

## スタキボトリス属カビによるマイコトキシン産生

誌名	マイコトキシン
ISSN	02851466
著者	滝埜, 昌彦
巻/号	60巻1号
掲載ページ	p. 27-36
発行年月	2010年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## スタキボトリス属カビによるマイコトキシン産生

滝埜昌彦

アジレント・テクノロジー(株)  
(192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1)

### 要 旨

*Stachbotrys* 属の大環状トリコテセン類を含む二次代謝産物の産生能を把握する目的で LC/MS-MS によるサトラトキシシン G, サトラトキシシン H, イソサトラトキシシン F 及びロリジン L2 の分析法及び LC/TOF-MS による *Stachbotrys* 属が産生する二次代謝産物のスクリーニング手法を開発し *Stachbotrys* 属の 37 胞子及び 9 菌糸の測定を行った。その結果, 4 種類マイコトキシンに関しては胞子 9 検体, 菌糸 2 検体から検出され濃度は胞子中 0.2 ~ 332.9 ng/10<sup>6</sup>, 菌糸抽出液中 3 ~ 784 ng/mL であった。LC/TOF-MS によるスクリーニングにおいては 11 種の大環状トリコテセン類のマイコトキシン及びアトラノン類, ドラベラン類, スタキボトリラクタム類及びスタキボシン類の存在が推定された。また多変量解析手法を用いることで菌体の溶血性の有無に関して 32 種類の特徴的な代謝物が抽出されその強度は溶血性を示す菌体で強度が非常に類似していた。

キーワード: スタキボトリス属, マイコトキシン, 大環状トリコテセン類,  
LC/MS-MS, LC/TOF-MS

(Received: December 15, 2009)

### はじめに

現在では, *Stachbotrys chartarum* は動物, 人に対して真菌症を引き起こすマイコトキシンを産生する真菌として良く知られている<sup>1)</sup>。発端は 1993-1994 年に米国クリーブランドで発生した幼児の突発性肺出血の大流行である<sup>2)</sup>。この時, 肺出血を発症した幼児の自宅から *S. chartarum* の繁殖が確認されたことが, ビルや家に繁殖するかびに対する意識を高め, *S. chartarum* が人, 特に幼児に対する真菌症に重要な真菌であることを認識させた。

最近では, 2005 年, ハリケーンによる大洪水を受けたニューオーリンズの屋内空気からもこの真菌が大量に検出され, 洪水などで被害を受けた家屋に住む人への健康被害が懸念されている<sup>3)</sup>。この真菌はマイコトキシンとしてロリジン類, ベルカリン類, サトラトキシシン類など大環状トリコテセン類 (MTRs) 及びトリコベルリン類, トリコベロール類などトリコベロイド類の多くを産生する<sup>4-6)</sup>。また, その他二次代謝産物として免疫抑制作用のあるスタキボトリラクタムなども産生し, これら生理活性化合物とマイコトキシン類の相互作用がこの真菌の人への強い毒性を示しているとの報告がある。さらにアトラノン類, ドラベランジテルペン類なども *S. chartarum* が産生する二

次代謝産物であり生理活性作用が研究されている。

*S. chartarum* の産生する二次代謝産物については HPLC 法<sup>7)</sup>、LC-MS 法<sup>8)</sup> による分析法が報告されているが LC-MS 法の場合、標準品が入手可能な化合物については MRM 手法を用いた LC/MS-MS 法による高感度分析による定量分析が可能である。しかし、*S. chartarum* の産生する二次代謝産物は標準品の入手が困難な化合物が多く LC/TOF-MS による網羅的分析法が有効である<sup>9)</sup>。そこで LC/MS-MS 法による特定 MTR 類の定量分析及び LC/TOF-MS を用いた二次代謝産物の包括的分析と *S. chartarum* のキャラクタリゼーションについて紹介する。

### 真菌の前処理

真菌は Potato dextrose agar 培地 25 °C で 3 週間培養後、培地を滅菌蒸留水で洗浄することで菌体を捕集した。この菌体を含む洗浄液をガラスフィルターでろ過することでろ液と残渣に分離し、ろ液は遠心分離し胞子を得た。一方、残渣はさらに滅菌蒸留水で洗浄し、洗浄液を遠心分離することで菌糸を得た。これら胞子及び菌糸は 3 mL の 80 % メタノールで 24 時間放置することで二次代謝産物を抽出し、遠心分離により透明な上清を得た。この上清を蒸発乾固後、1 mL のメタノールで再溶解した。

### LC/MS-MS による大環状トリコテセン類の分析

ロリジン L2, ロリジン A, サトラトキシシン H, サトラトキシシン G, イソサトラトキシシン F 及びベルカリン A は標準品を使用し LC/MS-MS による MRM 法での分析条件を確立し、定量分析を行った。LC/MS-MS の分析条件は Table 1 に示したが、プリカーサーイオンには各 MTRs のベースピークイオンを選択したがロリジン L2 はプロトン化分子、その他はアンモニウム付加イオンで

Table 1. Analytical condition of macrocyclic trichothecenes by LC/MS-MS

HPLC	: Agilent 1200
Column	: ZORBAX Eclipse Plus C18 (150 mm, 2.1 mm, 3.5 µm)
Mobile phase	: A: 0.1 % CH <sub>3</sub> COOH+10mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , B: ACN 30 % B ---- (30 min) ---70 % B
Column temp	: 40 °C
Sample volume	: 20 µL
Flow rate	: 0.2 mL/min
MS	: Agilent 6410B Triple Quad LC/MS
Ionization	: ESI (positive)
Drying gas	: 10 L/min at 300 °C
Nebulizer gas	: 345 kPa

No	name	Precursor	Product 1	Product 2	Collision 1	Collision 2	R. time	TS
1	Roridin L2	531	249	231	15	15	9.37	1
2	Satratoxin G	562	249	545	10	5	9.51	2
3	Satratoxin H	546	530	512	5	10	10.41	3
4	Iso-satratoxin F	560	249	544	10	5	13.19	4
5	Verrucaric acid	520	249	457	10	5	13.91	4
6	Roridin A	550	249	85	10	20	14.59	5

ある。またプロダクトイオンには定量用と確認用に2イオンを選択することでこれらイオンの強度比を定性情報に用いた。

Fig. 1には標準液 (0.5 ng/mL) のMRMクロマトグラムを示したが、全てのMTRsの検出が可能であり、これらクロマトグラムからS/N比=3を検出限界とした場合、各MTRsの検出限界は0.02~0.23 ng/mLであった。また、直線性も良好であり0.5~100 ng/mL範囲での検量線の相関係数は全MTRsで0.999以上であった。この分析法を用いて37種類の*S. chartarum*抽出液の測定を実施した。Table 2に定量結果を示したが、胞子で37検体中9検体、菌糸で9検体中2検体からMTR類が検出され検出された検体は胞子と菌糸で共通していた。しかしロリジンA及びベルカリンAについてはこれまでの報告通り全検体で検出されなかった。濃度は胞子中1~333 ng/10<sup>6</sup>、菌糸抽出液中3~784 ng/mLで、胞子については53637と53638、54415と54418が濃度のバランスが類似していた。

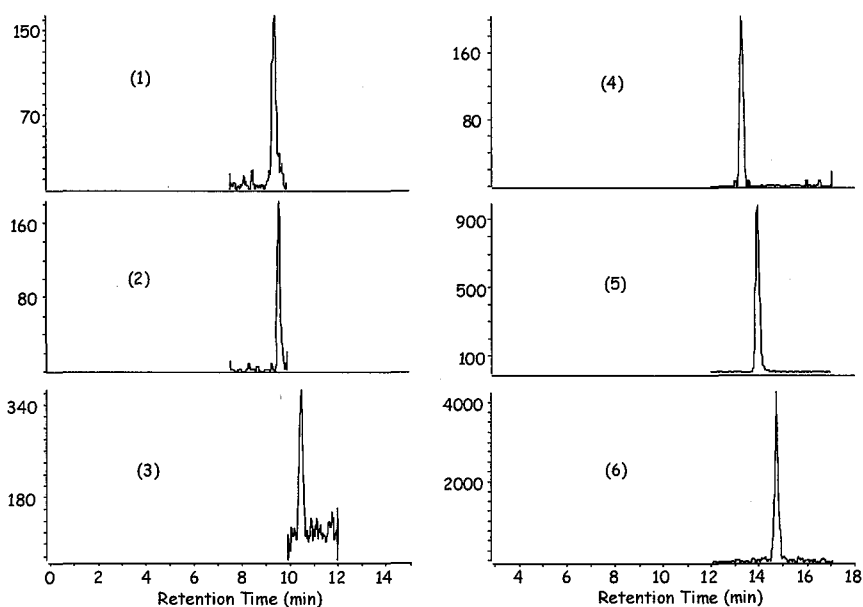


Fig. 1. MRM chromatograms of macrocyclic trichothecenes Concentration:0.5ng/mL  
(1): Roridin L2, (2): Satratoxin G, (3): Satratoxin H  
(4): Iso-satratoxin F, (5): Verrucarin A, (6): Roridin A

### LC/TOF-MSによる大環状トリコテセン類の分析

LC/TOF-MSの測定ではTOF-MSの特徴を利用した網羅的分析及び精密質量データベースを利用したスクリーニング法により標準品の入手できない二次代謝産物も含めた分析を行った。分析条件はTable 3に示したが、LC/MS-MSと比較して多くの二次代謝産物の測定が必要なることから穏やかなグラジエント条件を使用した。また精密質量測定のためリファレンス化合物 ( $m/z=121.050, 992.009$ ) を常時イオン源に導入してリアルタイム質量補正を行った。対象化合物はTable 4に示したがこれまで報告されている二次代謝産物を対象とした。スクリーニングには対象化合物のプロト

Table 2. Amount and target/qualifier ion ratio of 4 macrocyclic trichothecenes of 9 stachybotrys

Spore	Roridin L2		Satratoxin G		Satratoxin H		Iso-satratoxin F		Roridin A		Verrucarín A	
	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio
52909	104	69	ND	NA	153	15	ND	NA	ND	NA	ND	NA
53636	1	68	1	27	0	14	ND	NA	ND	NA	ND	NA
53637	42	69	91	54	119	15	87	82	ND	NA	ND	NA
53638	39	68	94	55	121	15	92	84	ND	NA	ND	NA
53639	99	68	13	58	39	16	24	97	ND	NA	ND	NA
54415	333	69	5	71	25	17	59	84	ND	NA	ND	NA
54416	4	69	9	55	2	18	4	89	ND	NA	ND	NA
54417	15	67	13	50	17	15	8	86	ND	NA	ND	NA
54418	60	69	4	54	10	16	35	83	ND	NA	ND	NA

Conc.: ng/10<sup>6</sup>

Hypha	Roridin L2		Satratoxin G		Satratoxin H		Iso-satratoxin F		Roridin A		Verrucarín A	
	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio	Conc.	Ratio
52909	251	69	3	63	784	15	ND	NA	ND	NA	ND	NA
53637	665	74	137	52	221	12	206	81	ND	NA	ND	NA

Conc.: ng/mL

Table 3. Analytical condition of secondary metabolites by LC/TOF-MS

LC	: 1200LC
Column	: ZORBAX Extend C18 (100 mm, 2.1 mm, 1.8 $\mu$ m)
Mobile phase	: A: ACN, B: 0.1 % HCOOH+10 mM HCOONH <sub>4</sub> 10 % A --- (50 min) --- 100 % A
Column temp	: 40 °C
Sample volume	: 20 $\mu$ L
Flow rate	: 0.2 mL/min
MS	: Agilent 6220 time-of-flight LC-MS
Ionization	: ESI (Positive)
Mass range	: m/z 100-1000
Drying gas	: 10 L/min at 350 °C
Nebulizer gas	: 345 kPa
Reference masss	: m/z = 121.050, 922.009
	:
Non target analysis	:
Monitor ion	: (M+H) <sup>+</sup> , (M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>
Mass window	: $\pm$ 0.001 Da
Relative Mass error	: 5 ppm
Retention time window	: $\pm$ 1 min

ン化分子及びアンモニウム付加イオンの精密質量によるマスクロマトグラムを質量幅: 0.01 Da で作成しピークが検出された場合, その平均質量スペクトルを採取し観察された全イオンからデータベース中化合物の精密質量と相対質量誤差: 5 ppm 以内の化合物を検索した. スクリーニング結果は Fig. 2 に検出された二次代謝産物のマスクロマトグラムの例, Table 5, 6 に全菌体中検出された二次代謝産物のピーク面積, 病原性を示した. さらに, 今回検討した *S. chartarum* は精査するこ

Table 4. Exact mass and retention time database of secondary metabolites for LC/TOF-MS

Metabolites	Formula	Retention time	Exact mass	
Trichodermin	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	23.72	292.167	MTRs precursor
Trichodermol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	15.39	250.157	
Satratoxin G	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	20.39	544.231	Satratoxins
Satratoxin H	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>	21.74	528.236	
Iso-satratoxin F	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	23.96	542.215	
Roridin L2	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	19.26	530.252	Roridins
Roridine A	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	25.65	532.267	
Roridine E	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	31.12	514.257	
Epi-Roridine E	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	30.07	514.257	
Roridine H	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	29.04	512.241	
Hydroxy-Roridin E	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	26.39	530.252	
Trichoverrin A or B	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	25.26	532.267	Trichoverroids
Trichoverrol A or B	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	21.20	420.215	
Verrucarín A	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	24.35	502.220	Verrucarins
Verrucarín B	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	22.14	500.205	
Verrucarín J	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	30.45	484.210	
3,4-Epoxy-6-hydroxy-dolabella-7,12-diene-one	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	21.27	318.219	Dolabellanes
6-Hydroxydolabella-3,8,12-trien-14-one	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	26.08	302.225	
Atranone A	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	24.72	416.220	Atranones
Atranone B	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	28.02	446.230	
Atranone C	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	27.04	416.220	
Atranone F	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	27.44	432.215	
Atranone G	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	30.03	462.225	
Spirodihydrobenzofuranlactam 1	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>	32.96	385.224	
Spirodihydrobenzofuranlactam 2	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub>	32.55	429.252	
Spirodihydrobenzofuranlactam 3	C <sub>28</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>6</sub>	34.76	485.278	
Spirodihydrobenzofuranlactam 4	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>8</sub>	27.62	515.252	
Stachyocin A	C <sub>52</sub> H <sub>70</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	43.50	882.503	Stachyocins
Stachyocin D	C <sub>52</sub> H <sub>70</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	31.97	914.493	

とでケモタイプの異なる *S. chlorohalonata* が含まれていることがわかり Table 5, 6 に示した. 検出された二次代謝産物は *S. chartarum* では MTR 類としてサトラトキシニン類, ロリジン類, ベルカリン類及びトリコペロール類が観察されアトラノン類やドラベラン類は全く検出されなかった. 一方 *S. chlorohalonata* では一部の菌体を除いて MTR 類は全く観察されずアトラノン類とドラベラン類が検出された. その他二次代謝産物としてスタキボトリラクタム類及びスタキボシン類は共通して観察され強度も二次代謝産物中高い値を示した. これらの結果は従来の報告と良く一致しケモタイプの異なる *Stachybotrys* 属でマイコトキシニンとして重要な MTRs の産生能が全く異なることが示された.

#### 多変量解析によるキャラクターゼーション

スタキボトリス属の真菌はサトラトキシニン類などのマイコトキシニンが真菌症を示すと考えられているが, その他様々な二次代謝産物を産生しており未知化合物が多く存在する. これら未知化合物

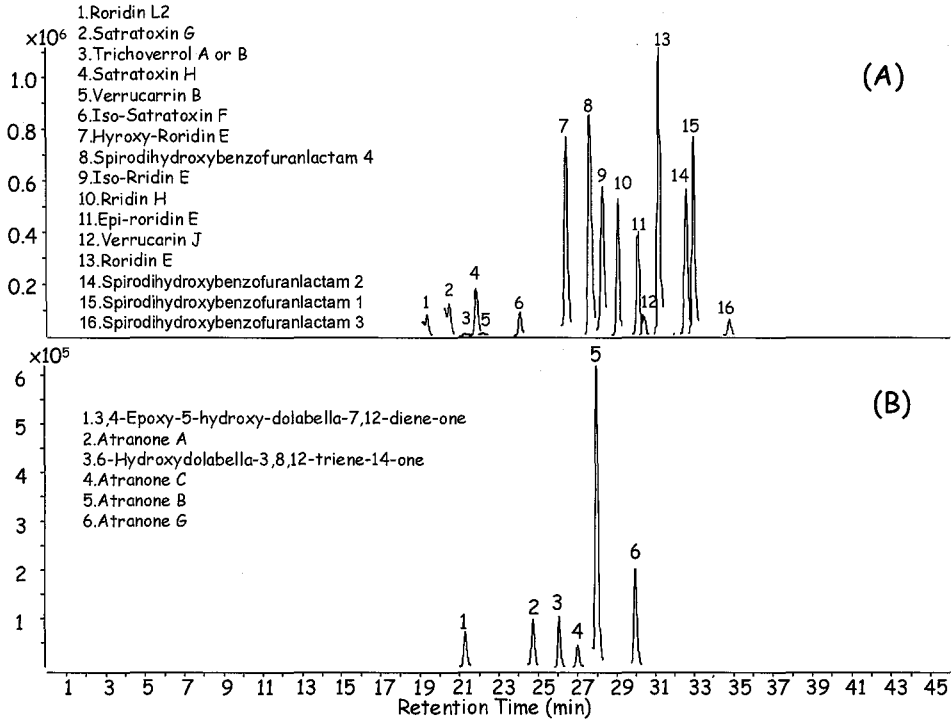


Fig. 2. Mass chromatograms of secondary metabolites in the spore  
(A): *S. chartarum* (B): *S. chlorohalonata*

も病原性に関与していると考えられることから既知のマイコトキシン以外の二次代謝産物の網羅的分析は重要である。そこでLC/TOF-MSで観察された二次代謝産物を網羅的に解析する目的に多変量解析を用いたキャラクタリゼーションを行った。

多変量解析では対象とする化合物をLC/TOF-MSで検出された全イオンから抽出する必要がある。そこで、LC/TOF-MSで検出された全イオンをMolecular Feature Extraction (MFE)と呼ぶ手法を用いてTable 7に示した条件で化合物抽出を行った。その結果、各真菌の胞子抽出液中検出された化合物は209～632化合物で、共通化合物を除いた全化合物数は1821であった。Fig. 3には29検体から検出された1821化合物の保持時間と分子量の関係を示した。これら観察された化合物を菌体の溶血性の有無をパラメーターとしてT検定(P値<0.05)及びFold解析(平均値>2倍)を組み合わせたVolcano Plot解析により特徴的な32化合物に絞り込んだ。これら32化合物をクラスター解析した結果のヒートマップ及びデンドログラムをFig. 4に示す。このクラスター解析で溶血性を示した真菌は32化合物の強度が非常に良く一致していた。また、その他3個のクラスターに分類され溶血性を示した真菌のクラスターは*S. chartarum*のクラスターに含まれていた。

#### まとめ

今回、*Stachbotrys*属が産生するマイコトキシンを含む二次代謝産物についてLC/MSの手法を用いた分析法を確立し37種類の*Stachbotrys*属について産生能の比較を行ったが、LC/MS-MSは特

Table 5. Abundance of secondary metabolites and pathogenic characteristics of stachybotrys

Spore	Trichoverrol	Satratoxins			Roridins			Verrucarins				Atranones					Dolabellanes		Spore × 10 <sup>6</sup>	Fungus	Haemolysis		
	A	G	H	Iso-F	L2	H	Hydroxy-E	E	Epi-E	B	J	A	B	C	F	G	D-1	D-2					
52909S	66308		96460		116568	104355	55218	529941	62086	1168	16924									11	A		
53636S			68	109	413			1798	58		709									25	A		
53637S	53665	49478	70930	33327	30171	201055	145861	490922	152749	328	34947								14	A			
53638S	55765	58337	82442	39924	61854	275485	195998	675279	190948	4255	44562								13	NA			
53639S	186985	4919	26882	8806	39851	426976	135650	712211	80541		79911								5	A			
54415S	491006		16679	30182	176655	239664	44109	1982683	35969	9006	125281								4	A	○		
54416S		5535	1550	2161		84		6261	745	154	2420								34	A	○		
54417S	2100	6276	10056	2939	6682	13124	1534	25429	4853	574	3348								39	A	○		
54418S	150478		6161	13288	23045	28280	2959	170295	8257	1466	9639								18	A	○		
41781S												436	10499		531		843165		4625	18	B		
41782S												50143	2969		800	29622	12912		37838	36046	4	B	
41783S												147787	2099		59815	55172	7437		45243	61783	24	B	
41784S												1432	496		4765				949795	4835	4	B	
41785S												154472	6089		7507	53837	28140		35476	27223	24	B	
41786S												107820	2434		31124	29608	7710		23793	32497	10	B	
41787S												189974	6037		6199	50706	25854		35657	52254	13	B	
41788S												31448	1134		11411	6973	7788		7762	7920	58	B	
41789S												93420	4613		28865	29406	23340		22195	22948	66	B	
41790S												65852	4725		821	21342	20757		20468	25653	11	B	
41791S												49883	475		2418	8262	6118		7517	9096	76	B	
41792S												34255	451		2026	4821	4614		3942	4210	30	B	
41793S												71696	2287		2416	23968	94514		14088	17007	33	B	
52908S												98417	3329		2119	21317	19788		24958	26124	16	NA	
52910S												13302	512		3063	3894	9031		6051	5360	66	B	
52911S												25660	3488		11295	11140	2436		7689	7194	57	B	
52912S												27091	29148		531	11516	67673		20579	21597	10	NA	
52913S												31481	609		1316	5051	672		4334	4561	62	NA	
53635S												78992	1566		22727	17205	5602		12730	11968	56	B	
53640S												36622	263711		7923	148853	43777		472705	147411	19	B	
54419S												40664	718		1119	7439	420		5089	7191	34	B	○
56694S												38971			4530	674			4784	3372	36	B	
56695S												9188			2876	690	10816		20456	9994	65	NA	
56698S												287			173	153			307	179	288	NA	
56697S									255			49156			2607	4255			15194	5986	200	NA	
56698S												10757			1022	410			5808	6742	213	NA	
56890S												2595			251	154			11105	2879	225	NA	
56861S									11866			596			28	132			3008	761	121	NA	

Hypha	Trichoverrol	Satratoxins			Roridins			Verrucarins				Atranones					Dolabellanes						
	A	G	H	Iso-F	L2	H	Hydroxy-E	E	Epi-E	B	J	A	B	C	F	G	D-1	D-2					
52909H	56211		1493098		1736018	1267816		8767840	925063	314622	1007880												
53637H	43251	382580	759445	380076	987466	2536836		8573863	2436113	482049	24717												
56694H												733495		329124	16503				84191	61817			
56695H												142401		67078	32134		869847		673174	250804			
56696H												664849		110409	382897				504508	411856			
56697H												11145508		1492189	973869				2488240	1086974			
56698H												1787192	3557108	214535	72883				887701	787759			
56890H												903106		91893	43642				2547401	815004			
56861H												194253		42690	63303				847532	278070			

D-1:6-Hydroxydolaballa-3,8,12-trien-14-one  
D-2:3,4-Epoxy-6-hydroxy-dolabella-7,12-diene-one

[A] *S. chartarum*  
[B] *S. chlorohalonata*



Table 6 Abundance of secondary metabolites and pathogenic characteristics of stachybotrys

Spore	Stachybotrylactam				Stachybocins		Spore × 10 <sup>6</sup>	Fungus	Haemolysis
	1	2	3	4	A	D			
52909S	14947259	3828117	283530	1988533	493174	58444	10.6	A	
53636S	122768	220374	25673	42588	44580		25	A	
53637S	5533426	4383669	322857	6245293	176933	18987	14	A	
53638S	6745643	5854899	391893	9716036	222390	9706	13.1	NA	
53639S	3522125	2316662	110117	1377196	87879		5	A	
54415S	5491713	2984075	385837	4544785	629112	131281	3.6	A	○
54416S	2762181	985809	89607	125278	119144		33.8	A	
54417S	8350739	2881944	92121	778941	337077	25772	38.8	A	○
54418S	2307872	1991777	258676	2311899	468887	86665	18.1	A	○
41781S	3526112	1983521	256378	2617821	345311	74532	18.1	B	
41782S	4075771	2408272	89822	322076	189882	2477	3.8	B	
41783S	30342481	4639376		437907	342825		23.8	B	
41784S	7767788	2185199	125312	614967	196997	5580	4.4	B	
41785S	16556138	3502486	109629	1104551	291137	1408	23.8	B	
41786S	5292661	1395533		31163	111767		10	B	
41787S	4049934	1888062	25217	457667	98176		12.9	B	
41788S	4847608	927263		171105	191570		58.1	B	
41789S	16928013	3364400	104233	735364	318995	930	66.3	B	
41790S	10464740	1986516	47038	208296	328861		11.3	B	
41791S	8410816	1770791	76822	949233	314295	446	75.6	B	
41792S	14773048	2521719		285720	133046	856	30	B	
41793S	15690541	2788666		530729	574629		33.1	B	
52908S	16653448	2008720		402990	275417	1120	15.8	NA	
52910S	13273279	2198625		114227	84617		66.3	B	
52911S	6834156	1269544		127242	130752		56.9	B	
52912S	12754063	2055884		57652	122985		10	NA	
52913S	15513964	2516471		429201	253551	1672	61.9	NA	
53635S	5993385	1889490		283620	210860		56.3	B	
53640S	3244578	3070681	195558	6379315	157022		19.4	B	
54419S	2320972	574230		109203	53791		34.4	B	○
56694S	3425132	1340510	22084	316801	43211		36.3	B	
56695S	3524162	6690103	1131144	6526094	323121	560998	65.0	NA	
56696S	16734513	6479760	823661	3187762	87321	36497	287.5	NA	
56697S	763825	6807782	12235	4987296	347321	327992	200.0	NA	
56698S	8735198	1534427	69125	80302	6321		212.5	NA	
56860S	5639861	2932597	539396	1784435	35221	33141	225.0	NA	
56861S	3875193	26815820	840273	5738987	673232	55142	121.3	NA	

Hypha	Stachybotrylactam				Stachybocins	
	1	2	3	4	A	D
52909-H	39212013	19310415	820974	5794946	1445023	79557
53637-H	5524131	8301871	1119538	12608719	36211	163892
56694-H	1425378	8495905	266147	1902545	363711	47722
56695-H	14527351	2007378	209857	1287180	6382021	196609
56696-H	26398612	4392107	58441	555442	263521	2616
56697-H	10953721	2897407	628527	5885670	354187	497250
56698-H	5643722	16068224	589991	2787762	364511	62726
56860-H	25628351	3737182	205384	2259486	6345121	111070
56861-H	2535793	2971524	185524	1718971	534173	87545

D-1:6-Hydroxydolabella-3,8,12-trien-14-one

D-2:3,4-Epoxy-6-hydroxy-dolabella-7,12-diene-one

[A] *S. chartarum*[B] *S. chlorohalonata*

Table 7. Condition of molecular feature extraction

1. Ion signal ratio :  $> 100$
2. Retention time window : 3-45 min
3. Extract mass window : 130-900 Da
4. Mass error of isotope ion :  $0.0025 \text{ Da} + 7 \text{ ppm}$
5. Adduct ion :  $M+H$ ,  $M+NH_4$ ,  $M+Na$
6. Compound filter :  $> 3000$

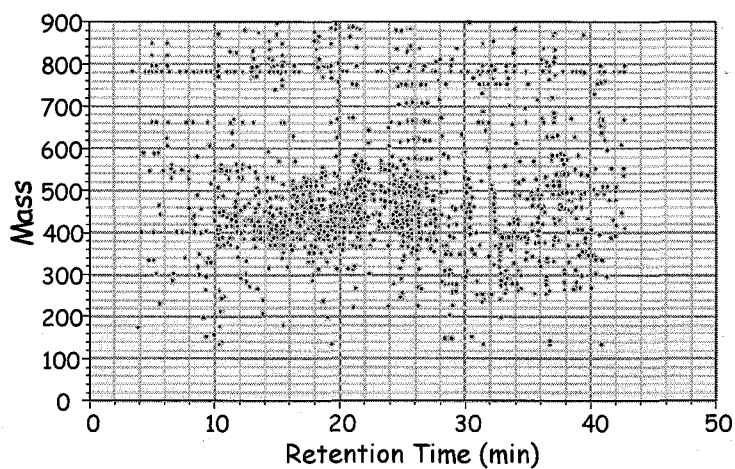
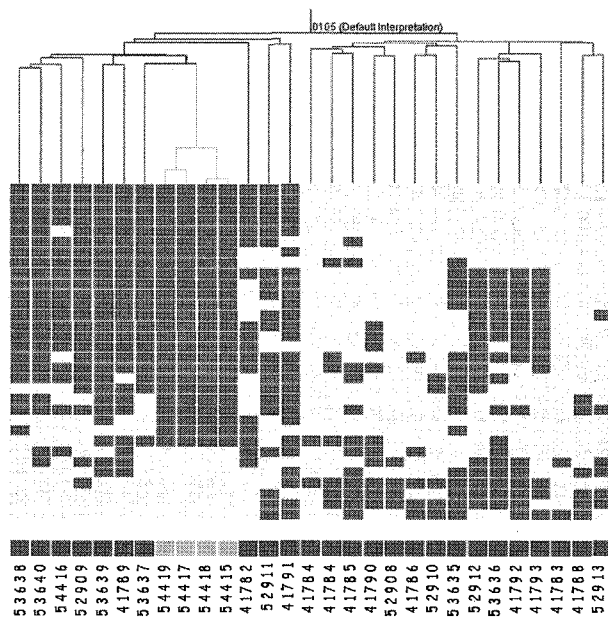


Fig. 3. Plot of mass-retention time of 1821 compounds

Fig. 4. Heat map and dendrogram produced by cluster analysis based on intensities of 32 secondary metabolites in the spore extract of 29 *Stachybotrys*

定のマイコトキシン類を高感度に測定するのに有効であり、LC/TOF-MS法は標準品が入手できないマイコトキシンを含めた二次代謝産物を精密質量から推定することが可能であり、数十種類の二次代謝産物の産生能評価が可能であった。さらにLC/TOF-MSで観察されたイオンをMFE手法及び多変量解析手法を用いることで未知の二次代謝産物強度の比較から真菌のキャラクタリゼーションが可能となり病原性に関与するマーカー探索に有効となりうることが示唆された。

今回の研究にあたりMTRsの標準品を提供して頂いた国立医薬品食品研究所の小西先生ならびにミシガン州立大学Pestka先生、また、*S. Chartarum*菌株の提供、試料前処理ならびに多くの助言を頂いた千葉大学医学部真菌医学研究センターの亀井先生ならびに落合先生に深謝の意を表す。

## 文 献

- 1) Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A.: Clin. Microbiol Rev., **16**, 144-172 (2003)
- 2) Dearborn, D.G., Yike, I., Sorenson, W.G., Miller, M.J., Etzel, R.A.: Env. Health Persp., **107**, 495-499 (1999).
- 3) Solomon, M.G., Koski, H.M., Ellman, R.M., Hammond, S.K.: Env. Health Persp., **114**, 1381-1386 (2006).
- 4) Eppley, R.M., Mazzola, E.P., Stack, M.E., Dreifuss, P.A.: J. Org. Chem., **45**, 2522-2523 (1980).
- 5) Jarvis, B.B., Salemme, J.M.: Nat. Toxins, **3**(1), 10-16 (1995).
- 6) Jarvis, B.B., Sorenson, W.G., Hintikka, E.L., Nikukin, M., Zhou, Y., Jiang, J., Wang, S., Hinkley, S., Etzel, R.A., Dearborn, D.G.: Appl. Environ. Microbiol., **64**(10), 3620-3625 (1998).
- 7) Andersen, B., Nielsen, F.K., Jarvis, B.B.: Mycologia, **94**(3), 392-403 (2002).
- 8) Bloom, E., Bal, K., Nyman, E., Must, A., Laesson, L.: Appl. Environ. Microbiol., **73**(13), 4211-4217 (2007).
- 9) Nielsen, F.K., Smedsgaard, J.: J. Chromatogr. A, **1002**, 111-136 (2003).

## Mycotoxin production by *Stachybotrys*

Masahiko TAKINO: Agilent Technologies Japan, Ltd (9-1, Takakura-cho, Hachioji-shi, Tokyo, 192-8510, Japan)

LC/MS-MS method to analyse of Satratoxin G, Satratoxin H, Iso-satratoxin F and Roridin L2 and LC/TOF-MS method to analyse secondary metabolites including macrocyclic trichothecenes (MTRs) for the investigation of the production of MTRs and other secondary metabolites by *Stachybotrys* has been developed. Thirty-seven spores and nine hyphae of *stachybotrys* were analysed. As a result, four MTRs were detected in nine spores and two hyphae and concentration of them ranged from 0.2 to 332.9 ng/10<sup>6</sup> in the spore and 3 to 784 ng/mL in the extract of hypha. Eleven MTRs, atranones, dolabellanes and stachybotrylactams and stachybotrycins were tentatively identified in the spore and the hypha.

Extracted metabolites were filtered to thirty two metabolites for pathogenic characteristics such as haemolysis of red blood cell by multivariate statistics. The abundance distribution of these metabolites of four spore extracts shown to induce haemolysis was very similar.

**Key words:** *Stachybotrys*, Mycotoxin, Macrocyclic trichothecenes, LC/MS-MS, LC/TOF-MS