

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

(*Omphalotus japonicus*) 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

Chemical Study of Secondary Metabolites from the Fruiting Body
and Mycelial Culture of *Omphalotus japonicus* for Utilization as a
Search Resources of New Compounds of Unutilized Mushrooms.

2021

岩手大学大学院

連合農学研究科

生物資源科学専攻

(山形大学)

青木 聡樹

目次

摘要.....	7
序論.....	9
本論.....	18
第 1 章 ツキヨタケ子実体に含まれる成分に関する研究.....	18
1-1 緒言.....	18
1-2 実験.....	19
1-2-1 使用器具.....	19
1-2-2 試料.....	19
1-2-3 薄層クロマトグラフィー (TLC).....	19
1-2-4 単離精製.....	20
1-2-5 ECD 測定並びに理論 ECD スペクトルによる絶対立体配置決定.....	31
1-2-6 ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 を用いた細胞毒性試験.....	31
1-2-7 変異酵母 YNS17 株による生育回復活性試験.....	32
1-3 実験結果.....	34
1-3-1 構造解析.....	34
1-3-1-1 化合物 1 (Tsukiyol A).....	35
1-3-1-2 化合物 2 (Tsukiyol B).....	39
1-3-1-3 化合物 3 (Tsukiyol C).....	40
1-3-1-4 化合物 4 (Neoilludin C).....	43
1-3-1-5 化合物 5 (4- <i>O</i> -Methylneoilludin A).....	47
1-3-1-6 化合物 6 (4- <i>O</i> -Methylneoilludin B).....	50
1-3-1-7 化合物 1~6 のスペクトルデータ.....	52
1-3-1-8 化合物 7~12 の同定.....	56
1-3-1-9 化合物 4~8 の ECD による絶対立体構造決定.....	56
1-3-2 生理活性.....	58
1-3-2-1 HL60 細胞に対する細胞毒性試験の結果.....	58

1-3-2-2 変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性試験の結果	58
1-4 考察	60
第 2 章 ツキヨタケ菌糸培養濾液に含まれる成分に関する研究	63
2-1 緒言	63
2-2 実験	65
2-2-1 使用器具	65
2-2-2 菌糸の分離と同定	65
2-2-3 菌糸の培養	65
2-2-4 TLC	66
2-2-5 単離と精製	66
2-2-6 ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 を用いた細胞毒性試験	70
2-2-7 変異酵母 YNS17 株による生育回復活性試験	70
2-3 実験結果	71
2-3-1 構造解析	71
2-3-1-1 化合物 13 (Tsukiyotakein)	72
2-3-1-2 化合物 13 のスペクトルデータ	75
2-3-1-3 化合物 14～19 の同定	75
2-3-2 生理活性	76
2-3-2-1 HL60 細胞に対する細胞毒性試験の結果	76
2-3-2-2 変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性試験の結果	76
2-4 考察	78
第 3 章 ツキヨタケ菌糸玄米培地培養物に含まれる成分に関する研究	80
3-1 緒言	80
3-2 実験	82
3-2-1 使用機器	82
3-2-2 使用菌株	82

3-2-3 菌糸の培養.....	82
3-2-4 TLC.....	82
3-2-5 単離精製.....	82
3-2-6 レタス幼植物体に対する生理活性試験.....	88
3-2-7 ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性試験.....	88
3-2-8 変異酵母 YNS17 株による生育回復活性試験	88
3-3 結果.....	89
3-3-1 構造解析	89
3-3-1-1 化合物 20 (Omphaloprenol A)	90
3-3-1-2 化合物 20 のスペクトルデータ.....	96
3-3-1-3 化合物 21~24 の同定	96
3-3-2 生理活性	96
3-3-2-1 レタス幼植物体に対する生理活性試験の結果	96
3-3-2-2 HL60 細胞に対する細胞毒性試験の結果	97
3-3-2-3 変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性試験の結果.....	98
3-4 考察.....	98
結論.....	100
参考文献	104
謝辞.....	122
補足資料	124
Fig. S 1 ツキヨタケ菌糸 YUOJ0825 株シーケンス解析の BLAST 検索の結果	125
Fig. S 2 ITS1F プライマーによる YUOJ0825 株のシーケンス解析の結果.....	126
Fig. S 3 ITS1R プライマーによる YUOJ0825 株のシーケンス解析の結果	127
Fig. S 4 Tsukiyol A の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CD_3OD)	128
Fig. S 5 Tsukiyol A の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CD_3OD)	129
Fig. S 6 Tsukiyol A の ^1H - ^1H COSY (CD_3OD)	130
Fig. S 7 Tsukiyol A の HMQC (CD_3OD)	131
Fig. S 8 Tsukiyol A の HMBC (CD_3OD)	132

Fig. S 9 Tsukiyol B の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	133
Fig. S 10 Tsukiyol B の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	134
Fig. S 11 Tsukiyol B の ^1H - ^1H COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	135
Fig. S 12 Tsukiyol B の HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	136
Fig. S 13 Tsukiyol B の HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	137
Fig. S 14 Tsukiyol C の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N} + 2.5\% \text{D}_2\text{O}$)....	138
Fig. S 15 Tsukiyol C の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N} + 2.5\% \text{D}_2\text{O}$)...	139
Fig. S 16 Tsukiyol C の ^1H - ^1H COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N} + 2.5\% \text{D}_2\text{O}$)	140
Fig. S 17 Tsukiyol C の HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N} + 2.5\% \text{D}_2\text{O}$)	141
Fig. S 18 Tsukiyol C の HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N} + 2.5\% \text{D}_2\text{O}$)	142
Fig. S 19 Neoilludin C の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CD_3OD).....	143
Fig. S 20 Neoilludin C の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CD_3OD)	144
Fig. S 21 Neoilludin C の ^1H - ^1H COSY (CD_3OD)	145
Fig. S 22 Neoilludin C の HMQC (CD_3OD).....	146
Fig. S 23 Neoilludin C の HMBC (CD_3OD)	147
Fig. S 24 4- <i>O</i> -Methylneoilludin A の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CD_3OD) ..	148
Fig. S 25 4- <i>O</i> -Methylneoilludin A の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CD_3OD) .	149
Fig. S 26 4- <i>O</i> -Methylneoilludin A の ^1H - ^1H COSY (CD_3OD)	150
Fig. S 27 4- <i>O</i> -Methylneoilludin A の HMQC (CD_3OD)	151
Fig. S 28 4- <i>O</i> -Methylneoilludin A の HMBC (CD_3OD)	152
Fig. S 29 4- <i>O</i> -Methylneoilludin B の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CD_3OD) ..	153
Fig. S 30 4- <i>O</i> -Methylneoilludin B の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CD_3OD)..	154
Fig. S 31 4- <i>O</i> -Methylneoilludin B の ^1H - ^1H COSY (CD_3OD).....	155
Fig. S 32 4- <i>O</i> -Methylneoilludin B の HMQC (CD_3OD)	156
Fig. S 33 4- <i>O</i> -Methylneoilludin B の HMBC (CD_3OD)	157
Fig. S 34 4- <i>O</i> -Methylneoilludin B (2017) の HMBC (CD_3OD) [63]	158
Fig. S 35 Tsukiyotakein の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CDCl_3)	159
Fig. S 36 Tsukiyotakein の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CDCl_3)	160
Fig. S 37 Tsukiyotakein の ^1H - ^1H COSY (CDCl_3)	161
Fig. S 38 Tsukiyotakein の HMQC (CDCl_3)	162
Fig. S 39 Tsukiyotakein の HMBC (CDCl_3).....	163
Fig. S 40 Omphaloprenol A ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CDCl_3)	164
Fig. S 41 Omphaloprenol A の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CDCl_3)	165
Fig. S 42 Omphaloprenol A の EI-MS スペクトル	166
Fig. S 43 Omphaloprenol A の IR スペクトル	167

略語一覽

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BuOH	butanol
CD ₃ OD	methanol <i>d</i> ₄
CDCl ₃	chloroform <i>d</i>
CHCl ₃	chloroform
COSY	correlated spectroscopy
ECD	electronic circular dichroism
EI	electron ionization
ESI	electrospray ionization
EtOAc	ethyl acetate
FAB	fast atom bombardment
HL60	human acute promyelocytic leukemia 60
HMBC	heteronuclear single quantum coherence
HMQC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	the half maximal inhibitory concentration
IR	infrared
MPG	malt peptone glucose
MPLC	medium pressure liquid chromatography
MS	mass spectrometry
MeOH	methanol
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect

ODS	octa decyl silyl
OSMAC	one strain many compounds
PDA	potato dextrose agar
R_f	rate of flow
TLC	thin layer chromatography
UV	ultra violet
calcd.	calculated
m/z	mass-to-charge ratio
sp.	species
SE	standard error
TDDFT	time-dependent density functional theory
YPD	yeast extract dextrose peptone

摘要

毒キノコとして知られるツキヨタケの子実体、菌糸培養濾液、菌糸玄米培地培養物より TLC の発色に基づいた新規化合物の探索を行ったところ、8 種の新規化合物を含む 22 種の化合物を単離し、構造解析と生理活性試験を行った。構造解析には NMR 及び MS、IR、ECD、旋光計を用いた。

ツキヨタケ子実体からは 6 種の新規な sesquiterpene 化合物 tsukiyol A-C、neoilludin C、4-*O*-methylneoilludin A、B を単離した。また既知化合物 illudin S、neoilludin A、B、5-hydroxidichomitol、 3β , 5α , 9α -trihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one、ergosterolperoxide も得られた。このうち tsukiyol C、4-*O*-methylneoilludin A、B、illudin S が変異酵母 YNS17 (*zds1* Δ *erg3* Δ *pdr1*/3 Δ) 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 3β , 5α , 9α -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。

ツキヨタケ菌糸培養濾液より 1 種の新規な illudalane sesquiterpene である tsukiyotakein のほか、7 種の既知化合物 illudin B、H、M、S、illudalic acid、gastrodigenin を単離した。このうち 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 5 種の化合物を単離した。うち 3 種は polyisoprenepolyol 類であり、2 種が既知化合物 hypsiziprenol A₁₀、A₁₁、一種が新規化合物 omphaloprenol A であった。また既知化合物 illudin S 及び ergosterol も得られた。Omphaloprenol A はレタス幼植物体地下部に対して成長促進作用が認められた一方、HL60 細胞に対しては細胞毒性を示した。

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に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。

公表論文

Aoki, S. *et al.* Constituents of the fruiting body of poisonous mushroom *Omphalotus japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* 68, 436-442 (2020), doi: 10.1248/cpb.c19-01009.

序論

序論—1 本研究の目的

本研究ではこれまで食用や薬用とされてこなかった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として知られるツキヨタケに着目し、産生する二次代謝物の単離精製と構造解析、生理活性評価を行った。以下にその背景を述べる。

序論—2 天然物化学

天然より有用物質を探索しこれを単離・同定する研究は 18 世紀後期より興隆した近代薬学と共に発展し、19 世紀に入ると 1806 年には Friedrich Sertürner によりアヘンから鎮痛薬となる morphine の単離が、1817 年には Pierre-Joseph Pelletier らによりキナの樹皮に含まれる抗マラリア成分 quinine の単離が達成されている。また我が国においても、長井長義らによりマオウの成分にして感冒・鎮咳薬となった ephedrine の単離が成されており、この業績は日本における近代薬学の黎明期を代表する研究として知られている^{1,2}。20 世紀に入り現在の化合物単離精製法の礎となるクロマトグラフィー法が Mikhail Semenovitch Tswett により発明されてからは、これまで分離困難であった多くの成分が容易に単離できるようになった³。以後、技術の向上に加え、核磁気共鳴分光法や質量分析法など各種分析手法と装置の登場・普及により、今日までにおよそ 26 万種もの化合物が天然より単離・構造決定されている⁴。

このような研究は、現代において天然物化学と呼ばれる一大分野の一角を担っており、化合物の単離同定のみならず、生理活性評価や合成法の確立など天然有機化合物に関する多岐にわたる研究テーマを擁している。

天然物化学研究、特に新規化合物の単離同定に関する研究の過程で得られた新規化合物は、優れた生理活性物質として創薬のリード化合物になるばかりでなく、時

に従来の知見を越えるような特異な構造や活性の作用機序を持つ化合物が見つかることで有機合成や創薬に関する技術の進歩につながることが期待される。また近年では生命現象について代謝産物からの解明をめざすケミカルバイオロジーやメタボロミクス分野の発展が目覚ましく、これらの分野において新規化合物の探索研究は、その基盤となる生体分子の迅速な同定に必要な各種スペクトルデータと十分量の単離精製された標品を提供することから、今後とも必要とされ続けることが予想される⁵。

序論－3 菌類、特にキノコが産生する成分

菌類とは、真核生物ドメインのオピストコンタに分類される生物群の一つである。細胞壁を有する主に固着性の多細胞生物であり、また分解と吸収栄養を行う従属栄養生物でもあるという特徴を持つ。一般にカビやキノコ、酵母、地衣類と呼ばれる生物がこれに該当する⁶。

菌類からは、これまで糸状菌を中心に多くの有用物質が見つかった。特に Alexander Fleming が 1928 年にアオカビの一種である *Penicillium chrysogenum* より発見した penicillin は、世界初の抗生物質として後に実用化される。また *P. citrinum* より HMG-CoA 還元酵素阻害物質として発見された mevastatin は脂質異常症に対する薬として期待され、その後の研究により *Aspergillus terreus* から見つかった類縁化合物の lovastatin が初のスタチン系薬として製品化を果たしたほか、*P. brevicompactum* より単離された mycophenolic acid が免疫抑制剤として利用されている⁷⁻⁹。

菌類に属する生物は、未発見種も含めると地球上におよそ 150 万種程度存在しているものと見積もられている¹⁰。一方、これまでに報告されているおよそ 26 万種の天然有機化合物のうち、半数以上が植物由来とされている⁴。しかし地球上に存在す

る植物の種の総数はおよそ 27 万種程度であり、菌類の 150 万種と比較すると少数である⁵。そのため、菌類からは今後も数多くの新規な化合物が見つかるものと期待される。

キノコとは、担子菌類や子囊菌類のうち、肉眼で観察できる程度の大きさの子実体を形成する種を総称したものである^{11,12}。また大型の子実体そのものを指す場合もあり、とりわけ食用となる種の子実体は広く栽培されている。我が国ではツキヨタケ科シイタケ属のシイタケ (*Lentinula edodes*) やシメジ科シロタモギタケ属のブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*)、ヒラタケ科ヒラタケ属のエリンギ (*Pleurotus eryngii*) 及びヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、タマバリタケ科エノキタケ属のエノキタケ (*Flammulina velutipes*)、モエギタケ科スギタケ属のナメコ (*Pholiota microspora*) などが広く流通している¹¹。特に干しシイタケの lenthionine に由来する香りや guanylic acid による旨味は、伝統的な日本料理において欠かせないものとなっている¹¹。また中国や東南アジアの料理にはウラベニガサ科フクロタケ属のフクロタケ (*Volvariella volvacea*) が、西洋料理にはイグチ科ヤマドリタケ属のヤマドリタケ (*Boletus edulis*) やハラタケ科ハラタケ属のツクリタケ (*Agaricus bisporus*)、セイヨウショウロ科セイヨウショウロ属のセイヨウショウロ (*Tuber sp.*) が食材として利用されるように、国や地域によって好まれる種も異なっている¹¹。加えて日本や中国においてキノコは生薬の原料にもなっており、例えばマンネンタケ科マンネンタケ属のマンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) は中国最古の本草書である神農本草経において延命の効果を持つ上薬として靈芝の名で記載され現在でも健康食品として栽培・流通しているほか、サルノコシカケ科チョレイマイタケ属のチョレイマイタケ (*Polyporus umbellatus*) の菌核は猪苓と呼ばれ、主に利尿剤などの用途で利用される¹¹。

キノコからは優れた生理活性やユニークな構造を有した代謝産物が報告されてい

る。例えば *Myriococcum albomyces* より最初に報告され、後にツクツクボウシタケの仲間の *Isaria sinclairii* から免疫抑制物質として単離された myriocin は、免疫抑制剤 fingolimod (FTY720) のリード化合物になったことで知られている^{13,14}。またイッポンシメジ科ヒカゲウラベニタケ属の *Clitopilus passeckerianus* から単離された抗生物質 pleuromutilin は、リボソームの peptidyl transferase center に結合することで、バクテリアのタンパク質合成を阻害するという珍しい作用機序を有することから、近年増加しつつある薬剤耐性菌への効果が期待されている^{15,16}。またタマバリタケ科マツカサキノコ属のマツカサシメジ (*Strobilurus tenacellus*) より単離され抗糸状菌物質として報告された strobilurin A は、農薬ストロビルリン系殺菌剤のリード化合物となっている¹⁷。更に前述の lovastatin は、ヒラタケにも含まれていることが報告されている¹⁸。

キノコの成分を知ることは、キノコの生態を解明する上でも重要である。例えば、キノコが引き起こす現象として古くから知られるものにフェアリーリングと呼ばれるものがある。これはキノコ子実体又は菌糸が輪状に生殖域を展開する現象で、フェアリーリング周辺では植物の生育が著しく促進されたり抑制されたりすることが知られている。このようなフェアリーリングにおける植物成長調整物質として、キシメジ科ムラサキシメジ属のコムラサキシメジ (*Lepista sordida*) から 2-azahypoxanthine と dimidazole-4-carboxamide が単離された¹⁹⁻²¹。またクヌギタケの仲間のキノコ (*Mycena sp.*) は、タケハリカビ (*Spinellus sp.*) と呼ばれる真菌にしばし寄生されることが知られている。クヌギタケは寄生に対する防御物質として formaldehyde を生成する一方、タケハリカビは、この formaldehyde への対抗防御として没食子酸とアミノ酸生成し、それらを Mannich 反応により無害な代謝物に変換している²²。しかしクヌギタケでは自身が生成した formaldehyde を更に自身が生産する pyrroloquinoline alkaloid の mycenarubin A に作用させて、

タケハリカビに対し特異的に成長阻害作用を持つ mycenarubin C に変換して対処するという二重の防御機構を有していることが明らかにされた²²。このように、キノコでは他の生物では見られないユニークな現象が特有の代謝物を介して行われている。

またキノコは子実体のみならず、菌糸や孢子など、生活環ごとに形態を変化させながら生活を営んでおり、その各形態において産する二次代謝物も異なることが知られている。例えば食用菌としても知られるサンゴハリタケ科サンゴハリタケ属のヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) では、子実体及び孢子、菌糸の成分がそれぞれ詳細に研究されており、子実体からは hericenone 類等が、菌糸からは erinacin 類、培養濾液からは erynapyron 類等が見つかり、更に孢子からも異なる新規な代謝産物が見つかり²³⁻²⁹。また、一般に菌類を培養する場合、培地組成や pH などの培養条件により生産する代謝産物に違いが生じることが知られており、実際にチャダイゴケ属菌 *Cyathus africanus* の菌糸培養物に関する先行研究においては、液体培地培養物から cyathane diterpene 類の neocyathins A-J が単離されたのに対し、固体培地培養物からは neocyathins K-R が単離されており、とりわけ neocyathins K, L は 9/7 縮合環系を持つ 4,9-seco-cyathane というこれまで報告の無い骨格を有した diterpene であった^{30,31}。このように、キノコは子実体と菌糸・孢子など各形態や菌糸の培養条件の違いにより産する代謝産物が異なるため、これらの特質を利用し網羅的に二次代謝産物の探索を行うことで多様な新規化合物を得られる可能性が考えられる。

序論－4 未利用キノコ

日本には種名がつけられていないものも含めると、推定 4000～5000 種程度のキノコが生息しているとされている¹²。その中で食用や薬用として人々が利用してき

た種は、僅か 100 種類程度に過ぎない¹¹。その他の種に関しては、有毒であることが判明しているものが少なくとも 200 種以上あるとされており、それ以外の種に関しては食毒不明のものが大部分を占めている。すなわち日本に生息するキノコのうち、食用や薬用にならない種については成分未知なものが多く、新規化合物が見つかることが期待される。そこで本研究では、これまで食用や薬用などに利用されてこなかったキノコとして、毒キノコであるツキヨタケに着目し研究を行った。

序論－5 ツキヨタケ

ツキヨタケ [*Omphalotus japonicus* (Kawam.) Kirchm. & O.K.Mill., *O. guepiniformis*, *Lampteromyces japonicus*] はツキヨタケ科ツキヨタケ属の担子菌であり、毒キノコ或いは発光性のキノコとして知られている (Fig. 1)。初秋から晩秋にかけて、ブナやイタヤカエデなどの朽ち木上に紫褐色で直径 10～25 cm 程度の大型の傘を有するヒラタケ型、またはカヤタケ型の子実体を群生させる。ヒダは淡黄色の後に白色となり垂生し、柄にはツバのような輪状の隆起帯がある。また柄の肉には黒紫色の染みがみられる¹²。

本種は、野生のヒラタケやラッシタケ科ワサビタケ属のムキタケ (*Panellus serotinus*) などの、いわゆるキノコ狩りの対象となる食用キノコと外見が非常によく似ており、また発生時期や発生場所も共通していることから誤同定・誤食による食中毒事故が毎年相次いで発生している³²。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いわれている。ツキヨタケを食すと、およそ 1 時間後に幻覚、腹痛、嘔吐、下痢などの症状が現れ、これらの症状が 10 日前後にわたり続くといわれている。また稀ながら死亡例が存在する^{32,33}。

ツキヨタケの毒成分は、illudane sesquiterpene の illudin S である³⁴。これはツキヨタケ属担子菌に共通の成分であるといわれており、*O. olearius* (著者注：

本種は北米に生息する *O. illudens* とシノニムであると考えられてきた。一方、分子系統解析により別種であるとする報告もある³⁵。しかし真菌類のデータベースである Mycobank では、*O. illudens* の現行名を 2020 年 11 月現在において *O. olearius* としている³⁶。更に先行研究においても、両者をシノニムとして扱うものと別種として扱うものが混在している為、少なくとも成分に関する研究においてこの 2 つの種を分けて議論することは困難である。よって本稿では、両者を *O. olearius* として扱うものとする。) より初めて単離された³⁷。Illudin S は強力な細胞毒性を有する化合物として知られており、多様なガン細胞に対して強い活性を示すことから抗ガン剤への応用が期待されてきた³⁸。特に本化合物を硫酸中で formaldehyde と反応させることで得られる半合成アナログ体の一つである irofulven (MGI-114、6-hydroxyacylfulven) は、illudin S と比較して治療指数に大幅な改善が認められたことから、抗ガン剤の候補物質として期待が持たれていた化合物である³⁹⁻⁴¹。これらの化合物の作用機構は cyclopropane 及び α, β 不飽和カルボニルの β 位プロトンが、glutathione や DNA などの生体分子と反応することによるものとされている⁴²。この他ツキヨタケからは illudin S の類縁体である dihydroilludin S や neoilludin A、B が報告されており、これらの化合物にも細胞毒性が認められているが illudin S と比べるとその活性は低い⁴³⁻⁴⁵。

ツキヨタケ属菌類は、多様な sesquiterpene を産することで知られている。そのため *O. olearius* を中心に長らく新規化合物の探索源として研究が行われており、現在までに illudoid sesquiterpene と総称される illudane、protoilludane、illudalane、fomannosane 骨格を持つ sesquiterpene 類のほか、africanane 骨格の omphadiol など 20 を超える新規 sesquiterpene が報告されている⁴⁶⁻⁵²。また、sesquiterpene 以外にも殺線虫活性を有する環状ペプチドの omphalotin 類が単離されている⁵³⁻⁵⁵。

一方ツキヨタケに含まれる成分に関してはあまり詳しく知られておらず、sesquiterpene に関しては上述の通り illudin S とその類縁体 3 種が報告されているのみである。

一般に担子菌キノコは、近縁種同士であっても含まれる成分には程度の差こそあれ違いが認められる。例えばベニタケ科ベニタケ属のキノコは、ツキヨタケ属同様に新規な sesquiterpene の報告が多く、シロハツモドキ (*Russula japonica*) からは protoilludane 又は illudalane sesquiterpene の russujaponols 類が子実体より見つかった。対して、同属のヤブレベニタケ (*Russula lepida*) からは aristolane sesquiterpene の rulepidadiol が、また欧州に生息する *Russula nobilis* からは lactarane sesquiterpene の russulanobilines A-C が単離されるなど種によって多様な構造の sesquiterpene を産している⁵⁶⁻⁵⁹。そのため、成分探索に関する先行研究の少ないツキヨタケには、sesquiterpene 類を中心に構造未知な化合物が多く存在している可能性が期待される。またツキヨタケは大型の子実体を多数群生し、有毒であるためキノコ狩りの対象にならず、山形大学上名川演習林に豊富に自生していることから試料としての供給が容易である。更には朽ち木を栄養源として生育する木材腐朽菌であることから、人工条件下での培養も容易である。従ってツキヨタケは未利用キノコの成分探索源としての有望性を検証する上で適した特徴を有した未利用キノコであるといえる。そこで本研究では、ツキヨタケを対象に子実体、培養濾液、玄米培地培養物よりそれぞれ含まれる成分の単離・構造解析並びに生理活性試験を行った。本稿では修士論文にて既に子実体より単離した 3 種の新規 sesquiterpene (tsukiyol A、neoilludin C、4-O-methylneoilludin B) に加え、上述の条件によりそれぞれ得た化合物について議論する⁶⁰。



Fig. 1 ツキヨタケ (*O. japonicus*) 子実体。山形大学演習林 (2019)

本論

第1章 ツキヨタケ子実体に含まれる成分に関する研究

1-1 緒言

ツキヨタケは日本で最も食中毒事故を引き起こす毒キノコとして知られている。その原因成分として illudin S が報告されているほか、類縁化合物の dihydroilludin S、neoilludin A、B が知られている^{34,43-45}。ツキヨタケ属菌類は多種多様な sesquiterpene 類を産生することで知られており、欧州原産種である *O. olearius* を中心に盛んに研究が行われてきた。本研究では、ツキヨタケ子実体の MeOH 抽出物より化合物の探索を行い、6 種の新規 sesquiterpene tsukiyols A-C、neoilludin C、4-*O*-methylneoilludin A、B を単離した^{60,61}。また既知の化合物として illudin S の他、neoilludin A、B、5-hydroxidichomitol、 3β , 5α , 9α -trihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one、ergosterolperoxide も得られた⁶⁰⁻⁶⁴。このうち tsukiyol A、neoilludin C、4-*O*-methylneoilludin A は、修士論文においても報告したものである⁶⁰。構造解析は NMR 及び MS、IR、ECD を用いて行った。

新規化合物のうち tsukiyol A、B は protoilludane 骨格、tsukiyol C は fomannnosane 骨格を有しており、これらの骨格を有する sesquiterpene 類の報告は本種において初である。

得られた化合物のうち、illudin S、4-*O*-methylneoilludin A、B、tsukiyol C は、変異酵母に対する生育回復活性系において弱い回復活性が見られた。また illudin S は、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対して強い細胞毒性を示し、 3β , 5α , 9α -trihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one にも活性が見られた。

1-2 実験

1-2-1 使用器具

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。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)、カラムにはジーエルサイエンス製 Inertsil ODS-3 ($\phi = 10$ mm、 $L = 250$ mm、 $5\mu\text{m}$)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 ($\phi = 22$ mm、 $L = 300$ mm) を用いた。固相抽出には Waters 製 Sep-Pak Vac 35 cc C_{18} -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 F_{254} を用いた。

1-2-2 試料

ツキヨタケ子実体は、2018 年に山形大学上名川演習林にて採取したもの 5.4 kg (新鮮重) を用いた。この子実体の乾燥標本 No. 181016 は、山形大学農学部生物有機化学研究室に保管した。

1-2-3 薄層クロマトグラフィー (TLC)

化合物の単離は TLC の発色に基づいて行った。各種クロマトグラフィーにより得られた画分をキャピラリーで TLC プレート上にスポットし、各画分に応じて溶出力を調整した混合溶媒を展開溶媒として展開した。化合物の検出は UV 短波 (254 nm)

及び長波（366 nm）及び 10% vanillin 硫酸の噴霧と 120 °Cでの加熱 35 秒間により行った。

1-2-4 単離精製

ツキヨタケ子実体からの抽出と粗分画の概要は Fig. 2、n-BuOH 画分からの化合物の単離については Fig. 3、EtOAc 画分からの単離は Fig. 4、EtOAc 粗抽出物からの単離は Fig. 5 に示した通りである。以下に詳細を述べる。

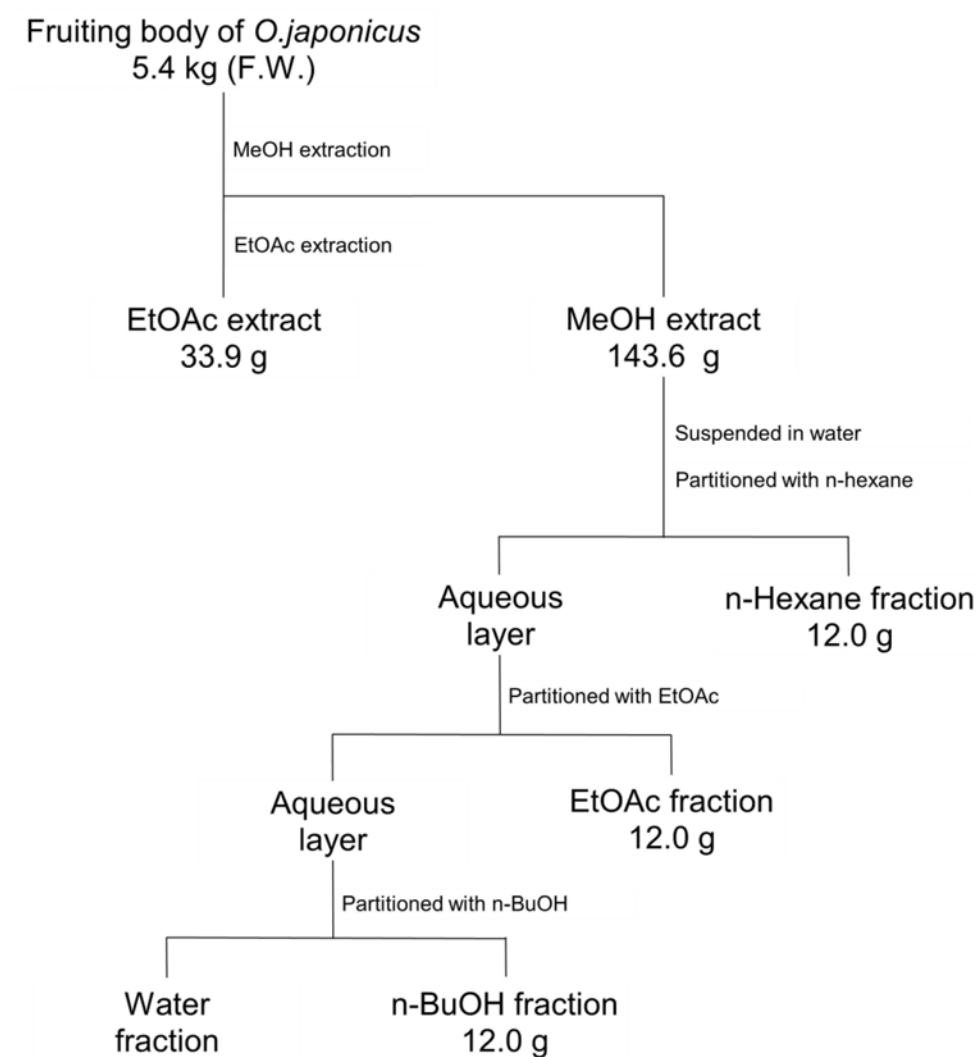


Fig. 2 ツキヨタケ子実体の抽出と分画

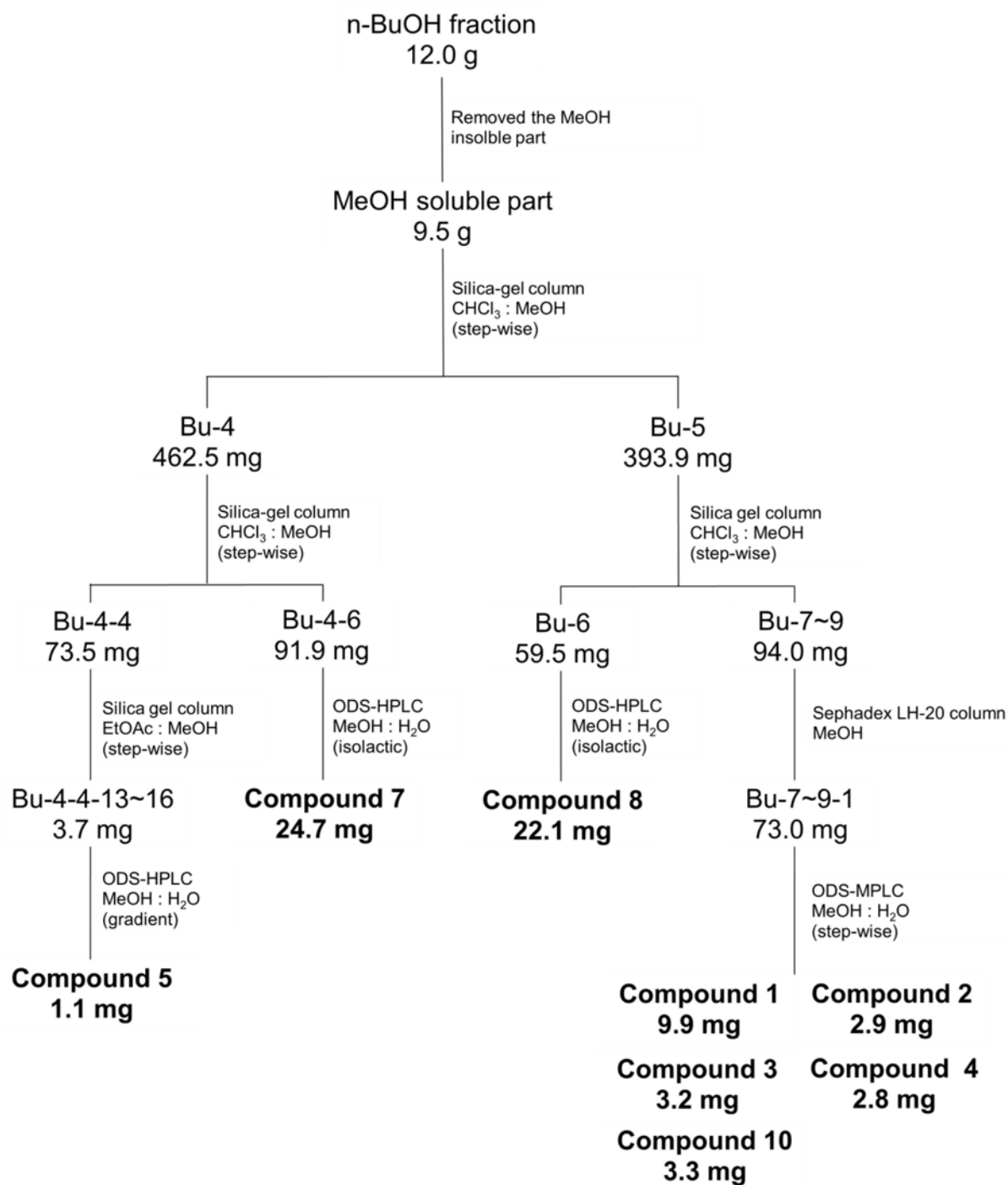


Fig. 3 n-BuOH 画分からの化合物の単離

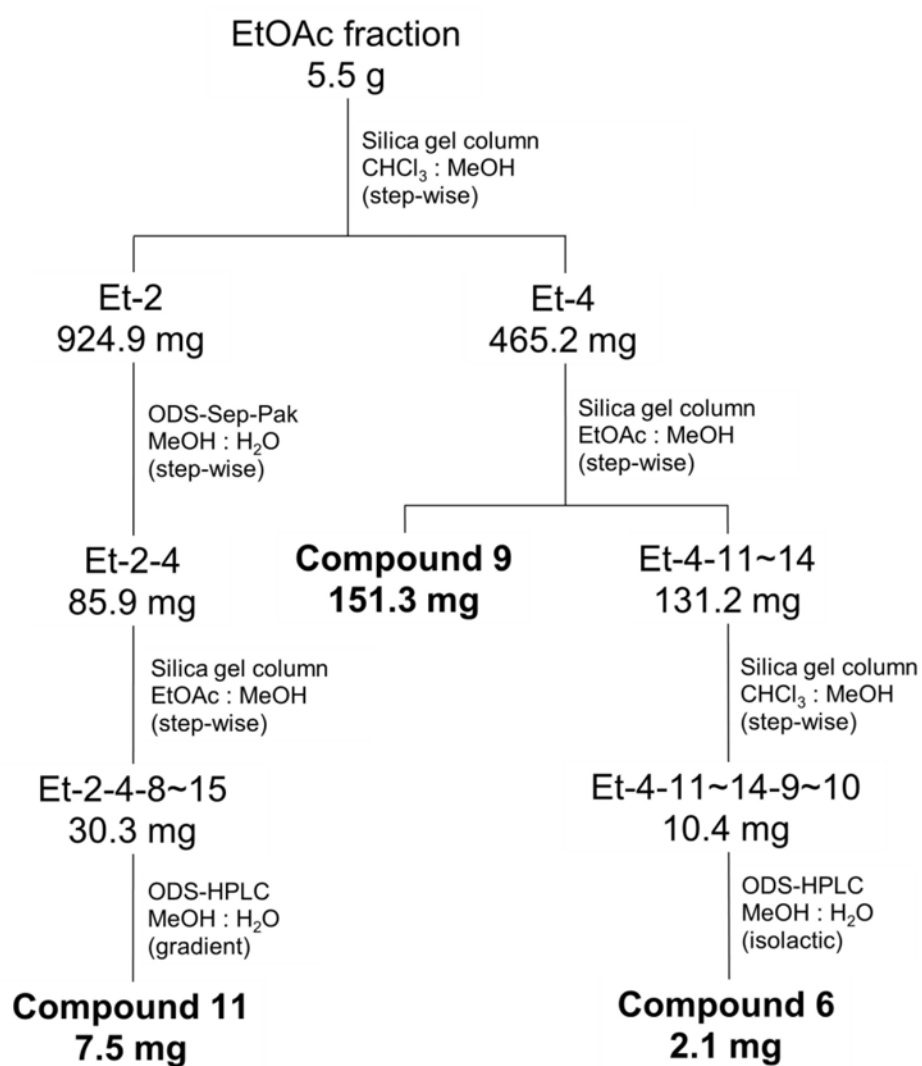


Fig. 4 EtOAc 画分からの化合物の単離

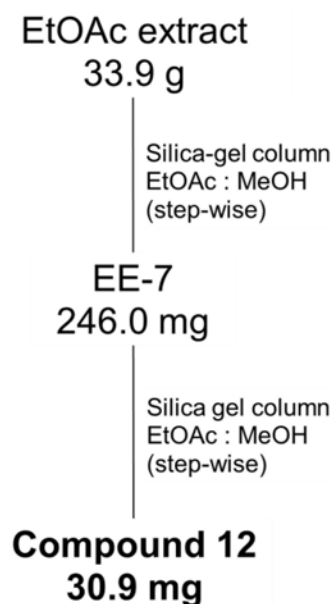


Fig. 5 EtOAc 粗抽出物からの化合物 12 の単離

ツキヨタケ子実体 5.4 kg と MeOH を 8 L 容量の貯蔵ビンに入れて 5 °C の温度下で 3 回抽出した。このとき 1 回目の抽出は 3 日間かけて行い、2 回目及び 3 回目の抽出はそれぞれ 1 日で行った。得られた抽出液はロータリーエバポレーターにて減圧濃縮し、143.6 g の粗抽出物を得た。MeOH 抽出後の子実体は EtOAc により同様の抽出操作を行い、33.9 g の EtOAc 粗抽出物を得た。

MeOH 粗抽出物を蒸留水で懸濁した。懸濁液を分液ロートに入れて n-hexane で 3 回抽出を行った。続いて EtOAc、n-BuOH の順にそれぞれ同様の操作を行い、得られた各抽出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮して n-hexane 画分 (12.0 g)、EtOAc 画分 (5.5 g)、n-BuOH 画分 (23.4 g) を得た。このとき n-hexane 及び EtOAc 抽出液については無水硫酸ナトリウムを添加して一晩脱水後、水和物となった硫酸ナトリウムを傾斜法で取り除いてから減圧濃縮を行った。

n-BuOH 画分を MeOH に懸濁させたところ、多量の白色粉末状物質の析出と沈

殿が確認された。そこで傾斜法によりこの白色粉末状物質を除去し、9.5 g の MeOH 可溶性画分を得た。n-BuOH 画分に生じた白色粉末状析出物については著者の修士論文において D-mannitol を主成分とする水溶性物質であることを確認している⁶⁰。

MeOH 可溶性画分について silica gel 60 を固定相とした順相カラムクロマトグラフィーで粗分画した。MeOH 可溶性画分を MeOH で溶解し、少量の silica gel 60 を加えてスラリー(粥状)とした後、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮することで MeOH 可溶性画分中の成分を silica gel 60 に吸着させた。

カラムは内径 8.0 cm のクロマト管に silica gel 60 と $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 85/15$ の混合溶媒のスラリー 1.0 L を充填したものを用いた。カラム最上部に MeOH 可溶性画分を吸着させた silica gel 60 を入れ、 CHCl_3 (mL) / MeOH (mL) = 850/150、700 /300、600/400、400/600、0/1000 で溶出した。溶出液は 500 mL 毎に分取し、それぞれロータリーエバポレーターで減圧濃縮して Bu-1～Bu-10 の計10の画分を得た。各画分の TLC の結果は Fig. 6 に示した。このうち TLC 上で明瞭なスポットが特に多く観察された Bu-4 画分 (462.5 mg) 及び Bu-5 画分 (393.9 mg) について更なる分画を進めた。

Bu-4 画分について、上述の手法により silica gel 60 に吸着させ、カラムクロマトグラフィーにより溶出した。この時カラムは内径 2.5 cm のクロマト管に silica gel 60 と $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 95:5$ の混合溶媒のスラリー 90 mL を充填したものを用い、 CHCl_3 (mL) / MeOH (mL) = 95/5、90/10、85/15、80/20、75/25、0/100 の順で流した。最初に溶出した 100mL を Bu-4-1、次いで 50 mL ごとに Bu-4-2～Bu-4-9、最後の MeOH 回収分を Bu-4-10 として計 10 画分に分画した。

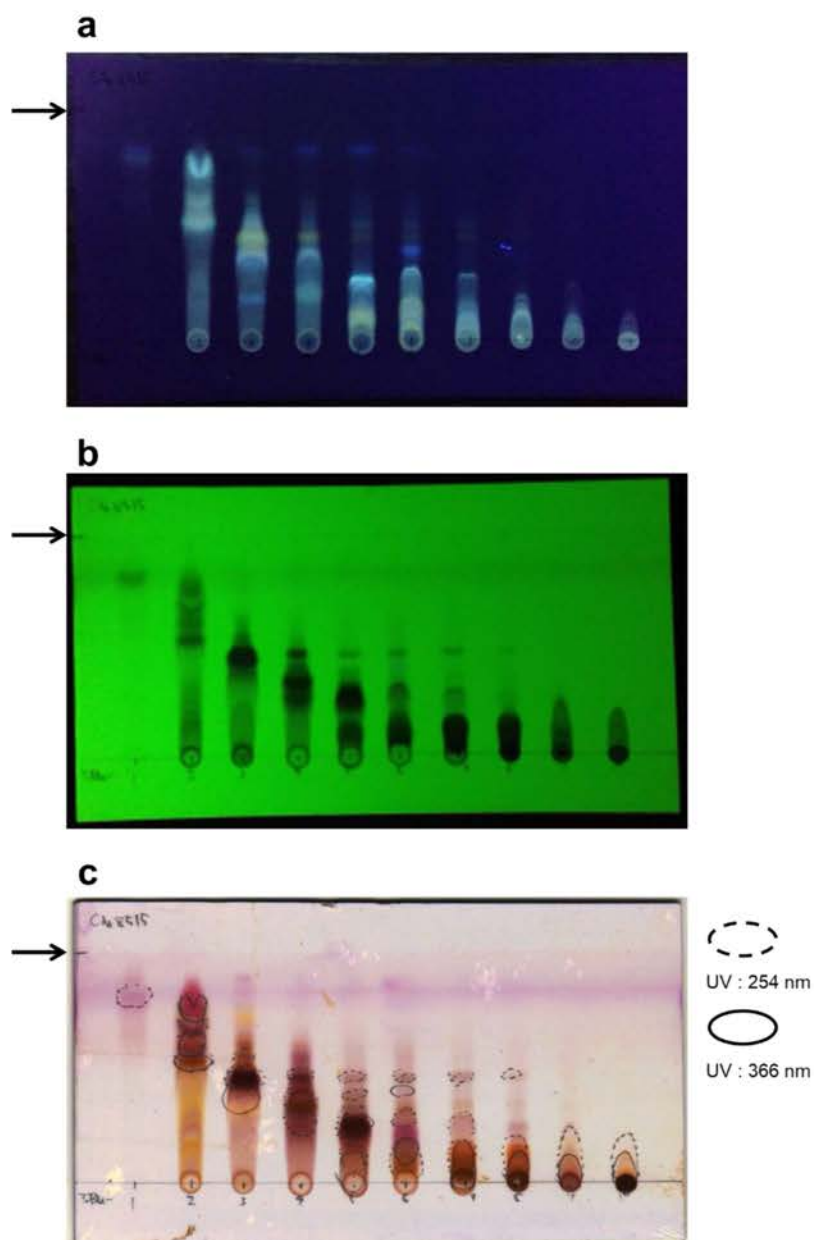


Fig. 6 子実体 BuOH 画分を粗分画して得られた Bu-1~Bu-10 画分の TLC アッセイ (a: UV 366nm、b: UV 254 nm、c: 10 % vanillin 硫酸呈色)。展開溶媒には $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 85/15$ を用いた。左上の黒矢印 (→) は溶媒フロントを示す。TLC 上に検出されたスポットのうち、UV 254 nm で吸収が見られたものは黒破線、UV 366 nm で蛍光が見られたものは黒実線で示した。なお、左下の画分番号の頭の数字の“3”は 2018 年産であることを示している。

このうち Bu-4-4 画分 (73.5 mg)並びに Bu-4-6 画分 (91.9 mg) より化合物 5 及び 7 をそれぞれ単離した。

Bu-4-4 画分を silica gel 60 クロマトグラフィーにて分画した。カラムには silica gel 60 と EtOAc のスラリー 40 mL を充填した直径 2.0 cm のクロマト管を用い、少量の silica gel 60 に吸着させた Bu-4-4 画分を混合溶媒 EtOAc (mL) /MeOH (mL) = 40/0、45/3、45/5、40/10、0/5 の順に溶出した。最初の 40 mL を分取後、試験管に 5 mL ずつ 24 画分に分画し、残りを MeOH 回収分として Bu-4-4-0~Bu-4-4-25 の計 26 画分を得た。このうち、Bu-4-4-13~16 画分 (計 3.7 mg)にかけて TLC より $R_f = 0.3$ 付近に化合物 5 の含有が確認されたため (Fig. 7)、ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 30/70 to 50/50、gradient、4 mL/min)による分取を試みたところ、保持時間 14.3 min に検出されたピークを化合物 5 (1.1 mg) として単離した。

Bu-4-6 画分 (91.9 mg) からは、ODS-HPLC (65% MeOH、isolactic、3.5 mL/min) より保持時間 9.0 min に検出されたピークを化合物 7 (24.7 mg) として単離した。

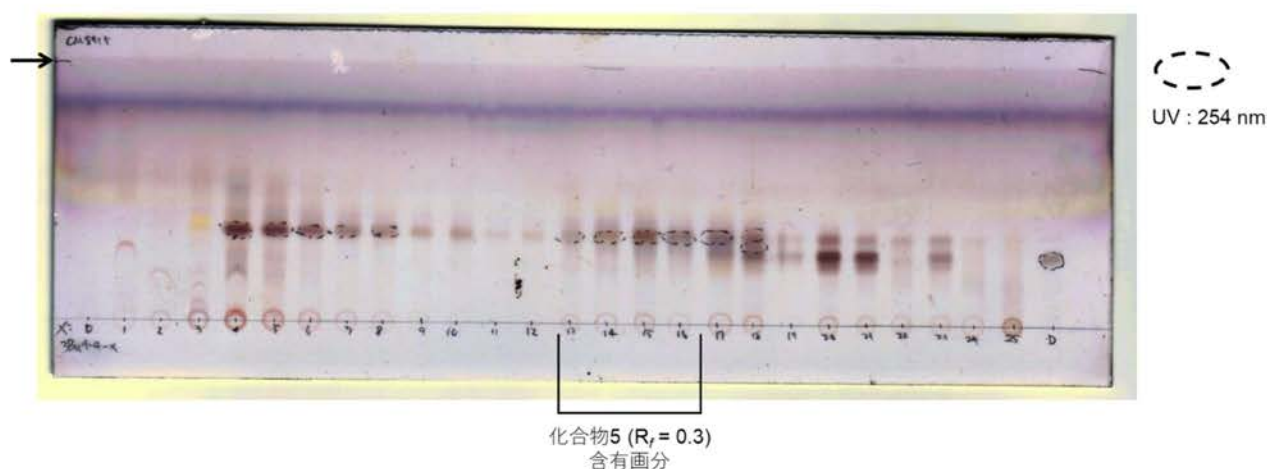


Fig. 7 Bu-4-4-0~Bu-4-4-25 画分の TLC。展開溶媒は CHCl₃/MeOH = 85/15 を用いた。

Bu-5 画分を少量の silica gel 60 で吸着させ、silica gel 60 カラムクロマトグラフィーにて分画した。カラムには $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9:1$ の混合溶媒と silica gel 60 のスラリー 100 mL を充填した直径 2.0 cm のクロマト管を用いた。溶出溶媒は CHCl_3 (mL) / MeOH (mL) = 135/15、80/10、140/20、120/20、100/20、80/20 で溶出し、最初の 150 mL を分取後、75 mL ごとに 9 画分に分画し Bu-5-1~Bu-5-10 を得た。このうち Bu-5-7~Bu-5-9 画分 (計 94.0 mg) を併合し、Sephadex LH-20 カラムにより更に分画した。カラムは内径 2.0 cm のクロマト管に MeOH で膨潤させた Sephadex LH-20 を 113 mL 程度充填したものを用いた。カラムへ少量の MeOH で溶解させた Bu-5-7~9 画分を流し、上端の sephadex LH-20 に吸収されたのを確認してから MeOH で溶出した。最初の 20 mL を分取後、試験管で 5 mL 毎に 20 本分取し、最後に column volume 相当分の MeOH を流してカラム内残留成分を回収し、計 22 画分を得た。得られた各画分について TLC により検出されたスポットに基づいて Bu-5-7~9-1~Bu-5-7~9-4 の計 4 画分に大別した (Fig. 8)。

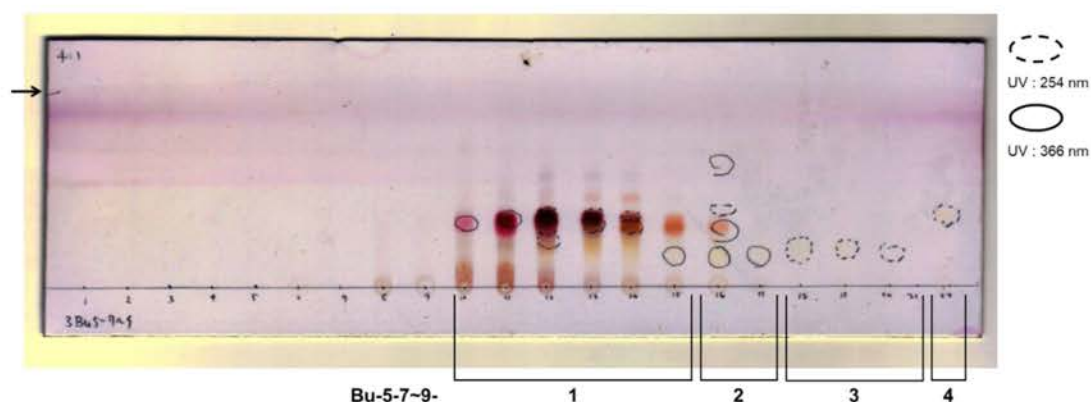


Fig. 8 Bu-5-7~9-1~Bu-5-7~9-22 の TLC。展開溶媒は $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 4/1$ 。

化合物 1-4 並びに 10 は、Bu-5-7~9-1 画分 (73.0 mg)より ODS-MPLC にて単離に至った。MeOH/H₂O = 1/4 の混合溶媒で十分に平衡化した ODS カラム対し 600 μ L の MeOH に溶解した Bu-5-7~9-1 画分を全量シリンジに取り、インジェクターを介してカラム内に導入した。混合溶媒 MeOH (mL) /H₂O (mL) = 10/40、15/35、20/30、25/25、30/20、0/50 をポンプで順次送液し、流速 5 mL/min で最初に溶出した 100 mL を Bu-5-7~9-1-1、次いで 20 mL 毎に Bu-5-7~9-1-2、3、5 mL 毎に Bu-5-7~9-1-4~33、残りを Bu-5-7~9-1-34 とした計 34 の画分を得た。このうち Bu-5-7~9-1-4,5 より化合物 4 (2.8 mg)、Bu-5-7~9-1-12,13 より化合物 1 (12.8 mg)、Bu-5-7~9-1-16 より化合物 2 (3.6 mg)、Bu-5-7~9-1-17,18 より化合物 3 (4.2 mg)、Bu-5-7~9-1-25,26 より化合物 10 (5.6 mg) が単一の化合物として得られた。

更に、B5-6 画分 (59.5 mg)より ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 60/40、isolactic、3.5 mL/min) にて保持時間 6.4 min に検出されたピークを化合物 8 として 22.1 mg 単離した。

EtOAc 画分についても、silica gel 60 を固定相とした順相カラムクロマトグラフィーにて粗分画を行った。カラムには silica gel 60 と CHCl₃/MeOH = 85/15 溶媒のスラリー 200 mL を充填した直径 3.5 cm のクロマト管を用いた。Silica gel 60 に吸着させた EtOAc 画分を混合溶媒 CHCl₃ (mL) /MeOH (mL) = 170/30、140/60、100/100、0/200 で溶出し、最初の 200 mL を Et-1、続いて 100 mL ごとに Et-2~Et-5、残りを Et-6 とした計 6 画分を得た。

このうち Et-2 画分 (924.9 mg) について、ODS-Sep-Pak を用いた固相抽出による分画を行った。MeOH/H₂O = 65/35 の混合溶媒で十分に平衡化した容量 35 cc の ODS-Sep-Pak に、少量の MeOH で溶かした Et-2 画分を吸収させ、MeOH (mL) /H₂O (mL) = 17.5/32.5、25/25、37.5/12.5、100/0 を

順次流し、溶出に用いた溶媒の比率毎に Et-2-1~Et-4-4 の計 4 画分を得た。

このうち、Et-2-4 画分 (85.9mg) より、更なる成分の分画を試みた。n-hexane/EtOAc = 1/4 の混合溶媒と silica gel 60 のスラリー 40 mL を直径 2.0 cm のクロマト管に充填したカラムを用いて、少量の silica gel 60 に吸着させた Et-2-4 画分を、混合溶媒 n-hexane (mL) /EtOAc (mL) = 10/40、0/50; EtOAc (mL) /MeOH (mL) = 45/5、40/10、0/50 で溶出した。最初に溶出した 30 mL を Et-2-4-1、次いで試験管で 5 mL 毎に分取した Et-2-4-2~Et-2-4-31、最後に残りの溶媒を回収した Et-2-4-32 の計 32 画分を得た。このうち TLC 上において、vanillin 硫酸による発色及び UV 短波 (254 nm) 照射にて $R_f = 0.35$ に観察され明瞭なスポット (Fig. 9) を含む Et-2-4-8~15 の計 8 画分を併せ (30.3 mg)、ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 80/20 to 90/10、gradient、4.0 mL/min) において保持時間 6.4 min に検出されたピークを化合物 11 として 7.5 mg 単離した。

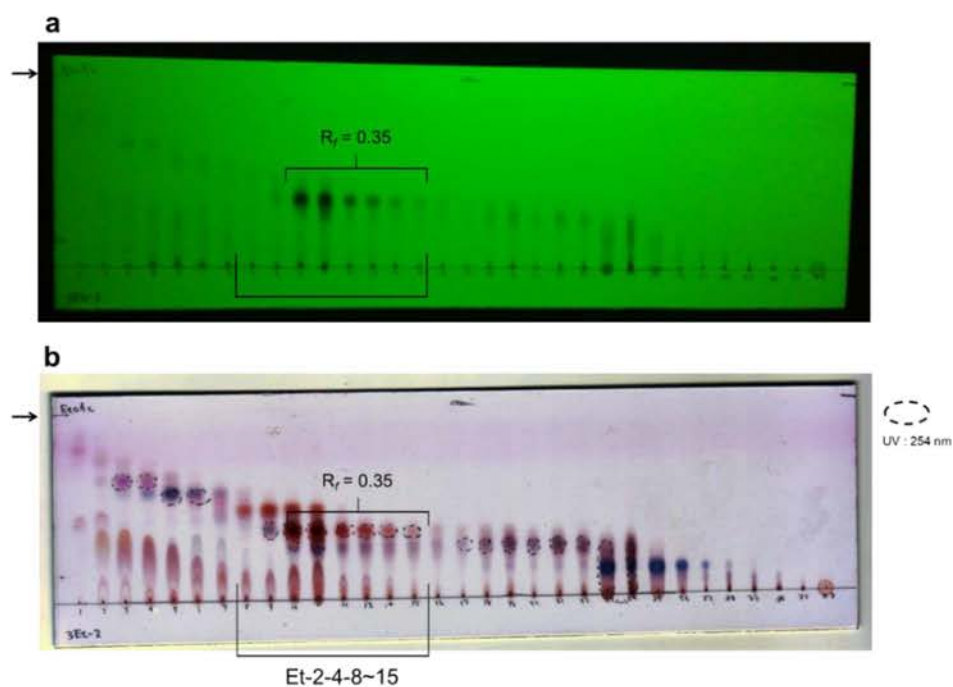


Fig. 9 Et-2-4-1~Et-2-4-32 の TLC (a : UV 254 nm、b : 10 % vanillin 硫酸呈色)。展開溶媒は EtOAc を用いた。

更に、Et-4 画分からも化合物の単離を試みた。EtOAc と silica gel 60 のスラリー 40 mL を直径 2.0 cm のクロマト管に充填したカラムを用いて、少量の silica gel 60 に吸着させた Et-4 画分を、混合溶媒 EtOAc (mL) /MeOH (mL) = 40/0、45/3、45/5、40/10、0/50 で溶出し、最初の 40 mL を Et-4-0 として分取後、試験管に 5 mL ごとに計 24 本分取し (Et-4-1~Et-4-24)、残りを MeOH 回収 (Et-4-25) として計 26 画分に分画した。このうち Et-4-5~7 画分において化合物 9 (151.3 mg) が単離された。また、Et-4-11~14 を併せた画分 (131.2 mg) を更に silica gel 60 カラムクロマトグラフィーで分画した。混合溶媒 CHCl₃/MeOH = 15/1 と silica gel 60 のスラリー 40 mL を直径 2.0 cm のクロマト管に充填したカラムを用いて、少量の silica gel 60 に吸着させた Et-4-11~14 画分を、混合溶媒 CHCl₃ (mL) /MeOH (mL) = 45/3、45/5、42.5/7.5、40/10、0/50 で溶出し、最初の 60 mL を Et-4-11~14-0 として分取後、試験管に 5 mL ごとに計 24 本分取し (Et-4-11~14-2~Et-4-11~14-24)、残りを MeOH 回収 (Et-4-11~14-25) として計 26 画分に分画した。化合物 6 (2.1 mg) は、Et-4-11~14-9,10 画分より ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 70/30、isocratic、3.5 mL/min) にて保持時間 12.1 min に検出されたピークを分取したことで単離された。

EtOAc 粗抽出物も、silica gel 60 カラムクロマトグラフィーにて粗分画を行った。混合溶媒 Hexane/EtOAc = 9/1 溶媒のスラリー 500 mL を充填した直径 4.0 cm のクロマト管に silica gel 60 と、シリカゲルに吸着させた EtOAc 粗抽出物を n-hexane (mL) /EtOAc (mL) = 900/100、800/200、600/400、400/600、0/1000 で溶出した。500 mL ごとに EE-1~EE-10 の計 10 画分に分画した。このうち EE-7 画分 (246.0 mg) より化合物の単離を試みた。n-hexane/EtOAc = 3:2 の混合溶媒と silica gel 60 のスラリー 40 mL を直径

2.0 cm のクロマト管に充填したカラムを用いて、少量の silica gel 60 に吸着させた EE-7 画分を n-hexane (mL) /EtOAc (mL) = 30/20、20/30、10/40、0/50 で溶出し、最初の 50 mL を EE-7-1 として分取後、試験管で 5 mL ごとに 20 画分 (EE-7-2~EE-7-21) に分画し、残りを EE-7-22 として計 23 画分に分画した。このうち EE-7-12 画分から EE-7-15 画分において化合物 12 (30.9 mg) が単離された。

1-2-5 ECD 測定並びに理論 ECD スペクトルによる絶対立体配置決定

化合物 4~8 について ECD 測定と理論 ECD による絶対立体構造の解析を試みた。

実験 ECD スペクトルは 300 nM の濃度に調節した化合物 4~8 の MeOH 溶液を石英セルに入れて測定することで得た。

理論 ECD スペクトルは、電子構造計算プログラム Gaussian09 を用いた時間依存密度汎関数法 (TDDFT 法) により取得した⁶⁵。安定配座の探索には GMMX プログラムを用いた。分子力場 MMFF94 による配座探索で得られた各々の配座異性体について、B3LYP/6-31G (d) を用いた計算により構造の最適化を行い、配座の候補を絞り込んだ⁶⁶。選んだ配座異性体の 30 個の励起状態について B3LYP/6311+G (d) を用いた TDDFT 法により ECD の計算を行い、配座の Boltzmann 分布に基づいて補正した理論 ECD スペクトル取得し、どの配座における理論 ECD スペクトルが実験 ECD スペクトルと最も近似であるかを比較した。

1-2-6 ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 を用いた細胞毒性試験

RPMI Medium 1640 培地 [10% 非働化済ウシ胎児血清、1 % penicillin (50 units/mL) -streptomycin (50 µg/mL)] 中 37 °C、5%CO₂ 条件下で

培養したHL60 細胞を 1.0×10^5 cells/mL になるように培地で調整し、98 μ L ずつ 96 well プレートに撻いた。そこに各化合物の MeOH 溶液を 2 μ L 加え 37 $^{\circ}$ C で 2 日間インキュベート後、リン酸緩衝生理食塩水に溶解した 5 mg/mL MTT を 10 μ L 添加して更に 4 時間インキュベートした。0.04 N HCl を加えた isopropanol を 100 μ L ずつ添加し、生成した不溶性 formazan 結晶をピペッティングにより溶解させ、560 nm における吸光度を測定した。細胞生存率は、MeOH のみ加えた well である control の吸光度と比較して求めた。また positive control には、camptothecin (CPT、 $IC_{50} = 54.2$ nM) を用いた⁶⁷。

1-2-7 変異酵母 YNS17 株による生育回復活性試験

得られた各化合物に対し、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 4 重遺伝子破壊酵母 YNS17 (*zds1 Δ erg3 Δ pdr1/3 Δ*) 株による生育回復活性を指標とした、 Ca^{2+} シグナル伝達阻害物質スクリーニングを実施した。

本試験では、出芽酵母の遺伝子 *zds1* を破壊することで、 Ca^{2+} シグナル伝達により G2 期遅延が生じて増殖不能の状態となった変異酵母を用いた。この変異酵母は、 Ca^{2+} シグナル伝達を阻害する物質を与えると、増殖能が回復する。本試験はこれを利用した表現型スクリーニング系である⁶⁸。すなわち、この試験で増殖能回復を示した化合物は、 Ca^{2+} シグナル伝達経路内に関与するのいずれかの分子を阻害しているものと考えられる。その中には、 Ca^{2+} channel (高血圧、狭心症) や calcineurin (アレルギー、免疫)、mpk1 MAPK (ガン)、GSK-3 β (アルツハイマー病、2 型糖尿病) などヒトの疾病と関わる分子が多く存在している。したがって、本試験で活性を示した化合物は医薬品リード化合物などへの応用が期待される (Fig. 10)^{67,68}。

本試験に用いた YNS17 株は *zds1* に加えて *erg3*、*pdr1*、*pdr3* を破壊すること

で薬剤透過性を高め、検出感度が向上した 4 重遺伝子破壊酵母である。

YNS17 株の YPD 液体培地培養物と 50 °C の YPD 寒天培地を混和後、滅菌済シャーレに捲いて室温下で固化させた。このとき YPD 寒天培地に Ca^{2+} の終濃度が 0.3 M になるよう CaCl_2 を添加した。各化合物の MeOH 溶液 5 μL を調整した培地上にスポットし、28 °C で 3 日間培養し、培地上に増殖能回復に伴う生育円の発生が肉眼で確認できたものを Ca^{2+} シグナル伝達阻害活性ありと判断した。また、観察された生育回復活性が添加した化合物により特異的に生じている事を確認するため、 CaCl_2 を含まない培地で同様の試験を行い活性が観察されないことを確かめた。Positive control には、タンパク質脱リン酸化酵素の calcineurin を阻害することで、YNS17 株に対して強い生育回復活性を示す免疫抑制剤 FK506 (tacrolimus、2.5 ng/spot) を用いた。

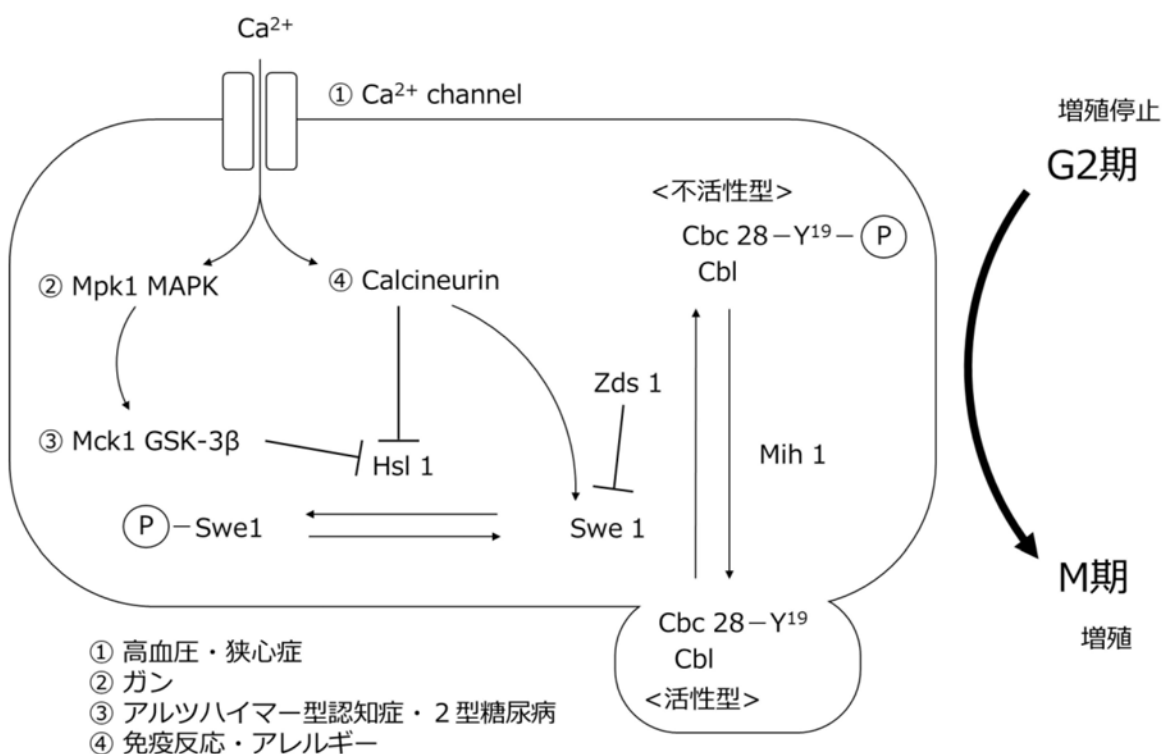


Fig. 10 変異酵母 YNS 1 7 株における Ca^{2+} シグナル伝達経路と疾病の関係について[71]

1-3 実験結果

1-3-1 構造解析

得られた各化合物の構造式を Fig. 11 に示した。以下に構造解析の詳細を述べる。

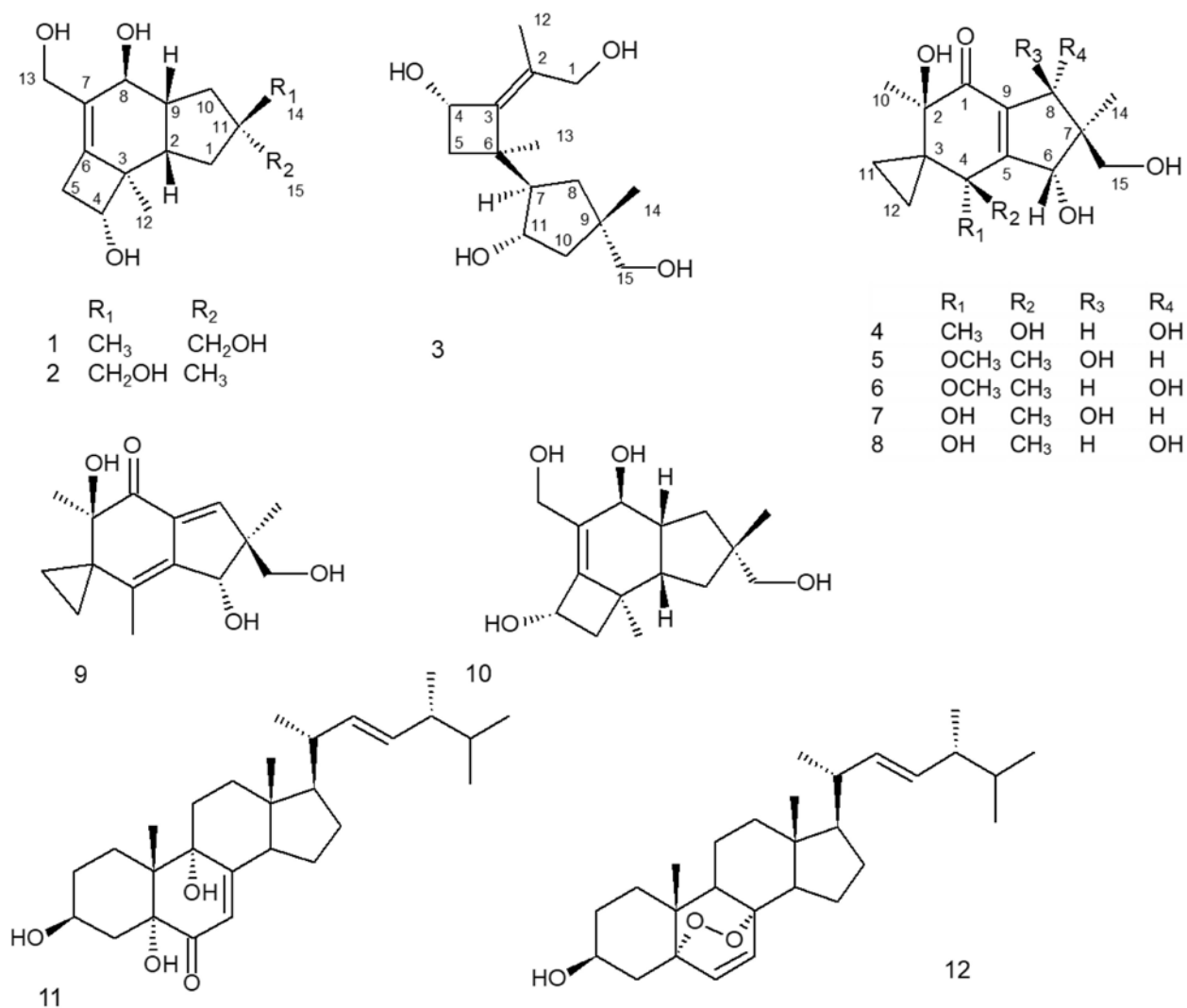


Fig. 11 化合物 1~12 の構造式

1-3-1-1 化合物 1 (Tsukiyol A)

化合物 1 は、無色の固形物として得られた。高分解能 FAB-MS より分子量を測定したところ、 m/z 291.1577 イオンが観測された。これは $C_{15}H_{24}O_4$ の Na 付加イオン $[M+Na]^+$ の精密質量 291.1572 と近似であることから分子式は $C_{15}H_{24}O_4$ であると示唆された。また、得られた分子式の炭素数が 15 であることから、本化合物は 3 個の isoprene ユニットから成る sesquiterpene である可能性が考えられた。

続いて構造決定のため NMR スペクトルを測定し、さらなる解析を行った。NMR スペクトルデータは補足資料に示した (Fig. S4~S8)。 1H NMR スペクトルを測定したところ、 δ_H 0.88、0.90 に singlet の methyl 基、 δ_H 3.29 (2H)、4.02 (1H)、4.10 (1H) に hydroxy methylene、 δ_H 3.75 (1H)、3.93 (1H) に hydroxy methine がみられたほか、 δ_H 2.12、2.22 に methine、 δ_H 1.20、1.26、1.40、1.59、2.56、2.95 に methylene が観測された。

^{13}C NMR スペクトルからは 15 本のピークを観測した。これは MS より求めた分子式と一致する。このうち δ_C 134.0、139.2 に一つの二重結合に相当する sp^2 四級炭素、 δ_C 53.1、46.52 に sp^3 四級炭素が確認された。得られた NMR スペクトルデータについて文献による調査を行ったところ、既知の protoilludane sesquiterpene でシロヒメカヤタケ (*Clitocybe candicans*、*Leucocybe candicans*) より単離が報告された 3-epi-illudol (Fig. 12) のものと類似していることが判明した⁶⁹。一方、15 位炭素が 3-epi-illudol では methyl であったのに対し、本化合物では hydroxymethylene であった。従って、本化合物は 3-epi-illudol の 15 位炭素に hydroxy 基が結合した protoilludane sesquiterpene ではないかと推測された。

続いて二次元 NMR の解析結果について述べる。主要な相関については Fig. 13 に示した。以後、相関を有する水素及び炭素の表記は、核種-位置番号 (例: H-1、C-

2)とする。 ^1H - ^1H COSY では、H-8 が H-9 と、H-9 が H-2 及び H-10 と、H-2 が H-1 と、H-5 が H-4 とそれぞれ相関を有していることが観察された。

HMQC により各プロトンと炭素のピークの結合を帰属し、HMBC による相関を調べたところ、まず hydroxy methylene の H-13 が C-7、C-6、C-8 に相関がみられ、また H-5 は C-6、H-4 は C-2 及び C-12、メチル基 H-12 は C-2、C-3、C-4、C-6、そして H-10、H-1、H-14、H-15 が C-11 と相関を有していた。これらの結果より、本化合物は推測通り protoilludane 骨格を有することが示唆された。また、2 次元 NMR より示唆された各炭素の位置関係は、前述の 3-epi-illudol の文献値とも類似していた。従って本化合物は、二次元 NMR の相関からも 3-epi-illudol の 15 位炭素に水酸基が結合した平面構造を有していることが示唆された。我々の知る限り、このような平面構造を有した化合物の報告はないことから本化合物は新規であると示唆された。

最後に、NOE 差スペクトルと ^1H NMR スペクトルの結合定数に基づいた立体解析の結果について述べる。

主要な NOE 相関は Fig. 14 に示した通りである。以下に詳細を記す。まず methyl 基の H-12 と H-8 及び H-1 α の間に NOE が観測された。更に H-9 は H-2、H-14、H-10 β と、また H-2 は H-1 β 、H-9、H-14、H-4 と、hydroxy methylene H-15 は H-1 α 及び H-10 α と、そして H-4 は H-5 β と NOE が見られた。これらは本化合物が 3-epi-illudol と同様の立体を有している事を示唆しており、加えて 5 員環部分における vicinal coupling の結合定数は、H-2/H-1 β 間並びに H-9/H-10 β 間で $^3J = 7.6$ Hz、H-2/H-1 α 間並びに H-9/H-10 α 間で $^3J = 10.5$ Hz であり、これは 3-epi-illudol の文献値 7.6 Hz 及び 9.7 Hz と近い値を示す (Fig. 15)⁶⁹。また、H-1 β と H-10 β には ^1H - ^1H COSY において W-type long range coupling が観測された。

以上より、本化合物の相対立体配置を決定した。本化合物は修士論文において単離を報告した新規化合物である⁶⁰。

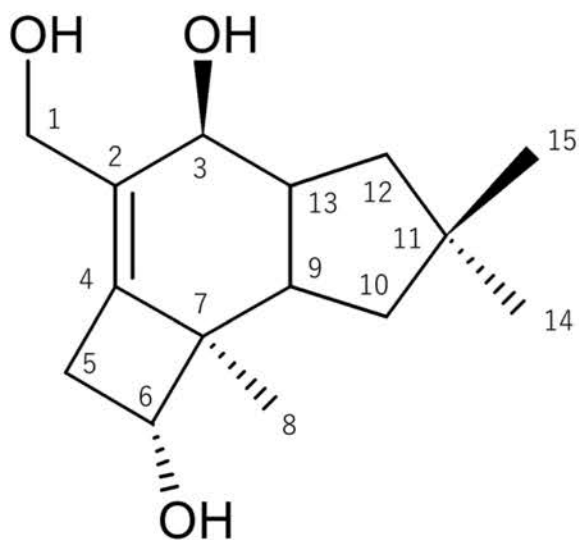


Fig. 12 化合物 1 と類縁な構造を有する 3-*epi*-illudol の構造⁶⁹

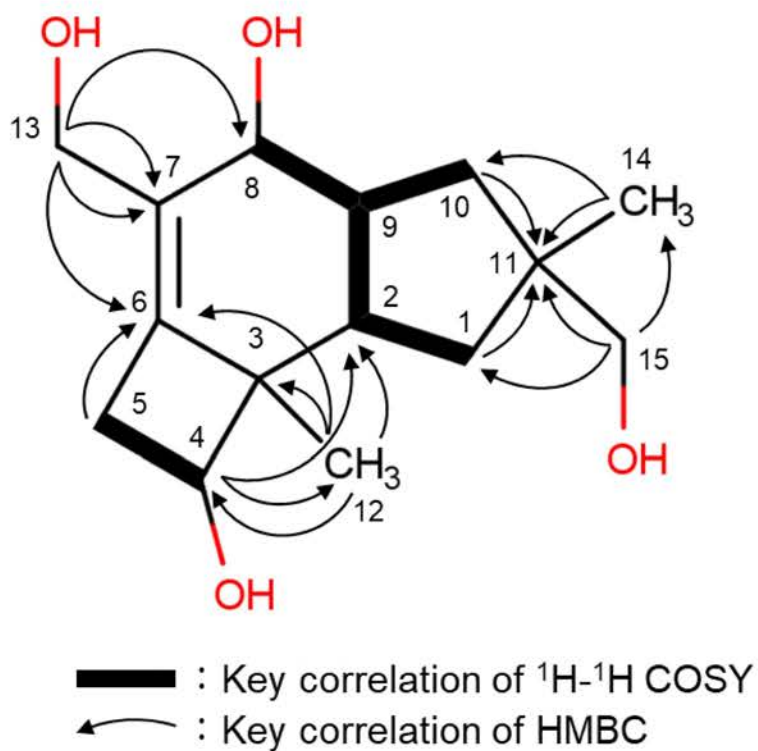


Fig. 13 化合物 1 (Tsukiyol A) の ^1H - ^1H COSY 及び HMBC による相関

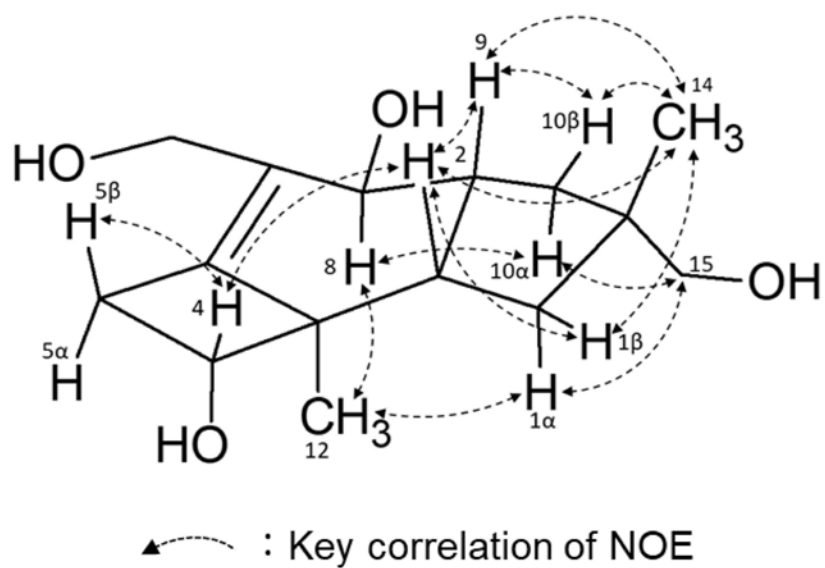


Fig. 14 化合物 1 (Tsukiyol A) の NOE 相関

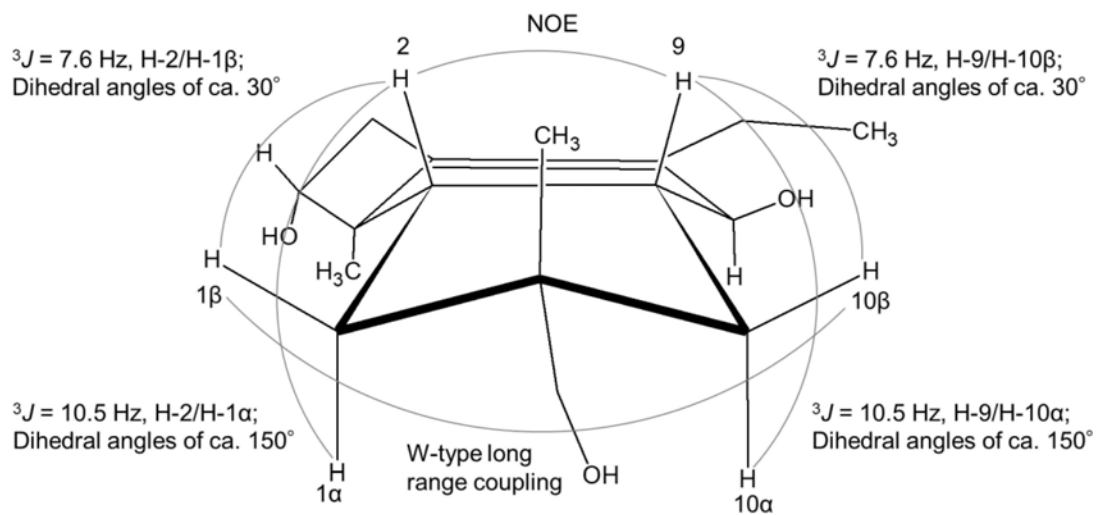


Fig. 15 化合物 1 (Tsukiyol A) の五員環部分の配座について

1-3-1-2 化合物 2 (Tsukiyol B)

化合物 2 も無色固形物として得られた。高分解能 FAB-MS より m/z 291.1569 に Na 付加イオン $[M+Na]^+$ が観測されたことから、分子式は化合物 1 と同じ $C_{15}H_{24}O_4$ であることが示唆された。各種 NMR スペクトルは tsukiyol A と非常に類似していた (Fig. S9~S13)。しかし NOE 差スペクトルにおいて、H-14 と H-2、H-9、H-10 β 、H-1 β 、H-15 と H-1 α 、H-10 α 、H-11 α の間に NOE が観測された。これは tsukiyol A の NOE 相関と比較して、化合物 2 は 11 位の四級炭素に結合した methyl 基と hydroxy methylene 基の位置関係が逆であることを示唆している。したがって本化合物は、tsukiyol A の 11 位炭素の立体が異なる新規な epimer であることが示唆された (Fig. 16)。

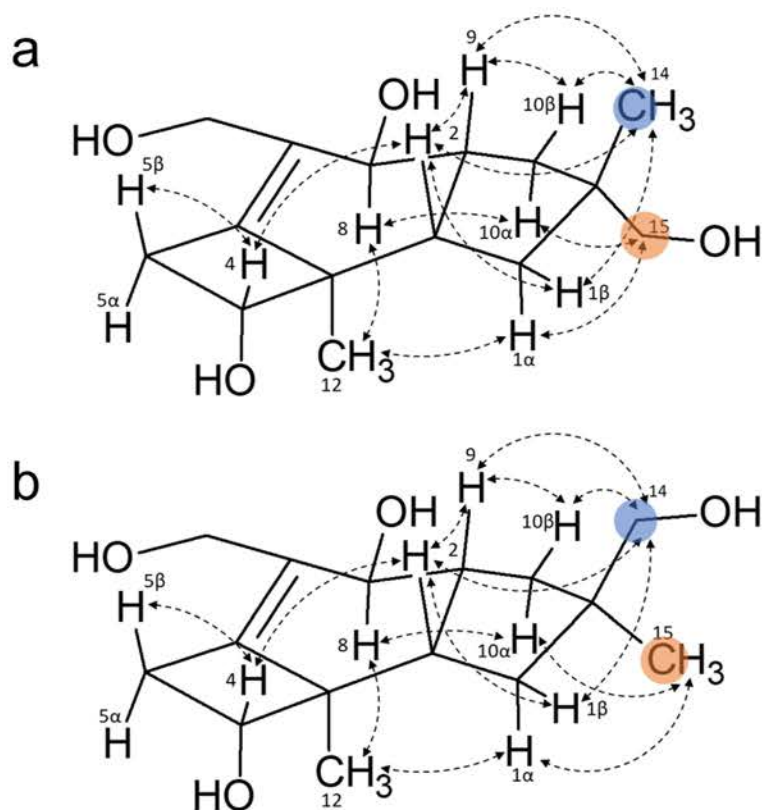


Fig. 16 化合物 1、2 (Tsukiyol A、B) の NOE 相関 (a: tsukiyol A、b: tsukiyol B)

1-3-1-3 化合物 3 (Tsukiyol C)

化合物 3 は無色の固形物として得られた。高分解能 FAB-MS より分子量を測定したところ、 m/z 293.1718 にイオンが観測された。これは $C_{15}H_{26}O_5$ の Na 付加イオン $[M+Na]^+$ の精密質量 293.1729 と極めて近い値であったことから、本化合物の分子式は $C_{15}H_{26}O_5$ であることが示唆された。また、得られた分子式の炭素数より本化合物は sesquiterpene である可能性が考えられた。

続いて構造決定のため NMR スペクトルを測定した。NMR スペクトルデータは補足資料に示した (Fig. S14~S18)。

1H NMR スペクトルにおいて δ_H 1.07、1.66、2.18 に 3 つの methyl 基が観測されたほか、 δ_H 3.63、3.75、4.37、4.98 に非等価な 2 つの hydroxy methylene、 δ_H 4.23、4.98 に hydroxy methine、 δ_H 2.61 に methine のほか、6 つの非等価な methylene に由来するプロトンが観測された。

^{13}C NMR では 15 個の炭素が観測され、MS より示唆された分子式の炭素数と一致した。このうち δ_C 132.2、148.1 に一つの二重結合に由来する sp^2 四級炭素、 δ_C 41.8、44.7 に sp^3 四級炭素が確認された。

続いて二次元 NMR の解析結果について述べる。主要な相関については Fig. 17 に示した。 1H - 1H COSY では H-4 と H-5 のほか、H-8 と H-7、H-11、H-10 に相関がみられた。HMQC により各プロトンと炭素のピークの結合を帰属し、HMBC による相関を調べたところ、hydroxy methylene の H-15 と methyl の H-14 が C-9、C-8、C-10 と相関を有していた。また H-11、H-7、H-8 は C-6 と、methyl H-13 は C-5、C-6、C-3 と、H-5 は C-3 と、methyl H-12 は C-1、C-2 と、hydroxy methylene H-1 は C-2、C-3 と相関を有していた。以上より化合物 3 の平面構造を決定し、fomannosane sesquiterpene であることが示唆された。

最後に NOE 差スペクトルによる立体解析について述べる。主要な相関は Fig. 18 に示した通りである。まず、hydroxy methylene H-1 は H-12、H-13、H-7、H-8 α 間に、H-8 α は H-1、H-15、H-7 間に NOE が見られた。更に hydroxy methylene H-15 は H-10 α と、H-7 は H-8 α と、hydroxy methylene H-1 は methyl H-13 と、methyl H-13 は H-5 α と、H-5 β は H-4、H-11、H-8 β と、H-8 β は H-5 β 、H-10 β 、H-14 と、H-10 β は H-8 β 、H-11、H-14 との間に NOE が観測された。以上より本化合物の立体構造を決定した。尚、得られた立体構造は類縁体でツキヨタケ近縁種 *O. olearius* より単離の報告がある illudosin (Fig. 19) のものとも一致する⁴⁷。

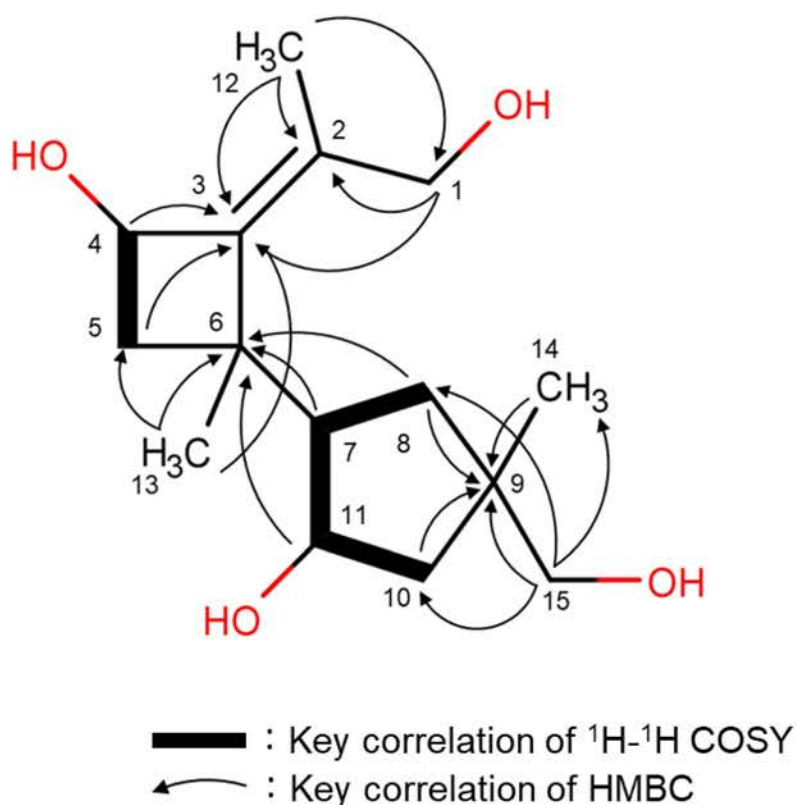


Fig. 17 化合物 3 (Tsukiyol C) の ^1H - ^1H COSY 及び HMBC による相関

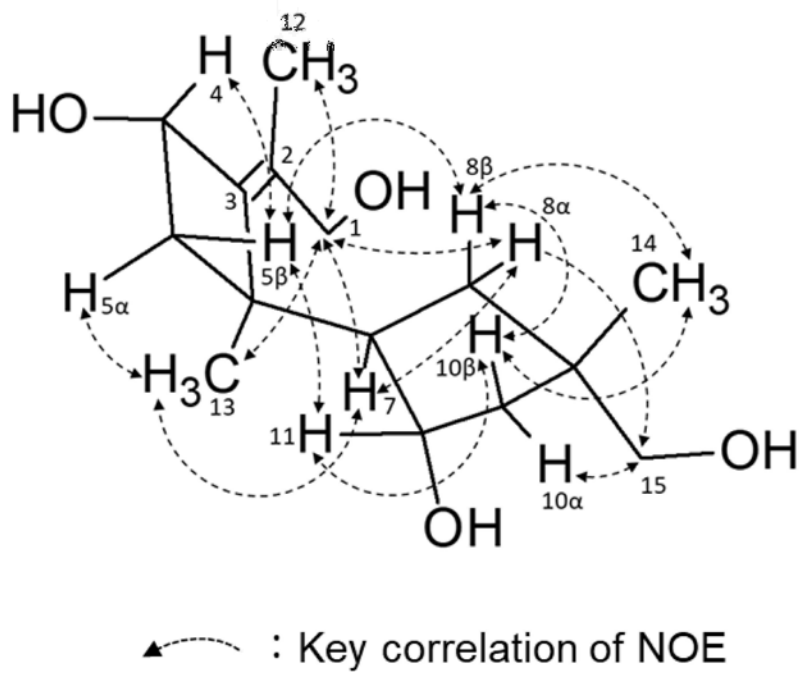


Fig. 18 化合物 3 (Tsukiyol C) の NOE 相関

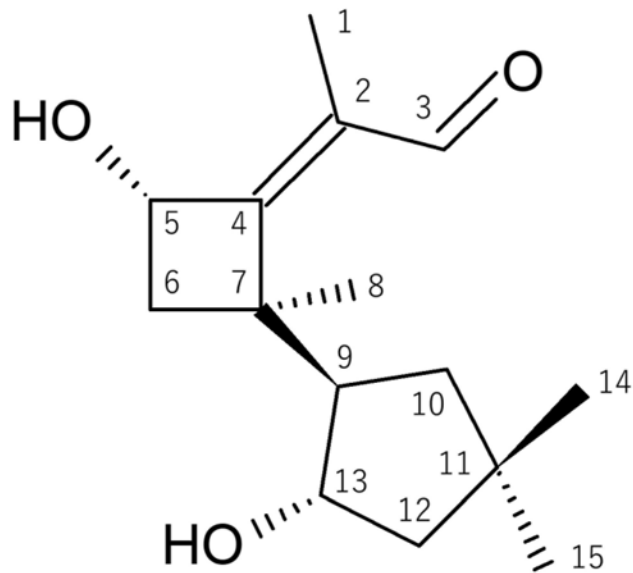


Fig. 19 化合物 3 (Tsukiyol C) と類縁な構造を有する illudosin の構造 ⁴⁷

1-3-1-4 化合物 4 (Neoilludin C)

化合物 4 は無色の固形物として得られた。高分解能 FAB-MS より分子量を測定したところ、 m/z 321.1311 にイオンが観測された。この値は $C_{15}H_{22}O_6$ の Na 付加イオン $[M+Na]^+$ の精密質量 321.1314 と極めて近い値を示したことから本化合物の分子式は $C_{15}H_{22}O_6$ であると示唆された。また、得られた分子式より、本化合物の炭素数が 15 であることから sesquiterpene である可能性が考えられた。

本化合物の NMR スペクトルは補足資料 (Fig. S19~S23) に示した。またピークリストは Table 1 に示した通りである。

1H NMR では、methyl 基水素に由来する δ_H 0.88、1.34、1.55、cyclopropane 環の methylene 水素に由来する δ_H 0.38、0.53、0.63、0.68、hydroxy methylene 水素に由来する δ_H 3.22、hydroxy methine に由来する δ_H 4.49、4.50 が観察された。

^{13}C NMR では 15 個の炭素が観測され、MS より示唆された分子式の炭素数と一致した。このうち δ_C 202.2、167.4、136.6 に α, β -不飽和 carbonyl 由来の炭素が観測されたほか、 δ_C 77.0、71.1、53.3、38.8、に sp^3 四級炭素が見られた。

続いて二次元 NMR の解析結果について述べる。主要な相関については Fig. 20 に示した。 1H - 1H COSY では、cyclopropane 環の H-11 と H-12 の部分にのみ相関がみられた。HMQC により各プロトンと炭素のピークの結合を帰属し HMBC による相関を調べたところ、cyclopropane 由来の H-11 と H-12 は共通して sp^3 四級炭素 C-2、C-3、C-4 と相関を有しており、いずれも同じ四級炭素 C-3 に結合していることが示唆された。従って本化合物は spiro cyclopropane 環構造を有していることが示唆された。更に H-10 は C-3、C-2、C-1 と、H-13 は C-3、C-4、C-5 と、H-6 は C-5、C-9、C-8、C-7 と、H-8 は C-9、C-1、C-7 と、H-15 は C-6、C-7、C-8 と相関を有していた。これらの結果から、示唆された平面構造は既知化合

物でツキヨタケから単離された neoilludin A、B と一致した^{44,45}。一方、NMR スペクトルが neoilludin A、B いずれの文献値とも一致しないことから本化合物は neoilludins A、B の立体異性体であると推定し、NOE 差スペクトルによる立体解析を行った。neoilludin A、B では H-13 と H-11 β 、H-12 β 、H-6 との間に NOE が観測されたのに対し、本化合物では H-13 と H-10、H-11 β の間に NOE が観測された (Fig. 21)。それ以外は neoilludin B の NOE 相関と良い一致を示していたことから、本化合物は neoilludin B の新規な epimer であることが示唆された (Fig. 22)。本化合物も修士論文にて最初に単離を報告した新規化合物である⁶⁰。

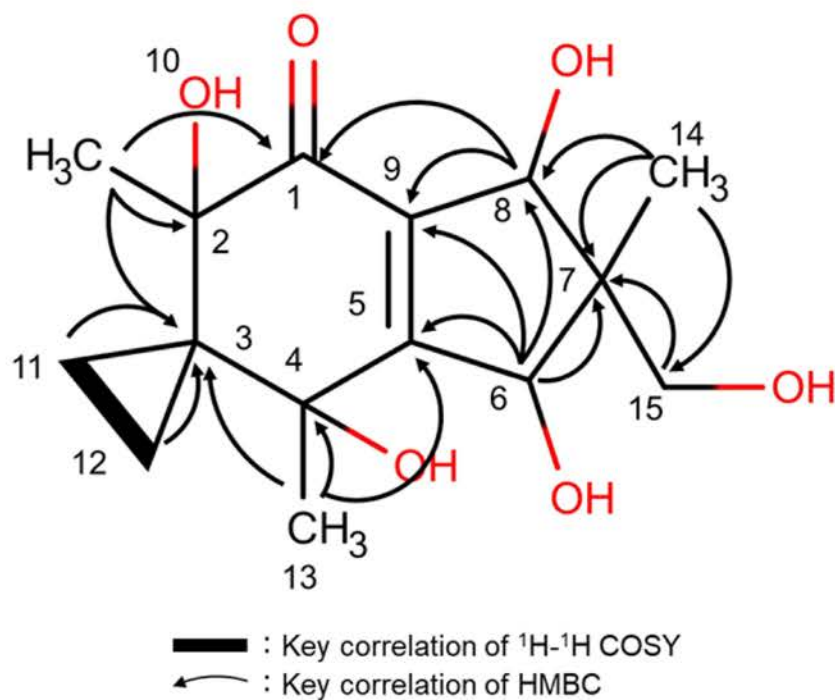


Fig. 20 化合物 4 (Neoilludin C) の ^1H - ^1H COSY 及び HMBC による相関

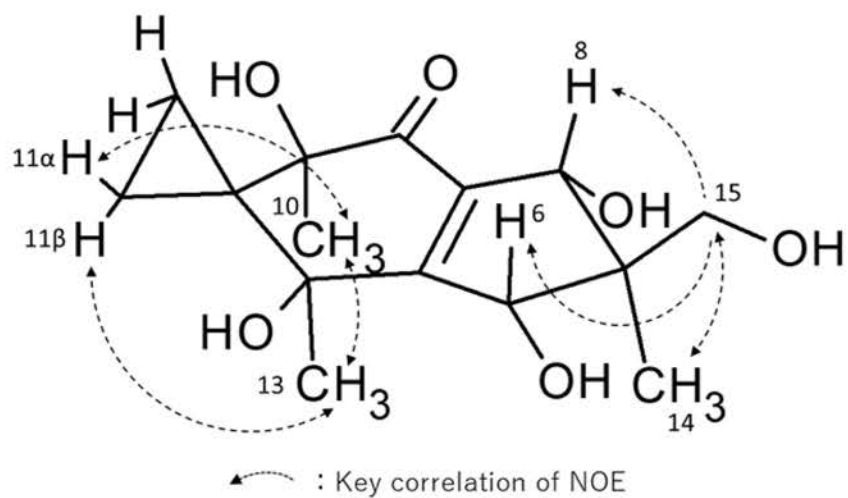


Fig. 21 化合物 (Neoilludi C) 4 の NOE 相関

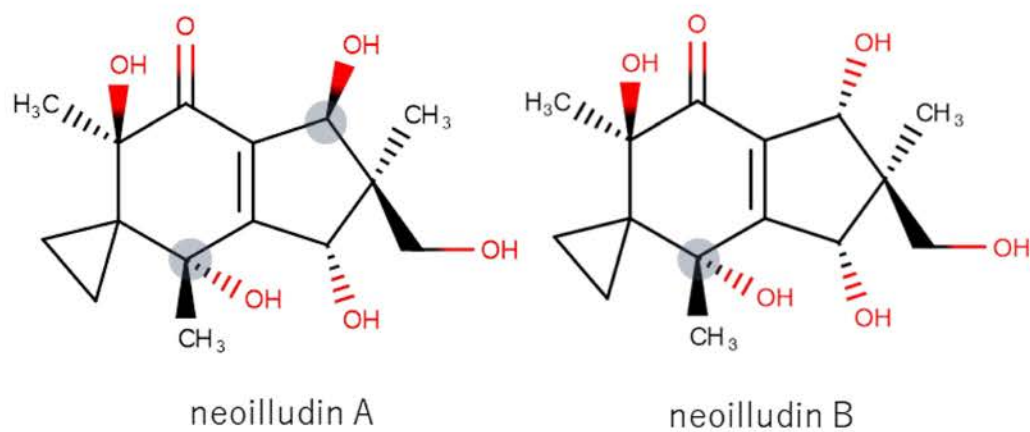


Fig. 22 Neoilludins A,B の立体構造

Table 1 化合物 4~6 のピークリスト (^1H : 600 MHz、 ^{13}C : 150 MHz、 CD_3OD)

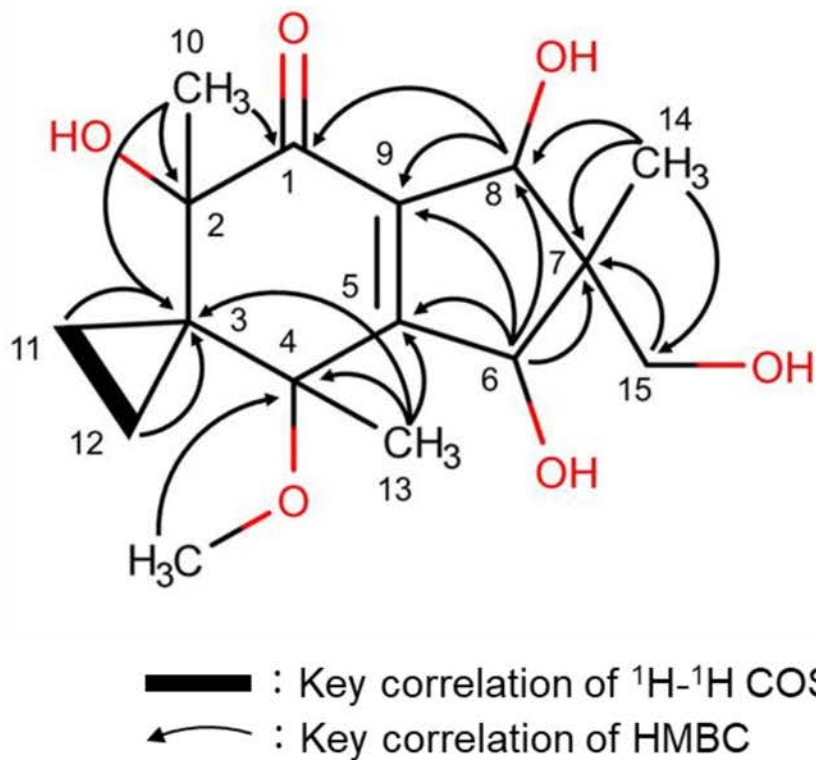
4		5		6		
C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		202.2		203		203.4
2		77		76.3		77.8
3		38.8		30.3		31.2
4		71.1		77.8		76.7
5		167.4		165.5		162.4
6	4.49 (1H, s)	75	4.47 (1H, s)	78.7	4.52 (1H, d, $J = 0.95$)	77.5
7		53.3		52.4		54.9
8	4.50 (1H, s)	77.6	4.94 (1H, s)	79.3	4.56 (1H, d, $J = 0.95$)	74.4
9		136.6		136.2		136.8
10	1.34 (3H, s)	26.9	1.58 (3H, s)	27	1.55 (3H, s)	26.5
11 α	0.63 (1H, ddd, $J = 9.9$, 5.9, 4.3 Hz)	4.3	0.25 (1H, ddd, $J = 9.9$, 5.7, 4.6 Hz)	4.8	0.07 (1H, ddd, $J = 9.6$, 5.6, 4.6 Hz)	4.5
11 β	0.68 (1H, ddd, $J = 9.9$, 5.9, 4.3 Hz)		0.66 (1H, ddd, $J = 9.9$, 5.7, 4.6 Hz)		0.49 (1H, ddd, $J = 9.6$, 5.6, 4.6 Hz)	
12 α	0.53 (1H, ddd, $J = 9.9$, 5.9, 3.8 Hz)	6.5	0.94 (1H, m)	6.0	0.85 (1H, m)	6.2
12 β	0.38 (1H, ddd, $J = 9.9$, 5.9, 3.8 Hz)		0.98 (1H, ddd, $J = 9.9$, 5.7, 5.9 Hz)		0.87 (1H, ddd, $J = 9.6$, 5.7, 4.9 Hz)	
13	1.55 (3H, s)	26.6	1.36 (3H, s)	16.9	1.21 (3H, s)	17.5
14	0.88 (3H, s)	12.9	0.94 (3H, s)	17.2	0.82 (3H, s)	12.6
15	3.22 (2H, s)	67.7	3.63 (1H, d, $J = 11.1$ Hz) 3.79 (1H, d, $J = 11.1$ Hz)	66.1	3.29 (2H, s)	67.1
OMe			3.35 (3H, s)	50.7	3.27 (3H, s)	50.9

1-3-1-5 化合物 5 (4-*O*-Methylneoilludin A)

化合物 5 は無色油状物質として得られた。高分解能 FAB-MS より分子量を測定したところ、 m/z 335.1469 にイオンが観測された。この値は $C_{16}H_{24}O_6$ の Na 付加イオン $[M+Na]^+$ の精密質量 335.1470 と極めて近いことから本化合物の分子式は $C_{16}H_{24}O_6$ であると示唆された。

1H 、 ^{13}C NMR スペクトルは補足資料に示した (Fig. S24~S28)。NMR スペクトルより得られた水素及び炭素の化学シフト値は neoilludin A のものと類似していた (Table 1) 一方、本化合物では δ_H 3.35 並びに δ_C 50.7 に neoilludin A には存在しない methoxy 基の存在が観測された^{44,45}。スペクトルデータは Table 1 に示した通りである。二次元 NMR 相関の結果は他の neoilludins A-C と比較して、C-4 と methoxy 基に相関があることを除き良い一致を示していた (Fig. 23, Fig. 24)。

NOE 差スペクトルにより本化合物は、H-13/H-11 β 、H-12 β 、H-6、*O*-methyl 間、H-6/H-15H 間、H-14/H-8、*O*-methyl 間、H-10/H-11 α 、*O*-methyl 間に NOE が観測され、各プロトンの相関関係が概ね文献上の neoilludin A のものと良い一致を示し、尚且つ *O*-methyl 基との間に観測された NOE も立体配座が neoilludin A と同様であること支持している (Fig. 25)^{44,45}。従って本化合物は、neoilludin A の 4 位水酸基が methoxy 基となった新規類縁体であることが明らかとなった。



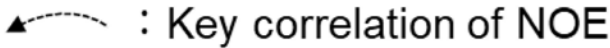


Fig. 25 化合物 5 (4-*O*-Methylneoilludin A) の NOE 相関

1-3-1-6 化合物 6 (4-*O*-Methylneoilludin B)

化合物 6 は無色油状物質として得られた。高分解能 FAB-MS より分子量を測定したところ、 m/z 335.1475 にイオンが観測された。この値は $C_{16}H_{24}O_6$ の Na 付加イオン $[M+Na]^+$ の精密質量 335.1470 と極めて近い値を示したことから本化合物の分子式は化合物 5 と同じ $C_{16}H_{24}O_6$ であると示唆された。

1H 、 ^{13}C NMR スペクトルは、neoilludin B のものと類似していた (Table 1、Fig. S29～S34) 一方、本化合物でも化合物 5 と同様に、 δ_H 3.27 並びに δ_C 50.9 に methoxy 基の存在が観測された。これは neoilludin B には存在しない部分構造である。二次元 NMR 相関の結果は他の neoilludin 類と比較して、C-4 に結合している水酸基が methoxy 基となっていることを除いて、良い一致を示していた (Fig. 26)^{44,45}。NOE 差スペクトルにより本化合物の相対立体配置は、neoilludin B と同様であることを示唆する H-13/H-11 β 、H-12 β 、H-6、*O*-methyl 間、H-10/H-11 α 、*O*-methyl 間に NOE が観察された (Fig. 27)。従って本化合物は、neoilludin B の 4 位水酸基が methoxy 基となった新規類縁体であると決定した。本化合物も、修士論文において初めて単離を報告した化合物である。一方修士論文では、methoxy 基のピークが残留した MeOH のピークに近い化学シフト値を示したため、化合物由来のピークではないとして、他の neoilludin 類と全く同じ平面構造を有した新規な立体異性体ではないかと誤同定したが、本論文において訂正する⁶⁰。

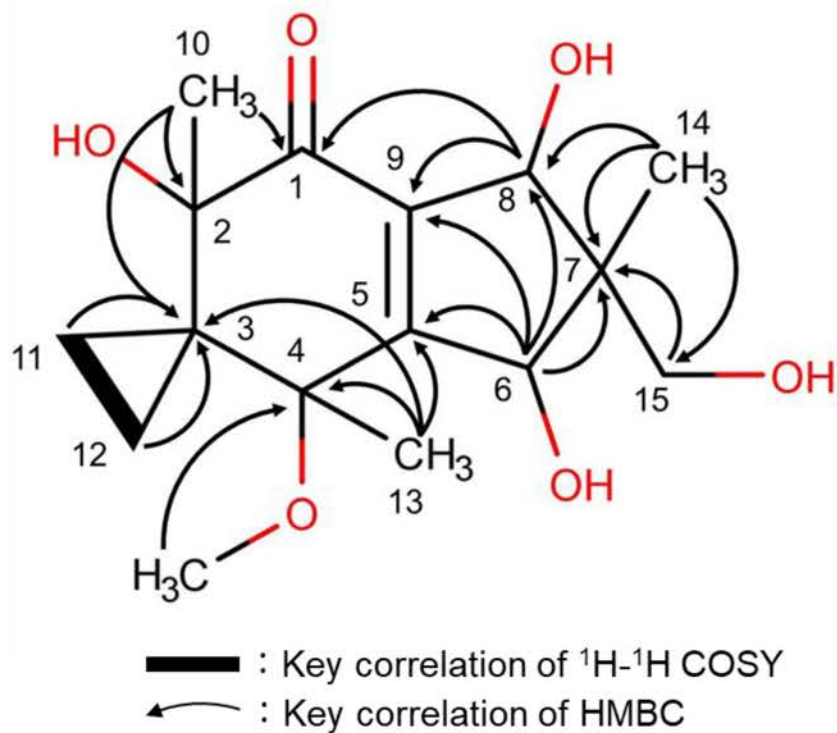


Fig. 26 化合物 6 (4-*O*-Methylneoilludin B) の ^1H - ^1H COSY 及び HMBC による相関

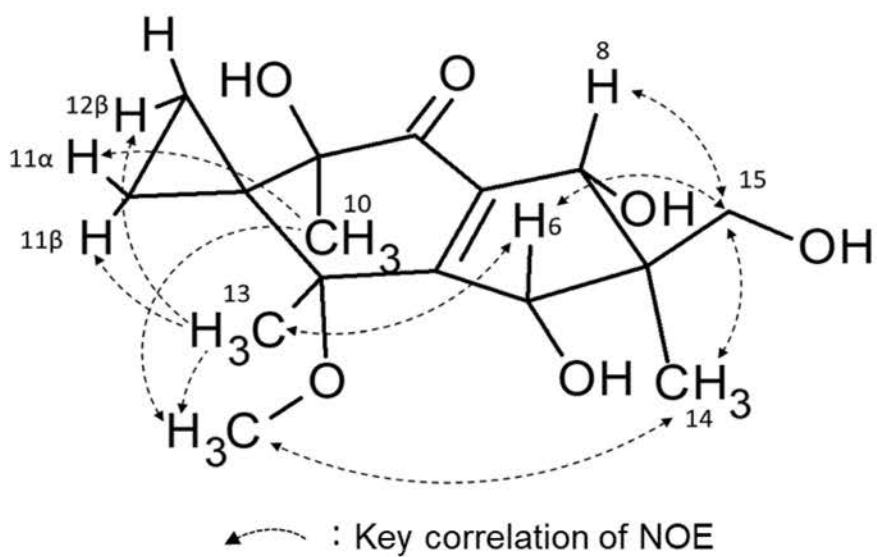


Fig. 27 化合物 6 (4-*O*-Methylneoilludin B) の NOE 相関

1-3-1-7 化合物 1~6 のスペクトルデータ

Tsukiyol A (化合物 1)

Colorless solid material, $[\alpha]_{20}^D = +0.7^\circ$ (c 0.1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3363 (hydroxy group); FAB-MS m/z : 291 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-FAB-MS m/z : 291.1577 (Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Na}$: 291.1572); ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ_{H} : 0.88 (3H, s, H-14), 0.90 (3H, s, H-12), 1.20 (1H, dd, $J = 12.7$ Hz, 9.7 Hz, H-10 α), 1.26 (1H, ddd, $J = 12.7$ Hz, 7.6 Hz, 1.6 Hz, H-1 β), 1.40 (1H, dd, $J = 12.7$ Hz, 10.5 Hz, H-1 α), 1.59 (1H, ddd, $J = 12.7$ Hz, 7.6 Hz, 1.6 Hz, H-10 β), 2.12 (1H, m, H-9), 2.22 (1H, ddd, $J = 7.6$ Hz, 8.8 Hz, 10.5 Hz, H-2), 2.56 (1H, m, H-5 α), 2.95 (1H, ddd, $J = 14.7$ Hz, 7.4 Hz, 1.4 Hz, H-5 β), 3.29 (2H, s, H-15), 3.75 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4), 3.93 (1H, brdd, $J = 9.2$ Hz, 1.6 Hz, H-8), 4.02 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-13), 4.10 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-13); ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ_{C} : 14.8 (CH_3 , C-12), 23.6 (CH_3 , C-14), 37.5 (CH_2 , C-5), 37.8 (CH_2 , C-1), 42.9 (CH_2 , C-10), 46.48 (CH , C-2), 46.52 (C , C-11), 51.1 (CH , C-9), 53.1 (C , C-3), 59.7 (CH_2 , C-13), 72.7 (CH_2 , C-15), 75.1 (CH , C-8), 76.9 (CH , C-4), 134.0 (C , C-7), 139.2 (C , C-6).

Tsukiyol B (化合物 2)

Colorless solid material, $[\alpha]_{20}^D = -13.85^\circ$ (c 0.1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3363 (hydroxy group), FAB-MS m/z : 291 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-FAB-MS m/z : 291.1569 (Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Na}$: 291.1572); ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 600 MHz) δ_{H} : 1.20 (3H, s, H-15), 1.24 (3H, s, H-12), 1.41 (1H, dd, $J = 12.8$ Hz, 9.8 Hz, H-1 α), 1.41 (1H, dd, $J = 12.8$ Hz, 9.8 Hz,

H-10 α), 1.81 (1H, dd, $J = 12.8$ Hz, 7.6 Hz, H-1 β), 2.39 (1H, dd, $J = 12.8$ Hz, 7.6 Hz, H-10 β), 2.41 (1H, ddd, $J = 7.6$ Hz, 8.8 Hz, 9.8 Hz, H-2), 2.57 (1H, m, H-9), 2.88 (1H, m, H-5 α), 3.17 (1H, dd, $J = 14.4$ Hz, 7.2 Hz, H-5 β), 3.55 (2H, d, $J = 1.6$ Hz, H-14), 4.09 (1H, brdd, $J = 7.2$ Hz, 7.8 Hz, H-4), 4.49 (1H, br, H-8), 4.61 (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H-13), 4.67 (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H-13) ; ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 150 MHz) δ_{C} : 14.9 (CH_3 , C-12), 25.8 (CH_3 , C-15), 37.6 (CH_2 , C-1), 37.7 (CH_2 , C-5), 42.8 (CH_2 , C-10), 45.8 (CH , C-2), 46.3 (C , C-11), 51.2 (CH , C-9), 52.4 (C , C-3), 69.0 (CH_2 , C-13), 70.0 (CH_2 , C-14), 74.7 (CH , C-8), 76.0 (CH , C-4), 134.4 (C , C-7), 137.0 (C , C-6).

Tsukiyol C (化合物 3)

Colorless solid material, $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = +89.45^\circ$ (c 0.1, MeOH); IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3381 (hydroxy group), FAB-MS m/z : 293 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, HR-FAB-MS m/z : 293.1718 (Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{Na}$: 293.1729); ^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N} + 2.5\%$ D_2O , 600 MHz) δ_{H} : 1.07 (3H, s H-14), 1.15 (1H, dd, $J = 13.0$ Hz, 11.1 Hz, H-8 β), 1.66 (3H, s, H-13), 1.85 (1H, dd, $J = 11.7$ Hz, 7.7 Hz, H-10 β), 1.90 (1H, dd, $J = 12.2$ Hz, 5.5 Hz, H-5 α), 2.04 (1H, dd, $J = 11.7$ Hz, 6.2 Hz, H-10 α), 2.16 (3H, s, H-12), 2.18 (1H, dd, $J = 13.0$ Hz, 8.3 Hz, H-8 α), 2.55 (1H, dd, $J = 12.2$ Hz, 8.8 Hz, H-5 β), 2.61 (1H, ddd, $J = 7.7$ Hz, 8.3 Hz, 11.1 Hz, H-7), 3.63 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, H-15), 3.75 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, H-15), 4.23 (1H, brdd, $J = 6.2$ Hz, 7.7 Hz, H-11), 4.37 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-1), 4.41 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-1), 4.98 (1H, brt, H-4); ^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N} + 2.5\%$ D_2O , 150 MHz)

δ_{C} : 16.1 (CH₃, C-12), 26.9 (CH₃, C-14), 28.1 (CH₃, C-13), 39.5 (CH₂, C-8), 40.9 (CH₂, C-5), 41.8 (C, C-9), 44.7 (C, C-6), 48.2 (CH₂, C-10), 55.8 (CH, C-7), 62.7 (CH₂, C-1), 67.6 (CH, C-4), 71.1 (CH₂, C-15), 75.2 (CH, C-11), 132.2 (C, C-2), 148.1 (C, C-3).

Neoilludin C (化合物 4)

Colorless solid material, $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = -16.4^{\circ}$ (c 0.1, MeOH); IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3390 (hydroxy group), 1683 (α , β -unsaturated carbonyl); UV λ_{max} (MeOH): 230 ($\log \epsilon = 2.99$); ECD nm ($\Delta \epsilon$): 253 (-8.39), 217(+5.59); FAB-MS m/z : 321 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$, HR-FAB-MS: m/z : 321.1311 (Calcd for C₁₅H₂₂O₆Na: 321.1314); ¹H NMR and ¹³C NMR data are shown in Table 1.

4-*O*-Methylneoilludin A (化合物 5)

Colorless oily material, $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = -3.2^{\circ}$ (c 0.1, MeOH); IR ν_{max} (NaCl) cm^{-1} : 3435 (hydroxy group), 1683 (α , β -unsaturated carbonyl); UV λ_{max} (MeOH): 242 ($\log \epsilon = 2.95$); ECD nm ($\Delta \epsilon$): 249 (-8.68), 212 (+11.63); FAB-MS m/z : 335 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$, HR-FAB-MS m/z : 335.1469 (Calcd for C₁₆H₂₄O₆Na: 335.1470); ¹H NMR and ¹³C NMR data are shown in Table 1.

4-*O*-Methylneoilludin B (化合物 6)

Colorless oily material, $[\alpha]_{20}^{\text{D}} = -5.15^{\circ}$ (c 0.1, MeOH); IR ν_{max} (NaCl) cm^{-1} : 3398 (hydroxy group), 1682 (α , β -unsaturated

carbonyl); UV λ_{max} (MeOH): 242.5(log ϵ = 2.95); ECD nm ($\Delta\epsilon$): 246 (-6.04), 211(+5.82); FAB-MS m/z : 335 [M+Na]⁺, HR-FAB-MS m/z : 335.1475(Calcd for C₁₆H₂₄O₆Na: 335.1470); ¹H NMR and ¹³C NMR data are shown in Table 1.

1-3-1-8 化合物 7～12 の同定

その他得られた化合物に関しては、文献値との比較から化合物 7 は neoilludin A、化合物 8 は neoilludin B、化合物 9 は illudin S、化合物 10 は 5-hydroxydichomitol、化合物 11 は 3β , 5α , 9α -trihydroxyergosta-7, 22-diene-6-one、化合物 12 は ergosterolperoxide と同定した^{44,45,60-64}。

1-3-1-9 化合物 4～8 の ECD による絶対立体構造決定

化合物 4～8 についてはいずれも共通した構造を有していたことから、ECD による絶対立体配置の決定を試みた。得られた ECD スペクトルのうち、化合物 7 (neoilludin A) のものを Fig. 28 に示した。いずれの化合物も 220 nm 付近に正の、250 nm 付近に負の Cotton 効果が観測された (Table 2)。TDDFT 法により計算した理論 ECD スペクトルと比較したところ、Fig. 29 に示した 化合物 4 の $2R$, $4S$, $6S$, $7S$, $8R$ の配座が実測した ECD と良い一致を示した。従って他の neoilludin 類縁体も同様の配座を有しているものと考えられ、各化合物の絶対立体配置は、化合物 5 が $2R$, $4R$, $6S$, $7S$, $8R$ 、化合物 6 が $2R$, $4S$, $6S$, $7S$, $8S$ 、化合物 7 が $2R$, $4S$, $6S$, $7S$, $8S$ 、化合物 8 が $2R$, $4S$, $6S$, $7S$, $8R$ であると示唆された。

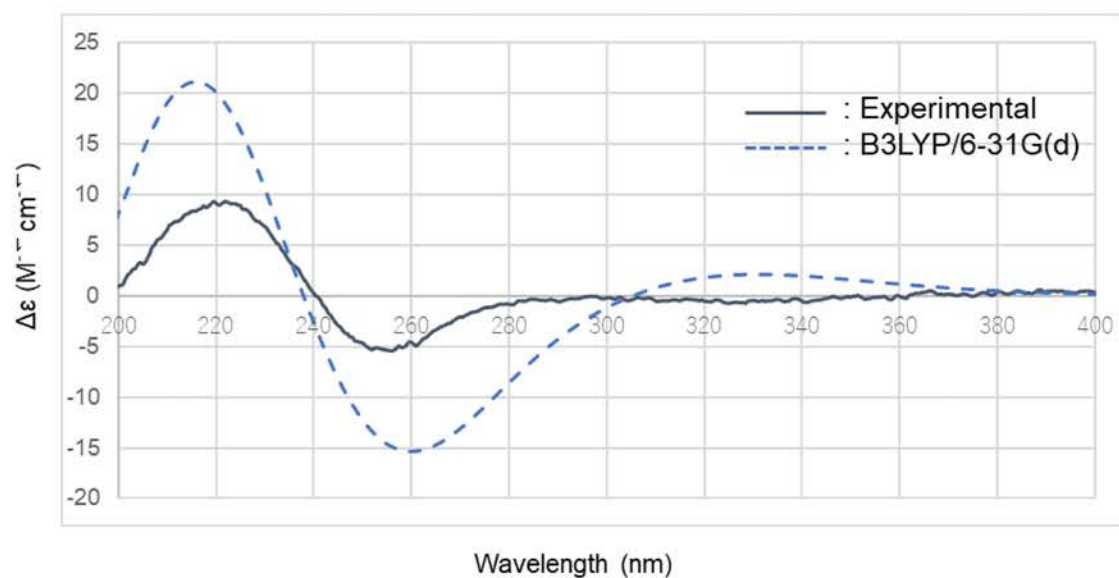


Fig. 28 neoilludin A の ECD スペクトル。 実線は測定した ECD、破線は理論 ECD を示す。前者は MeOH で 300 nM の濃度に調整して測定した。

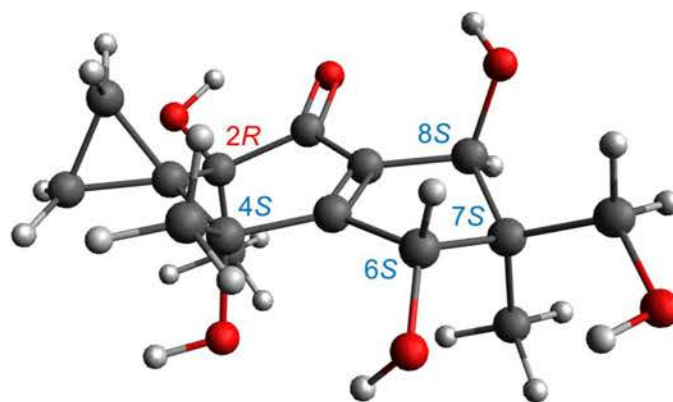


Fig. 29 Neoilludin A の立体配座 ($2R, 4S, 6S, 7S, 8R$)

Table 2 化合物 4~8 の実測 ECD

	4	5	6	7	8
$\Delta\epsilon$	-8.39 (253 nm)	-8.68 (249 nm)	-6.04 (246 nm)	-5.43 (253 nm)	-1.69 (255.5 nm)
	+5.59 (217 nm)	+11.63 (212 nm)	+5.82 (211 nm)	+9.29 (222 nm)	+3.90 (224.5 nm)

1-3-2 生理活性

1-3-2-1 HL60 細胞に対する細胞毒性試験の結果

各化合物について生理活性を調べたところ、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対して化合物 9 及び化合物 11 が、それぞれ $IC_{50} = 3.3 \text{ nM}$ 、 $4.1 \text{ } \mu\text{M}$ で細胞毒性を示した (Table. 3)。特に化合物 9 は、他の類縁体とも比較して強い活性を有していた。

Table 3 各化合物の HL60 に対する細胞毒性。Control と比較した際の半数阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。

化合物	IC_{50}
CPT	54.2 nM
1	>10 μM
2	>10 μM
3	>10 μM
4	>10 μM
5	>10 μM
6	>10 μM
7	>10 μM
8	>10 μM
9	3.3 nM
10	>10 μM
11	4.1 μM
12	>10 μM

1-3-2-2 変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性試験の結果

変異酵母 YNS17 株を用いた生育回復活性系において、化合物 3 及び 5、6、9 が、それぞれ 1.25、2.5、0.625、1.25 $\mu\text{g/spot}$ で弱い活性を示した (Fig. 30)。

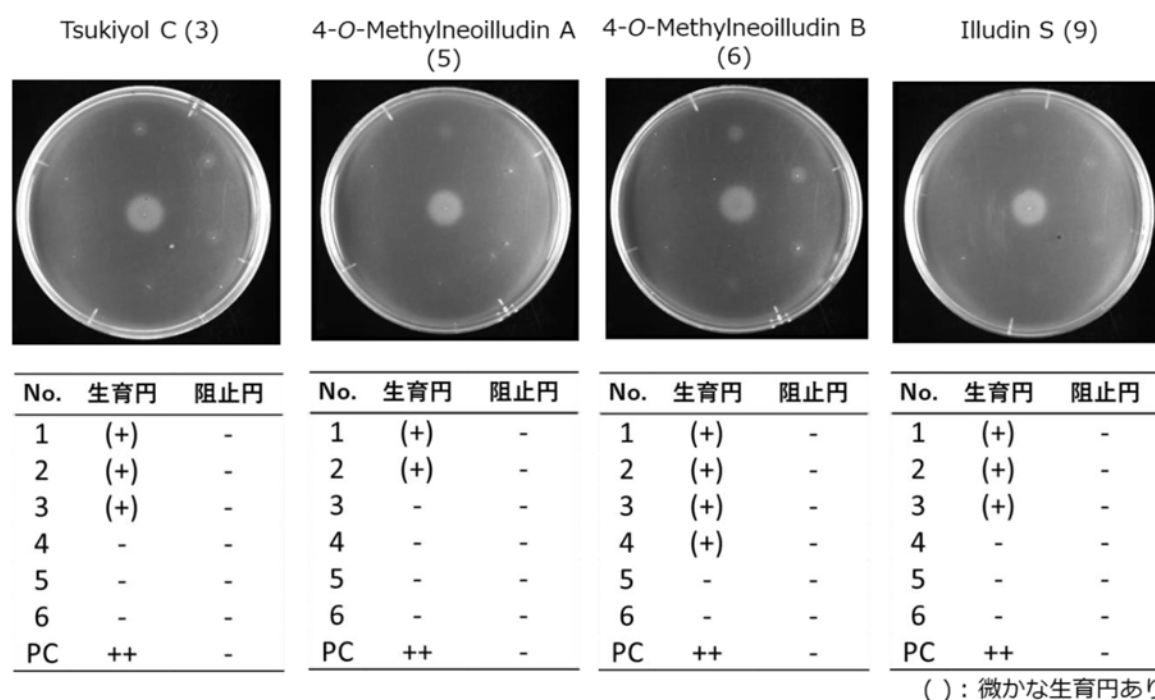


Fig. 30 変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性試験の結果。YNS17 株と培地をまいたシャーレに各化合物の MeOH 溶液をスポットした。濃度は 1 を 5 µg/spot とし、2~6 まで 1/2 希釈してそれぞれスポットした。中央には positive control (PC) として 2.5 ng/spot に調整した FK506 をスポットした。

1-4 考察

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-hydroxydichomitol (化合物 10)、 3β , 5α , 9α -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-hydroxydichomitol および 3β , 5α , 9α -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。

今回単離した protoilludane sesquiterpene の tsukiyol A、B、5-hydroxydichomitol 及び illudane sesquiterpene の neoilludin C、4-*O*-methylneoilludin A、B、fomannosane sesquiterpene の tsukiyol C は、いずれも illudoid sesquiterpene と総称されており、farnesyl diphosphate の環化で humulyl cation を経て生じた protoilludyl cation から派生したものである (Fig. 31)^{70,71}。実際本属からこれまで報告された sesquiterpene 類の殆どが illudoid sesquiterpene である。以上の結果より *O. japonicus* は近縁種同様、多様な sesquiterpene を産生していることが示唆された。一方、neoilludin A、B の 4 位水酸基が methoxy 基となった新規化合物 4-*O*-methylneoilludin A、B については単離精製の過程において neoilludin が MeOH などの溶媒と反応して生じた可能性が否定できないことから、実際に子実体内で生合成されたものなのか否かについては検討の余地がある。

生理活性においては illudin S が HL60細胞に対して強い細胞毒性を示した。一方 illudin S 以外の illudane sesquiterpene では、 $10\mu\text{M}$ の濃度までは細胞毒性が見られなかった。これは今回単離した 6 種の illudane sesquiterpene の

うち、illudin S のみが反応性の高い α, β -不飽和 carbonyl の β 位 proton を有しており、生体内分子と Michael 付加反応を引き起こすことで細胞毒性が生じたのではないかと考えられる (Fig. 32)^{42,72}。実際、先行研究において illudin S の α, β -不飽和 carbonyl の β 位 proton が含硫アミノ酸と酸性条件下で Michael 付加反応を引き起こすことが報告されており、*O. olearius* が産生する類縁体の illudin M、や illudin S の半合成アナログ体の irofulven も同様の作用機構を有しているとされている⁷²。一方、先行研究において、neoilludin A、B が細胞毒性を有するという、本研究と異なる結果が報告されている⁴⁴。今回 neoilludin A、B に細胞毒性が確認できなかった理由の一つとして、試験に用いた細胞株の違いが挙げられる。本研究ではヒト前骨髄性急性白血病 HL60 細胞を試験に用いたのに対し、先行研究ではマウス白血病 P388 細胞が用いられており、それぞれの細胞株によって neoilludin 類に対する感受性に差があったのではないかと考えられる。

Tsukiyol C、4-*O*-methylneoilludins A、B、illudin S は、弱いながら変異酵母 YNS17 株にに対する生育回復活性を有していた。この試験では酵母の増殖の回復を指標としているため、細胞毒性のみを有する化合物は活性を示さないという特徴がある⁷³。Illudane 及び fomannosane sesquiterpene 類に対して今回のような試験を行った報告は我々の知る限り本研究が初である。従って、これらの化合物が具体的に Ca^{2+} 伝達系のどの部分に対して作用しているのかを解明できれば、illudin 類や fomannosane sesquiterpene の新たな生理活性の発見につながる事が期待される。

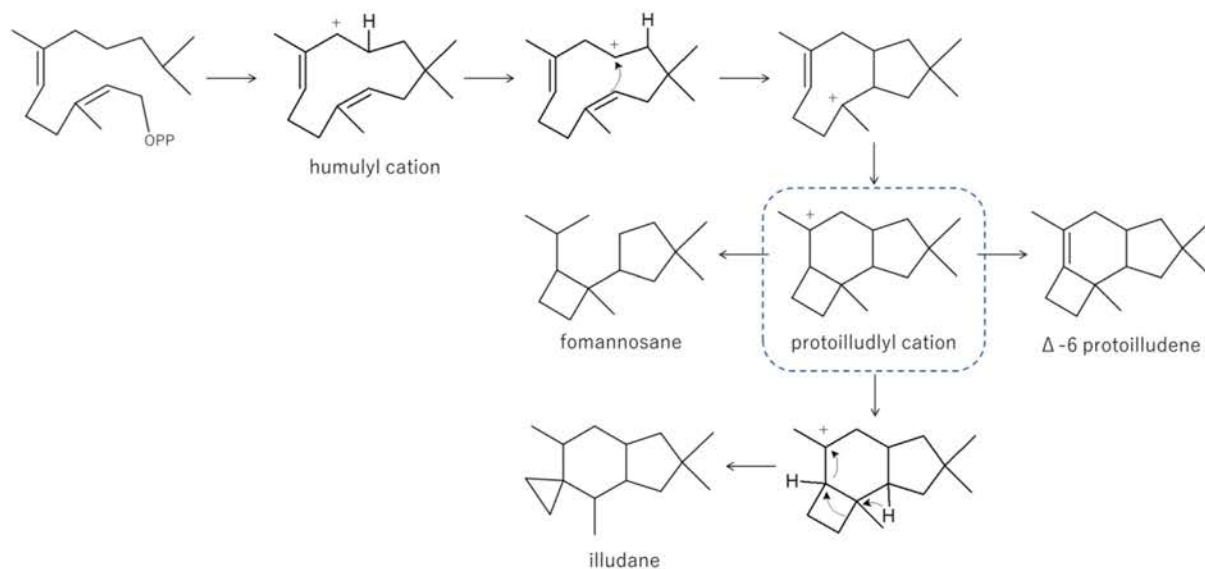


Fig. 31 Illudoid sesquiterpene の生合成経路。Farnesyl diphosphate が環化し、humulyl cation を経て protoilludane 骨格が形成され、更に illudane や fomanosane 骨格へと派生する^{70,71}。

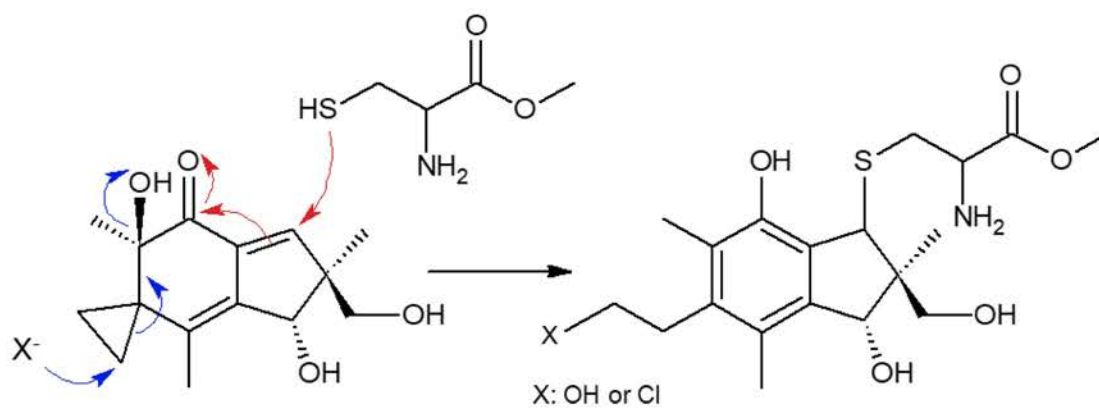


Fig. 32 Illudin S の含硫アミノ酸との反応機構。赤矢印で示した箇所は α , β -不飽和カルボニルの β 位における Michael 付加反応である⁷²。

第 2 章 ツキヨタケ菌糸培養濾液に含まれる成分に関する研究

2-1 緒言

キノコにおいて子実体と菌糸とでは、異なる代謝物が産生することが知られており、例えば食用キノコのヤマブシタケでは、子実体や菌糸の他、胞子からそれぞれ異なる新規な成分が単離されている²³⁻²⁹。

本章では、ツキヨタケより更なる新規化合物の探索を行うため、子実体より分離した菌糸の液体培地培養物より化合物の探索を試みた。

ツキヨタケ属の菌類はこれまで多様な sesquiterpene を生産することで知られてきた。そこで、これまで近縁種の *O. olearius* の新規 sesquiterpene の単離に関する研究において広く用いられてきた MPG 培地を利用して培養を試みた (Fig. 33)。

本章では MPG 培地培養濾液より、新規 illudalane sesquiterpene である tsukiyotakein の他、既知化合物 illudin B、H、M、S、illudalic acid、gastrodigenin の計 7 種の化合物単離し、その構造を決定した。^{37,48,49,74,75} 特に tsukiyotakein と illudalic acid については、これまで子実体からは見られなかった illudalane 骨格を有する sesquiterpene であった。また、illudin B、M は *O. olearius* から、illudin H は *O. nidiformis* から単離が報告されていた化合物であり、これまでツキヨタケからの報告はなかった。ツキヨタケ菌糸液体培地培養濾液からは、子実体では見られなかった化合物が新たに 6 種類単離された。



Fig. 33 ツキヨタケ菌糸 MPG 培地培養物とその濾液

2-2 実験

2-2-1 使用器具

ESI-MS の測定には Waters 製 SYNAPT G2 を用いた。

その他の使用器具に関しては 1 章と同様である、

2-2-2 菌糸の分離と同定

ツキヨタケ菌糸は、2017 年に山形大学演習林より採集したツキヨタケ子実体より分離した菌株 YUOJ0825 を用いた。子実体内部の無菌状態の組織をナイフで切り出し、PDA 平板培地に接菌し 25 °C 暗所下で静置した。このうち菌糸の成長が確認されたものを PDA 斜面培地に移植し、山形大学農学部生物有機化学研究室にて保存・維持した (Fig. 34)。菌糸は形態観察のほか、真菌同定プライマー ITS1R 並びに ITS1F を用いた 18S rRNA と 5.8S rRNA 間のスペーサー領域 (ITS1) のシーケンス解析を BEX (株) に委託して行い、得られた配列が BLAST 検索の結果よりツキヨタケ (LC198705.1) と 100.00% の相同性を示したことから、本菌株はツキヨタケであると同定した。シーケンス解析の詳細なデータは補足資料 (Fig. S 1 ~ S 3) に添付した。

2-2-3 菌糸の培養

保存していた菌糸を PDA 平板培地に接菌し、25 °C 暗所下において 15 日間静置培養した。得られた PDA 培地培養物は 1 辺 2~3 mm 程度の賽の目状に切断し、100 mL の MPG 液体培地 1 本あたりに 3 片接菌した。MPG 培地は、蒸留水 100 mL に対して麦芽エキス 2.0 g、大豆ペプトン 0.4 g、グルコース 3.0 g の比率で調整し、坂口フラスコに入れてシリコ栓を装着後 120 °C、20 分で蒸圧滅菌したも

の 24 本を用いた。接菌した坂口フラスコは 25 °C 暗所下で 3 週間、140 rpm で振盪培養した。



Fig. 34 YUOJ0825 株の PDA 斜面培地培養物 (25 °C 暗所下)。

2-2-4 TLC

第 1 章と同様の手法により行った。

2-2-5 単離と精製

各化合物の単離スキームは Fig. 35 に示した通りである。以下に詳細を述べる。

培養液は吸引ろ過し、培養濾液と菌糸に分離した。このうち前者について分液ロートを用いて EtOAc にて抽出し、減圧濃縮にて EtOAc 画分を 1.3 g 得た。

得られた EtOAc 画分は、silica gel 60 クロマトグラフィーにより粗分画した。内径 4.0 cm のクロマト管に、silica gel 60 と混合溶媒 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 95:5$ のスラリー 200 mL を充填したカラムを用意し、silica gel 60 に吸着させた EtOAc 画分を CHCl_3 (mL) / MeOH (mL) = 190/10、180/20、170/30、160/40、0/200 で順次溶出した。最初に溶出した 300 mL を OME-1 とし、100 mL ごとに OME-2～OME-7、MeOH 回収分を OME-8 として計 8 画分に粗分画した (Fig. 36)。

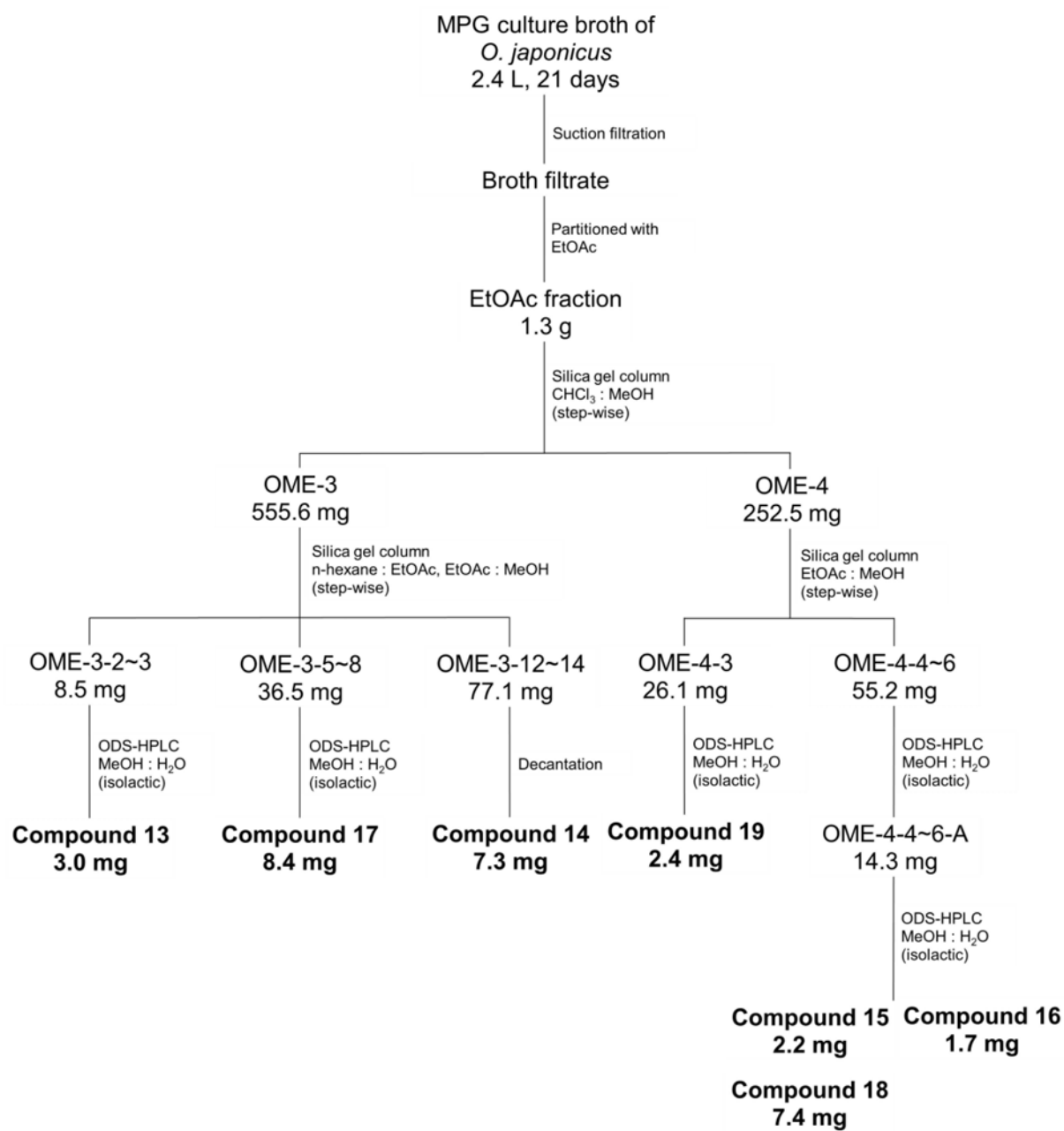


Fig. 35 ツキヨタケ菌糸培養濾液の化合物単離スキーム

このうち、OME-3 画分 (555.6 mg) について更なる分画を進めた。Silica gel 60 と混合溶媒 n-hexane/EtOAc = 3:2 のスラリー 50 mL を充填した直径 2.0 cm のクロマト管で、少量の silica gel 60 に吸着させた OME-3 画分を、混合溶媒 n-hexane (mL) /EtOAc (mL) = 30/20、25/25、20/30、10/40、0/50 の順に溶出した。最初に溶出した 50 mL を OME-3-1 として分取後、試験管に 5 mL 毎 24 画分まで取り OME-3-2~OME-3-24 とした。残りは OME-3-25 として回収した。得られた各画分の TLC の結果は Fig. 37 に示した。このうち OME-3-12~14 (計 77.1 mg) にかけて、EtOAc 中にて白色の沈殿物が析出した。この白色沈殿物は化合物 14 であり、傾斜法により 7.3 mg 単離した。

また OME-3-2、3 画分 (計 8.5 mg) について、ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 70/30、isocratic 4.5 mL/min) により保持時間 17.2 min に検出されたピークを化合物 13 (3.0 mg) として単離したほか、OME-3-5~8 (計 36.3 mg) より保持時間 10.3 min に検出されたピークを化合物 17 (8.4 mg) として単離した。

OME-4 画分 (252.5 mg) についても silica gel 60 による分画を行った。2.0 cm 径のクロマト管に混合溶媒 EtOAc/MeOH = 95/5 と silica gel 60 のスラリー 50 mL を充填したカラムを用意し、EtOAc (mL) /MeOH (mL) = 47.5/2.5、45/5、42.5/7.5、0/50 で溶出した。最初に溶出した 40 mL を OME-4-0 画分として分取後、試験管で 5 mL 毎に OME-4-1~OME-4-16 の計 16 画分まで取り、最後に残った溶出液の回収分として OME-4-17 を得た。このうち OME-4-3 画分 (26.1 mg) より、ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 40/60、isocratic、4.5 mL/min) により保持時間 5.8 min に検出されたピークを化合物 19 (2.4 mg) として単離した。OME-4-4~6 画分 (計 14.4 mg) について、ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 50/50、isocratic、4.5 mL/min) により検出された保持時間 6.5 min のピークを分取し、OME-4-4~6-A 画分 (14.3 mg) 得

た。更に、この画分について ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 23/77、isolactic、4.5 mL/min) を行い、保持時間 24.3、28.5、31.1 min に検出されたピークをそれぞれ化合物 15 (2.2 mg)、化合物 18 (7.4 mg)、化合物 16 (1.7 mg)として単離した。

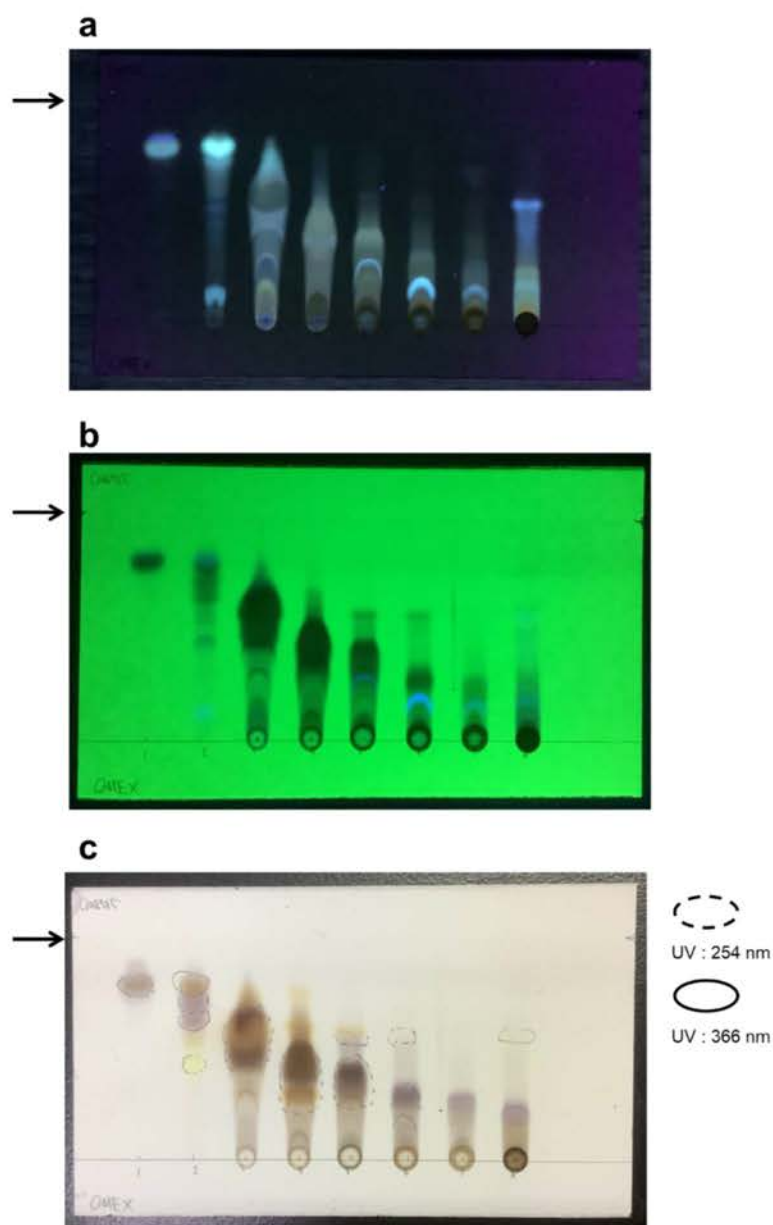


Fig. 36 OME-1~OME8 画分の TLC アッセイ (a : UV 366nm、b : UV 254 nm、c : 10 % vanillin 硫酸呈色)。展開溶媒は CHCl₃/MeOH = 85/15。

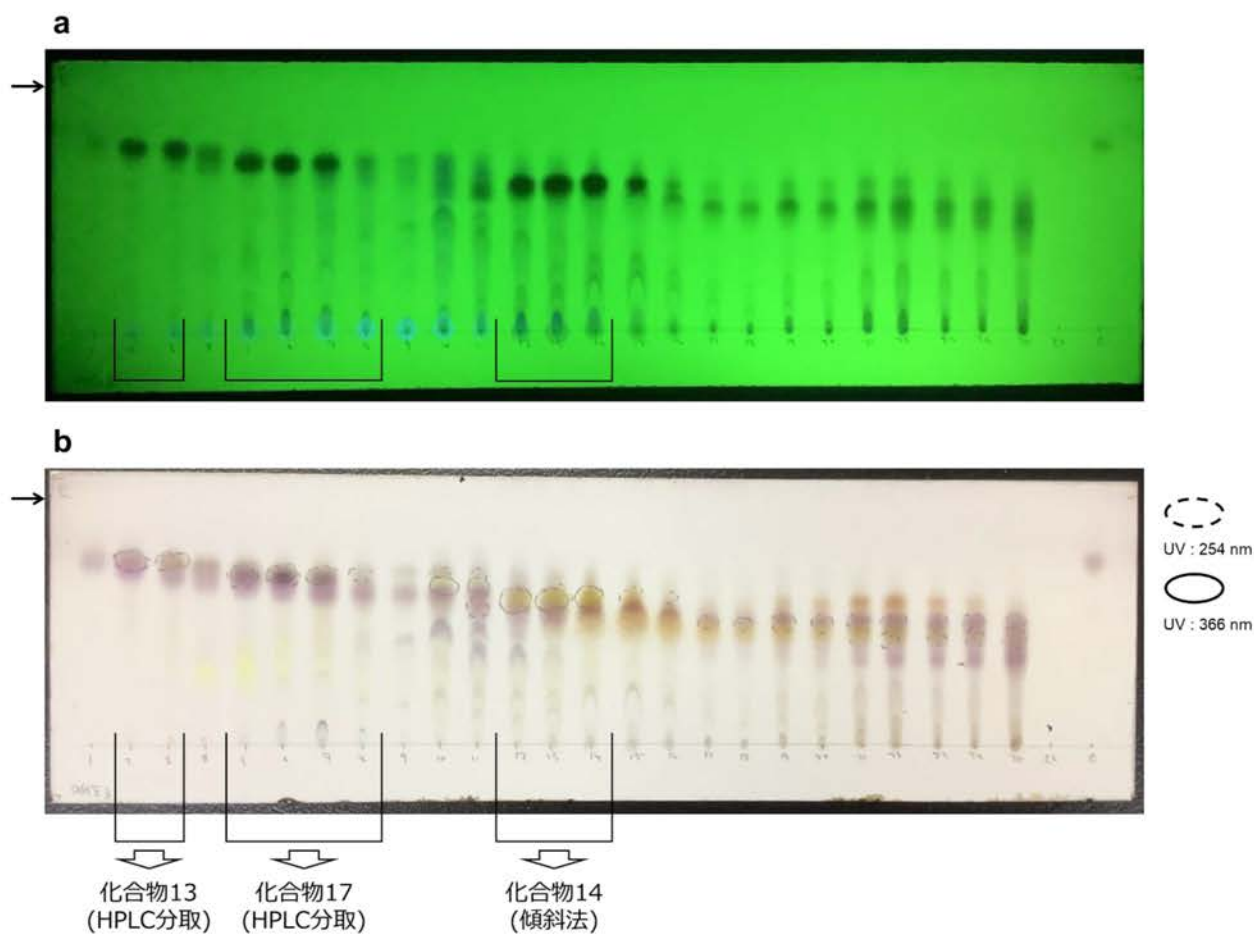


Fig. 37 OME-3-0~OME-3-26 の TLC (a : UV 254 nm、b : 10 % vanillin 硫酸呈色)。

左より OME-3-1~OME-2-26, OME-3-0。展開溶媒は EtOAc。

2-2-6 ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 を用いた細胞毒性試験

第 1 章と同様の手法により実施した。positive control には camptothecin ($IC_{50} = 32.1 \text{ nM}$) を用いた。

2-2-7 変異酵母 YNS17 株による生育回復活性試験

第 1 章と同様の手法により実施した。positive control には FK506 (2.5 ng/spot)を用いた。

2-3 実験結果

2-3-1 構造解析

得られた化合物の構造を Fig. 38 に示した。このうち新規であった化合物 13 の構造解析について以下に詳細を述べる。

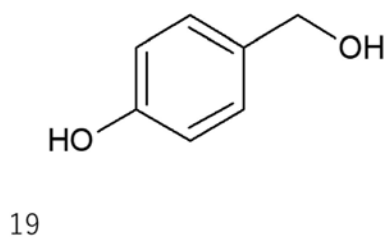
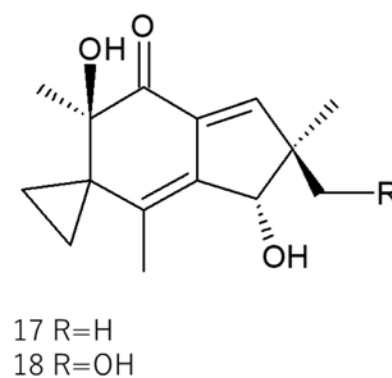
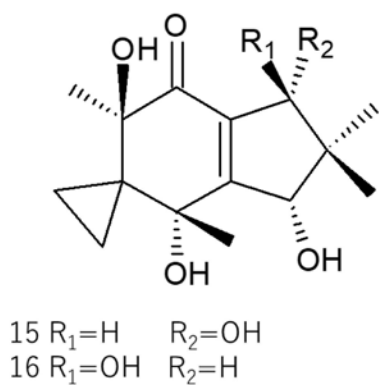
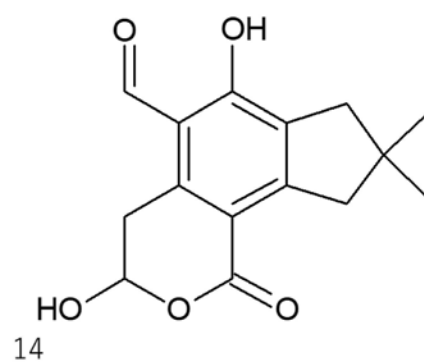
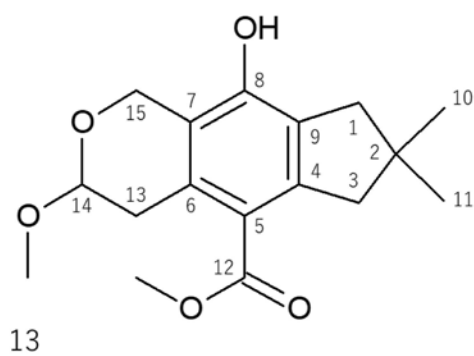


Fig. 38 化合物 13~20 の構造式

2-3-1-1 化合物 13 (Tsukiyotakein)

化合物 13 は無色油状物質として得られた。高分解能 ESI-MS より分子量を測定したところ、 m/z 329.1364 にイオンが観測された。この値は $C_{17}H_{22}O_5$ の Na 付加イオン $[M+Na]^+$ の精密質量 329.1365 と極めて近い値であることから本化合物の分子式は $C_{17}H_{22}O_5$ であると示唆された。

続いて構造決定のため NMR スペクトルを測定し、さらなる解析を行った。NMR スペクトルデータは補足資料に添付した (Fig. S35~S39)。

1H NMR より 2 つの singlet な methyl が δ_H 1.13、1.17 に見られたほか、2 つの methoxy が δ_H 3.50、3.83、4 つの methylene が δ_H 2.56 (2H)、2.87 (1H)、2.98 (1H)、3.03 (1H)、3.22 (1H)、4.76 (2H)、1 つの acetal methin が δ_H 4.94 に観測された。このことから本化合物を構成する 17 個の炭素のうち、2 つは methoxy 基に由来するものである。従って、本化合物は 15 個の炭素から成る基本骨格を持つ化合物であり、後から 2 個の methoxy 基が結合したものと推測される。即ち本化合物は sesquiterpene 類である可能性が考えられた。

^{13}C NMR では ESI-MS より導いた分子式の通り 17 本の炭素が観測された。このうち δ_H 168.25 に carbonyl が観測されたほか、芳香環領域に δ_H 119.2、120.3、125.5、132.0、145.7、149.8 の 6 個の炭素が観測された。これらはいずれも四級炭素であったことから本化合物は 6 置換ベンゼンを 1 つ有していることが示唆された。

続いて二次元 NMR の解析結果について述べる (Fig. 39)。 1H - 1H COSY では主だった相関は H-13 と H-14 の間に観測されたのみであった。HMQC により各プロトンと炭素のピークの結合を帰属し、HMBC による相関を調べたところ、以下に示したような相関が得られた。まず、2 つの methoxy δ_H 3.50、3.83 は、それぞれ acetal C-14、carbonyl C-12 と相関を有していた。このことから C-12 は

methyl acetate であると推測された。Methyl 基 H-10 および H-11 は、いずれも C-1、C-2、C-3 と相関があり、H-1 は C-2、C-3、C-4、C-8、C-9、C-10、C-11 と、H-3 は C-1、C-2、C-4、C-5、C-9、C-10、C-11 と相関を有しており、C-4、C-5、C-8、C-9 は化学シフト値から芳香環由来と推測されることから、一つの四級炭素に 2 つのメチル基が結合した 5 員環と 6 置換ベンゼンの縮合環を部分構造に有していることが示唆された。また、化学シフト値より、C-8 は phenol 基の付け根の四級炭素であると推定した。一方 acetal H-14 は、C-6、C-13、C-15 と相関を有していた。更に H-15 は C-6、C-7、C-8、C-14 と相関があり、また化学シフト値から酸素原子と隣接していることが示唆された。加えて H-13 が C-6、C-7、C-14 と相関を有しており、C-6、C-7、C-8 が芳香環由来の炭素であることから、14 位に acetal 構造を有する 6 員環エーテルとベンゼン環の縮合環があることも示唆された。更に、芳香環由来炭素 C-5 は化学シフト値から carbonyl との結合が示唆される。以上より本化合物は、ベンゼン環に 6 員環エーテルと 5 員環が縮合した多環式化合物であり、また炭素の骨格から illudalane sesquiterpene であることが示唆された。以上より決定した化合物 13 の構造はこれまでに報告の無いものであったことから、本化合物は新規であることが示唆された。

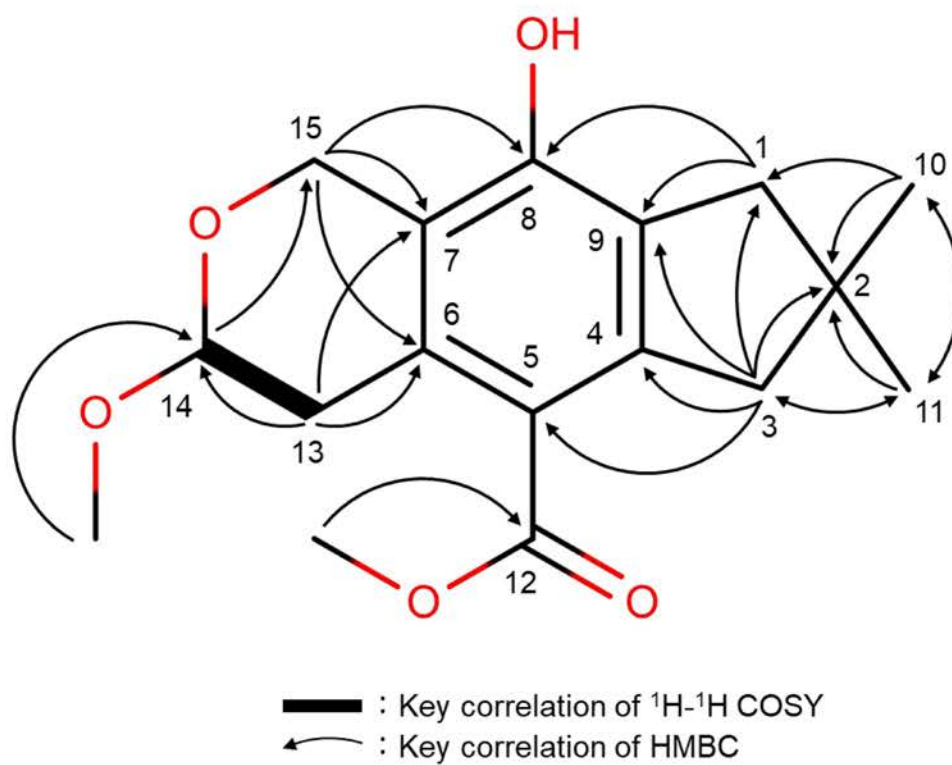


Fig. 39 化合物 13 (Tsukiyotakein) の ^1H - ^1H COSY 及び HMBC による相関

2-3-1-2 化合物 13 のスペクトルデータ

Tsukiyotakein (化合物 13)

Colorless oily material, $[\alpha]_{20}^D = -2.0^\circ$ (c 0.1, MeOH); IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3391 (hydroxy group), 1709 (carbonyl); ESI-MS m/z 329.1364 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$: 329.1365); ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ_{H} : 1.13 (3H, s), 1.17 (3H, s), 2.56 (2H, s), 2.87 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 2.98 (1H, d, $J = 17.0$ Hz), 3.03 (1H, dd, $J = 17.7$ Hz, 2.2 Hz), 3.22 (1H, dd, $J = 17.7$ Hz, 3.9 Hz), 3.50 (3H, s), 3.83 (3H, s), 4.76 (2H, dd, $J = 14.89$ Hz), 4.94 (1H, dd, $J = 2.2$ Hz, 3.9 Hz) δ_{C} : 29.0 (CH_3 , C-10), 29.0 (CH_3 , C-10), 32.4 (CH_2 , C-13), 40.0 (C, C-2), 42.4 (CH_2 , C-1), 49.4 (CH_2 , C-3), 51.3 (CH_3 , *O*-methyl), 55.5 (CH_3 , *O*-methyl), 58.3 (CH_2 , C-15), 97.7 (CH, C-14), 119.2 (C, C-6), 120.3 (C, C-5), 125.5 (C, C-4), 132.0 (C, C-7), 145.8 (C, C-9), 149.8 (C, C-8), 168.3 (C, C-12).

2-3-1-3 化合物 14~19 の同定

その他得られた化合物については、文献値との比較により化合物 14 が illudalic acid、化合物 15 が illudin B、化合物 16 が illudin H、化合物 17 が illudin M、化合物 18 が illudin S、化合物 19 が gastrodigeni であると同定した。^{37,48,49,74,75}

2-3-2 生理活性

2-3-2-1 HL60 細胞に対する細胞毒性試験の結果

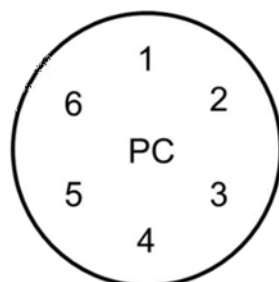
HL60 細胞による細胞毒性試験の結果、化合物 15 ($IC_{50} = 6.16 \mu M$)及び化合物 16 ($IC_{50} = 0.93 \mu M$)、illudin M ($IC_{50} = 20.91 nM$)、化合物 18 ($IC_{50} = 7.38 nM$)がそれぞれ活性を示した (Table 4)。

Table 4 化合物の細胞毒性

化合物	IC_{50}
CPT	32.10 nM
13	>50 μM
14	>50 μM
15	6.16 μM
16	0.93 μM
17	20.91 nM
18	7.38 nM
19	>50 μM

2-3-2-2 変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性試験の結果

変異酵母 YNS17 株による生育回復活性試験では、化合物 15、16 が 2.5 $\mu g/spot$ 、化合物 19 が 1.25 $\mu g/spot$ で活性を示した (Fig. 40)。



1 : 5 $\mu\text{g}/\text{spot}$
 2-6 : 1/2希釈
 PC : FK506 (2.5 ng/spot)

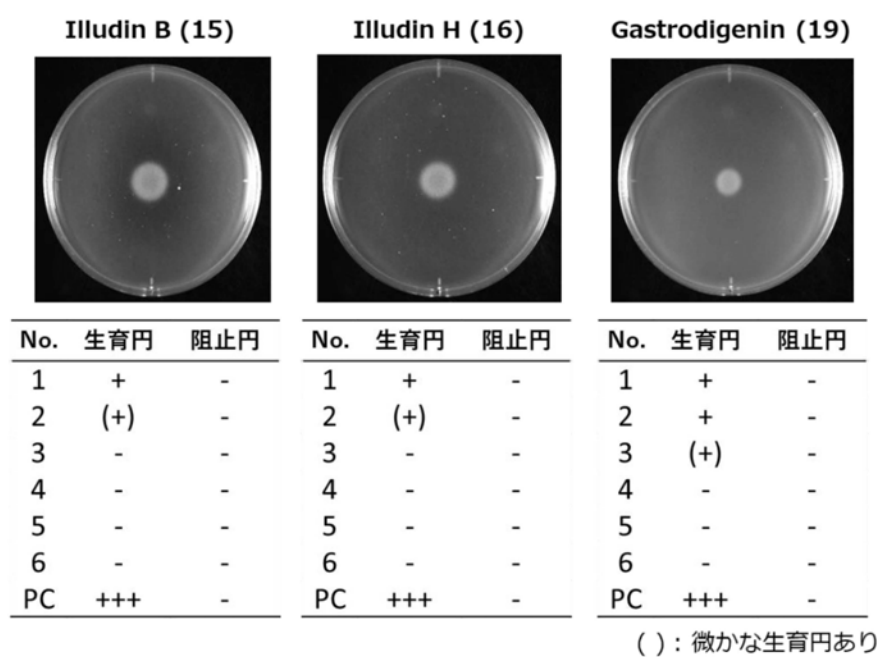


Fig. 40 化合物の YNS17 株に対する生育回復活性試験

2-4 考察

ツキヨタケ菌系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 M は、illudin S と並んで強い細胞毒性を有する化合物で、*O. olearius* より最初に報告された³⁷。また illudin H は、豪州産のツキヨタケ属近縁種 *O. nidiformis* から見つかった化合物である⁷⁴。Tsukiyotakein 及び illudalic acid は、illudalane 骨格を有する sesquiterpene であった⁴⁸。illudalane 骨格もまた illudoid sesquiterpene と呼ばれており、protoilludane の cyclobutane が開裂して生じるものと考えられる⁷⁶。

他の近縁種から報告された既知の sesquiterpene のみならず、近縁種からは報告の無い新規な構造を有した sesquiterpene も単離した。本研究では近縁種 *O. olearius* における先行研究において用いられた培地を利用しており、実際に単離された既知化合物も *O. olearius* から既に報告のあるものが多い。従って、ツキヨタケ菌系が生育可能な異なる組成の培地で培養を行い、得られた培養物から化合物の探索を行えば他の近縁種では見られなかったような化合物が見つかる可能性が期待される。

本研究で得られた化合物が菌系を MPG 培地において培養した際に特異的に産生するものであるのか、またどのようなメカニズムによって生産する二次代謝物に違いが生じるのかについてその詳細を明らかにすることはできなかった。従って上述の点についてはより詳細な研究が望まれる。

変異酵母 YNS17 株の生育回復活性試験において illudin B、H、gastrodigenin が弱い活性を示した。第 1 章においても illudin S のほか 4-O-methylneoilludin A、B が弱い活性を示したことから、illudane 型セスキテルペンには変異酵母の Ca^{2+} シグナル伝達に対し何らかの阻害を引き起こす作用を有しているものと推測される。一方、第 1 章において YNS17 株に対し活性を示した illudin S については、今回の試験において活性を示さなかった。従って、illudin S の活性の有無については再度検討の余地があると考えられる。

第 3 章 ツキヨタケ菌糸玄米培地培養物に含まれる成分に関する研究

3-1 緒言

これまでツキヨタケ子実体より 12 種の化合物、菌糸液体培地培養物より 7 種の化合物を単離した。一般に糸状菌類は培地の違いなどが引き金となって異なる代謝物を産生することが知られており、序論でも述べた通り、キノコにおいてもチャダイゴケ属の菌より固体培地と液体培地で異なる diterpene の単離が報告されている^{30,31}。とりわけツキヨタケ属菌糸培養物の成分探索研究では、我々の知る限り液体培地による培養物を用いた手法しか行われておらず、固体培地を用いた場合の成分探索の報告は行われていない。実際、第 2 章において MPG 培地培養濾液より単離した化合物も 1 種の新規 illudalane sesquiterpene と既知化合物 gastrodigenin を除いた 5 種の化合物はいずれも先行研究において *O. olearius* から報告のあるものであったことから、従来とは異なる培地を用いた培養物から化合物の探索を試みることでこれまでツキヨタケ属菌類から報告の無かったような代謝物が見つかることが期待される。

そこで本研究では種々の培地を検討した結果、ツキヨタケ菌糸が比較的旺盛に生育することが確認され、菌類の成分探索研究に良く用いられる玄米培地を採用し、得られた培養物から化合物の探索を試みた (Fig. 41)。その結果、これまでツキヨタケ属菌類から報告の無かった化合物群である polyisoprenepolyol 類が 3 種見つかった。そのうちの一つである omphaloprenol A は、これまで報告の無い新規な構造を有していた。残る 2 種は、先行研究の文献値との比較などによりブナシメジから単離された hypsiziprenol A₁₀ および A₁₁ であると同定した^{77,78}。また、既知化合物として illudin S 及び ergosterol も単離した^{34,64}。得られた化合物を生理活性を試験した結果、omphaloprenol A はレタス幼植物体地下部に対して有意に成

長を促進した。また、ergosterol にも弱いながら同様の活性が確認された。一方、illudin S は地上部地下部共に強く成長を阻害した。またヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性試験の結果、polyisoprenepolyol 類と illudin S が活性を示した。



Fig. 41 ツキヨタケ菌糸玄米培地培養物

3-2 実験

3-2-1 使用機器

EI-MS は JEOL 製 JMS-T100GC を用いた。それ以外は 1 章及び 2 章と同様である。

3-2-2 使用菌株

ツキヨタケ菌糸は、第 2 章で用いたものと同じ YUOJ0825 株を用いた。

3-2-3 菌糸の培養

PDA 平板培地に YUOJ0825 株を接菌し、25 °C、15 日間暗所下で静置培養した。得られた培養物はナイフで 1 辺 2~3 mm 程度の賽の目上に切断し、玄米培地 1 本あたりに 3 片接菌した。玄米培地は玄米 105 g と蒸留水 210 mL を入れた 500 mL 三角フラスコに綿栓をして、120 °C、20 分で蒸圧滅菌したものを 4 本用いた。接菌した培地は 25 °C 暗所下で 40 日間培養した。

3-2-4 TLC

第 1 章と同様の手法により行った。

3-2-5 単離精製

玄米培地培養物の粗分画の概要については Fig. 42、各化合物の単離までの概要は Fig. 43 に示した通りである。以下に詳細を述べる。

玄米培地培養物の抽出と n-hexane、EtOAc、BuOH による分画は第 1 章の子実体の抽出及び分画と同様の操作により行い、n-hexane 画分 6.3 g、EtOAc 画分 1.4 g、BuOH 画分 19.1 g を得た。各画分について TLC アッセイを行ったところ

ろ、EtOAc 画分において子実体の EtOAc 画分では見られなかったスポットが[§] R_f 値 0.2 付近にて確認された (Fig. 44)。また、この当該スポットは MPG 培地培養濾液の EtOAc 抽出物においても確認されなかったものである。そこで本研究では EtOAc 画分に注目して化合物の単離を試みた。

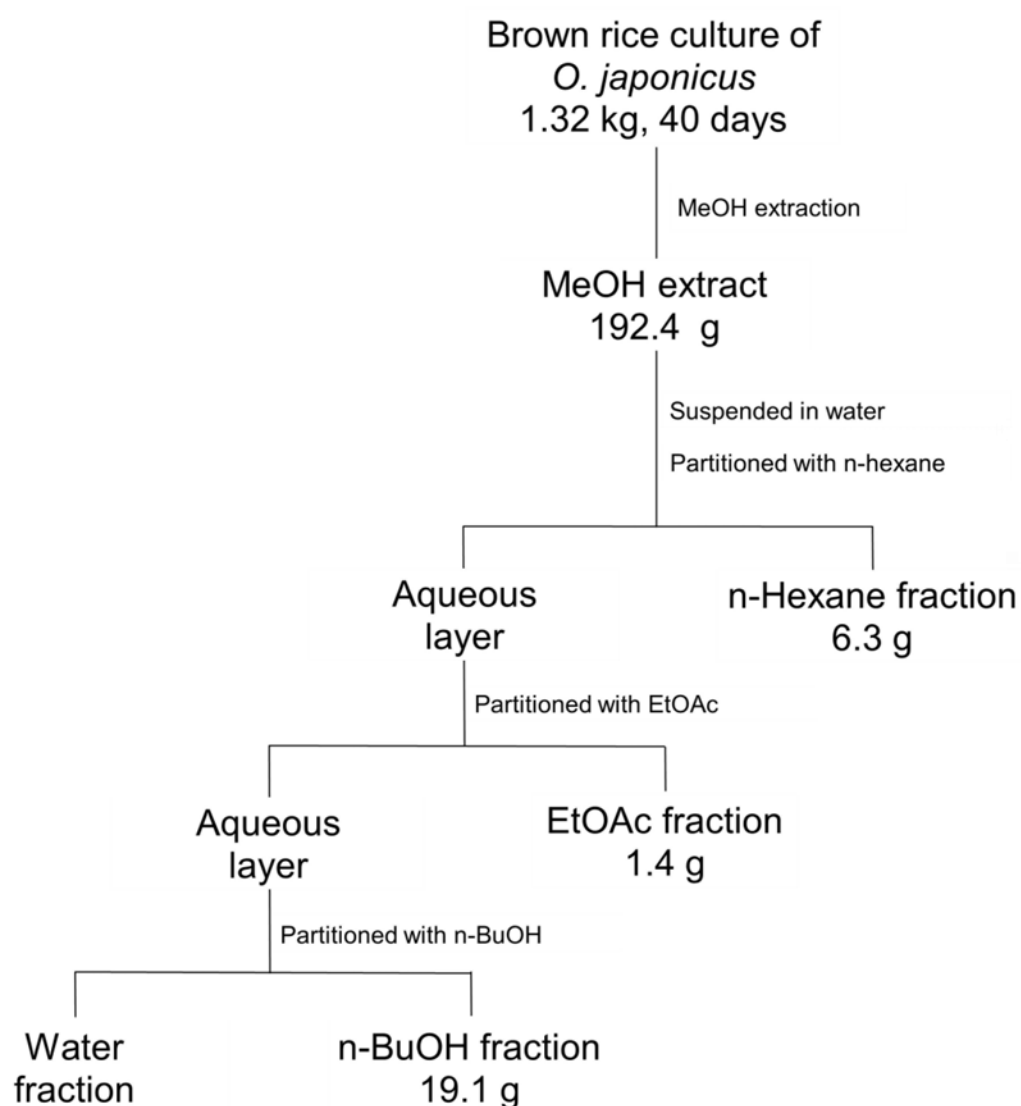


Fig. 42 ツキヨタケ菌糸玄米培地培養物の分画

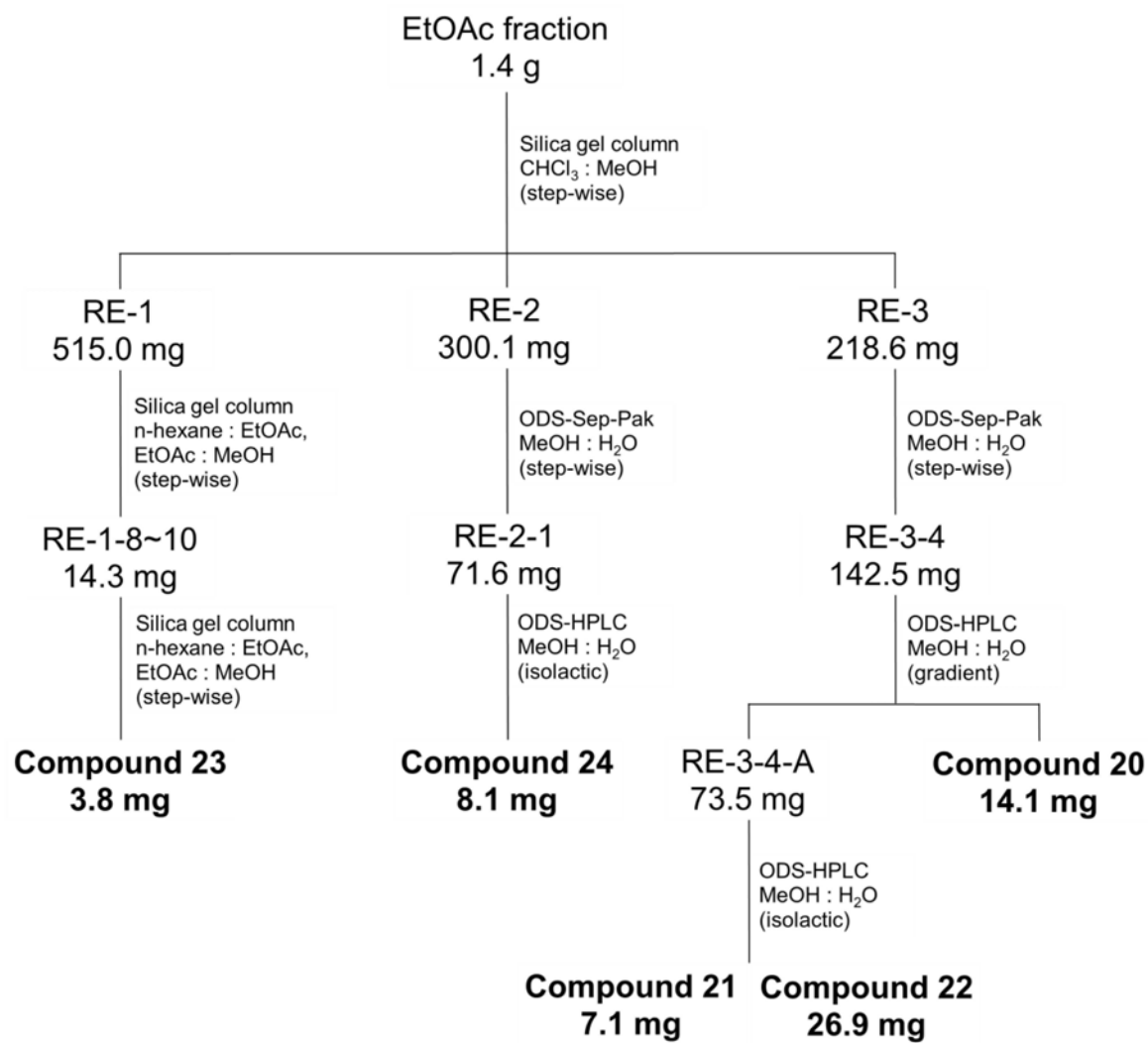


Fig. 43 EtOAc 画分からの化合物の単離

混合溶媒 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 85:15$ の比率で混合した溶媒と silica gel 60 のスラリー 200 mL を充填したクロマト管を用いて、silica gel 60 に吸着させた EtOAc 画分を CHCl_3 (mL) / MeOH (mL) = 170/25、140/60、100/100、0/200 で段階的に溶出し、200 mL 毎に RE-1~RE-6 に分画した (Fig. 45)。このうち RE-3 (218.6 mg) について、ODS-Sep-Pak による分画を行った。 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 75/25$ で十分に平衡化した ODS-Sep-Pak に少量の MeOH に溶かした RE-3 を入れ、 MeOH (mL) / H_2O (mL) = 75/25、50/50、75/25、100/0 で溶出した (Fig. 46)。溶出した溶媒の比率ごとに RE-3-1~RE-3-4 の計 4 画分を得た。得られた画分のうち、RE-3-4 画分 (142.5 mg) について、ODS-HPLC [$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 85/15$ to 100/0 (0-15 min)、100/0 (15-40 min)] にて保持時間 14.4 min 及び 18.9 min に検出されたピークをそれぞれ分取した。このうち後者は化合物 20 (14.1 mg) であった。前者である RE-3-4-A 画分 (73.5 mg) は更に ODS-HPLC ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 80/20$, isolactic, 3.5 mL/min) に付し、保持時間 45.8 min、48.4 min に検出されたピークをそれぞれ化合物 21 (7.1 mg)、化合物 22 (26.9 mg) として単離した。

RE-1 画分 (515.0 mg) を silica gel 60 に吸着後、混合溶媒 $n\text{-hexane}/\text{EtOAc} = 7/3$ と silica gel 60 のスラリー 40 mL を内径 2.0 cm のクロマト管に充填したカラムを用いて $n\text{-hexane}$ (mL) / EtOAc (mL) = 35/15、30/20、25/25、20/30 の溶媒で順次溶出した。最初に溶出した 40 mL を RE-1-1 とし、試験管で 5 mL 毎に 24 本分取 (RE-1-2~RE-1-25) し、最後に残りの溶出溶媒を回収した RE-1-26 を得た。このうち、RE-1-8~10 画分 (14.3 mg) について化合物の単離を試みた。混合溶媒 $n\text{-hexane}/\text{EtOAc} = 7/3$ 溶媒と silica gel 60 のスラリー 40 mL を内径 2.0 cm のクロマト管に充填したカラムを用いて $n\text{-hexane}$ (mL) / EtOAc (mL) = 35/15、30/20 で溶出し、10 mL 毎

に RE-1-8~10-1~RE-1-8~10-10 の計 10 画分を得た。このうち RE-1-8~10
 において化合物 23 (3.8 mg) が単離された。RE-2 (300.1 mg) は、RE-3 と同
 様の手順により ODS-Sep-Pak にて RE-2-1~RE-2-4 に分画した。このうち RE-
 2-1 画分 (71.6 mg) について、ODS-HPLC (MeOH/H₂O = 25/75、
 isolactic、5.0 mL/min) にて保持時間 22.1 min に見られたピークを化合物 24
 として 8.1 mg 単離した。

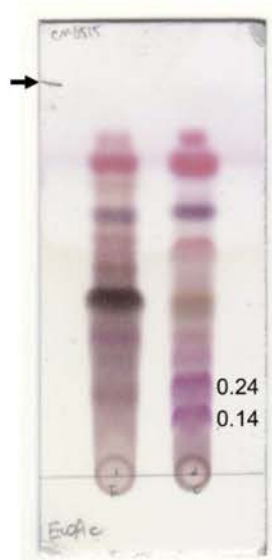


Fig. 44 子実体 EtOAc 画分(左)と玄米培地培養物 EtOAc 画分(右)。展開溶媒は
 CHCl₃/MeOH =8 5/15、呈色は 10% vanillin 硫酸試薬を噴霧後、120 °Cで 35 秒
 間加熱して行った。数字は R_f 値、左上の黒矢印は溶媒フロントを示す。

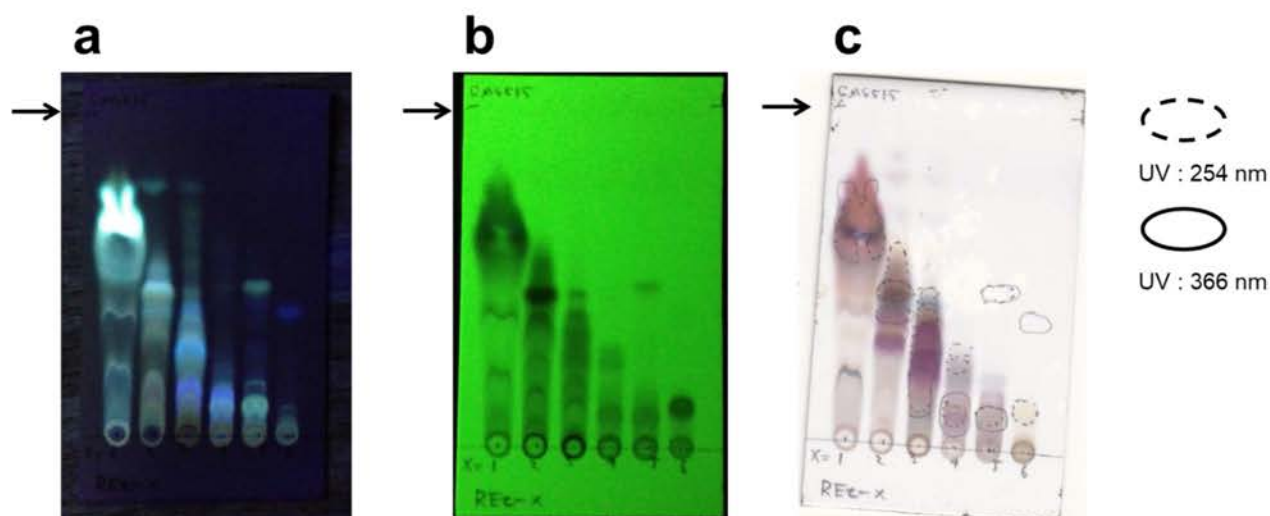


Fig. 45 RE-1~RE-6 の TLC (a : UV 366nm、b : UV 254 nm、c : 10 % vanillin 硫酸呈色)。
展開溶媒は $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=85/15$ 。

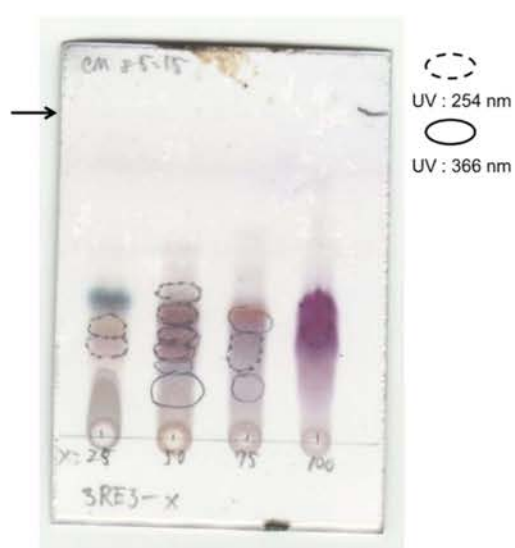


Fig. 46 RE-3 の Sep-Pak による分画後の TLC。左より MeOH = 25% (RE-3-1) 、50 % (RE-3-2) 、75 % (RE-3-3) 、100 % (RE-3-4) 画分。
展開溶媒は $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 85/15$ を用いた。

3-2-6 レタス幼植物体に対する生理活性試験

本実験ではいずれの化合物も比較的量が取れたため、レタス種子 (*Lactuca sativa*) による生理活性試験を行った。レタス種子はメルボルン種 MT を用いた。発芽は、種子に蒸留水を与え 25 °C 暗所下に 1 日静置することで行った。4.0 cm シャーレに 4.0 cm 濾紙を入れ、終濃度が 100 ppm となるよう各化合物の MeOH 溶液を添加し、風乾により MeOH を除去した。そこへ tween 80 を 0.1% 添加した蒸留水 1.0 mL と発芽種子 10 粒を入れ、25 °C 暗所下で 3 日間静置後、幼植物体の地上部と地下部の長さを測定した。MeOH 溶液のみを加えたものを control とし、成長率 \pm SE を算出した。また、positive control として 100 ppm の 2,4-D 添加区（地上部: $5.57 \pm 0.51\%$ 、地下部: $13.52 \pm 0.67\%$ ）を用意した。

3-2-7 ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞毒性試験

第 1 章と同様の手法により実施した。positive control には camptothecin ($IC_{50} = 35.7$ nM) を用いた。

3-2-8 変異酵母 YNS17 株による生育回復活性試験

第 1 章と同様の手法により実施した。positive control には FK506 (0.25 ng/spot) を用いた。

3-3 結果

3-3-1 構造解析

得られた化合物の構造は Fig. 47 に示した通りである。このうち新規化合物であった化合物 20 の構造解析について以下に詳細を述べる。

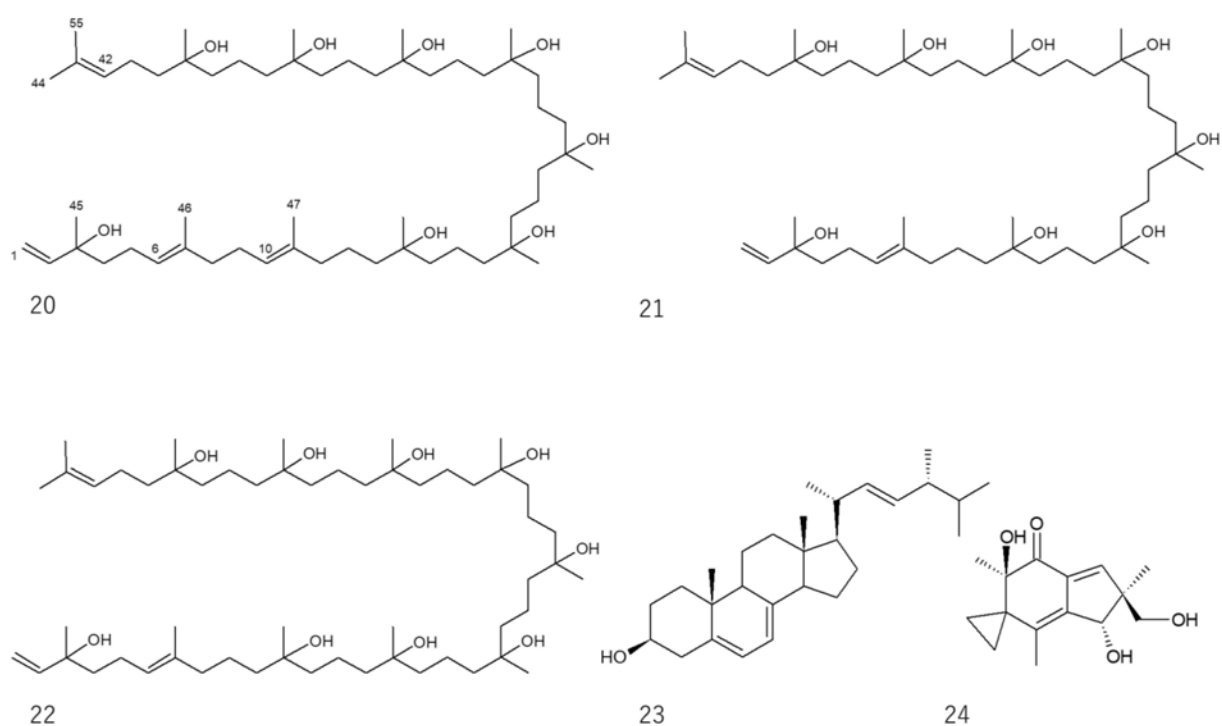


Fig. 47 化合物 20~24 の構造式

3-3-1-1 化合物 20 (Omphaloprenol A)

化合物 20 は白色粉末状物質として得られた。高分解能 ESI-MS により精密質量を測定したところ、 m/z 893.7808 にイオンが観測された。これは $C_{55}H_{106}O_8$ のプロトン付加イオン $[M+H]^+$ の精密質量 893.7806 に極めて近い値であることから本化合物の分子式は $C_{55}H_{106}O_8$ であると示唆された。

得られた化合物について構造解析を行うため NMR スペクトルを測定した。得られたスペクトルは補足資料に示した (Fig. S40, S41)。

1H 及び ^{13}C NMR の peak list は Table 5 に示した通りである。 ^{13}C NMR より、 δ_c 111.7、124.3、124.4、124.5、131.8、134.9、135.4、145.0 に二重結合に由来する 8 個の sp^2 炭素が観測されたことから、4 個の二重結合を有していることが示唆された。分子式より本化合物の不飽和度は 4 であり、これは二重結合の数と一致することから、本化合物は環状構造を有さない鎖状の化合物であることが推定された。また、 δ_c 72.8 に非常に強い四級炭素に由来するピークが観測された。化学シフト値とピーク強度から、水酸基が結合し、なおかつ極めて類似した環境下に置かれた四級炭素が多数存在しているものと推測された。 1H NMR では、重複しているものも含めて計 12 個の singlet な methyl 基が観測された。このうち δ_H 1.57、1.58、1.61、1.67 は、その化学シフト値から二重結合を付け根に持つ allylic methyl であると推測された。また、積分値より 44 個相当の methylene 由来プロトンが δ_H 1.31~1.51 にかけて重複して観測されたほか、10 個相当の allylic methylene 由来プロトンが δ_H 1.91~2.10 に、二重結合に由来する水素が δ_H 5.04、5.07、5.11、5.20、5.90 にそれぞれ観測された。

以上の結果より本化合物は鎖状の化合物で、水酸基と methyl 基が結合した四級炭素が、methylene 鎖を介して多数結合した構造を有しているものと考えられた。このような構造を有する天然物として、polyisoprenepolyol 類である可能性が考

えられた。そこで先行研究との比較を行ったところ、化合物 20 の NMR スペクトルは、近年植物内生菌より報告された bionectin F (Fig. 48) のものと類似していることが判明した⁷⁹。Bionectin F は二重結合を有する *E*-isoprene ユニットと水酸基を持つ isoprene ユニット、両方を持つ isoprene ユニットの 3 つの部分構造から構成されており、化合物 20 の NMR スペクトルから想定される構造と極めて近い。そこで本化合物は類縁な構造を持つ polyisoprenepolyol であると推測し、構造解析を進めた。まず、MS より求めた分子式 $C_{55}H_{106}O_8$ より、炭素数が 55 であることから、本化合物は計 11 個の isoprene ユニットで構成されているものと考えられた。一方、化合物 20 は bionectin F と異なり、 1H NMR において酸素原子との結合を示唆する化学シフト値を示すプロトンは観測されなかった。従って、本化合物の末端部のうち C-1 側の末端に水酸基は存在しないものと考えられる。代わりに本化合物は C-1 末端に二重結合を有しているものと推測される。これは 1H NMR スペクトルにおいて観測された二重結合由来プロトンのうち、 δ_H 5.04 と δ_H 5.20 の共に C-1 に結合したプロトンが、互いに $J = 1.2$ Hz で geminal coupling していることに加え、 δ_H 5.04 のプロトンが δ_H 5.90 に観測されたプロトンと $J = 10.6$ Hz で、 δ_H 5.20 のプロトンが $J = 17.4$ Hz で coupling しているためである。即ちこれは δ_H 5.04 と δ_H 5.20 のプロトンが δ_H 5.90 のプロトンに対してそれぞれ *cis*、*trans* の位置関係にあることを示唆している (Fig. 49)。また、末端の二重結合を除くと残る二重結合は 3 個である。一方、二重結合炭素を付け根に持つ allylic methyl は 1H NMR スペクトルより 4 個観測されている。この状況は本化合物の C-44 側の末端を構成する isoprene ユニットの C-42 位に二重結合を有していると考えれば説明ができる。従って、残るのは水酸基を持つ isoprene ユニット 7 個と二重結合を有する isoprene ユニット 2 個の位置関係と二重結合の立体の決定である。二重結合の立体については、先行研究より polyisoprenepolyol の内部二重

結合について、allyl 位 methyl 基の化学シフト値が、*Z* 配置の場合 δ_c 25 前後、*E* 配置の場合 δ_c 16 前後になるとされている⁸⁰。本化合物の場合、C-44 を除く allylic methyl は、 ^{13}C NMR において δ_c 15.9、16.0 にそれぞれ検出されたことから、いずれも *E* 配置であることが示唆された。

水酸基を持つ isoprene ユニット 7 個と二重結合を有する isoprene ユニット 2 個の位置関係については NMR スペクトルの各ピークの重複が多く、これ以上の解析が困難であった。一方、bionectin F の構造解析では化合物の直接導入法により EI-MS スペクトルを取得し、観測されたフラグメントイオンを帰属することにより平面構造の決定に至っていた。そこで化合物 20 にも同様の測定を実施した。得られた EI-MS スペクトルより、主要なフラグメントとして m/z 69、109、135、177、203、245、275、313、343、399、411、467、479、535、547、615 が観測された (Fig. S42)。一般に EI-MS では、 sp^3 四級炭素では vinyl 位で、 sp^2 四級炭素では allyl 位で開裂が起きたフラグメントが生じる傾向にあることから、これらのフラグメントイオンがどちらに由来するかを帰属すれば二重結合の位置の特定が可能となる。帰属の結果、Fig. 50 に示したように、 m/z 69、135、203 がそれぞれ allyl 位でのフラグメンテーションであったことから、6 位及び 10 位に内部二重結合を有していることが示唆された。以上より化合物の平面構造の決定に至り、各種データベースによる化合物検索を行ったところ、同様の構造を有する化合物はこれまでに報告がない事が明らかとなったため新規化合物であることが分かり本化合物を、omphaloprenol A と命名した。

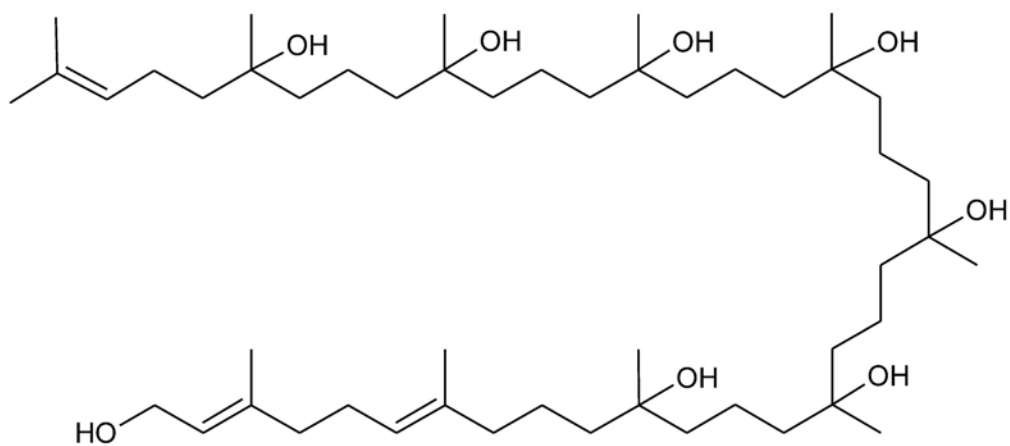


Fig. 48 Bionectin F の構造⁷⁹

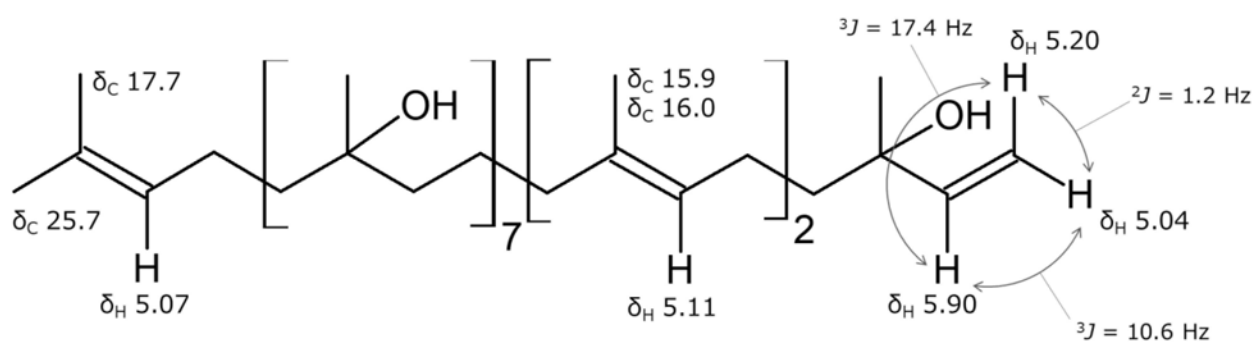


Fig. 49 Omphaloprenol A (20) の二重結合周辺の構造の NMR による帰属

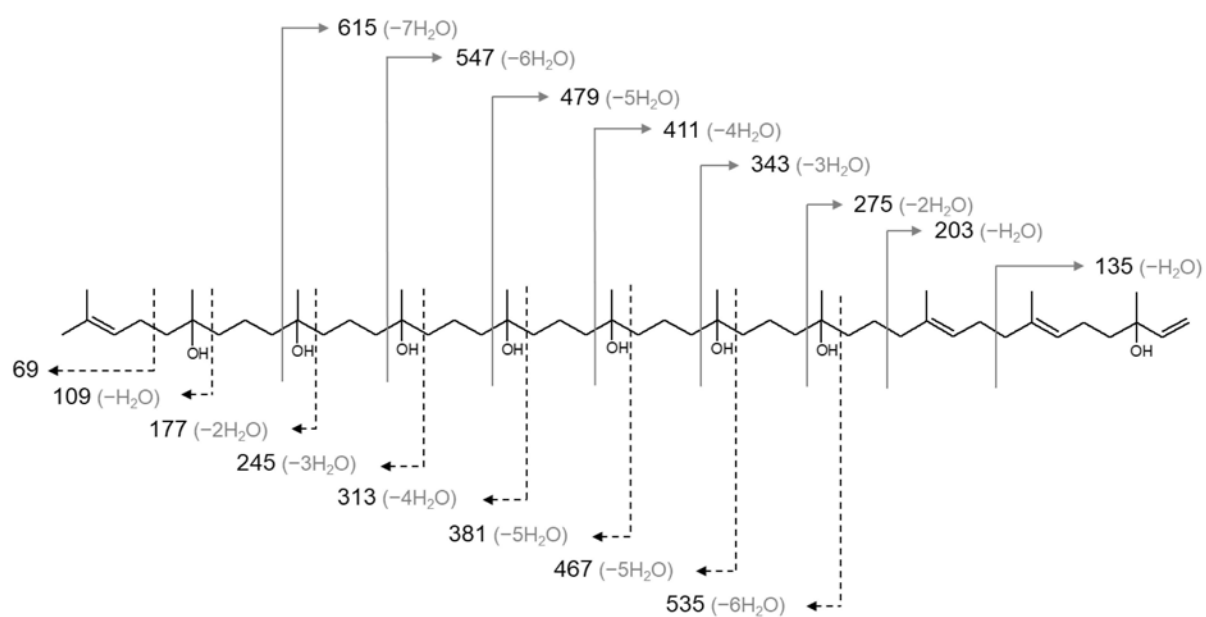


Fig. 50 Omphaloprenol A (20) の EI-MS (直接導入法) によるフラグメントイオンの帰属

Table 5 Omphaloprenol A (20) のピークリスト (¹H: 600 MHz, ¹³C: 150 MHz, CDCl₃)

	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
1	5.04 (1H, dd, <i>J</i> = 10.6, 1.2 Hz)	111.7	28	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5
	5.20 (1H, dd, <i>J</i> = 17.4, 1.2 Hz)		29	1.31–1.51 (2H)	18.1–18.2
2	5.90 (1H, dd, <i>J</i> = 17.4, 10.6 Hz)	145.0	30	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5
3		73.51	31		72.8
4	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5	32	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5
5	1.91–2.10 (2H)	26.3	33	1.31–1.51 (2H)	18.1–18.2
6	5.11 (1H, m)	124.3–124.5	34	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5
7		134.9–135.4	35		72.8
10	5.11 (1H, brt, m)	124.3–124.5	38	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5
11		134.9–135.4	39		72.8
12	1.91–2.10 (2H)	39.6–40.0	40	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5
13	1.31–1.51 (2H)	18.1–18.2	41	1.91–2.10 (2H)	22.7–22.8
14	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5	42	5.07 (1H, brtd, <i>J</i> = 7.1, 1.0 Hz)	124.3–124.5
15		72.8	43		131.8
16	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5	44	1.67 (3H, s)	25.7
17	1.31–1.51 (2H)	18.1–18.2	45	1.26 (3H, s)	27.7
18	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5	46	1.57–1.58 (3H, s)	15.9–16.0
19		72.8	47	1.57–1.58 (3H, s)	15.9–16.0
20	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5	48	1.14–1.16 (3H, s)	26.8–27.1
21	1.31–1.51 (2H)	18.1–18.2	49	1.14–1.16 (3H, s)	26.8–27.1
22	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5	50	1.14–1.16 (3H, s)	26.8–27.1
23		72.8	51	1.14–1.16 (3H, s)	26.8–27.1
24	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5	52	1.14–1.16 (3H, s)	26.8–27.1
25	1.31–1.51 (2H)	18.1–18.2	53	1.14–1.16 (3H, s)	26.8–27.1
26	1.31–1.51 (2H)	41.6–42.5	54	1.14–1.16 (3H, s)	26.8–27.1
27		72.8	55	1.61 (3H, s)	17.7

3-3-1-2 化合物 20 のスペクトルデータ

Omphaloprenol A

Colorless glassy material, $[\alpha]_{20}^D = +17.8$ (c 0.1, MeOH), $IR_{\nu_{max}}$ (NaCl) = 3365 cm^{-1} (Fig. S43), HR-ESI-MS m/z : 893.7808 $[M+H]^+$ (Calcd for $C_{55}H_{97}O_8$: 893.7806) NMR spectra was shown in Table 5.

3-3-1-3 化合物 21～24 の同定

その他の化合物については、文献値及び本研究室が所有していた標品との比較により、化合物 21 及び 22 は hypsiziprenol A_{10} 、 A_{11} ^{77,78}、化合物 23 は ergosterol、化合物 24 は illudin S³⁴と同定した。このうち hypsiziprenol A_{10} 、 A_{11} は、ブナシメジより報告のある既知化合物であり、苦味の呈味成分として知られている。^{77,78}

3-3-2 生理活性

3-3-2-1 レタス幼植物体に対する生理活性試験の結果

レタス幼植物体を用いた試験の結果、化合物 24 が地上部地下部共に顕著な成長阻害活性を示した。一方、化合物 20 は、地下部の成長を有意に促進した。また、化合物 23 にも地下部に対し成長促進が認められた (Fig. 51)。

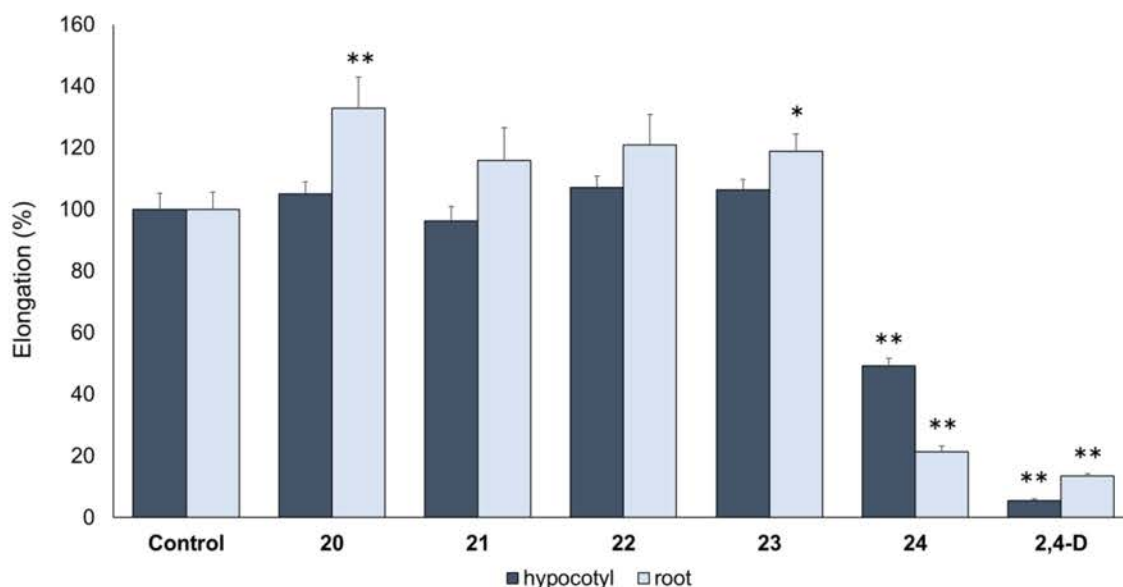


Fig. 51 各化合物を 100 ppm 投与したときのレタス幼植物体の成長率。Control の成長率を 100 としたときの、各化合物添加区画の平均成長率 \pm SE を算出した ($n = 20$)。有意差の判定は Welch の t 検定により行った。(* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)

3-3-2-2 HL60 細胞に対する細胞毒性試験の結果

細胞毒性試験は、化合物 23 が保管中に分解した為それ以外の化合物で行った。その結果、化合物 20~22 及び 24 のいずれの化合物も $IC_{50} = 3.7 \mu M$ 、 $3.8 \mu M$ 、 $3.4 \mu M$ 、 15.2 nM で細胞毒性を示した (Table 6)。興味深いことに、化合物 20 はレタス幼植物体地下部に対して成長促進活性を有していたにもかかわらず、HL60 細胞に対しては細胞毒性を示した。

Table 6 HL60 細胞による細胞毒性試験の結果

化合物	IC_{50}
CPT	32.10 nM
20	3.7 μM
21	3.4 μM
22	3.8 μM
24	15.2 nM

3-3-2-3 変異酵母 YNS17 株に対する生育回復活性試験の結果

変異酵母の生育回復活性試験において今回単離した化合物はいずれも活性を示さなかった。

3-4 考察

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 A₁₀、A₁₁ (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 A₁₀、A₁₁ は、これまでツキヨタケ属の担子菌類からは報告の無い polyisoprenepolyol と呼ばれる polyterpene 類であった。

polyisoprenepolyol は、ブナシメジやモエギタケ科チャムツタケ属のオオワライタケ (*Gymnopilus junonius*) に多く含まれる成分として知られている^{77,78,81-86}。オオワライタケに含まれる polyisoprenepolyol として、gymnoprenol 類や gymnopilin 類、gymnopilene が報告されている。Gymnopilin 類は、polyisoprene 鎖の末端に hydroxy-3-methyl-glutaricacid がエステル結合した構造を有している。オオワライタケは幻覚作用を有する毒キノコとして知られており、gymnopilin 類が原因成分なのではないかと考えられている^{86,87}。

ブナシメジに含まれる hypsiziprenol 類は、苦みを呈することに加え様々な生理活性が知られていることから広く研究されている。hypsiziprenol A₉ からは、培養した肝ガン細胞に対する細胞周期停止による増殖阻害や結核細菌に対する阻害活性が知られている⁸⁸⁻⁹⁰。また、HL60 細胞に対しても細胞毒性が確認されており、その作用機序はカスパーゼ活性化とミトコンドリア膜電位の低下を介したアポトーシス誘導によるものとされている⁹¹。

また polyisoprenepolyol は、キノコ以外の菌類からも単離の報告があり、例えば構造解析で述べた bionectin F は植物内生菌 *Bionectria* sp. Y1085 株から単離されている⁷⁹。また、真菌 *Gliocladium* sp. FO-1513 株からは、acyl CoA cholesterol acyltransferase 阻害作用を有する glisoprenin A が単離された⁸⁰。我々の知る限り、担子菌キノコからの polyisoprenepolyol 類の単離はオオワライタケ、ブナシメジに次ぐ 3 例目であり、ツキヨタケ属の担子菌より polyisoprenepolyol の存在を報告したのは本研究が初となる。

今回単離した 3 種の polyisoprenepolyol も、HL60 細胞に対して細胞毒性を有していた。前述の通り、類縁化合物の hypsiziprenol A₉ が HL60 細胞に対してカスパーゼ活性化とミトコンドリア膜電位の低下を介したアポトーシス誘導を引き起こすことが知られていることから、本化合物も同様の作用機序によって細胞毒性を引き起こしているものと推測される⁹¹。また hypsiziprenol A₉ の HL60 への細胞毒性は IC₅₀ = 9.0 μM であったことから、今回単離した omphaloprenol A、hypsiziprenol A₁₀、A₁₁ の方が、HL60 細胞に対してより強い活性を有していることが示唆された⁹¹。また興味深いことに、omphaloprenol A は HL60 細胞には細胞毒性を示したにもかかわらず、レタス幼植物体の地下部に対しては成長を有意に促進した。従ってブナシメジやオオワライタケの polyisoprenepolyol 類の中にも同様の活性を持つものが存在するのではないかと期待される。

polyisoprenepolyol 類の単離精製の過程で、本化合物群は、silica gel 60 及び ODS のいずれに対しても高い親和性を有していることが確認された。そのため silica gel 60 カラムにより高極性画分を分画後、ODS カラムで低極性画分を得ることで polyisoprenepolyol 含有画分を効率的に得られた。この方法を使えば、ブナシメジ子実体中の hypsiziprenol 類の分析や他の菌類からの polyisoprenepolyol 探索がより効率的に行えるようになるものと期待される。

結論

ツキヨタケ子実体、菌糸液体培地培養濾液、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。

ツキヨタケ子実体からは、tsukiyols A-C、neoilludin C、4-*O*-methyl-neoilludin A、B の 6 種の新規 sesquiterpene を含む 12 種類の化合物を単離した。これまで知られていた illudane 型の骨格を有する sesquiterpene のほか、protoilludane、fomannosane 骨格を有したものも確認された。従ってツキヨタケは他のツキヨタケ属担子菌同様、多様な sesquiterpene 類を生産していることが明らかとなった (Fig. 52)。

ツキヨタケ菌糸液体培地培養物からは、1 種の新規 sesquiterpene である tsukiyotakein を含む 7 種の化合物を単離した。Illudin S を除くその他の化合物は、いずれも子実体において存在が確認されなかったものばかりである。特に illudalic acid 及び tsukiyotakein は illudalane 骨格を有しており、本種子実体では見られなかったタイプの sesquiterpene である。従ってツキヨタケは、子実体と菌糸培養濾液とでは産生する二次代謝物に大きな違いがあることが示唆された。

ツキヨタケ菌糸玄米培地培養物より 1 種の新規 polyisoprenepolyol の omphaloprenol A を含む 5 種の化合物を単離し、構造決定を行った。玄米培地培養物からの成分研究はツキヨタケ属担子菌において本研究が初であり、これまで本属から報告の無かった polyisoprenepolyol 類が見つかった。このことから、ツキヨタケ属担子菌は培養条件の検討次第で更なる未知の代謝物が得られることが期待される。一方でツキヨタケの毒成分 illudin S はいずれの条件においても単離された。

ツキヨタケ属以外のツキヨタケ科のキノコも、興味深い構造や生理活性を持ったものが見つかっている。例えば、アカアザタケ属のアカアザタケ (*Rhodocollybia maculata*) やエセオリミキ (*R. butyracea*) より単離された sesquiterpene lactone の collybolide は、後にうつ病や薬物依存症、内臓痛などの疾患の治療標的として知られる κ -オピオイド受容体にアゴニストとして作用し、鎮痛・鎮痒作用を示すことが明らかになった^{92,93}。これまでに報告された κ -オピオイド受容体に強く作用する物質の殆どは含窒素化合物ばかりであり、窒素を含まない化合物ではメキシコ原産のシソ科多年草 *Salvia divinorum* より単離された、幻覚作用を持つ diterpene 化合物 Salvinorin A に次ぐ 2 例目である^{94,95}。さらに、これまで collybolide について人体に有害な作用が報告されておらず、またアカアザタケやエセオリミキも可食なキノコとされていることから、副作用のない薬剤開発へつながることが期待されている。

またモリノカレバタケ属のキノコからは、抗菌活性を持つ chloropropynyl-isocoumarin の gymnopalynes A, B が見つかっているほか、ヒトガン細胞に対して顕著な増殖阻害活性を有する環状ペプチドの gymnopeptides A, B が単離されている^{96,97}。しかしツキヨタケ科担子菌には成分未知な種が今なお多く存在している。従って、今後もツキヨタケ科からは様々な新規化合物が見つかるものと期待される。今回行ったような子実体と菌糸培養物双方を調べる手法は、キノコの中でも特に腐生菌や木材腐朽菌などに応用しやすいことから、幅広い未利用キノコで同様の研究を行うことで更に多様な成分を得ることが出来と考えられる。

また、本研究では主に天然より採取した子実体のほか、培養条件が異なる2通りの菌糸培養物より新規化合物を単離するに至ったが、最近子実体も同様に発生条件の違いにより異なる代謝物を産生する可能性を示唆する研究が報告された。薬用キノコ霊芝の仲間タイより産した *Ganoderma* 属キノコに含まれる triterpene 類に

関する研究では、天然子実体と栽培子実体、菌糸液体培養物から成分探索を行い、それぞれから得られる triterpene 類を調べたところ、単離された計36種類の triterpene 化合物のうち、天然子実体では ganocolossusin A 及び ganodermalactone V、11 β -hydroxycolossolactone VII、ganodermalactone I が、栽培子実体からは ganodermalactone E、W、X が特異的に含まれていることが明らかとなった⁹⁸。この結果より、従来微生物からの新規化合物探索で用いられてきたアプローチはキノコ子実体においても有効である可能性が期待されるため、このような手法を組み合わせればさらに多様な代謝産物が得られるのではないかと考えられる。一方で、近年のゲノム解析により、菌類には通常発現していない膨大な二次代謝物生合成に関する遺伝子が存在していることが明らかとなり、菌類の代謝産物の研究は異種発現系などを用いた遺伝子工学的な手法が主流になりつつある。このような技術は最近担子菌キノコにも応用されるようになり、2019 年にナヨタケ科ヒトヨタケ属のウシグソヒトヨタケ (*Coprinopsis cinerea*) より、lagopodin の生合成研究や新規なシデロホアである coprinoferrin の発見が遺伝子破壊法により行われた^{99,100}。一方、生物が生産する代謝物は全てが酵素反応により生合成される訳ではなく、外来代謝物が修飾されて生じる化合物や非酵素的反応に由来する化合物も多く存在している。環境要因の制御は、遺伝子工学的な手法と比べると簡易性と汎用性の高さに利点があり、膨大な未利用キノコの成分探索を行う上では有利な特徴であるといえる。

キノコの特質を生かした幅広い化合物探索手法を組み合わせ、未利用キノコの成分を調べることで多様な新規二次代謝物が見つかること、そして得られた化合物の中から創薬のリード化合物になるような優れた生理活性物質が見つかることが期待される。

参考文献

1. 長井 長義. 漢藥麻黄成分研究成績. 藥學雜誌 29-35 (1892)
2. 長井 長義. 漢藥麻黄成分研究成績(續). 藥學雜誌 832-860 (1892).
3. Senchenkova, EM. Michael Tswett-the creator of chromatography. (Russian Academy of Science, 2003).
4. Dictionary of natural products. (Taylor & Francis Group, CRC Press, 2020).
5. 斎藤 和季. 植物メタボロミクスーゲノムから解読する植物化学成分. (裳華房, 2019).
6. 巖佐 庸, 倉谷 滋, 斎藤 成也 *et al.* 岩波生物学辞典第5版. (岩波書店, 2013).
7. Endo, A., Kuroda, M. & Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* 29, 1346-1348 (1976).
8. Endo, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* 33, 1569-1582 (1992).

9. Kitchin, J. E. S., Pomeranz, M. K. Pak, G., Washenik, K. *et al.* Rediscovering mycophenolic acid: A review of its mechanism, side effects, and potential uses. *J. Am. Acad. Dermatol.* 37, 445-449 (1997).
10. Hawksworth, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95, 641-655 (1991).
11. 日本菌学会. 菌類の辞典. (朝倉書店, 2013).
12. 今関 六也, 大谷 吉雄, 本郷 次雄. 日本のきのこ 増補改訂新版. (山と溪谷社, 2011).
13. Kluepfel, D., Bagli, J., Baker, H. *et al.* Myriocin, a new antifungal antibiotic from *Myriococcum arbomyces*. *J. Antibiot.* 22, 109-115 (1972).
14. Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S. *et al.* Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211 396-403 (1995).
15. Kavanagh, F., Hervey, A. & Robbins, W. J. Antibiotic

Antibiotic substances from basidiomycetes: VIII. *Pleurotus Multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus Passeckerianus* Pilat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 37, 570–574 (1951).

16. Birch, A. J., Holzapfel, C. W. & Rickards, R. W. The structure and some aspects of the biosynthesis of pleuromutilin. *Tetrahedron* 22, 359–387 (1966).
17. Steglich, W. & Schramm, G. The strobilurins - new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J. Antibiot.* 30, 806–810 (1977).
18. Gunde-Cimerman, N. & Cimerman, A. Pleurotus Fruiting Bodies Contain the Inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase-Lovastatin. *Exp. Mycol.*, 19, 1–6 (1995).
19. Choi, J. H., Fushimi, K., Abe, N. *et al.* Disclosure of the ‘fairy’ of fairy-ring-forming fungus *Lepista sordida*. *ChemBioChem* 11, 1373–1377 (2010).
20. Choi, J. H., Abe N., Tanaka H. *et al.* Plant-growth regulator, imidazole-4-carboxamide, produced by the fairy ring forming fungus *Lepista sordida*. *J. Agric. Food. Chem.* 58, 9956–9959

(2010).

21. 河岸 洋和. “フェアリーリング”の化学と“フェアリー化合物”の植物成長調節剤としての可能性. *化学と生物* 52, 665–670 (2014).
22. Himstedt, R., Wagner S., Jaeger R. J. R. *et al.* Formaldehyde as a chemical defence agent of fruiting bodies of *Mycena rosea* and its role in the generation of the alkaloid mycenarubin C. *ChemBioChem* 21, 1613–1620 (2020).
23. Kawagishi, H., Ando, M., Sakamoto, H. *et al.* Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Heridium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.* 32, 4561–4564 (1991).
24. Kawagishi, H., Ando, M., Shinba, K. *et al.* Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Heridium erinaceum*. *Phytochemistry* 32, 175–178 (1992).
25. Kawagishi, H., Shirai, R., Sakamoto, H. *et al.* Erinapyrones A and B from the cultured mycelia of *Heridium erinaceum*. *Chem. Lett.* 21, 2475–2476 (1992).
26. Kawagishi, H., Shimada, A., Shirai, R. *et al.* Erinacines A, B

and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-
synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*.

Tetrahedron Lett. 35, 1569–1572 (1994).

27. Kawagishi, H., Simada, A., Shizuki, K., *et al.* Erinacine D, a stimulator of NGF-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Heterocycl. Commun.* 2, 51–54 (1996).
28. Kawagishi, H., Shimada, A., Hosokawa, S. *et al.* Erinacines E, F, and G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.* 37, 7399–7402 (1996).
29. 呉 静, 内田 和輝, 石岡 達明, *et al.* ヤマブシタケ(*Hericium erinaceus*)の生活環各段階における生物活性物質の網羅的探索, in 第60回天然有機化合物討論会講演要旨集 367–372 (2018).
30. Wei, J. Cheng, Y., Guo, W. H. *et al.* Molecular Diversity and potential anti-neuroinflammatory activities of cyathane diterpenoids from the basidiomycete *Cyathus africanus*. *Sci. Rep.* 7, 1–14 (2017).
31. Wei, J., Guo, W. H., Cheng, Y. *et al.* Polyoxygenated cyathane diterpenoids from the mushroom *Cyathus africanus*, and their

- neurotrophic and anti-neuroinflammatory activities. *Sci. Rep.* 8, 1–15 (2018).
32. 自然のリスクプロファイル:ツキヨタケ *Omphalotus guepiniformis* (キシメジ科ツキヨタ属). 厚生労働省
(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000142114.html>)
33. 笠原 義正, 伊藤 健. LC/MS/MS によるツキヨタケおよび食中毒原因食品中の illudin S の分析. *食品衛生学雑誌* 50, 167–172 (2009).
34. Matsumoto, T., Shirahama, H., Ichihara, A. *et al.* Structure of lampterol (illudin S). *Tetrahedron* 21, 2671–2676 (1965).
35. Kirchmair, M., Morandell, S., Stolz, D. *et al.* Phylogeny of the genus *Omphalotus* based on nuclear ribosomal DNA-sequences. *Mycologia* 96, 1253–1260 (2004).
36. Mycobank. # 318990 (<https://www.mycobank.org/>.)
37. McMorris, T. C. & Anchel, M. Fungal metabolites. the structures of the novel sesquiterpenoids illudin-S and -M. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 1594–1600 (1965).

38. Kelner, M. J., McMorris, T. C., Beck, W.T., *et al.* Preclinical evaluation of illudins as anticancer agents. *Cancer Res.* 47, 3186–3189 (1987).
39. Kelner, M. J., McMorris, T. C., Estes, L., *et al.* Efficacy of acylfulvene illudin analogues against a metastatic lung carcinoma MV522 xenograft nonresponsive to traditional anticancer agents: retention of activity against various mdr phenotypes and unusual cytotoxicity against ERCC2 and ERCC3 DNA helicases. *Cancer Res.* 55, 4936–4940 (1995).
40. MacDonald, J. R., Muscoplat, C. C., Dexter, D. L. *et al.* Preclinical antitumor activity of 6-hydroxymethylacylfulvene, a semisynthetic derivative of the mushroom toxin illudin S. *Cancer Res.* 57, 279–283 (1997).
41. McMorris, T. C., Kelner, M. J., Wang, W. *et al.* (Hydroxymethyl)acylfulvene: An illudin derivative with superior antitumor properties. *J. Nat. Prod.* 59, 896–899 (1996).
42. McMorris, T. C., Kelner, M. J., Wang, W. *et al.* On the mechanism of toxicity of illudins: the role of glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* 3, 574–579 (1990).

43. Ichihara, A., Shirahama, H. & Matsumoto, T. Dihydroilludin S, a new constituent from *Lampteromyces japonicus*. *Tetrahedron Lett.* 10, 3965–3968 (1969).
44. Kuramoto, M., Tsukihara, T. & Ono, N. Neoilludins A and B, new bioactive components from *Lampteromyces japonicus*. *Chem. Lett.* 28, 1113–1114 (1999).
45. Uno, H., Kuramoto, M. & Miyoshi A. Novel illudin derivatives from *Omphalotus guepiniformis*. in *International Conference on Biodiversity and Natural Products* 23–28 (1999).
46. McMorris, T. C., Nair, M. S. R. & Anchel, M. Structure of illudol, a sesquiterpenoid triol from *Clitocybe illudens*. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 4562–4563 (1967).
47. Arnon, A., Cardillo, R., Nasini, G. *et al.* Secondary mould metabolites. Part 34. Isolation and structure elucidation of illudosin, a novel sesquiterpene from *Clitocybe illudens* using one and two dimensional NMR techniques. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 8, 1787–1791 (1991).
48. Nair, M. S. R., Takeshita, H., McMorris, T. C. *et al.* Metabolites of *Clitocybe illudens*. IV. Illudalic acid, a

- sesquiterpenoid, and illudinine, a sesquiterpenoid alkaloid. *J. Org. Chem.* 34, 240–243 (1969).
49. Arnone, A., Cardillo, R., Nasini, G. *et al.* Secondary mould metabolites. Part 31. Isolation and structure elucidation of illudins A and B, and illudalenol, new sesquiterpenoids from *Clitocybe illudens*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 4, 733–737 (1991).
50. McMorris, T. C., Lira, R., Gantzel, P. K., *et al.* Sesquiterpenes from the basidiomycete *Omphalotus illudens*. *J. Nat. Prod.* 63, 1557–1559 (2000).
51. McMorris, T. C., Kashinatham, A., Lira, R. *et al.* Sesquiterpenes from *Omphalotus illudens*. *Phytochemistry* 61, 395–398 (2002).
52. Wawrzyn, G. T., Quin, M. B., Choudhary, S. *et al.* Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in basidiomycota. *Chem. Biol.* 19, 772–783 (2012).
53. Sterner, O., Etzel, W., Mayer, A. *et al.* Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematocidal activity from

Omphalotus olearius II. Isolation and Structure Determination. *Nat. Prod. Lett.* 10, 33–38 (1997).

54. Mayer, A., Anke, H. & Sterner, O. Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematocidal activity from *Omphalotus olearius* I. Fermentation and biological activity. *Nat. Prod. Lett.* 10, 25–32 (1997).
55. Büchel, E., Martini, U., Mayer, A. *et al.* Omphalotins B, C and D, nematocidal cyclopeptides from *Omphalotus olearius*. Absolute configuration of omphalotin A. *Tetrahedron* 54, 5345–5352 (1998).
56. Jian-Wen, T., Ze-Jun, D. & Ji-Kai, L. New Terpenoids from Basidiomycetes *Russula lepida*. *Helv. Chim. Acta* 83, 3191–3197 (2000).
57. Yoshikawa, K., Kaneko, A., Matsumoto, Y. *et al.* Russujaponols A–F, illudoid sesquiterpenes from the fruiting body of *Russula japonica*. *J. Nat. Prod.* 69, 1267–1270 (2006).
58. Yoshikawa, K., Matsumoto, Y., Hama, H., *et al.* Russujaponols G–L, illudoid sesquiterpenes, and their neurite outgrowth promoting activity from the fruit body of *Russula japonica*.

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 57, 311-314 (2009).

59. Malagòn, O., Porta, A., Clericuzio, M., *et al.* Structures and biological significance of lactarane sesquiterpenes from the European mushroom *Russula nobilis*. *Phytochemistry* 107, 126-134 (2014).
60. 青木 聡樹. ツキヨタケ (*Omphalotus guepiniformis*) 子実体に含まれる成分の探索. 修士論文 (2018)
61. Aoki, S., Aboshi, T., Shiono, Y. *et al.* Constituents of the fruiting body of poisonous mushroom *Omphalotus japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* 68, 436-442 (2020).
62. Xie, H. H, Xu, X. Y., Dan, Y. *et al.* Novel sesquiterpenes from the mycelial cultures of *Dichomitus squalens*. *Helv. Chim. Acta* 94, 868-874 (2011).
63. Kawagishi, H., Katsumi, R., Sazawa, T., *et al.* Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry* 27, 2777-2779 (1988).
64. Endo, M., Kajiwarra, M. & Nakanishi, K. Fluorescent constituents and cultivation of *Lampteromyces japonicus*. *J.*

Chem. Soc. D Chem. Commun. 309 (1970).

65. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., *et al.* Gaussian R. B., 09, Gaussian, Inc., Wallingford CT, (2010).
66. Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* 17, 490–519 (1996).
67. Arayama, M., Uesugi, S., Tanaka, K., *et al.* Homojesterones: vinylogous analogues of jesterone from *Helminthosporium velutinum* TS28. *Tetrahedron* 72, 1031–1035 (2016).
68. 吉田 潤. Ca²⁺シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母に対して作用する機能性物質の標的分子の解析. 博士論文 (2011).
69. Arnone, A., Cardillo, R., Di Modugno, V. *et al.* Secondary mould metabolites. Part 29. Isolation and structure elucidation of candicansol, 3-epi-illudol and 1-O-acetyl-3-epi-illudol, novel sesquiterpenoids from *Clitocybe candicans*, and absolute configuration of 3-epi-illudol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 11, 1995–2000 (1989).
70. Burgess, M. L. & Barrow, K. D. Biosynthesis of illudosin, a

- fomannosane-type sesquiterpene, by the Basidiomycete *Omphalotus nidiformis*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 17, 2461–2466 (1999).
71. Hanson, J. R., Marten, T. & Nyfeler, R. Studies in terpenoid biosynthesis. Part XV. Biosynthesis of the sesquiterpenoid illudin M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 8, 876–880 (1976).
 72. Tanaka, K., Inoue, T., Tezuka, Y. & Kikuchi, T. Michael-Type addition of illudin S, a toxic Substance from *Lampteromyces japonicus*, with cysteine and cysteine-containing peptides *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 273–279 (1996).
 73. Shitamukai, A., Mizunuma, M., Hirata, D., *et al.* A positive screening for drugs that specifically inhibit the Ca²⁺ - signaling activity on the basis of the growth promoting effect on a yeast mutant with a peculiar phenotype. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1942–1946 (2000).
 74. Burgess, M. L., Zhang, Y. L. & Barrow, K. D. Characterization of new illudanes, illudins F, G, and H from the Basidiomycete *Omphalotus nidiformis*. *J. Nat. Prod.* 62, 1542–1544 (1999).
 75. Cai, J., Zhao, L. & Zhang, D. Chemical constituents from

- Bletilla ochracea* Schltr. *Chem. Res. Chinese Univ.* 23, 705–707 (2007).
76. Morisaki, N., Furukawa, J., Kobayashi, H., *et al.* Conversion of 6-protoilludene into illudin-M and -S by. *Tetrahedron Lett.* 26, 4755–4758 (1985).
 77. Sawabe, A., Morita, M., Ouchi, S. *et al.* Fast atom bombardment mass spectrometry and linked scan analyses at constant B/E in the structural characterizaton of new polyisoprenepolyols isolated from an edible mushroom (*Hypsizigus marmoreus*). *J. Mass Spectrom.* 31, 921–925 (1996).
 78. Sawabe, A., Morita, M., Kiso, T. *et al.* Structural analyses of a precursory substance of bitterness: new polyisoprenepolyols isolated from an edible mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 47, 588–593 (1999).
 79. Yang, Y.H., Yang D. S., Li. G.H. *et al.* Antibacterial diketopiperazines from an endophytic fungus *Bionectria sp.* Y1085. *J. Antibiot.* 72, 752–758 (2019).

80. Nishida, H., Huang, X. H., Tomoda, H. *et al.* Glisoprenins, new inhibitors of acyl-CoA: Cholesterol acyltransferase produced by *Gliocladium* sp. FO-1513. II. Structure elucidation of glisoprenins A and B. *J. Antibiot.* 45, 1669–1676 (1992).
81. Nozoe, S., Koike, Y., Kusano, G. *et al.* Structure of gymnopilin, a bitter principle of an hallucinogenic mushroom,. *Tetrahedron Lett.* 24, 1735–1736 (1983).
82. Nozoe, S., Koike, Y., Ito, N. *et al.* Isolation and structure of gymnoprenol-D, a homologous series of fully hydrated polyisoprenepolyol from *Gymnopilus spectabilis*. *Chem. Lett.* 13, 1001–1002 (1984).
83. Findlay, J. A. & He, Z. Minor Constituents of *Gymnopilus spectabilis*. *J. Nat. Prod.* 54, 184–189 (1991).
84. Tanaka, M., Hashimoto, K., Okuno, T., *et al.* Neurotoxic oligoisoprenoids of the hallucinogenic mushroom, *Gymnopilus spectabilis*. *Phytochemistry* 34, 661–664 (1993).
85. Kim, K. H., Choi, S. U. & Lee, K. R. Gymnopilin K: a new cytotoxic gymnopilin from *Gymnopilus spectabilis*. *J. Antibiot.* 65, 135–137 (2012).

86. 田中 正泰, 針ヶ谷 弘子, 鎌田 樹志, *et al.* おおわらいたけの神経興奮性成分: ジムノピリンについて. in 天然有機化合物討論会講演要旨集 110-117 (1992).
87. Miyazaki, S., Kitamura, N., Nishio, A., *et al.* Gymnopilin-a substance produced by the hallucinogenic mushroom, *Gymnopilus junonius*-mobilizes intracellular Ca^{2+} in dorsal root ganglion cells. *Biomed. Res.* 33, 111-118 (2012).
88. Chang, J. S., Son, J. K., Li, G. *et al.* Inhibition of cell cycle progression on HepG2 cells by hypsiziprenol A₉, isolated from *Hypsizigus marmoreus*. *Cancer Lett.* 212, 7-14 (2004).
89. Akihisa, T., Franzblau, S. G., Tokuda, H., *et al.* Antitubercular activity and inhibitory effect on Epstein-Barr virus activation of sterols and polyisoprenepolyols from an edible mushroom, *Hypsizigus marmoreus*. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1117-1119 (2005).
90. Mizutani, S. Kawai, T, Enoki, R. *et al.* Tumor-growth inhibitory activity of the terpene compound isolated from buna-shimeji mushroom. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 53, 55-61 (2006).

91. Mizumoto, H., Onogi, H, Mizutani, S. *et al.* Mechanism of apoptosis induced by polyterpene from buna-shimeji (*Hypsizigus marmoreus*) in HL-60 Cells. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 55, 612–618 (2008).
92. Castronovo, F., Clericuzio, M., Toma, L. *et al.* Fungal metabolites. Part 45: The sesquiterpenes of *Collybia maculata* and *Collybia peronata*. *Tetrahedron* 57, 2791–2798 (2001).
93. Gupta, A., Gomes, I., Bobeck, E. N. *et al.* Collybolide is a novel biased agonist of κ -opioid receptors with potent antipruritic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 6041–6046 (2016).
94. Ortega, A., Blount, J. F. & Manchand, P. S. Salvinorin, a new trans-neoclerodane diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 10, 2505–2508 (1982).
95. Roth, B. L., Baner, K., Westkaemper, R. *et al.* Salvinorin A: A potent naturally occurring nonnitrogenous opioid selective agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11934–11939 (2002).
96. Thongbai, B. *et al.* Gymnopalynes A and B, Chloropropynyl-

isocoumarin Antibiotics from Cultures of the Basidiomycete *Gymnopus sp.* *J. Nat. Prod.* 76, 2141–2144 (2013).

97. Ványolós, A. Surup, F., Mohr, K. *et al.* Gymnopeptides A and B, cyclic octadecapeptides from the mushroom *Gymnopus fusipes*. *Org. Lett.* 18, 2688–2691 (2016).
98. Isaka, M., Chinthanom, P., Choeyklin, R. *et al.* Highly modified lanostane triterpenes from the wood-rot Basidiomycete *Ganoderma colossus*: Comparative chemical investigations of natural and artificially cultivated fruiting bodies and mycelial cultures. *J. Nat. Prod.* 83, 2066–2075 (2020).
99. Masuya, T., Tsunematsu, Y., Hirayama, Y. *et al.* Biosynthesis of lagopodins in mushroom involves a complex network of oxidation reactions. *Org. Biomol. Chem.* 17, 234–239 (2019).
100. Tsunematsu, Y., Takanishi, J., Asai, S. *et al.* Genomic mushroom hunting decrypts coprinoferrin, a siderophore secondary metabolite vital to fungal cell development. *Org. Lett.* 21, 7582–7586 (2019).

謝辞

本研究を行うに当たり懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました山形大学農学部 村山 哲也 教授に感謝申し上げます。また、ESI-MS 測定をはじめ機器分析や構造解析に当たりご指導、ご助言を戴きました山形大学農学部 網干 貴子 准教授、細胞毒性試験や酵母の生育回復活性試験など各種生理活性試験を行っていただきました論文執筆にあたりご指導ご助言いただきました岩手大学農学部 木村 賢一 教授、本論文のご校閲とご教示を賜りました弘前大学農学部 橋本 勝 教授に感謝申し上げます。

本研究において ECD 装置をお貸ししてくださいました山形大学工学部の今野 博行 教授、ECD 計算並びに菌糸培養に関するご指導ご助言いただきました山形大学農学部 塩野 義人 教授、FAB-MS 測定をしてくださり、また主論文執筆時にご指導いただきました東北医科薬科大学の村田 敏拓 先生、EI-MS 測定をしてくださいました山形大学工学部 松葉 滋 先生、ツキヨタケのサンプリングと同定をしてくださいました山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センターの新井 大輔 様並びに飯塚 禎明 様に感謝いたします。そしてこれまで様々な面で支えてくださいました山形大学農学部生物有機化学研究室並びに発酵制御学研究室、岩手大学農学部天然物生化学研究室内の皆様、卒業生・関係者の皆様に感謝いたします。

また、本研究ではクラウドファンディングプロジェクト「キノコの知られざる有用性や化学成分の多様性を探索する！

(<https://academist-cf.com/projects/171?lang=ja>)」及びファンクラブプロジェクト「キノコからの新たな化合物探索法を確立したい！

(<https://academist-cf.com/fanclubs/175>)」による支援を受けています。

ご支援いただきました皆様に心より感謝申し上げます。特にクラウドファンディングにおきましては阿部 尚美 様、飯島 明子 様、前川 慶之 様、小波 秀雄 様、松岡

秀達 様、梅本 里穂 様、菊地 武志 様より多大な御支援を頂きました(順不同)。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

補足資料

【検体名】 YU0J

【塩基配列データ】 解析塩基数： 292bp

AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAATGTTTTGAAGGGGACTGTTGCTGGCCTTGTAACAAAGGCATGTGCACGTTTCC
TTTCAATCTATTATCCACCTGTGCACCTTTCTGTAGAAGCTTTTCAGGTCGTTGTTAGGGGCTGTACTTCAGTGCAGCTCTG
TTGATGATTCTGGGCTTCTATGTCTTACAACTCTAATAAATGAATTGAATGTCTCTTTATTGGTACTTAATTGGACCTTTA
AAACTTATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG

【上記配列を使用した BLAST 検索結果より推定した菌種名 (上位データ)】

Accession	分類名	Score	E-Value	相同性(%)
LC198705.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	540	2e-149	100.00%
KJ713987.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	540	2e-149	100.00%
KJ395102.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	540	2e-149	100.00%
KJ395101.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	540	2e-149	100.00%
KJ395100.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	534	8e-148	99.66%
AY313286.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	534	8e-148	100.00%
LN714578.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	512	4e-141	99.30%
LC274965.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	508	5e-140	99.64%
AB301601.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	508	5e-140	99.64%
AY534113.1	<i>Omphalotus japonicus</i>	508	5e-140	99.64%

【配列比較結果 (上位のみ)】

[LC198705.1](#) Length: 787 Number of Matches: 1

Omphalotus japonicus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S, strain: FFPRI 460502

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
540 bits(292)	2e-149 ()	292/292 (100%)	0/292 (0%)	Plus/Plus
Query 1	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAATGTTTTGAAGGGGACTGTTGCTGGCCTTG	60		
Sbjct 30	AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAATGTTTTGAAGGGGACTGTTGCTGGCCTTG	89		
Query 61	TAACAAAGGCATGTGCACGTTTCCTTTCAATCTATTATCCACCTGTGCACCTTTCTGTA	120		
Sbjct 90	TAACAAAGGCATGTGCACGTTTCCTTTCAATCTATTATCCACCTGTGCACCTTTCTGTA	149		
Query 121	GAAGCTTTTCAGGTCGTTGTTAGGGGCTGTACTTCAGTGCAGCTCTGTTGATGATTCTG	180		
Sbjct 150	GAAGCTTTTCAGGTCGTTGTTAGGGGCTGTACTTCAGTGCAGCTCTGTTGATGATTCTG	209		
Query 181	GGCTTCTATGTCTTACAACTCTAATAAATGAATTGAATGTCTCTTTATTGGTACTTA	240		
Sbjct 210	GGCTTCTATGTCTTACAACTCTAATAAATGAATTGAATGTCTCTTTATTGGTACTTA	269		

```

Query 241 ATTGGACCTTTAAACTTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG 292
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 270 ATTGGACCTTTAAACTTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG 321

```

Fig. S 1 ツキヨタケ菌糸 YUOJ0825 株シーケンス解析の BLAST 検索の結果

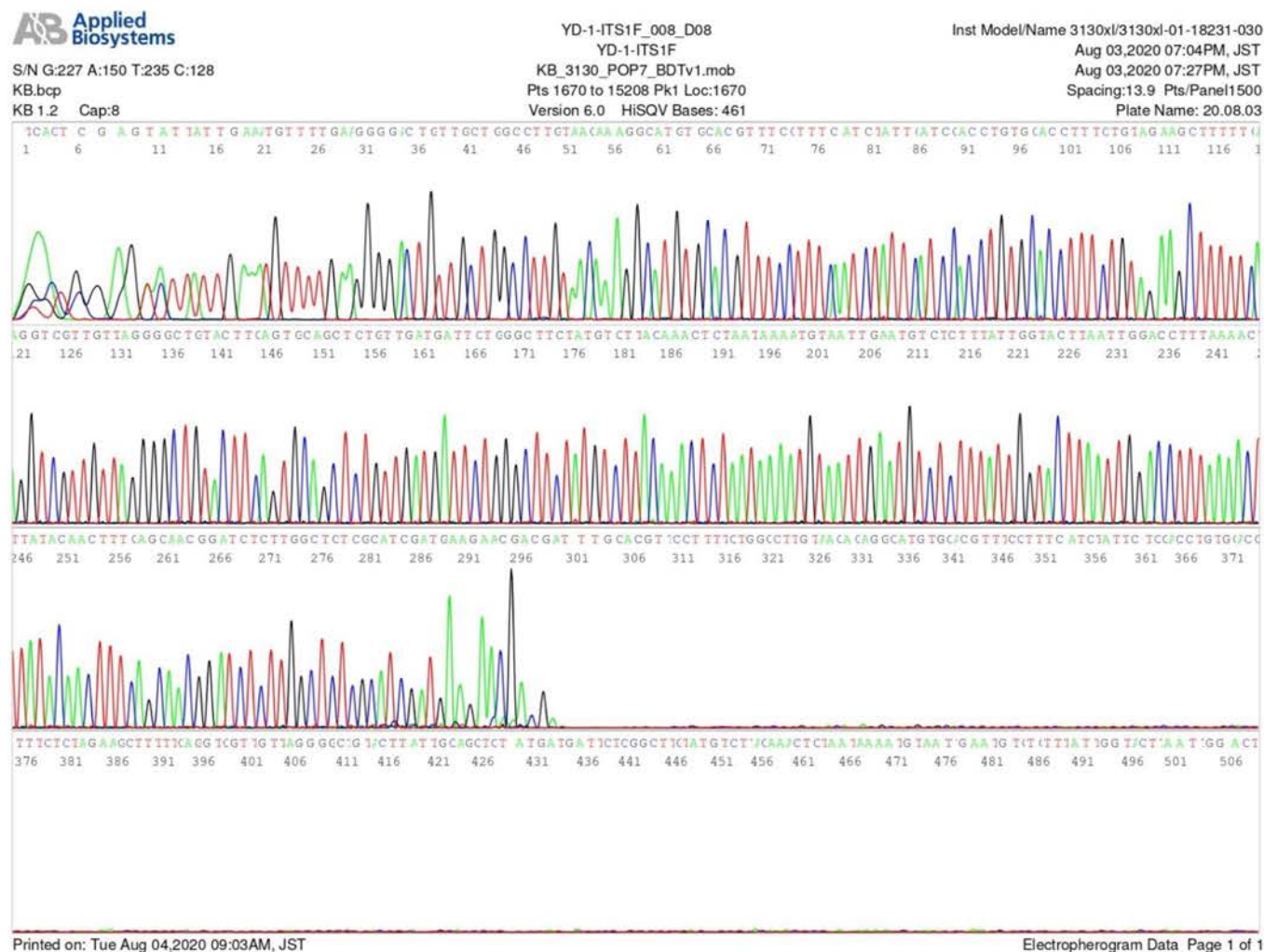


Fig. S 2 ITS1F プライマーによる YUOJ0825 株のシーケンス解析の結果

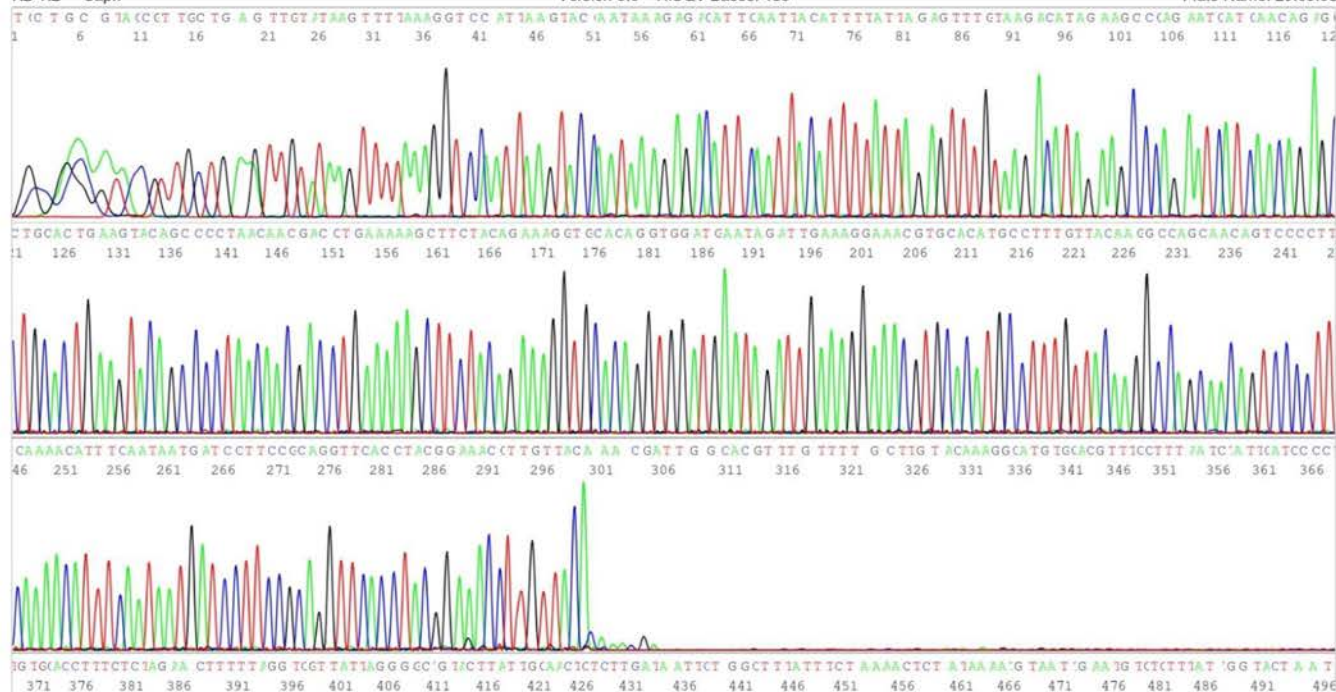


Fig. S 3 ITS1R プライマーによる YUOJ0825 株のシーケンス解析の結果

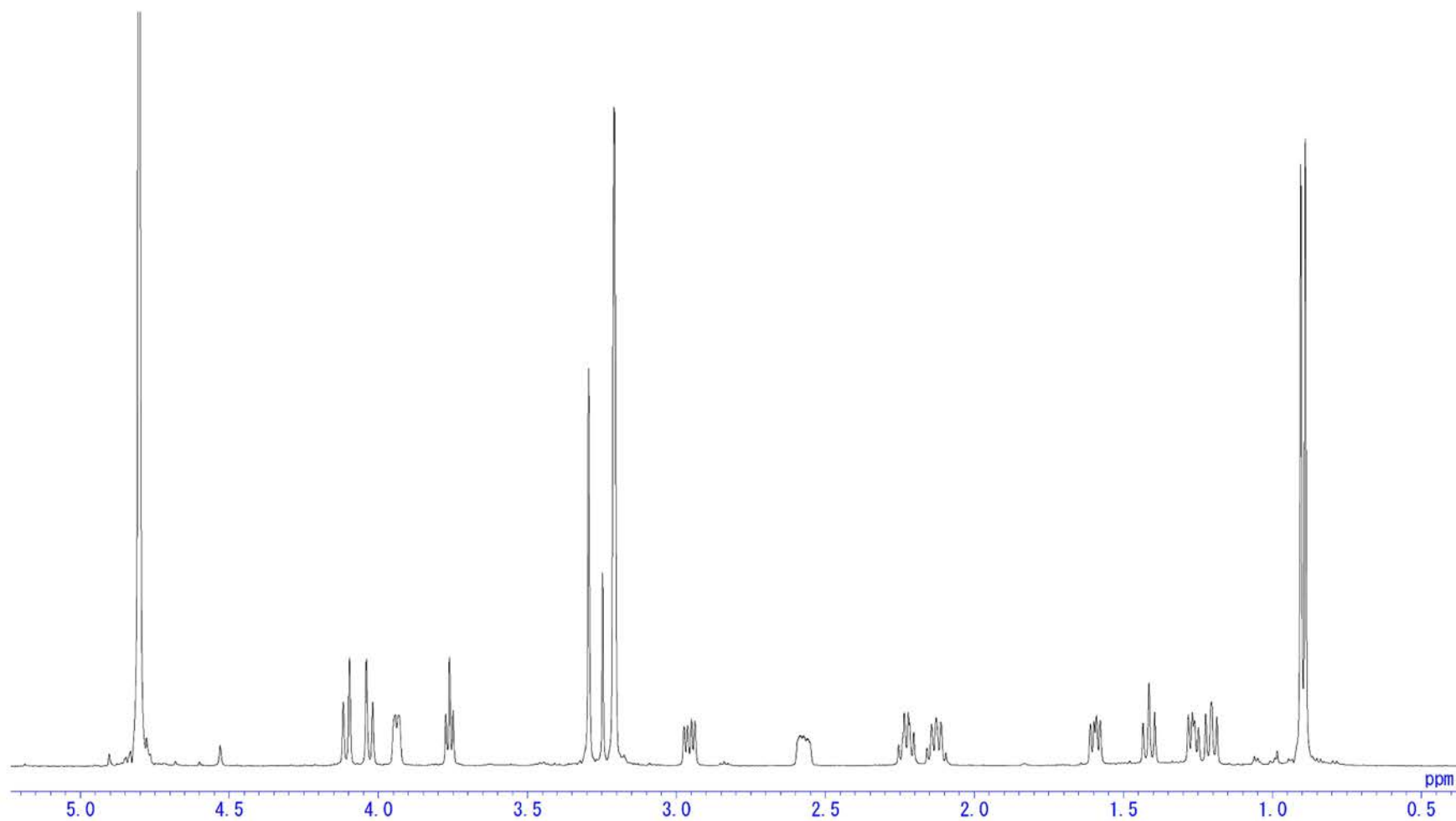


Fig. S 4 Tsukiyol A の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CD_3OD)

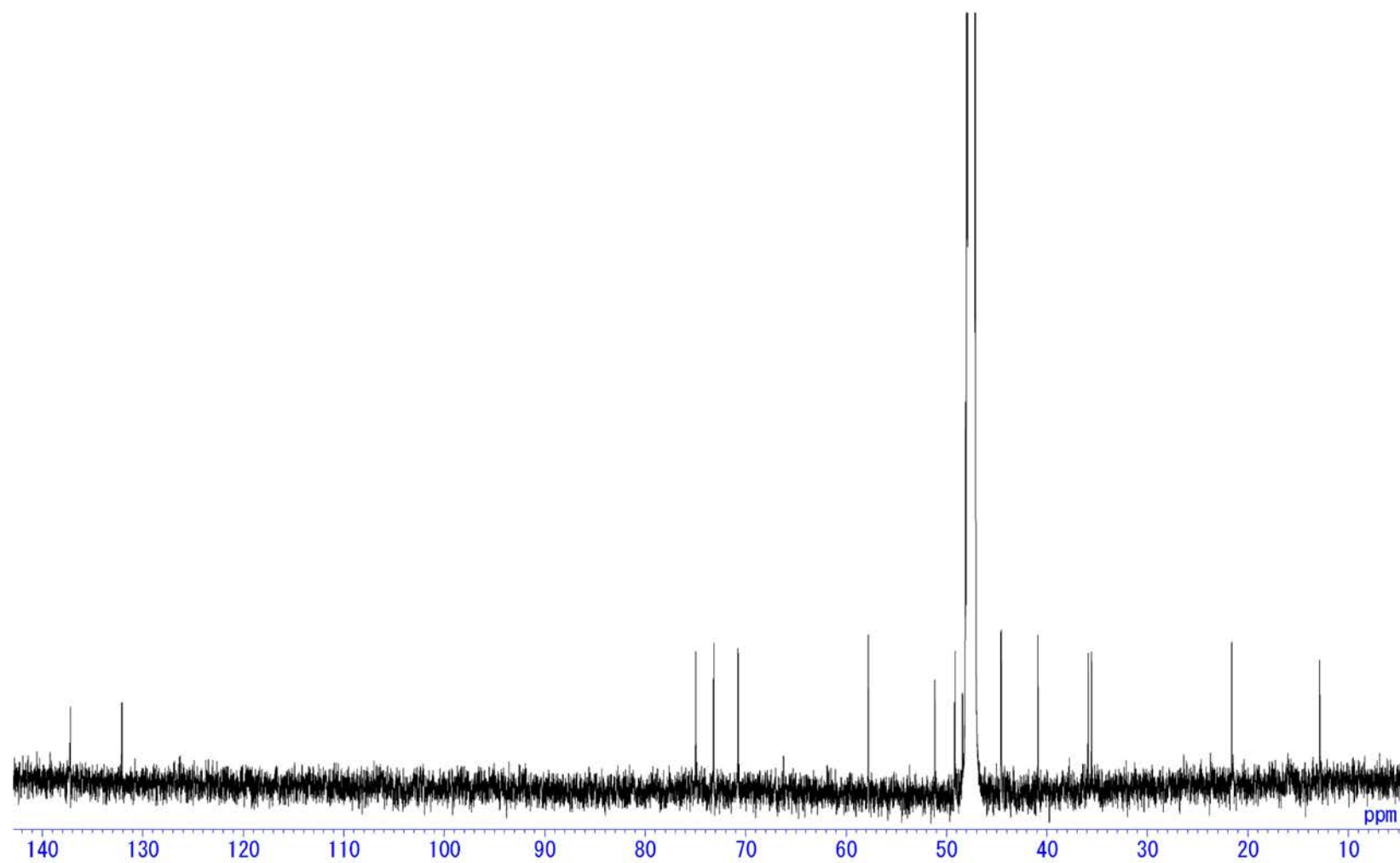


Fig. S 5 Tsukiyol A の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CD_3OD)

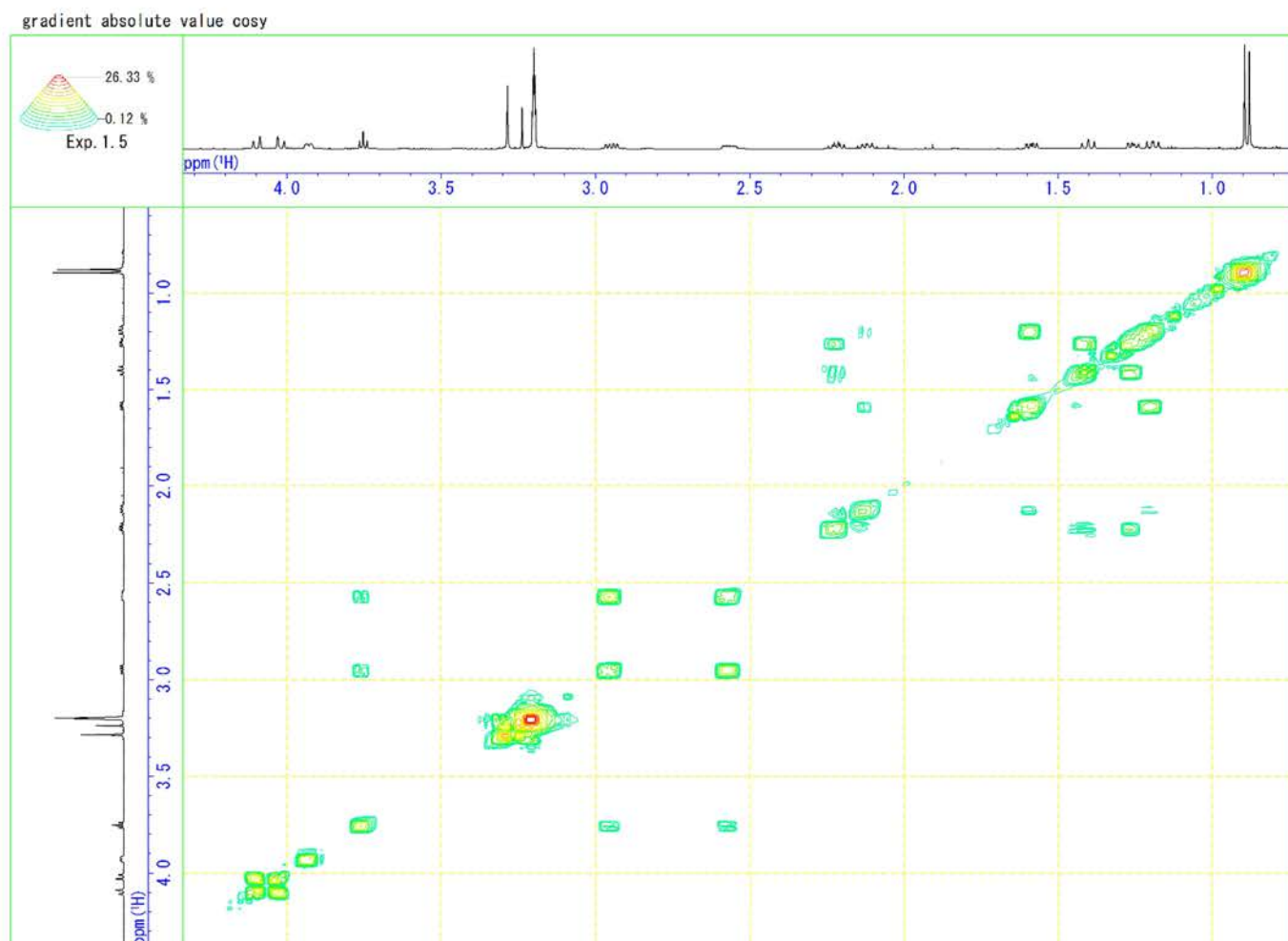


Fig. S 6 Tsukiyol A の ^1H - ^1H COSY (CD_3OD)

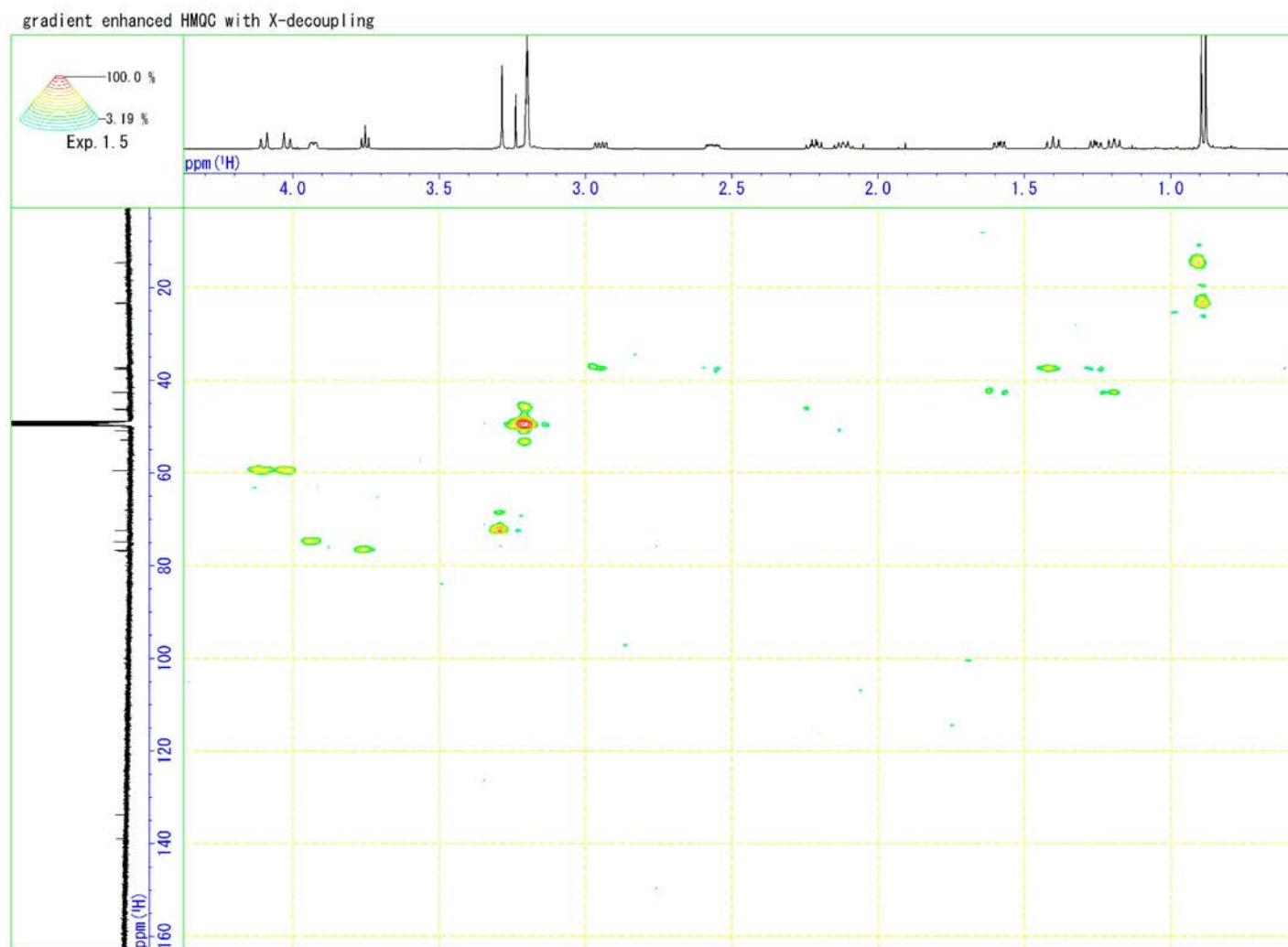


Fig. S 7 Tsukiyol A の HMQC (CD_3OD)

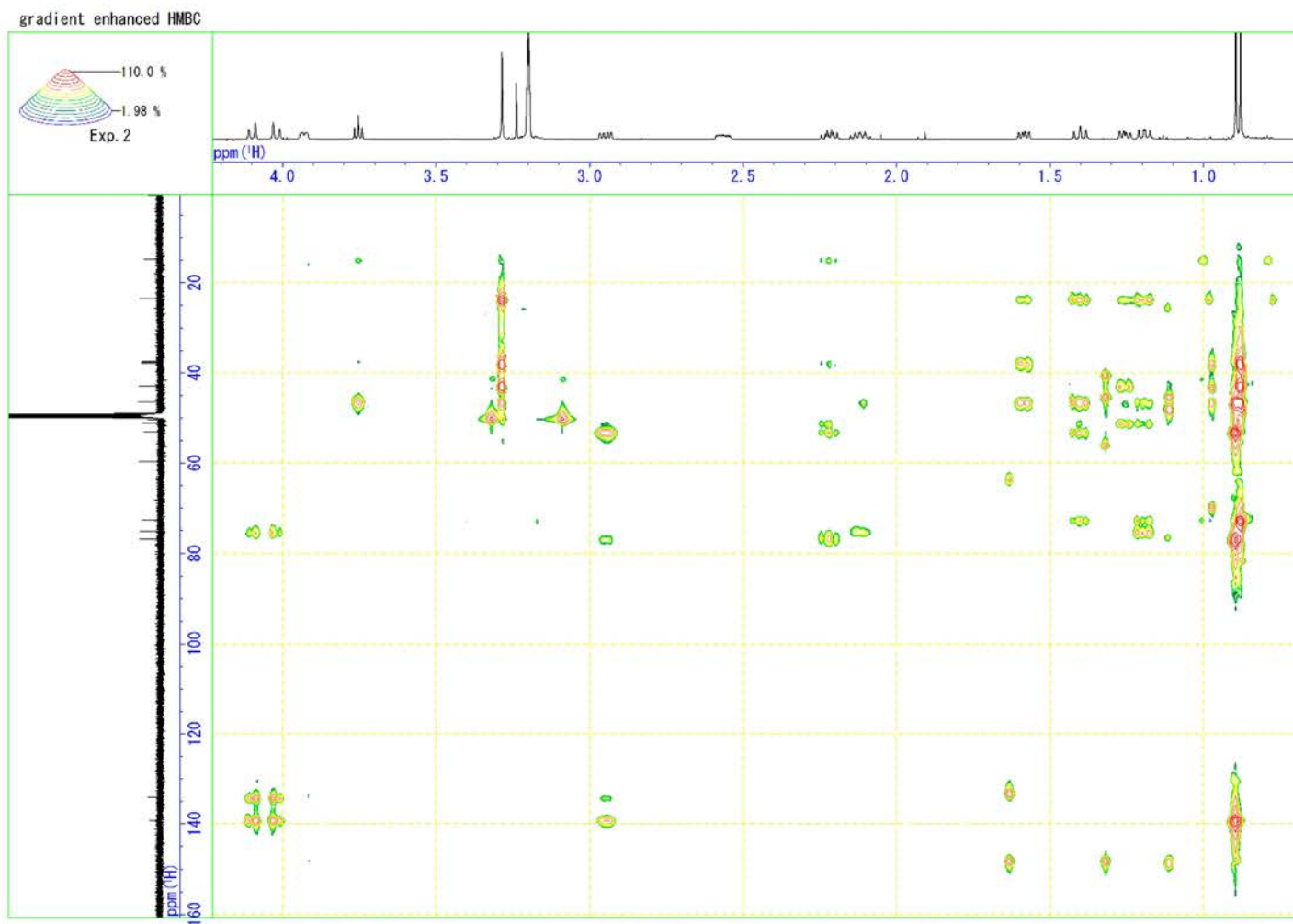


Fig. S 8 Tsukiyol A の HMBC (CD_3OD)

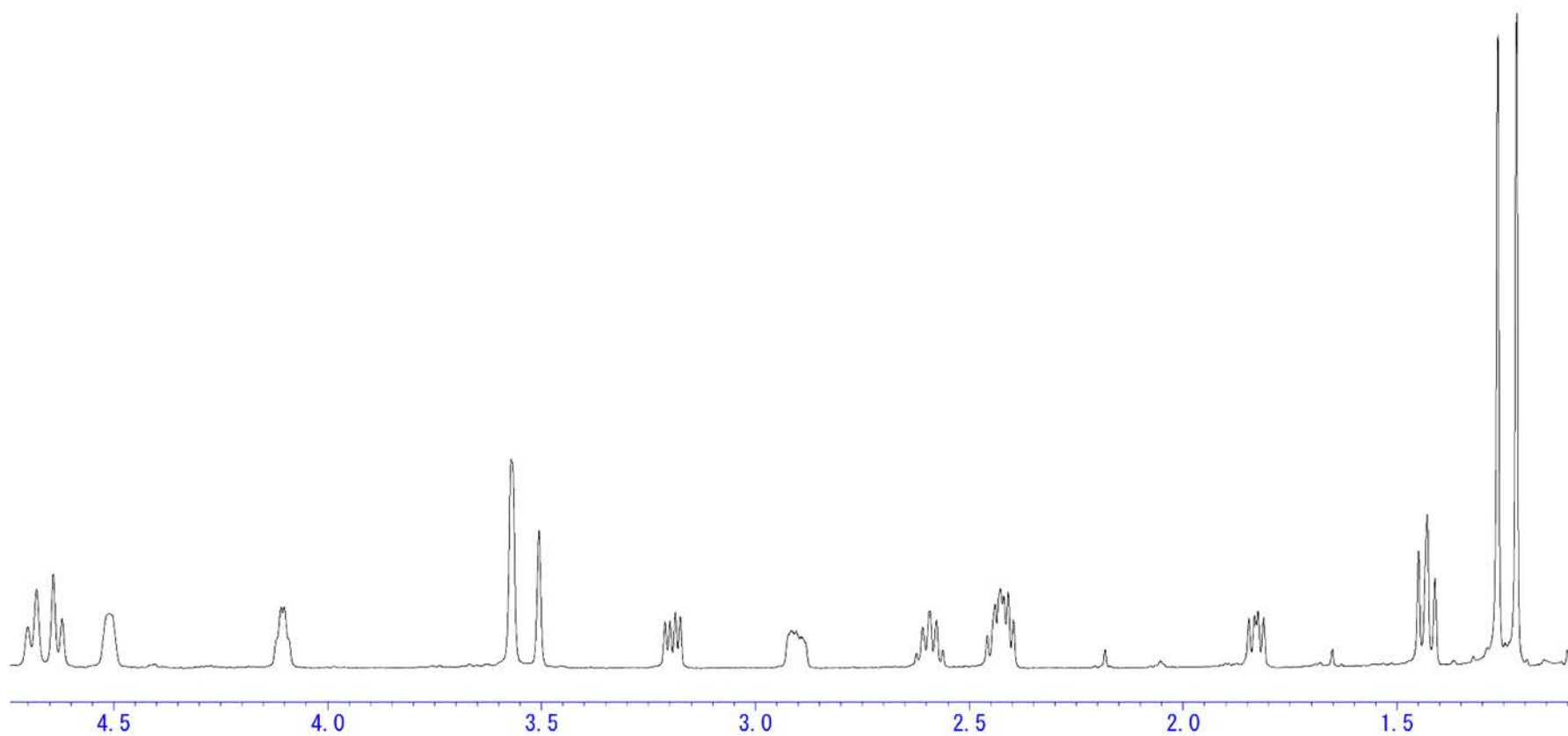


Fig. S 9 Tsukiyol B の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

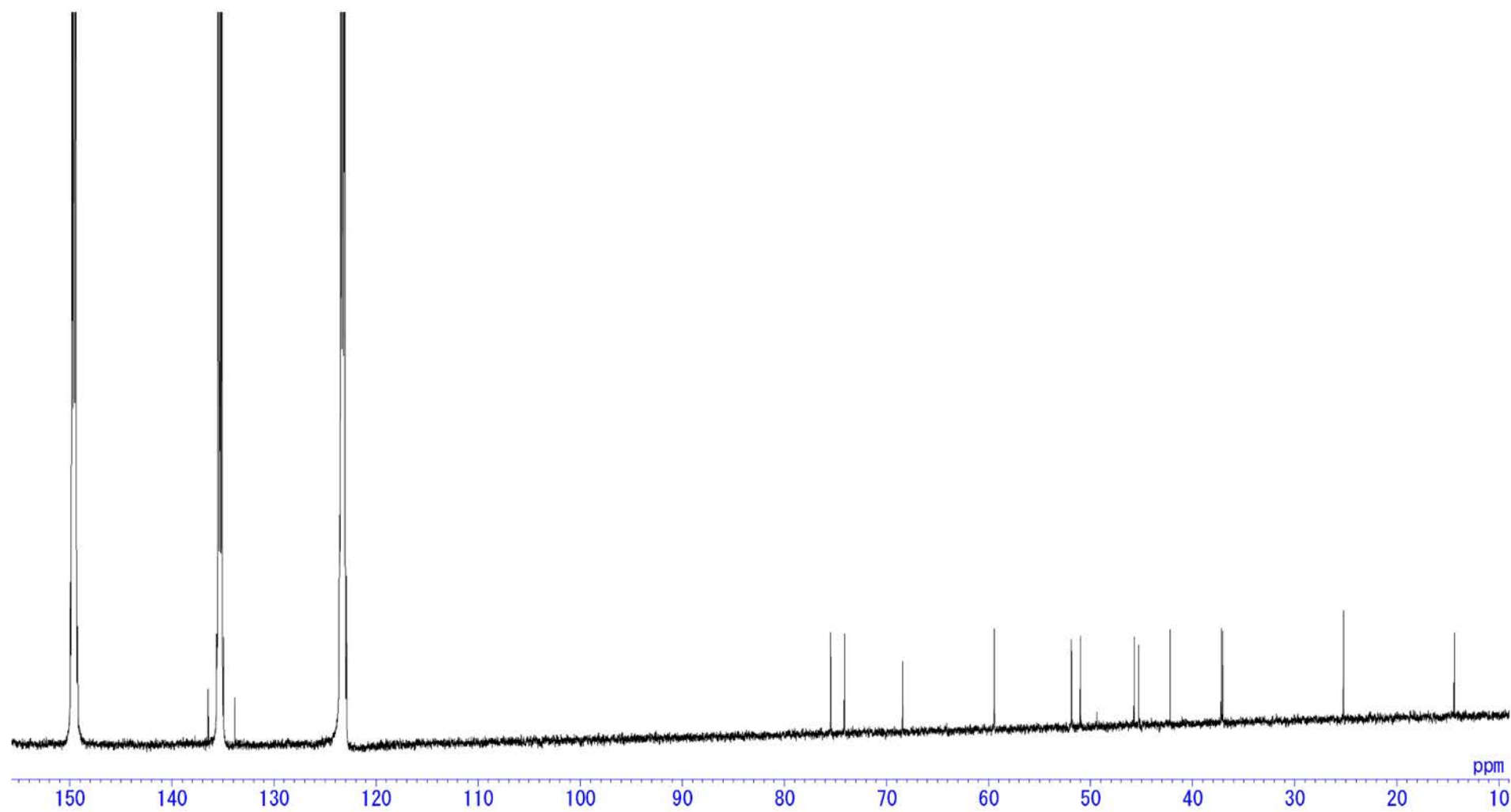


Fig. S 10 Tsukiyol B の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

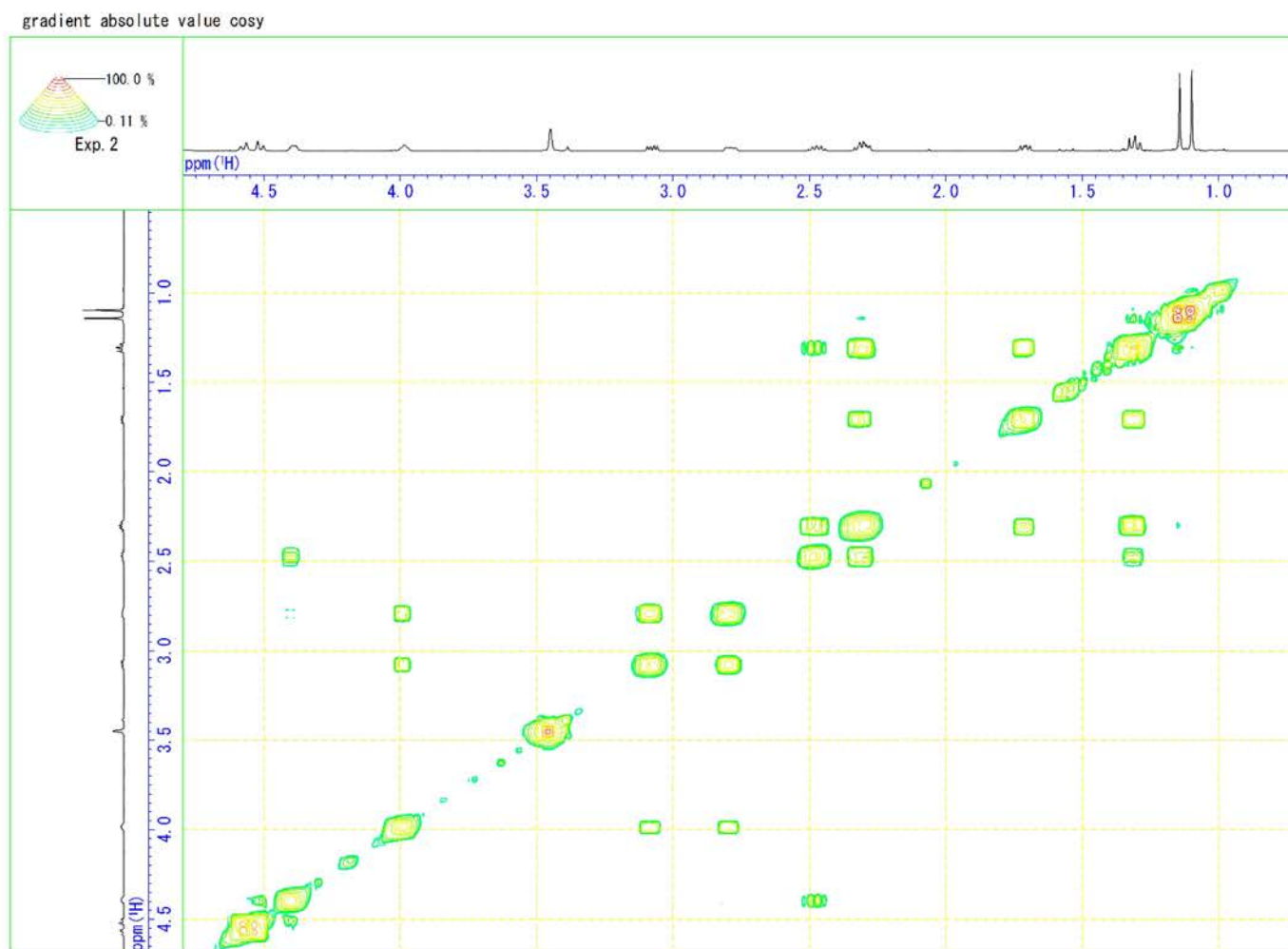


Fig. S 11 Tsukiyol B の ^1H - ^1H COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

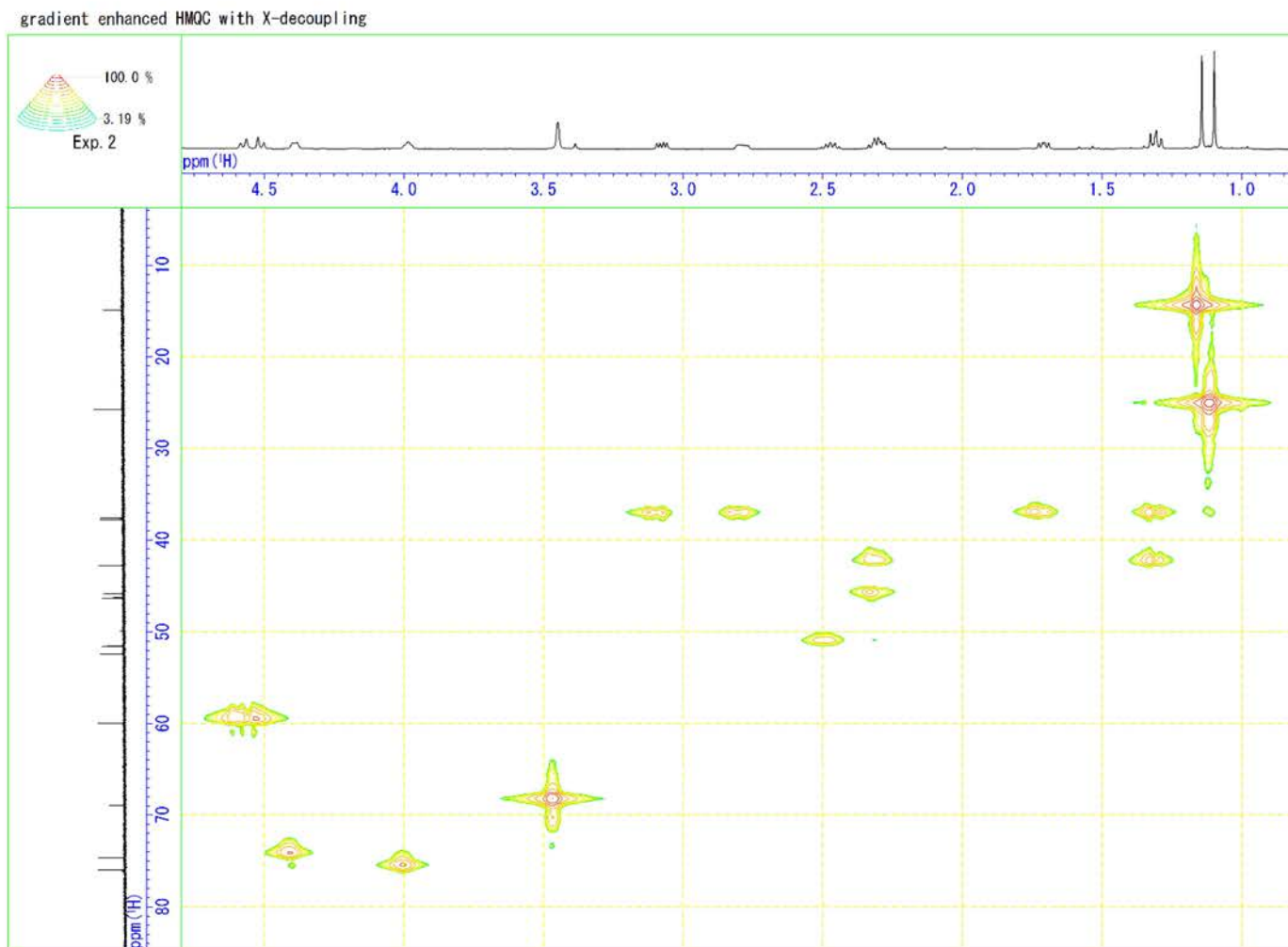


Fig. S 12 Tsukiyol B の HMQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

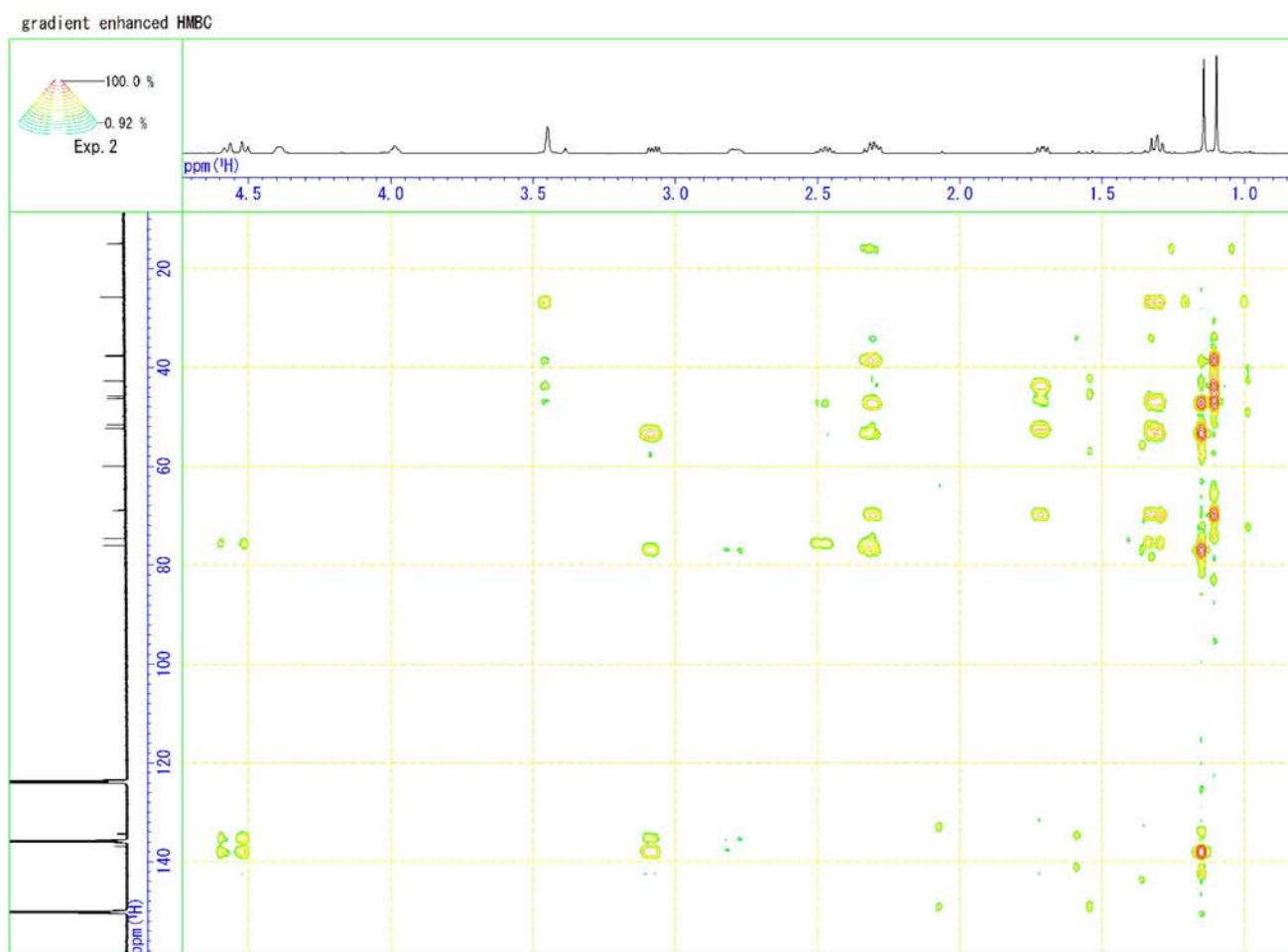


Fig. S 13 Tsukiyol B の HMBC (C5D₅N)

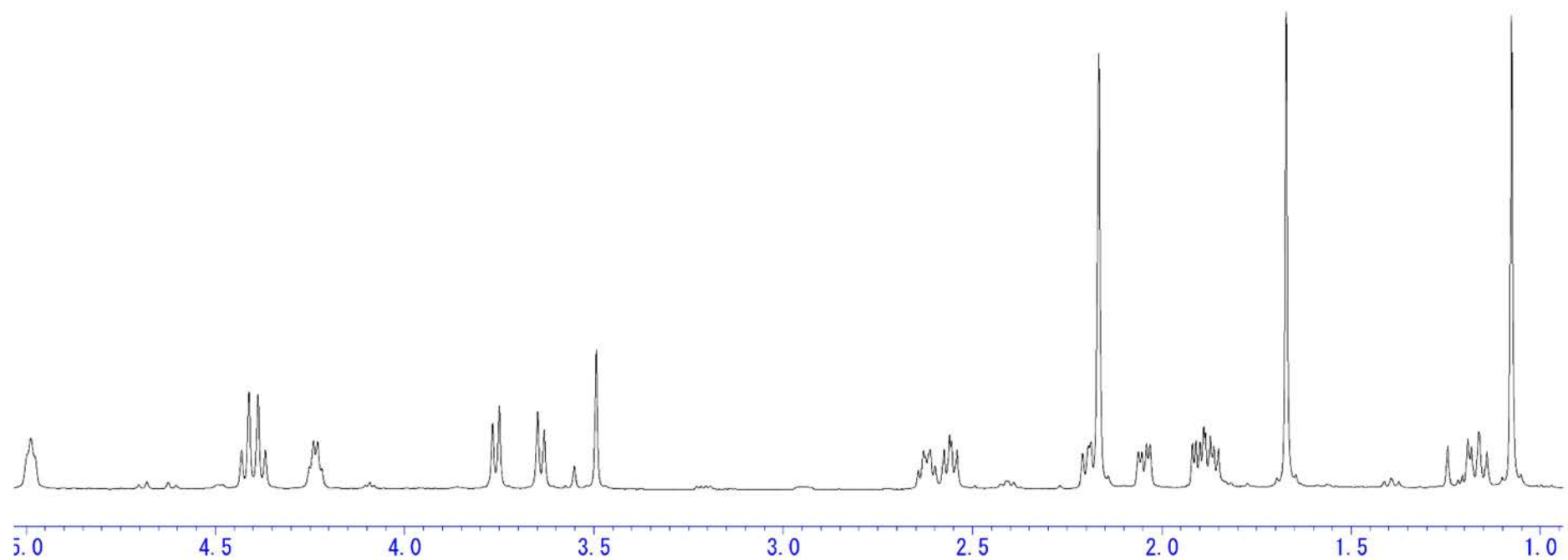


Fig. S 14 Tsukiyol C の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ + 2.5 % D_2O)

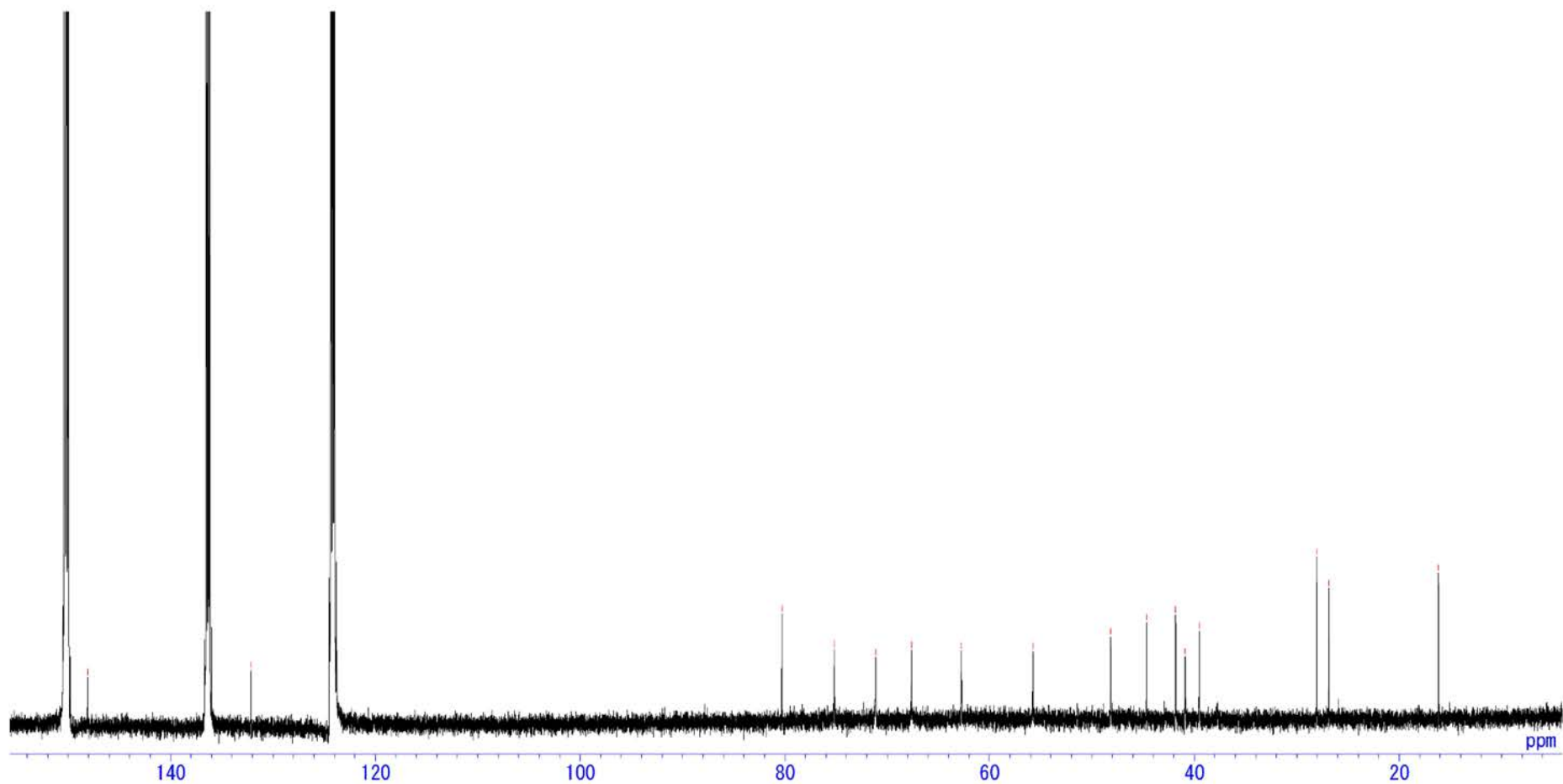


Fig. S 15 Tsukiyol C の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ + 2.5 % D_2O)

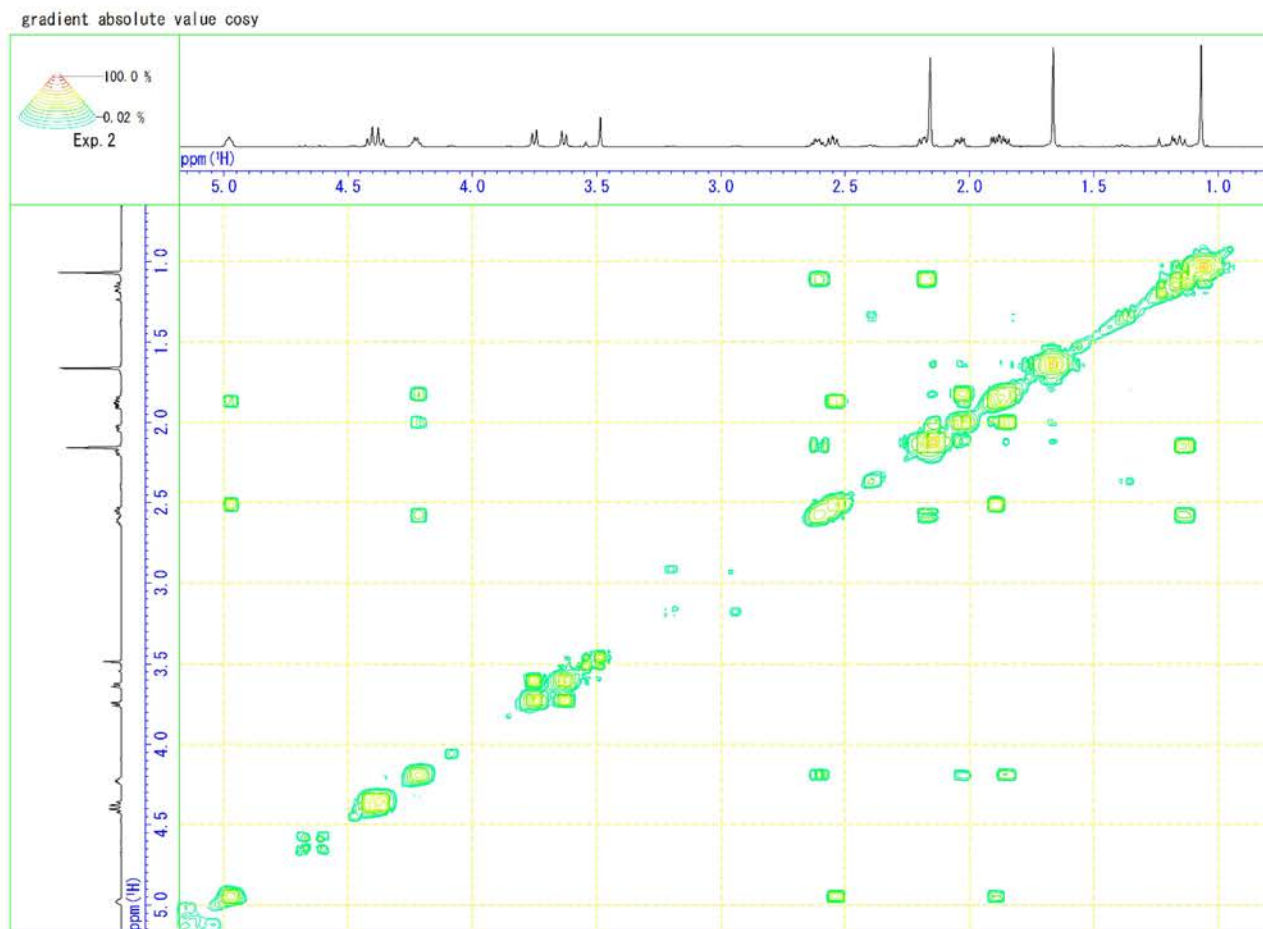


Fig. S 16 Tsukiyol C の ^1H - ^1H COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ + 2.5 % D_2O)

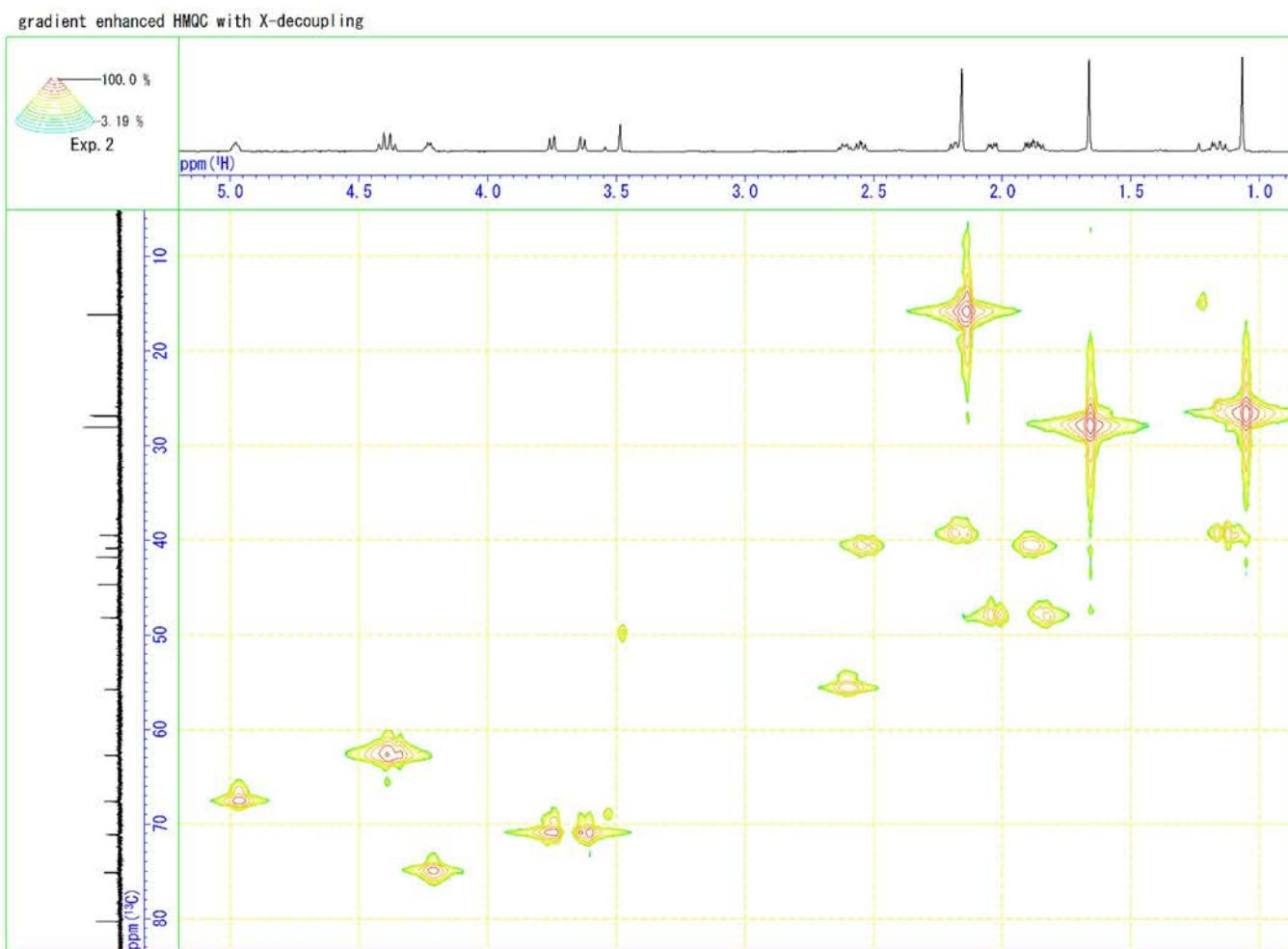


Fig. S 17 Tsukiyol C の HMQC (C₅D₅N + 2.5 % D₂O)

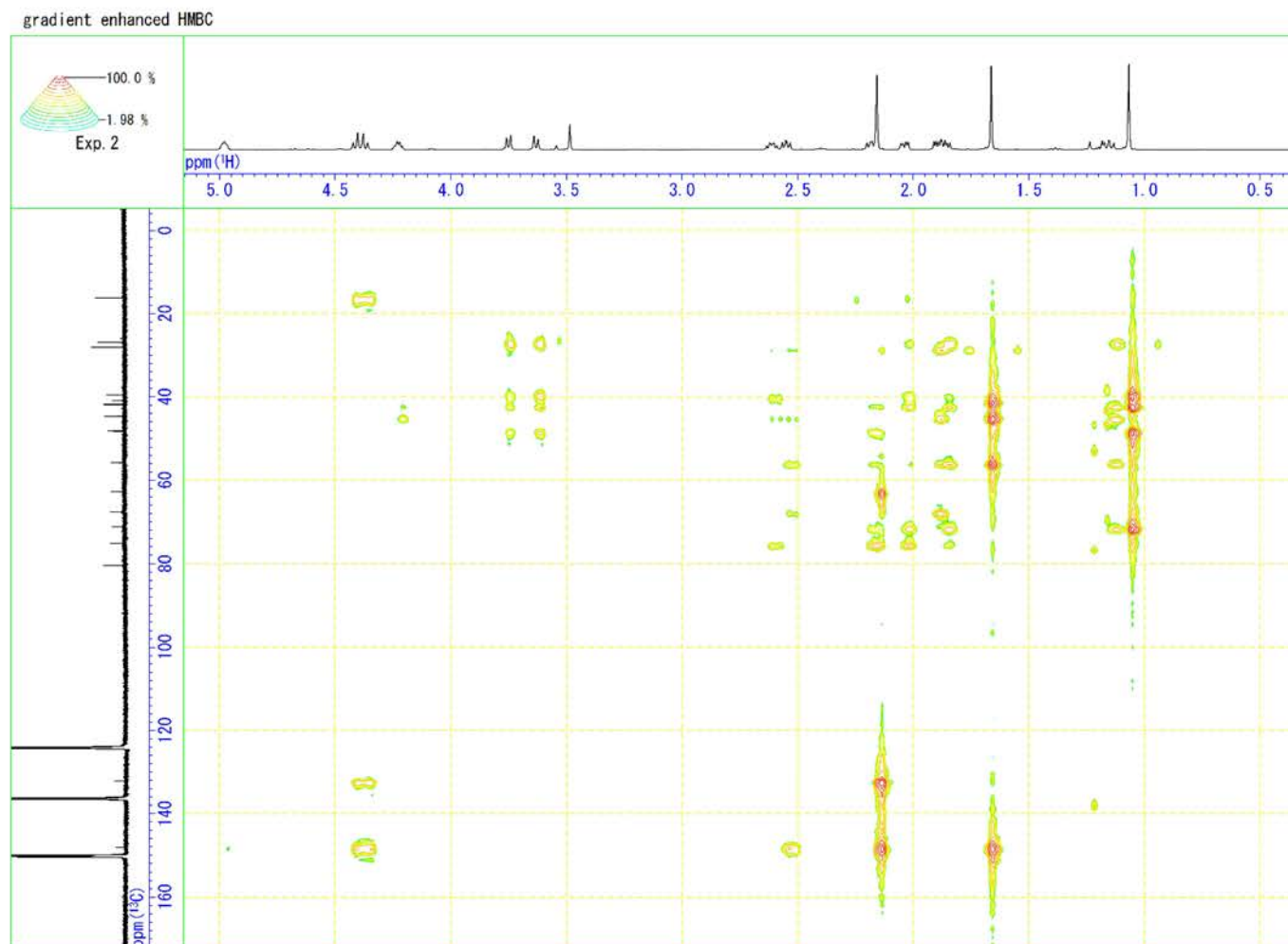


Fig. S 18 Tsukiyol C の HMBC (C₅D₅N + 2.5 % D₂O)

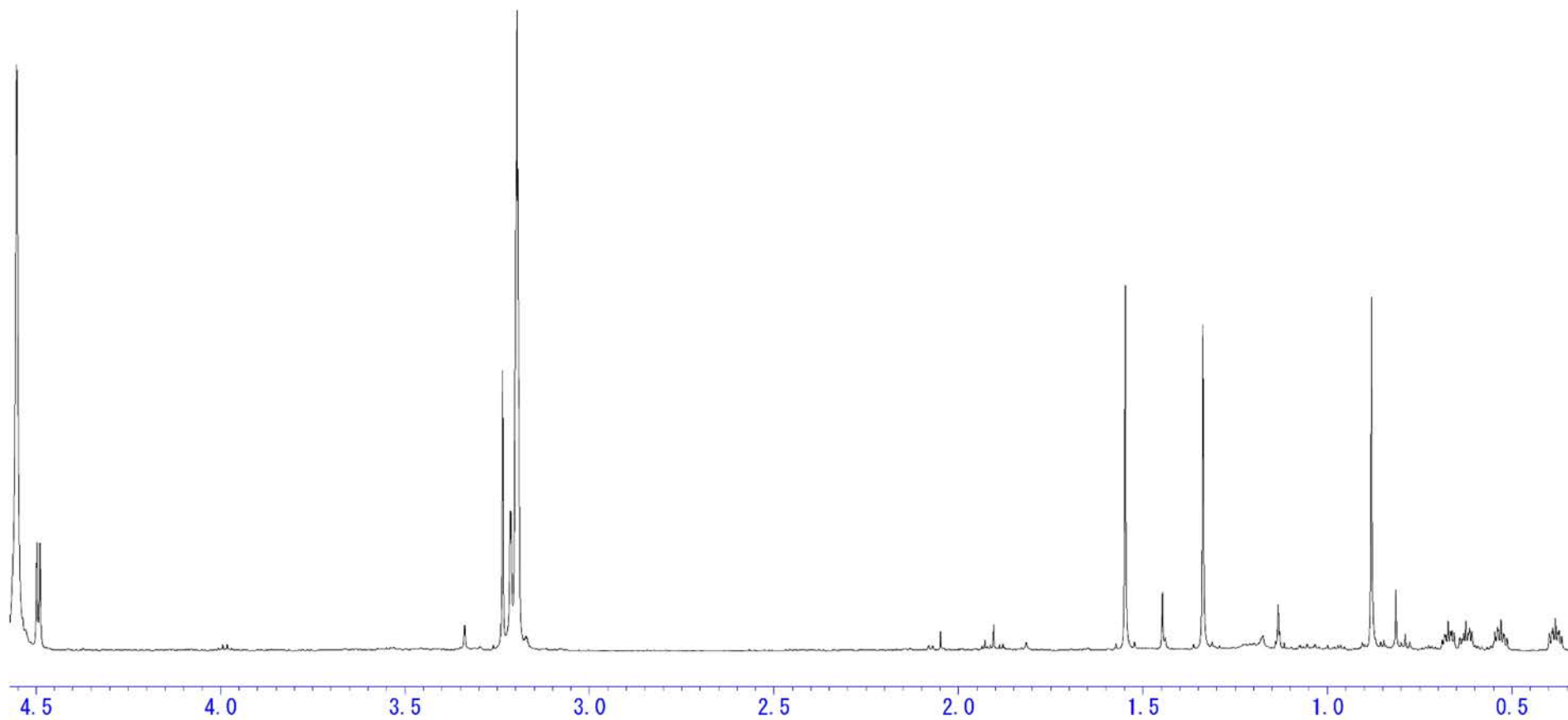


Fig. S 19 Neoilludin C の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CD_3OD)

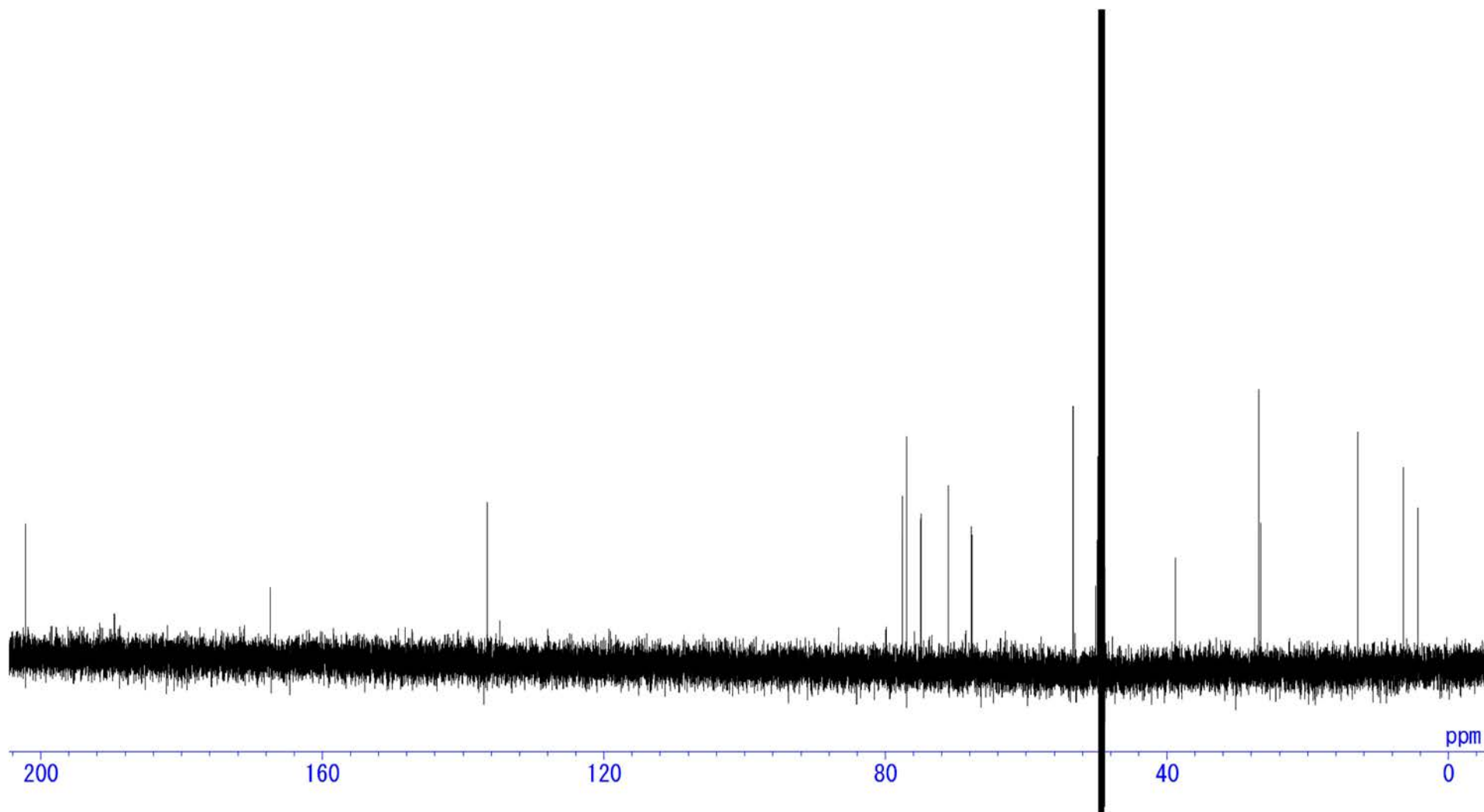


Fig. S 20 Neoilludin C の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CD_3OD)

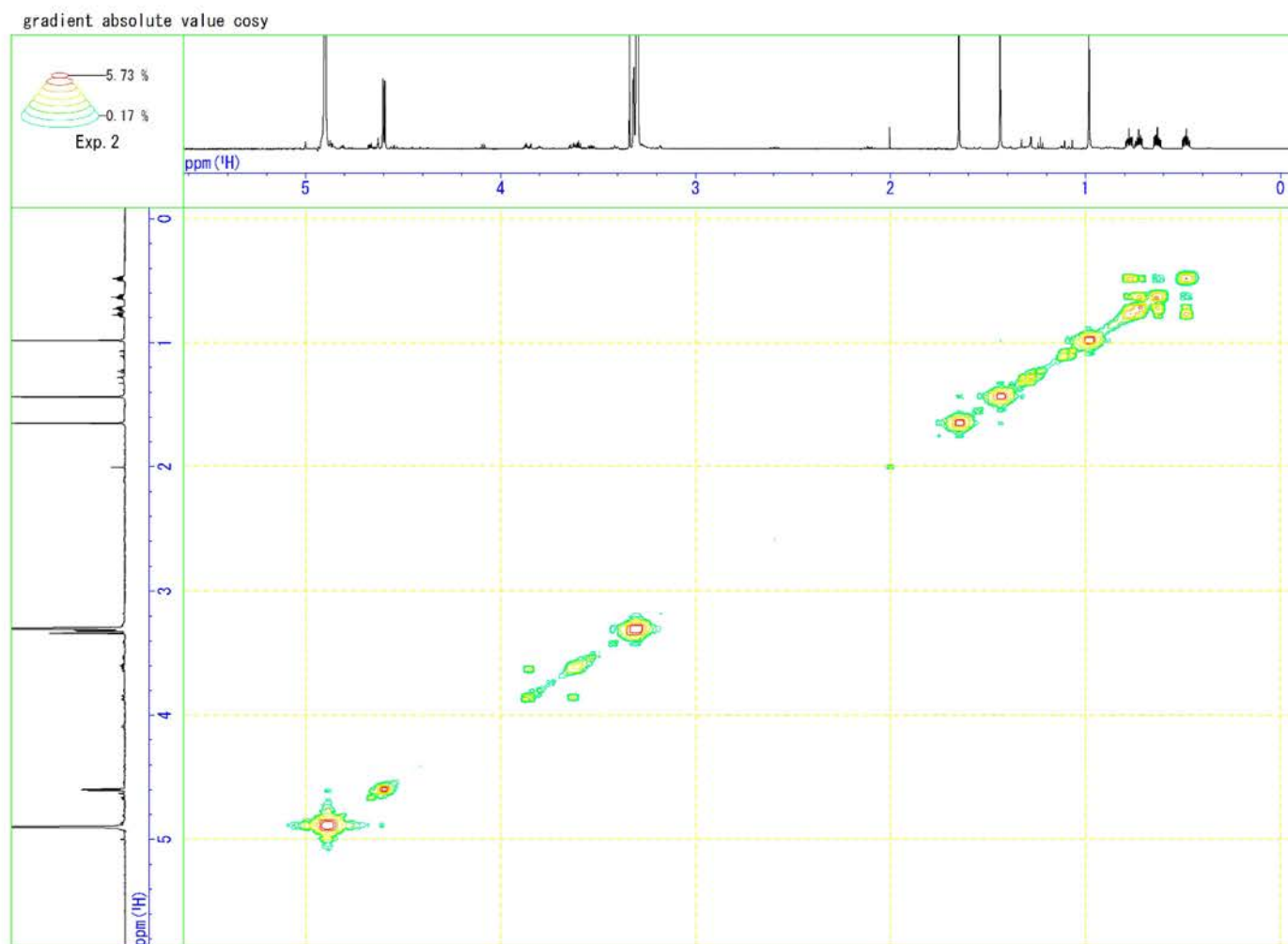


Fig. S 21 Neoilludin C の ^1H - ^1H COSY (CD_3OD)

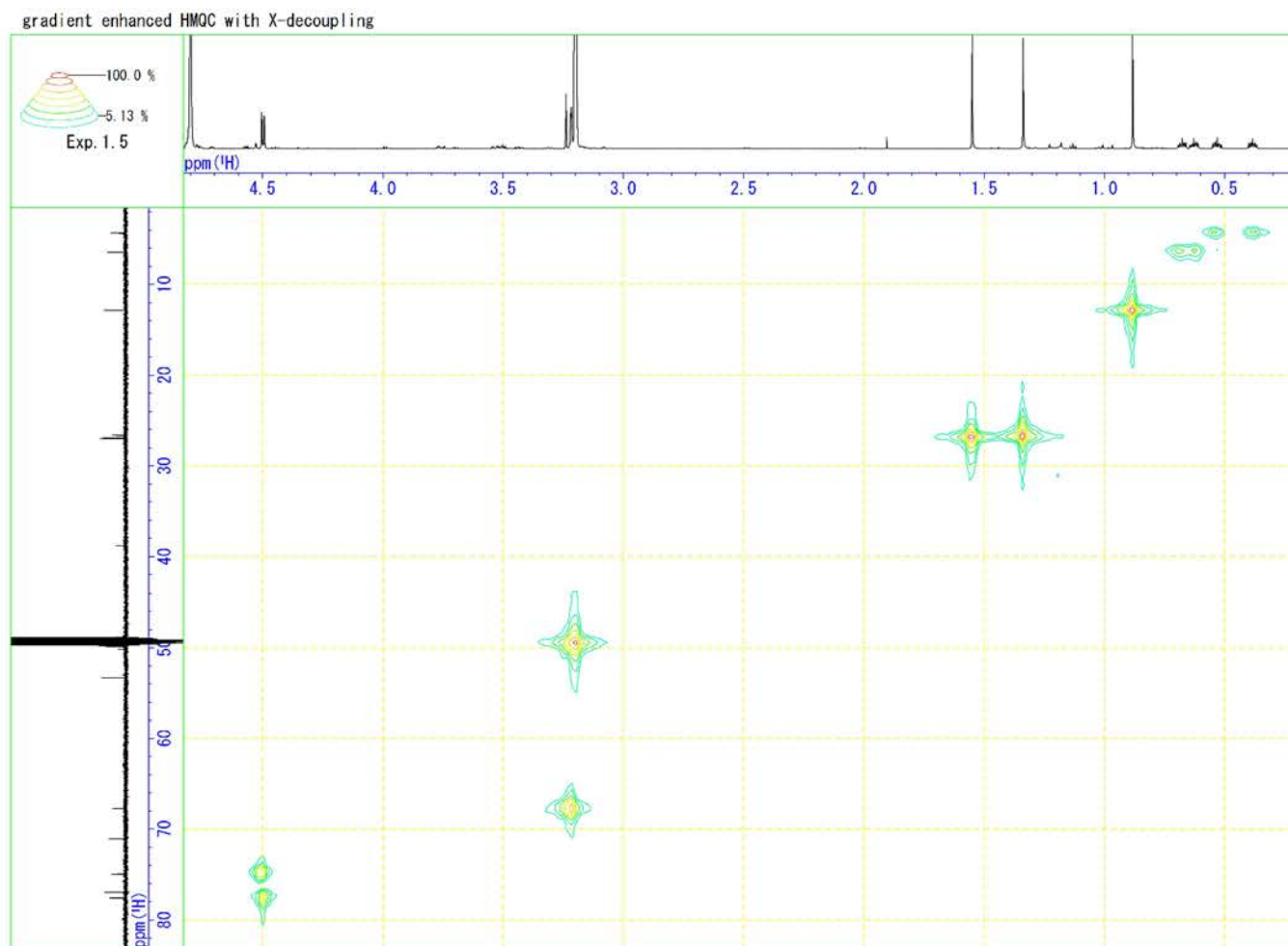


Fig. S 22 Neoilludin C の HMQC (CD_3OD)

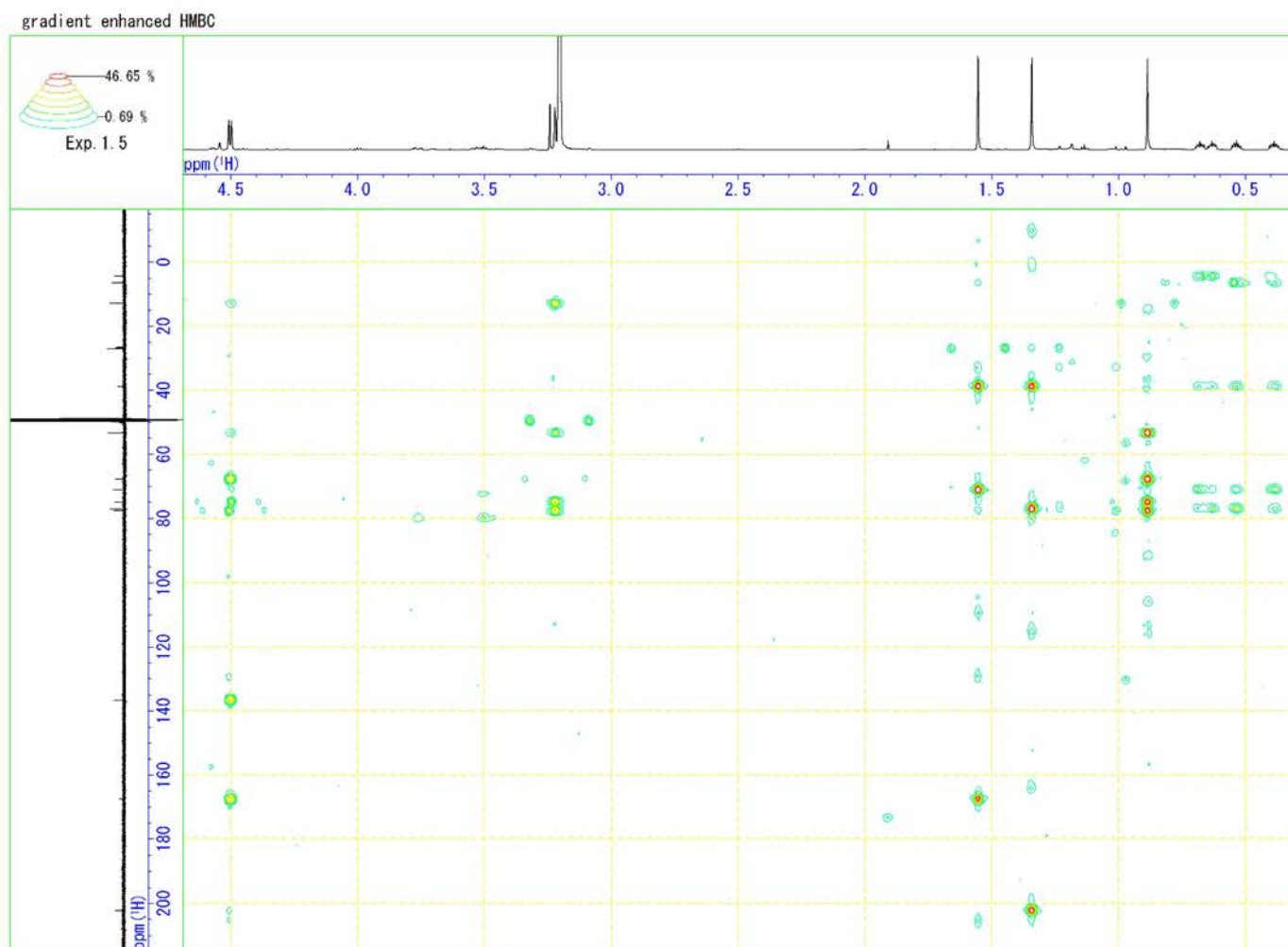


Fig. S 23 Neoilludin C の HMBC (CD_3OD)

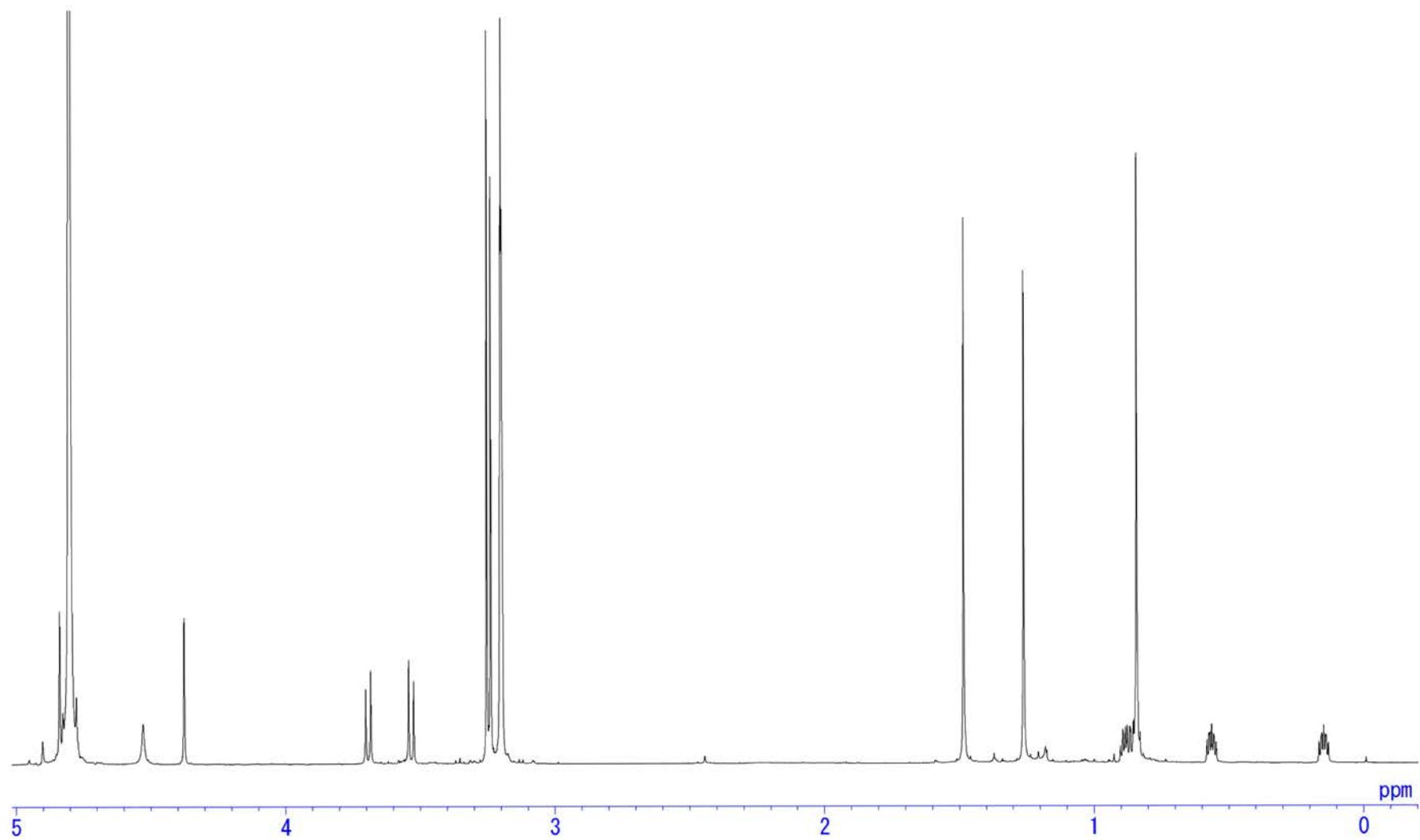


Fig. S 24 4-*O*-Methylnesoludine A の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CD_3OD)

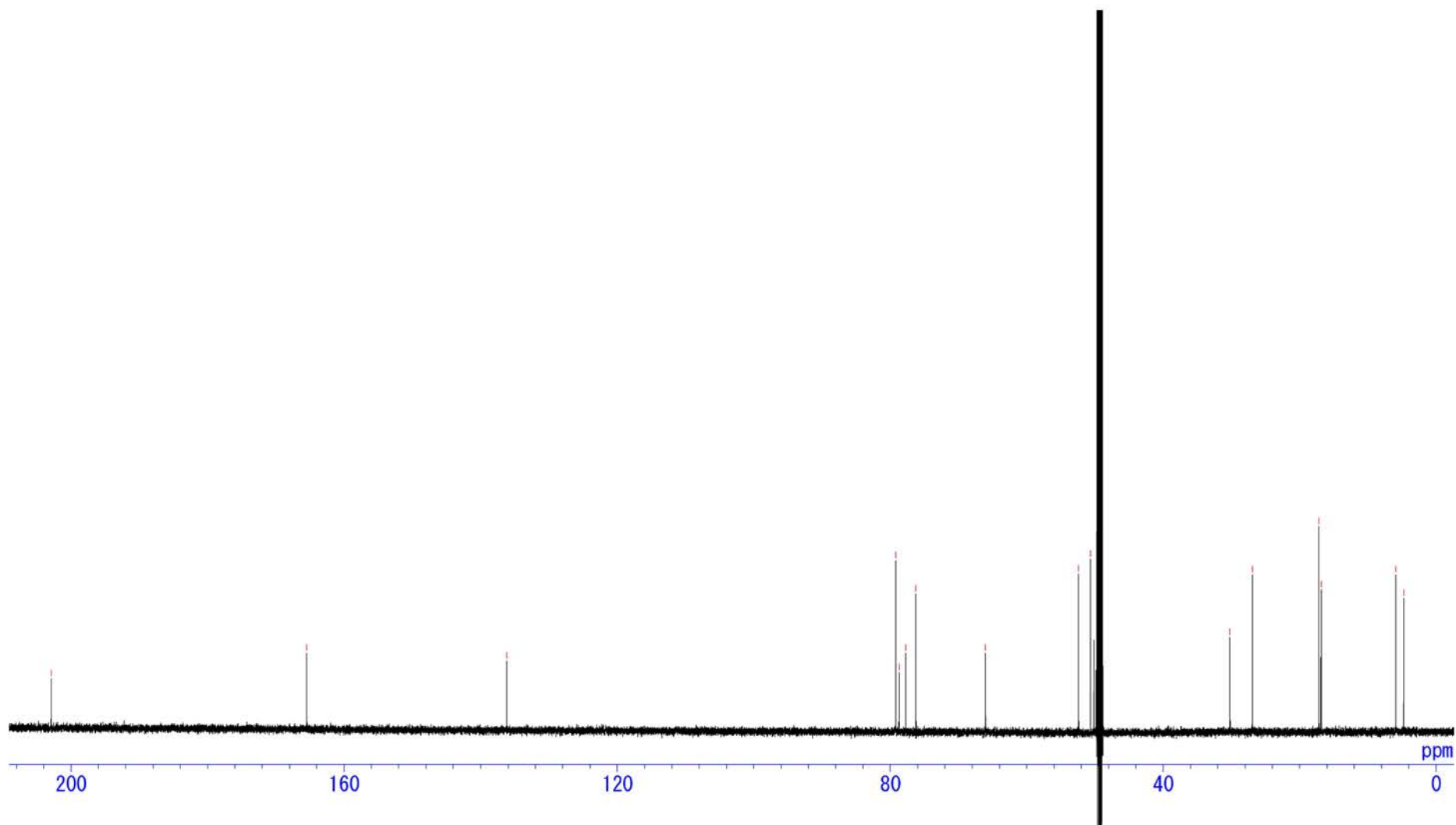


Fig. S 25 4-*O*-Methylnesoludine A の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CD_3OD)

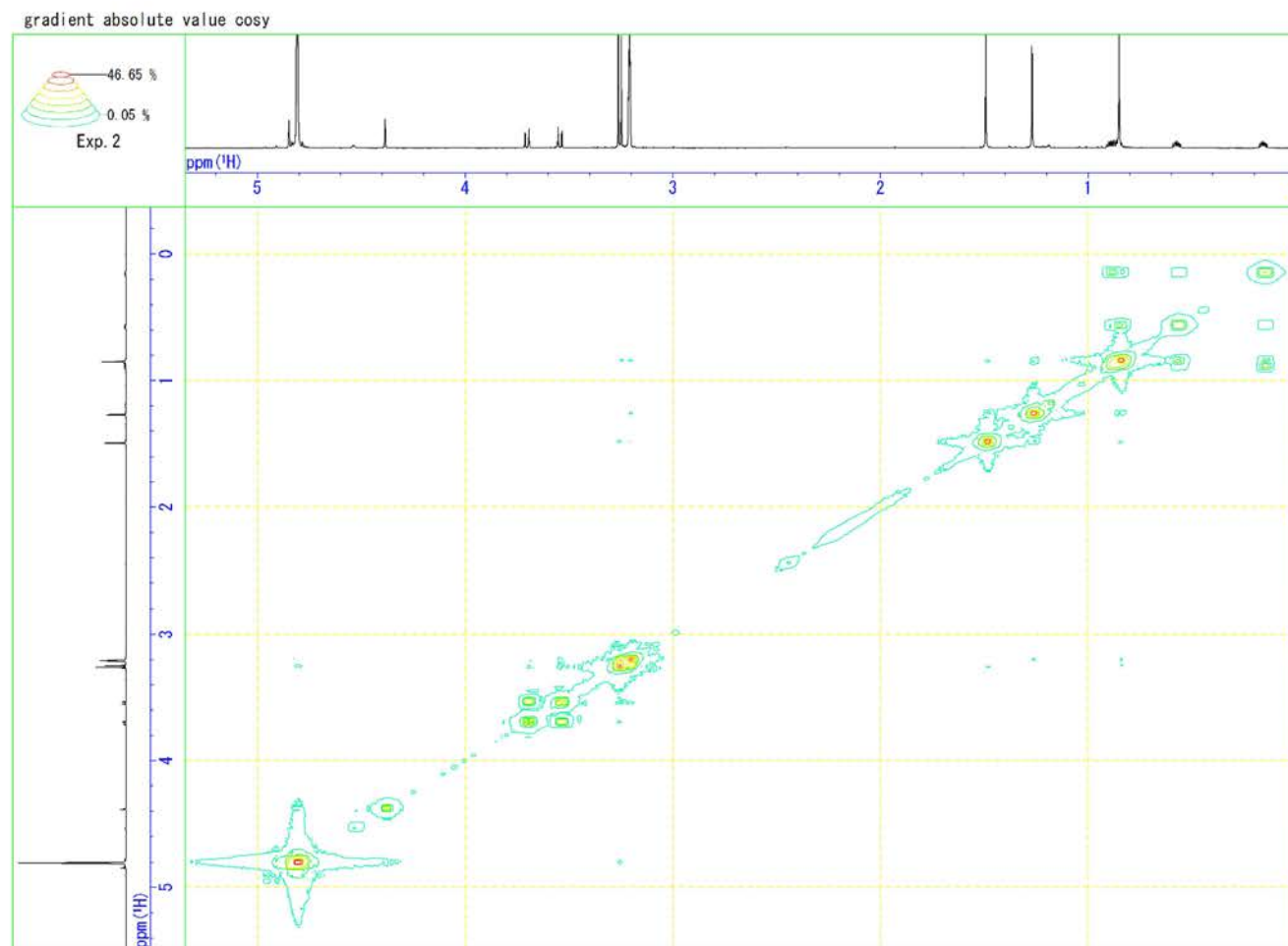


Fig. S 26 4-*O*-Methylneoilludin A の ^1H - ^1H COSY (CD_3OD)

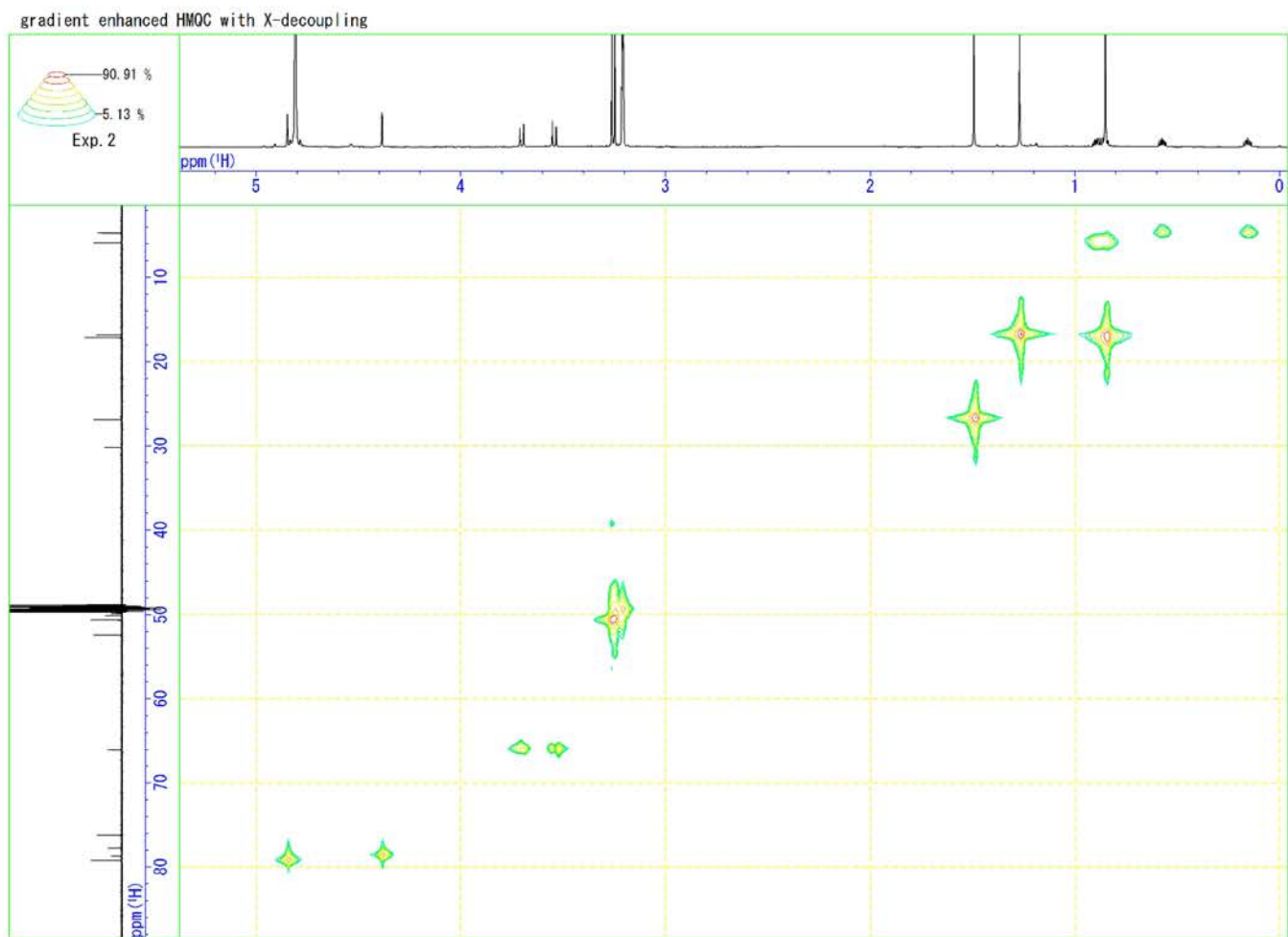


Fig. S 27 4-*O*-Methylneoilludin A の HMQC (CD₃OD)

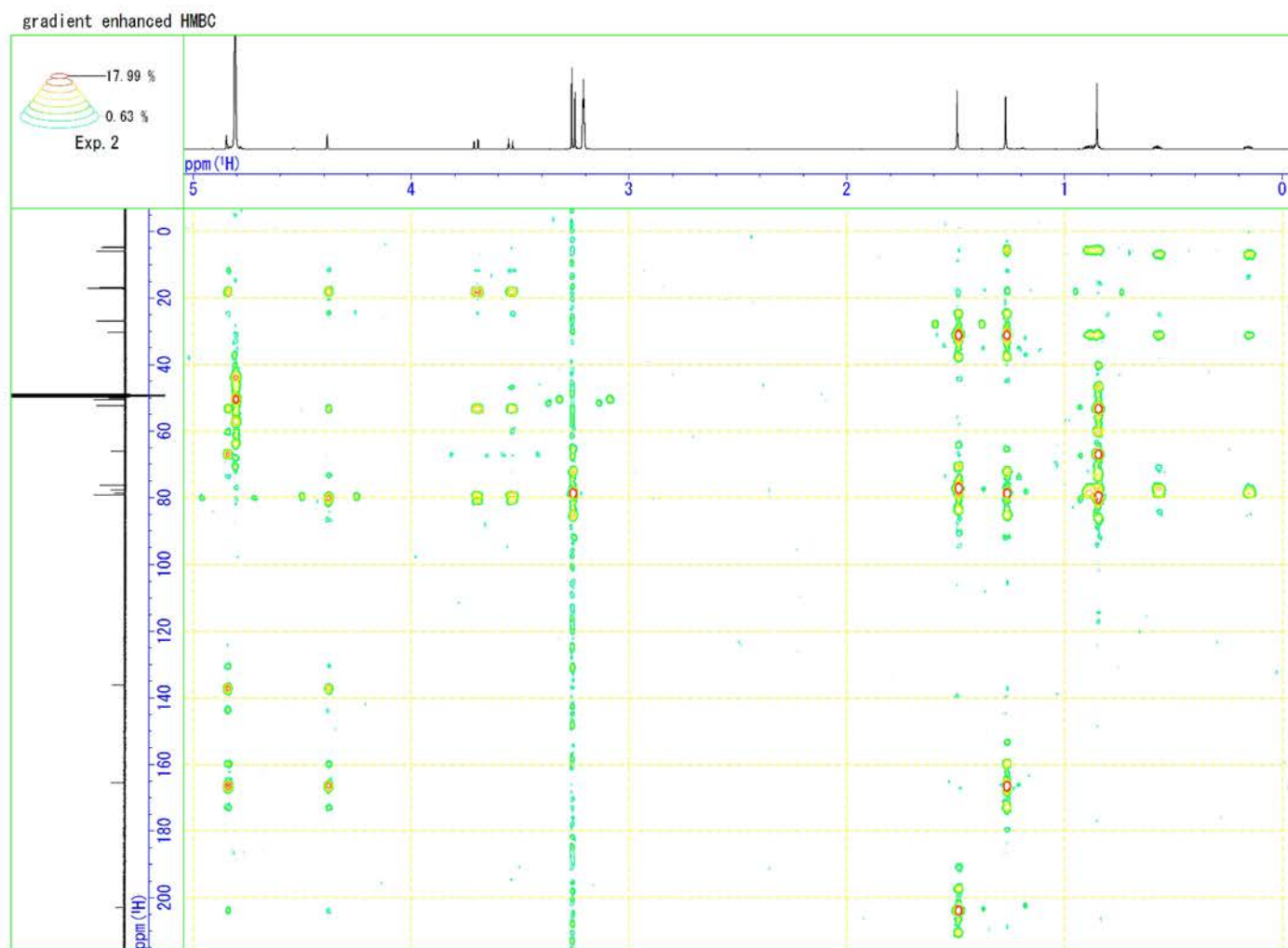


Fig. S 28 4-*O*-Methylnesolludin A の HMBC (CD₃OD)

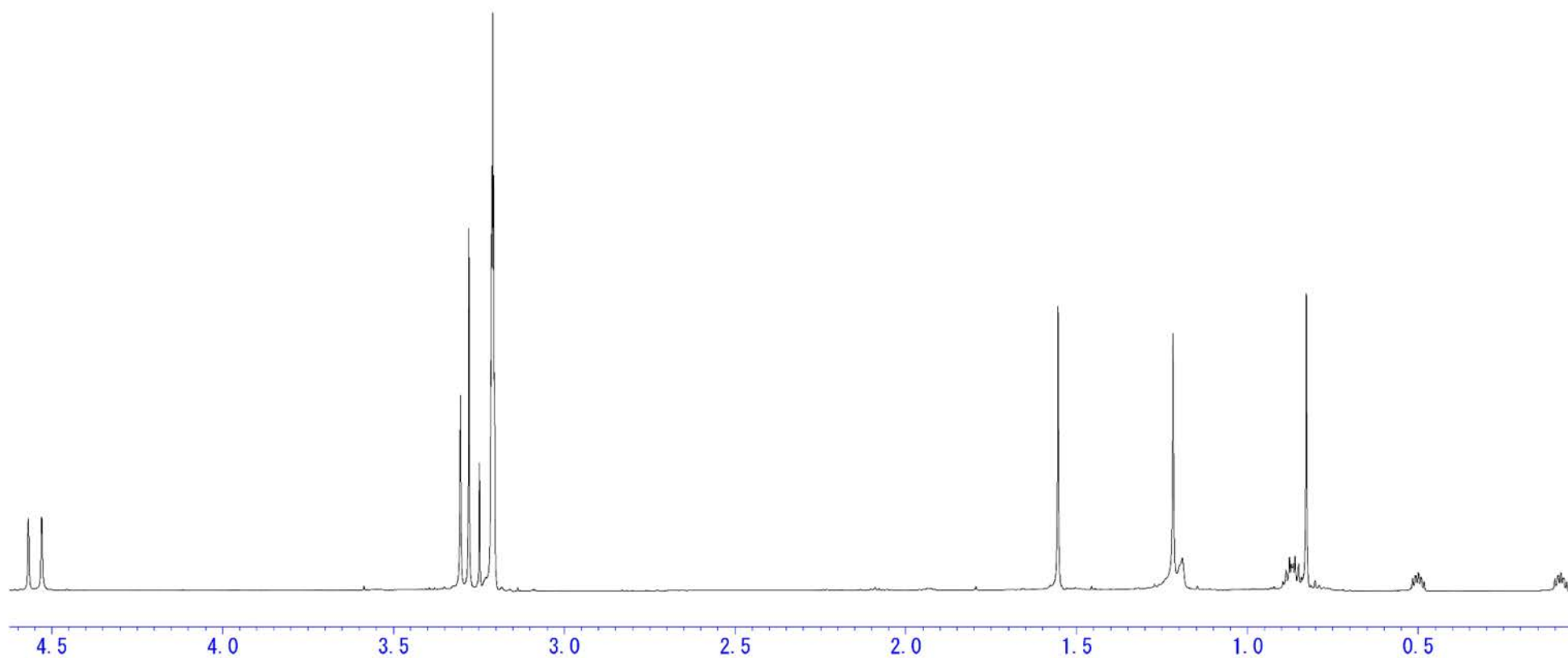


Fig. S 29 4-*O*-Methylnesoludrin B の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CD_3OD)

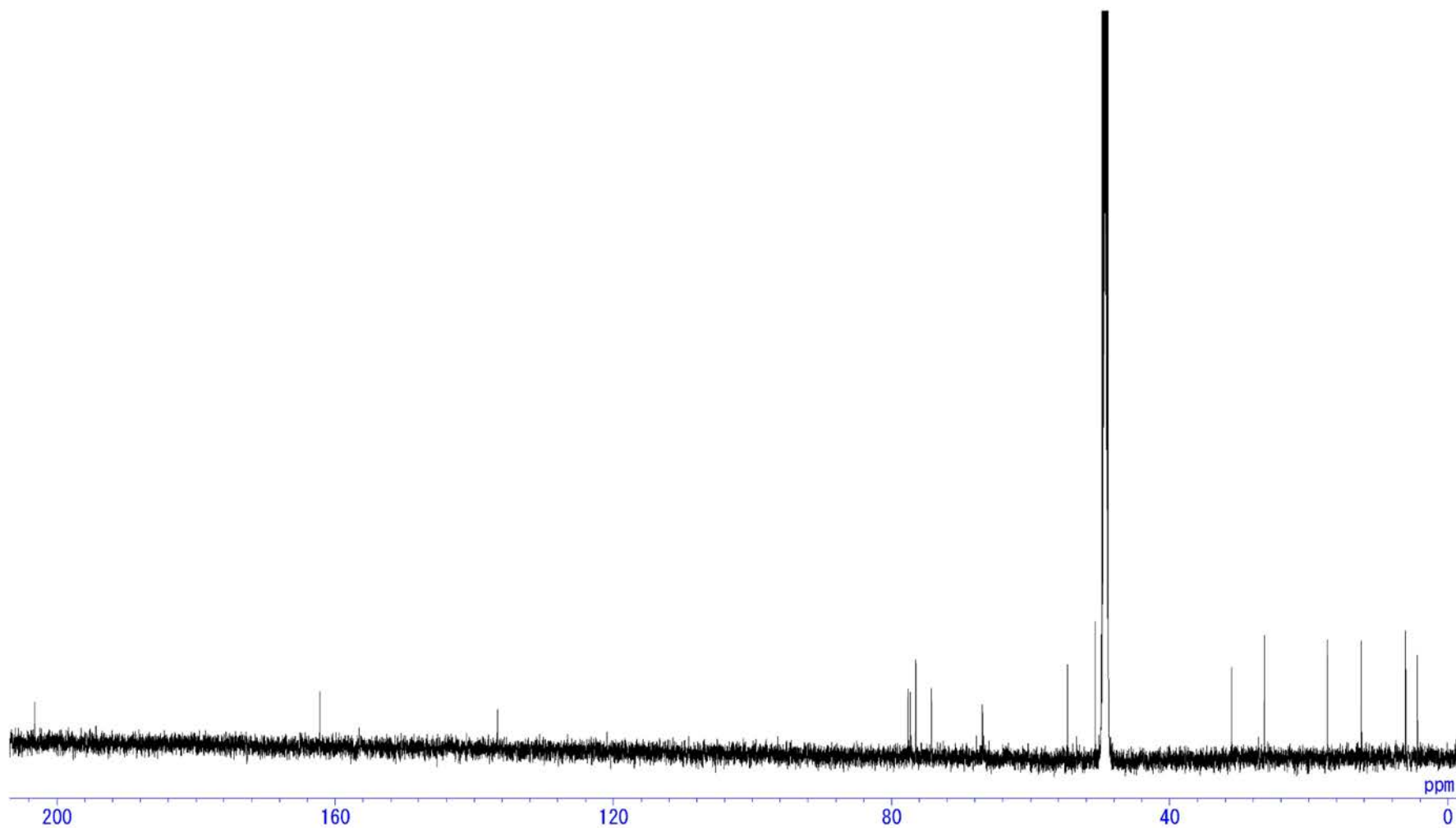


Fig. S 30 4-*O*-Methylneoilludin B の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CD_3OD)

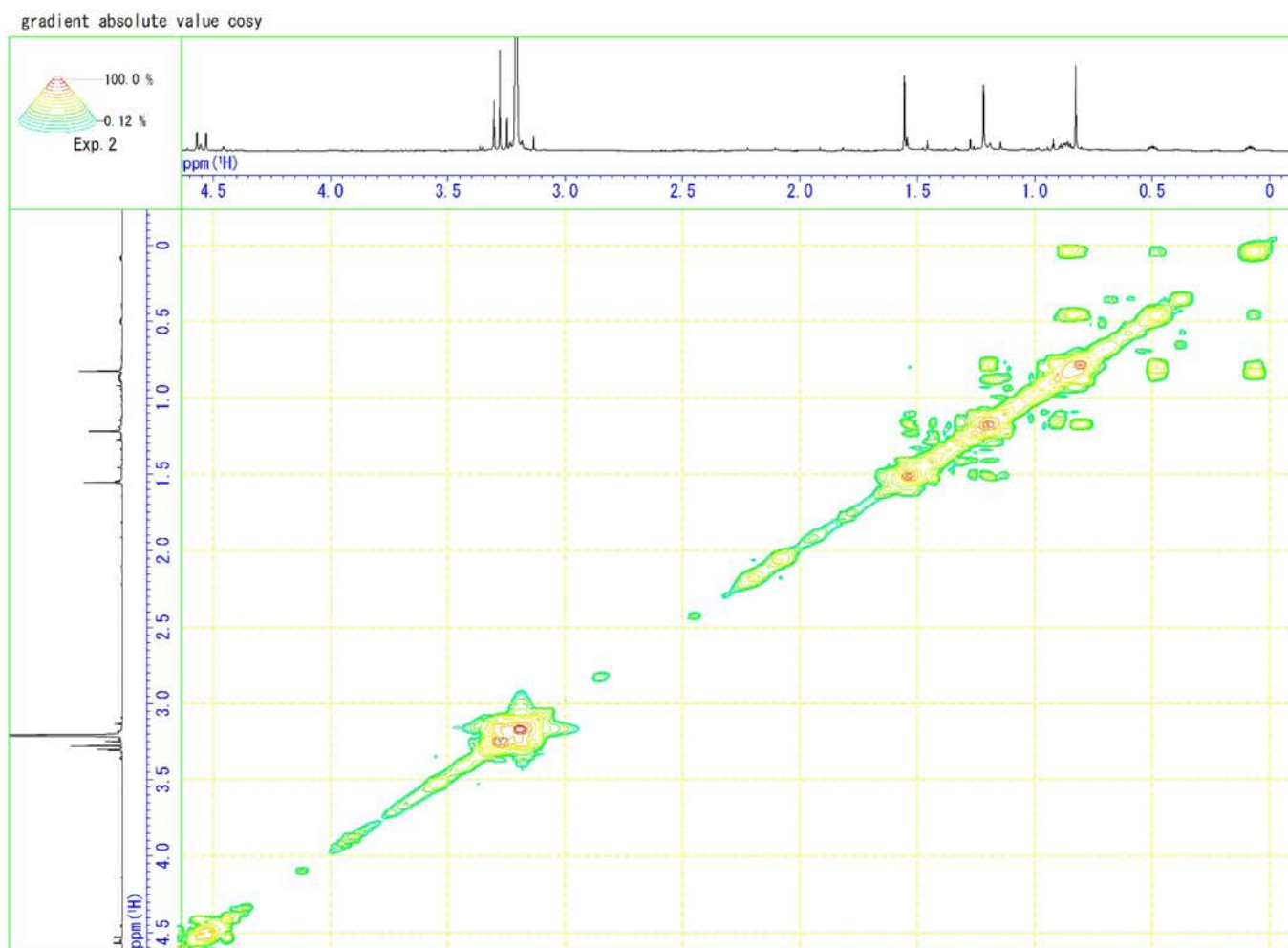


Fig. S 31 4-*O*-Methylneoilludin B の ¹H-¹H COSY (CD₃OD)

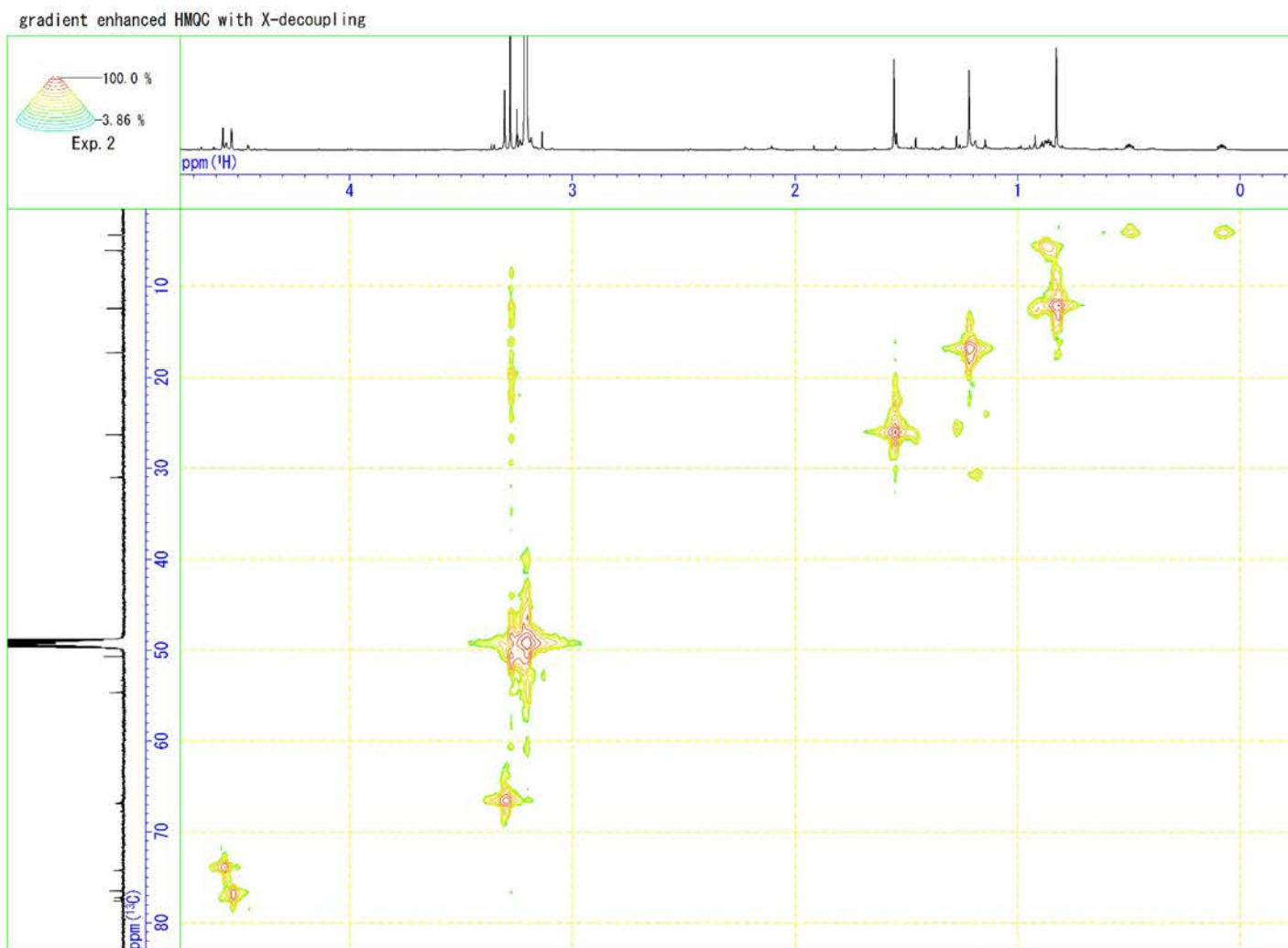


Fig. S 32 4-*O*-Methylneoilludin B の HMQC (CD_3OD)

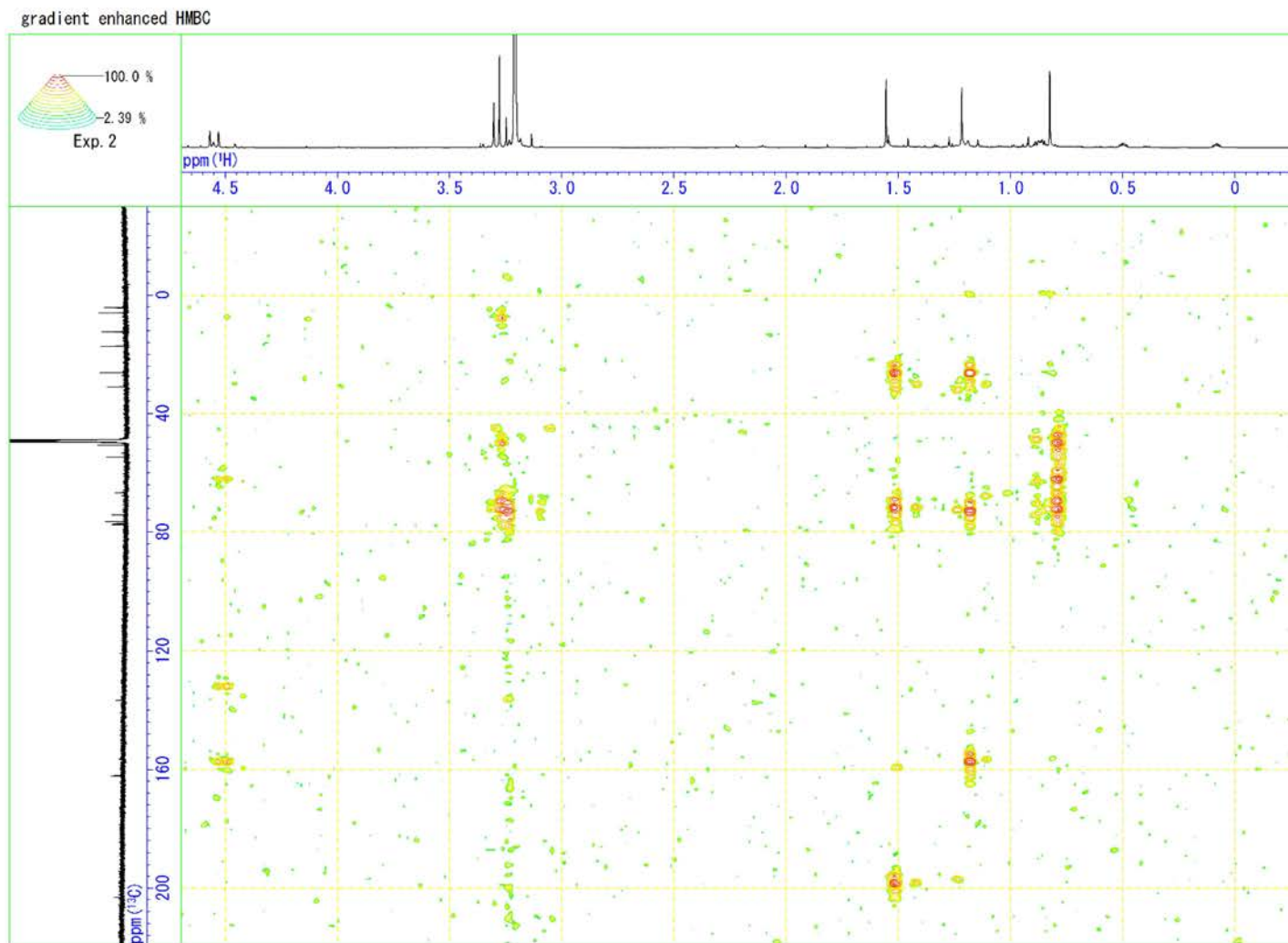


Fig. S 33 4-*O*-Methylnеоилудин B の HMBC (CD_3OD)

著者注: 2018 年度産子実体より単離できた本化合物量が微量であり HMBC において十分な相関を得るに至らなかった為、補足として次ページに修士論文より引用した 2017 年度産子実体由来の本化合物の HMBC 相関を添付した。

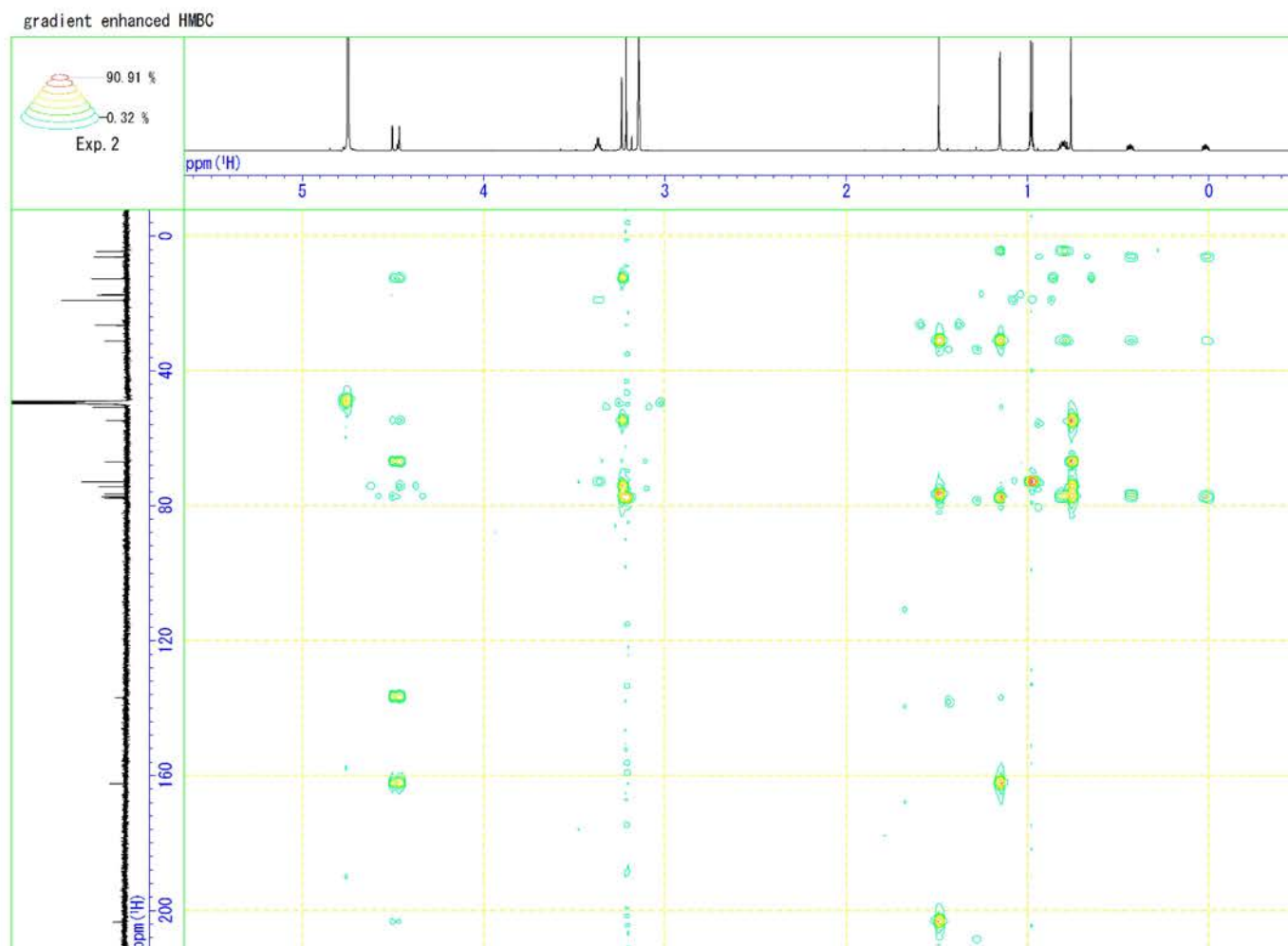


Fig. S 34 4-*O*-Methylnеоилудин B (2017) の HMBC (CD_3OD) [63]

著者注: δ_{H} 1.03, 3.43 及び δ_{C} 19.1, 73.7 に見られるシグナルは夾雑物 2, 3-butanediol によるものである [63]。

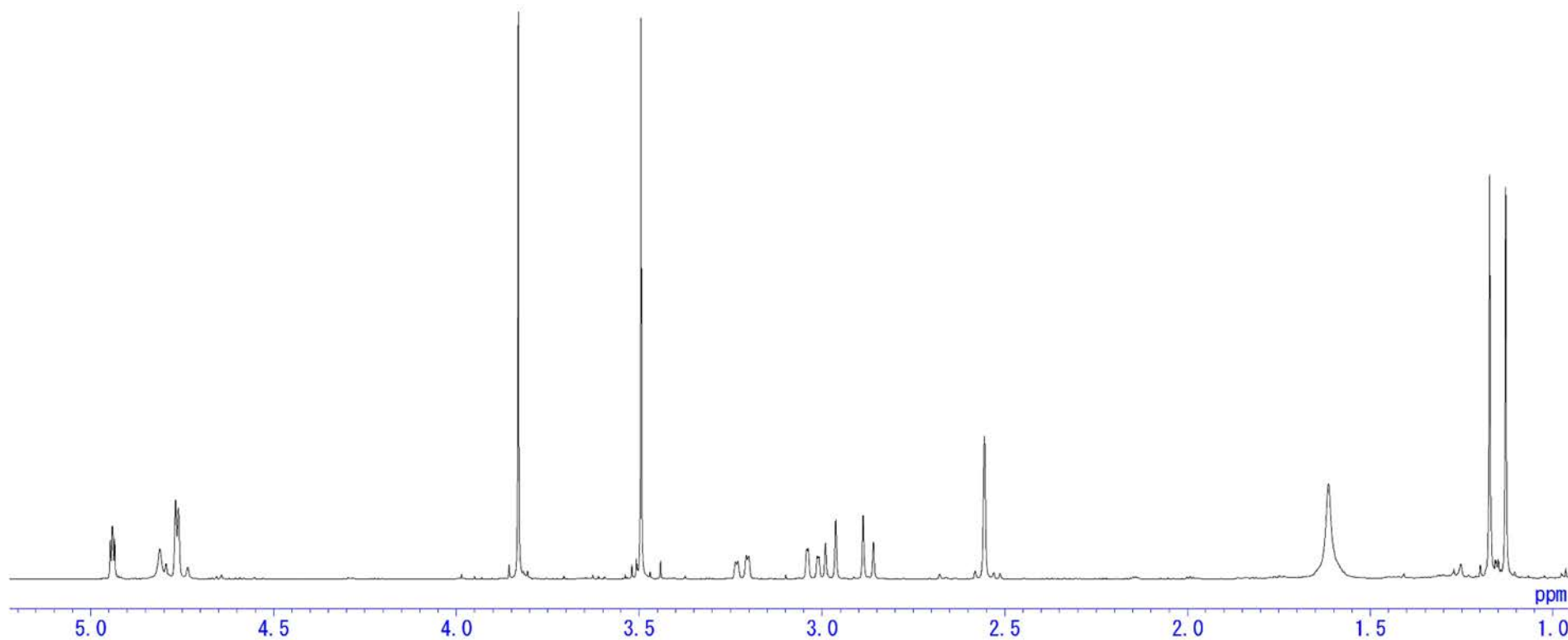


Fig. S 35 Tsukiyotakein の ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CDCl_3)

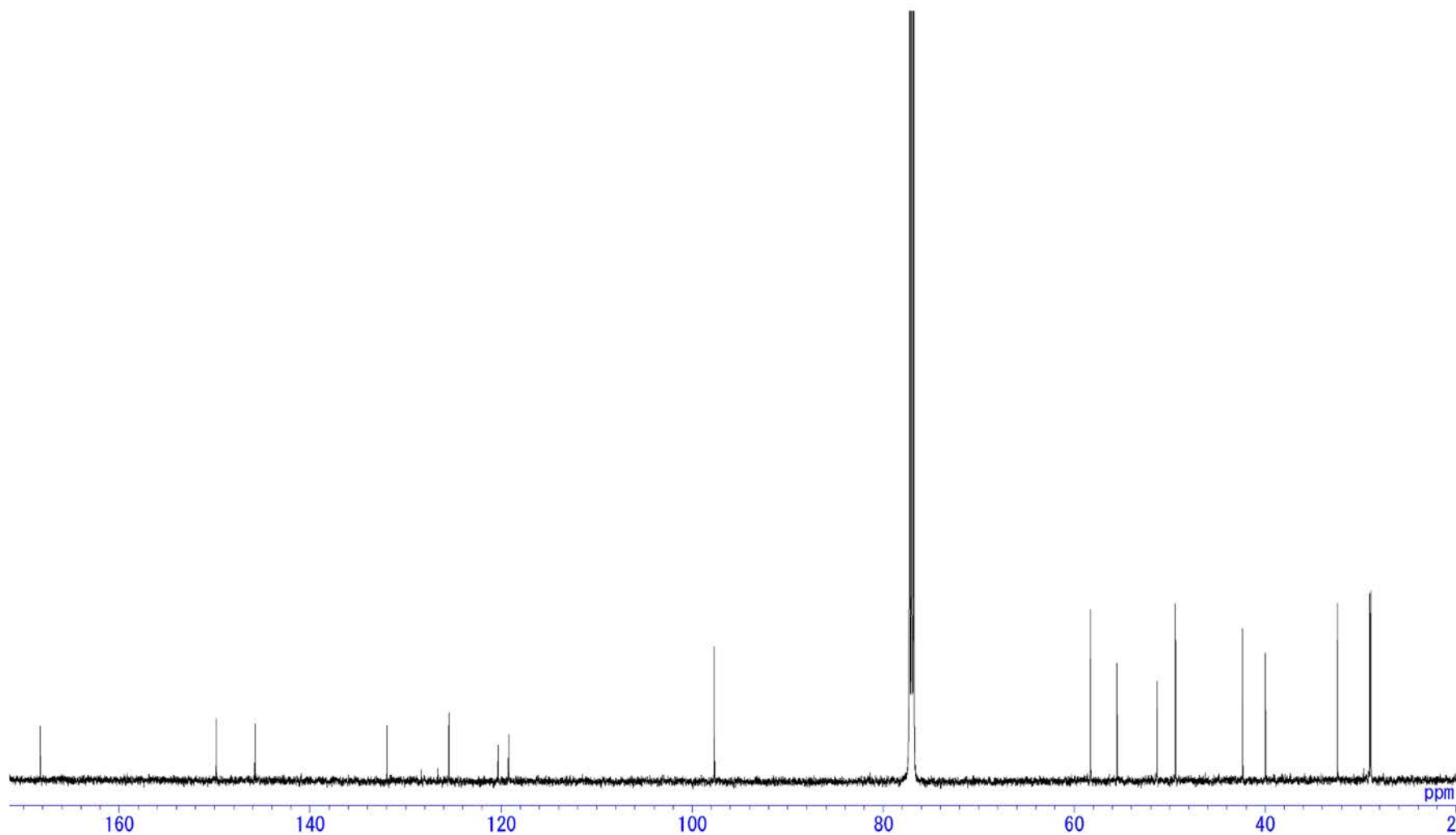


Fig. S 36 Tsukiyotakein の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CDCl_3)

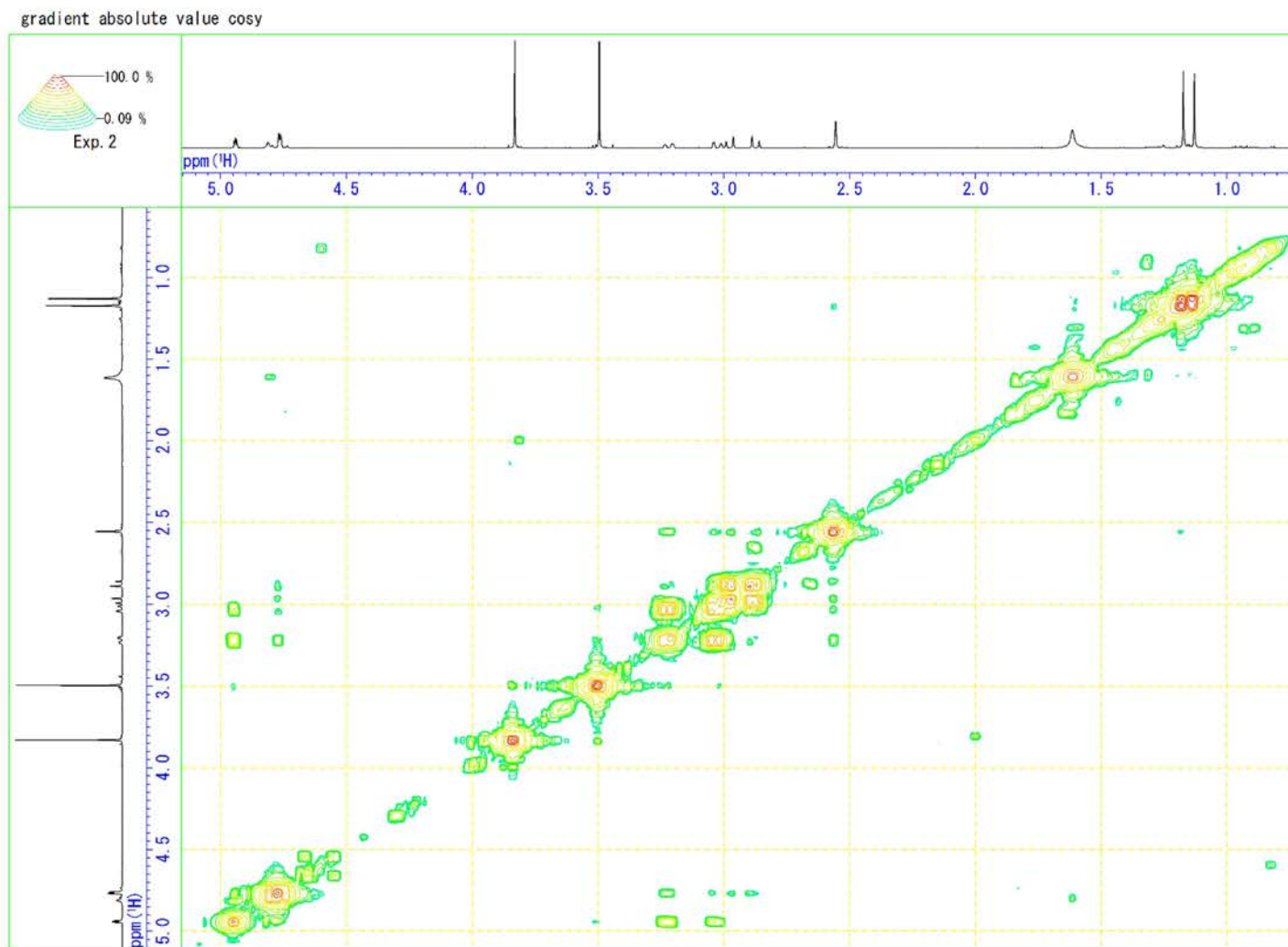


Fig. S 37 Tsukiyotakein の ^1H - ^1H COSY (CDCl_3)

gradient enhanced HMQC with X-decoupling

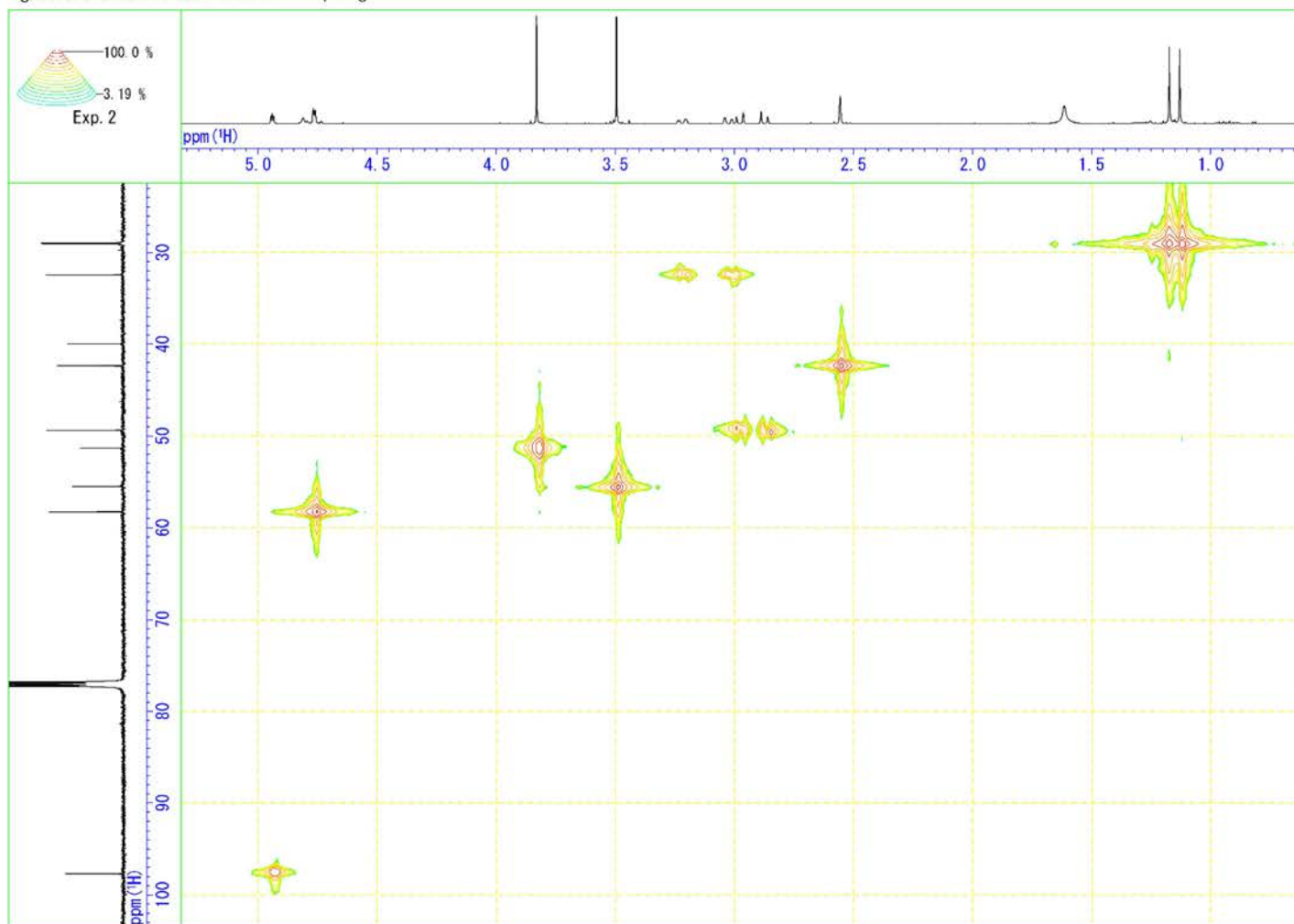


Fig. S 38 Tsukiyotakein の HMQC (CDCl₃)

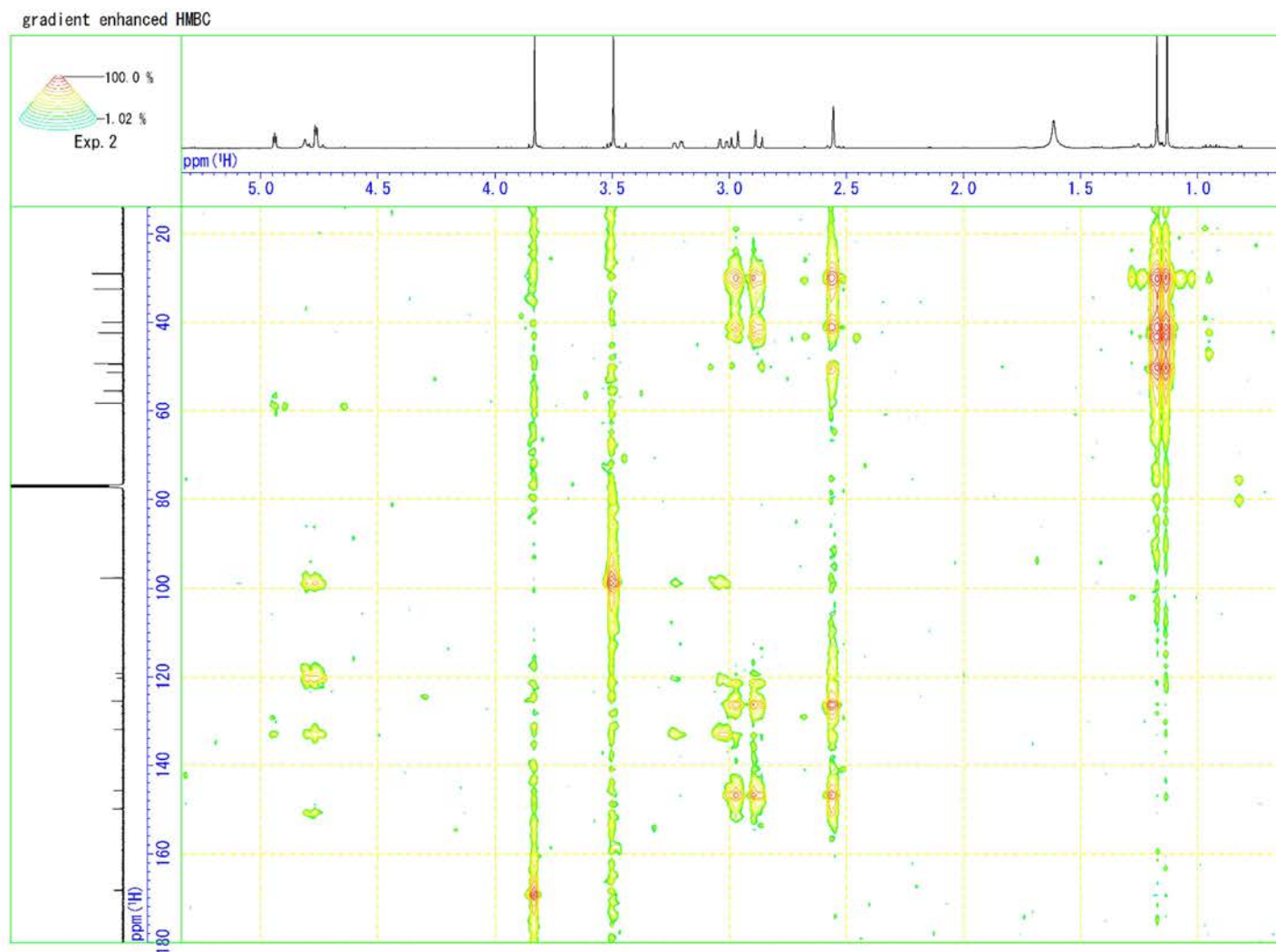


Fig. S 39 Tsukiyotakein の HMBC (CDCl_3)

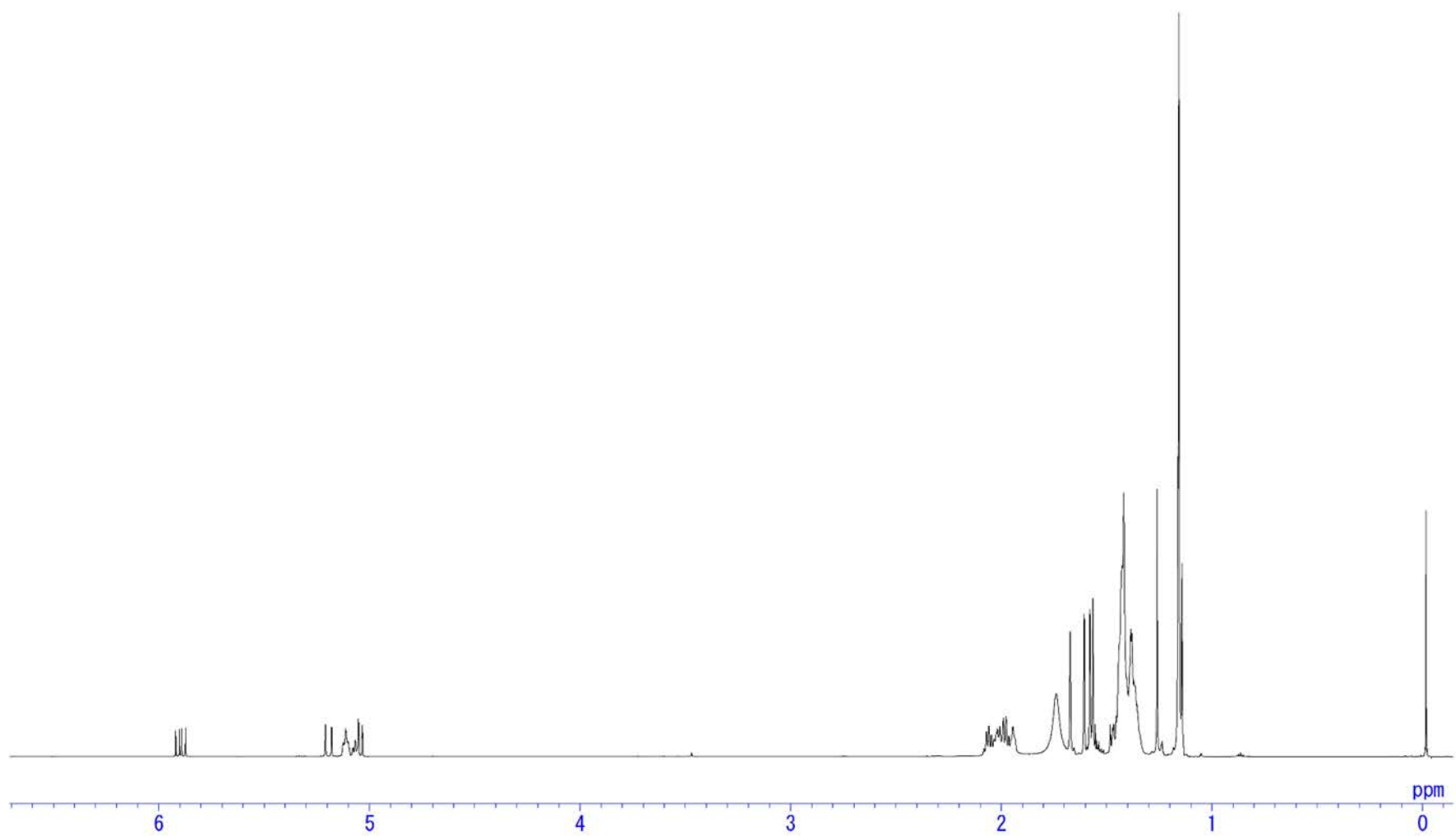


Fig. S 40 Omphaloprenol A ^1H NMR スペクトル (600 MHz, CDCl_3)

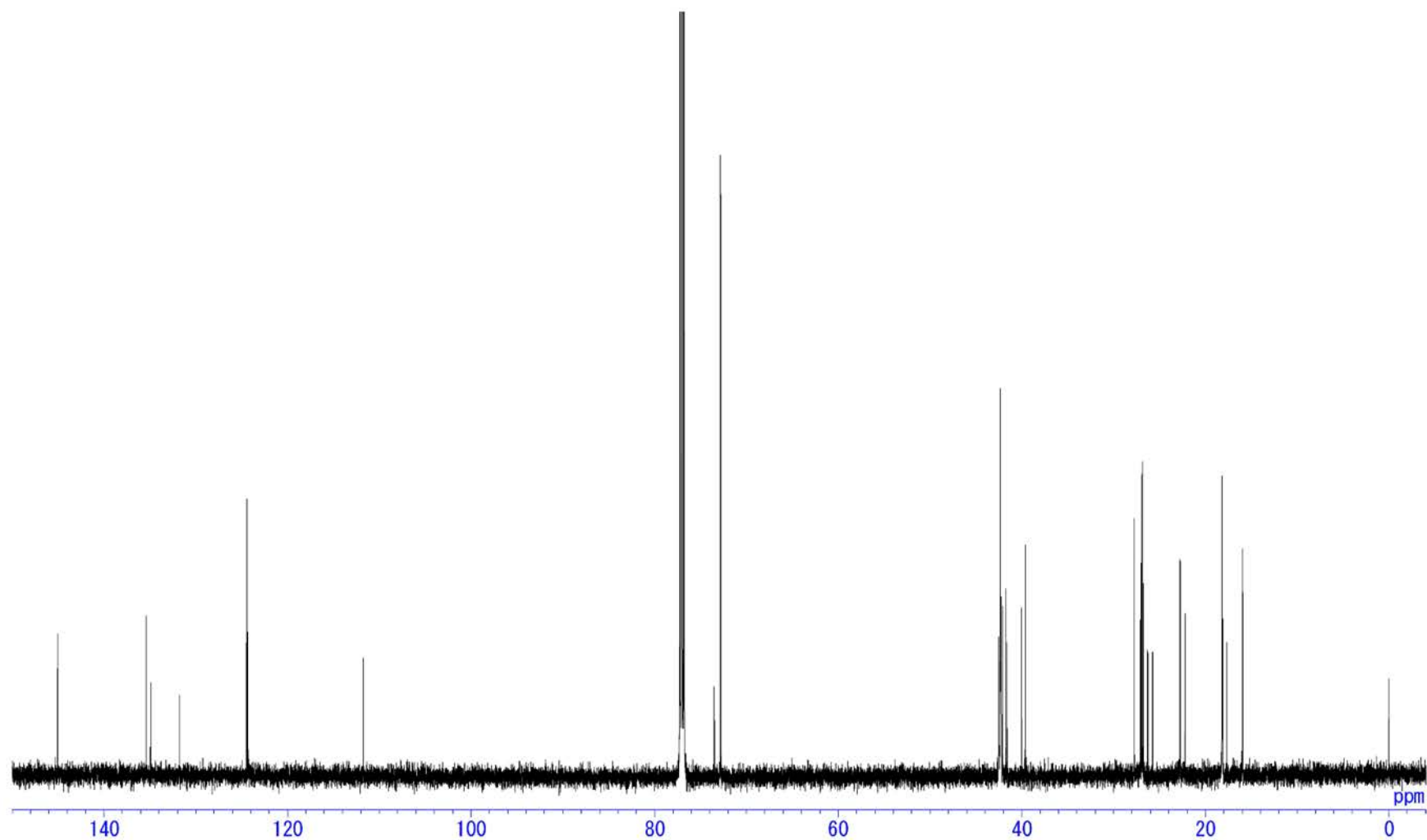


Fig. S 41 Omphaloprenol A の ^{13}C NMR スペクトル (150 MHz, CDCl_3)

Acq. Data Name: RE34B
Creation Parameters: 平均(MS[1] 経過時間: 3.68)

Experiment Date/Time: 2020/06/29 10:07:41
Ionization Mode: EI+

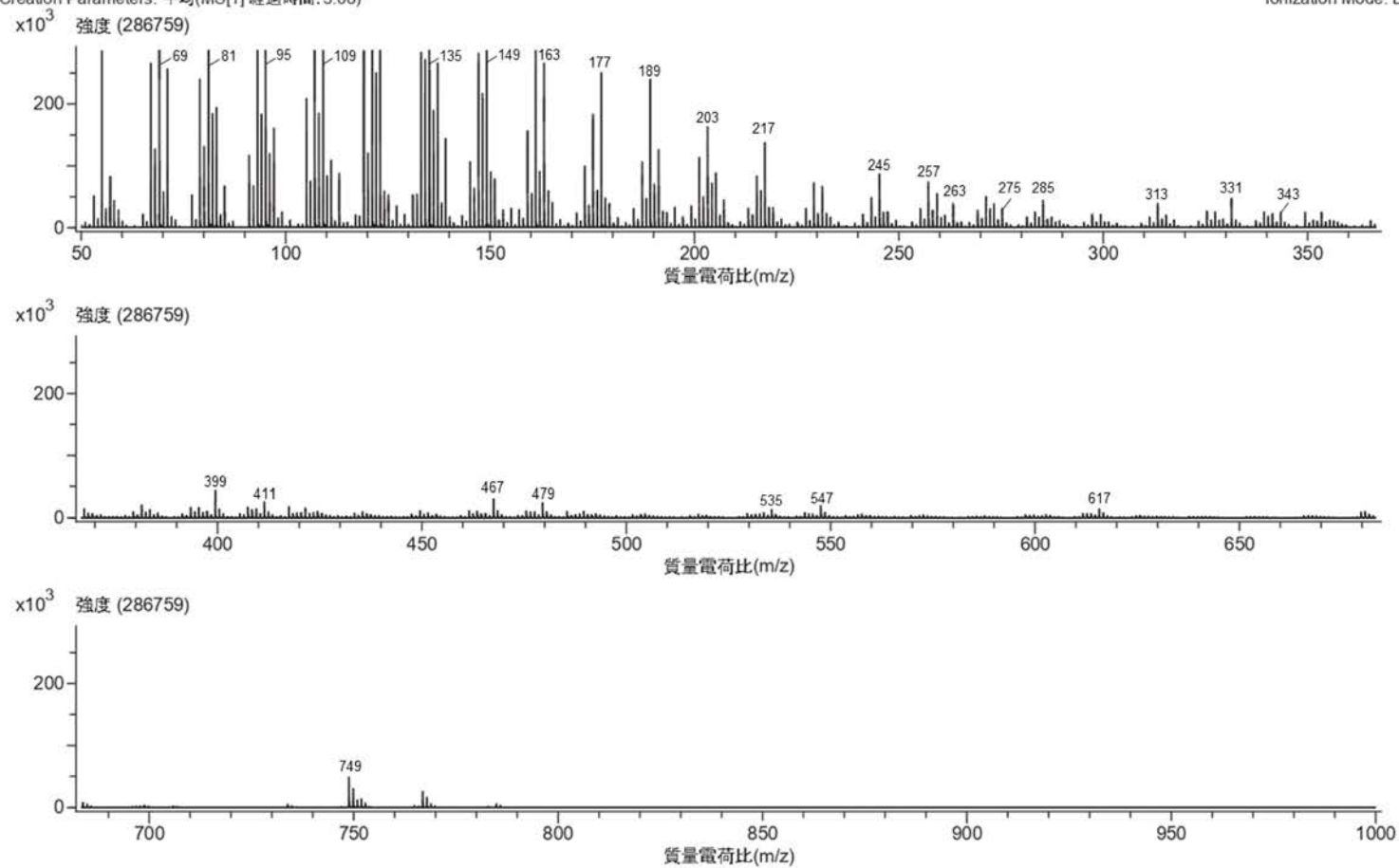


Fig. S 42 Omphaloprenol A の EI-MS スペクトル

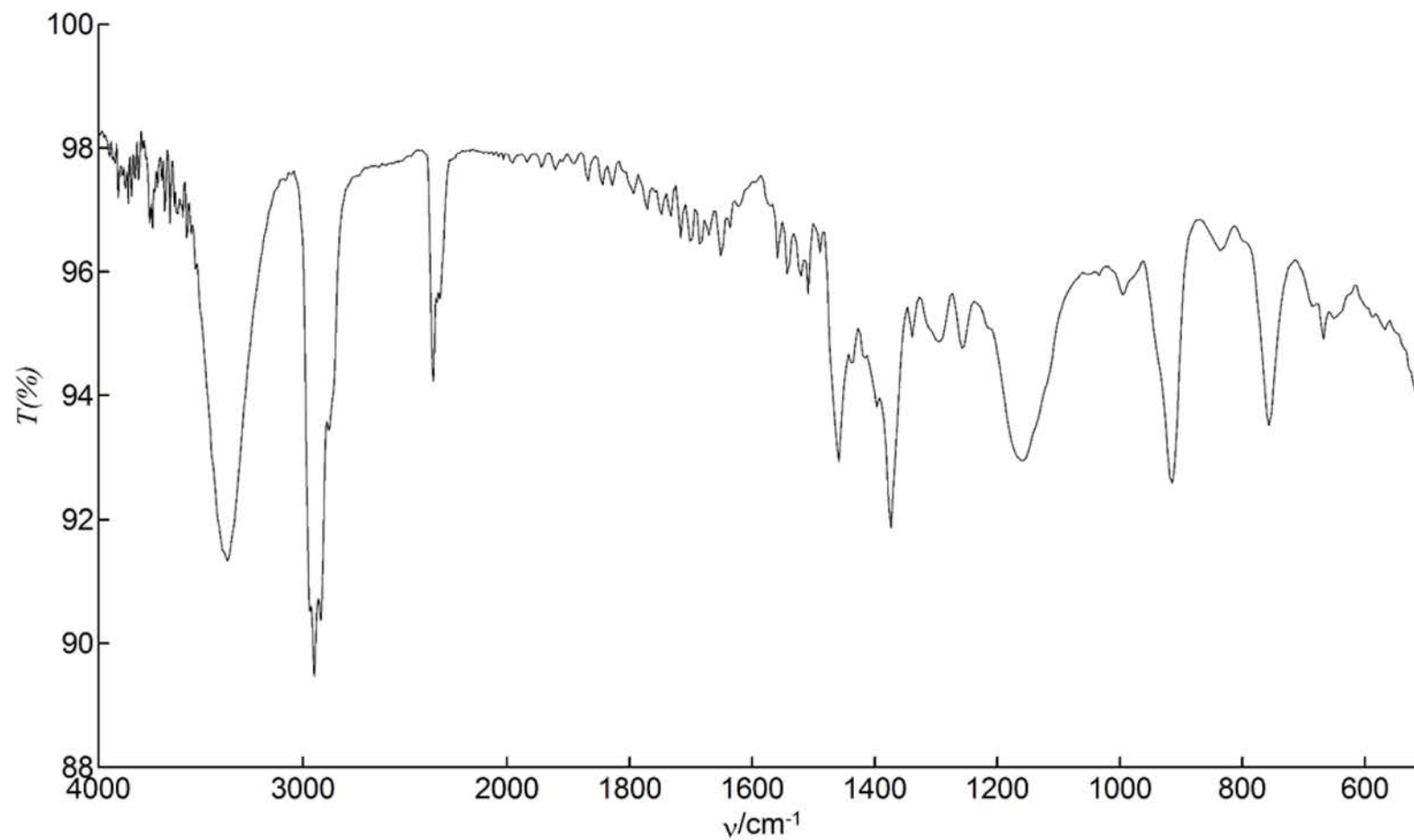


Fig. S 43 Omphaloprenol A の IR スペクトル