

## 博士論文要約 (Summary)

2018 年 4 月入学

連合農学研究科 生物資源科学 専攻

氏 名 青木 聡樹

タイトル	未利用キノコの新規化合物探索源としての活用を目的としたツキヨタケ ( <i>Omphalotus japonicus</i> ) 子実体と菌糸培養物に含まれる 二次代謝産物に関する化学的研究
<p>「序論及び目的」</p> <p>キノコとは担子菌類や子囊菌類のうち大型の子実体を形成するものを総称したものである。日本には 4000 から 5000 種ほどが生息するものと見積もられているが、そのうち食用や薬用になるのは 100 種程度である。本研究ではそれ以外の未利用キノコに着目した成分探索研究の一つとして毒キノコのツキヨタケ (<i>Omphalotus japonicus</i>) に着目した。</p> <p>ツキヨタケはツキヨタケ科ツキヨタケ属の担子菌で、上述の通り有毒である。9 月から 11 月にかけて広葉樹林の倒木などに子実体を群生させ、外見がよく似たムキタケやヒラタケなどの食用種と発生場所及び次期が重複しているため誤同定による食中毒事故が毎年相次いでいる。そのため日本で最もキノコ食中毒を引き起こす毒キノコであるとされている。毒成分としてセスキテルペン化合物の illudin S が報告されている。ツキヨタケ属菌類は多様なセスキテルペン類を産生することで知られている。特に海外の近縁種から 20 を超える新規セスキテルペン類が報告されている。一方、ツキヨタケの成分については毒成分を除き詳細な研究がこれまで少ないことから、新規化合物が多く含まれる可能性が期待される。そこで本研究ではツキヨタケ子実体と菌糸培養物から新規化合物の探索を試みた。</p> <p>「使用機器」</p> <p>NMR 装置は、JEOL 製 JNM-ECX-600 を用いた。比旋光度は堀場製作所製 SEPA-300、IR は同社製 FT-710、UV は島津製作所製 UV mini 1240、ECD は日本分光製 J-820 を用いて測定した。高分解能 FAB-MS は JEOL 製 JMS-700 により測定した。ESI-MS の測定には Waters 製 SYNAPT G2 を用いた。EI-MS は JEOL 製 JMS-T100GC を用いた。HPLC は、ポンプに LC-8A、UV 検出器に SPD-10A、システムコントローラーに CMB-10A (いずれも島津製作所製)、カラムにはジエールサイエンス製 Inertsil ODS-3 (<math>\phi = 10</math> mm、<math>L = 250</math> mm、<math>5 \mu</math> m) を用いた。MPLC は、ポンプに草野科学器械製作所製 KP-70、カラムに野村化学製 Develosil Packed column (<math>\phi = 22</math> mm、<math>L = 300</math> mm) を用いた。固相抽出には Waters 製 Sep-Pak Vac 35 cc C<sub>18</sub>-10 g、シリカゲルには Merck 製シリカゲル 60 (63-210 メッシュ)、Sephadex LH-20 は GE ヘルスケア製、TLC には Merck 製シリカゲル F254 を用いた。</p> <p>「材料及び方法」</p> <p>ツキヨタケ子実体は 2018 年に山形大学農学部附属上名川演習林より採取した。ツキヨタケ菌糸は 2017 年に子実体より分離し、山形大学農学部生物有機化学研究室で保存・維持した YUOJ0825 株を用いた。</p> <p>ツキヨタケ子実体 (新鮮重 5.4 kg) を MeOH 及び EtOAc にて抽出した。MeOH 抽出物は蒸留水で懸濁後、分液ロートで n-hexane、EtOAc、n-BuOH でそれぞれ分画した。このうち</p>	

EtOAc 画分及び n-BuOH 画分、EtOAc 粗抽出物より、TLC の発色を基にシリカゲルカラムや ODS-HPLC、ODS 固相抽出、ODS-MPLC を用いて化合物 1~12 を得た。

YUOJ0825 株を MPG 培地 (2.4 L) に接菌し、3 週間 25 °C 暗所下で振盪培養して得た培養液を吸引濾過して培養濾液を得た。培養濾液を EtOAc で抽出後、シリカゲルカラム及び ODS-HPLC により化合物 13~19 を得た。

同じく YUOJ0825 株について、玄米培地 (新鮮重 1.32 kg) に接菌し、25 °C 暗所下で 40 日間静置培養した。培養物を MeOH で抽出後、粗抽出物を蒸留水で懸濁後、分液ロートで n-hexane、EtOAc、n-BuOH でそれぞれ分画した。このうち EtOAc 画分についてシリカゲルカラム及び ODS 固相抽出、ODS-HPLC を用いて化合物 20~24 を単離した。

得られた各化合物について NMR 及び MS、IR、ECD による構造決定を行い、生物活性試験として変異酵母 YNS17 (*zds1*  $\Delta$  *erg3*  $\Delta$  *pdr1/3*  $\Delta$ ) 株による Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達阻害スクリーニング、ヒト急性前骨髄性白血病 HL60 細胞に対する細胞毒性試験、レタス種子に対する成長調節活性試験を実施した。

#### 「結果」

ツキヨタケ子実体より、6 種の新規化合物 tsukiyol A-C (化合物 1~3)、neoilludin C (化合物 4)、4-*O*-methylneoilludin A、B (化合物 5、6) と 6 種の既知化合物 neoilludin A、B (化合物 6、7)、illudin S (化合物 9)、5-hydroxydichomitrol (化合物 10)、3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -trihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one (化合物 11)、ergosterolperoxide (化合物 12) を単離し構造を決定した。既知化合物のうち 5-hydroxydichomitrol および 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -trihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one をツキヨタケより報告するのは、本研究が初である。このうち tsukiyol C、4-*O*-methylneoilludin A、B、illudin S が変異酵母 YNS17 (*zds1*  $\Delta$  *erg3*  $\Delta$  *pdr1/3*  $\Delta$ ) 株の生育回復活性試験において弱い活性を示した他、illudin S 及び 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -trihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one がヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対して細胞毒性を示した。

ツキヨタケ菌糸 (YUOJ0825 株) の液体培地培養液より、1 種の新規化合物 tsukiyotakein (化合物 13) 及び 6 種の既知化合物 illudalic acid (化合物 14)、illudin B、H、M、S (化合物 15~18) gastrodigenin (化合物 19) を単離した。このうち illudin S 以外の化合物は、我々が知る限り、いずれもツキヨタケからの単離の報告が無い化合物であった。Illudin B 及び H、gastrodigenin が変異酵母 YNS17 株の生育回復活性試験において弱い活性を示した。また illudin B、H、M、S が HL60 細胞に対し細胞毒性を示した。

ツキヨタケ菌糸玄米培地培養物より 1 種の新規化合物 omphaloprenol A 及び、4 種の既知化合物 hypsiziprenol A<sub>10</sub>、A<sub>11</sub> (化合物 21、22)、ergosterol (化合物 23)、illudin S (化合物 24) を単離し構造を決定した。中でも新規化合物 omphaloprenol A 及び hypsiziprenol A<sub>10</sub>、A<sub>11</sub> は、これまでツキヨタケ属の担子菌類からは報告の無い polyisoprenopolyol と呼ばれる polyterpene 類であった。

#### 「結論及び考察」

ツキヨタケ子実体、菌糸液体培地培養液、菌糸玄米培地培養物について TLC の発色に基づきそれぞれ網羅的に成分研究を行った結果、計 22 種 (化合物 9、18、24 はいずれも illudin S であったため。) の化合物を単離・構造決定し、そのうち 8 種が新規な化合物であった。

以上の結果よりツキヨタケは形態や菌糸における培養条件の違いにより異なる二次代謝物が単離された。よってキノコからは多様な探索手法を組み合わせることでより多様な化合物を得られることが期待され、特に未利用キノコの成分探索への活用が期待される。