

Fusarium sporotrichioides T-2 トキシソ産生株

に関する研究

深谷宣仁

1995

Fusarium sporotrichioides T-2 トキシン 産生株
に関する研究

深 谷 宣 仁

1 9 9 5

目 次

I	緒 言	1
II	材料と方法	1 2
	1. 供試菌株	1 2
	2. 培地と培養条件	1 2
	3. trichothecene 系マイコトキシンの解析法	1 3
	1) trichothecene 系マイコトキシンの抽出法	1 3
	2) trichothecene 系マイコトキシンの GLC 測定法	1 3
	4. 蛋白質試料の調製法 (sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミド ゲル電気泳動 法および二次元電気泳動用試料)	1 3
	5. 蛋白質定量法	1 4
	6. 電気泳動法	1 4
	1) sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)	1 4
	2) 二次元電気泳動法	1 5
	7. 電気泳動後のゲルの染色法	1 6
	1) 銀染色	1 6
	2) Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 染色	1 6
	8. 二次元電気泳動ゲルのコンピューター解析法	1 7
	9. N-末端アミノ酸配列分析法	1 7
	1 0. N-末端ブロックのデブロック法	1 8
	1 1. シークエンス解析における o-phthaldialdehyde 法	1 8

1 2.	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) の酵素活性測定	----	1 9
Ⅲ	成 績	-----	2 1
1.	アスパラギン 添加による <i>F.sporotrichioides</i> (M-1-1 株と R2301 株) の trichothecene 産生性の変動	-----	2 1
1)	<i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株	-----	2 1
2)	<i>F. sporotrichioides</i> R2301 株	-----	2 2
2.	アスパラギン 添加による <i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株の 菌体発育と 菌体蛋白質量の変動	-----	2 2
1)	菌体発育の変動	-----	2 2
2)	菌体蛋白質の変動	-----	2 3
3.	<i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株菌体蛋白質の電気泳動と N-末端アミノ 酸配列分析	-----	2 3
1)	<i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株菌体蛋白質の sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	-----	2 3
2)	<i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株菌体蛋白質の二次元電気泳動	----	2 4
3)	二次元電気泳動によって分離した <i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株菌 体蛋白質の N-末端アミノ酸配列分析	-----	2 4
4.	<i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株菌体蛋白質における N-末端ブロックア ミノ酸の無水ヒドラジン分解およびアミノ酸配列分析	-----	2 6
5.	アスパラギン 添加における 2 種類の蛋白質の変動	-----	2 6
1)	アスパラギン 添加による peptidyl-prolyl cis-trans isomerase の 変動	-----	2 6
2)	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase の o-phthaldialdehyde (OPA) 反応	-----	2 7
3)	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase の酵素活性測定	-----	2 8

4) アスパラギン 添加による glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の変動	2 8
IV 考 察	3 0
1. アスパラギン 添加による <i>F. sporotrichioides</i> (M-1-1 株と R2301 株)の trichothecene 産生の変動	3 0
2. アスパラギン 添加による <i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株の菌体発育と菌体蛋白質量の変動	3 1
3. <i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株菌体蛋白質の電気泳動と N-末端アミノ酸配列分析	3 3
4. <i>F. sporotrichioides</i> M-1-1 株菌体蛋白質における N-末端ブロックアミノ酸の無水ヒドラジン分解	3 5
5. アスパラギン添加における 2 種類の蛋白質の変動	3 7
V 総括および結論	4 2
VI 謝 辞	4 5
VII 引用文献	4 6

Table 1-2

Figure 1-18

I 緒 言

真菌は発育・増殖を繰り返す上で様々な代謝機能を発揮する。この代謝機構の中心は各種の酵素であり、栄養源となる基質が真菌の異化作用により分解され同時にエネルギー産生を伴う。真菌はこのエネルギーを同化作用に利用して発育する。このような生物に共通する基本的代謝が一次代謝である。また、発育成長した真菌において、その個体の生命活動に果たす役割の不明な代謝機構が二次代謝であり、この最終産物が二次代謝産物である。

一般に微生物細胞(細菌・真菌・原虫及び未分化な細胞)に選択毒性を有するものが抗生物質であるのに対し、植物毒性や動物毒性を示すものを真菌毒と言う。この真菌毒には、抗原性を有する比較的病原性の強い真菌によって産生される高分子真菌毒素と、抗原性を欠き、一般に動物に対する真菌の病原性の強弱に関係なく産生される低分子真菌毒素が存在する。この低分子真菌毒素がマイコトキシンと呼ばれて真菌中毒症を引き起こす。

1940年以降真菌中毒症における数多くの重要な報告がなされるようになった。マイコトキシンによって引き起こされた真菌中毒症の最初の報告は、最も初期にかつ熱心に研究されたVertinskii(1940年)の1931年ウクライナ地方におけるスタキボトリス中毒症(*Stachybotryotoxicosis*)に関する知見であった[139]。これは、その原因が明かにされる以前に旧ソ連においてMZ(Massovie zabolivanie)と略称され、数千頭の馬が死亡するなどの経済的に重大な損失を招来する疾患として知られていた。1945年、その原因がこれまで無害なカビと考えられていた*Stachybotrys atra*のトキシンによることがDrobotkoらによって明らかにされた[28]。第二次大戦終了後アジアから輸入した米が、黄色色素を生成するカビで汚染されていた黄変米事件(1954年)に端を発して、汚染*Penicillium*属菌より肝発癌性luteoskyrin[113]、腎毒性citrinin[104, 108, 112]、神経毒citroviridin[60, 136]など

のマイコトキシンが真菌中毒症の原因として同定された。また，1960年，英国各地において10万羽以上に及ぶ七面鳥ならびにアヒルの雛がわずか数カ月のうちに斃死したTurkey-X病に端を発し，*Aspergillus flavus* 由来の aflatoxin B1 (AFB1) が同定された [5, 143, 144, 145]。現在までに aflatoxin は，*A. parasiticus* によって産生される aflatoxin も含めて8種の構造類似体が単離されており，その強力な肝発癌性と食品汚染の面から最も注目されている。

Fusarium 属によって産生されるマイコトキシンは約40種類のものが知られているが [84]，その主要なものに T-2トキシン (T-2)，nivalenol (NIV)，diacetoxyscirpenol (DAS)，neosolaniol (NS)，deoxynivalenol (DON)，HT-2 toxin (HT-2)，fusarenon-X (FX) などのtrichothecene系マイコトキシンがあげられる [84]。歴史的には，trichotheceneの名は，1948年に，初めて分離された trichothecene の *Trichothecium roseum* にちなんで付けられ，1949年に trichothecin 抗真菌性物質として最初に発見され [49]，次いで，1961年に Brian ら [20] が *Fusarium equiseti* から DAS を植物に対する毒性物質として単離して以来，その産生菌と代謝産物が世界各地で分離・同定され，現在では，約200種に及ぶ化合物が確認されている [129]。

今回の研究に供された *Fusarium* 属の一種である *Fusarium sporotrichioides* (以下 *F. sporotrichioides* と略す) は，北ヨーロッパ・北アメリカ・カナダ・日本(北海道)・旧ソ連のような世界の寒冷地域において，土壌や広範囲にわたる植物群，特に種子や草木に生息しており [125]，赤色色素を産生することから赤かび中毒症として世界各地に知られている。*Fusarium* 菌は，かなりの低温(0℃以下)でも発育することが認められ，カナダと旧ソ連では，雪の下で越冬した種子からの *Fusarium* 菌分離報告がある [128]。

本菌は，不完全菌類の線菌綱，Moniliales目，Phialoconidia形成菌群の *Sporotrichiella* 菌群，*Fusarium* 科，*Fusarium* 属に属する糸状菌で，菌糸は有隔性，

植物寄生により分生子柄は分生子層を形成する。大型のフィアロ型分生子は 2 ～ 6 細胞性で三日月状に湾曲することを特徴とする。集落は色素産生により赤色を呈し、西洋梨形～棍棒状で非連鎖性の小分生子は単純性フィアリッドに多数生じる。大分生子は狭幅性紡錘状～鎌形で気中菌糸および分生子座に生じ、厚膜胞子の形成も見られる [119]。 *F. sporotrichioides* によって産生される trichothecene 系マイコトキシンには、 acetyl T-2 toxin, butenolide, DON, DAS, diacetylivalenol, FX, HT-2, NS, NIV, NT-1, NT-2, T-1 toxin, T-2, T-2 tetraol, zearalenone の 15 種類が報告されている [84]。

我が国における赤かび中毒症の報告 [133] は、1909 年の古くからイネや小麦に大規模な被害をおよぼすことで大変有名であり、trichothecene 系マイコトキシンは、穀物や飼料、食品を汚染して家畜や人に障害を引き起こす [128]。米・小麦・大麦・燕麦・トウモロコシ等の穀物が *Fusarium* 菌の被害を被っている [126]。諸外国と共通して見られる急性中毒症は、嘔吐・悪心・餌の拒否反応・下痢等が上げられ、被害動物は人を含め家畜全般にわたっている [126]。

また、1942年に旧ソ連で発生した多数の死亡例を含む食餌性無白血球症 (alimentary toxic aleukia, ATA) の原因の 1 つは、T-2 によると考えられている [38]。T-2 の汚染頻度は DON・NIV に比べるとあまり高くはないが、trichothecene 系マイコトキシンの中で最も強い細胞毒性を示す点で重要である [68]。

T-2 は、活発に蛋白合成を抑制し、その結果として骨髄の機能障害を招く [93, 95, 130, 131, 135]。その報告により、ネズミと猫に造血器障害を引き起こすことがわかった。また、鶏の飼料への T-2 投与実験では、卵の生産性の低下と卵殻の薄肥化、および口内炎、飼料消費量の低下、白血球数減少、血清蛋白質や総脂質の減少が観察されている [68]。Ueno らによる調査では、高感度の ELISA を用いることによって T-2 による農機具用品の世界中の汚染を明らかにしている [22, 69]。

trichothecene は、熱帯植物の *Baccharis megapotamica* に加えて *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Trichothecium* や *Trichoderma* 属の植物病原真菌の他、様々な *Fusarium* 菌によって産生される [127]. trichothecene 類の毒性発現は、真核細胞における蛋白質や DNA の生合成阻害によるもので [93, 95, 130, 131, 135], 特に蛋白質の生合成阻害はリボソームへの強い親和性によるもので、真核細胞の 80S リボソームに結合しリボソームサイクルを停止させ、その結果リボソーム構造を低分子化し、生合成の初期段階と延長段階を阻害する [68]. この際、trichothecene 骨格の活性中心とされる 12,13-epoxytrichothecene 環が重要な役割を果たすものと考えられている. そのため、trichothecene は、細胞増殖の盛んな臓器である腸管上皮、骨髄、脾臓、精巣、卵巣などに対して障害を招く.

trichothecene は、化学的には酸素原子を含む sesquiterpene であり、その生合成経路に関しては多くの研究がなされている. 酢酸から生じるメバロン酸を前駆体とし、イソプレネールに従って生合成されるが、その過程に酸素添加反応やメチル基および水素の転移反応が含まれることが、様々な中間体の同定より明らかにされている [33, 83].

人が trichothecene に暴露されていることは、近年報告されたインドのカシミール地区における赤かび汚染の小麦で作ったパンによる下痢や嘔吐などを特徴とした多数の中毒例の発生、また、中国における同様な食中毒の報告例 [142] から明らかである.

trichothecene における猫や豚での中毒学的特性には、悪心、嘔吐、下痢、出血の他、皮膚粘膜刺激性、白血球数減少、再生不良性貧血などが上げられる [128]. また、マウスやラットを用いた発癌性における動物実験も数多く報告されている [94, 134]. 南アメリカや中国でも、喉頭癌の多発と trichothecene による汚染との関連性が報告されている [69].

このような、環境の自然毒物である trichothecene の生合成と分解における抑制系を確立するため、現在までに多くの研究が進められている。

Hohn ら [63] は、trichothecene 生合成に関与する酵素として、trichodiene synthase を *F. sporotrichioides* から分離報告し、sesquiterpene cyclase と trichodiene synthase の間で trichothecene における共通の環を有し、生合成のキーエンザイムであることを明らかにしている。trichodiene synthase は、*Fusarium* 属菌から発見された初めての酵素であり、その酵素活性は、*Trichothecium roseum* の細胞抽出において初めて見付けられた [25]。trichothecene における trichodiene synthase は、その原器である trichodiene のファルネシルピロリン酸 (farnesyl pyrophosphate acid) を閉環することが明らかにされているが [63]、trichodiene に酸素を添加する酵素に関しては未だ明かでない。Desjardins らは、 $H_2^{16}O$, $H_2^{18}O$, $^{16}O_2$, $^{18}O_2$ などの同位体酸素系分子による ($H_2^{16}O$, $^{16}O_2$), ($H_2^{18}O$, $^{16}O_2$), ($H_2^{16}O$, $^{18}O_2$), ($H_2^{18}O$, $^{18}O_2$) の 4 種の (水, 酸素) の組み合わせを各々含む培地を用い、T-2 産生性 *F. sporotrichioides* NRRL 3299 株を培養し、得られた培養液の酢酸エチル抽出物中の T-2 について、gas-liquid chromatography -mass spectrometry (GC-MS) で分析することにより、T-2 の酸素原子の由来を報告し、ピラン環、エポキシ環、3 位の水酸基、および 4, 8, 15 位に付いた酸素は分子状酸素に由来し、3 個のアセチル基のカルボニル酸素は水から発生することを明らかにし [13, 25, 27]、さらに、Desjardins ら [24] は、高等植物ミクロソーム中のチトクローム P-450 系モノオキシゲナーゼ反応を阻害することで知られる ancyimidole が、*F. sporotrichioides* NRRL 3299 菌株における T-2 の生合成を阻害し、trichodiene を蓄積することを報告し [26]、trichothecene の生合成に酸素添加酵素としてチトクローム P-450 モノオキシゲナーゼ系が関与している可能性を示唆した。

Bhatnagar ら [16] は、*A. parasiticus* 菌体中に、P-450 モノオキシゲナーゼ系が存在することを見だし、さらに、フェノバルビタール添加培地で培養することに

より、この菌体中の NADPH-チトクローム P-450 レダクターゼ活性およびベンズフェタミンを基質としたモノオキシゲナーゼ活性が上昇し、同時に、二次代謝産物である aflatoxin の産生量も上昇したことを報告した。これらの報告は、afratoxin の生合成に P-450モノオキシゲナーゼ系が関与していることを示唆した。一方、Shou ら [114, 116] は、大豆油を含む培地で培養した *F.oxysporum* 菌体中から、リノレン酸を基質とするリポキシゲナーゼ活性を持つ P-450 を単離精製し、これを *Fusarium* P-450 と名付け、この *Fusarium* P-450 には、ラウリン酸とパルミチン酸を基質とする水酸化反応触媒活性があることを報告した。さらに、Shoun ら [115] は、この菌体中より、チトクローム b_5 を単離する値同時に、菌体破碎液 (cell-free extract) 中に、NADPH-チトクローム C レダクターゼ活性と NADH-ファルネシルレダクターゼ活性を見だし、*F. oxysporum* 菌体中にも哺乳動物の肝ミクロソームと同様の電子伝達系が存在することを示唆した。

また、Beremand ら [13] は、*F. sporotrichioides* NRRL 3299 株において、アミノ酸の 1 つである L-ロイシンが、T-2 に存在するイソ吉草酸部分の直接の前駆体であることを示唆し、同時に、*Fusarium* 菌の蛋白質における研究が、T-2 の生合成に関連して行われている。Desjardins ら [25] は、先にのべたように、 $H_2^{18}O$ と $^{18}O_2$ の混合実験の結果、T-2 におけるイソ吉草酸カルボニル酸素は、水に由来していることを示唆したが、これは、イソ吉草酸部分が、脱カルボキシレートアミノ基転移反応 (decarboxylative transamination) を媒介する L-ロイシンから誘発されている可能性を示唆している。真菌の菌体から抽出された蛋白質の精製法には、処理する蛋白質の量・安定性・性状（溶液か沈殿か）に応じて適当な方法を選ぶ必要があり様々な方法が存在する。電気泳動を主体としたポリアクリルアミドゲル電気泳動法 [44] を始め、塩析分画法 [1] やイオン交換カラムクロマトグラフィー法 [98]、ゲル濾過法 [37] やアフィニティークロマトグラフィー法 [82]、高速液体クロマトグラフィー法 [66] など様々な方法が紹介されている。

電気泳動法は多種の成分を含む蛋白質試料を分離・分析する際に有用な方法であり、ゲル電気泳動法による蛋白質の分離には、sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法[3, 65, 57, 138], 濃度勾配ゲル電気泳動法 [85], ゲル等電点電気泳動法 [21, 65, 71]や固定化 pH 勾配ゲル等電点電気泳動法 [2] など様々なゲル電気泳動法が開発されたが、さらに高い蛋白質の分解能を必要とする時、二次元電気泳動法 [11, 12, 137] は極めて有用である。

二次元電気泳動法は 1975 年 O'Farrell [91] により発表され、蛋白質の等電点 (pI: isoelectric point) と分子量の互いに独立した性質により 2 段階に分けて分離するものである。すなわち、一次元目で等電点の差により分離し、二次元目で分子量の違いにより泳動分離する方法で、この全く原理の異なる方法を組み合わせた方法が二次元電気泳動法である。この方法により中性付近を中心にかなり広い等電点領域の蛋白質を高い分解能で分離することができるようになった。

その後、O'Farrell の二次元電気泳動法は非常に多くの研究者に利用され数多くのデータも得られたが、myosin 重鎖を始めとする高分子量成分の分析ができなかったり、得られた pH 範囲が狭いなどの問題を抱え、改良がさかんに行われてきた。また、最近では蛋白質の分離・精製のための調整用としてさらに二次元電気泳動法を改良し、slab non-equilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) / SDS-PAGE という容易なアミノ酸配列の決定および抗体作成を可能にする方法も考案されている [51]。

一次元目の等電点電気泳動法は、ポリアクリルアミド、アガロース、セファデックス等を支持体として行う方法と、支持体を用いないショ糖やグリセロールの密度勾配を持つ自由溶液系が知られている。近年、一次元目の等電点電気泳動法に、新しい両性担体として Immobiline (Pharmacia 社) が使い始められた。この両性担体は、アクリルアミドの誘導体であるためアクリルアミドおよびメチレンビスアクリルアミドと混合して重合されると、支持体に固定化される。両性担体が固定

化されているために狭い pH 範囲でも安定な pH 勾配が得られ、これまで以上の高分解能が得られるようになった。本研究でも、*F. sporotrichioides* M-1-1 株の菌体蛋白を分離する際に、二次元電気泳動法を取り入れ、その一次元目には、Immobiline を使用した [6, 43, 76]。

蛋白質の分離・精製技術の発達とともに、蛋白質の変性および再生反応に関する研究も進められてきた。その歴史は古く、1930 年代にまでさかのぼるが、完全な unfolded 状態の 1 本鎖のポリペプチド鎖から天然三次構造が形成されることを明らかにしたのは、1950 年代後半から始まり 1973 年に発表された Anfinsen ら [7] の研究であった。彼らは、尿素で変性させたリボヌクレアーゼ A を透析によって尿素を取り除き、天然条件に戻すと、未変性のものと同じジスルフィド結合を持つもとの活性あるリボヌクレアーゼ A が再生することを示した。それ以来、一般にポリペプチド鎖は合成後、自然な自己集合 (self-assembly) によって機能的な分子構造になると考えられてきた。

しかし、これに対する例外はすぐに見つかった。シアン化合物の解毒作用に関与する酵素ロダネーゼ (rhodanese) は 293 個のアミノ酸からなる 1 本のポリペプチド鎖だが、二つのドメイン構造をとるために変性状態からの自律的な再生は起きない [87]。

膜通過におけるポリペプチドは、合成直後に高次構造をとってしまっただけでは膜を通過することができない。また、輸送先では機能的な高次構造への折りたたみやサブユニット会合が正確に迅速に行われる必要があるが、熱力学的な自然集合だけでは誤った構造に成りかねない。翻訳後のポリペプチド鎖に介添えして分子内および分子間における正しい高次構造の構築や膜透過を助ける蛋白質として、分子シャペロン (molecular chaperone) と総称される分子の概念が確立したのは、90 年代にはいつてからである。

分子シャペロンには、いくつかの蛋白質ファミリーがあり、ポリペプチドの正

しい集合を媒介する蛋白質であるが、いずれもそれ自身は最終的な機能を持つ構造の構成要素にはならない蛋白質と定義されている[54].

分子シャペロンのような機能蛋白質に関する研究は、決して容易なことではないが、その基盤ともいえる蛋白質のアミノ酸配列分析の研究は、極めて重要であろう。アミノ酸の一次構造解析は、蛋白質の構造やその機能の解明には絶対不可欠である。最近、DNAの塩基配列から蛋白質のアミノ酸配列を推定できるようになったが、必ずしも全ての蛋白質について適用できるとは限らない。また、翻訳中や翻訳後の蛋白質の修飾に関する情報、例えば、翻訳中におけるシグナルペプチドの除去、翻訳後のリン酸化部位、糖鎖の付加位置などに関する情報も得ることができない。従って、DNA解析技術が発達した今日でも、蛋白質のアミノ酸配列分析は重要である。

また、蛋白質のアミノ酸配列を、たとえそれが部分的であったにしても決定することができれば、その配列に対応するオリゴペプチドを合成することができるので、これをプローブにして、その蛋白質をコードする遺伝子をクローニングすることができる[58].

蛋白質のアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴペプチドをプライマーとして用いれば、PCR (polymerase chain reaction) 法により、特定の蛋白質をコードするDNAだけを増幅することができ、Leeら[79]やFordham-Skeltonら[38]は、この方法で増幅されたDNAをプローブにし、より効率的なクローニングに成功している。このように遺伝子クローニングのためのアミノ酸配列分析の重要性は急速に高まってきている。

Edman [31, 32] は、1949年に蛋白質やペプチドのN末端からのアミノ酸配列分析の優れた手法を開発した。この方法は、エドマン法またはエドマン分解と呼ばれ、phenylisothiocyanate (PITC; エドマン試薬) をカップリング試薬として用いることから、PITC法とも呼ばれている。PITCは、カップリング後の強酸によ

る N-末端ペプチド結合の特異的切断を可能にし、この反応特性がなくては、蛋白質やペプチドのアミノ酸を N 末端から順次分離していくことはできない。

そして、Edman [32] は、1967 年に Begg とともにアミノ酸配列を自動的に分析する初のアミノ酸配列分析装置を開発した。これは、試薬を液体の形で添加してエドマン分解を行うもので、液相シーケンサーと呼ばれた。Edman らの液相シーケンサーは、当時としてはかなり画期的であったものの完全な自動化ではなく、また、分析には 250 nmol 以上の比較的多量の蛋白質が必要であるなど、様々な問題があった。

その後、多くの研究者によってあらゆる改良が行われ、1981 年、Hunkapiller, Hood ら [55] によって新しいタイプのシーケンサーが開発された。彼らの装置では、分析に用いる一部の試薬を気体として反応させるもので、気相シーケンサーと呼ばれた。気相シーケンサーは、数十 pmol レベルのきわめて微量の蛋白質あるいはペプチドでもアミノ酸配列を決定できるようになり、1981 年以降、多くの研究室に導入された。

1985 年、Vandekerckerckhove ら [137] は、ゲル電気泳動で分離した蛋白質を、ポリブレン処理したガラス繊維濾紙にブロットし、転写されたガラス繊維濾紙上の蛋白質スポットを切り取り、気相シーケンサーのエドマン反応槽に挿入して、アミノ酸配列を決定することに世界で初めて成功した。その 2 年後、1987 年、Matsudaira [85] は、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にブロットしても、気相シーケンサーでアミノ酸配列を決定できることを示した。PVDF 膜は、ガラス繊維濾紙に比べ、蛋白質結合容量が大きく、取り扱いやすいといった理由から、この方法は急速に広まった。今回、二次元電気泳動によって分離された *Fusarium* 菌体蛋白質は、Matsudaira の方法に準じ、気相シーケンサー (Applied Biosystems 社 477 A) で、アミノ酸配列分析を実行した。

現在でも、trichothecene 系マイコトキシンによる人および家畜への汚染は、確

実に存在する。この現状において、trichothecene の中でも最も強い細胞毒性を示す T-2 の生合成とその調節に関連する蛋白質の究明は極めて重要である。 *F. sporotrichioides* M-1-1 株は、我が国の中で T-2-producer として初めて分離されて以来 [133]、様々な研究の中で試験菌として供され、20 年以上にわたり T-2 を産生するための高い能力を維持している。 *Fusarium* 菌の蛋白質に関する報告は、前述したように、T-2 生合成のキーエンザイムであることが明らかにされている trichodiene synthase の分離のみである。

本論文では、 *Fusarium* 属真菌によって産生される trichothecene 系マイコトキシン、T-2 の生合成とその調節に関連する蛋白質を明らかにすることを目的とし、二次元電気泳動の導入によって、 *F. sporotrichioides* M-1-1 株の菌体蛋白質の分離を初めて試みた。二次元電気泳動によって分離された蛋白質スポットのうち、数種の蛋白質を、Matsudaira の方法に準じてアミノ酸配列分析にかけ、得られた新しいアミノ末端部分配列は、PIR 蛋白質のデータベース [9] による相同性検索によって解析、T-2 producer に関連していると推察される数種の蛋白質について比較検討した。また、細胞質における蛋白質の folding に関係していると推察される分子シャペロンの一種が分離され、その酵素活性を確認した。これらの知見は、T-2 生合成のメカニズムを研究する上で有効な手がかりになるばかりでなく、今後、T-2 産生に関与する酵素系の発現を支配する遺伝子群の特定とその存在様式（真菌染色体性・bacteriophage・plasmid）を明らかにする上で大変有用であり、T-2 産生を支配する遺伝子群が特定できれば、他の多くの有毒真菌株についても類似手法で解析可能となり、家畜・家禽におけるマイコトキシン中毒症の診断・予防対策に役立つこととなる。著者は、これらの基礎となる研究を試み、いくつかの興味ある結果を得たのでその内容について報告する。

II 材料と方法

1. 供試菌株

研究に使用した菌株は、東京理科大学薬学部毒性学・微生物化学教室より分与され、麻布大学微生物学第一講座に保存されているトリコテセン系毒素 (T-2 toxin) 産生菌 *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 株、及び *F. sporotrichioides* R2301 株を用いた。使用菌株は、ポテトデキストロース寒天斜面培地 [18] で 4℃ に保存されているものを、3～5 mm 四方の寒天ごとポテトデキストロース寒天平板培地に接種し、25℃ で 7 日間培養（赤色色素の産生が悪い場合はさらに 7 日間の継代培養を行った）した。形成された菌糸及び分生子は、3～5 mm 四方の寒天ごと Czapek-Dox Broth 培地 (Difco Lab.) の 100 ml に接種し、500 ml の坂口フラスコで 25℃, 120 rpm (TA60R, 高崎科学器械) で 3 日間振盪培養を行った。培養後その発育菌は、六つ折り滅菌ガーゼによる濾過によって菌糸を除去し、分生子を 1,760 × g 10 分間遠心し、沈殿を滅菌蒸留水に懸濁した。同様の操作を 2 度繰り返した後、 1×10^5 /ml に調整して実験に供した。

2. 培地と培養条件

1×10^5 /ml に調製した菌液の 1 ml を 100 ml の sucrose yeast extract peptone (SYP) 液体培地 (5% sucrose, 0.1% yeast extract ; Difco Lab., 0.1% Bact-peptone ; Difco Lab.) [67] に接種し、500 ml の坂口フラスコで 25℃, 2～7 日間, 120 rpm (TA60R, 高崎科学器械) で振盪培養を行った。2 日間の培養後、5% アスパラギン溶液 [蒸留水に溶解した アスパラギン溶液を pore size 0.22 μm のメンブランフィルター (Millipore 社, USA) で濾過滅菌した] 1 ml を、各々のフラスコに添加し、培養は更に 1～5 間続けた。培養後の菌糸体は、六つ折り滅菌ガーゼで集め、50 ml の滅菌蒸留水で洗浄し、直ちに -80℃ に凍結後、凍結乾燥を行った。

3. trichothecene 系マイコトキシンの解析法

1) trichothecene 系マイコトキシンの抽出法

菌糸体からのマイコトキシンの抽出は、*F. sporotrichioides* M-1-1 株 1×10^5 /ml の SYP 培地培養中または培養後の培養液から、経時的に 5 ml ずつ無菌的に採取したものを、等量の酢酸エチルを加えて 10 分間転倒混和し、酢酸エチルエステル抽出で行った。混和後、室温で $1,800 \times g$ 10 分間遠心、その上清（酢酸エチルエステル層）をマイクロチューブに小分けし、窒素スチーム下で濃縮したものを gas-liquid chromatography (GLC) 法で解析した。

2) trichothecene 系マイコトキシンの GLC 測定法

濃縮サンプルは、反応液として N-trimethyl-imidazole, 触媒として N,O-bis-trimethylsilylacetamide, 反応強化剤として trimethylchlorosilane (3:3:2) を含む trimethylsilylating reagent (和光純薬工業) で室温 30 分間 trimethylsilyl (TMS) 化し揮発化を行った。GLC 解析 [55] は水素炎イオン化検出器を備え付けた gas-chromatograph (GC-14A 型, 島律製作所) で行った。ガラスカラム (4 mm \times 1.6 m, 島律製作所) には, 100-120 mesh Chromosorb WHP (ジーエルサイエンス) を 1.5% Silicone OV-17 (ジーエルサイエンス) で覆った充填剤を用いた。カラムの設定温度は $2.5^\circ\text{C}/\text{min}$ の割合で $220\text{-}280^\circ\text{C}$ に設定し, injection と detection の温度は 300°C に保った。窒素, 水素ガス及び空気の流入速度は各々 60, 50, 500 ml/min で実施した。データは全てクロマトパック PC180A (島律製作所) により記録した。

4. 蛋白質試料の調整法 (sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 および二次元電気泳動用試料)

凍結乾燥した *F. sporotrichioides* の菌糸体は, 液体窒素を加えながら海砂 (20-35 メッシュ, 和光純薬工業) とともに粉末状になるまでよくすり潰した。蛋

白抽出バッファー [50 mM Tris-HCl buffer pH 6.8, 10 mM MgCl₂, 0.1% (v/v) β -mercaptoethanol, 2 mM phenylmethl sulfonyl fluoride, 0.2 mM dithothreitol (DTT)]は, Roux ら (100) の方法を改良して調製し使い, 2時間抽出後, 4°Cで 47,500 × g 30分間遠心分離を行った. その上清を 1.5 ml 容マイクロチューブに 400 μ l ずつ分注し, 最終濃度 5% となるようにトリクロール酢酸 (TCA) を加え, 混和後, 4°Cで一晩静置した. TCA 沈殿によって得られた蛋白は, 4°Cで 1,400 × g 10分間遠心, 上清を除き, 沈殿をジエチルエーテルに懸濁, 遠心した. 同様の操作を 4回繰り返して TCA 除去後, 減圧下でジエチルエーテルと TCA を除去することによって試料を濃縮乾固し, 実験まで -80°Cで保存した.

5. 蛋白質定量法

蛋白質の定量は, Ramagli と Rodriguez らの方法 [106] に準じ, 総蛋白質の色素定量法試薬 (Bio-Rad 社, USA) を用いた Bradford 法に基づく比色定量法で測定した. -80°C保存蛋白質試料をサンプル溶解バッファー [9 M urea, 1% (w/v) DTT, 2% (w/v) Ampholyte pH 3 -10 (Millipore, USA) , 0.5% (v/v) Triton X-100 (Pharmacia, Sweden)] に溶かし, よく攪拌後 25°C, 43,000 × g 10分間遠心し, その上清を蛋白質定量用サンプルとした. この蛋白質溶液 10 μ l に, 0.1 N HCl 10 μ l を加え攪拌, 更に蒸留水 10 μ l を加え攪拌し, 5倍希釈 Dye reagent (Bio-Rad 社, UAS) 3.5 ml を加えよく攪拌, 室温で5分以上インキュベート後, 分光光度計にて 595 nm の波長で測定した. 蛋白質量は, egg ovalbumin を標準蛋白質として得られた検量線により算出した.

6. 電気泳動法

1) sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は, Laemmli らの方法 [77] に基づき 0.1% SDS を含む 15.0% ポリ

アクリルアミドゲル [14.8% acrylamide, 0.2% N,N'-Methylene-bis acrylamide, 2.25 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.07% ammonium persulfate (APS, ammonium peroxodisulfate), 0.07% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)] で日本エーダーの電気泳動システムを使って行なった。泳動条件は、蛋白質試料が stacking gel を抜けるまでは 25 mA の定電流、running gel に到達すると 35 mA の定電流で over running (3 時間 15分) した。

電気泳動時に用いられた蛋白質試料は、アスパラギンを添加した 3 日間培養菌体蛋白で、そのうち 33 μ g/100 μ l が一回に用いた。

2) 二次元電気泳動法

二次元電気泳動は、一次元目から、予め蛋白質試料に外挿標準標準蛋白質として混合し、実行された。標準蛋白質は、SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range (lactoferrin-bovine milk, serumalbumin-bovine, actin-bovinemuscle, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-chicken muscle, carbonic anhydrase-bovine erythrocyte, trypsin inhibitor-soybean, myoglobin -horse heart, lysozyme-chicken egg, lactalbumine-bovine milk) (Bio-Rad 社) を使用した。泳動後のゲルを銀染色する場合は、蛋白質試料 0.4 mg に対し 0.2 μ g, CBB-G250 染色の場合は、蛋白質試料 2 mg 対し 2 μ g の標準蛋白質を混ぜた。一次元目のゲル等電点電気泳動は、gradient pH 3.0-10.5 の Immobiline drystrip (18 cm, Pharmacia 社) を用い、水平型電気泳動システム, Multiphor II (Pharmacia 社) で行った。Immobiline drystrip は、膨潤液 [8 M urea, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) Ampholyte pH 3-10 (Millipore 社), 0.2% (w/v) DTT, 0.001% orange G] で 6 時間以上膨潤した。二次元電気泳動のための蛋白質試料は、9 M urea, 1% (w/v) DTT, 2% (w/v) Ampholyte pH 3-10 (Millipore 社), 0.5% (v/v) Triton X-100 (Pharmacia 社) [125] から成るサンプル溶解バッファーで、37°C 2 時間のインキュベーション後、25°C, 43,000 \times g 10 分間遠心した上清を用いた。一次元目の泳動は、最初の 8 時間を 500

V, 次の 15 時間を 3,500 V の計 23 時間行った。1 次元目終了後のゲルは, 0.05 M Tris-HCl pH 6.8, 6 M Urea, 30% (v/v) glycerol, 1 % (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 16 mM DTT, 0.01% bromophenol blue (BPB) から成る平衡化バッファーで 15 分間平衡化した。

二次元目の SDS-PAGE は, Laemmli [77] の方法に準じ, 13.5% running gel (13.1% acrylamide, 0.4% N,N'-methylene-bis acrylamide, 165 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% TEMED, 0.1% APS) (20 cm × 20 cm) [28] のみを使い, Investigator 2 -D Electrophoresis system (Millipore 社) で行った。泳動条件は 16W/gel で 5 時間か, あるいは BPB 色素のブルーのラインがゲルの底に到着するまで行った。

7. 電気泳動後のゲルの染色法

1) 銀染色

電気泳動後のゲル染色は, US Patent と Japanese Patent [29] で書かれた方法を僅かに改良し, Ohsawa と Ebata [92] に従って 2 D-silver stain II (第一生化学工業) を用いて行った。まず, ゲルを solution I (50%メタノール, 10%酢酸) で 10 分間固定し, solution II (30%メタノール, 10%酢酸, 0.0025%チオ尿素) で更に 15 分間固定する。次に solution III (50%メタノール, 0.0005% DTT, 0.1%グルタルアルデヒド, 0.00025%チオ尿素) で 10 分間の増感後, 蒸留水で 5 分間水洗した。廃液後, 銀染色液 (0.2% AgNO₃, 0.14% NH₃, 0.2% NaOH) で 15 分間染色した。染色後, 蒸留水で 3 回水洗し, solution V (0.005%クエン酸, 0.02%フォルムアルデヒド, 0.00005%チオ硫酸ナトリウム) で現像し, 鮮明な蛋白質スポットが得られたところで, 10%クエン酸によって現像を停止し, 10 分後蒸留水で 3 回水洗した。これらのステップは全て緩やかな振盪のもとで行った。

2) Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 染色

電気泳動後のゲルは、スポット定量性のある CBB G-250 でも染色された。CBB G-250 での染色は Volker Neuhoff らの方法に従った [90]。すなわち、ゲルを 12% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) で 1 時間固定し、CBB G-250 染色液 [0.08% (w/v) CBB G-250, 1.6% (w/v) リン酸, 8.0% (w/v) 硫酸アンモニウム, 20% (v/v) メタノール] で 24 時間染色した。染色後、25% (v/v) メタノールで 3 時間脱染色を行い、蒸留水で 3 回水洗したのち、解析に供した。これらのステップは全て緩やかな振盪のもとで行った。

8. 二次元電気泳動ゲルのコンピューター解析法

二次元電気泳動後のゲルのスポット解析は Molecular Dynamics 社のレーザースキャナー(USA)を使用した。データは SPARC station (SUN Micro Systems Inc., Mountain View, CA, USA) 上で PDQUEST™ software (PDI, Inc., USA) によって解析した。ゲルをスキャンし、外挿標準標準蛋白質の使用により各々の蛋白質スポットの位置や濃さの平均をとりながら、1つのゲルイメージを作成するために修正した。そして、培養日数の異なる蛋白質試料の二次元電気泳動ゲルイメージを、*Fusarium* 蛋白質ゲルイメージとして1つにまとめた。

9. N末端アミノ酸配列分析法

二次元電気泳動後、ゲル上の蛋白質は セミドライ型ブロッティング装置(日本エードー)を用いて Matsudaira の方法に従い、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Fluortrans™, Pall Ultrafine Filtration Co., USA) に電氣的に転写した [85]。その時の電流値は 1 cm² あたり 1 mA であり、室温で 4 時間通電した。転写終了後、PVDF 膜を蒸留水で 1 回水洗した後で、0.1% (w/v) CBB R-250 を含む 50% (v/v) メタノールで 1 分間染色し、10% (v/v) 酢酸を含む 40% (v/v) メタノールで 3 分間脱染色を行った。脱色後、蒸留水で 2 回水洗してから、減圧下で乾燥させた。この操

作によって膜上に出現したスポットを切り取り，画像解析装置におけるゲルスポット解析によりアスパラギンの添加によって明らかに変動の見られた2種類の蛋白質スポット，および広範囲にわたってランダムに選択された23種類の蛋白質スポットについてN末端アミノ酸配列分析を行った．切り取られたPVDF膜は，1.5 ml マイクロチューブ内で50% (v/v) メタノールにて洗浄後，蒸留水で水洗した．この操作を2回繰り返した．次に，バルスリキット型シーケンサー (Model 477A, Applied Biosystems, USA)の反応槽の，予めポリブレン(Bio Plen, Applied 社) 処理の施された Siliconized Glass Filter (SGF, Applied 社)上に，サンプルのPVDF膜をのせ，再度ポリブレン処理を施し，自動エドマン分解を実行した．Phenylthiohydation (PTH) アミノ酸は，オンライン HPLC (Model 120A, Perkin Elmer) で同定した [4, 55]．

10. N-末端ブロックのデブロック法

N-末端のブロックが認められた場合，Tsugita らの方法に準じ，N-末端 無水ヒドラジン分解を行った [88]．この反応条件は，N-末端からフォルミル基とグルタミル基のみをはずし，アミノ酸配列分析を可能にする方法である．ブロックされたプロテインを含む PVDF 膜を，シーケンサーから取り出し，ダーラム管 (4 mm×40 mm) 内において50%メタノールで2回洗浄後，蒸留水で水洗し，減圧下で乾燥させた．乾燥後，100 μ lの無水ヒドラジンを入れた小試験管 (13 mm×100 mm) にダーラム管ごと移し，封管後，直ちに液体窒素による急速凍結を行い，20 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた．4時間後，直ちに反応を止め (液体窒素による急速凍結)，開封管後，減圧下で乾燥し，50%メタノールと蒸留水で1回ずつ洗浄を行い，再びシーケンサーにかけた．

11. シーケンス解析における o-phthaldialdehyde 法

o-phthaldialdehyde (OPA) 法 [8] は、予め分かっているプロリン残基のサイクルに OPA 反応処理を施し、それ以前のシーケンスを残して、プロリン残基以外の全てのアミノ酸残基をブロックする。そのあとのシーケンスは、オーバーラップの減少によって鮮明となり、更に先のアミノ酸配列を読むことができる。OPA 反応は、バルスリキッド型シーケンサーによって実行した。そこで、目的とする蛋白質は、II-9 に従い、予めアミノ酸配列分析にかけた。プロリン残基の位置を確認後、新たに M-1-1 株の蛋白質試料 4.8 mg を二次元電気泳動で分離し、PVDF 膜にブロットした目的とするスポット (PPIase) をシーケンサーの反応槽にセットした。そして、OPA 試薬 [0.15 mM OPA (和光純薬工業株式会社), 0.5% β -メルカプトエタノール, 0.1% アセトニトリル] を調整後、既知のプロリン残基 (13 ステップおよび 20 ステップ) に OPA 試薬が反応するようシーケンサーにセットした。

1 2. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) の酵素活性測定

凍結乾燥した *F. sporotrichioides* の菌糸体は、cold room (4°C) で液体窒素を加えながら海砂 (20-30 mesh, 和光純薬) とともに粉末状になるまでよくすり潰し、蛋白質抽出バッファー [50 mM Tris-HCl buffer pH 6.8, 10 mM MgCl₂, 0.1% (v/v) β -mercaptoethanol, 2 mM phenylmethl sulfonyl fluoride, 0.2 mM DTT] [Roux と Labarere (105) らの改良型] で 2 時間抽出後、4°C で 47,500 × g, 30 分間遠心分離を行った。蛋白質抽出後、PPIase の酵素活性測定は、高橋らの方法を僅かに改良して行った。また、蛋白質試料は、II-5 に従って蛋白質定量を行い、各々、1 mg/ml に調整した上清を PPIase 酵素活性測定用の試料に供した。遠心後、上清を、0.5 M Tris-HCl pH 8.8 で pH 7.8 に調整し、25°C, 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後の抽出液基質として 10 mM peptide N-succinyl-Ala-Ala-Pro-4-methyl-coumaryl-7-amide (MCA, Peptide Institute Inc, Minoh, Japan) 10 μ l を加え、

室温で 30 秒間インキュベーション後, 0.76 mM キモトリプシン(Sigma, USA) 20 μ l を加えた. キモトリプシン添加後, 0 分, 1 分, 2 分, 3 分目に経時的に, 分光光度計にて, 360 nm の波長で測定した.

Ⅲ 成 績

1. アスパラギン添加による*F. sporotrichioides* (M-1-1 株と R2301 株)

trichothecene 産生の変動

F. sporotrichioides M-1-1 株および R2301 株における, 0.01%, 0.03%, 0.05% の 3 つのアスパラギン濃度に対する T-2 toxin (T-2), diacetoxyscirpenol (DAS) そして neosolaniol (NS) (μ g/ml) への効果を観察した. アスパラギンはいずれも培養 2 日目, 各々のフラスコに添加し, control には等量の滅菌蒸留水を加え, 培養 7 日目まで経過を追って測定した. アスパラギンの濃度 0.01%, 0.03%, 0.05% に対する各々の trichothecene (T-2, DAS, NS) 産生は, Fig. 1-2 に示し, 各々のアスパラギン濃度 0.01%, 0.03%, 0.05% に対する trichothecene (T-2, DAS, NS) 産生は, Fig. 3-4 に示した. なお, T-2, DAS, NS 産生の増減の有無は, 培養 7 日間におけるトキシシン産生量の平均値を有意水準 5% で検定を行った.

1) *F. sporotrichioides* M-1-1 株

T-2 の産生 (Fig. 1-a) は, 培養 7 日間全体を通して control と比べアスパラギンの濃度 0.03% および 0.05% で増加傾向を示した ($P < 0.05$). 0.01% の濃度では 4 日目以降 control を下回り, アスパラギンの効果は見られなかった ($P < 0.05$). 0.01% · 0.03% · 0.05% の 3 つの濃度における T-2 産生効果は, 培養 7 日間全体を通して最大効果を示したのは 0.05% であった ($P < 0.05$). また, 培養 4 日目から 5 日目にかけて 0.05% は control に比べ 2.3 倍の増加を示した.

DAS の産生 (Fig. 1-b) は, 培養 7 日間全体を通し control と比べ, アスパラギンの濃度 0.01% · 0.03% · 0.05% のいずれも増加傾向を示した ($P < 0.05$). 0.01% · 0.03% · 0.05% の 3 つの濃度における DAS 産生効果は, 培養 7 日間全体を通して最大効果を示したのは 0.05% であった ($P < 0.05$). また, 培養 4 日目から 5 日目にかけて 0.05% は control に比べ 8.5 倍の増加を示した.

NS の産生 (Fig. 1- c) は、培養 7 日間全体を通して control と比べアスパラギンの濃度 0.01%・0.03%・0.05% のいずれも増加傾向を示した ($P<0.05$)。0.01%・0.03%・0.05% の 3 つの濃度における NS 産生効果は、培養 7 日間全体を通して最大効果を示したのは 0.05% であった ($P<0.05$)。また、培養 4 日目から 5 日目にかけて 0.05% は control に比べ 1.9 倍の増加を示した。

2) *F. sporotrichioides* R2301 株

T-2 の産生 (Fig. 2-a) は、培養 7 日間全体を通して control と比べアスパラギンの濃度 0.01%・0.03%・0.05% のいずれも増加傾向を示した ($P<0.05$)。0.01%・0.03%・0.05% の 3 つの濃度における T-2 産生効果は、培養 7 日間全体を通して最大効果を示したのは 0.01% であった ($P<0.05$)。

DAS の産生 (Fig. 2-b) は、培養 5 日目までは control と比べアスパラギンの濃度 0.01%・0.03%・0.05% のいずれも増加傾向を示した ($P<0.05$)。培養 7 日間全体では、アスパラギンの濃度 0.05% のときのみ増加傾向を示した ($P<0.05$)。アスパラギンの添加濃度 0.01% および 0.03% では、培養 7 日間全体を通して control と比べアスパラギンの効果は見られなかった ($P<0.05$)。

NS の産生 (Fig. 2-c) は、培養 4 日目までは control と比べアスパラギンの濃度 0.01%・0.03%・0.05% のいずれもアスパラギンの効果は見られなかった ($P<0.05$)。培養 7 日間全体では、control と比べアスパラギンの濃度 0.01% および 0.05% で増加傾向を示した ($P<0.05$)。アスパラギンの添加濃度 0.03% では培養 6 日目までアスパラギンの効果は見られなかった ($P<0.05$)。

2. アスパラギン添加による *F. sporotrichioides* M-1-1 株の菌体発育と菌体蛋白質量の変動

1) 菌体発育の変動

F. sporotrichioides M-1-1 株において、培養 2 日目にアスパラギン（最終濃度

0.05%) を添加した時の培養液100 ml 中における菌体重量 (dry/weight) を、滅菌蒸留水を control とし、培養 2 日目から 7 日目まで経時的に測定した (Fig. 5). なお、アスパラギン添加における菌体重量の増減の有無は、培養 7 日間における、菌体重量の平均値を有意水準 5 % で検定を行った。

アスパラギンを添加した翌日 (培養 3 日目) から増加傾向を示し、4 日目にわずかに増加したあと急速に減少傾向を示した。培養 7 日間全体を通して、アスパラギンを添加した場合、菌体重量の増加を示した ($P < 0.05$)。control は、培養 3 日目まで増加し 4 日目にはアスパラギンが添加された場合より 1 日早く減少傾向を示した ($P < 0.05$)。

2) 菌体蛋白質の変動

1) で得られた培養 2 日目から 7 日目までの乾燥菌体から、TCA 沈殿によって蛋白質を抽出し、アスパラギンを添加した場合と無添加の場合の菌体蛋白質量の変動を測定した (Fig. 6)。

アスパラギンの添加、無添加に関わらず測定開始の培養 2 日目から 7 日目まで一様に減少傾向を示した。また、僅かではあるがアスパラギンを添加した場合、培養 2 日目から 7 日目までの蛋白質量は増加傾向を示した ($P < 0.05$)。

3. *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質の電気泳動と N-末端アミノ酸配列分析

1) *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質の sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

F. sporotrichioides M-1-1 株において、培養 2 日目にアスパラギン (最終濃度 0.05%) を添加した 3 日間培養菌体蛋白質試料 $33 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ を 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE にかけて、泳動終了後のゲルは銀染色で染色し、およそ 60 本のメジャーバンドを確認した (Fig. 7)。同様に、3 日間培養菌体蛋白質試料 $0.3 \text{ mg}/100 \mu\text{l}$ を SDS-PAGE によって分離し、ゲル上の蛋白質を PVDF 膜へ

電氣的に転写後，CBB R-250 で染色した．その中で，19.7 kDa の1本のメジャーバンドについてN-末端から15残基のアミノ酸配列を決定した．PIR 蛋白質のデータベースによる相同性検索より，*Neurospora crassa* の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) に対して60.0%の相同性を持つことがわかった．のちに二次元電気泳動によって詳細に調べたので後述する．

2) *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質の二次元電気泳動

F. sporotrichioides M-1-1 株において，アスパラギン無添加の培養2日目から5日目までの菌体蛋白質試料および培養2日目に最終濃度0.05%でアスパラギンを添加した培養3日目から5日目までの菌体蛋白質試料を二次元電気泳動によって分離した．電気泳動後のゲルを銀染色で染めたアスパラギン無添加の培養2日目から5日目までを Fig. 8-a, b, d, f に，アスパラギンを添加した培養3日目から5日目までを Fig. 8-c, e, g に示した．また，電気泳動後のゲルをCBB R-250 で染めたアスパラギン無添加の培養2日目から5日目までを Fig. 9-a, b, d, f に，アスパラギンを添加した培養3日目から5日目までを Fig. 9-c, e, g に示した．

二次元電気泳動に供した蛋白質試料は，泳動後，銀染色の場合，0.4 mg，CBB G-250 染色の場合，2 mg を用いた．2日目から5日目までの染色後の全ての二次元電気泳動ポリアクリルアミドゲルは，9つの標準蛋白質をもとに Molecular Dynamics 社のレーザースキャナーで PDQUEST™ softwareにより解析した．その結果，編集した Image Gel の中で，約1,244 のスポットが確認できた (Fig. 10)．また，CBB G-250 で染色したゲルの解析からは，各々の蛋白質スポットで計算した Optical Density (OD) 値によって，アスパラギンの添加により明らかに変動を認められた2つの蛋白質スポットを確認した (Fig. 11)．その蛋白質スポットは，各々，等電点7.0，19.7 kDa の蛋白質と等電点6.2，42.6 kDa の蛋白質であった．この2種類の蛋白質における詳細については，Ⅲ-6で，各々，(1)と(2)に述べた．

3) 二次元電気泳動によって分離した *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質の

N-末端アミノ酸配列分析

F. sporotrichioides M-1-1 株の菌体蛋白質 4.8 mg は、二次元電気泳動によって分離し、ゲル上の蛋白質を PVDF 膜へ電氣的に転写後 CBB R-250 で染色した。膜上に出現した 25 種のスポットを切り出し、N-末端アミノ酸配列分析装置にかけた。その結果は Table 1 に示し、各スポットナンバーに対するその位置は Fig. 12 に示したとおりである。これらの N-末端アミノ酸配列結果より PIR蛋白質のデータベースによる相同性検索を行い、およそ 1,244 スポットのうち 13 種の *Fusarium* 蛋白質を明らかにした。また、各々の蛋白質における相同性は、Fig. 13 に示した。

スポット 7 とスポット 13 および 21 の N-末端アミノ酸部分配列は、*Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) の malate dehydrogenase [73] と *Trichoderma koningii* の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [110] および *Schizosaccharomyces pombe* (*S.pombe*) の triose-phosphate isomerase [107] のアミノ酸配列に各々 100% 一致した。

スポット 1 は、*Emericella nidulans* の ribosomal S16 protein [19] に 83.3% の相同性を示した。

スポット 23 は、*S.cerevisiae* の phosphopyruvate hydratase [23] に 72.7% の相同性を示した。

スポット 3 と 9 は、*S.pombe* の alcohol dehydrogenase [106] と *Neurospora crassa* (*N.crassa*) の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [123] に各々 66.7% の相同性を示した。

スポット 12 は、スポット 9 と同じシーケンスを示すが、スポット 9 より等電点が 0.6 ほど酸性側にあった。

スポット 2 は、*Chlamydomonas reinhardtii* の ribosomal protein S12 [81] に 60% の相同性を示した。

スポット 5 は、*Coccidioides immitis* の serine proteinase [101] に 58.3% の相同性

を示した.

スポット 14 は, mitochondrion *Mytilus edulis* の NADH dehydrogenase chain 5 [62] に 55.6% の相同性を示した.

スポット 19 は, *Hyoscyamus niger* の hyoscyamine (6 β)-dioxygenase [86] に 46.7% の相同性を示した.

スポット 6 は, *Arachins hypogaea* の arachin 25K protein (17) に若干 (36.8%) の相同性を示した.

12 個のスポット 4, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25 は, その N-末端がブロックされていた.

4. *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質における N-末端ブロックアミノ酸の無水ヒドラジン分解およびアミノ酸配列分析

F. sporotrichioides M-1-1 株の蛋白質における N-末端アミノ酸配列分析の結果, その N-末端がブロックされていた 12 個のスポット 4, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25 について, N-末端の無水ヒドラジン分解を行った. 無水ヒドラジン分解の施された全ての蛋白質は, バルスリキッド型シーケンサーによって, 再びアミノ酸配列分析を試みた. その結果, スポット 4, 8, 10, 11, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25 の 11 種の蛋白質における N-末端のブロックは, 除去されなかった. スポット 15 は, N-末端から 15 残基 (未読の アミノ酸, X を 5 つ含む) まで解読した. そのアミノ酸配列は, QTVSXMRLXXXVXDN/ であった. このアミノ酸配列に対して, PIR 蛋白質のデータベースによる相同性検索を実施したが, これらの情報からは, 検索できなかった.

5. アスパラギン添加における 2 種蛋白質の変動

1) アスパラギン添加による peptidyl-prolyl cis-trans isomerase の変動

F. sporotrichioides M-1-1 株の二次元電気泳動において、アスパラギンの添加により明らかに変動を認めた2つの蛋白質スポットのうち等電点 7.0, 19.7 kDa の蛋白質 (Fig. 11) は、N-末端アミノ酸配列分析の結果 (Table 1), *N.crassa* の PPIase との相同性から PPIase であることがわかった。

そこで、アスパラギン無添加の培養2日目から4日目と培養2日目に最終濃度 0.05% でアスパラギンを添加した培養3日目から4日目までの二次元電気泳動ゲル上 (定量性のある CBB G-250 染色で染色を行ったゲル) での PPIase の変動を、Molecular Dynamics 社のレイザースキャナーを用いて PDQUEST™ software により解析し、その OD 値を基に分析を試みた。PPIase の OD 値は、できるだけ誤差を少なくするために、比較しあう2つのゲル中で、アスパラギンの添加によって誘導されない5つの内部標準蛋白質を決め、それらの増減の相対値の平均から PPIase における増減の相対値を算出した。

アスパラギン無添加の培養2日目 (以下 control-2 と略す) からアスパラギン無添加の培養3日目 (以下 control-3 と略す) の PPIase における増減の相対値は 0.31 で、僅かに減少傾向を示したがほとんど変化は見られなかった。control-2 から培養2日目に最終濃度 0.05% でアスパラギンを添加した培養3日目 (以下 N-3 と略す) における相対値は 1.17 で、増加傾向を示した。N-3 から培養2日目に最終濃度 0.05% でアスパラギンを添加した培養4日目 (以下 N-4 と略す) における相対値は 0.41 で、僅かに減少傾向を示したがほとんど変化は見られなかった。また control-3 と N-3 では 3.15 で、N-3 は control-3 に比べ、増加傾向を示した。アスパラギン無添加の培養4日目 (以下 control-4 と略す) と N-4 では 3.49 で、N-4 は control-4 に比べ増加傾向を示した。

2) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase の o-phthaldialdehyde (OPA) 反応

蛋白質スポット9は、アミノ酸配列分析において24残基まで解読し、PIR蛋白のデータベースによる相同性検索の結果、*N. crassa* の peptidyl-prolyl cis-trans

isomerase (以下 PPIase と略す) に 66.7% の相同性を示した (Table 1). 24 残基の N-末端アミノ酸部分配列の中で, その 13 残基と 20 残基にプロリンの存在を認めた.

そこで, プロリン残基の位置する 13 ステップと 20 ステップ目に OPA 反応を実施した結果, 41 ステップまでのアミノ酸配列が明らかになった (Table 2). そのシーケンスは, PIR 蛋白質のデータベースによる相同性検索からカビ, 動物, 植物のアミノ末端配列の中で, *N. crassa* のシーケンスと高い相同性 (63.4%) を示した (Fig. 14).

3) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase の酵素活性測定

F. sporotrichioides M-1-1 株の菌糸体から抽出した細胞抽出上清を用い, PPIase の酵素活性を測定した. 酵素活性に用いた細胞抽出上清は, アスパラギンを添加することなく 2 日間培養した菌糸体 (control-2), 培養 2 日目に アスパラギン (最終濃度 0.05%) を添加した 3 日間, 4 日間, 5 日間培養菌糸体 (N-3, N-4, N-5) の 4 種を, 各々, 1 mg/ml に調整し, プロリンペプチド結合の cis-trans 異性化に触媒作用をおよぼす能力について測定を行った (Fig. 15). なお, 活性の有無は, 測定 0 分, 1 分, 2 分, 3 分目における測定値の平均値を control-2, N-3, N-4, N-5 および no cell extract の相互で有意水準 5% において検定を行った.

キモトリプシン添加後, 0 分, 1 分, 2 分, 3 分目に経時的に分光光度計にて 360 nm の波長で測定したところ, control-2, N-3, N-4, N-5 のいずれも 1 分目から活性を示し, 最終測定である 3 分目までその活性は持続した. また, その活性は, アスパラギンを添加した 3 日間および 4 日間培養において高い活性を示した ($P < 0.05$).

4) アスパラギン添加による glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の変動

F. sporotrichioides M-1-1 株の二次元電気泳動においてアスパラギンの添加により明らかに変動を認めた 2 つの蛋白質スポットのうち, 等電点 6.2, 42.6 kDa の蛋

白質 (Fig. 11) は, N-末端アミノ酸配列分析の結果 (Table 1), *Trichoderma koningii* の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下 GPDase と略す) との相同性から GPDase であることがわかった.

そこで, アスパラギン無添加の培養 2 日目から 4 日目と培養 2 日目に最終濃度 0.05% でアスパラギンを添加した培養 3 日目から 4 日目までの二次元電気泳動ゲル上 (定量性のある CBBG-250 染色で染色を行ったゲル) での GPDase の変動を, レーザースキャナーを用いて PDQUEST™ softwareにより解析し, その OD 値を基に分析を試みた. GPDase の OD 値はできるだけ誤差を少なくするために比較しあう 2 つのゲル中でアスパラギンの添加によって誘導されない 5 つの内部標準蛋白質を決め, それらの増減の相対値の平均から GPDase における増減の相対値を算出した.

Control-2 から control-3 の GPDase における増減の相対値は 52.67 で, 増加傾向を示した. control-2 から N-3 における相対値は 57.25 で, 増加傾向を示した. N-3 から N-4 における相対値は 0.83 で, 僅かに減少傾向を示したがほとんど変化は見られなかった. また, control-3 と N-3 では 0.92 で, N-3 は control-3 と比べ, 僅かに減少傾向を示したがほとんど変化は見られなかった. Control-4 と N-4 では 15.00 で, N-4 は control-4 に比べ, 増加傾向を示した.

IV 考 察

1. アスパラギン 添加による *F. sporotrichioides* (M-1-1 株と R2301 株) における trichothecene 産生性の変動

諸角ら [89] による” トリコテセン系カビ毒産生用合成培地の検討” を実施した報告の中で、彼らがそれより以前に報告した SSP (salts sucrose peptone) 培地 [61] を基礎培地とし、*F. sporotrichioides* F-135 株を被検菌とした T-2 および DON 産生におよぼすアミノ酸添加の影響では、アスパラギン単独で 1% 濃度に添加した場合に最も良好な成績が得られた。この結果をもとにし、著者は SYP 培地を基礎培地として、アスパラギンを 1% 濃度に添加したときの *F. sporotrichioides* M-1-1 株および R2301 株における T-2, DAS, NS の産生向上実験を試みたが、両菌株とも、trichothecene の産生向上は見られなかった（データ非記載）。これは、諸角らの培養条件が、15 日間による静置培養下でのアスパラギン濃度であったのに対し、著者は、その培養条件が、静置培養より遥かに早く菌発育代謝が進む振盪培養下（3 日間）で、静置培養下と同じアスパラギン 1% 濃度で培養したことが原因と考えられた。そこで、アスパラギン濃度を 1% の 1/100 まで下げ、0.01%, 0.03%, 0.05% の 3 つのアスパラギン濃度で実行した。

M-1-1 株における T-2, DAS, NS のアスパラギン添加に対する産生性の上昇は、trichothecene の産生がアスパラギンの添加濃度に比例して高まることを示唆し、アスパラギン濃度 0.05% で trichothecene の最も高い産生を得た。0.05% から 1% の間のアスパラギン添加実験は行っておらず、必ずしも 0.05% のアスパラギン濃度が、SYP 培地を用いた振盪培養条件での trichothecene 産生に、最も良好な濃度であるとは断言できない。しかし、M-1-1 株の結果では、0.05% のアスパラギン濃度が、trichothecene の産生を高めるのに十分であることは確かであった。

一方、R2301 株では、アスパラギン添加による trichothecene 産生性の上昇は若

干見られたものの、アスパラギンの添加濃度によるtrichothecene 産生性の大きな差異は見られなかった。これらの結果は、R2301株におけるアスパラギンの添加は、trichothecene 産生性を有意に引き出すものではないように思われるが、R2301株のアスパラギンに対する感受性が原因である可能性も考えられるため、更に数種のT-2産生菌株を用いたアスパラギン添加によるtrichothecene 産生性の変動についても検討の必要があると考えられた。

これらのアスパラギン添加によるtrichothecene 産生性の上昇は、単にアスパラギンを窒素源としてのみ利用し、菌体発育の活性上昇とそれにおける菌体量の総体的な増加によるとの見方もできる。しかし、後述するアスパラギン添加によるM-1-1株菌体蛋白質の二次元電気泳動における変動の存在を認める以上、アスパラギンによるtrichothecene 生合成に関連する酵素、あるいは蛋白質の誘導による可能性も考えられる。諸角らの報告では、*F. sporotrichioides* F-135株を用いて、T-2およびDAS産生に及ぼす8種類のアミノ酸(アスパラギン、フェニルアラニン、バリン、グルタミン酸、ロイシン、ヒスチジン、グリシン、トリプトファン)添加の影響を検討した結果、アスパラギンとフェニルアラニン添加培地のみ効果を得ているが、その機構については解明されていない[89]。trichothecene 産生性の上昇が、アスパラギンによるtrichothecene 生合成に関連する酵素、あるいは蛋白質の誘導によるとの見解を有力にするためには、アスパラギン添加により変動の認められた全ての蛋白質の解析が必要と思われた。

2. アスパラギン添加による *F.sporotrichioides* M-1-1株の菌体発育と菌体蛋白質量の変動

M-1-1株のアスパラギン添加(最終濃度0.05%)による菌体重量の増加は、M-1-1株の菌体発育におけるアスパラギンの効果を示唆するのに十分であった。真菌類は窒素源として、無機窒素、アミノ酸、アミドの他、ペプチド蛋白質などを利

用する [18]. 無機窒素源では、酵母類における空気中窒素の固定能の存在が知られているが、一般には硫酸アンモニウムや硝酸塩が利用され、多くの糸状菌にとって硝酸塩は優れた窒素源となる [117, 118]. アミノ酸としては、アスパラギン酸やグルタミン酸が利用され、トリプトファンの利用は少なく、システインは殆ど利用されない。一般にアミノ酸の利用は、単独よりもむしろ利用性の高いアミノ酸との組み合わせで増加する傾向があるが、チロシンとグリシンのような拮抗的に作用するものもある。また、菌種によっては特異的なアミノ酸要求性を持つものがあり、*Trichophyton* 属は、ヒスチジン・アルギニン要求性の真菌として知られている [117, 118]. アミドとしては、アスパラギンの他にグルタミンが重要で、これはアスパラギン酸やグルタミン酸と同程度に利用されるが、菌種によってはアミドの利用性が高い。M-1-1 株では、アミドであるアスパラギンが、窒素源として菌体蛋白質の合成に利用され、その結果、菌体発育に関連する蛋白質の合成が高まったと思われる。これは、蛋白質量の変動でも、終始、アスパラギンの添加した菌体蛋白質量が上回っており、また、アスパラギンの添加による、真菌を含む広い生物の生活過程の中で、代謝機構に不可欠な酵素の 1 つである glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [110] の上昇を確認していることからもうなずける (詳細は IV-5)。培養に用いた培地組成の中で、窒素源となるものにはペプトンの存在を認めるのみであり、アスパラギンと相乗効果との見方も考えられるが、M-1-1 株におけるアスパラギンの効果が絶大であることを示唆するのに十分であった。また、菌体蛋白質量における変動では、アスパラギンの添加と無添加に関わらず、培養とともに菌糸体内の蛋白質量減少傾向を示している。これは培養の進行における菌糸の肥厚化による蛋白質抽出効率の低下が考えられるが、凍結乾燥状態での菌体粉碎を導入した著者の方法ではその可能性は低く、むしろ培養の進行における菌体外への蛋白質放出の可能性が高い。このことは、得られた培養液の菌体外蛋白質量の変動を測定することにより立証できるが、今回、こ

の確認は行っていないため断言することはできない。

3. *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質の電気泳動と N-末端アミノ酸配列分析

F. sporotrichioides M-1-1 株と R2301 株の trichothecene 産生性実験結果より、アスパラギンの添加・無添加に関わらず trichothecene 産生性の高かった M-1-1 株を用いて電気泳動による菌体蛋白質の解析を行った。

M-1-1 株菌体蛋白質の SDS-PAGE では、およそ 60 本のメジャーバンドを確認し、その中でアスパラギン添加により明らかに濃くなった 1 本のメジャーバンドについて N-末端から 15 残基のアミノ酸配列を決定し、PIR 蛋白質のデータベースによる相同性検索を行ったところ、*Neurospora crassa* の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [123] に対して 60.0% の相同性を持つことがわかった (IV-5 で考察)。著者は、アスパラギン添加により変動する蛋白質が存在する以上、trichothecene 産生性の上昇が単に菌体発育の活性上昇のみによるものではないと考えた。そこで、trichothecene 生合成に関連する蛋白質・酵素の発見のため、更に M-1-1 株菌体蛋白質を二次元電気泳動で分離し、アスパラギン添加によって明らかに増加を示した 2 種類の蛋白質とその他の数種類の蛋白質について一次構造の部分解析および相同性検索を行った。

二次元電気泳動によって分離した M-1-1 株菌体蛋白質のおよそ 1,244 スポットのうち、25 種類の *Fusarium* 蛋白質について、N-末端アミノ酸配列分析を行った結果、13 種類の *Fusarium* 蛋白質を明かにした。

スポット 7 および 21 の N-末端アミノ酸部分配列は、*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) の malate dehydrogenase [73] および *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) の triose-phosphate isomerase [107] のアミノ酸配列に各々 100% の一致を示し、また、各々の蛋白質の分子量がほぼ一致していることから同定できるものと思われるが、それぞれ機能蛋白質であるため酵素活性の測定が必要と思わ

れる。スポット 3, 5, 7, 14, 23 も各々の蛋白質と高い相同性を示す機能蛋白質であることが推測されるが、その同定には、やはり酵素活性の測定が必要と思われる。スポット 1, 2, 6 は、*Emericella nidulans* の ribosomal S16 protein [19] と *Chlamydomonas reinhardtii* の ribosomal protein S12 [81] および *Arachins hypogaea* の arachin 25K protein [17] におのおの 83.3%, 60%, 36.8% の相同性を示す構造蛋白質であることが推測された。

アミノ酸配列分析の結果明らかになった 13 種類の *Fusarium* 蛋白質の中で、*Neurospora crassa* (*N.crassa*) の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase に相同性を示したスポット 9, および *Trichoderma koningii* の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase に相同性を示したスポット 13 は、trichothecene 産生性の上昇に関連していると考えられたアスパラギンの添加によって誘導され、また、スポット 19 に相同性を示した *Hyoscyamus niger* の hyoscyamine (6 β)-dioxygenase の作用から、これらスポット 9, 13, 19 は、trichothecene 生合成との関連の可能性が示唆された。アスパラギンの添加によって変動した *Fusarium* 蛋白質 スポット 9 および 13 については、IV-5 で考察した。

スポット 19 は、*Hyoscyamus niger* の hyoscyamine (6 β)-dioxygenase (以下 H6H と略す) と 46.7% の相同性 (N-末端から 15 残基) を示していた。各々の分子量における比較では、スポット 19 が 30.5 kDa であるのに対し、*H. niger* の H6H は 39.0 kDa であった。スポット 19 の N-末端とは 48 残基目からの matching であったため、*H. niger* の H6H における 48 残基をシグナルシーケンスと考えれば各々の分子量はほぼ一致したものになった。これまで、H6H は、*H. niger* の他に報告がないため、スポット 19 を H6H と同定するためには H6H としての酵素活性および全構造解析、またアミノ酸組成の分析などが必要であるが、H6H の作用から trichothecene 生合成との関連が示唆された。hyoscyamine (6 β)-dioxygenase は、茄子科植物の *Hyoschamus niger* の培養した根から抽出・精製さ

れ [86], 別名 hyoscyamine (6 β)-hydroxylase と呼ばれている. いくつかの茄子科植物の根は, 副交感神経で作用する抗コリン作用薬のトロパンアルカロイドに属すヒオスチアミンおよびスコポラミンを産生するヒオスチアミンの 6,7-epoxide 体を持つスコポラミンは, ヒオスチアミンから 6 β -hydroxyhyoscyamine を通って形成される (Fig. 16). H6H はスコポラミンを導く生合成過程において, epoxide 体形成における最初の反応の水酸化を引き起こすことが明らかにされている [86]. この様に H6H が, trichothecene 骨格の活性中心とされる 12, 13-epoxytrichothecene 環に類似した 6, 7-epoxide 体の形成初期反応をもたらしていることは, trichothecene 生合成との関連が十分予測される. また, *F. sporotrichioides*, *Gibberella pulicaris* (anamorph, *F. sambucinum*) の trichothecene 産生株を用いた ancymidol と xanthotoxin の酸化酵素抑制処理により, trichothecene の産生抑制と trichodiene の蓄積を生じた結果から, trichodiene が *Fusarium trichothecene* の前駆体であることは証明されている [26]. trichothecene 生合成における初期過程において, 前駆体である trichodiene から 2-hydroxytrichodiene を通って 12,, 13-epoxy-9,10-trichoene-2-ol が形成される [15, 25] (Fig. 17). M-1-1 株から分離された H6H が, この epoxide 体を形成する前段階の水酸化反応に関連していることが考えられた. hyoschamine の epoxide 体形成における水酸化反応は, H6H 単独の反応ではなく, α -ケトグルタル酸, Fe²⁺, 酸素分子, アスコルビン酸塩などの基質も必要なことから [49, 50], trichothecene の epoxide 体形成にも H6H の他に何らかの基質の存在があるのかもしれない.

12 個のスポット 4, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25 は, その N-末端がブロックされており, この考察は次の IV-4 に記す.

4. *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質における N-末端ブロックアミノ酸の無水ヒドラジン分解

二次元電気泳動によって分離した *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質のうち、25 種類の蛋白質について N-末端アミノ酸配列分析を行ったところ、12 種類の蛋白質における N-末端がブロックされていた。これは、アミノ酸配列分析を行った 25 種類の蛋白質の 48% に相当した。

多くの蛋白質は、ブロックされた α -アミノ基を持ち、エドマン分解によるカップリング試薬に反応できない。 α -アミノ基がアセチル基やフォルミル基によるアシル化を受けている場合、あるいは N-末端がグルタミンの環化によってグルタミルを生じた時など、このままの状態では、N-末端アミノ酸配列の分析は不可能である。 N-末端の主なブロックのタイプには、フォルミル基、グルタミル基、アセチル基が知られている [88]。

そこで著者は、N-末端がブロックされていた 12 個のスポット 4, 8, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 25 について、N-末端の無水ヒドラジン分解によりデブロックを試みた。無水ヒドラジンは、1952 年、Akabori ら [4] によって、ペプチドと蛋白質の溶解に用いたことが始まりである。無水ヒドラジンは、C-末端アミノ酸を除いて、全構成アミノ酸のヒドラジン誘導体を結果として生じ、この所見は、ペプチドと蛋白質の C-末端アミノ酸解析における足がかりとなった [4, 146]。Tsugita らは、この無水ヒドラジンの蒸気を用いた無水ヒドラジン分解により、フォルミル基とグルタミル基によるブロックの除去を報告した [88]。これは、 -5°C で 8 時間の反応ではフォルミル基を、 20°C で 4 時間の反応ではフォルミル基とグルタミル基の両方を除去するものであった。

12 個の全スポットにおける無水ヒドラジン分解 (20°C で 4 時間の反応条件) 後のアミノ酸配列分析では、Table 1 で示したようにスポット 15 のみ、N-末端から 15 残基 (未解読のアミノ酸, X を 5 つ含む) まで解読した。そのアミノ酸配列は、QTVSXMRLXXXVXDN/ であった。このことから、スポット 15 の N-末端は、フォルミル基あるいはグルタミル基であることが示唆されたが、その 1 残基目がグル

タミンであることより、グルタミンの環化したグルタミル基によるブロックであることがわかった。また、このアミノ酸配列に対して、PIR蛋白のデータベースによる相同性検索を実施したが、これらの情報からは検索できず、新しい蛋白質試料を用いた新たなアミノ酸解析による未解読のアミノ酸(X)の減少が必要と思われた。その他の蛋白質においては、無水ヒドラジン分解によるN-末端ブロックの除去ができなかったことより、そのN-末端は、アセチル基によるブロックであることが示唆された。

5. アスパラギン添加における2種蛋白質の変動

アスパラギン添加によるM-1-1株菌体蛋白質のSDS-PAGEにおいて、明らかに濃くなった1本のメジャーバンドは、N-末端アミノ酸配列分析とPIR蛋白のデータベースによる相同性検索から、*N. crassa*のpeptidyl-prolyl cis-trans isomerase(以下PPIaseと略す)に対して60.0%の相同性(N-末端から15残基)を持つことはすでに述べた。この蛋白質は、二次元電気泳動におけるアスパラギン添加の培養3日目と4日目で明らかに増加の見られた2つの蛋白質のうち、等電点7.0、分子量19.7 kDaの蛋白質スポット9と同一であることを示していた。更に、スポット9のo-phthaldialdehyde(OPA)反応処理によるアミノ酸配列分析によって、41ステップまでのアミノ酸配列を明らかにしたことで、真菌、動物および植物で報告されているPPIaseとの相同性をより一層明確なものにし、特に*N. crassa*と高い相同性(63.4%)を示すことがわかった。更に、プロリンペプチド結合のcis-trans異性化反応を確認するためのPPIase活性測定において、アスパラギン無添加の2日間培養菌体蛋白質(以下control-2と略す)、およびアスパラギンを添加した3日間、4日間、5日間培養菌体蛋白質(以下、各々N-3、N-4、N-5と略す)のいずれも活性が見られたことは、スポット9をPPIaseと同定するのに十分であった。また、今回用いた蛋白質抽出の条件が細胞質レベルの蛋白質のみ得られるこ

とから、*N. crassa* の 2 つの PPIase (cytosol PPIase, mitochondria PPIase) [123] のうち、*N. crassa* の cytosol PPIase と同質であることが示唆された。

PPIase は、1984 年、Fischer ら [35] により、短いオリゴペプチドのポリペプチド結合の cis-trans 異性化反応を能率的に促進する酵素として発見され、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) と命名された。この触媒反応は、共有結合の分裂・形成を含まないプロリンを生産するペプチド結合の C-N 結合で 180 °C 回転するものである。現在までに、PPIase 活性は、あらゆる組織や有機体、哺乳類から細菌に至るまで広く分布していることが明らかにされている [34]。また、1987 年には、*E. coli* から分離された PPIase が、*in vitro* で immunoglobulin light chain のようないくつかの小さい蛋白質の再巻き戻りを促進することも明らかにされた [70, 78, 80]。今回の M-1-1 株から分離した PPIase では、蛋白質の巻き戻り過程における関連実験は行っておらず、今後、*Fusarium* 属菌での確認が必要と思われる。1989 年には、豚腎臓由来の PPIase が、免疫抑制剤の cyclosporin A と結合する蛋白質によく似た牛の cyclophilin と同一であると報告され [36, 121]、この酵素は、真核細胞に広く存在する免疫抑制剤結合蛋白質 cyclophilin に同一であることが明らかとなった [14, 34, 36, 123]。1992 年に Stamnes ら [14, 103, 119] は、cyclophilin に属する蛋白質には、cyclosporin A および免疫抑制剤の受容体であり、*in vitro* で PPIase 活性を示すことを報告した。最近になって、cyclophilin は、蛋白質の巻き戻り過程においてイソメラーゼとしてだけでなく、シャペロンとして関係していることも示されている [41]。その cyclophilin におけるシャペロンとしての機能とは、PPIase 活性が巻き戻りの過程では、遅速段階で起こるのに対し、*in vitro* で変性した炭酸脱水素酵素を初期段階で巻き戻してしまう中間生成物の集合体を防ぐとのことであった。

Fusarium 属の他の種における PPIase の報告は、18.0 kDa の分子量を持つ *F. sambucinum* からの分離があり、cyclosporine A による PPIase 活性の抑制によっ

てその活性は確認されている [64]. しかし, そのアミノ酸解析やアミノ酸配列分析は全く明らかにされていない. 従って, 今回著者が明らかにした M-1-1 株における N-末端から 41 残基までのアミノ酸配列は, *Fusarium* 種における PPIase のアミノ酸部分配列として初めての報告であり, 今後の *Fusarium* 属の PPIase の構造解析や機能解析に大きく役立つものと思われる.

また, アミノ酸配列分析において, スポット 9 の PPIase と同じ分子量 19.7 kDa であるスポット 12 が, スポット 9 と同じシーケンス (N-末端から 20 残基) を示したことから, PPIase と考えられた. しかしながら, 等電点はスポット 9 より 0.6 ほど酸性側にある pI 6.4 であった. この 2 つの PPIase は, 同じ族ではあるが, 機能的な違いを有しているかもしれない. その相違は, 恐らく deamination や phosphorylation のような翻訳後の修飾によって生じたのではないだろうか. これらの結果から著者は, これら 2 つの蛋白質を, それぞれ PPIase a および PPIase b と名付けた. Harding ら [52, 72] もまた, 人と牛において, それぞれ等しい分子量 (17,737) を示すが, 各々 pI 9.1 と pI 7.4 の等電点が異なる 2 つの cyclophilin の異性体を報告している. その中で彼らはアミノ酸分析により, その異性体は人および牛において類似したアミノ酸組成を有していることを述べている. 彼らの報告から考えても, M-1-1 株におけるこの 2 つの蛋白質は, PPIase の異性体であることが考えられた. また, Harding らは, 人と牛における等電点が異なる 2 つの cyclophilin において, pI 8.6-8.7 の cyclophilin をメジャータイプの PPIase とし, pI 6.7-6.9 の cyclophilin をマイナータイプの PPIase と決定してあることから [52], M-1-1 株の PPIase a および PPIase b は, それぞれマイナータイプの PPIase であることが示唆された.

また, M-1-1 株において, アスパラギンの添加による PPIase 産生量の 3 日目および 4 日目での上昇と, 3 日目, 4 日目の菌体産生量の増加, 更に 4 日目から 5 日目にかけての急激な T-2 産生性の上昇は, 一貫した関連性を示唆するものである.

PPIase の上昇は、菌体産生量の上昇に比例しているため菌体重量の増加によることが伺えるが、通常酵素系の反応が酵素作用の前段階に生じることから考えれば、T-2 産生性の 4 日目からの急激な上昇と 3 日目および 4 日目での PPIase 産生量の増加には、trichothecene 生合成との関連性を示唆していることが推測できるものではないであろうか。

更に特筆すべきことは、*Fusarium* 種の中で、*F. solani* が抗真菌物質として cyclosporin A を産生することが明らかにされている [111]。PPIase もまた、ここで述べたように cyclosporin A-結合蛋白質 cyclophilin として知られており、その活性は cyclosporin A によって抑制される。これまで、*F. sporotrichioides* が cyclosporin A を産生することはわかっておらず、また、著者も M-1-1 株からの分離はできなかったが、この 2 種類の *Fusarium* 属菌 *F. solani* と *F. sporotrichioides* は、小麦や大麦のような穀類作物の中で、植物病原菌としてたびたび分離されている。このように、植物体あるいは真菌群における生命活動の支配は、PPIase と cyclosporin A の化学的相互作用の介在によって調節されている可能性が示唆された。

アスパラギンの添加により顕著に上昇が見られた 2 つ目の蛋白質スポット 13 は、N-末端から 24 残基の相同性検索から、Fig. 18 に示されたほとんどの glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下 GPDase と略す) の N-末端領域と高い相同性を示し、特にそのアミノ酸配列は、*Trichoderma koningii* (以下 *T. koningii* と略す) の GPDase と 100% の相同性 (N-末端から 24 残基) を示すことから GPDase と考えられる (Fig. 18)。従来、菌類学的特徴として、*F. sporotrichioides* と *T. koningii* が完全世代になることはあまり知られていない。*Fusarium* の完全世代は *Hypocreaceae* 科の *Nectria* と *Gibberella* に属し、その一方で、*Trichoderma* の完全世代もまた *Hypocreaceae* 科の *Hypocrea* と *Podostroma* に属する [53]。*Trichoderma* 種は trichodermin のような

trichothecene 系マイコトキシンを産生することはすでに述べた。それ故、この2種類は類似した代謝産物を産生する、同じ仲間である。また、*Cochliobolus heterostrophus* (anamorph; *Bipolaris*) と *Curvularis lunata* は、28 残基目のアスパラギン酸とグルタミン酸の違いだけで GPDase と同定されている (Fig, 18)。*C. lunata* の不完全世代は *Cochliobolus lunata* であり、この2種類は、*Cochliobolus* の不完全世代に分類されている [53]。Table 3 において、*Bacillus subtilis* と人を除けば、他の微生物は子囊菌類に属する。GPDase は真核生物から細菌に至るまで広範囲に保存されており、以上のことからスポット 13 は、*F. sporotrichioides* の GPDase であることが明らかにされた。

GPDase は、解糖系の中で NAD^+ と無機燐酸塩の存在下において 1,3-diphosphoglycerate を形成するために glyceraldehyde-3-phosphate の酸化的燐酸化を触媒し、その結果、次の過程における NADH, ATP およびピルビン酸塩を形成する [47]。

また、M-1-1 株において、アスパラギンの添加による GPDase 産生量の4日目から5日目までの上昇も、4日目から5日目にかけての急激な T-2 産生性の上昇に関連していることを示し、ここでも T-2 産生性におけるアスパラギンの効果の可能性が考えられた。それは、解糖系における GPDase の活性がアスパラギンの添加によって刺激され、その結果、ピルビン酸塩の産出高が上昇し、メバロン酸の合成過程における開始原料の増加を誘発したことが示唆された。更にまた、trichothecene が、化学的には酸素原子を含む sesquiterpene であることはすでに述べたが、*T. koningii* によって生じた sesquiterpene の抗生物質である koningic acid が、GPDase の酵素活性を抑制することがわかっている [109, 141]。これは、GPDase のチオール群に結合し、酸素を不可逆的に不活化することによる [109]。これらのことから、trichothecene 生合成と GPDase との関連性が強く示唆された。

V 総括および結論

近年、真菌の二次代謝産物 マイコトキシンを産生する菌種と有毒代謝産物の同定や汚染状況、代謝や作用機序に関する多くの知見が集積し、さらに、分子生物学の発展とその導入により、マイコトキシン新知見が明らかにされつつある。しかしながら、その一方で、*Fusarium* 属菌によって産生される trichothecene 系マイコトキシンの生合成に関与する蛋白質・酵素は、Hohn らによる trichogiene synthase の報告のみである。

今回、著者は、T-2 トキシンの高い産生能を有する *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 株を用いたアスパラギン添加実験を発端とし、*Fusarium* 属菌において初めて二次元電気泳動法を蛋白質分離・分析に導入することによって、*F. sporotrichioides* M-1-1 株の菌体蛋白質の分離に成功し、更に、分離した数種の蛋白質についてのアミノ酸配列分析により、*Fusarium* 属菌で初めての菌体蛋白質の存在およびそれらの N-末端アミノ酸部分配列がここで明らかにされた。また、その結果から、trichogiene synthase に続く新たな trichothecene 生合成過程に関連すると推察された数種の蛋白質について、以下の結論が得られた。

1. アスパラギン添加の *F. sporotrichioides* M-1-1 株における trichothecene (T-2, DAS, NS) 産生性の上昇は、単に窒素源としてアスパラギンを利用し、菌体発育の活性上昇とそれにおける菌体量の総体的な増加によるとの見方もできる。その一方で、アスパラギン添加による M-1-1 株菌体蛋白質の二次元電気泳動における変動から、アスパラギンによる trichothecene 生合成に関連する酵素、あるいは蛋白質の誘導による可能性が考えられ、*F. sporotrichioides* M-1-1 株におけるアスパラギンの添加は、T-2 を始めとする trichothecene の産生を高めるのに十分な効果があり、しかも、アスパラギンの添加における trichothecene の産生性は、*Fusarium* 属菌に対して選択性を有していることが推察されたため、更に、数種の

T-2 産生菌株 を用いた アスパラギン添加による trichothecene 産生性の変動についても検討の必要があると考えられた。

2. *F. sporotrichioides* M-1-1 株における アスパラギン添加は、菌体蛋白質の合成を高め、菌体発育の活性化を促進する。また、アスパラギンの添加によって上昇した蛋白質の中には、trichothecene 生合成に関連する酵素、あるいは蛋白質の存在が推察された。

3. *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質における初の二次元電気泳動法の導入、およびレーザーキャナーでの PDQUEST™ software を用いた解析から、およそ 1,244 種の *F. sporotrichioides* M-1-1 株細胞質蛋白質の存在が証明された。また、およそ 1,244 スポットのうち、25 種類の *Fusarium* 蛋白質についてアミノ酸配列分析を行った結果、*Fusarium* 属菌にとっては、初めての報告になる細胞質蛋白質 13 種類 (malate dehydrogenase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose-phosphate isomerase, ribosomal S16 protein, phosphopyruvate hydratase, alcohol dehydrogenase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase b, ribosomal protein S12, serine proteinase, NADH dehydrogenase chain 5, hyoscyamine (6 β)-dioxygenase, arachin 25K protein) が確認され、それぞれの N-末端アミノ酸部分配列を決定できた。その中でも、*Hyoscyamus niger* の hyoscyamine (6 β)-dioxygenase と 46.7% の相同性を示した *Fusarium* 蛋白質は、trichothecene 骨格の活性中心とされる 12, 13-epoxytrichothecene 環の形成初期反応における epoxide 体を形成する前段階の水酸化反応に関連していることが推察された。これらは、trichothecene 生合成に関連する酵素系の発現や *Fusarium* 属菌の発育過程を支配する遺伝子群の特定を明らかにする上で、有効な手がかりになることが期待できる。

4. アミノ酸配列分析を行った *F. sporotrichioides* M-1-1 株菌体蛋白質 25 種類の 44.0% が、アセチル基によるアシル化を受けていることを確認し、無水ヒドラ

ジン分解以外の新たなデブロック法の開発が望まれた。

5. *F. sporotrichioides* M-1-1 株から アスパラギンの添加により明らかに上昇の認められた 2 つの蛋白質の 1 つが, *F. sporotrichioides* では初めての報告となる, *Neurospora crassa* と高い相同性 (N-末端から 41 残基まで 63.4%) を持った 2 種類の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a (PPIase a) (等電点 7.0, 19.7 kDa) および peptidyl-prolyl cis-trans isomerase b (PPIase b) (等電点 6.4, 19.7 kDa) であることを明らかにし, PPIase a はマイナータイプの PPIase であることがわかった。そして, M-1-1 株における N-末端から 41 残基までのアミノ酸配列は, *Fusarium* 属における PPIase のアミノ酸部分配列としても初めての報告であった。また, アスパラギン添加における PPIase の上昇は, 菌体産生量の増加および T-2 産生性の上昇と一貫した関連性が伺われ, trichothecene 生合成に関与すると推察された。更に, *Fusarium* 属菌における PPIase の存在から, 菌体発育における生命活動の支配は, cyclosporin A との化学的相互作用の介在によって調節されている可能性が期待された。

アスパラギンの添加により顕著に上昇が見られた 2 つ目の蛋白質は, *Trichoderma koningii* と 100% の相同性 (N-末端から 24 残基) を示す glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDase) であることが *Fusarium* 属で初めて明らかにされた。また, M-1-1 株における N-末端から 24 残基までのアミノ酸配列は, *Fusarium* 属における GPDase のアミノ酸部分配列としても初めての報告であった。更に, アスパラギン添加における GPDase の上昇は, 菌体産生量の増加および T-2 産生性の上昇と一貫した関連性が伺われ, trichothecene 生合成の発端であるメバロン酸の合成過程における開始原料の増加誘発に関連していることが推察された。

VI 謝 辞

本論文の作製にあたり，御懇切な御校閲を賜った麻布大学獣医学部微生物学第一講座・田淵清教授，生化学講座・古泉巖教授，分子生物学講座・藤谷英男教授，微生物学第一講座・木内明男助教授，池田輝雄講師に深甚の謝意を表します。

また，本研究遂行にあたり一貫して御指導いただき，更に研究の場を与えてくださった，東京理科大学薬学部毒性学微生物化学教室・上野芳夫教授，東京理科大学生命科学研究所・次田皓教授に深謝致します。また上野芳夫教授に於きましては貴重な菌株を分与していただき感謝の意を致します。

忘れてはならないのは，私の研究を支えてくださった多くの先生方並びに先輩諸氏であります。以下にその氏名と所属を記して謹んで感謝の意を表します。杉浦義昭博士（東京理科大学薬学部），川村理博士（東京理科大学薬学部），加茂政晴博士（東京理科大学薬学部），川上隆雄先生（東京理科大学薬学部），西田利穂助教授（麻布大学獣医学部），猪股智男助教授（麻布大学獣医学部），白井明志博士（麻布大学獣医学部），深谷裕子先生（千葉市食肉衛生検査所）。

最後に，研究を進めるにあたり御協力頂きました東京理科大学薬学部毒性学微生物化学教室研究生，東京理科大学生命科学研究所蛋白研究室研究生，麻布大学獣医学部微生物学第一講座研究生各位に謝意を表します。

Ⅶ 引用文献

1. Ackers, G.K. 1975. Molecular sieve methods of analysis, in Neurath, H. and Hill, R.L. (eds), The proteins (3rd ed.), Vol. 1, pp. 1-94, Academic Press.
2. Aebelsold, R., Pipes, G.D., Wettenhall, R.E.H., Nika, H. and Hood, L.E. 1990. Covalent attachment of peptides for high sensitivity solid-phase sequence analysis. *Anal. Biochem.* 187: 56-65.
3. Aebelsold, R.H., Teprow, D.B., Hood, L.E. and Kent, S.B.H. 1986. Electrophoretic transfer onto activated glass. High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence analysis. *J. Biol. Chem.* 261: 4229-4238.
4. Akabori, S., Ohno, K. and Narita, K. 1952. Hydrazinolysis of proteins and peptides: method for the characterization of carboxy-terminal amino acids in proteins. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 25: 214-218.
5. Allcroft, R. and Rogers, O.B.E. 1966. Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of the 'Milk toxin'. *Nature.* 5019: 154-155.
6. Altland, K., Banzhoff, A., Hackler, R. and Rossmann, U. 1984. Improved rehydration procedure for polyacrylamide gels in presence of urea: Demonstration of inherited human prealbumin variants by isoelectric focusing in an immobilized pH gradient. *Electrophoresis.* 5: 379-381.
7. Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 181: 223-230.
8. Applied biosystem, Model 477 Protein-peptide sequencing system users manual. pp. 3: 38-39. Sequencing samples producing high lag.
9. Barker, W.C., George, D.G., Mewes, E.W., Pfeiffer, F and Tsugita, A. 1993. The PIR-international databases. *Nucl. Acids Res.* 21: 3089-3092.
10. Bartling, D., Heese, A. and Weiler, E.W. 1992. Nucleotide sequence of a cDNA encoding an *Arabidopsis* cyclophilin-like protein. *Plant Mol. Biol.* 19: 529-530.

11. Bauw, G., Loose, M.D., Inze, D., Montagu, M.V. and Vanderckhove, J. 1987. Alterations in the phenotype of plant cells studied by NH₂-terminal amino acid-sequence analysis of proteins electroblotted from two-dimensional gel-separated total extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 4806-4810.
12. Benjamin, T., Niu, C.H., Parmelee, D.C., Huggett, A.C., Yu, B., Roller, P.P. and Thorgeirsson, S.S. 1989. Direct N-terminal sequence analysis of rat liver plasma membrane glycoproteins separated by two-dimensional polyacrylamidgel electrophoresis. *Electrophoresis.* 10: 447-455.
13. Beremand, M.N., Van Middlesworth, F., Taylor, S., Plattner, R.D. and Weisleder, D. 1988. Leucine auxotrophy specifically alters the pattern of trichothecene production in a T-2 toxin-producing strain of *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2759-2766.
14. Bergsma, D.J., Eder, C., Gross, M., Kersten, H., Sylvester, D., Appelbaum, E., Cusimano, D., Livi, G.P., McLaughlin, M.M., Kasyan, K., Prichett, W.P., Bossard, C.S., Brandt, M. and Levy, M.A. 1991. The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* 266: 23204-23214.
15. Betina, V. 1989. *Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects.* Chapter 10, Trichothecenes, 10. 6, Biosynthesis of trichothecenes. pp. 226-241. Vol. 9, Bioactive molecules, Czechoslovakia.
16. Bhatnagar, R.K., Ahmad, S., Kohli, K.K., Mukerji, K.G. and Venkatasubramanian. 1982. Induction of polystyrene monooxygenase and aflatoxin production by phenobarbitone in *Aspergillus parasiticus* NRRL 3240. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 1287-1292.
17. Bhushan, R., Goyal, R.N. and Agarwal, A. 1985. Complete amino acid sequence of an arachin subunit. *Biochem. Int.* 11: 477-490.
18. Booth, C. 1971. "The Genes *Fusarium*." Commonwealth Agricultural Bureaux, Bucks, England. pp. 21.
19. Bradshaw, R.E. Pillar, T.M. 1991. Isolation and nucleotide sequence of the

- ribosomal protein S16-encoding gene from *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 108: 157-162.
20. Brian, P.W., Dawkins, A.W., Grove, J.F., Hemming, H.G., Lowe, D., and Norris, G.L.F. 1961. Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti*. *J. Exp. Bot.* 12: 1-12.
 21. Chang, L.H., Hsieh, J.C., Chen, W.L. and Tam, M.F. 1990. Identification of rat liver glutathione S-transferase Yb subunits by partial N-terminal sequencing after electroblotting of protein onto a polyvinylidene difluoride membrane from an analytical isoelectric focusing gel. *Electrophoresis*. 11: 589-593.
 22. Chiba, J., Kawamura, O., Kajii, H., Ohtani, K., Nagayama, S. and Ueno, Y. 1988. *Food Add. Contam.* 5: 629-639.
 23. Chin, C.C.Q., Brewer, J.M. and Wold, F. 1981. The amino acid sequence of yeast enolase. *J. Biol. Chem.* 256: 1377-1384.
 24. Coolbaugh, R.C., Hirano, S.S. and West, C.A. 1978. Studies on the specificity and site of action of α -cyclopropyl- α -[p-methoxyphenyl]-5-pyrimidine methyl alcohol (ancymidol), a plant growth regulator. *Plant Physiol.* 62: 571-576.
 25. Desjardins, A.E., Hohn, T.M. and McCormick, S.P. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: Chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.* 57.: 595-604.
 26. Desjardins, A.E., Plattner, R.D. and Beremand, M.N. Ancymidol blocks trichothecene biosynthesis and leads to accumulation of trichodiene in *Fusarium sporotrichioides* and *Gibberella pulicaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1860-1865.
 27. Desjardins, A.E., Plattner, R.D. and Vanmiddlesworth, S. 1986. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*: origin of the oxygen atoms of T-2 toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 493-497.
 28. Drobotko, V.G. 1945. Stachybotryotoxicosis a new disease of horses and

- humans. Am. Rev. Soviet Med. 2: 238-242.
39. Ebata, N., Tanaka, Y. and Negishi, A. 1991. US Patent. 5, 064, 768. 1990. Japanese Patents. Hei2-80958 and Hei2-80959.
30. Edman, P. 1949. A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. Arch. Biochem. 22: 475-476.
31. Edman, P. 1950. Method for the determination of the amino acid sequence in peptides. Acta chem. Scand. 4: 283-293.
32. Edman, p. and Begg, G. 1967. A protein sequenater. Eur. J. Biochem. 1: 80-91.
33. Evans, R., Holtom, A.M. and Hanson J.R. 1973. Biosynthesis of 2-cis-Farnesol. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 465.
34. Fischer, G. and Schmid, F.X. 1990. The mechanism of protein folding. Implication of *in vitro* refolding models for de nove protein folding and translocation in the cell. Biochemistry. 29: 2205-2212.
35. Fischer, G., Bang, H. and Mech, C. 1984. Detection of enzyme catalysis for cis-trans isomerization of peptide bounds using proline containing peptides as substrates. Biomed. Biochim. Acta. 43: 1101-1112.
36. Fischer, G., Liebold, W., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F.X. Cyclophirin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. Nature. 337: 476-478.
37. Fischer, L. 1980. Gel filtration chromatography (2 nd ed.), in Work, T.S. and Burdon, R.H. (eds.), Vol. 1, Part II, North-Holland Biomedical Press.
38. Fordham-Skelton, A.P., Yarwood, A. and Croy, R.R.D. Synthesis of saporin gene probes from partial protein sequence data: Use of inosine-oligonucleotides, genomic DNA and the polymerase chain reaction. Mol. Gen. Genet. 221: 134-138.
39. Forgacs, J. and Carll, W.T. 1962. Mycotoxicoses. Adv. Vet. Sci. 7: 273-282.

40. Freeman, G.G. and Morrison, R.I. 1949. The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link. *Biochem.* 44: 1-5.
41. Frekgard, P.O., Bergenheim, N., Jonsson, B.H., Svensson, M. and Carlsson, U. 1992. Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase. *Science.* 258: 466-468.
42. Gasser, C.S., Gunning, D.A., Budeliere, K.A. and Brown, S.M. 1990. Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 9519-9523.
43. Gorg, A., Wester, J., Westermeier, R., Postel, W., Weidinger, S., Patutschnick, W. and Cleve, H. 1983. Isoelectric focusing with immobilized pH gradients for the analysis of transferrin (Tf) subtypes and variants. *Hum Genet.* 64: 222-226.
44. Gordon, A.H. 1975. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels, in Work, T.S. and Work, E. (eds), Vol. 1, Part I, revised edition, North-Holland.
45. Haendler, B. and Hofer, E. 1990. Characterization of the human cyclophilin gene and of related processed pseudogenes. *Eur. J. Biochem.* 190: 477-482.
46. Haendler, B., Keller, R., Hiestand, P.C., Kocher, H.P., Wegmann, G. and Movva, N.R. 1989. Yeast cyclophilin: isolation and characterization of the protein, cDNA and gene. *Gene.* 83: 39-46.
47. Harris, J.I. and Waters, M. 1976. In the enzymes. In Boyer, P.D. (ed), 3rd Edn., Vol. 13, 1-49, Academic Press, New York.
48. Hasel, K.W., Glass, J.R., Godbout, M. and Sutcliffe, J.G. 1991. An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin. *Mol. Cell Biol.* 11: 3484-3491.
49. Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1985. Hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root cultures. *J.*

Plant Physiol. 81: 619-625.

50. Hashimoto, T., Yukimune, Y. and Yamada, Y. 1985. Tropan alkaloid production in *Hyoscyamus* root cultures. J. Plant Physiol. 124:61-75.
51. 服部浩朋. 金田敏郎. 大塚健三. 1992. 調整用二次元電気泳動法—スラブ NEPHGH/SDS-PAGE—. 生化学. 64: 416-420.
52. Harding, M.W., Handschumacher, R.E. and Speicher, D.W. 1986. Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. J. Biol. Chem. 261: 8547-8555.1.
53. Hawksworthy, D.L., Sutton, B.C. and Ainsworth, G.C. 1983. Ainsworth & Bibby's dictionary of the fungi, 7th edition, commonwealth mycological, Ins., Surrey, England.
54. Hendrick, J.P. and Hartl, F.U. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. Annu. Rev. Biochem. 62: 349-384.
55. Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W. Hood, L.E. and Dreyer, W.J. 1981. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. J. Biol. Chem. 256: 7990-7997.
56. 平野 久. 1987. 非蛍光プレラベル法—DABSYL-アミノ酸. 続生化学実験講座 2 タンパク質の化学・上 (日本生化学会編), pp.. 207-209, 東京化学同人.
57. 平野 久. 1987. 手動エドマン分解—DABITC 法. 続生化学実験講座 2 タンパク質の化学・上 (日本生化学会編), pp.. 317-327-209, 東京化学同人.
58. 平野 久. 1992. 遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析. pp. 1, 1 . 1 アミノ酸配列の意義. 東京化学同人.
59. Hirano, H. and Wittmann-Liebold, B. 1989. Protein microsequence analysis with dansyl-amino-PITC. "Methods in protein sequence analysis", in Wittmann-Liebold, B. (ed), pp. 42-52, Springer, Berlin.
60. 平田義正. 1947. カビの代謝性生産物について (第3, 第4報). 日化誌. 68: 104-106.

61. Hitokoto, H., Morozumi, K. and Kudou, Y. 1982. Chemically defined medium for high yields of sterigmatocystin. *Mycopathologia*. 78: 99-105.
62. Hoffmann, R.J., Boore, J.L. and Brown, W.M. 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics*. 131: 397-412.
63. Hohn, T. and Vanmiddlesworth, S. 1986. Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides*. *Arch. Biochem. & Biophys.* 275: 92-97.
64. Hornbogen, T., Pieper, R., Hoffmann, K., Kleinkauf, H. and Zocher, R. 1992. Two new cyclophilins from *Fusarium sambucinum* and *Aspergillus niger*: resistance of cyclophilin/ cyclosporin A complexes against proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 791-796.
65. Hsieh, J.C., Lin, F.P. and Tam, M.F. 1988. Electroblotting onto glassfiber from an analytical isoelectrofocusing gel: a preparative method for isolating proteins for N-terminal microsequencing. *Anal. Biochem.* 170: 1-8.
66. Hughes, G.J. and Wilson, K.J. 1983. High-performance liquid chromatography: analytic and preparative application in protein-structure determination. *Methods Biochem. Anal.* 29: 59-135.
67. Ishii, K., Sato, H. and Ueno, Y. 1985. Production of 3-acetyldeoxynivalenol in shake culture. *Mycotoxin Res.* 1: 19-24.
68. 川村 理. 上野芳夫. 1990. マイコトキシンの作用機序. *臨床獣医*. 8: 44-50.
69. Kawamura, O., Nagayama, S., Sato, S., Ohtani, K., Sugiura, Y., Tanaka, T. and Ueno, Y. 1990. Survey of T-2 toxin in cereals by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Food & Agric. Immunol.* 2: 173-180.
70. Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. and Schmid, F.X. 1990. Folding of ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by prolin isomerization. *Biochemistry.* 29: 3053-3061.
71. Knierim, M., Buchholz, J. and Pflug, W. Electrotransfer of proteins after

- isoelectric focusing (with or without urea) on fabric-reinforced, immobilized pH gradient gels. *Anal. Biochem.* 172: 139-144.
72. Koletsky, A.J., Harding, W. and Handschumacher, R.E. 1986. Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J. Immunology.* 137: 1054-1059.
73. Kopetzki, E., Entian, K.D., Lottspeich, F. and Mecke, D. 1987. Purification procedure and N-terminal amino acid sequence of yeast malate dehydrogenase isoenzymes. *Biochem. Biophys. Acta.* 912: 398-403.
74. Koser, P.L., Sylvester, D., Livi, G.P. and Bergsma. 1990. A second cyclophilin-related gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 18: 1643.
75. Koser, P.L., Livi, G.P., Levy, M.A., Rosenberg, M. and Bergsma. D.J. 1990. A *candida albicans* homology of a human cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Gene.* 96: 189-195.
76. Kristina, Ek., Bjellqvist, B. and Righetti, P.G. 1983. Preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients. I. General principles and methodology. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 8: 135-155.
77. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* 227: 680-685.
78. Lang, K., Schmid, F.X. and Fischer, G. 1987. Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature.* 329: 268-270.
79. Lee, C.C., Wu, X., Gibbs, R.A., Cook, R.G., Muzny, D.M. and Caskey, C.T. 1988. Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: Cloning of oxidase. *Science.* 239: 1288-1290.
80. Liu, J., Albers, W., Chen, Chih-Ming., Schreiber, S.L. and Walsh, C.T. 1990. Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteins by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2304-2308.

81. Liu, X.Q., Gillham, N.W. and Boynton, J.E. 1989. Chloroplast ribosomal protein gene rps 12 of *Chlamydomonas reinhardtii*. Wild-type sequence, mutation to streptomycin resistance and dependence, and function in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264: 16100-16108.
82. Lowe, C.R. 1979. An introduction to affinity chromatography, in Work, T.S. and Work, E. (eds), Vol. 7, Part II, North-Holland.
83. Machida, Y. and Nozoe, S. 1972. Biosynthesis of trichothecene and related compounds. *Tetrahedron.* 28: 5113-5117.
84. Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A. 1984. Toxicogenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.
85. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomol quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038.
86. Matsuda, J., Okabe, S., Hashimoto, T. and Yamada, Y. 1991. Molecular cloning of hyoscyamine 6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. *J. Biol. Chem.* 266: 9460-9464.
87. 南 康文. 矢原一郎. 1993. 分子シャペロン. *科学.* 63: 517-525.
88. Miyatake, N., Kamo, M., Satake, K., Uchiyama, Y. and Tsugita, A. 1993. Removal of N-terminal formyl groups and deblocking of pyrrolidone carboxylic acid of proteins with anhydrous hydrazine vapor. *Eur. J. Biochem.* 212: 785-789.
89. 諸角 聖. 和字慶朝昭. 一言 広. 工藤泰雄. 1988. トリコテセン系カビ毒産生用合成培地の検討. *食品と微生物.* 5: 131-136.
90. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. 1988. dependence of particle and fiber properties. *Electrophoresis.* 9: 255-262.
91. O' Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of

- proteins. J. Biol. Chem. 250 : 4007-4021.
92. Ohsawa, K., and Ebata, N. 1983. Silver stain for detecting 10-femtogram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem.135: 409-415.
 93. Ohtsubo, K., Kaden, P. and Mittermayer, C. 1970. Polyribosomal breakdown in mouse fibroblaste (L-cells) by fusarenon-X, a toxic principle isolated from *Fusarium nivale*. Biochem. Biophys. Acta. 287: 520-525.
 94. Ohtsubo, K., Ryu, J.C., Nakamura, K., Izumiyama, N., Tanaka, T., Yamamura, H., Kobayashi, T. and Ueno, Y. 1989. Chronic toxicity of nivalenol in female mice: a 2-year feeding study with *Fusarium nivale* Fn 2B-moulded rice. Food Chem. Toxicol. 27: 591-598.
 95. Ohtsubo, K., Yamada, M. and Saito, M. 1968. Inhibitory effect of nivalenol, a toxic metabolite of *Fusarium nivale*, on the growth cycle and biopolymer synthesis of Hera cells. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 21: 185-194.
 96. Osiewacz, H.D. and Ridder, R. 1991. Genome analysis of imperfect fungi: electrophoretic karyotyping and characterization of the nuclear gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate (GPD) of *Curvularia lunata*. Curr. Genet.20: 151-155.
 97. Pahl, A., Uehlein, M., Bang, H., Schlumbohm, W. and Keller, U. 1992. *Streptomyces* peptidyl-prolyl cis-trans isomerase that strongly resemble cyclophilins from eukaryotic organisms. Mol. Microbiol. 6: 3551-3558.
 98. Peterson, E.A. 1970. Cellulosic ion exchangers, in Work, T.S. and Work, E. (eds), Vol. 2, Part II, North-Holland.
 99. Punt, P.J., Dingemanse, M.A. Jacobs-Meijnsing, B.J.M., Pouwels, P.H. and van den Hondel, C.A.M.J.J. 1988. Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. Gene. 69: 49-57.
 100. Ramagli, L.S. and Rodriguez, L.V. 1985. Quantitation of microgramme amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

sample buffer. Electrophoresis. 6: 559-563.

101. Resnick, S., Zimmer, B., Pappagianis, D., Eakin, A. and McKerrow, J. 1990. Purification and amino-terminal sequence analysis of the complement-fixing and precipitin antigens from *Coccidioides immitis*. J. Clin. Microbiol. 28: 385-388.
102. Ridder, R. and Osiewacz, H.D. 1992. Sequence analysis of the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) of *Podospora anserina*: use of homologous regulatory sequences to improve transformation efficiency. Curr. Genet. 21: 207-213.
103. Rinfret, A., Collins, C., Menard, R. and Anderson, S.K. 1994. The N-terminal cyclopolin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and chaperone activities. Biochemistry. 33:1668-1673.
104. Robertson, A. Cartwright, N.J., Whalley, W.B. 1949. A synthesis of citrinin. Nature. 163: 94-95.
105. Roux, P., and Labarere, J. 1990. Isozyme characterization of dikaryotic strains of the edible basidiomycete *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*). J. Exp. Mycology. 14: 101-112.
106. Russell, P.R. and Hall, B.D. 1983. The primary structure of the alcohol dehydrogenase gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. 258: 143-149.
107. Russell, P.R. 1985. Transcription of the triose-phosphate isomerase gene of *Schizosaccharomyces pombe* initiates from a start point different from that in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 40: 125-130.
108. 酒井文徳. 1955. *Penicillium citrinum* Thom の寄生による"黄変米", 並びにその菌に由来する色素 Citrinin の毒性殊に腎臓障害作用に関する実験的研究. 日本薬理誌. 51: 431-442.
109. Sakai, K., Hasumi, K. and Endo, A. 1988. Inactivation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by kojonic acid. Biochim.

- Biophys. Acta. 1077: 192-196.
110. Sakaki, K., Hasumi, K. and Endo, A. 1990. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozymes from the koningic acid (heptelidic acid) producer *Trichoderma koningii*. Eur. J. Biochem. 193: 195-202.
 111. Sawai, K., Okuno, T., Terada, Y., Harada, H., Sawamura, K. and Sasaki, H. 1981. Isolation and properties of two antifungal substances from *Fusarium solani*. Agric. Biol. Chem. 45: 1223-1228.
 112. Shibata, S., Natri, S., Udagawa, S. 1964. Univ. Tokyo Press, Tokyo.
 113. Shibata, S., Ogihara, Y., Tokutake, Y. and Tanaka, O. 1965. Duclauxin, a metabolite of *Penicillium duclauxi* (Delacroix). Tetrahedron Letter. 18: 1287-1288.
 114. Shoun, H., Sudo, Y. and Bepp.u, T. 1984. Subterminal hydroxylation of fatty acids by a cytochrome P-450-dependent enzyme system from a fungus, *Fusarium oxysporum*. J. Biochem. 97: 755-763.
 115. Shoun, H., Sudo, Y., Sato, K. and Bepp.u, T. 1989. Components of the cytochrome P-450 monooxygenase system of the fungus, *Fusarium oxysporum*: conditions induction and isolation of cytochrome b_5 . Agric. Biol. Chem. 53: 2153-2161.
 116. Shoun, H., Sudo, Y., Seto, Y. and Bepp.u, T. 1983. Purification and properties of a cytochrome P-450 of a fungus, *Fusarium oxysporum*. J. Biochem. 94: 1219-1229.
 117. Smith, J.E. and Berry, D.R. 1974. An introduction to the biochemistry of fungal development, Academic Press, London.
 118. Smith, J.E. and Berry, D.R. 1976. The filamentous fungi, Vol. 2, Biosynthesis and metabolism, in Arnold, E. (ed.), London.
 119. Stamnes, M., Rutherford, S.L. and Zuker, C.S. 1992. Cyclophilins: a new family of proteins involved in intracellular folding. Reviews. 2: 272-276.

120. 田淵 清. 池田輝雄. 1992. 獣医真菌学. 第5版. II真菌の培養法とその発育・増殖. pp. 21-28. 麻布大学獣医学部・微生物学講座.
121. Takahashi, N., Hayano, T. and Suzuki, M. 1989. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*. 337: 473-475.
122. Templeton, M.D., Rikkarink, E.H.A., Solon, S.L. and Crowhurst, R.N. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulate*. *Gene*. 122: 225-230.
123. Tropschug, M., Nicholson, D.W., Hartle, F.U., Koehler, H., Pfanner, N., Wachter, E. and Neupert, W. 1988. Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of *Neurospora crassa*. One gene codes for both the cytosolic and mitochondrial forms. *J. Biol. Chem.* 263: 14433-14440.
124. Tso, J.Y., Kao, X.H., Reece, K.S. and Wu, R. 1985. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13: 2485-2502.
125. Tugita, A., Kawakami, T., Uchiyama, M., Kamo, M., Miyatake, N. and Nozu, Y. 1994. Separation and characterization of rice proteins. *Electrophoresis*. 15: 708-720.
126. 上野芳夫. 1973. 総説. 赤カビ毒 (I) . 食衛誌. 14: 403-414.
127. Ueno, Y. 1980. Trichothecene mycotoxins, mycology, chemistry, and toxicology, in Draper, H.H. (eds.), *Advances in nutritional reserch*, Vol. 3, pp. 301-353. Plenum Publishing Corporation, New York.
128. Ueno, Y. 1984. *Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects*, Elsevier, Amsterdam.
129. Ueno, Y. 1987. Trichothecenes in food, in Krough, P. (ed.), *Mycotoxins in Food*, pp.. 123-147. Academic Press, Inc., London.

130. Ueno, Y. and Fukushima, K. 1968. Inhibition of protein and DNA synthesis in Ehrlich ascites tumour by nivalenol, a toxic principle of *Fusarium nivale*-growing rice. *Experientia*. 24: 1032-1033.
131. Ueno, Y., Hosoya, M. and Ishikawa, Y. 1969. Inhibitory effects of mycotoxins on the protein synthesis in rabbit reticulocytes. *J. Biochem.* 66: 419-422.
132. Ueno, Y., Ishii, K., Sakai, S., Kanaeda, H., Tsunoda, T., Tanaka, T. and Enomoto, M. 1972. Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. VI. Microbial survey on "bean-hulls poisoning of horses" with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of *Fusarium solani* M-1-1. *Jpn. J. Exp. Med.* 42: 187-203.
133. Ueno, Y., Ishikawa, Y., Nakajima, M., Sakai, K., Ishii, K., Tsunoda, H., Saito, M., Enomoto, M., Ohtsubo, K., and Umeda, M. 1971a. Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. I. Screening of toxic strains. *Japan. J. Exp. Med.* 41: 257-272.
134. Ueno, Y., Yabe, T., Hashimoto, H., Sekijima, M., Masuda, T., Kim, D.J., Hasegawa, R. and Ito, N. 1992. Enhancement of GST-P-positive liver cell foci development by nivalenol, a trichothecene mycotoxin. *Carcinogenesis*. 13: 787-791.
135. Ueno, Y. and Yamakawa, H. 1970. Antiprotozoal activity of scirpene mycotoxins of *Fusarium nivale* Fn 2B. *Jpn. J. Exp. Med.* 40: 385-390.
136. 浦口健二. 1947. かび米の一種 黄変米に有毒物質の存在することについて : 黄変米の毒性に関する薬理学的研究 その1. *日新医学*. 34: 155-161.
137. Vandekerckhove, J., Bauw, G., Puype, M., Damme, J.V. and Montag, M.V. 1985. Protein-blotting on polybrene-coated glass-fiber sheets. A basis for acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomole quantities of protein previously separated on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel. *Eur. J. Biochem.* 152: 9-19.
138. Vandekerckhove, J. and Bauw, G. 1987. Amino acid sequence analysis of proteins separated by one and two-dimensional gel electrophoresis and

- electroblotted on polybase-coated glass-fiber sheets. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 368: 443-444.
139. Vertinskii, K.I. 1940. Food poisoning in horses due to *Syachybotrys alternans*. Veterinaria. 5: 61-68.
 140. Viane, A. and Dhaese, P. 1989. Sequence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. 17: 1251.
 141. Watanabe, H., Hasumi, K., Fukushima, Y., Sakai, K. and Endo, A. 1993. Cloning of two isozymes of *Trichoderma koningii* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with different sensitivity to koningic acid. Biochim. Biophys. Acta. 1172: 43-48.
 142. WHO, IPCS 105, Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. 1990.
 143. Wilson, B.J. 1966. Toxins other than aflatoxins produced by *Aspergillus flavus*. Bact. Rev. 30: 478-484.
 144. Wilson, B.J. and Wilson, C.H. and Hayes, A.W. 1968. Tremorgenic toxin from *Penicillium cyclopium* grown on food materials. Nature. 220: 77-78.
 145. Wogan, G.N. 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bact. Rev. 30: 460-470.
 146. Yamamoto, A., Toda, H. and Sakiyama, F. 1989. Vapor-phase hydrazinolysis for microdetermination of carboxy-terminal amino acids of proteins. J. Biochem. 106: 552-554.
 147. Yoder, O. 1991. Submitted to the EMBL data library, reference number: S22150.

Table 1. Partial amino-terminal sequences of *F. sporotrichioides* proteins from two dimensional gel electrophoresis.

Spot number on the Fig. 12	pI	M.W.	N-terminal sequence	Possible protein name
1	9.0	19.1	AYGTVRVDVDAQ/	ribosomal protein S16 [19]
2	8.9	18.8	MITKQGTIRXA/	ribosomal protein S12 [81]
3	8.5	26.4	QLLKGYVVDGKF/	alcohol dehydrogenase (EC1.1.1.1.) [106]
4	8.3	21.3	blocked	---
5	8.1	16.5	TTVSYDTGYDDKSRPMTSVA/	serine proteinase (EC3.4.21) [101]
6	8.0	20.9	SEVSPVTGYFGLMAPMTDV/	arachin 25K like protein
7	7.6	34.0	YKVTVLGAAGGI/	malate dehydrogenase (EC1.1.1.37) [73]
8	7.3	16.8	blocked	---
9	7.0	19.7	GNKVFFDITWEGPVFQNGKPTSTV/	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC5.2.1.8) [123]
10	6.9	25.0	blocked	---
11	6.8	37.9	blocked	---
12	6.4	19.7	GNKVFFDITWEGVXQNGKP/	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC5.2.1.8) [123]
13	6.2	42.6	APKIVGNGFGRIGRIVFRNAVEH/	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC1.2.1.12) [110]
14	6.1	47.9	QXPGYEIIITG/	NADH dehydrogenase (EC1.6.5.3) chain 5 [62]
15	5.9	59.6	Deblock→QTVSXMPELLXXVVDN/	not identity
16	5.8	39.1	blocked	---
17	5.7	43.0	blocked	---
18	5.7	25.9	blocked	---
19	5.6	30.5	VQQIPKANHILLDLT/	hyocyanin (6 β)-dioxygenase (EC1.14.11.11.) [23]
20	5.5	14.6	blocked	---
21	5.1	28.9	ARKFFVGGNF/	triose-phosphate-isomerase (EC5.3.1.1.) [107]
22	5.1	18.0	blocked	---
23	5.0	47.0	AIVLVFARSVDK/	phosphopyruvate hydratase (EC4.2.1.11) [23]
24	4.6	49.9	blocked	---
25	4.4	34.6	blocked	---

Table 2. Partial amino-terminal sequence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of *F. sporotrichioides*

Residual number	Amino acid	Yield (p-mol)	Residual number	Amino acid	Yield (p-mol)
1	G	41.9	21	T	3.2
2	N	26.0	22	S	1.0
3	K	24.3	23	T	3.0
4	V	68.2	24	V	12.9
5	F	47.8	25	K	6.0
6	F	61.8	26	E	2.3
7	D	32.1	27	Q	2.8
8	I	75.0	28	S	2.3
9	T	49.8	29	G	1.4
10	W	2.3	30	R	0.8
11	E	23.5	31	I	3.7
12	G	60.3	32	N	1.1
13	P*	16.3	33	F	2.1
14	V	36.4	34	N	1.3
15	F	35.8	35	L	3.1
16	Q	52.8	36	F	2.1
17	N	44.0	37	N	1.9
18	G	30.6	38	D	+
19	K	15.4	39	Q	0.7
20	P*	11.6	40	V	2.2
			41	P	+

*: The parts to which OPA reaction was applied.

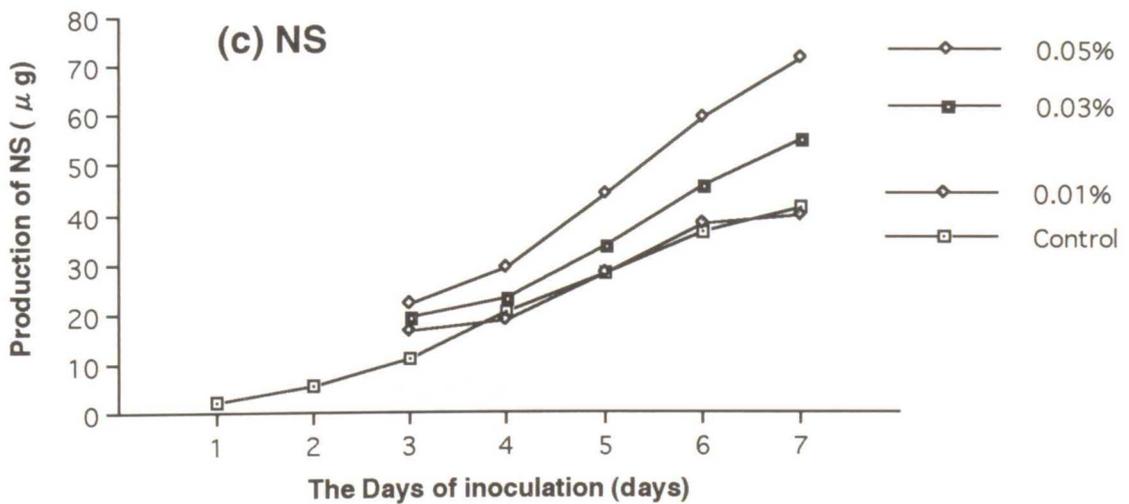
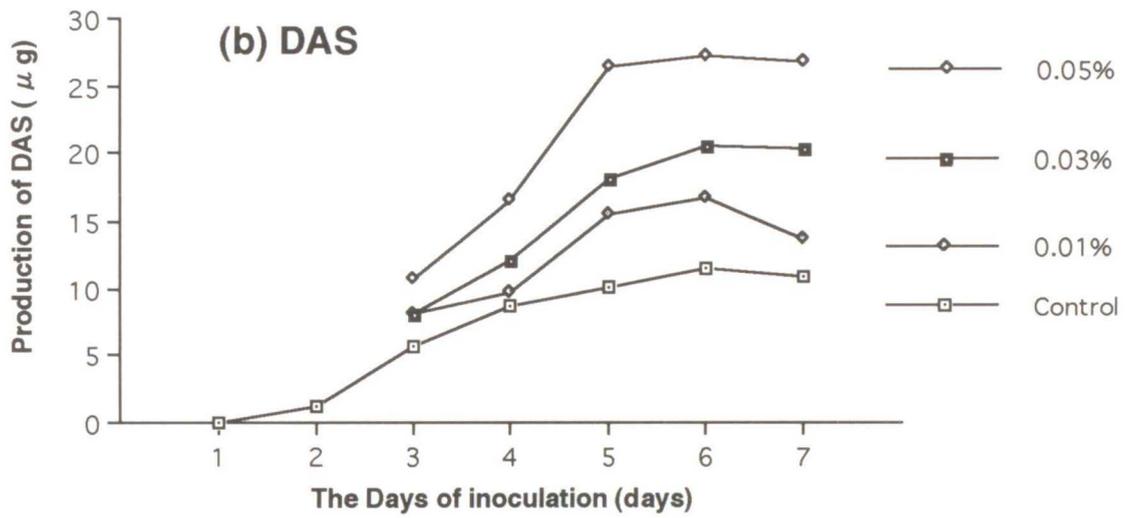
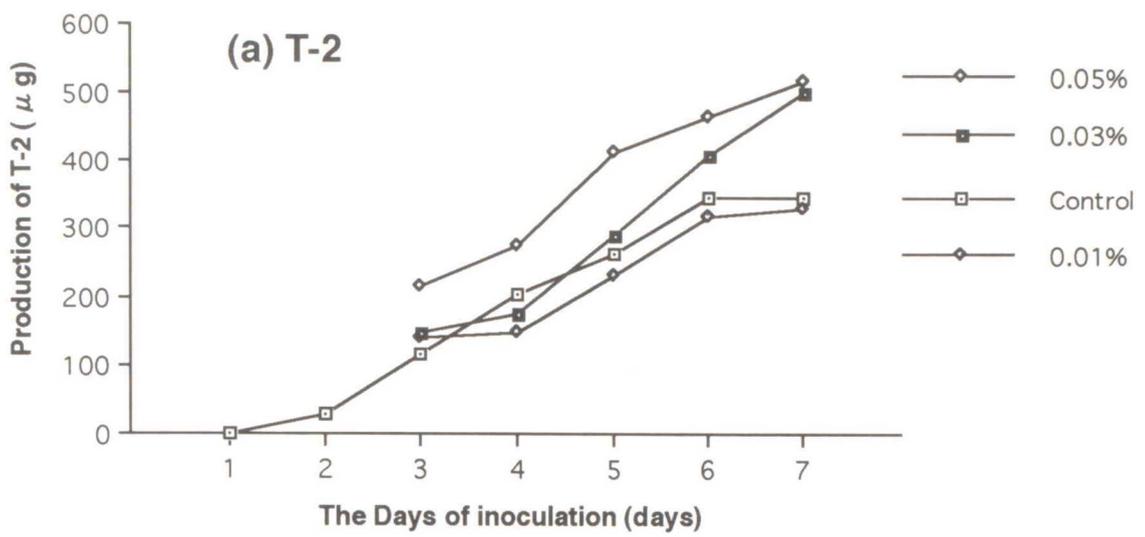


Fig. 1. Effect of asparagine on the production of trichothecenes in *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 strain. (a); T-2, (b); DAS, (c); NS

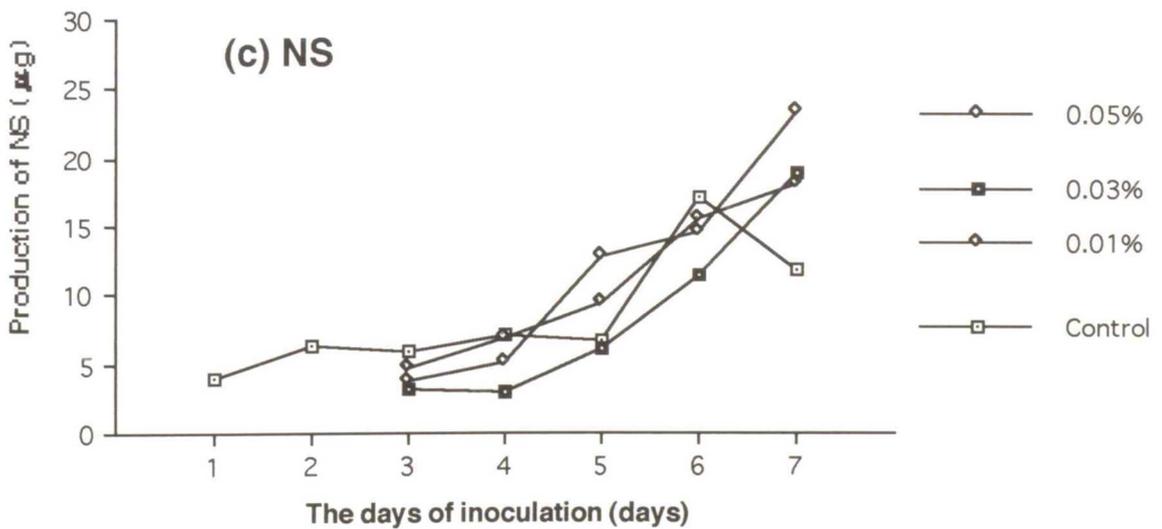
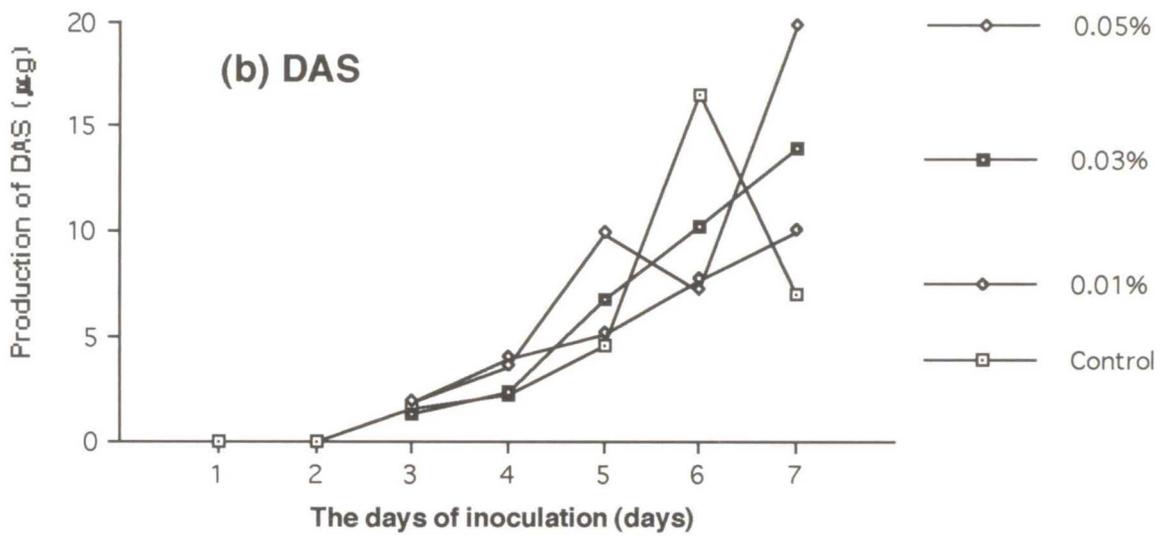
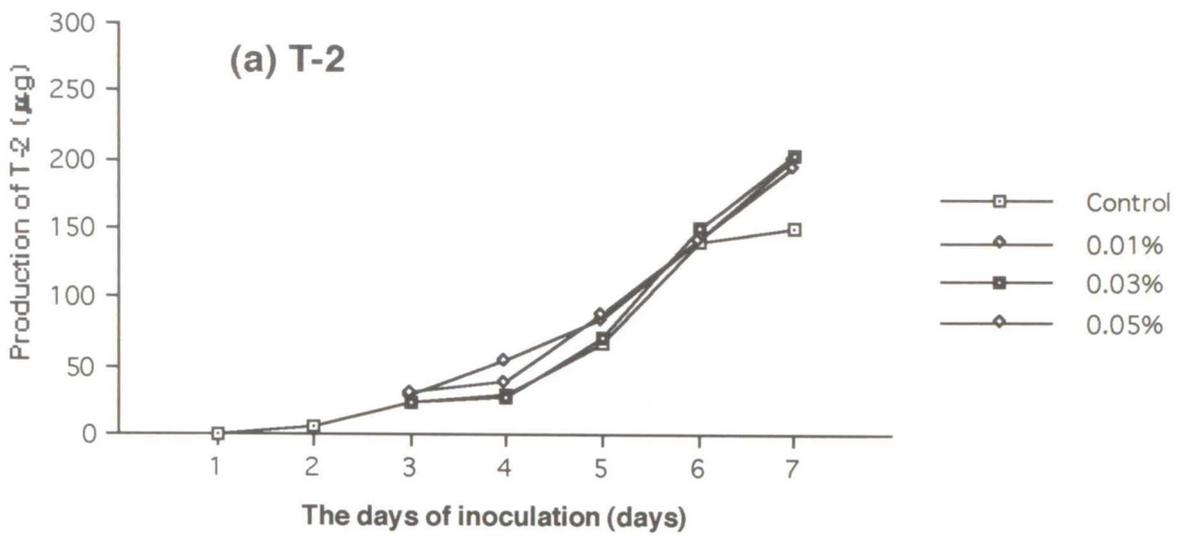


Fig. 2. Effect of asparagine on the production of trichothecenes in *Fusarium sporotrichioides* R2301 strain. (a); T-2, (b); DAS, (c); NS

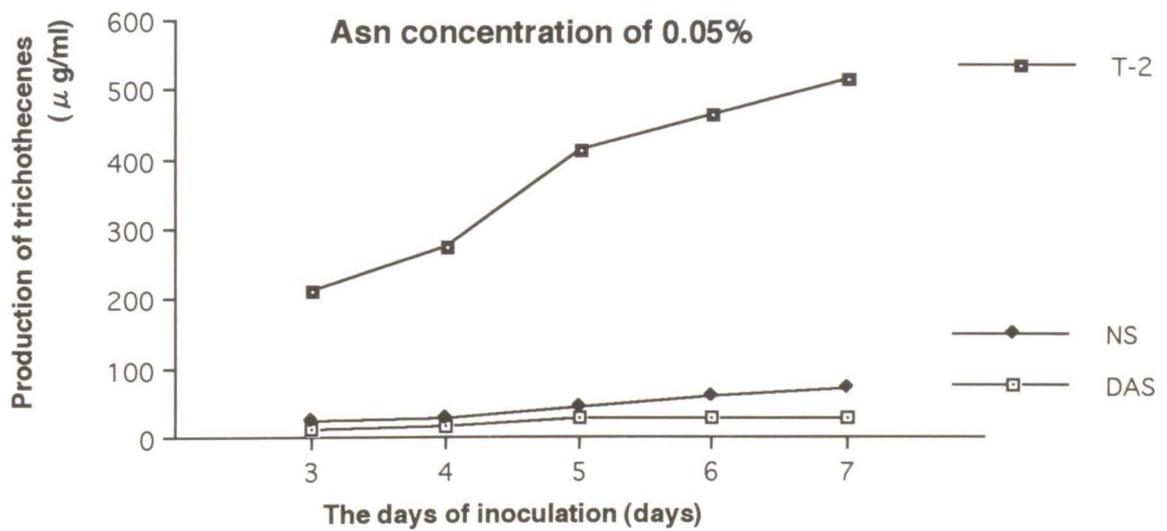
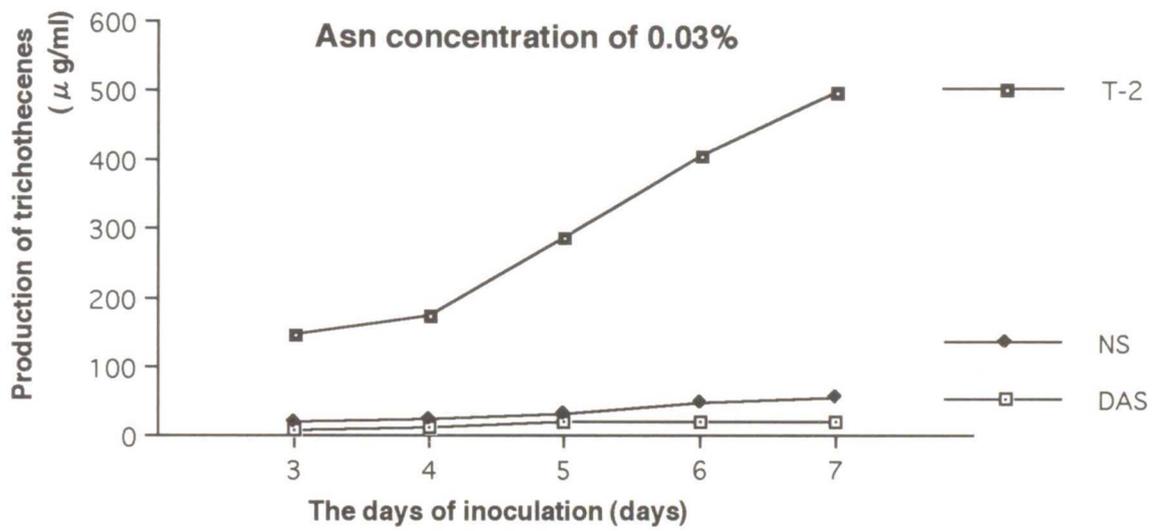
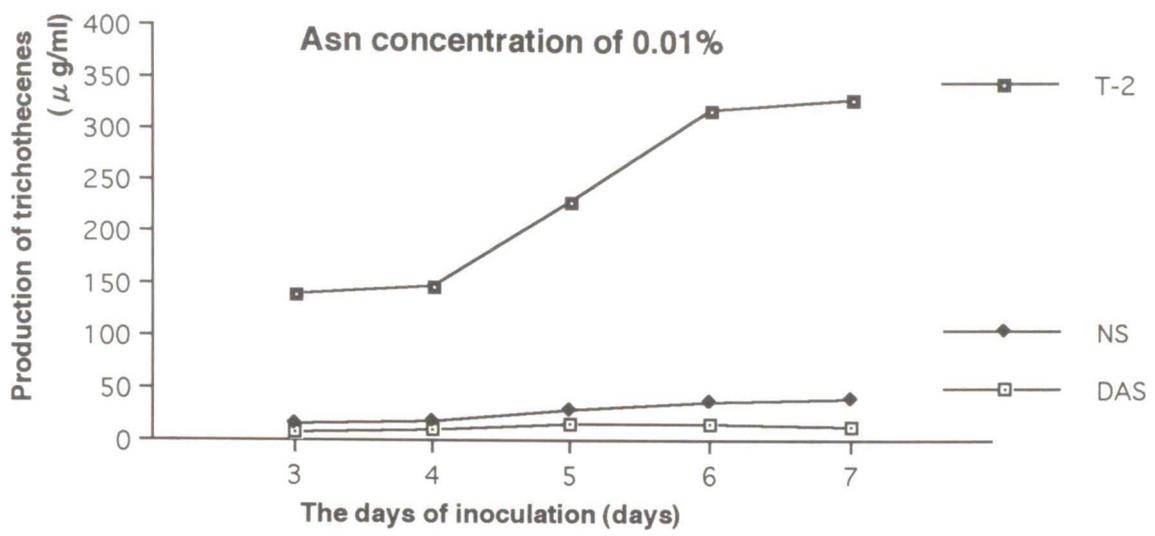


Fig. 3. Effect of asparagine on the production of trichothecenes in *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 strain. (a); 0.01%, (b); 0.03%, (c); 0.05%

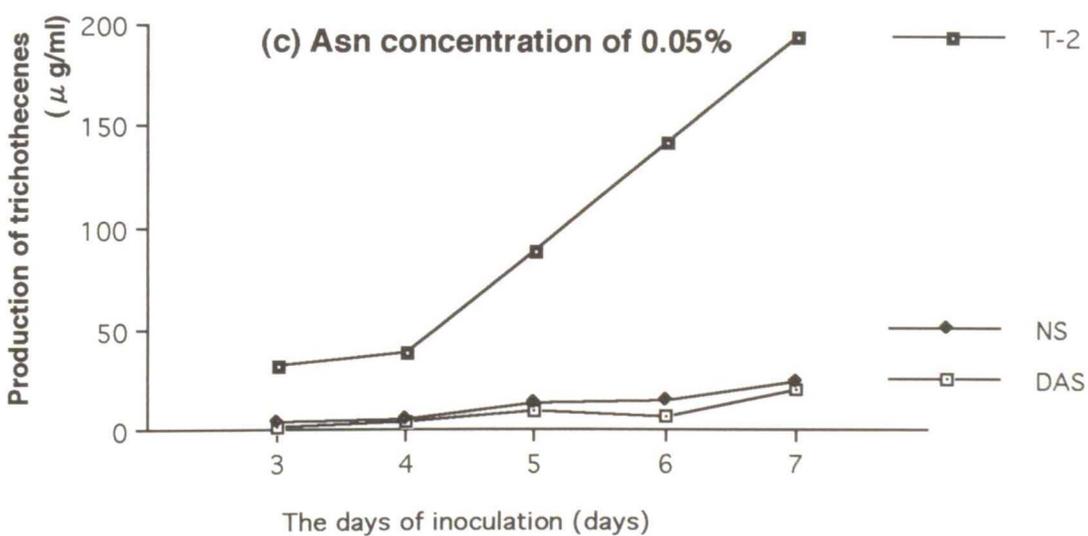
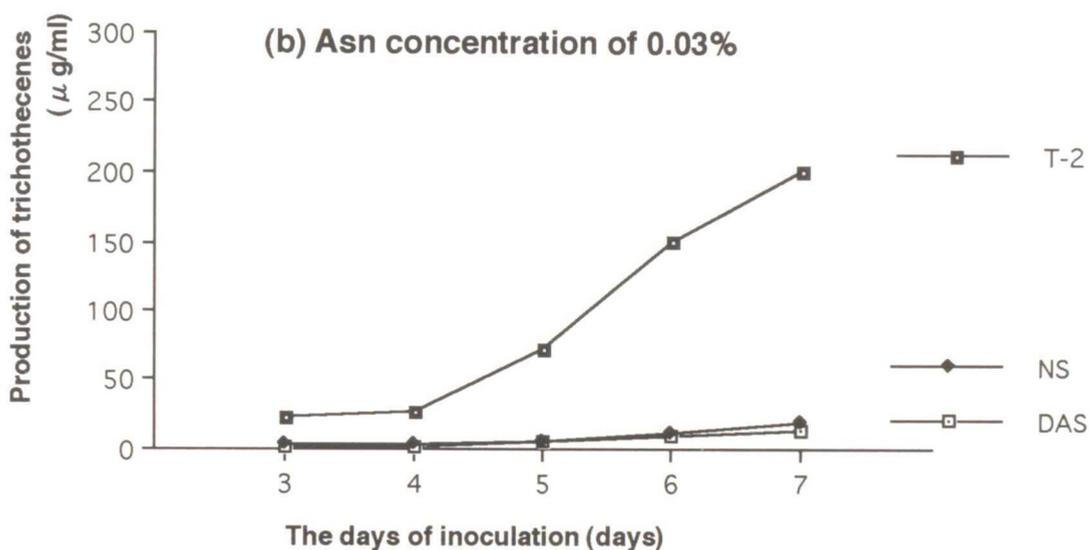
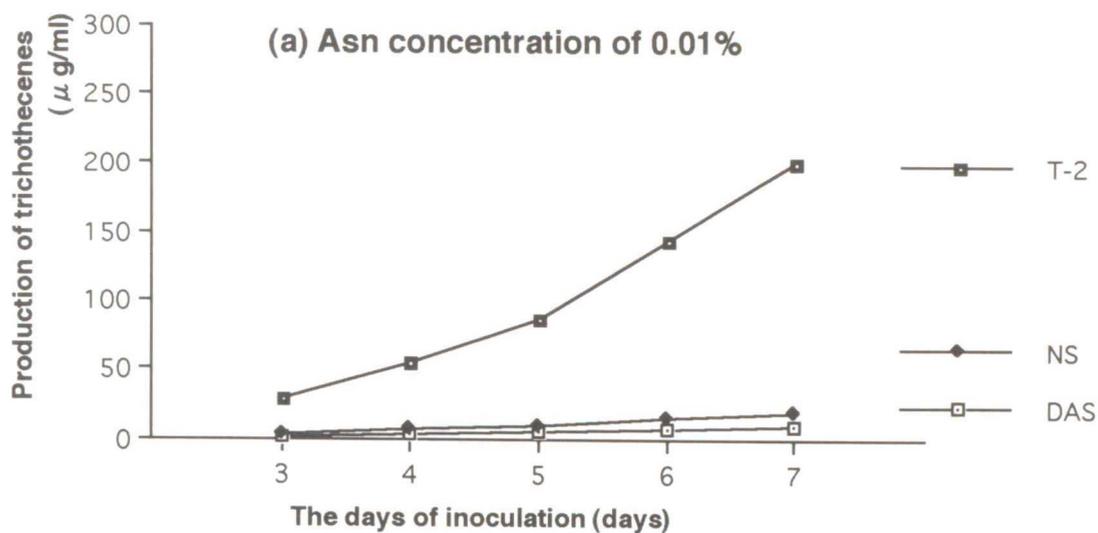


Fig. 4. Effect of asparagine on the production of trichothecenes in *Fusarium sporotrichioides* R2301 strain. (a); 0.01%, (b); 0.03%, (c); 0.05%

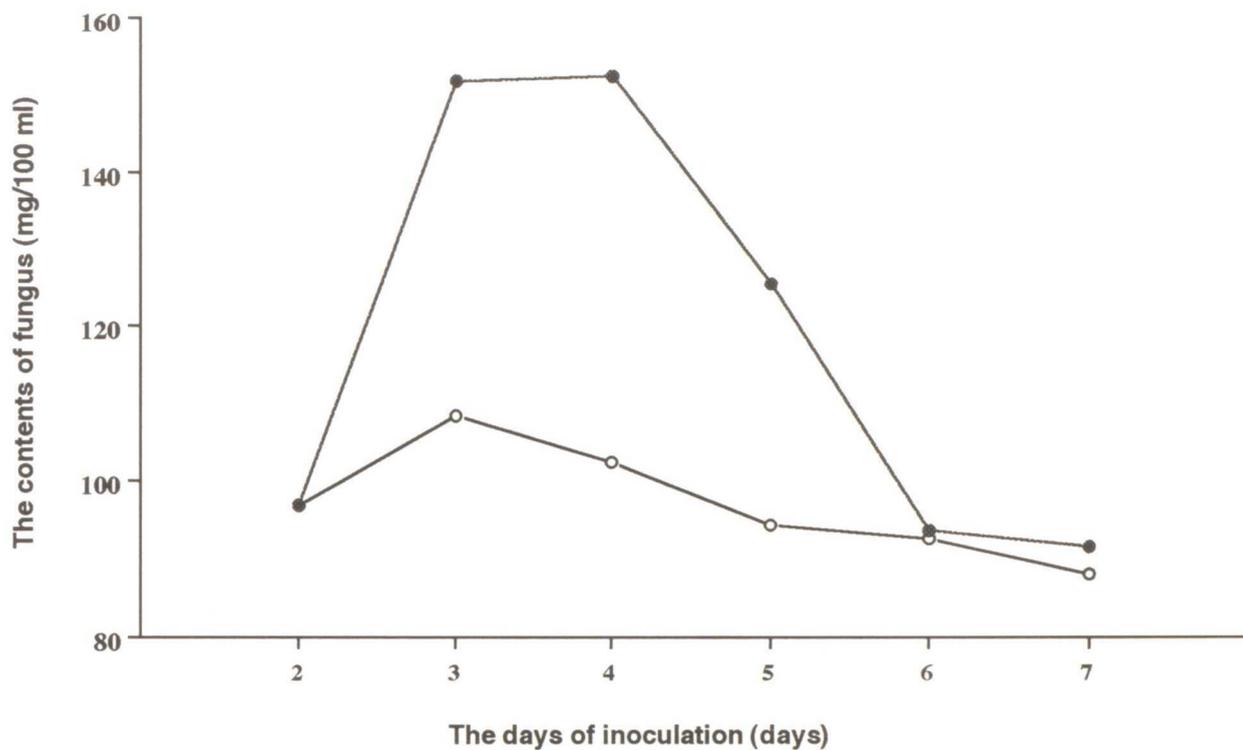


Fig. 5. Effect of asparagine on the fungal growth of *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 strain. ○—○; Control. ●—●; Fluctuation of fungus tissue in the presence of asparagine (final concentration of 0.05%) for 2 days.

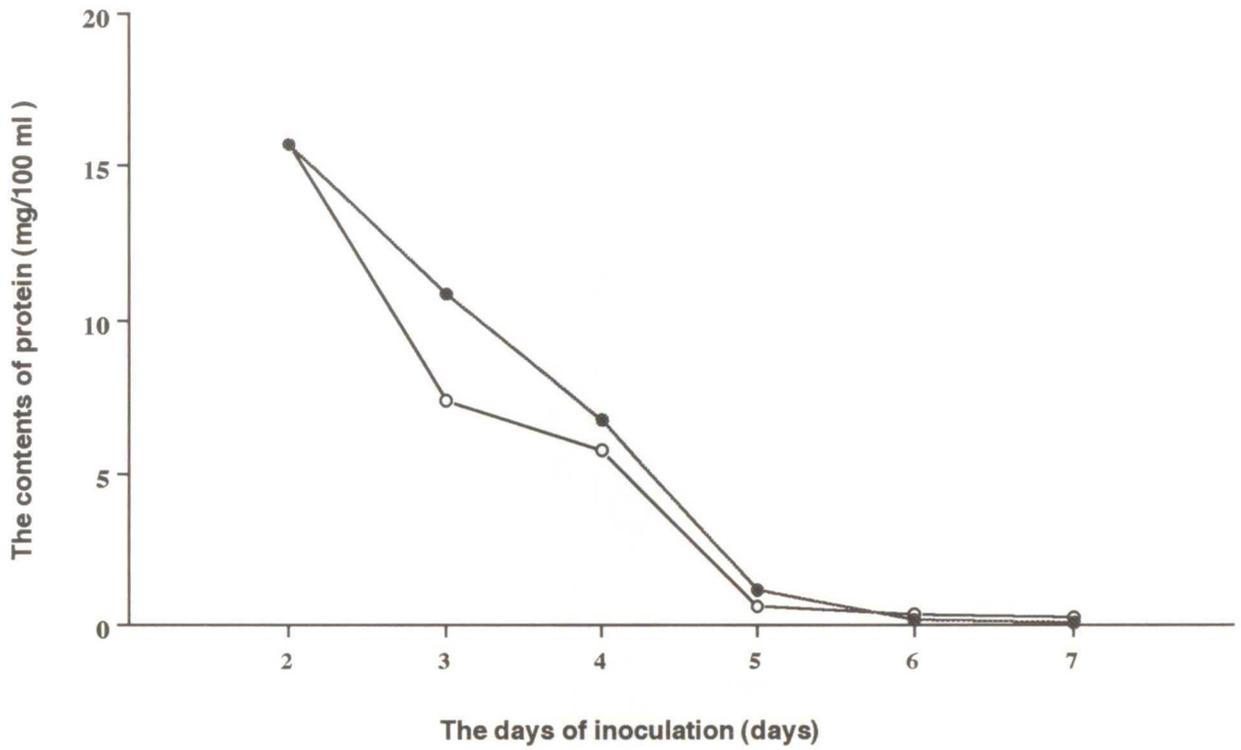


Fig. 6. The contents of extracted protein in fungus tissue of *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 strain. ○—○; Control. ●—●; Fluctuation of fungus tissue in the presence of asparagine (final concentration of 0.05%) for 2 days.

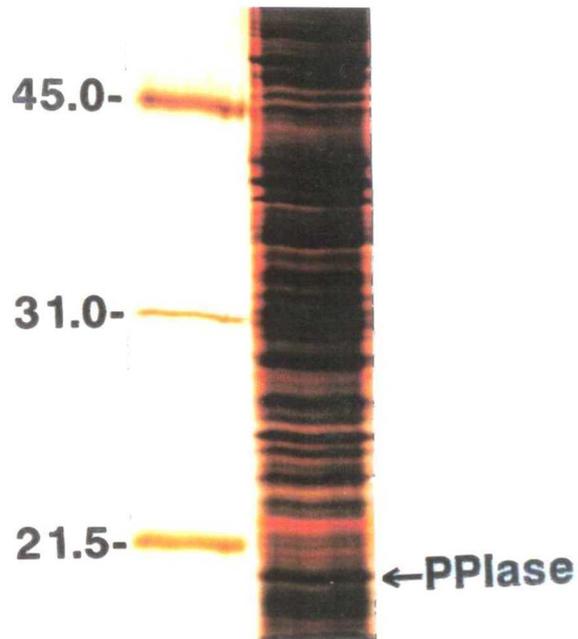


Fig. 7. Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) pattern. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase band existed point of 19.7 kDa.

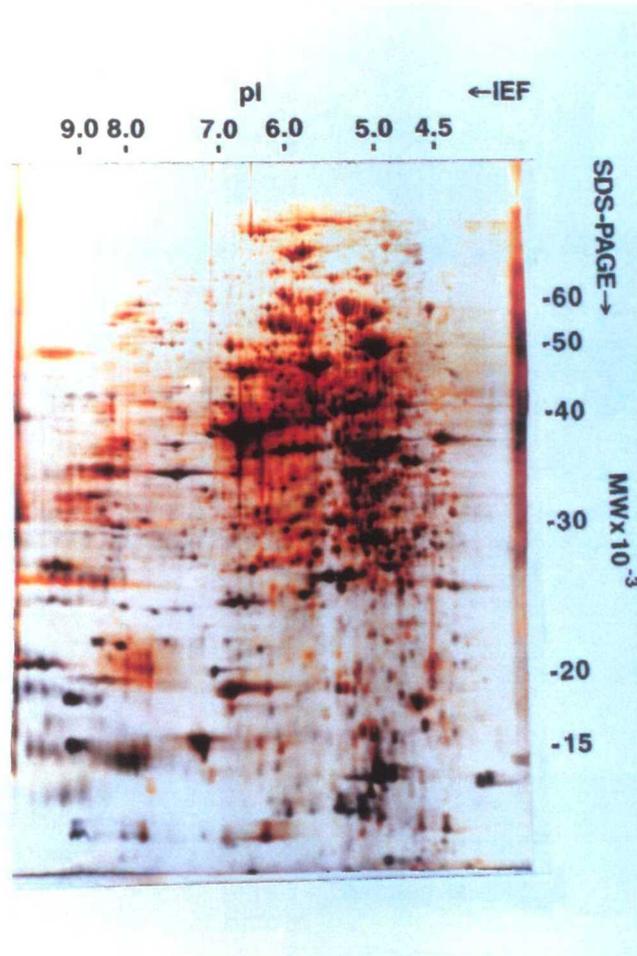


Fig. 8 -a. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (silver stain) incubated for 2 days without asparagine . (control-2).

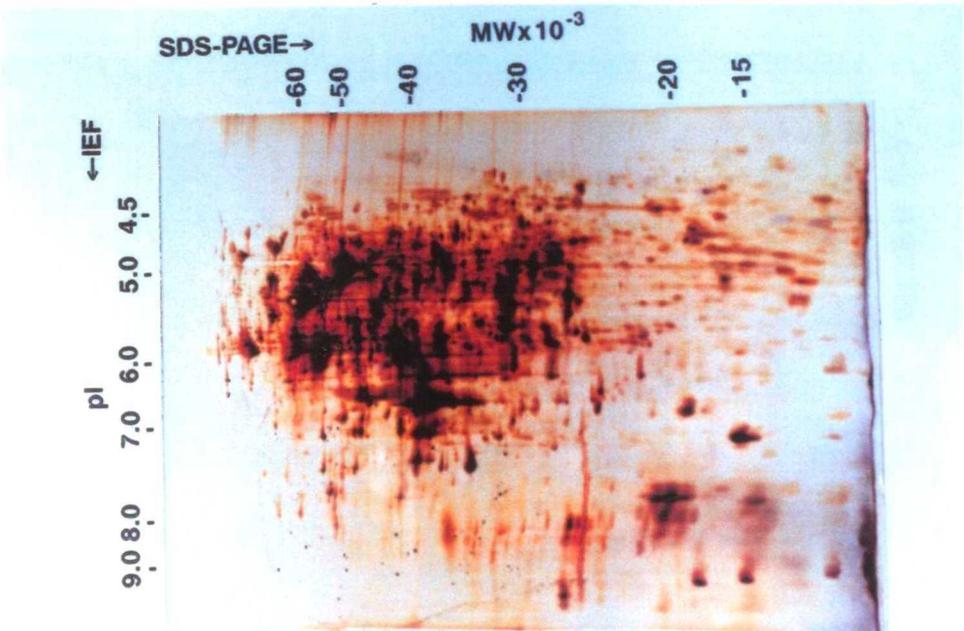


Fig. 8-b. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichoides* proteins (silver stain) incubated for 3 days without asparagine . (control-3).

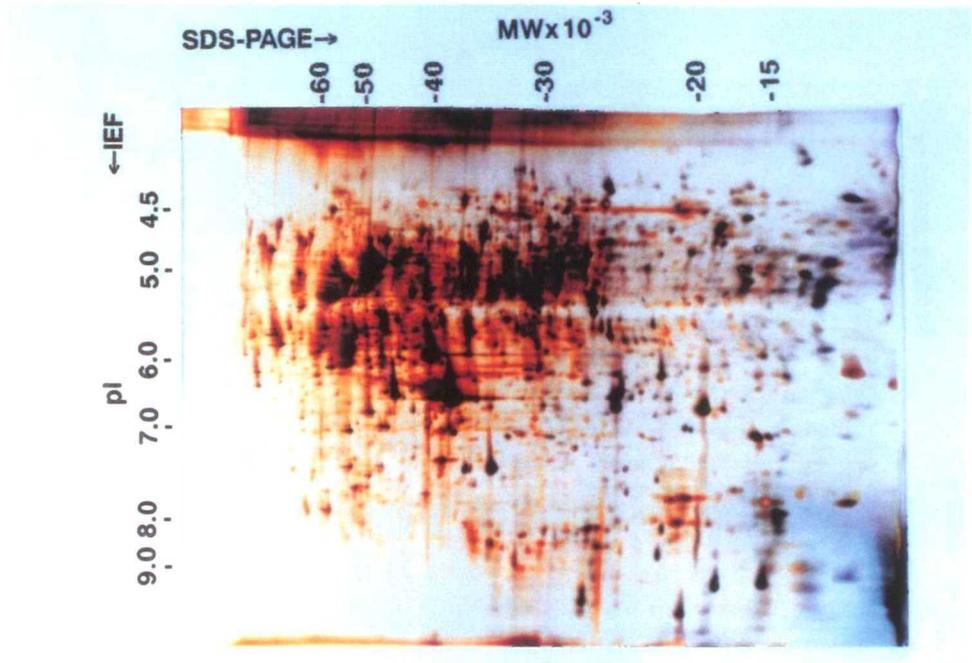


Fig. 8-c. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichoides* proteins (silver stain) incubated for 3 days with asparagine . (N-3).

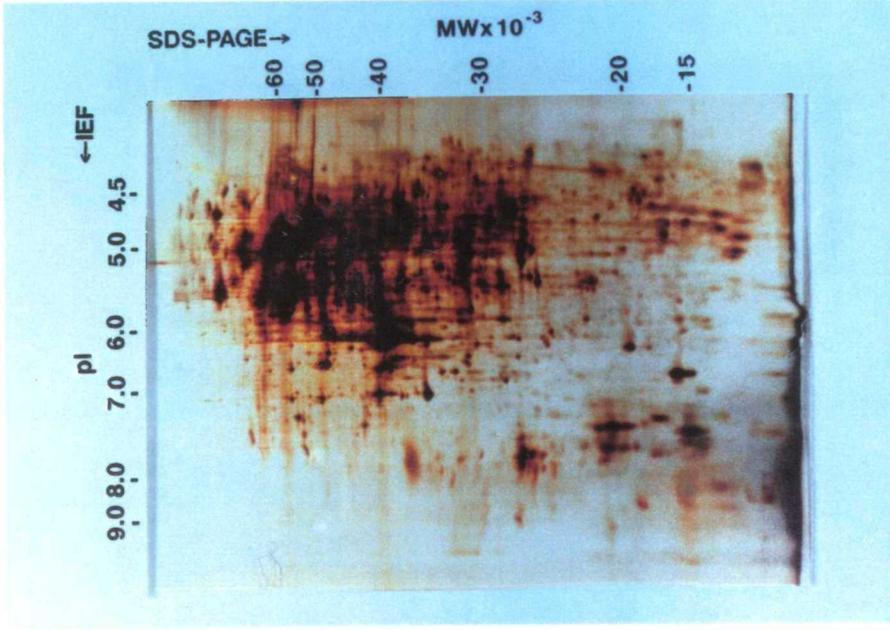


Fig. 8-d. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (silver stain) incubated for 4 days without asparagine . (control-4).

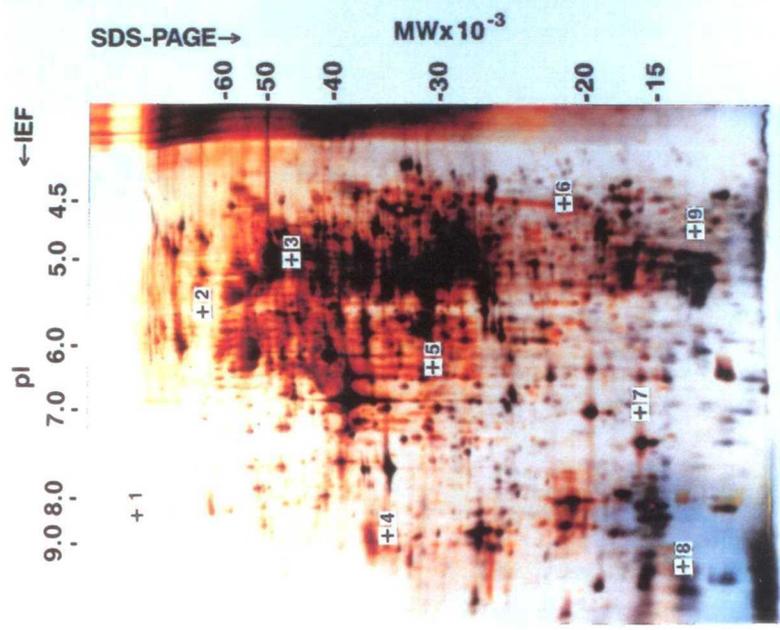


Fig. 8-e. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (silver stain) incubated for 4 days with asparagine . (N-4). The numbers are the same as that described for fig. 10.

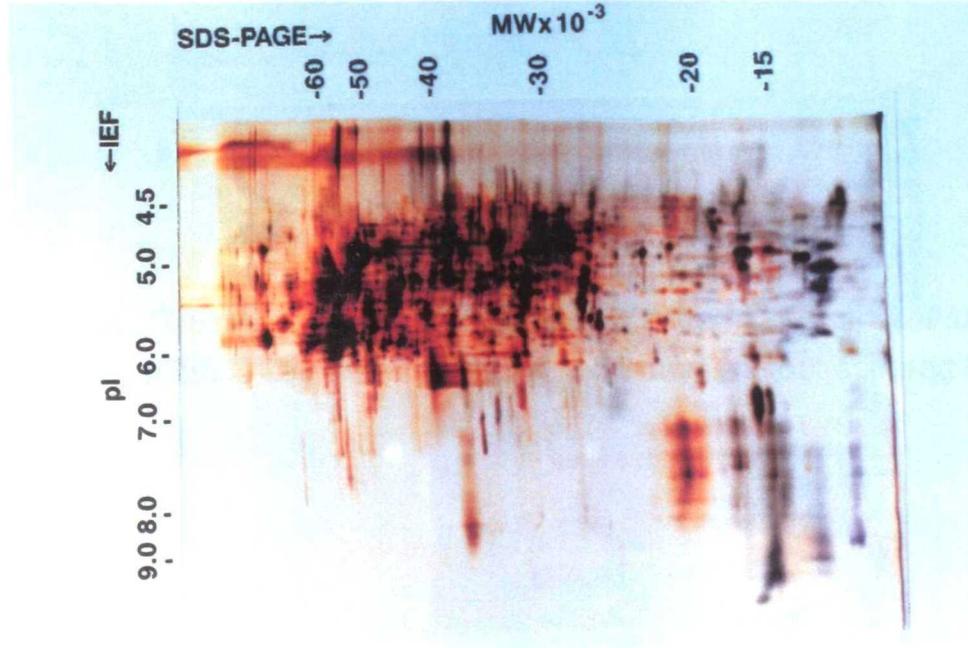


Fig. 8-f. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (silver stain) incubated for 5 days without asparagine . (control-5).

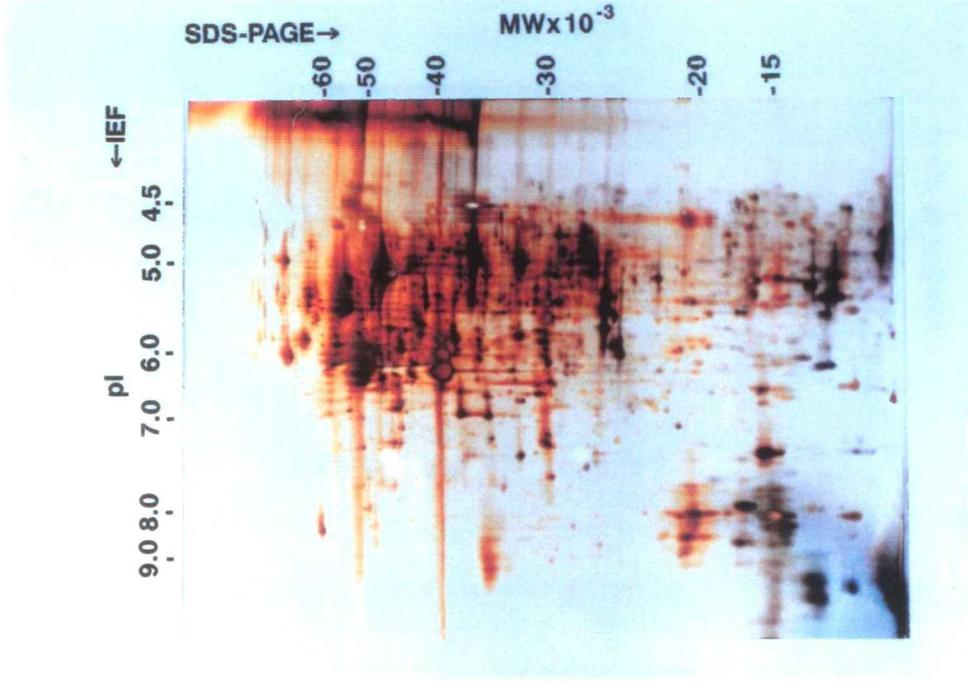


Fig. 8-g. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (silver stain) incubated for 5 days with asparagine . (N-5).

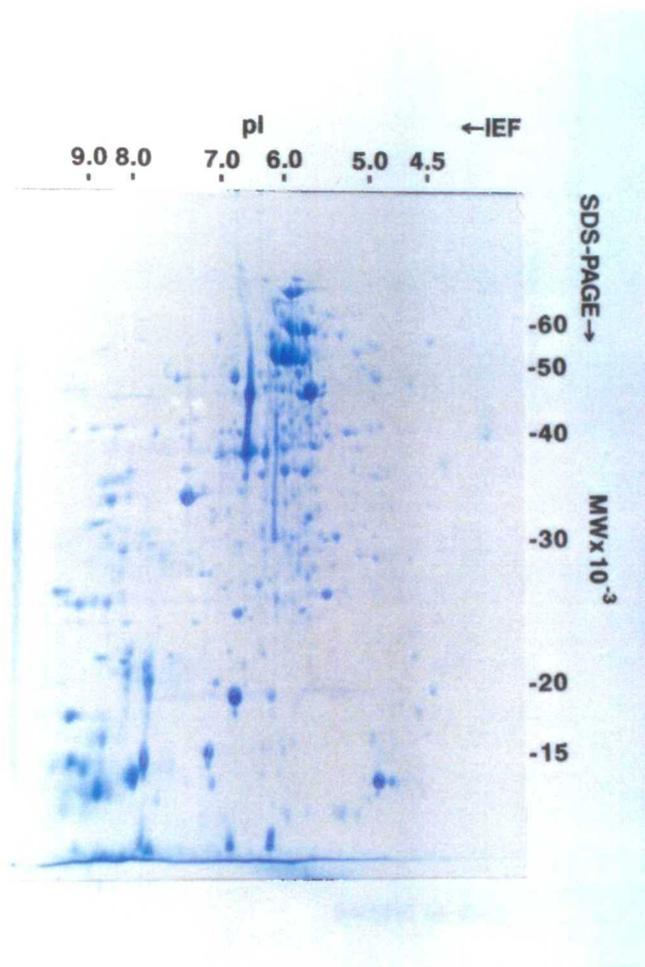


Fig. 9-a. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (CBB G-250 stain) incubated for 2 days without asparagine . (control-2).

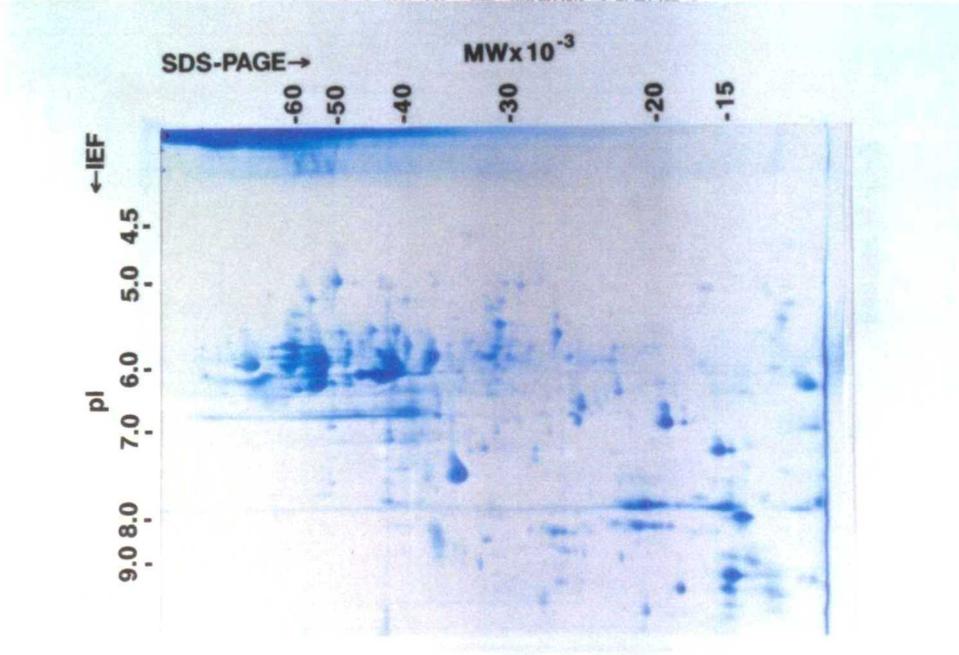


Fig. 9-b. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (CBB G-250 stain) incubated for 3 days without asparagine. (control-3).

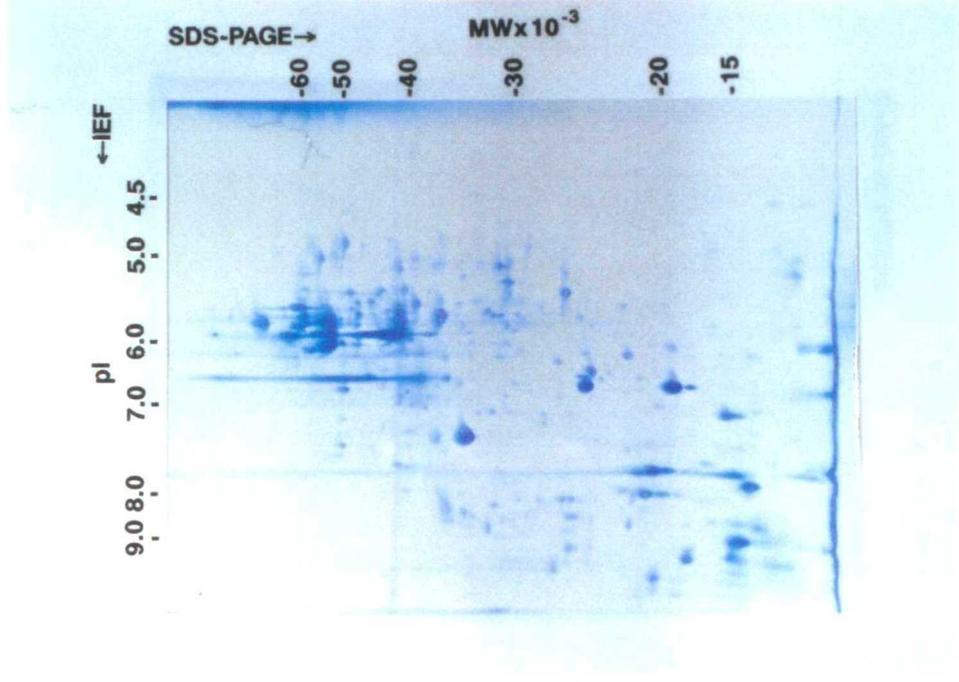


Fig. 9-c. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (CBB G-250 stain) incubated for 3 days with asparagine. (N-3).

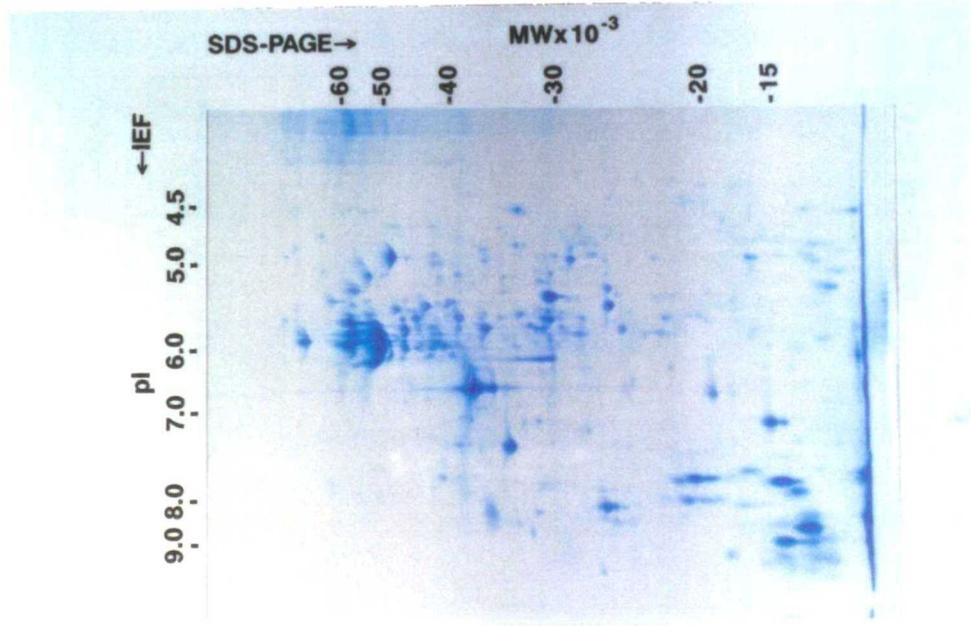


Fig. 9-d. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (CBB G-250 stain) incubated for 4 days without asparagine . (control-4).

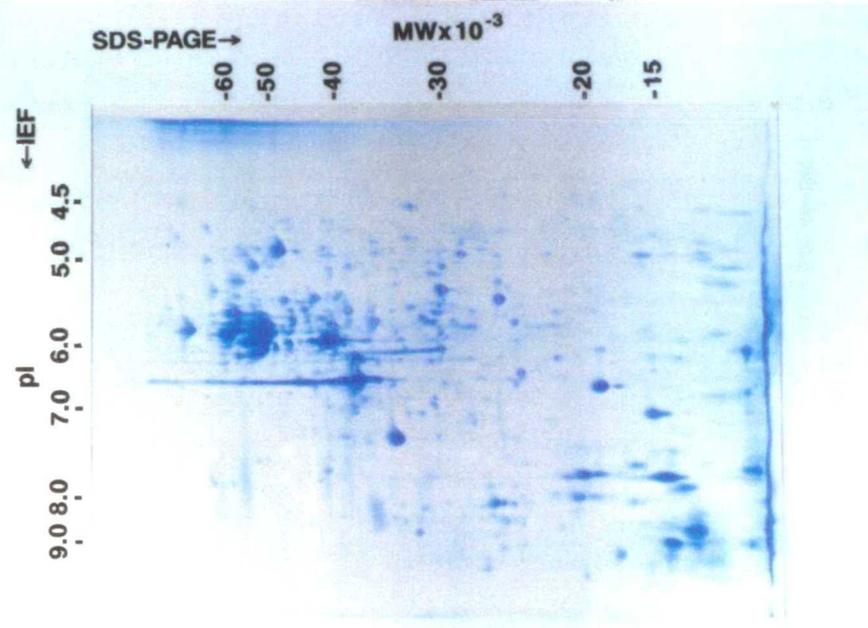


Fig. 9-e. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins (CBB G-250 stain) incubated for 4 days with asparagine . (N-4).

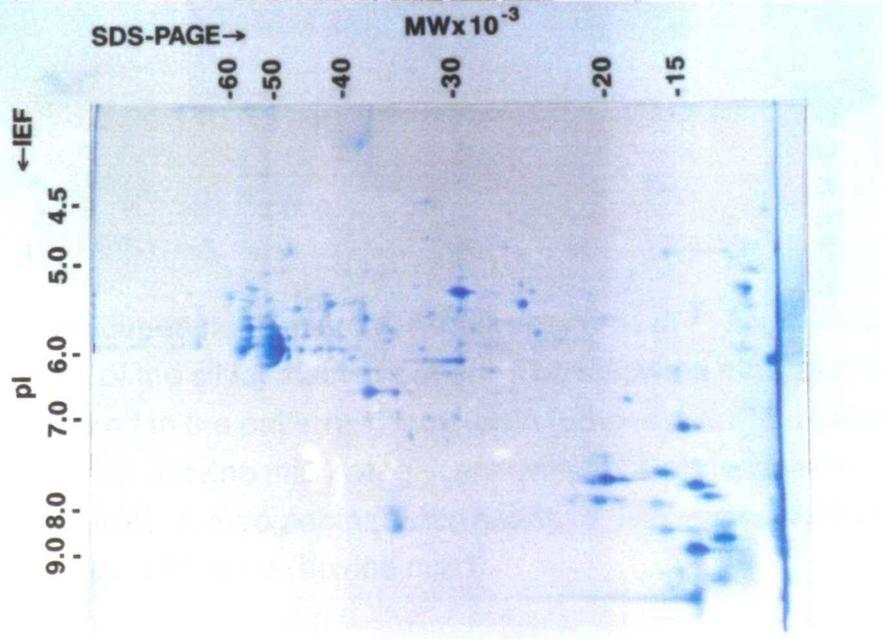


Fig. 9-f. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichoides* proteins (CBB G-250 stain) incubated for 5 days without asparagine . (control-5).

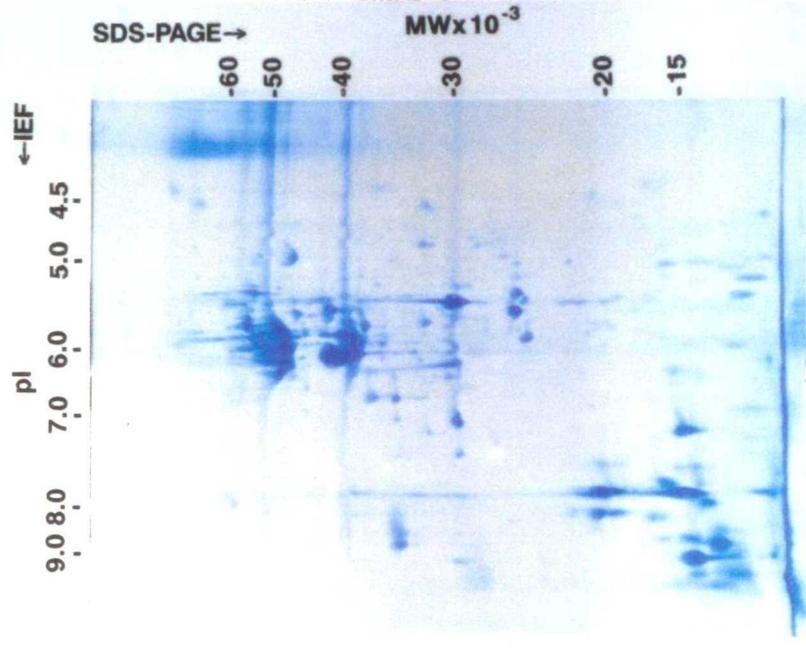


Fig. 9-g. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichoides* proteins (CBB G-250 stain) incubated for 5 days with asparagine . (N-5).

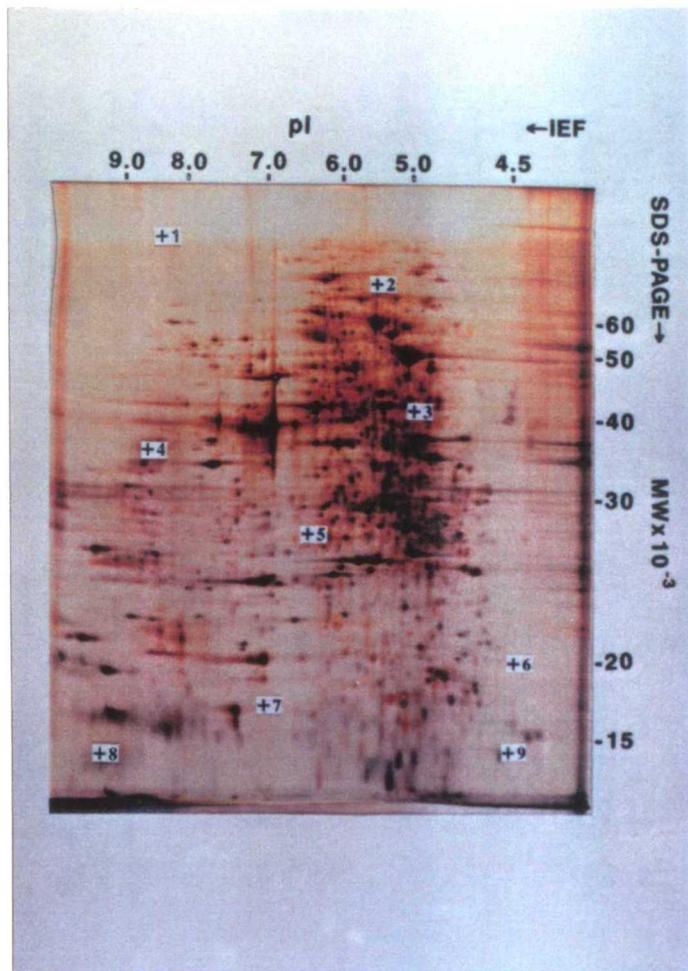


Fig. 10. Two dimensional electrophoresis patterns of *F. sporotrichioides* proteins. One of the silver stained pattern. The following nine standard proteins [125] were marked in the pattern; 1. lactoferrin (bovine milk), 2. serum albumin (bovine), 3. actin (bovine milk), 4. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (chicken muscle), 7. myoglobin (horse heart), 8. lysozyme (chicken egg) and 9. α -lactalbumine (bovine milk).



Fig. 11. Fluctuation of spot 9 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase: PPlase) and spot 13 (glyceraldehyde - 3-phosphate dehydrogenase: GPDase) on the two dimensional electrophoresis gel of *F. sporotrichoides* proteins incubated for 2-4 days with asparagine. control 2: two dimensional gel incubated for 2 days without asparagine. control 3: two dimensional gel incubated for 3 days without asparagine. control 4: two dimensional gel incubated for 4 days without asparagine. N-3: twodimensional gel incubated for 3 days with asparagine. N-4: two dimensional gel incubated for 4 days with asparagine.

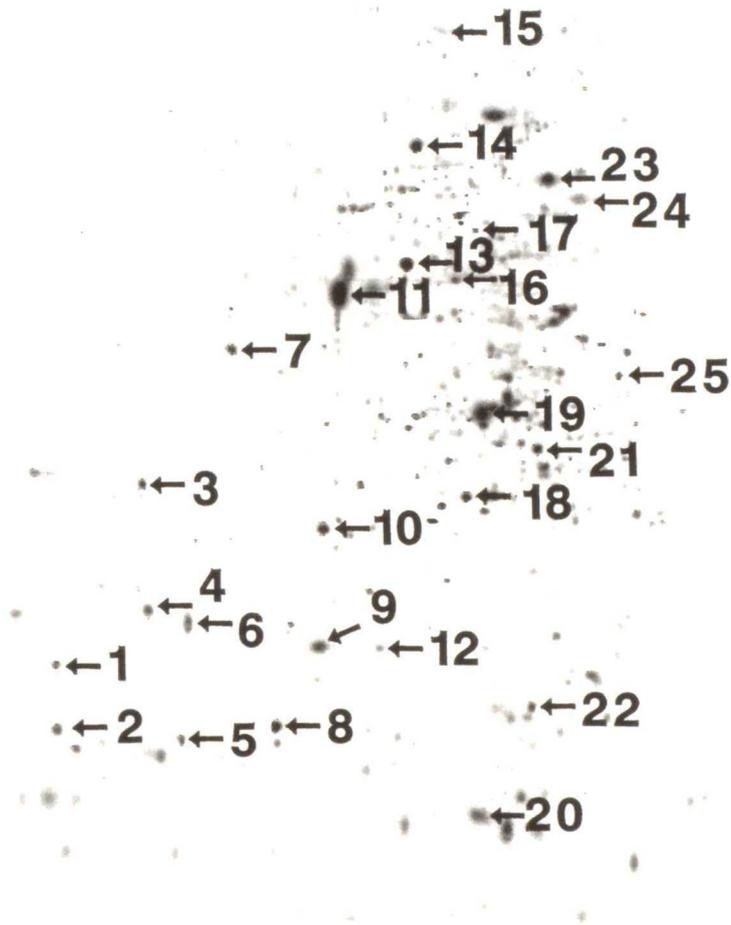


Fig. 12. Edited two dimensional electrophoresis gel pattern. The sequenced 25 spots are marked on the pattern with the numbers listed in Table 1.

Spot number on the Fig. 12	Possible protein name (organisms)	M. W.	N-terminal sequence	Sequence identity (%)
1	ribosomal protein S16 (<i>Emmericella nidulans</i>) [19]	19.1	AYGVTVRDVDAQ/ MGVTVRDVDAQ	83.3
2	ribosomal protein S12 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>) [81]	18.8	MITKQGTI RXA/ MPTIQQLI RSA	60.0
3	alcohol dehydrogenase (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) [106]	26.4	QLLKGYTVDGKF/ 110-IQLSGYTVDGTF	66.7
5	serine proteinase (<i>Coccidioides immitis</i>) [101]	16.5	TTVSYDTGYDDK/ 6-ADLSYDTHYDDP/	58.3
6	arachin 25 K like protein (<i>Arachins hypogaea</i>) [17]	20.9	SEVSPVTGYFGLMAPMTDV/ TDSEPGAVILGFKASMTDV	36.8
7	malate dehydrogenase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) [73]	34.0	YKVTVLGAAGGI/ 18-YKVTVLGAGGGI	100.0
9	peptidyl-prolyl isomerase a (<i>Neurospora crassa</i>) [123]	19.7	GNKVFDDITWEGPVFQ NGKPTSTV/ MSKVFVFDLEWEGPVLGPNKPTSEI	66.7
13	GPDase (<i>Trichoderma koningii</i>) [110]	42.6	APKIVGINGFGRI GRI VFRNAVEH/ APKIVGINGFGRI GRI VFRNAVEH	100.0
14	NADH dehydrogenase (mitochondrion <i>Mytilus edulis</i>) [62]	47.9	QXPGYEXI ITG/ 13-ILTYLFI FTG	55.6
19	hyoscyamine (6 β)-dehydrogenase (<i>Hyoscyamus niger</i>) [23]	30.5	VQQIPKANHILDLIT/ 48-VQQITKACQDFGLFQ	46.7
21	triose-phosphate-isomerase (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) [107]	28.9	ARKFFVGGNF/ ARKFFVGGNF	100.0
23	phosphopyruvate hydrase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) [23]	47.0	AIVLVFARSVYDK/ AVSKVYARSVYDS	72.7

Fig. 13. Comparison of N-terminal amino acid sequences of *Fusarium sporotrichoides* proteins from two dimensional gel electrophoresis with that of possible proteins.

Organisms	N-terminal amino acid sequence										Identity (%)
	1	10	20	30	40	50					
<i>Fusarium sporotrichioides a</i>	G	M	K V F F D I	T W E G P V F Q	N	G K P T S T V K E Q	S G R I N F N L F E	D V V P	K T A R N F	63.3	
<i>Fusarium sporotrichioides b</i>	G	M	K V F F D I	T W E G I V I Q	N	G I P /		D V V P	K T A R N F	63.3	
<i>Neurospora crassa (m)</i>	M	S	K V F F D L	E W E G P V L G P N	N	N K P T S E E I A K Q	S G R I N F T L Y D	D V V P	K T A R N F	41.4	
<i>Neurospora crassa</i>	M	S	K V F F D L	E W E G P V L G P N	N	N K P T S E E I A K Q	S G R I N F T L Y D	D V V P	K T A R N F	34.1	
<i>Streptomyces chrysomallus</i>	M	T	T K V Y F D I	I I D D A		P T	G R I T F N L F D	D I V P	K T A E N F	34.1	
<i>Saccharomyces cerevisiae 1</i>	M	S	Q V Y F D	V E A D	D	G Q P I	G R V V F K Y M	D I V P	K T A E N F	34.1	
<i>Saccharomyces cerevisiae 2</i>		T	Q K V F F D I	E H		G	G R I V I G L Y G	K V C P	K T A K N F	34.1	
<i>Saccharomyces cerevisiae 3</i>	G	K	N V F F D	P A V	N	G E	G R Y D	N V V P	K T A E N F	36.6	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	M	S	T C P F D	V I A N	N	G Q P T	L G R I V F K L F D	D V V P	K T A A N F	39.0	
<i>Candida albicans</i>	M	S	T V Y F D	V S A D	D	G Q	L G R I T F K L Y D	D V V P	K T A E N F	31.7	
Human 1	M	V	N P T V F F D I	A V	D	G E F	I G R V S F E L F A	D K V P	K T A E N F	41.4	
Human 2	G	P	K	T			L K I G D F G	K T V P	K T V D N F	24.4	
Human 3	G	L	Y L	V D A N	N			D V V P	K T A E N F	17.1	
Bovine	V	N	P T V F F D I	G A V	D	G E F	L G R V S F E L F A	D K V P	K T A E N F	41.4	
Pig	V	P	T V F F D I	G A V	D	G E F	L G R V S F E L F A	D K V P	K T A E N F	41.4	
Arabidopsis		H	C P F D M	T I			G R I I M E L F A	D V V P	K T A E N F	36.6	
Tomato		P	V F F D L	T I		A	G R V M E E L Y	D T T P	K T A E N F	36.6	

Fig. 14. Sequence alignment of peptidyl-prolyl isomerases from several sources. Numbers start from the amino termini of the cytosolic proteins. (m) stands for mitochondria. Prolyl isomerases 1 for yeast and human locate in cytosol, while the isomerases 2 and 3 are the isoforms.

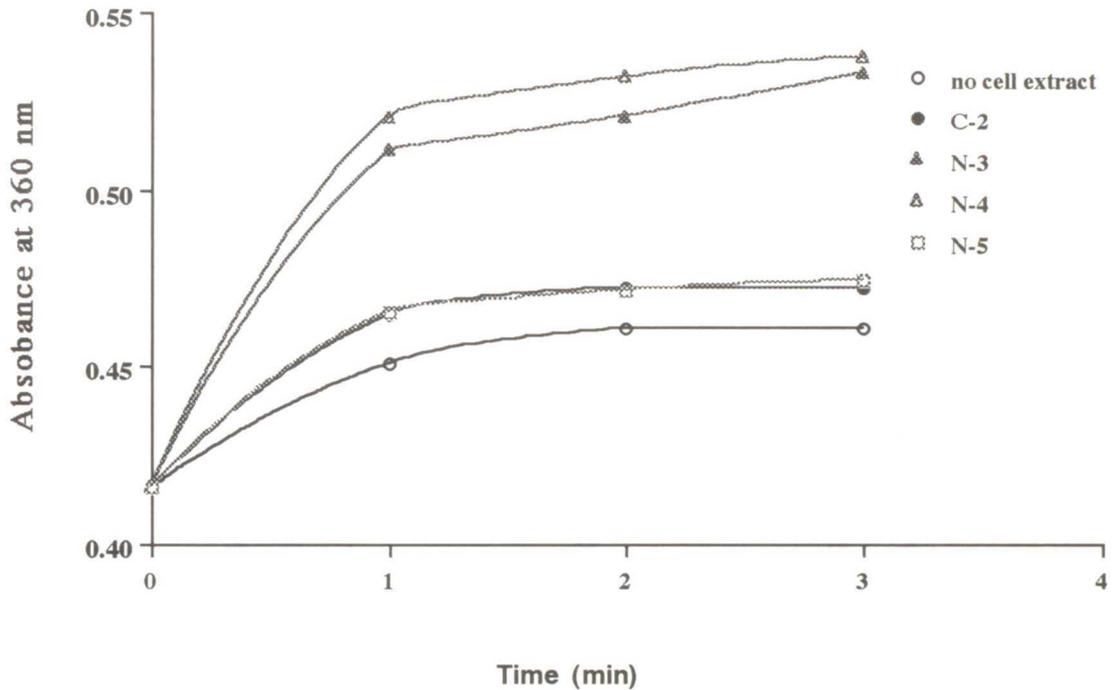


Fig. 15. Representative curve showing PPLase activity of *F. sporotrichioides* M-1-1. Release of MCA from the peptide substrate N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA following cis- \rightarrow trans conversion of the Ala-Pro bond was spectrophotometrically monitored as described in materials and methods. ○; no cell. ●; (C-2) after incubation without asparagine for 2 days. ▲; (N-3) after incubation without asparagine for 3 days. △; (N-4) after incubation without asparagine for 4 days. □; (N-5) after incubation without asparagine for 3 days.

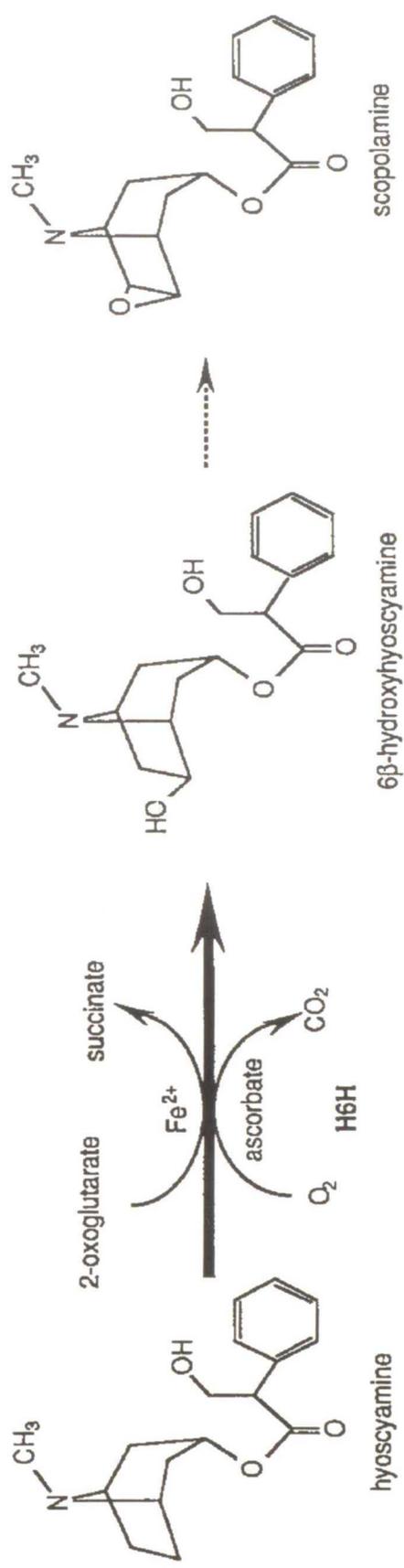


Fig. 16. Biosynthetic pathway from hyoscyamine to scopolamine [86].
Hyoscyamin 6 β -hydroxylase (H6H), a 2-oxoglutarate-dependent dioxxygenase, catalyzes the first reaction in this epoxide formation.

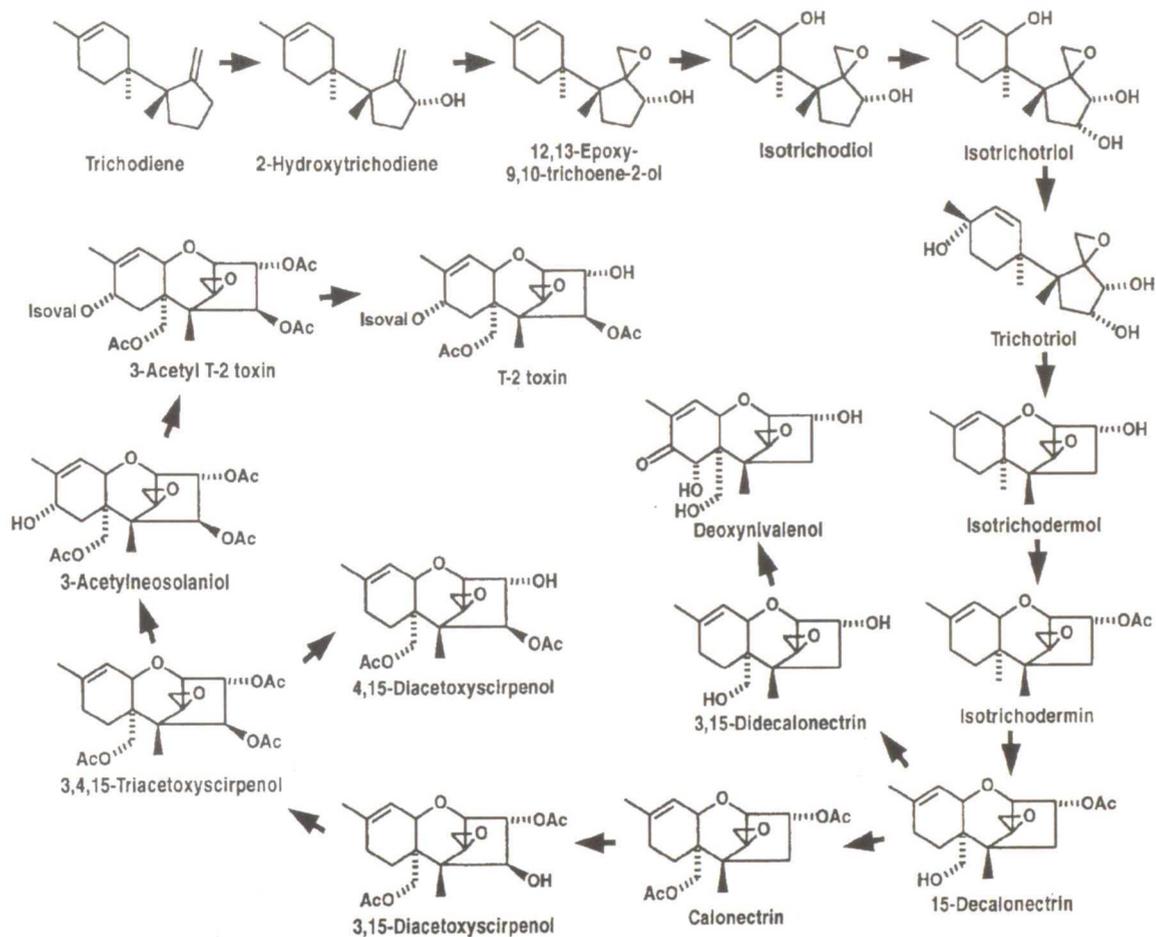


Fig. 17 .Trichothecene biosynthetic pathway in *Fusarium* species [25] .

Organisms	N-terminal amino acid sequence				Mismatch	Identity (%)
	1	10	20	30		
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	APIKVGINGF	GRIGRIYFRN	AVEH/	AVND		
<i>Trichoderma koningii</i> [110]	APIKVGINGF	GRIGRIYFRN	AVEHPDIEVV	AVND	0	100.0
<i>Glomerella cingurate</i> [122]	APIKVGINGF	GRIGRIYFRN	AIEHPEVEIV	AVND	1	95.8
<i>Podospora anserina</i> [102]	MTVKVGINGF	GRIGRIYFRN	AVEHPDVEIV	AVND	2	91.7
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> [147]	MVVKVGINGF	GRIGRIYFRN	AIEHNDVDIV	AVND	3	87.5
<i>Curvularia lunata</i> [96]	MVVKVGINGF	GRIGRIYFRN	AIEHNDVEIV	AVND	3	87.5
<i>Emericella nidulans</i> [99]	MAPKVGINGF	GRIGRIVFRN	AIEAGTVDVV	AVND	4	83.3
<i>Bacillus subtilis</i> [140]	MAVKVGINGF	GRIGRNVFRA	ALNNPEVEVV	AVND	7	70.8
Human [124]	APIKVGINGF	GRIGRLVTRA	ALNNPEVEVV	AIND	9	62.5

Fig. 18. Comparison of N-terminal amino acid sequence of spot 13 with that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in other organisms.