合した。20,000 x g で遠心分離した上清を 50  $\mu$ L とって水/メタノール (3:1) 150  $\mu$ L と混合し、LC/MS 分析に供した。条件を以下に記す。

HPLC 条件 ;

装置、流速、カラム、検出波長は 10-2 で記した条件と同一である。

移動相: A 液: 5 mM ヘキシルアミン (酢酸で pH 6.3 に調整)

B 液: 90%メタノール/10%酢酸アンモニウム (アンモニア水溶液で pH 8.5 に調整)

グラジエント:

time (min)	A 液 (%)	B 液 (%)
0-2	100	10
2-50	100→0	0→100
50-60	0	100
60-75	0→100	100→0

Retention time: 28.2 min

MS 条件;

装置、ESI モード、ソース温度、脱溶媒温度、コーン電圧、脱溶媒ガス量、コーンガ

ス量、キャピラリー電圧は 10-2 で記した条件と同一である。

検出: acetyl-CoA  $m/z$  810 (M+H)<sup>+</sup>

3,4-dimethoxyaniline  $m/z$  154 (M+H)<sup>+</sup>

濃度既知の acetyl-CoA 標品のピーク面積から検量線を作成し、サンプル中の acetyl-CoA 量を定量した。acetyl-CoA のピーク面積は内部標準として用いた 3,4-dimethoxyaniline のピーク面積による補正を行った。グラフには抽出を行った乾燥菌体重量あたりの acetyl-CoA 量に換算した値を表示した。

#### 14. リアルタイム PCR 法による mRNA 量の定量

テンプレートとした cDNA は 8-1 で述べた方法により調製した。total RNA 0.04  $\mu$ g 分から合成した cDNA を各リアルタイム PCR 反応で用いた。FastStart Universal SYBR GreenMaster (Rox) (Roche Molecular Systems) を用いて反応を行った。反応溶液の組成を下に示す。

FastStart Universal SYBR GreenMaster (Rox)	12.5 $\mu$ L
cDNA	2 $\mu$ L (total RNA 0.04 $\mu$ g 相当)
Real-time PCR primer F (5 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
Real-time PCR primer R (5 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
超純水	5.5 $\mu$ L
合計	25 $\mu$ L

分析機器 : ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

PCR 条件 : 95°C 10 min, (95°C 15 sec, 60°C 1 min) 40 サイクル

cDNA の希釈系列を調製し、希釈系列の Ct 値から検量線を作成した。各サンプル

の Ct 値を検量線に当てはめ、mRNA 量の相対値を算出した。さらに、*GAPDH* をコントロール遺伝子として、測定遺伝子の相対 mRNA 量を *GAPDH* の相対 mRNA 量で除算することで、サンプルごとの測定値の標準化を行った。

用いたプライマーの配列を以下に記す。

*GAPDH* F: 5'- TCAAGGGTGTCTGGCCTAC -3'

*GAPDH* R: 5'- AGTAACCCCACTCGTTGTCG -3'

*Tri6* F: 5'- TGCTCGGCATGAGTCTAAGC -3'

*Tri6* R: 5'- CACCGATCCCTCGTCAACAC -3'

*Tri5* F: 5'- CGACGATGAGCGTGACCAA -3'

*Tri5* R: 5'- TGGGTGAGCTTCTCCAAAGC -3'

## 15. 遺伝子破壊株の作製

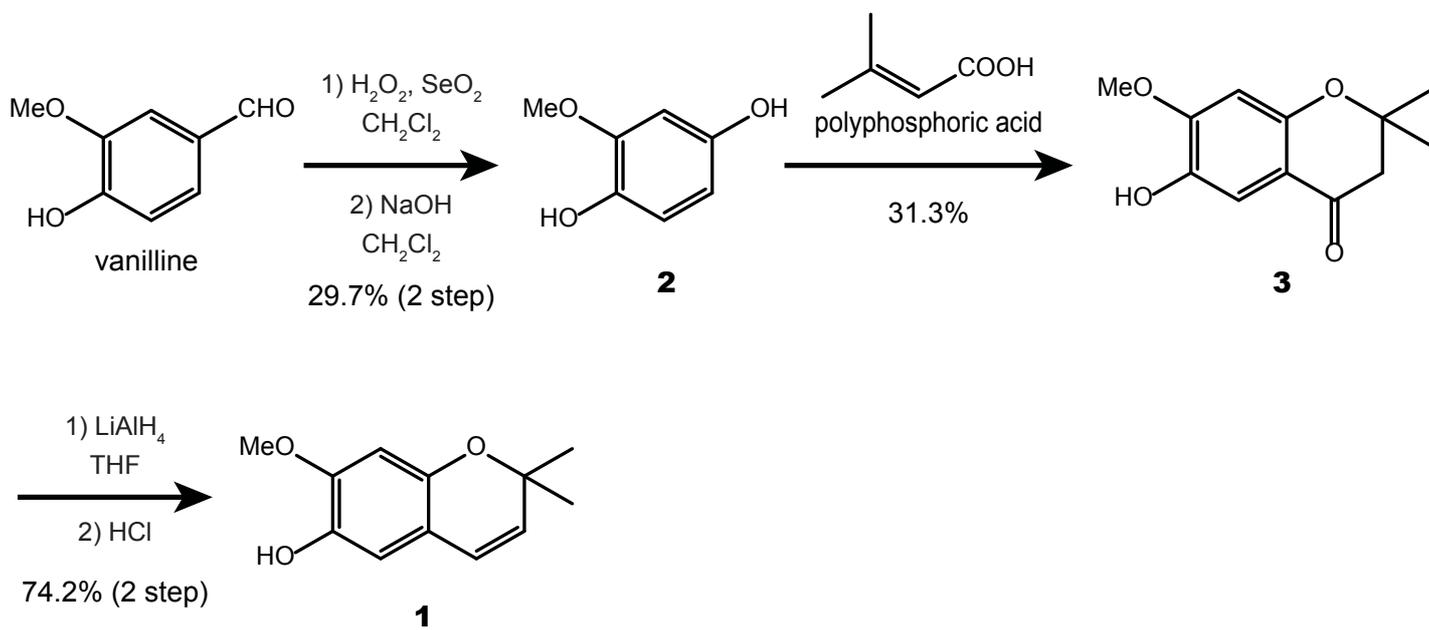
本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

## 16. DIG 標識プローブを用いた遺伝子破壊の確認

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

## 17. 統計解析

各図中にバイオロジカルレプリケートの数を記した。グラフは平均値±標準偏差または平均値+標準偏差を表示した。二群間の比較は Welch t-test により行い、多群間の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) による検定後、Dunnett test によりコントロールに比べ有意差の存在する群を検定した。p<0.05 を有意差の基準とした。



スキーム 1-1

## 第二章 アフラトキシン生産阻害物質 diocatin の作用機構

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

### 第三章 シリング酸アルキルおよび類縁化合物のアフラトキシン生産阻害活性

序論で述べたように、シラカバ *Betula alba* のエッセンシャルオイルから単離されたシリング酸メチルは、*Aspergillus parasiticus* および *Aspergillus flavus* のアフラトキシン生産をそれぞれ 0.9 mM および 0.8 mM の IC<sub>50</sub> 値で阻害する [67]。また、シリング酸の類縁化合物である没食子酸も *A. flavus* のアフラトキシン生産を阻害することが報告されている [144]。

一方、食品添加物として用いられる没食子酸のアルキルエステル体について、その抗菌活性がアルキル鎖の構造と相関し、メチルからノニルまでアルキル鎖が長くなるほど抗菌活性が強くなることが報告されている [145, 146]。さらに、没食子酸アルキルにミトコンドリア呼吸鎖複合体 II の阻害活性が存在し、その活性もまたペンチルからノニルまでアルキル鎖が長くなるほど強くなることが示されている [146]。没食子酸アルキル同様シリング酸アルキルの類縁化合物であるアルキルパラベンにおいても、アルキル鎖が長いほど抗菌活性および呼吸鎖複合体 II の阻害活性が強くなることが報告されている [147]。

呼吸鎖複合体 II の阻害剤として知られる boscalid、atpenin A5、siccanin を含め、複数のミトコンドリア呼吸鎖複合体の阻害剤に *A. parasiticus* のアフラトキシン生産阻害活性が報告されている [76]。しかしながら、その活性の強さと阻害の対象となる呼吸鎖複合体の種類に相関は見出されていない。

以上の報告と、シリング酸アルキル、没食子酸アルキルおよびアルキルパラベンの構造の類似性から、シリング酸アルキルの呼吸鎖複合体 II 阻害活性および、没食子酸アルキルとアルキルパラベンのアフラトキシン生産阻害活性が予想された。さらに、これらの活性とアルキル鎖の長さの関連が予想された。そこで本章では、図 3-1 に示した種々の長さのアルキル鎖をもつシリング酸アルキル、アルキルパラベンおよび没食子酸アルキルを用いて、これらのアフラトキシン生産阻害活性と呼吸鎖複合体 II 阻害活性を調べた。

### 3-1 シリング酸アルキルがアフラトキシン生産および菌体重量に与える影響

シリング酸アルキルが *A. flavus* のアフラトキシン生産に与える影響を調べるため、PDB 液体培地 2 mL に *A. flavus* の孢子を 20,000 個植菌し、薬剤添加または無添加で 28°C、4 日間静置培養した。培養後、ろ過により上清と菌体を分離し、上清からアフラトキシンを抽出し HPLC によりアフラトキシン B<sub>1</sub> 量を定量した。菌体は凍結乾燥を行い、乾燥菌体重量を秤量した。結果を図 3-2 に示す。シリング酸エチルおよびシリング酸プロピルは 0.1 mM の濃度でアフラトキシン生産に影響を与えなかったが、シリング酸ブチルは 0.1 mM で、シリング酸ペンチルおよびそれよりアルキル鎖の長いシリング酸アルキルでは 0.05 mM でアフラトキシン生産を 27%以下に強く抑制した (図 3-3 (a))。菌体重量に関しては、シリング酸ブチルおよびそれよりアルキル鎖の長いシリング酸アルキルで有意な菌体重量の減少が見られたが、その減少率は最も大きい場合で薬剤無添加に比べ 36%程度の減少であった (図 3-3 (b))。

### 3-2 アルキルパラベンおよび没食子酸アルキルがアフラトキシン生産および菌体重量に与える影響

3-1 と同様の実験をアルキルパラベンおよび没食子酸アルキルを用いて行った。結果を図 3-3 に示す。プロピルパラベンとヘプチルパラベンは 0.1 mM で、オクチルパラベンは 0.05 mM でアフラトキシン生産を有意に減少させた。没食子酸プロピルはアフラトキシン生産に大きな影響を与えなかった一方、没食子酸オクチルは 0.05 mM でアフラトキシン生産を強く抑制した。アルキルパラベンが菌体重量に与える影響に関しては、プロピルパラベンとそれよりアルキル鎖の長いアルキルパラベンで菌体重量の有意な減少が見られたが、その減少率は最も大きい場合で薬剤無添加に比べ 16%の減少であった。没食子酸オクチルに関しては、0.1 mM で薬剤無添加に比べ 44%の菌体重量の減少が見られた。

### 3-3 シリング酸アルキルおよび類縁化合物が呼吸鎖複合体 II の活性に与える影響

次に、各化合物の呼吸鎖複合体 II 阻害活性を調べるため、ウシ *Bos taurus* の心臓のミトコンドリアを用いた市販のキットによる複合体 II の活性測定を行った。実験方法の概要を図 3-4 に示す。複合体 II はコハク酸デヒドロゲナーゼ活性およびユビキノンレダクターゼ活性を有し、コハク酸をフマル酸に酸化すると同時に FAD を FADH<sub>2</sub> に還元する。FADH<sub>2</sub> は複合体 II から遊離せず、ユビキノン (UQ) の還元に使われ FAD と UQH<sub>2</sub> が生成する。アッセイ溶液に含まれるジクロロフェノールインドフェノール (DCPIP) は波長 600 nm に極大吸収を有するが、UQH<sub>2</sub> により還元され DCPIPH<sub>2</sub> となると 600 nm の吸光が減少する。すなわち、600 nm の吸光度を経時的に測定することで、複合体 II の活性を測定することができる。実験に供する各化合物について、複数の濃度で吸光度の減少を測定し、薬剤無添加の吸光度の減少速度との比率から複合体 II 活性阻害率を算出した。化合物の濃度と阻害率をプロットしたグラフから、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出し、各化合物についてまとめたものが表 3-1 である。本実験では、複合体 I、複合体 III、複合体 IV の影響を抑制するために、それぞれの特異的阻害剤であるロテノン、アンチマイシン A、シアン化カリウムを添加して行った。

シリング酸メチルおよびシリング酸エチルは実験で行った濃度では阻害が見られなかったが、シリング酸プロピルおよびそれよりアルキル鎖の長いシリング酸アルキルで複合体 II 阻害活性が確認された。また、アルキル鎖が長くなるほど IC<sub>50</sub> 値が減少する傾向が見られた。一方、プロピルパラベン は 2 mM で 25% の阻害を示したが、5 mM で化合物の析出が見られ、IC<sub>50</sub> 値の算出ができなかった。オクチルパラベンおよび没食子酸オクチルはシリング酸オクチルと同等かより小さな IC<sub>50</sub> 値を示した。複合体 II の阻害剤として知られ、*A. parasiticus* のアフラトキシン生産を 0.01 μM 以下の IC<sub>50</sub> 値で阻害するボスカリドは [76]、本アッセイ系においては複合体 II 活性を IC<sub>50</sub> 値 0.02 mM で阻害した。

### 3-4 考察

シラカバの精油から単離されたシリング酸メチルはアフラトキシン生産阻害活性を持つ [67]。シリング酸の類縁化合物として、トゥーレアリ産のクルミ中に含まれる没食子酸がアフラトキシン生産阻害活性を有していることが報告されていた [144]。また、没食子酸アルキルは抗菌活性および複合体 II 阻害活性を有し、その活性はともにアルキル鎖が長くなるほど強くなることが報告されていた [145, 146]。呼吸鎖複合体 II の阻害は *A. parasiticus* のアフラトキシン生産の阻害に結びつくことが示されていたため [76]、本章ではシリング酸メチルのアルキル鎖を延長した化合物およびその類縁化合物の、*A. flavus* に対するアフラトキシン生産阻害活性および呼吸鎖複合体 II 阻害活性を調べた。

その結果、シリング酸アルキルのアフラトキシン生産阻害活性と呼吸鎖複合体 II 阻害活性はともにアルキル鎖が長くなるほど強くなる傾向が見られることが確認された。また、アルキル鎖の長いシリング酸アルキルは菌体の生育を減少させたが、その減少率はアフラトキシン生産阻害率と比べわずかであり、アフラトキシン生産を選択的に阻害していると言える。*A. parasiticus* のアフラトキシン阻害活性を有する呼吸鎖複合体の阻害剤においても、菌体の生育を大きく阻害するものは報告されておらず [76]、ミトコンドリア呼吸鎖の阻害は選択的なアフラトキシン生産の阻害をもたらすと考えられる。

アルキルパラベンおよび没食子酸アルキルにおいても、シリング酸アルキルと同様にアルキル鎖の長いものほど強いアフラトキシン生産阻害活性と複合体 II 阻害活性をもつことが確認された。前述したように、没食子酸アルキルおよびアルキルパラベンには抗菌活性が存在することが知られ、*Aspergillus* 属に対する抗菌活性としては、没食子酸オクチルが *A. flavus* ATCC 9170 株に対し最小阻害濃度 (MIC) 0.063 mM で生育阻害を示したとの報告がある [148]。本実験においても、アフラトキシン生産の阻害活性を有したプロピルパラベン、ヘプチルパラベン、オクチルパラベンおよび没食

子酸オクチルは菌体の生育も有意に減少させたが、0.05 mM の没食子酸オクチルは *A. flavus* IMF47798 株の PDB 液体培地における生育に影響を与えることなくアフラトキシン生産を強く阻害していた。このことから、没食子酸オクチルは耐性菌の急速な蔓延を招かないアフラトキシン汚染防除剤として利用できる可能性を有している。

アルキルパラベンはその抗菌活性や化学的安定性、低い毒性や非揮発性のために化粧品防腐剤として用いられている。しかし、アルキルパラベン類はエストロゲン様活性を有することが報告されており [149]、現在、添加物としての利用が問題視されている。一方、没食子酸オクチルに関しては抗腫瘍活性が最近報告されたほかは慢性、急性毒性および変異原性に関する報告は存在せず [150, 151]、今後も食品添加物としての利用が継続されるものと考えられる。そのため、農産物収穫後の貯蔵や輸送段階でのアフラトキシン汚染に対する、アフラトキシン制御剤として没食子酸オクチルを利用する産業応用性が期待される。

表 3-1 で示されるように、長いアルキル鎖を有するシリング酸アルキルおよび類縁化合物はウシ *B. taurus* の複合体 II 阻害活性を有していたが、その IC<sub>50</sub> 値は図 3-2 および図 3-3 から推測される *A. flavus* に対するアフラトキシン生産阻害活性の IC<sub>50</sub> 値より数倍から数十倍高かった。3-3 で述べたように、ボスカリドは *A. parasiticus* のアフラトキシン生産を 0.01 μM 以下の IC<sub>50</sub> 値で阻害したが [76]、本章で行った複合体 II 阻害実験での IC<sub>50</sub> 値はその二千倍以上となる 0.02 mM であった。この原因として 2通りの考え方ができる。ひとつは、複合体 II に対する阻害活性はわずかであっても、アフラトキシン生産は大きな影響を受ける可能性である。すなわち、複合体 II の活性阻害がミトコンドリア好気呼吸のバランスを崩し、アセチル CoA などの種々の代謝物質や ATP 生産量を減少させ、波及的にアフラトキシン生産の減少に結びつく可能性である。

もうひとつは、*A. flavus* の複合体 II と *B. taurus* の複合体 II の構造の相違である。複合体 II はミトコンドリアマトリックスに露出した親水性サブユニットである SDHA および SDHB と、内膜に挿入された疎水性サブユニットである SDHC および

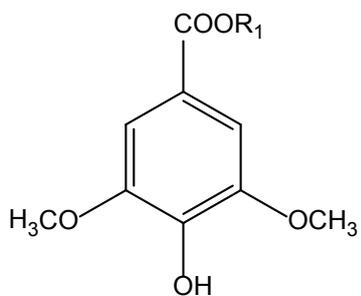
SDHD からなる。*B. taurus* の SDHA、SDHB、SDHC と、*A. flavus* の SDHA、SDHB、SDHC について、GENETYX ver.10 ソフトウェアで計算される配列一致度およびアミノ酸の性質から計算される配列類似性を下に列記する。なお、*A. flavus* の SDHA、SDHB、SDHC は、*A. flavus* のタンパク質配列データベースに対し *B. taurus* の SDHA、SDHB、SDHC をもって相同性検索を行った結果で、最も一致度の高かったタンパク質を選定した。SDHD については、*A. flavus* のタンパク質配列データベースには *B. taurus* の SDHD と高い配列一致度をもつタンパク質は存在しなかった。

SDHA (フラボタンパク質) ; Identity: 69% Similarity: 87%

SDHB (鉄硫黄タンパク質) ; Identity: 66% Similarity: 91%

SDHC (疎水性タンパク質) ; Identity: 42% Similarity: 70%

親水性サブユニットである SDHA および SDHB は両者でやや高い配列類似性を有するが、疎水性サブユニットである SDHC の配列類似性はそれより低かった。一方、シリング酸アルキルおよび類縁化合物のアルキル鎖が長いほど疎水性が高くなると考えられ [147, 148]、これらの化合物が複合体 II と相互作用する場合、複合体 II の疎水性部位と相互作用することが考えられる。すなわち、上記の *A. flavus* および *A. parasiticus* に対するアフラトキシン生産阻害活性と *B. taurus* の複合体 II 阻害活性の IC<sub>50</sub> 値の隔たりは、両種の複合体 II の疎水性部位の構造の違いに起因し、*A. flavus* および *A. parasiticus* の複合体 II は *B. taurus* で見られたよりも低い濃度のシリング酸アルキルおよび類縁化合物で阻害される可能性がある。今後、*Aspergillus* のミトコンドリアを単離し、複合体 II の活性を測定する実験を通し、この可能性を検証する必要があると考えている。



methyl syringate:  $R_1 = -\text{CH}_3$

ethyl syringate:  $R_1 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$

propyl syringate:  $R_1 = -(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$

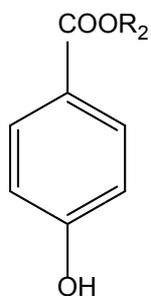
butyl syringate:  $R_1 = -(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$

pentyl syringate:  $R_1 = -(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

hexyl syringate:  $R_1 = -(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$

heptyl syringate:  $R_1 = -(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$

octyl syringate:  $R_1 = -(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

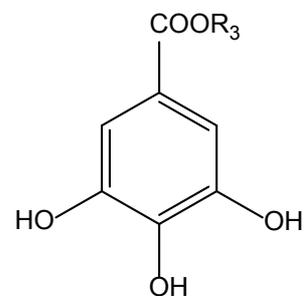


ethyl paraben:  $R_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_3$

propyl paraben:  $R_2 = -(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$

heptyl paraben:  $R_2 = -(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$

octyl paraben:  $R_2 = -(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

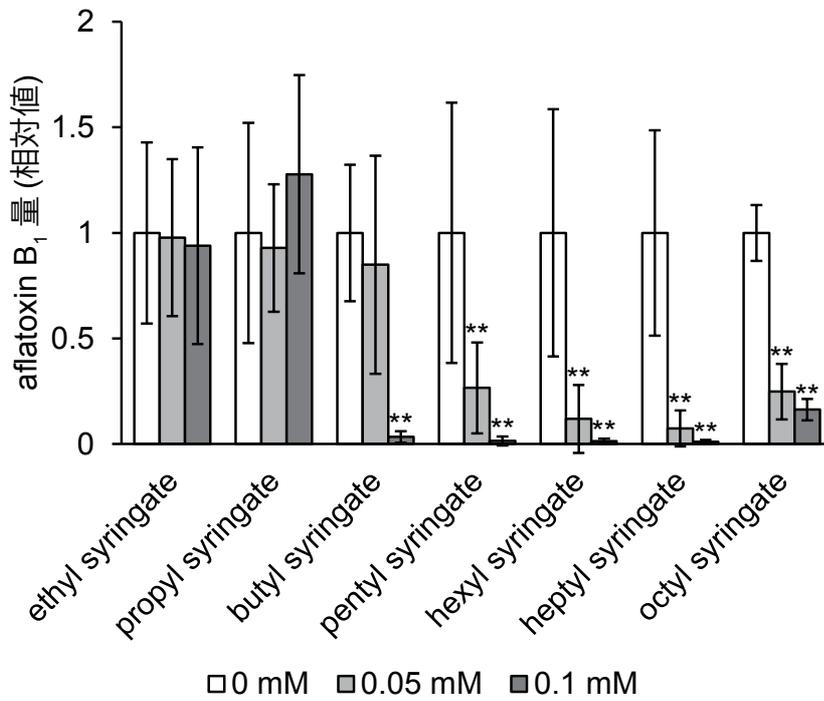


propyl gallate:  $R_2 = -(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$

octyl gallate:  $R_2 = -(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$

図3-1. シリング酸アルキル、アルキルパラベン、没食子酸アルキルの構造

(a)



(b)

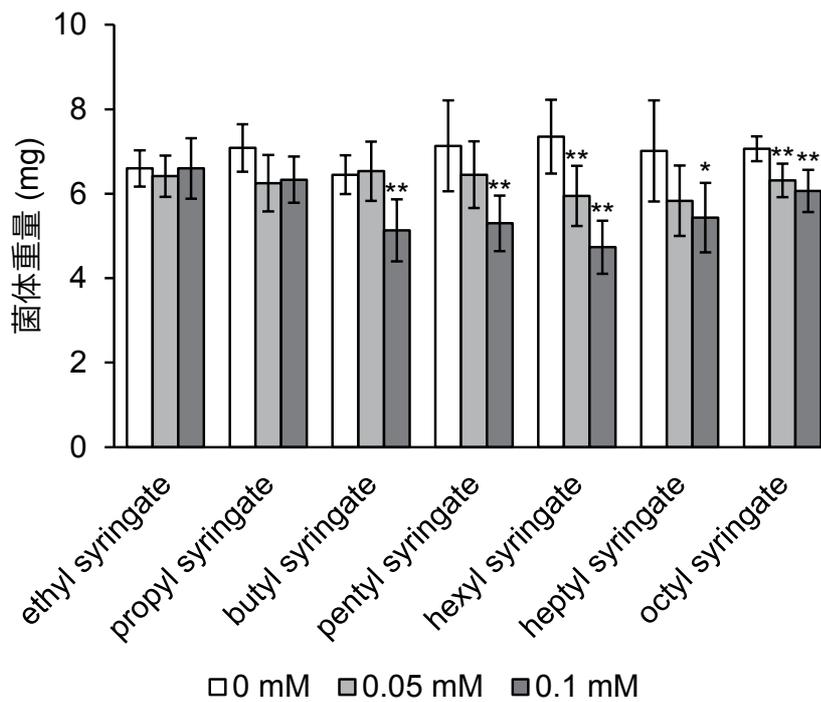


図3-2. シリング酸アルキルがアフラトキシン生産および菌体の生育に与える影響

(a): 4日間培養後の *A. flavus* 培養上清中のアフラトキシン B<sub>1</sub> 量に対するシリング酸アルキルの効果  
各化合物について、薬剤無添加の aflatoxin B<sub>1</sub> 量を 1 とした相対値を表示した。

mean ± SD,  $n = 6$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control, Dunnett test.

(b): 4日間培養後の *A. flavus* の菌体重量に対するシリング酸アルキルの効果

mean ± SD,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control, Dunnett test.

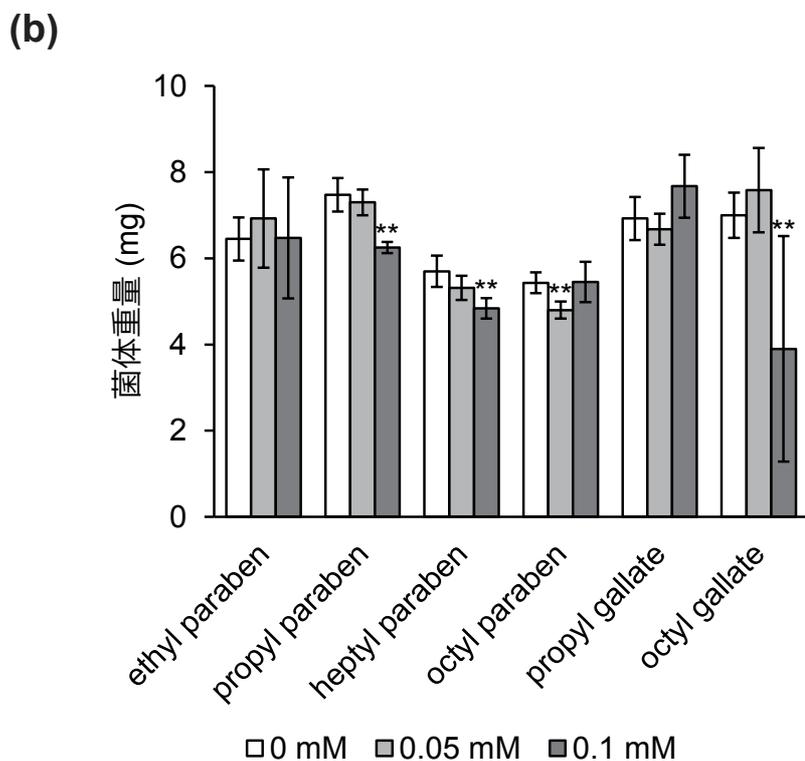
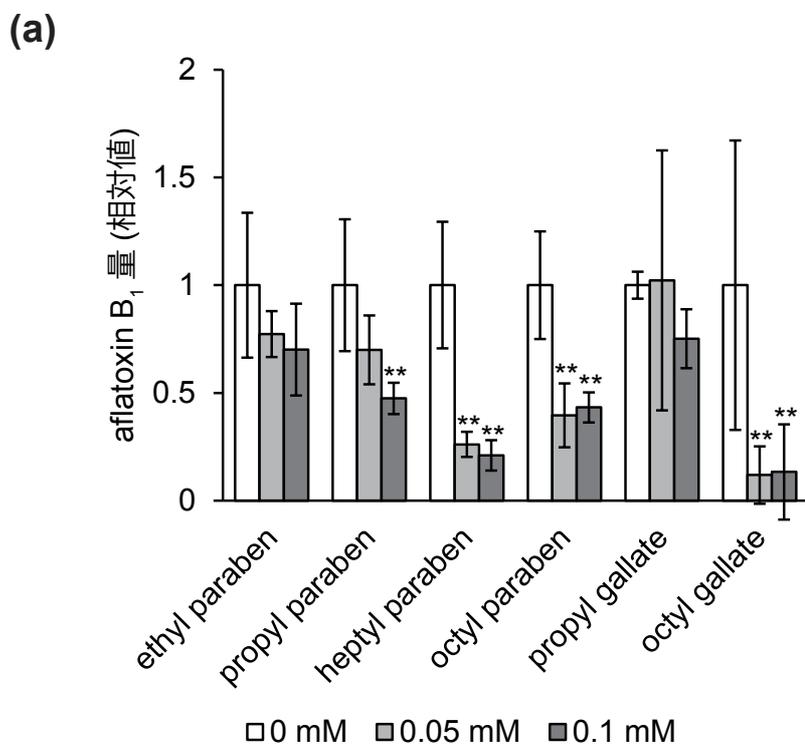


図3-3. アルキルパラベンおよび没食子酸アルキルがアフラトキシン生産および菌体の生育に与える影響

(a): 4 日間培養後の *A. flavus* 培養上清中のアフラトキシン B<sub>1</sub> 量に対するアルキルパラベンの効果  
各化合物について、薬剤無添加の aflatoxin B<sub>1</sub> 量を 1 とした相対値を表示した。

mean ± SD,  $n = 6$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control, Dunnett test.

(b): 4 日間培養後の *A. flavus* の菌体重量に対するアルキルパラベンの効果

mean ± SD,  $n = 6$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control, Dunnett test.

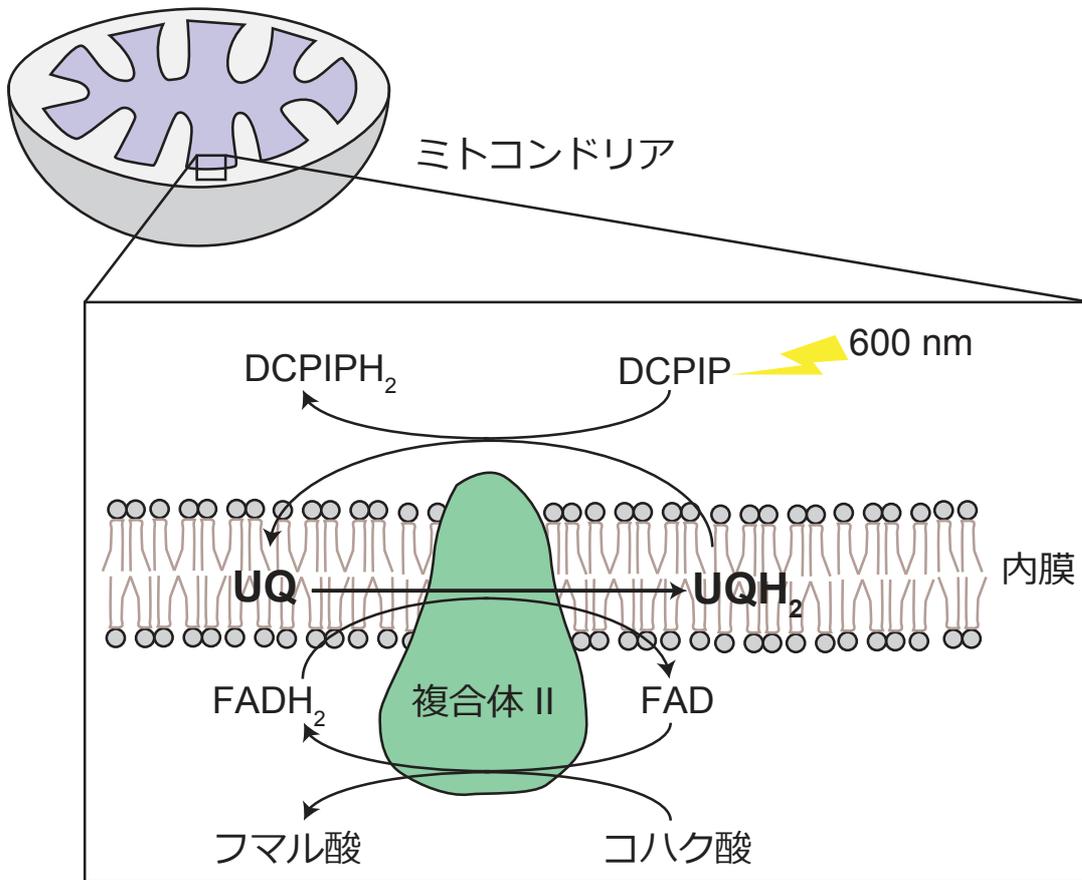


図3-4. 複合体II 活性測定方法の模式図

表3-1. シリング酸アルキルおよび類縁化合物の複合体 II 阻害活性のIC<sub>50</sub>値

compound	IC <sub>50</sub> (mM)
methyl syringate	- *
ethyl syringate	- *
propyl syringate	22
butyl syringate	9.7
pentyl syringate	2.8
hexyl syringate	1.1
heptyl syringate	1.3
octyl syringate	0.34
propyl paraben	>2 **
octyl paraben	0.16
octyl gallate	0.29
boscalid	0.02

\* は、20 mMで阻害が見られなかったことを意味する。

\*\* は、2 mMで25%の阻害が見られたが、それより大きい濃度で化合物の析出が見られ活性を測定できなかった。

## 実験の部

### 試薬

プロピルパラベン、ヘプチルパラベンおよび没食子酸オクチルは東京化成工業のものを用いた。エチルパラベンおよびボスカリドは和光純薬工業のものを用いた。他のシリング酸アルキルおよびオクチルパラベン、没食子酸プロピルは作田が調製したものを用いた。これらの化合物は DMSO に溶解して用いた。他の試薬は断らない限り関東化学の特級品を用いた。

### 1. *A. flavus* の孢子懸濁液の調製

第二章実験の部で述べた方法と同様である。

### 2. アフラトキシン B<sub>1</sub> の定量および乾燥菌体重量の秤量

第二章実験の部で述べた方法と同様である。シリング酸アルキルおよび類縁化合物は 0.05 M または 0.1 M で調製したものを PDB 液体培地 2 mL に対し 2  $\mu$ L 加えた。コントロールとして DMSO 2  $\mu$ L を加えた。

### 3. 複合体 II 阻害活性の測定

複合体 II の活性は MitoCheck® Complex II Activity Assay Kit (cayman chemical) を用い、製品付属のプロトコルに従って測定した。600 nm の吸光度の連続的な測定は Model 550 microplate reader (Bio-Rad) により行った。各化合物の DMSO による希釈系列を調製し、各濃度で吸光度の減少を測定し、近似直線の傾きを算出した。同様に算出した薬剤無添加区の吸光度の減少速度の近似直線の傾きとの比率から、当該濃度における複合体 II の阻害活性を算出した。化合物の濃度と阻害活性をプロットしたグラフを作成し、Image J ソフトウェア (US NIH) のグラフ解析機能から IC<sub>50</sub> 値を算出した。

#### 4. 統計解析

各図中にバイオロジカルレプリケートの数を記した。グラフは平均値±標準偏差を表示した。多群間の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) による検定後、Dunnett test によりコントロールに比べ有意差の存在する群を検定した。 $p < 0.05$  を有意差の基準とした。

農作物のマイコトキシン汚染は有史以来人類の食の安全を脅かしてきた問題である。世界銀行が 1993 年に発行した報告によれば、発展途上国においては「早死によって失われた年数」と「障害により健康が失われた年数」を合算した数値である「障害調整生存年数」の 40%がマイコトキシンによる疾病が原因とされている [152]。日本においては、最も深刻な害をもたらすアフラトキシン汚染が見られないこと、DON や他のマイコトキシンによる小麦等の汚染は殺菌剤を要とした綿密な防除が図られていることから、現代においては実生活で問題となることは少ない。しかしながら、地球規模の温暖化が進行するなか、今後もマイコトキシン汚染が広がらない保証はない。もとより、輸入に依存する食糧や飼料の安全を確保する上で、産地や輸送時においてマイコトキシン汚染防除策が実施されることは大きな意義を持つ。故に、優れたマイコトキシン汚染防除法の開発は広く世界に求められる課題である。このような観点のもと、マイコトキシン生産を特異的に阻害する生物活性物質は、マイコトキシン汚染防除剤として実用化が期待されるばかりでなく、その作用機序を理解することでマイコトキシン生産の分子機構に対する理解を得ることができ、より優れた汚染防除策の構築に貢献できると期待される。

そこで本研究では、第一章において *F. graminearum* の DON 生産阻害物質 precocene II の、第二章において *A. flavus* および *A. parasiticus* のアフラトキシン生産阻害物質 dioctatin の結合タンパク質の同定と作用機構の解明を行い、第三章において methyl syringate 誘導体および類縁体の活性の評価を行った。

第一章では、precocene II の固定化ナノ磁気ビーズを利用し、precocene II の作用点が存在すると考えられたミトコンドリアの抽出タンパク質から、precocene II 結合タンパク質として VDAC を同定した。大腸菌発現系により調製した His-VDAC はネイティブの VDAC と異なり precocene II により precocene II 固定化ナノ磁気ビーズにより溶出されなかったが、precocene II を固定化していないビーズにはほとんど結合し

ない一方 precocene II 固定化ナノ磁気ビーズには多くの His-VDAC が結合していたことから、VDAC は precocene II に強固に結合すると結論付けた。出芽酵母のミトコンドリアタンパク質からも precocene II 結合タンパク質として VDAC が同定されたことは、precocene II は *F. graminearum* の VDAC と出芽酵母の VDAC で共通した構造に結合していることを示唆している。出芽酵母の生育や代謝に対する precocene II の活性を今後調べていくことで、*F. graminearum* の DON 生産と VDAC との関係に新たな展開が開けるかもしれない。

VDAC を通した precocene II の DON 生産阻害のメカニズムとして、VDAC のスーパーオキシド放出における機能に着目した。ミトコンドリアの呼吸鎖複合体で放出されているスーパーオキシドは、ミトコンドリア内のスーパーオキシドジスムターゼ (主に MnSOD) で分解されるか、または VDAC を透過して細胞質基質に移動し、細胞質基質のスーパーオキシドジスムターゼ (主に CuZnSOD) により分解される。スーパーオキシドを特異的に検出するとともに、局在指向性を有する蛍光試薬を用いた観察によって、コントロールとして用いたスーパーオキシド発生試薬の paraquat は細胞質基質およびミトコンドリア内の両方のスーパーオキシドを増加させていた一方、precocene II はミトコンドリア内のスーパーオキシドのみを増加させていることがわかった。precocene II はミトコンドリアタンパク質の酸化損傷を増加させることが見出され、ミトコンドリアのスーパーオキシドの増加が裏付けられた。paraquat によるスーパーオキシドの発生は paraquat が還元されて生じる paraquat radical を経由すると考えられているが、還元を行う酵素については NADPH-cytochrome c reductase とする説や NADH-quinone oxidoreductase とする説などが存在し未だ確定していない [101]。

更に、paraquat およびスーパーオキシド発生試薬である menadione が 3-ADON 生産を阻害したこと、抗酸化物質を添加した場合 3-ADON 生産が増加するとともに、低濃度の precocene II による 3-ADON 生産阻害が覆されることがわかった。ミトコンドリアに局在することが予想される MnSOD2 の遺伝子破壊株ではミトコンドリアのスーパーオキシドの増加、Tri6 遺伝子の転写量減少、3-ADON 生産阻害が見られたことから、ミトコンドリアのスーパーオキシドの増加は 3-ADON 生産阻害に繋がること、

および precocene II はミトコンドリアのスーパーオキシドを増加させることで 3-ADON 生産阻害をもたらすことが明確にされた。

一方、MnSOD1 の遺伝子破壊株は細胞質基質のスーパーオキシドの増加のみを示したにも関わらず、MnSOD2 破壊株より弱いながらも *Tri6* 転写量の減少、3-ADON 生産の減少を示したことから、細胞質基質におけるスーパーオキシドの増加も 3-ADON 生産の減少に繋がることが示唆された。このことは、ミトコンドリアの存在に依存しない、スーパーオキシドのシグナルとしての機能を示唆しており、今後調べていく必要があるだろう。

precocene II によるミトコンドリアのスーパーオキシドの蓄積と、菌体内アセチル CoA 量の減少、ヒストンアセチル化と DON 生産の関係に関する報告 [39]から、precocene II 添加により *Tri* クラスターのヒストンアセチル化が減少し、*Tri* 遺伝子発現が減少するメカニズムが示唆された。precocene II 添加後直ちに生じる *Tri6* 転写量の減少は、アセチル CoA の迅速な代謝回転が阻害されるためであるかもしれない。

precocene II は、*A. flavus* のアフラトキシン生産に対しても弱い阻害活性を有することを見出している (データは示していない)。アフラトキシン生産においては、細胞内の酸化ストレスの上昇とアフラトキシン生産の正の相関が示唆されている [153]。しかしながら、precocene II は *F. graminearum* の VDAC と出芽酵母の VDAC の両者に結合すること、第二章、第三章で示したように diocatin や呼吸鎖複合体阻害剤がミトコンドリアを標的とし阻害的に働いていると考えられることを総合すれば、precocene II は *A. flavus* の VDAC に結合し、ミトコンドリアにスーパーオキシドを蓄積させることでアフラトキシン生産を阻害することが十分に考えられる。

「本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。」

第三章では、既存の食品添加物のアフラトキシン汚染防除剤への実用化を見据えて、以前に見出されていた呼吸鎖阻害剤のアフラトキシン阻害活性 [76]、アルキルパラ

ベン類および没食子酸アルキル類のアルキル鎖の長さと呼吸鎖複合体 II 阻害活性の相関に関する報告 [146, 147]、およびシリング酸メチルの構造類似性をもとにして実験を行った。すなわち、シリング酸アルキル類のアルキル鎖の長さと呼吸鎖複合体 II 阻害活性、アフラトキシン生産阻害活性の相関、およびアルキルパラベン類と没食子酸アルキル類のアフラトキシン生産阻害活性を調べた。その結果、シリング酸アルキル類はアルキル鎖が長いほど呼吸鎖複合体 II 阻害活性およびアフラトキシン生産阻害活性が増大すること、没食子酸アルキル類およびアルキルパラベン類もまたアフラトキシン生産阻害活性を有することを確認した。没食子酸アルキル類は食品添加物として広く用いられている物質であり、今後アフラトキシン汚染制御における実用化を期待したい。

以上本研究で得られた結果は、3種類の物質の作用機構モデルを図 4-1 (学術雑誌論文として出版する予定の部分を含むため、公表できない。5年以内に出版予定) のようにまとめることを可能とし、それは *F. graminearum* と *A. flavus* という種の違いを越えた、マイコトキシン生産におけるミトコンドリアの重要性を示している。

真菌の二次代謝物質であるマイコトキシンの生産と、ミトコンドリア機能との関係を明確に示した報告は本研究がはじめてである。今後さらにそれらの関係についての研究を深めていくことで、より効果的なマイコトキシン汚染防除法の開発に繋がるとともに、真菌の二次代謝の生産調節機構や、進化と二次代謝の関わり、二次代謝産物の生産微生物にとっての役割を解明する手がかりが得られることが期待できると考える。

本研究の成果が、マイコトキシン汚染防除法の開発に向かう応用研究と、微生物の物質生産機構の解明に向かう基礎研究の、両者を発展させる一助となることを期待したい。

## 参考文献

- [1] 齊藤 初雄. 微生物遺伝資源利用マニュアル(25). (2009).
- [2] Schmale, D. G. & Munkvold G. P. Mycotoxins in Crops: A Threat to Human and Domestic Animal Health. *The Plant Health Instructor* (2009).
- [3] Schiff, P. L. Ergot and its alkaloids. *Am. J. Pharm. Educ.* **70**, 98 (2006).
- [4] Steyn, P. S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol. Lett.* **82–83**, 843–51 (1995).
- [5] Cram, D. J. Mold metabolites; the structure of citrinin. *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 4244–7 (1948).
- [6] Jordan, W. H., Carlton, W. W. & Sansing, G. A. Citrinin mycotoxicosis in the mouse. *Food. Cosmet. Toxicol.* **15**, 29–34 (1977).
- [7] Imaida, K., Hirose, M., Ogiso, T., Kurata, Y. & Ito, N. Quantitative analysis of initiating and promoting activities of five mycotoxins in liver carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* **16**, 137–43 (1982).
- [8] Tatsuno, T., Saito, M., Enomoto, M. & Tsunoda, H. Nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivale*. *Chem. Pharm. Bull.* **16**, 2519–20 (1968).
- [9] Yoshizawa, T. & Morooka, N. Deoxynivalenol and its monoacetate: New mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2933–4 (1973).
- [10] Yagen, B. & Joffe, A. Z. Screening of toxic isolates of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* involved in causing alimentary toxic aleukia. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 423–7 (1976).
- [11] 厚生労働省. 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. 2002.
- [12] Xu, X. M., Parry, D. W., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Edwards, S. G., Cooke, B. M., Doohan, F. M., Monaghan, S., Moretti, A., Tocco, G., Mule, G., Hornok, L., Béki, E., Tatnell, J. & Ritieni, A. Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins. *Eur. J. Plant Pathol.* **120**, 21–34 (2008).
- [13] Ehrlich, K. C. & Daigle, K. W. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. *Biochim. Biophys. Acta.* **923**, 206–13 (1987).
- [14] Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R. Deoxynivalenol and its

- toxicity. *Interdiscip. Toxicol.* **3**, 94–9 (2010).
- [15] 小西良子. カビ毒の毒性と作用機序および最近の知見. *FFI ジャーナル*. **211**(12), 1004-8 (2006).
- [16] Doster, R. C., Sinnhuber, R. O. & Pawlowski, N. E. Acute intraperitoneal toxicity of ochratoxin a and B derivatives in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Food Cosmet. Toxicol.* **12**, 499–505 (1974).
- [17] Applebaum, R. S. & Marth, E. H. Biogenesis of the C<sub>20</sub> polyketide, aflatoxin. A review. *Mycopathologia.* **76**, 103–14 (1981).
- [18] Spensley, P. C. Aflatoxin, the active principle in turkey 'X' disease. *Endeavour.* **22**, 75-9 (1963).
- [19] Butler, W. H., Greenblatt, M. & Lijinsky, W. Carcinogenesis in rats by aflatoxins B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, and B<sub>2</sub>. *Cancer research.* **29**, 2206–11 (1969).
- [20] Kumagai, S. The fate of aflatoxin B<sub>1</sub> in animals. *Mycotoxins.* **60**, 7-16 (2010).
- [21] Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M. & Aggarwal, D. Human aflatoxin in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. Soc. Clin. Nutr.* **80**, 1106–22 (2004).
- [22] 鶴田 理, 真鍋 勝. 熱帯農研集報, **32**, 29-38 (1978).
- [23] Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A. M., Misore, A., DeCock, K. & Rubin, C. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicoses in Eastern and Central Kenya. *Environ. Health Perspect.* **113**, 1763–7 (2005).
- [24] Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S. & Fujimura, M. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 2105–23 (2007).
- [25] Merhej, J., Richard-Forget, F. & Barreau, C. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 519–28 (2011).
- [26] Seong, K -Y., Pasquali, M., Zhou, X., Song, J., Hilburn, K., McCormick, S., Dong, Y., Xu, J -R. & Kistler, H. C. Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **72**, 354–67 (2009).

- [27] Peplow, A. W., Tag, A. G., Garifullina, G. F. & Beremand, M. N. Identification of new genes positively regulated by Tri10 and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2731–6 (2003).
- [28] Nasmith, C. G., Walkowiak, S., Wang, L., Leung, W. W. Y., Gong, Y., Johnston, A., Harris, L. J., Guttman, D. S. & Subramaniam, R. Tri6 is a global transcription regulator in the phytopathogen *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog.* **7**, e1002266 (2011).
- [29] Gardiner, D. M., Osborne, S., Kazan, K. & Manners, J. M. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology* **155**, 3149–56 (2009).
- [30] Merhej, J., Boutigny, A. L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F. & Barreau, C. Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **27**, 710–7 (2010).
- [31] Merhej, J., Richard-Forget, F. & Barreau, C. The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **48**, 275–84 (2011).
- [32] Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N -J., Keller, N. P., Yu, J -H. & Braus, G. H. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**, 1504–6 (2008).
- [33] Lee, J., Myong, K., Kim, J -E., Kim, H -K., Yun, S -H. & Lee, Y -W. FgVelB globally regulates sexual reproduction, mycotoxin production and pathogenicity in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Microbiology* **158**, 1723–33 (2012).
- [34] Jiang, J., Liu, X., Yin, Y. & Ma, Z. Involvement of a velvet protein FgVeA in the regulation of asexual development, lipid and secondary metabolisms and virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One* **6**, e28291 (2011).
- [35] Jiao, F., Kawakami, A. & Nakajima, T. Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**, 212–9 (2008).
- [36] Ruijter, G. J., & Visser, J. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**, 103–14 (2006).

- [37] Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M -N., Barreau, C. & Richard-Forget, F. Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **258**, 102–7 (2006).
- [38] Ponts, N., Couedelo, L., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M -N., Barreau, C. & Richard-Forget, F. *Fusarium* response to oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is trichothecene chemotype-dependent. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**, 255–62 (2009).
- [39] Lee, Y., Min, K., Son, H., Park, A. R., Kim, J -C., Choi, G. J. & Lee, Y -W. ELP3 Is involved in sexual and asexual development , virulence , and the oxidative stress response in *Fusarium graminearum*. **27**, 1344–55 (2014).
- [40] Menke, J., Weber, J., Broz, K. & Kistler, H. C. Cellular development associated with induced mycotoxin synthesis in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS One* **8**, e63077 (2013).
- [41] 農林水産省. 平成 14-23 年度 国産穀類のかび毒含有実態調査の結果.
- [42] Bai, G. H., Desjardins, A. E. & Plattner, R. D. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* **153**, 91–8 (2002).
- [43] Sakuda, S., Yoshinari, T., Furukawa, T., Jermnak, U., Takagi, K., Iimura, K., Yamamoto, T. & Suzuki, M. Search for aflatoxin and trichothecene production inhibitors and analysis of their modes of action. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 43–54 (2016).
- [44] Yaguchi, A. Yoshinari, T., Tsuyuki, R., Takahashi, H., Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Isolation and identification of precocenes and piperitone from essential oils as specific inhibitors of trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 846–51 (2009).
- [45] Yoshinari, T. Yaguchi, A., Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Takahashi, H., Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Spiroethers of German chamomile inhibit production of aflatoxin G<sub>1</sub> and trichothecene mycotoxin by inhibiting cytochrome P450 monooxygenases involved in their biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**, 184–90 (2008).
- [46] Bowers, W. S., Ohta, T., Cleere, J. S. & Marsella, P. A. Discovery of insect anti-juvenile hormones in

- plants. *Science*. **193**, 542–7 (1976).
- [47] Lee, H., Bien, C. M., Hughes, A. L., Espenshade, P. J., Kwon-Chung, K. J. & Chang, Y. C. Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **65**, 1018–33 (2007).
- [48] Tsuyuki, R., Yoshinari, T., Sakamoto, N., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Enhancement of trichothecene production in *Fusarium graminearum* by cobalt chloride. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1760–6 (2011).
- [49] Sakamoto, N., Tsuyuki, R., Yoshinari, T., Jermnak, U., Furukawa, T., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Correlation of ATP citrate lyase and acetyl CoA levels with trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Toxins* **5**, 2258–69 (2013).
- [50] 矢部 希見子, 中島 廣光. アフラトキシン生合成機構について. *食衛誌* **52**, 135–147 (2011).
- [51] Yabe, K. & Nakajima, H. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 745–55 (2004).
- [52] Smith, C. A., Woloshuk, C. P., Robertson, D. & Payne, G. A. Silencing of the aflatoxin gene cluster in a diploid strain of *Aspergillus flavus* is suppressed by ectopic aflR expression. *Genetics* **176**, 2077–86 (2007).
- [53] Meyers, D. M., Obrian, G., Du, W. L., Bhatnagar, D. & Payne, G. A. Characterization of *aflJ*, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3713–7 (1998).
- [54] Ehrlich, K. C., Mack, B. M., Wei, Q., Li, P., Roze, L. V., Dazzo, F., Cary, J. W., Bhatnagar, D. & Linz, J. E. Association with AflR in endosomes reveals new functions for AflJ in aflatoxin biosynthesis. *Toxins (Basel)*. **4**, 1582–600 (2012).
- [55] Shwab, E. K. & Keller, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycol. Res.* **112**, 225–30 (2008).
- [56] Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A. & Arst, H. N. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779–90 (1995).
- [57] Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Cary, J. W. & Cotty, P. J. Promoter elements in the aflatoxin

- pathway polyketide synthase gene. *Biochim. Biophys. Acta.* **1576**, 171–5 (2002).
- [58] Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D. & Parker, C. S. Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes & development* **3**, 283–92 (1989).
- [59] Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., Picardo, M., Fanelli, C. & Fabbri, A. A. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryot. Cell* **7**, 988–1000 (2008).
- [60] Roze, L. V., Arthur, A. E., Hong, S. Y., Chanda, A. & Linz, J. E. The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster. *Mol. Microbiol.* **66**, 713–26 (2007).
- [61] Chanda, A., Roze, L. V., Kang, S., Artymovich, K. A., Hicks, G. R., Raikhel, N. V., Calvo, A. M. & Linz, J. E. A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19533–8 (2009).
- [62] Roze, L. V., Chanda, A. & Linz, J. E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. *Fungal Genet. Biol.* **48**, 35–48 (2011).
- [63] 田端 節子. 調理加工によるアフラトキシンの消長及びそれに及ぼす食品成分の影響. 食衛誌. **33**, 150-6 (1992).
- [64] Burgos-Hernández, A., Price, R. L., Jorgensen-Kornman, K., López-Garca, R., Njapau, H. & Park, D. L. Decontamination of aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated corn by ammonium persulphate during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **82**, 546–52 (2002).
- [65] Cotty, P. J. Influence of field application of an atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infection cotton balls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* **84**, 1270–7 (1994).
- [66] Holmes, R. A., Boston, R. S. & Payne, G. A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 559–72 (2008).
- [67] Jermnak, U., Yoshinari, T., Sugiyama, Y., Tsuyuki, R., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and

- aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 339–44 (2012).
- [68] Buchanan, R. L. & Lewis, D. F. Caffeine inhibition of aflatoxin synthesis: Probable site of action. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1216–20 (1984).
- [69] Razzaghi-Abyaneh, M., Yoshinari, T., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M -B., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Dillapiol and Apiol as specific inhibitors of the biosynthesis of aflatoxin G<sub>1</sub> in *Aspergillus parasiticus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2329–32 (2007).
- [70] Jermnak, U., Chinaphuti, A., Poapolathep, A., Kawai, R., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Prevention of aflatoxin contamination by a soil bacterium of *Stenotrophomonas* sp. that produces aflatoxin production inhibitors. *Microbiol.* **159**, 902–12 (2013).
- [71] Ono, M., Sakuda, S., Suzuki, A. & Isogai, A. Aflastatin A, a Novel inhibitor of aflatoxin production by aflatoxigenic fungi. *J. Antibiot.* **50**, 111–8 (1997).
- [72] Fukunaga, K., Misato, T., Ishii, I. & Asakawa, M. Blastacidin, a New Anti-phytopathogenic Fungal Substance, Part I. *Bull Agric Chem Soc.* **19**(3), 181-8 (1955).
- [73] Sakuda, S., Ono, M. & Ikeda, H. Blastacidin A as an inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Antibiot.* **53**, 1265–71 (2000).
- [74] Kondo, T., Sakurada, M., Okamoto, S., Ono, M., Tsukigi, H., Suzuki, A., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Effects of aflastatin A, an inhibitor of aflatoxin production, on aflatoxin biosynthetic pathway and glucose metabolism in *Aspergillus parasiticus*. *J. Antibiot.* **54**, 650–7 (2001).
- [75] Yoshinari, T., Noda, Y., Yoda, K., Sezaki, H., Nagasawa, H. & Sakuda, S. Inhibitory activity of blastacidin A, a strong aflatoxin production inhibitor, on protein synthesis of yeast: selective inhibition of aflatoxin production by protein synthesis inhibitors. *J. Antibiot.* **63**, 309–14 (2010).
- [76] Sakuda, S., Prabowo, D. F., Takagi, K., Shiomi, K., Mori, M., Ōmura, S. & Nagasawa, H. Inhibitory effects of respiration inhibitors on aflatoxin production. *Toxins (Basel)*. **6**, 1193–200 (2014).
- [77] Takeuchi, T., Aoyanagi, T., Okami, Y., Osanawa, H., Iinuma, H. & Ogawa, K. Jpn. Kokai Tokkyo Koho. 9 pp. CODEN: JKXXAF JP 03077857 A2 19910403.
- [78] Yoshinari, T., Akiyama, T., Nakamura, K., Kondo, T., Takahashi, Y., Muraoka, Y., Nonomura, Y.,

- Nagasawa, H. & Sakuda, S. Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology* **153**, 2774–80 (2007).
- [79] 村岡 靖彦, 作田 庄平. 新規ジオクタチン誘導体及びその製造方法. 特許出願番号 PCT/JP2007/051949.
- [80] 吉成 知也. 博士論文「アフラトキシン生産阻害物質の作用機構に関する研究」
- [81] Nishimura, S., Arita, Y., Honda, M., Iwamoto, K., Matsuyama, A., Shirai, A., Kawasaki, H., Kakeya, H., Kobayashi, T., Matsunaga, S. & Yoshida, M. Marine antifungal theonellamides target 3beta-hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 519–26 (2010).
- [82] Tashiro, E. & Imoto, M. Target identification of bioactive compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1910–21 (2012).
- [83] Sakamoto, S., Hatakeyama, M., Ito, T. & Handa, H. Tools and methodologies capable of isolating and identifying a target molecule for a bioactive compound. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1990–2001 (2012).
- [84] Lomenick, B., Olsen, R. W. & Huang, J. Identification of direct protein targets of small molecules. *ACS Chem. Biol.* **6**, 34–46 (2011).
- [85] Harding, M. W., Galat, a, Uehling, D. E. & Schreiber, S. L. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**, 758–60 (1989).
- [86] Schreiber, S. L. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **251**, 283–7 (1991).
- [87] Taunton, J., Hassig, C. a & Schreiber, S. L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**, 408–11 (1996).
- [88] Burdine, L. & Kodadek, T. Target identification in chemical genetics. *Chem. Biol.* **11**, 593–7 (2004).
- [89] Lerman, L. S. A Biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **39**, 232–6 (1953).
- [90] Sakamoto, S., Kabe, Y., Hatakeyama, M., Yamaguchi, Y. & Handa, H. Development and application of high-performance affinity beads: toward chemical biology and drug discovery. *Chemical record.* **9**, 66–85 (2009).
- [91] Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y. & Handa, H.

- Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. **327**, 1345–50 (2010).
- [92] 坂本直子. 修士論文「マイコトキシン生産阻害物質の作用機構に関する研究」.
- [93] Piulachs, M -D., Cassier, P. & Bellés, X. Ultrastructural changes induced by precocene II and 3,4-dihydroprecocene II in the corpora allata of *Blattella germanica*. *Cell Tissue Res*. **258**, 91–9 (1989).
- [94] Hammond, A. H., Garle, M. J. & Fry, J. R. Mechanism of toxicity of precocene II in rat hepatocyte cultures. *J. Biochem. Toxicol.* **10**, 265–73 (1995).
- [95] Colombini, M. VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*. **1818**, 1457–65 (2012).
- [96] Baker, M. A., Lane, D. J. R., Ly, J. D., De Pinto, V. & Lawen, A. VDAC1 is a transplasma membrane NADH-ferricyanide reductase. *J. Biol. Chem.* **279**, 4811–9 (2004).
- [97] Bay, D. C., O’Neil, J. D. & Court, D. A. Two-step folding of recombinant mitochondrial porin in detergent. *Biophys. J.* **94**, 457–68 (2008).
- [98] Apel, K. & Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373–99 (2004).
- [99] Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D. & Cadenas, E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* **278**, 5557–63 (2003).
- [100] Lustgarten, M. S., Bhattacharya, A., Muller, F. L., Jang, Y. C., Shimizu, T., Shirasawa, T., Richardson, A. & Van Remmen, H. Complex I generated, mitochondrial matrix-directed superoxide is released from the mitochondria through voltage dependent anion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**, 515–21 (2012).
- [101] Fukushima, T., Tanaka, K., Lim, H. & Moriyama, M. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. *Environ. Health Prev. Med.* **7**, 89–94 (2002).
- [102] White, E. J. & Clark, J. B. Menadione-treated synaptosomes as a model for post-ischaemic neuronal damage. *Biochem. J.* **253**, 425–33 (1988).
- [103] 平原 文子. ビタミン E と抗酸化性. 栄養学雑誌. **52**, 205-6 (1994).
- [104] Zielonka, J., Vasquez-Vivar, J. & Kalyanaraman, B. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat. Protoc.* **3**, 8–21 (2008).

- [105] Robinson, K. M., Janes, M. S., Pehar, M., Monette, J. S., Ross, M. F., Hagen, T. M., Murphy, M. P. & Beckman, J. S. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15038–43 (2006).
- [106] Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. & Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* **329**, 23–38 (2003).
- [107] Hynes, M. J. & Murray, S. L. ATP-citrate lyase is required for production of cytosolic acetyl coenzyme A and development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* **9**, 1039–48 (2010).
- [108] Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A. & Van Remmen, H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 477–503 (2007).
- [109] Longo, V. D., Gralla, E. B. & Valentine, J. S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 12275–80 (1996).
- [110] Montibus, M., Ducos, C., Bonnin-Verdal, M.-N., Bormann, J., Ponts, N., Richard-Forget, F. & Barreau, C. The bZIP transcription factor Fgap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One* **8**, e83377 (2013).
- [111] Goswami, R. S. Targeted gene replacement in fungi using a split-marker approach. *Proteomics* **835**, 255–69 (2012).
- [112] Colombini, M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol. Cell. Biochem.* **256–257**, 107–15 (2004).
- [113] Hodge, T. & Colombini, M. Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *J. Membr. Biol.* **157**, 271–9 (1997).
- [114] Colombini, M. Measurement of VDAC permeability in intact mitochondria and in reconstituted systems. *Methods Cell Biol.* **80**, 241–60 (2007).
- [115] Barja, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in States 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 347–66 (1999).
- [116] Audenaert, K., Callewaert, E., Höfte, M., De Saeger, S. & Haesaert, G. Hydrogen peroxide induced by the fungicide prothioconazole triggers deoxynivalenol (DON) production by *Fusarium graminearum*. *BMC Microbiology* **10**, 112 (2010).

- [117] Yao, S. H. Guo, Y., Wang, Y. Z., Zhang, D., Xu, L. & Tang, W. H. A cytoplasmic Cu-Zn superoxide dismutase SOD1 contributes to hyphal growth and virulence of *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **91**, 32–42 (2016).
- [118] Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R., & Thompson, C. B. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* **324**, 1076–80 (2009).
- [119] Cuomo, C. A., Güldener, U., Xu, J -R., Trail, F., Turgeon, B. G., Pietro, A. Di., Walton, J. D., Ma, L - J., Baker, S. E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y -L., Harris, L. J., Hilburn, K., Kennell, J. C., Kroken, S., Magnuson, J. K., Muehlbauer, G., Münsterkötter, M., Nelson, D., Donnell, K. O. & Ouellet, T. The *Fusarium graminearum* Genome. *Science* **317**, 1400–3 (2007).
- [120] Nierman, W. C., Yu, J., Fedorova-Abrams, N. D., Losada, L., Cleveland, T. E., Bhatnagar, D., Bennett, J. W., Dean, R. & Payne, G. A. Genome sequence of *Aspergillus flavus* NRRL 3357, a strain that causes aflatoxin contamination of food and feed. *Genome Announc.* **3**, e00168-15 (2015).
- [121] 近藤 竜彦. 博士論文「アフラトキシン生産阻害物質アフラスタチン A、ブラストサイジン A の作用機作の解析」
- [122] Yu, A. Y. H. & Houry, W. A. ClpP: A distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Lett.* **581**, 3749–57 (2007).
- [123] Wang, J., Hartling, J. A. & Flanagan, J. M. The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**, 447–56 (1997).
- [124] Kress, W., Maglica, Ž. & Weber-Ban, E. Clp chaperone-proteases: structure and function. *Res. Microbiol.* **160**, 618–28 (2009).
- [125] Gribun, A., Kimber, M. S., Ching, R., Sprangers, R., Fiebig, K. M. & Houry, W. A. The ClpP double ring tetradecameric protease exhibits plastic ring-ring interactions, and the N termini of its subunits form flexible loops that are essential for ClpXP and ClpAP complex formation. *J. Biol. Chem.* **280**, 16185–96 (2005).
- [126] Kang, S. G., Maurizi, M. R., Thompson, M., Mueser, T. & Ahvazi, B. Crystallography and mutagenesis point to an essential role for the N-terminus of human mitochondrial ClpP. *J. Struct. Biol.* **148**, 338–52 (2004).

- [127] Woo, K. M., Chung, W. J., Ha, D. B., Goldberg, A. L. & Chung, C. H. Protease T<sub>i</sub> from *Escherichia coli* requires ATP hydrolysis for protein breakdown but not for hydrolysis of small peptides. *J. Biol. Chem.* **264**, 2088–91 (1989).
- [128] Gottesman, S., Maurizi, M. R. & Wickner, S. Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell* **91**, 435–8 (1997).
- [129] Sauer, R. T., Bolon, D. N., Burton, B. M., Burton, R. E., Flynn, J. M., Grant, R. A., Hersch, G. L., Joshi, S. A., Kenniston, J. A., Levchenko, I., Neher, S. B., Oakes, E. S. C., Siddiqui, S. M., Wah, D. A. & Baker, T. A. Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines. *Cell* **119**, 9–18 (2004).
- [130] Van Den Brulle, J., Steidl, S. & Brakhage, A. A. Cloning and characterization of an *Aspergillus nidulans* gene involved in the regulation of penicillin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5222–8 (1999).
- [131] Rix, U. & Superti-Furga, G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 616–24 (2009).
- [132] Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S. & Maurizi, M. R. A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 4477–85 (1987).
- [133] Effantin, G., Ishikawa, T., De Donatis, G. M., Maurizi, M. R. & Steven, A. C. Local and global mobility in the ClpA AAA+ chaperone detected by cryo-electron microscopy: Functional connotations. *Structure* **18**, 553–62 (2010).
- [134] Baker, T. A. & Sauer, R. T. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim. Biophys. Acta.* **1823**, 15–28 (2012).
- [135] Bolon, D. N., Grant, R. A., Baker, T. A. & Sauer, R. T. Nucleotide-dependent substrate handoff from the SspB adaptor to the AAA+ ClpXP protease. *Mol. Cell* **16**, 343–50 (2004).
- [136] Trentini, D. B., Suskiewicz, M. J., Deszcz, L. & Mechtler, K. Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by the ClpCP protease. *Nature* **539**, 48–53 (2016).
- [137] Brötz-Oesterhelt, H., Beyer, D., Kroll, H -P., Endermann, R., Ladel, C., Schroeder, W., Hinzen, B., Raddatz, S., Paulsen, H., Henninger, K., Bandow, J. E., Sahl, H -G. & Labischinski, H. Dysregulation

- of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat. Med.* **11**, 1082–7 (2005).
- [138] Lee, B -G., Park, E. Y., Lee, K -E., Jeon, H., Sung, K. H., Paulsen, H., Rübsamen-Schaeff, H., Brötz-Oesterhelt, H. & Song, H. K. Structures of ClpP in complex with acyldepsipeptide antibiotics reveal its activation mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 471–8 (2010).
- [139] Gersch, M., Famulla, K., Dahmen, M., Göbl, C., Malik, I., Richter, K., Korotkov, V. S., Sass, P., Rübsamen-Schaeff, H., Madl, T., Brötz-Oesterhelt, H. & Sieber, S. A. AAA+ chaperones and acyldepsipeptides activate the ClpP protease via conformational control. *Nat. Commun.* **6**, 6320 (2015).
- [140] McGillivray, S. M., Tran, D. N., Ramadoss, N. S., Alumasa, J. N., Okumura, C. Y., Sakoulas, G., Vaughn, M. M., Zhang, D. X., Keiler, K. C. & Nizet, V. Pharmacological inhibition of the ClpXP protease increases bacterial susceptibility to host cathelicidin antimicrobial peptides and cell envelope-active antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1854–61 (2012).
- [141] Cole, A., Wang, Z., Coyaud, E., Voisin, V., Gronda, M., Jitkova, Y., Mattson, R., Hurren, R., Babovic, S., Maclean, N., Restall, I., Wang, X., Jeyaraju, D. V., Sukhai, M. A., Prabha, S., Bashir, S., Ramakrishnan, A., Leung, E., Qia, Y. H., Zhang, N., Combes, K. R., Ketela, T., Lin, F., Houry, W. A., Aman, A., Al-awar, R., Zheng, W., Wienholds, E., Xu, C. J., Dick, J., Wang, J. C. Y., Moffat, J., Minden, M. D., Eaves, C. J., Bader, G. D., Hao, Z., Kornblau, S. M., Raught, B. & Schimmer, A. D. Inhibition of the mitochondrial protease ClpP as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **27**, 864–76 (2015).
- [142] Barbour, J. A. & Turner, N. Mitochondrial stress signaling promotes cellular adaptations. *Int. J. Cell Biol.* **2014**, Article ID 156020, 12 pages (2014).
- [143] Haynes, C. M., Yang, Y., Blais, S. P., Neubert, T. A. & Ron, D. The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol. Cell* **37**, 529–40 (2010).
- [144] Mahoney, N. & Molyneux, R. J. Phytochemical inhibition of aflatoxicogenicity in *Aspergillus flavus* by Constituents of Walnut (*Juglans regia*). *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1882–9 (2004).
- [145] Kubo, I., Xiao, P., Nihei, K., Fujita, K., Yamagiwa, Y. & Kamikawa, T. Molecular design of

- antifungal agents. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3992–8 (2002).
- [146] Ito, S., Nakagawa, Y., Yazawa, S., Sasaki, Y. & Yajima, S. Antifungal activity of alkyl gallates against plant pathogenic fungi. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **24**, 1812–4 (2014).
- [147] Ito, S., Yazawa, S., Nakagawa, Y., Sasaki, Y. & Yajima, S. Effects of alkyl parabens on plant pathogenic fungi. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **25**, 1774–7 (2015).
- [148] Leal, P. C., Mascarello, A., Derita, M., Zuljan, F., Nunes, R. J., Zacchino, S. & Yunes, R. A. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 1793–6 (2009).
- [149] Nishihama, Y., Yoshinaga, J., Iida, A., Konishi, S., Imai, H., Yoneyama, M., Nakajima, D. & Shiraishi, H. Association between paraben exposure and menstrual cycle in female university students in Japan. *Reprod. Toxicol.* **63**, 107–13 (2016).
- [150] de Cordova, C. A. S., Locatelli, C., Assunção, L. S., Mattei, B., Mascarello, A., Winter, E., Nunes, R. J., Yunes, R. A., & Creczynski-Pasa, T. B. Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. *Toxicol. Vitr.* **25**, 2025–34 (2011).
- [151] van der Heijden, C. A., Janssen, P. J. C. M. & Strik, J. J. T. W. A. Toxicology of gallates: A review and evaluation. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 1067–70 (1986).
- [152] World Bank. World Development Report 1993, Investing in Health. New York: Oxford University Press. (1993).
- [153] Jayashree, T. & Subramanyam, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 981–5 (2000).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、すばらしい研究環境と懇切丁寧なご指導、多大なご助言を頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻、作田庄平准教授に心より感謝いたします。

実験の方針や研究への取組み方、日々の生活に至るまで、懇切丁寧なご指導、数々のご助言を頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻、鈴木道生講師に心より感謝いたします。

見識に富んだ多くのご助言、叱咤激励を頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻、長澤寛道名誉教授に心より感謝いたします。

3-ADON の定量にご協力頂くだけでなく、実験および解析の手法や結果の解釈について、多くのご指導と大変有意義なご助言を頂きました、国立医薬品食品衛生研究所、吉成知也博士に心より感謝いたします。

プラスミド DNA をご提供頂くだけでなく、破壊株の作製法や結果の解釈について、大変有意義なご助言を頂きました、名古屋大学大学院 生命農学研究科、木村真准教授に心より感謝いたします。

diocatin および diocatin 誘導体を合成して頂きました、東海大学工学部、片山秀和准教授、市川琢万氏に心より感謝いたします。

LC/MS/MS によるタンパク質の同定にご協力頂きました、東京大学 分子細胞生物学研究所、根岸瑠美博士に心より感謝いたします。

N 末端シーケンサー解析によるアミノ酸の配列解析にご協力頂きました、応用生命化学専攻 先端機器分析室、黒岩真弓博士に心より感謝いたします。

シリング酸アルキルおよび類縁化合物の研究に関し、多くの協力を頂きました、東京大学大学院新領域創成科学研究科、木村太一氏に心より感謝いたします。

研究方針、実験手技などについて大変多くのご指導、ご助言を頂きました、東京大学大学院新領域創成科学研究科、永田晋治准教授に心より感謝いたします。

実験方法や機器の操作等、多くのご指導とご助言を頂きました山本利義博士、飯村九林博士に心より感謝いたします。

最後になりましたが、研究生活におけるさまざまな面で大いに筆者を支えてくださいました生物有機化学研究室の皆様、および精神的にも経済的にも筆者を支えてくださいました家族に心より感謝いたします。