J S M *Mycotoxins*

www.jstage.jst.go.jp/browse/myco

Trichothecene biosynthesis in different fungal genera: resistance mechanisms, pathway enzymes, and their product applications.

Naoko Takahashi-Ando, Kosuke Matsui, Tamotsu Suzuki, Kazuki Sadamatsu, Hayato Azuhata, Ayaki Okada, Genki Matsuo, Hirone Takeda, Yoshiaki Koizumi, Makoto Kimura

JSM Mycotoxins, **70**(2):67-74 (2020)
<http://doi.org/10.2520/myco.70-2-3>

JSM Mycotoxins is issued twice a year, one volume a year, by the Japanese Society of Mycotoxicology and the purpose of the journal is to publish results and technical information regarding mycotoxins. *JSM Mycotoxins* publishes Reviews, original results (Research Papers, Technical Notes, Notes, and Letters), Proceedings of special lectures, symposia, and workshops of the meeting of Japanese Society of Mycotoxicology

Japanese Society of Mycotoxicology
(http://www.jsmyco.org/MYCONTENTS/Eng/index_eng.html)

トリコテセン耐性に関わる側鎖修飾と異種異属のトリコテセン生産菌を利用したトリコテセンライブラリーの構築

安藤 直子¹, 松井 宏介², 鈴木 将¹, 貞松 和樹¹, 小豆畑 隼¹,
岡田 彩希¹, 松尾 元暉¹, 武田 博音¹, 小泉 慶明¹, 木村 真²

¹東洋大学大学院理工学研究科 (〒350-8585 埼玉県川越市鯨井2100)

²名古屋大学大学院生命農学研究科 (〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町)

キーワード

トリコテセン; ライブラリー化;
d-type; *Fusarium*; LC-MS/MS;
t-type; *Tri101*

連絡先

安藤 直子, 東洋大学理工学研究科
応用化学専攻, 〒350-8585 埼玉県
川越市鯨井2100
電子メール: ando_n@toyo.jp

(2020年5月20日受付,
2020年5月26日受理)

JSTAGE早期公開日: 2020年6月6日

要旨

トリコテセン系カビ毒は, *Fusarium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*属等の糸状菌によって生産され, 食や環境を通じて人々の健康を脅かす. これらのトリコテセンは, これまでその構造からA型 (type A) からD型 (type D) に分類されてきた. しかし, 生合成経路の見地から見れば, trichodieneから連続的酸化を経て, isotrichodiolの環化によって生じるd-typeトリコテセンとisotrichotriolの環化によって生じるt-typeトリコテセンに分類する方が合理的とも言える. 我々は, トリコテセン生産菌の遺伝子組換え株を用い, 天然型・非天然型のトリコテセンを生産・精製・同定してきた. 本稿では, これまでの研究で得られた知見について, ここに報告する.

トリコテセンとその生産菌についての研究背景

トリコテセンとは, その構造の中にトリコテセン骨格 (12,13-epoxy-trichothec-9-ene; EPT) を共通に有するカビ毒の一群を言い, 既に200種類以上の存在が知られている. これらトリコテセンは, *Fusarium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*属等の進化上必ずしも近縁とは言えない複数の糸状菌によって生産される. 最初に発見されたトリコテセンは, 抗真菌化合物スクリーニングの過程で単離された*Trichothecium roseum*のtrichothecinであるが¹⁾, 発見当初は食の危害要因として認識されていた訳ではなかった. トリコテセンが後に重要なカビ毒として認識されるようになり, その研究がマイコキシン研究として発展したのは, 上野や芳澤らの日本人研究者の貢献に負うところが大きい^{2),3)}. さらに欧米における研究から得られた知見も加わり, ムギ類における汚染実態や類縁体の存在, 生産菌の分布等が次々と明らかにされていった.

トリコテセン類は, 構造に基づいてA型 (type A) からD型 (type D) に分ける上野らの分類法²⁾が受け入れられ, 広く用いられてきた. B型トリコテセン

はC-8位にケト基を有するのに対し, A型トリコテセンはケト基を持たない. C型トリコテセンはC-7,8位に第二のエポキシ環を形成し, D型トリコテセンはC-4位とC-15位の間に大環状構造を有するという構造的特徴を持つ.

しかし, 生合成経路および耐性機構に基づいてd-typeとt-typeの2つに分ける生物学的な分類が理にかなっており⁴⁾, 世界的にも受け入れられつつある⁵⁾. すなわち, トリコテセン骨格を形成する2回目の環化がどの中間体の段階で起こるかが2つのタイプのトリコテセンの分岐点になっているという考え方であり, 後述するように生産菌の自己耐性機構とも関連する. トリコテセン生合成経路の初期段階ではfarnesyl pyrophosphateが発物質となり, trichodieneを経て, Tri4pにより連続的な酸化を受ける (図1). d-typeトリコテセンでは, トリコテセン前駆体のisotrichodiolの段階で2回目の環化が起こり, EPTが形成される. 対して, t-typeトリコテセンではさらに酸素付加を受けてisotrichotriolに水酸化された段階で2回目の環化が起こり, isotrichodermol (ITDol) が生産される. t-typeトリコテセンは主として*Fusarium*属菌によって生産され, そのC-3位が酸素付加 (水酸化) されているのに

図1 t-typeトリコテセンとd-typeトリコテセンの生合成経路の違い。

トリコテセン中間体trichodieneに酸素付加する生合成酵素をコードするTri4の機能の違い³⁶⁾によって、d-typeトリコテセンとt-typeトリコテセンに大別される。非*Fusarium*属菌が生産するd-typeトリコテセン経路上の中間体12,13-epoxytrichothec-9-ene (EPT)は*Fusarium*属菌のt-typeトリコテセン生合成経路にはとりこまれないことから、C-3位の水酸化は2回目の環化反応後は進まない(図中、赤マークで遮断した部分)ことが示されている³⁷⁾。

対して、非*Fusarium*属菌によって生産されるd-typeトリコテセンはC-3位に酸素官能基を持たない。

*Fusarium graminearum*等の*Fusarium*属菌は重要穀類に感染し、赤かび病を起こすことで有名であり、同時にB型トリコテセンに分類されるdeoxynivalenol (DON)やnivalenol (NIV) (図2)、およびそれらのアセチル化体を生産し、穀類を汚染する。また*F. sporotrichioides*や*F. langsethiae*等は、T-2 toxin等の毒性の強いA型トリコテセンを生産する。これらの*Fusarium*属菌が生産するトリコテセンはt-typeのみであり、圃場で検出される種類は数種類に限られていた。しかし近年、これまで知られてこなかった側鎖修飾パターンを示すトリコテセンの発見も報告されている⁶⁾。

t-typeトリコテセンの低毒性化

t-typeトリコテセンは重要穀類を汚染し食の安全を脅かすため、かなり早い時期から代謝や低毒性化に関する多くの研究がなされてきた。まず明らかになったのは、芳澤らによるラット排泄物から見出したDONの脱エポキシ化による低毒性化である⁷⁾。現在、Biomim社から同様の活性を示す嫌気性菌*Eubacterium* BBSH 797が飼料添加剤として実用化されている⁸⁾。また、1997年には、島らによってC-3位のケト化⁹⁾、続いて2011年には生長らによってC-3位のエピマー化(C-3 epimerization)活性を示す微生物が発見された¹⁰⁾。さらに2016年、Hassan

らが*Devosia mutans* 17-2-E-8においてDONのC-3 epimerizationに関わる酵素遺伝子を同定し、このプロセスがC-3位のケト化を通じて起こり、DONの低毒化に関与することを示した^{11),12)}。

また、宿主植物コムギにも*in vitro*でDONを低毒化する活性が存在することが古くより報告されていた¹³⁾。その後、PoppenbergerらによってDON 3-O-β-D-glucoside (DON 3-G)やDON 3-Gの生成に関わるUDP-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子がモデル植物シロイヌナズナから単離され、C-3位糖抱合によるトリコテセン低毒化機構が実証された¹⁴⁾。DON 3-Gは、これまでのDON分析法では見逃されていたことから、食の安全にとって重大な懸念となった。何故ならば、それを摂取した人や家畜の体内でアグリコンが解離され、毒性の回復につながりうるからである¹⁵⁾。そのため、糖抱合体のようなmodified mycotoxinはmasked mycotoxinとしても知られ、アグリコン同様の毒性が危惧されている。

C-3位の糖抱合による*in vitro*での毒性低下の報告に先立ち、1998年、木村らはトリコテセンC-3位のアセチル化酵素遺伝子Tri101を*F. graminearum*より単離し、生産菌の自己耐性に関わっていることを示した⁴⁾。t-typeトリコテセン生産菌の生合成経路では、isotrichotriolが環化してトリコテセン骨格を有する初めての中間体ITDolが生成した直後に、C-3位がTri101pによってO-アセチル化されて

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	A-D分類	t/d分類
nivalenol	--- OH	↘ OH	HO ↘	OH	O=	B	t
4-acetylnivalenol	--- OH	↘ OAc	HO ↘	OH	O=	B	t
deoxynivalenol	--- OH	↘ H	HO ↘	OH	O=	B	t
T-2 toxin	--- OH	↘ OAc	AcO ↘	H	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CO-	A	t
neosolaniol	--- OH	↘ OAc	AcO ↘	H	HO-	A	t
isotrichodermin	--- OAc	↘ H	H ↘	H	H ↘	A	t
calonectrin	--- OAc	↘ H	AcO ↘	H	H ↘	A	t
trichothecin	— H	↘ O-C(=O)-CH=CH ₂	H ↘	H	O=	B	d

図2 代表的なトリコテセンの構造式。

B型トリコテセンはR₅にケト基を持ち、A型トリコテセンは持たない。C型トリコテセンはC-7位とC-8位に第二のエポキシ環構造を持ち、D型トリコテセンは大環状型トリコテセンである。R₁ = Hの場合はd-typeトリコテセンとなり、R₁ = OR₁' (R₁' = H or Ac) がt-typeトリコテセンとなる。

isotrichodermin (ITD) になる。3-*O*-アセチル化体の*in vitro*での毒性は水酸化体に比べ著しく低下し、トリコテセンを生産する*Fusarium*はこの反応により、自ら生産する毒物に対し防御していると考えられる。実際、*Tri101*遺伝子を導入した真菌や植物¹⁶⁾ではトリコテセン耐性が増すことが示された。しかし、長らく動物細胞については、同様の現象の報告はなかった。この原因を追及したところ、培養に使用される牛胎児血清 (FBS) には3-*O*-アセチルトリコテセンのC-3位アセチル基を離脱させるエステラーゼが混入していること、さらに培養細胞の抽出液にもC-3位脱アセチル化酵素活性が見られ、導入した*Tri101p*によるトリコテセン耐性が観察しにくい状況にあることが明らかになった¹⁷⁾。熱処理したFBSを用いて*Tri101*遺伝子を導入したマウスFM3A細胞を培養しても脱アセチル化酵素活性は完全には喪失せず、FM3A細胞のITDに対するIC₅₀の値を正確に算出することはできなかった。しかし、*Tri101*を高発現させたFM3A細胞のITDに対するIC₅₀はFM3A細胞のITDo1に対するIC₅₀の約40倍の

値に増え、ITDo1が混入していることを勘案するとC-3位のアセチル化修飾がトリコテセン低毒化に大きく関与していることが示された。また、他のC-3位水酸化、およびアセチル化トリコテセンの組み合わせについてもHL-60, U937, FM3A, HaCaT細胞を用いて検証を行ったが、例外なく、水酸化トリコテセンの方がアセチル化体に比べ、毒性が強いことが示された。

このように、t-typeトリコテセンのみで起こりうるC-3位の*O*-アセチル化のような修飾は、t-typeトリコテセンの低毒化において、極めて重要な役割を果たしていることがわかる。

d-typeトリコテセンとt-typeトリコテセンの生合成酵素

C-3位の修飾基の有無を含め、d-typeトリコテセンとt-typeトリコテセン生産菌の生合成経路や酵素には、進化的、機能的にもかなり大きな違いがある¹⁸⁾。例として、前述の*Tri4p*の機能の違い、*Tri101*遺伝子の有無の他、C-4位の修飾酵素遺伝子の違い等が

挙げられる。そこで、我々は、d-typeトリコテセンをt-typeトリコテセン生産菌に添加、またはその逆を行い、生合成酵素に関する新たな知見を集めている。

*Fusarium*属の生産するt-typeトリコテセンのうち、DON、NIVとそのアセチル化体、および中間体calonectrinとその脱アセチル化体を、d-typeトリコテセン生産菌*T. roseum*に添加したところ、C-4位が酸素付加を受けたものはC-3位、C-4位が水酸基に変換された後に*T. roseum*のd-typeトリコテセン生合成経路に組み込まれ、4-O-ブテノイル化された(小泉慶明ら¹⁹⁾(図3-1)。一方、C-4位が酸素付加されていないものでは、反応が進みにくかった。このことから、C-4位のブテノイル化に関わる*T. roseum* Tri3p¹⁸⁾の機能については、以下のことが見出された。すなわち、C-3位のアセチル基の存在はこの反応を阻害し、反応が進むためには脱アセチル化が起こる必要があること、さらに、C-4位水酸化を担う*T. roseum* Tri22p¹⁸⁾はt-typeトリコテセンに対しては基質として働きにくいことが明らかとなってきた。

また逆に、*T. roseum*や*Spicellum roseum*が生産するd-typeトリコテセン(trichothecin, trichodermol等)をt-typeトリコテセン生産菌である*Fusarium*属菌に添加した場合、そのトリコテセン生合成経路には組み込まれずにC-4位が糖抱合を受けることが、精製した変換物のNMR解析によって明らかとなった²⁰⁾(図3-2)。このことから、d-typeトリコテセンはt-typeトリコテセン生産菌の生合成酵素の基質にはならないこと、C-4位糖抱合反応が補助的な耐性を担っている可能性が示唆された。

そこで、C-3位アセチル化によって耐性を獲得することができないトリコテセン非生産菌*F. graminearum* ΔTri5ΔTri101株(NBRC 114124)にt-typeトリコテセンを添加した。その結果、d-typeトリコテセンを添加した場合と同様に、いくつかのt-typeトリコテセンではC-4位が糖抱合を受けることが示された²⁰⁾(図3-3)。すなわちトリコテセンに対する自己耐性機構を失ったt-type生産菌は、第II相反応のような抱合反応によって^{21),22)}、*F. graminearum* Tri101pのトリコテセン耐性機構を補完する可能性が示唆されたと言える。

トリコテセンライブラリーの構築

以上のように我々の研究室では、異種、異属、t-typeおよびd-typeのトリコテセン生産菌の生合成経路を組み合わせ、生合成酵素の知見を得ることを試みてきた。その過程で、天然型トリコテセンに加え多くの非天然トリコテセンを得ており、それらのMS/

MSライブラリーを構築しつつある。上記では異属、t-typeおよびd-typeのトリコテセン生産菌の生合成経路を組み合わせた例を紹介したが、*Fusarium*属の異種のトリコテセン生産菌の生合成経路の組み合わせも試みている。例えばB型トリコテセン生産菌*F. graminearum*のシャント経路の中間体である7-hydroxyisotrichodermin²³⁾を、A型トリコテセン(T-2 toxin)生産菌である*F. sporotrichioides*に添加した場合、天然のA型トリコテセンとして知られていない7-hydroxy T-2 toxinが生産された²⁴⁾。現在、同様の方法で、C-7位が水酸化された4-deoxy T-2 toxinの類縁体の生産を試みている²⁵⁾。

同時に、MS/MSライブラリーに登録したトリコテセンについては、HL-60やFM3A等のヒト培養細胞^{17),24)}やトリコテセン超感受性酵母^{26),27)}に対する毒性、および、ヒト皮膚角化細胞への生理活性を調べ^{28),29)}、構造活性相関についても検証を行ってきた。これらの研究から、新規トリコテセンの生理活性やそのリスクを事前に推測する体制が整いつつある状況にまでライブラリーの構築が進んできている。それに加え、側鎖修飾酵素の機能進化や^{30),31)}、トリコテセン生産菌の自己耐性機能についても新たな知見を得てきた。これまでの生合成研究で用いてきた一連のトリコテセン生合成変異株の組換え体は、(独)製品評価技術基盤機構のNITE Biological Resource Center (NBRC)に寄託され(前田一行³²⁾、中嶋佑一³³⁾)、一般に入手可能である。

トリコテセンを含めたカビ毒は、いったん基本骨格が形成されると非常に安定だと考えられていた。しかし近年、必ずしもそれにあてはまらない例も見いだされてきた。例えば、カビ毒の構造は変化しうることが示されており^{6),34)}、新規トリコテセンとして有名になったNX-3は、貯蔵や加工の間にトリコテセン骨格を失ったNX3-M1という化合物に変換されることが示された³⁴⁾。また、neosolaniol (NEO)のようなC-8位水酸化トリコテセンは比較的不安定で、「不思議」な反応によって側鎖修飾パターンに思わぬバリエーションが生じることが明らかとなってきた(松山桃子ら³⁵⁾)。この現象では、NEOの構造異性体に加え、分子量が18Da少ない物質が検出され、脱水、あるいは、ケト化と脱エポキシ化が同時に進み、何らかのトリコテセン骨格の変換が起こりやすいことが強く示唆された。

現在、80種類を超すトリコテセンや関連化合物のMS/MSデータを整備しており、そのうちt-typeトリコテセンは60種類を占める。トリコテセンのMS/MSパターンをライブラリー化し、さらに充実させることで、今後、NX-3のような新規のトリコテセン

1) t-typeトリコテセンのd-typeトリコテセン生産菌への添加例

2) d-typeトリコテセンのt-typeトリコテセン生産菌への添加例

3) t-typeトリコテセンのt-typeトリコテセン生産菌 Δ Tri101への添加例

図3 トリコテセンの添加実験において起こった反応例.

1) t-typeトリコテセンのnivalenolをd-typeトリコテセン生産菌の*T. roseum*に添加した場合、トリコテセン生合成経路に組み込まれ、ブテノイル化が起こる。ただし、C-3位にアセチル基がついている場合は、脱アセチル化が先に起こる必要がある。2) d-typeトリコテセンのtrichodermolをt-typeトリコテセン生産菌の*F. graminearum*に添加した場合、トリコテセン生合成経路に組み込まれず、C-4位の糖抱合が起こる。3) t-typeトリコテセンのHT-2 toxinをTri5とTri101の2つの遺伝子が破壊された*F. graminearum* NBRC 114124株に添加すると、C-4位の糖抱合が起こる。(Tri5はトリコテセン生合成経路の初発の遺伝子であり、この遺伝子を破壊されたトリコテセン生産菌はトリコテセンを生産できない。)

が圃場に出現しても速やかな検出が可能となり、先進的な食の安全への貢献が期待することができると考えられる。

謝 辞

本研究は、2015年度 飯島藤十郎記念食品科学振興財団、2018-2019年度 私学振興事業学術研究振興資金、および2018-2020年度 JSPS科研費18K05524の助成を受けてなされた。ここに深く感謝する次第である。

参考文献

- Freeman, G.G., Morrison, R.I.: The isolation and chemical properties of trichothecin, an antifungal substance from *Trichothecium roseum* Link. *Biochem J*, **44**, 1-5 (1949)
- Ueno, Y., Nakajima, M., Sakai, K., Ishii, K., Sato, N.: Comparative toxicology of trichothec mycotoxins: inhibition of protein synthesis in animal cells. *J Biochem*, **74**, 285-296 (1973)
- Yoshizawa, T., Morooka, N.: Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agric Biol Chem*, **37**, 2933-2934 (1973)
- Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K., Yamaguchi, I.: Trichothecene 3-*O*-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of *Tri101*. *J Biol Chem*, **273**, 1654-1661 (1998)
- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A., Alexander, N.J.: Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins (Basel)*, **3**, 802-814 (2011)
- Varga, E., Wiesenberger, G., Hametner, C., Ward, T.J., Dong, Y., Schofbeck, D., McCormick, S., Broz, K., Stuckler, R., Schuhmacher, R., Krska, R., Kistler, H.C., Berthiller, F., Adam, G.: New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. *Environ Microbiol*, **17**, 2588-2600 (2015)
- Yoshizawa, T., Takeda, H., Ohi, T.: Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric Biol Chem*, **47**, 2133-2135 (1983)
- Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A.P., Binder, E.M.: Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol Nutr Food Res*, **50**, 543-551 (2006)
- Shima, J., Takase, S., Takahashi, Y., Iwai, Y., Fujimoto, H., Yamazaki, M., Ochi, K.: Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 3825-3830 (1997)
- Ikunaga, Y., Sato, I., Grond, S., Numaziri, N., Yoshida, S., Yamaya, H., Hiradate, S., Hasegawa, M., Toshima, H., Koitabashi, M., Ito, M., Karlovsky, P., Tsushima, S.: *Nocardioides* sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-*epi*-deoxynivalenol. *Appl Microbiol Biotechnol*, **89**, 419-427 (2011)
- He, J.W., Hassan, Y.I., Perilla, N., Li, X.-Z., Boland, G.J., Zhou, T.: Bacterial epimerization as a route for deoxynivalenol detoxification: the influence of growth and environmental conditions. *Front Microbiol*, **7**, 572 (2016)
- Hassan, Y.I., He, J.W., Perilla, N., Tang, K., Karlovsky, P., Zhou, T.: The enzymatic epimerization of deoxynivalenol by *Devosia* mutants proceeds through the formation of 3-*keto*-DON intermediate. *Sci Rep*, **7**, 6929 (2017)
- Miller, J.D., Arnison, P.G.: Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Can J Plant Pathol*, **8**, 147-150 (1986)
- Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glossl, J., Luschnig, C., Adam, G.: Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **278**, 47905-47914 (2003)
- Dall'Erta, A., Cirilini, M., Dall'Asta, M., Del Rio, D., Galaverna, G., Dall'Asta, C.: Masked mycotoxins are efficiently hydrolyzed by human colonic microbiota releasing their aglycones. *Chem Res Toxicol*, **26**, 305-312 (2013)
- Ohsato, S., Ochiai-Fukuda, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Koizumi, S., Hamamoto, H., Kudo, T., Yamaguchi, I., Kimura, M.: Transgenic rice plants expressing trichothecene 3-*O*-acetyltransferase show resistance to the *Fusarium* phytotoxin deoxynivalenol. *Plant Cell Rep*, **26**, 531-538 (2007)
- Tanaka, N., Takushima, R., Tanaka, A., Okada, A., Matsui, K., Maeda, K., Aikawa, S., Kimura, M., Takahashi-Ando, N.: Reduced toxicity of trichothecenes, isotrichodermol, and deoxynivalenol, by transgenic expression of the *Tri101* 3-*O*-acetyltransferase gene in cultured mammalian FM3A cells. *Toxins (Basel)*, **11** (2019)
- Proctor, R.H., McCormick, S.P., Kim, H.S., Cardoza, R.E., Stanley, A.M., Lindo, L., Kelly, A., Brown, D.W., Lee, T., Vaughan, M.M., Alexander, N.J., Busman, M., Gutierrez, S.: Evolution of structural diversity of trichothecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi. *PLoS Pathog*, **14**, e1006946 (2018)
- 小泉慶明, 鈴木将, 岡田彩希, 貞松和樹, 松井宏介, 木村真, 安藤直子: *Trichothecium roseum*の生合成経路解明に向けたfeeding実験. 日本マイコトキシン学会第85回学術講演会一般講演 P-3 (2020)
- 松井宏介, 新海航輝, 武田博音, 相川俊一, 安藤直子, 木村真: *Tri101*を破壊した*Fusarium graminearum*変異株が示すt-typeトリコテセンC-4位への糖抱合活性. 日本マイコトキシン学会第85回学術講演会一般講演 O-1 (2020)
- Kamimura, H.: Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus* sp. *Appl Environ Microbiol*, **52**, 515-519 (1986)
- Huang, H.-H., Ma, G.-L., Sun, Y.-M., Li, Q., Zhong,

- D.-F.: Phase II metabolites of etofesalamide in filamentous fungi. *Acta Pharmacol Sin*, **26**, 893-896 (2005)
- 23) Kamata, K., Tanaka, A., Maeda, K., Takushima, R., Sato, H., Aikawa, S., Yoshida, Y., Kimura, M., Takahashi-Ando, N.: Evaluation of toxicities of 7-hydroxyisotrichodermin and 8-hydroxyisotrichodermin, shunt intermediates in the biosynthetic grid of deoxynivalenol, by using a sensitive yeast assay. *JSM Mycotoxins*, **65**, 7-9 (2015)
- 24) Kamata, K., Sato, H., Maeda, K., Furihata, K., Aikawa, S., Adachi, K., Tanaka, A., Tokai, T., Nakajima, Y., Yoshida, Y., Sakuda, S., Kimura, M., Takahashi-Ando, N.: Exploring an artificial metabolic route in *Fusarium sporotrichioides*: production and characterization of 7-hydroxy T-2 toxin. *J Nat Prod*, **81**, 1041-1044 (2018)
- 25) 小豆畑隼, 貞松和樹, 鈴木将, 松井宏介, 揚原佑, 高野翼, 中嶋佑一, 相川俊一, 木村真, 安藤直子: *Fusarium sporotrichioides*の遺伝子破壊株を用いた4-deoxy-7-hydroxy T-2 toxinの生産と同定. 日本マイコトキシン学会第85回学術講演会一般講演 P-5 (2020)
- 26) Takahashi-Ando, N., Tanaka, A., Sekimoto, Y., Yamauchi, K., Echigo, A., Usami, R., Abe, F., Minegishi, H.: Functional screening for resistance genes against trichothecenes in the library of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. *Mycotoxins*, **63**, 9-15 (2013)
- 27) Tanaka, A., Yamane, Y., Komiya, Y., Yamauchi, K., Sugiyama, T., Echigo, A., Usami, R., Yoshida, Y., Abe, F., Minegishi, H., Takahashi-Ando, N.: Development of a highly sensitive yeast bioassay for trichothecene detection. *Mycotoxins*, **63**, 161-170 (2013)
- 28) 岡田彩希, 新海航輝, 田中千智, 木村真, 安藤直子: 希少d-typeトリコテセンの精製とd-typeトリコテセンの生理活性の検証. 日本マイコトキシン学会第82回学術講演 P-8 (2018)
- 29) 岡田彩希, 新海航輝, 田中千智, 木村真, 安藤直子: *Fusarium*属菌と非*Fusarium*属菌由来のトリコテセンの生理活性の検証. 第114回日本食品衛生学会学術講演会 (2018)
- 30) Maeda, K., Tanaka, A., Sugiura, R., Koshino, H., Tokai, T., Sato, M., Nakajima, Y., Tanahashi, Y., Kanamaru, K., Kobayashi, T., Nishiuchi, T., Fujimura, M., Takahashi-Ando, N., Kimura, M.: Hydroxylations of trichothecene rings in the biosynthesis of *Fusarium* trichothecenes: evolution of alternative pathways in the nivalenol chemotype. *Environ Microbiol*, **18**, 3798-3811 (2016)
- 31) Maeda, K., Tanaka, Y., Matsuyama, M., Sato, M., Sadamatsu, K., Suzuki, T., Matsui, K., Nakajima, Y., Tokai, T., Kanamaru, K., Ohsato, S., Kobayashi, T., Fujimura, M., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Kimura, M.: Substrate specificities of *Fusarium* biosynthetic enzymes explain the genetic basis of a mixed chemotype producing both deoxynivalenol and nivalenol-type trichothecenes. *Int J Food Microbiol*, **320**, 108532 (2020)
- 32) 前田一行: NBRC 113174-113182.
- 33) 中嶋佑一: NBRC 113184-113185.
- 34) Varga, E., Wiesenberger, G., Woelflingseder, L., Twaruschek, K., Hametner, C., Vaclavikova, M., Malachova, A., Marko, D., Berthiller, F., Adam, G.: Less-toxic rearrangement products of NX-toxins are formed during storage and food processing. *Toxicol Lett*, **284**, 205-212 (2018)
- 35) 松山桃子, 松井宏介, 小豆畑隼, 中嶋佑一, 吉成知也, 小林哲夫, 相川俊一, 安藤直子, 木村真: A-ringに水酸基を有するトリコテセンの不思議な反応. 日本マイコトキシン学会第85回学術講演会一般講演 P-11 (2020)
- 36) Tokai, T., Koshino, H., Takahashi-Ando, N., Sato, M., Fujimura, M., Kimura, M.: *Fusarium Tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **353**, 412-417 (2007)
- 37) Zamir, L.O., Devor, K.A., Nikolakakis, A., Sauriol, F.: Biosynthesis of *Fusarium culmorum* trichothecenes. The roles of isotrichodermin and 12,13-epoxytrichothec-9-ene. *J Biol Chem*, **265**, 6713-6725 (1990)

Trichothecene biosynthesis in different fungal genera: resistance mechanisms, pathway enzymes, and their product applications.

Naoko Takahashi-Ando¹, Kosuke Matsui², Tamotsu Suzuki¹, Kazuki Sadamatsu¹, Hayato Azuhata¹, Ayaki Okada¹, Genki Matsuo¹, Hirone Takeda¹, Yoshiaki Koizumi¹, Makoto Kimura²

¹Graduate School of Science and Engineering, Toyo University, 2100 Kujirai, Kawagoe, Saitama 350-8585, Japan.

²Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan.

Food and environmental exposure to trichothecenes, a group of mycotoxins produced by filamentous fungi such as *Fusarium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, and *Myrothecium*, threatens the health of humans and livestock. The toxins are conventionally classified into types A through D based on their characteristic chemical structures (e.g., the presence of C-8 ketone, 7,8-epoxide, or macrocyclic ring between C-4 and C-15). However, from the viewpoint of biosynthesis, it is more reasonable to classify them into two groups, C-3 unoxxygenated d-type trichothecenes and C-3 oxygenated t-type trichothecenes, which are produced by the cyclization of isotrichodiol and isotrichotriol, respectively. Using molecular genetic approaches, we characterized the biosynthetic enzymes of several trichothecene-producing fungi and identified many natural and unnatural trichothecenes. Based on our achievements, an MS/MS library comprising various trichothecene intermediates is being constructed. We believe that in the near future, our MS/MS library will be useful for detecting the emergence of novel trichothecenes.

Keywords: trichothecene, library, d-type; *Fusarium*; LC-MS/MS; t-type; *Tri101*