

静岡大学 博士論文

キノコ由来の生物活性物質の
生物有機化学的研究

2011年1月

大学院自然科学系教育部

バイオサイエンス専攻

上田 恵子

目次

第1部 ヤマブシタケ由来の小胞体ストレス誘導細胞死抑制物質の探索	
第1章 緒論	2
第2章 本論	4
第1節 ヤマブシタケ由来の機能性物質の単離	4
第2節 化合物の構造解析	7
第3節 単離化合物の生合成についての考察	53
第4節 小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性試験の評価及び考察	55
第3章 実験部	59
第1節 使用器具	59
第2節 ヤマブシタケ由来の機能性物質の単離	60
第3節 小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性試験	62
第2部 キノコ由来の奇形子実体誘導物質の化学的研究	
第1章 緒論	64
第2章 本論	65
第1節 奇形子実体誘導活性試験の確立	65
第2節 キノコ由来機能性物質の単離	66
第3節 化合物の構造解析	67
第4節 奇形子実体誘導活性試験の評価及び今後の予定	73
第3章 実験部	74
第1節 使用器具	74
第2節 機能性物質の単離	75
第3節 奇形子実体誘導活性試験	76
論文要旨	77

Summary	79
参考文献	80
謝辭	84

第1部

ヤマブシタケ(*Hericium erinaceum*)由来の
小胞体ストレス誘導細胞死抑制物質の
生物有機化学的研究

第1章 緒論

ヤマブシタケ (*Hericium erinaceum*) とはサンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の食用のキノコである。現在、人工栽培が行われているキノコは数十種類で、ヤマブシタケもその中の一つであり、スーパーマーケットなどで購入可能になりつつある。¹⁾ 一般にキノコというと傘と柄を持ち、傘の裏にはひだのあるシイタケのようなキノコを思い浮かべるが、ヤマブシタケはそれとは全く異なった外見をしており、傘を分化せず、白い倒卵形から球形で、広葉樹の立木や枯木にやや垂れ下がって発生する。また、シイタケなどのひだに相当する部分は尖った針状となり、側面及び下面から無数に垂れ下がっている。²⁾ ヤマブシタケは以前から本研究室の研究材料であり、子実体から HeLa 細胞に対する毒性活性を示す hericenone A 及び B や³⁾、前脳基底核コリン作動性神経細胞(BFCN)の働きを活性化させる神経成長因子(NGF)の合成を誘導する hericenone C~H などの化合物が単離・精製されている。^{4,5)} HeLa 細胞は子宮頸部のガン細胞から得られたものであること⁶⁾、BFCN の障害がアルツハイマー型認知症に関係していること⁷⁾から、これらの活性はそれぞれガンや認知症の予防や治療に利用できるのではないかと期待されている。このことから、ヤマブシタケは健康食品として消費者の関心を集めている。

また、以前より、神経変性疾患における細胞内の酸化ストレスと細胞死との関連が報告されており、抗酸化活性に注目した予防薬や治療薬の探索が進められてきた。一方、小胞体(endoplasmic reticulum, ER)で酸化ストレスとは別の細胞内ストレスが生じると同様に細胞死を誘導することが明らかになった。近年、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患において、小胞体ストレスにより引き起こされる細胞死との関連と重要性が報告されている。⁸⁻¹⁴⁾ 真核生物の小胞体では蛋白質の成熟にあたり、糖鎖付加等の修飾を受け、「小胞体品質管理」と呼ばれる機構により、小胞体内で正しい高次構造をとった蛋白質は小胞体外に分泌されるが、蛋白質のミスフォールディングなどで正しい高次構造をとれなかった異常蛋白質は分泌されずに小胞体内部に蓄積される。この異常蛋白質の蓄積による小胞体ストレスに対して、小胞体分子シャペロンによる異常蛋白質のフォールディングの促進や異常蛋白質を細胞質に排出してプロテアソームにより分解する ER-associated degradation (ERAD) と呼ばれる応答機構がある。¹⁵⁻¹⁷⁾ しかし過度な小胞体ストレスを受けると上述の機構では対処できずに異常蛋白質の蓄積を招き神経細胞のアポトーシスにつながるが、その細胞死発生の機構は解明されていない。しかし、小胞体ストレスと細胞死は神経変性疾患だけでなく、糖尿病や動脈硬化といった生活習慣病、脳の虚血やガンといった様々な疾患との関連が報告されており¹⁴⁾、その機能解明と小胞体ストレス誘導細胞死を制御する物質の発見は神経変性疾患をはじめとする様々な疾患の治療・予防薬の開発につながる可能性がある。¹⁸⁾ また、このような疾患に対して、発病してからの治療ではなく、食品を摂取することで、発病のリスクを下げることもできるかもしれないという報告が出ている。^{19, 20)}

このような背景のもと、本研究室では、食用のキノコ類からの小胞体ストレス抑制物質の探索を行っており、本研究の研究材料であるヤマブシタケから既に *dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine* を見出し、活性発現機構を検討している。²⁾ そこで、本研究では、ヤマブシタケよりさらなる小胞体ストレス誘導細胞死抑制物質の単離及び精製を目的とし、探索を行った。その研究材料として、ヤマブシタケの子実体と廃菌床を用いることとした。人工栽培されているキノコの多くは菌床栽培されているが、キノコ収穫後の菌床の多くは廃棄され、年間のその廃棄量は膨大なものとなっている。そこで、廃菌床の利用価値を見出すために、本研究では、ヤマブシタケ廃菌床も研究材料として用いた。

第2章 本論

第1節 ヤマブシタケ由来の機能性物質の単離

2-1-1 子実体由来の機能性物質の単離

生のヤマブシタケ子実体を 85%エタノール、アセトンで順次抽出後、分液ロートを用いて、クロロホルム層、酢酸エチル層、水層を得た。活性の確認されたクロロホルム層をフラッシュクロマトグラフィーに供したのち、ODS 中圧カラムを用いた MPLC に供した。さらに、ODS カラムを用いた HPLC に供して化合物 1 を得た(Fig. 1)。

温風乾燥させたヤマブシタケ子実体をヘキサン、酢酸エチル、エタノールで順次抽出し、減圧濃縮し、各抽出物を得た。活性の確認されたヘキサン層をフラッシュクロマトグラフィーに供し、さらに ODS カラムを用いた HPLC で分画し、新規化合物である化合物 2 及び 3 を得た(Fig. 2)。

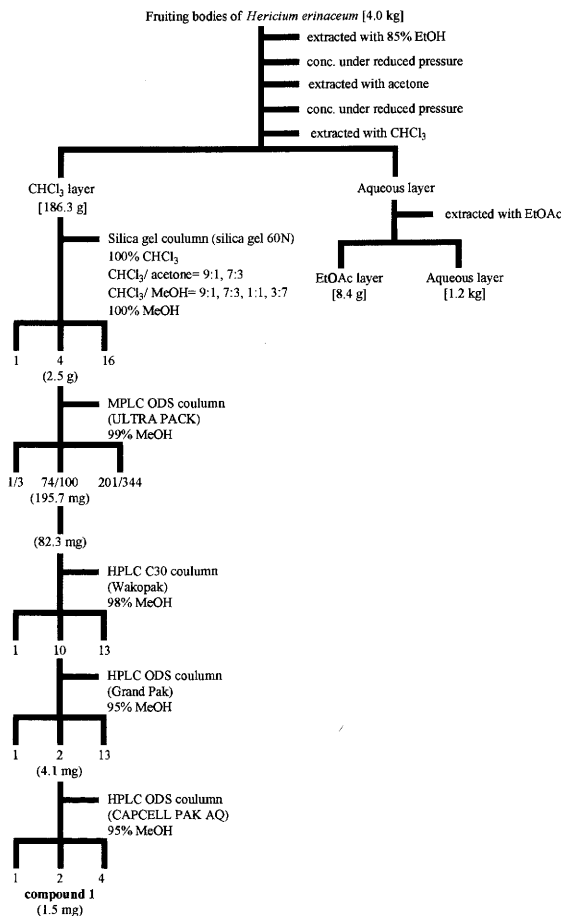


Fig. 1 Chromatographic fractionation of CHCl₃ layer of the fresh fruiting bodies of *Hericium erinaceum*.

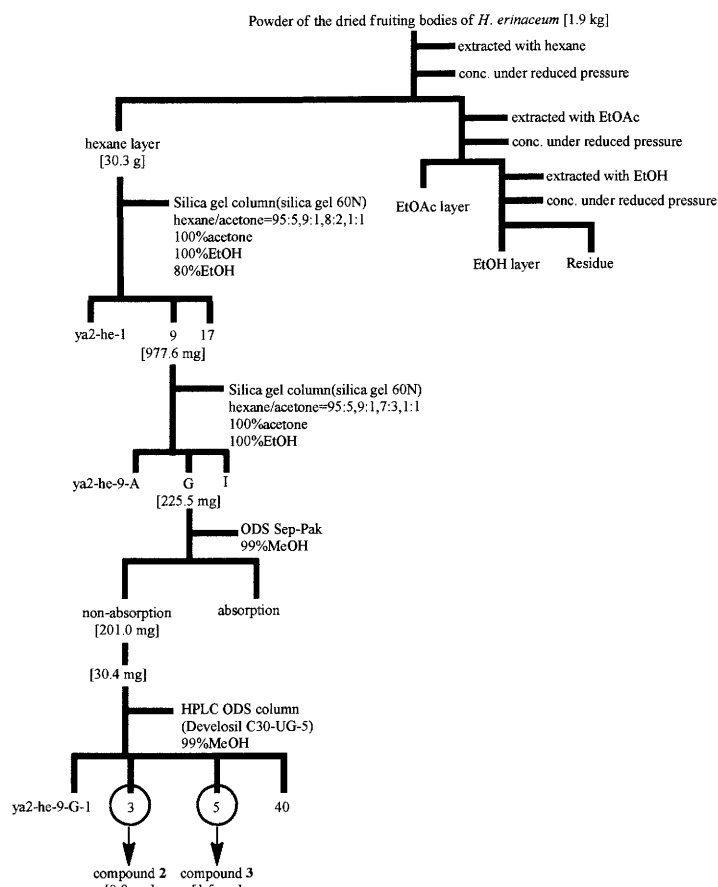


Fig. 2 Chromatographic fractionation of hexane layer of the powdered fruiting bodies of *H. erinaceum*.

2-1-2 廃菌床由来の機能性物質の単離

ヤマブシタケ廃菌床を 85%エタノール、アセトンで順次抽出後、分液ロートを用いて、ヘキサン層、酢酸エチル層、水層を得た。ヘキサン層及び酢酸エチル層において活性が確認された。ヘキサン層を各種クロマトグラフィーに供し、化合物 4~7 を単離及び精製した (Fig. 3, 4)。続いて、酢酸エチル層を各種クロマトグラフィーにより分画し、化合物 8~10 を得た (Fig. 5)。

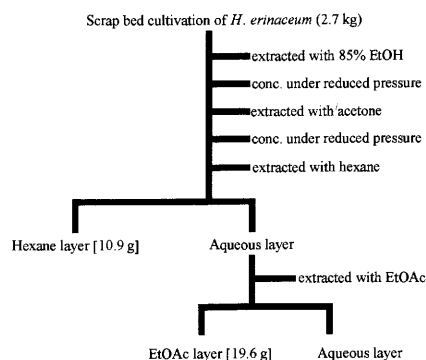


Fig. 3 Extraction of the scrap cultivation beds of *H. erinaceum*.

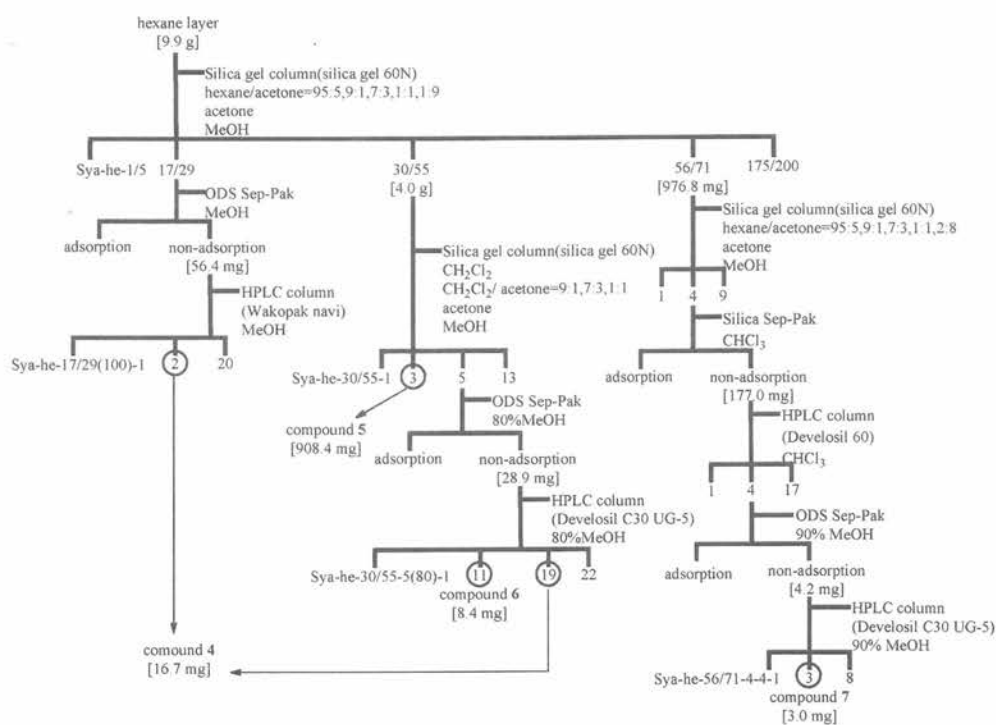


Fig. 4 Chromatographic fractionation of hexane layer of the scrap cultivation beds of *H. erinaceum*..

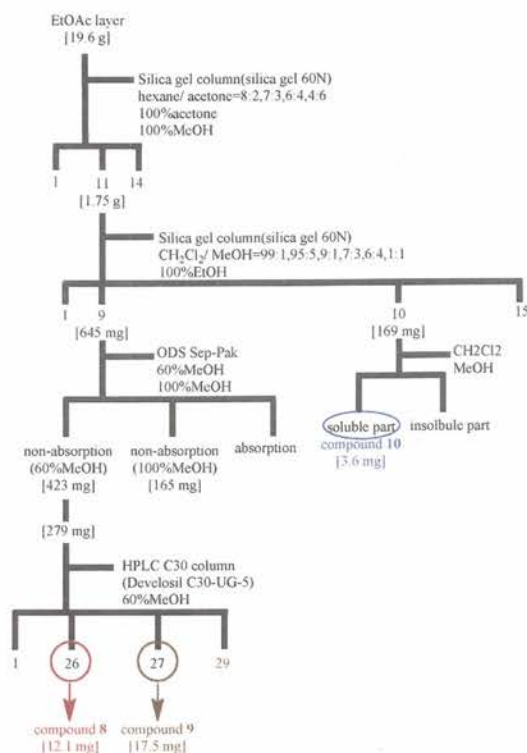
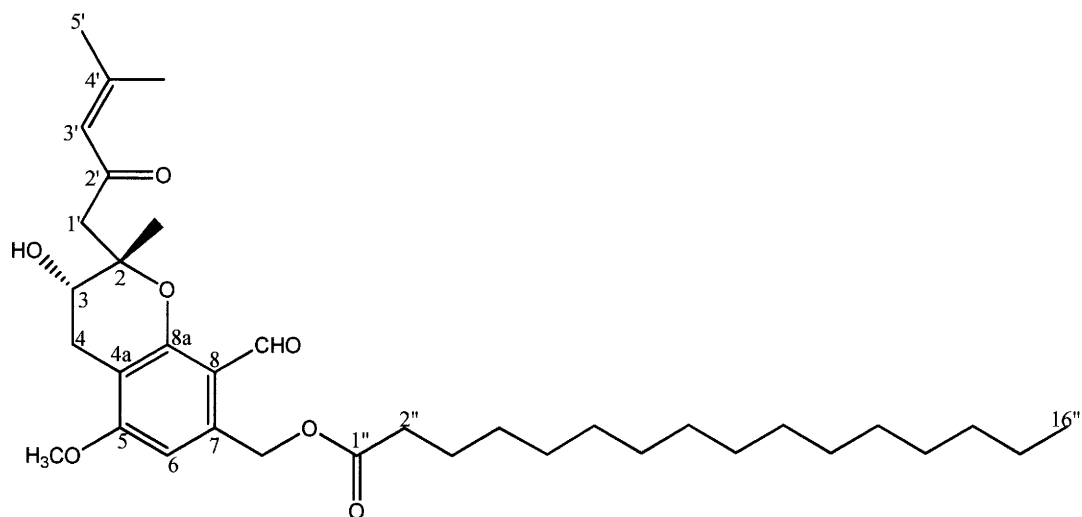


Fig. 5 Chromatographic fractionation of EtOAc layer of the scrap cultivation beds of *H. erinaceum*..

第2節 化合物の構造解析

2-2-1 化合物 1(3-hydroxyhericenone F)の構造解析

化合物 1 は HRESIMS(+)において m/z 609.36816 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{35}H_{54}NaO_7$, 609.37672) の分子イオンピークを示したことより、分子式を $C_{35}H_{54}O_7$ と決定した。IR スペクトルで 3446 cm^{-1} に水酸基を示唆する吸収ピークが観測された(Fig. 6)。 ^{13}C -NMR 及び DEPT スペクトルより、メチルが 4 つ、メチレンが 17 個、メチンが 3 つ、4 級炭素が 9 つであることが分かった(Fig. 8)。HMBC 相関($H_6 \rightarrow C_{4a}, C_{8a}, C_8, C_7\text{-CH}_2$; $H_4 \rightarrow C_2, C_{4a}, C_{8a}$; $H_7\text{-CH}_2 \rightarrow C_6, C_7, C_8$; $H_2\text{-Me} \rightarrow C_2, C_3$)より、クロマン骨格の存在が示唆された(Fig. 10)。フォルミル基(δ_H 10.22, δ_C 187.6)は C_7 及び C_8 、メトキシ基(δ_H 3.87, δ_C 55.6)は C_5 に相関を示した(Fig. 10)。さらに HMBC 相関($H_{1'} \rightarrow C_2', C_2, C_3$; $H_{3'} \rightarrow C_2', C_4'$; $H_{5'} \rightarrow C_3', C_4', C_4'\text{-Me}$; $H_4'\text{-Me} \rightarrow C_3', C_4', C_5'$)より、側鎖部分の構造が支持された(Fig. 10)。脂肪酸エステルの部分は NMR 及び MS データよりパルミチン酸とした。さらに、NOE 差及び NOESY スペクトルより、 H_3 と $H_2\text{-Me}$ 間に相関が確認されたので、化合物 1 の構造を ((2*S**,3*S**)-8-formyl-3-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-2-(4'-methyl-2'-oxopent-3'-enyl)chroman-7-yl)methyl palmitate と決定した。また、CD スペクトルを測定したところ、ラセミ体であった。化合物 1 は新規化合物であり、同じくヤマブシタケより単離されている hericenone F の 3 位に水酸基が付加した構造であったことより、3-hydroxy-hericenone F と命名した。



((2*S*,3*S*)-8-formyl-3-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-2-(4-methyl-2-oxopent-3-enyl)chroman-7-yl)
methyl palmitate

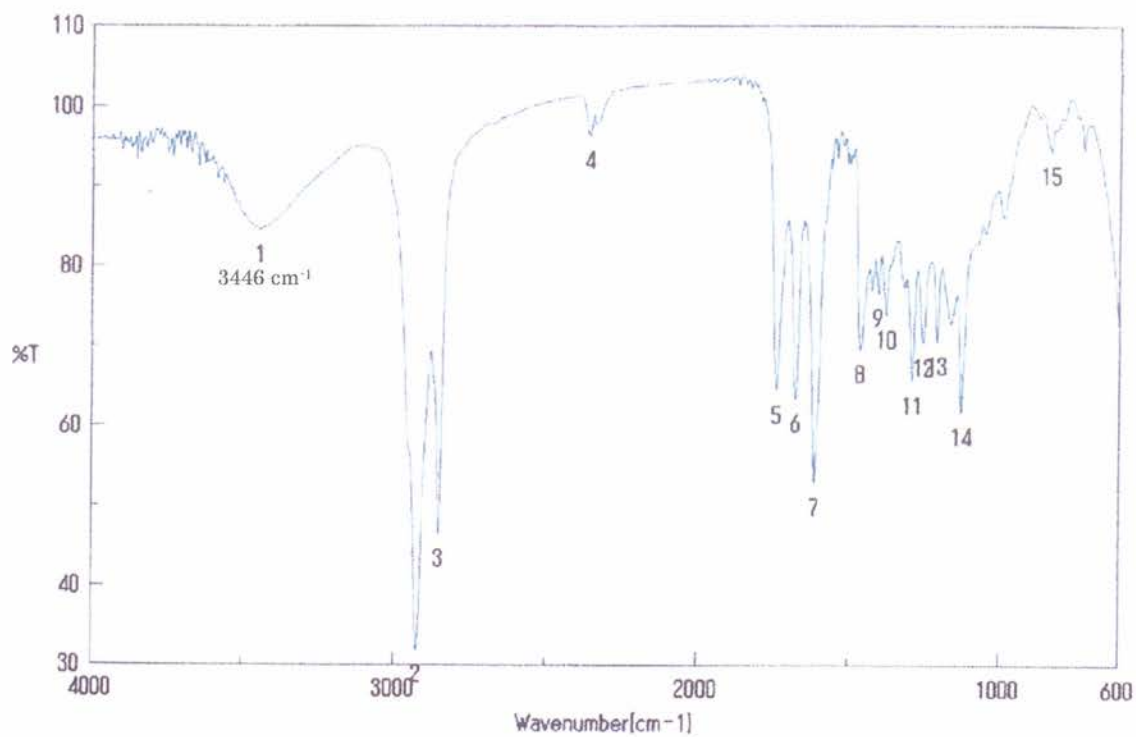


Fig. 6 IR spectrum of 1.

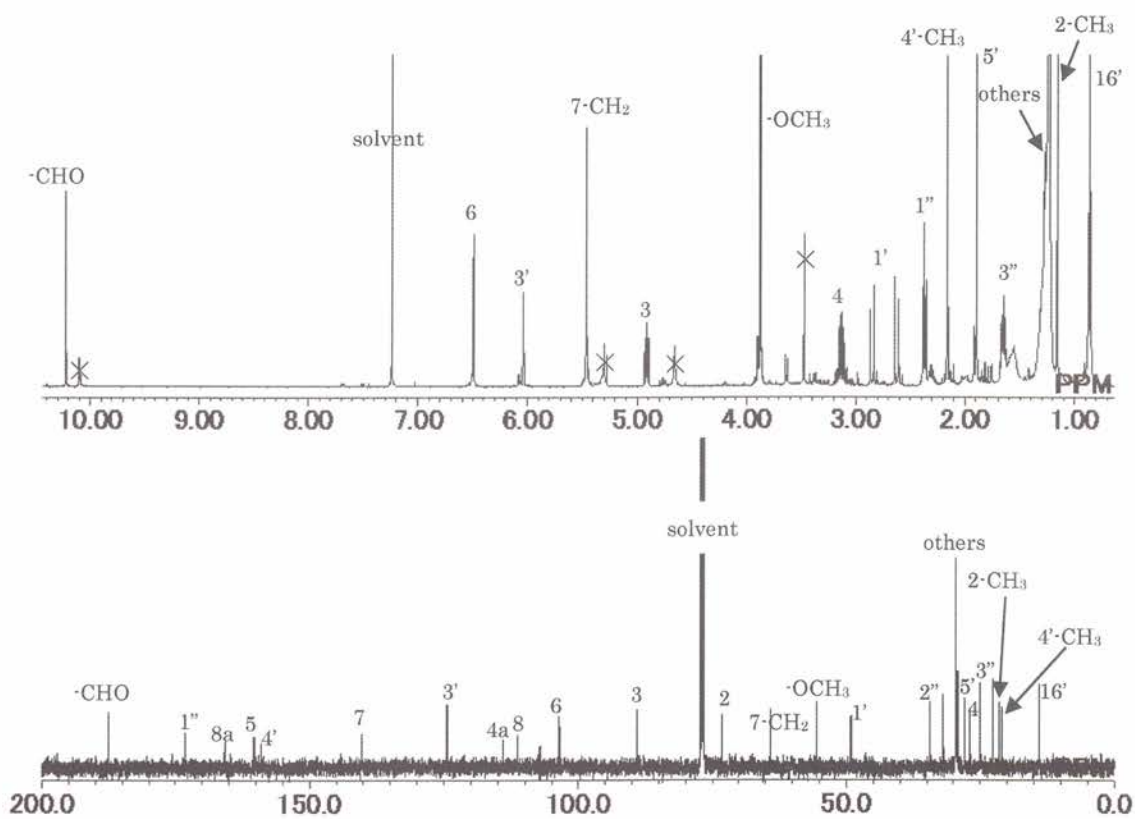


Fig. 7 ^1H and ^{13}C NMR spectra of 1 (in CDCl_3).

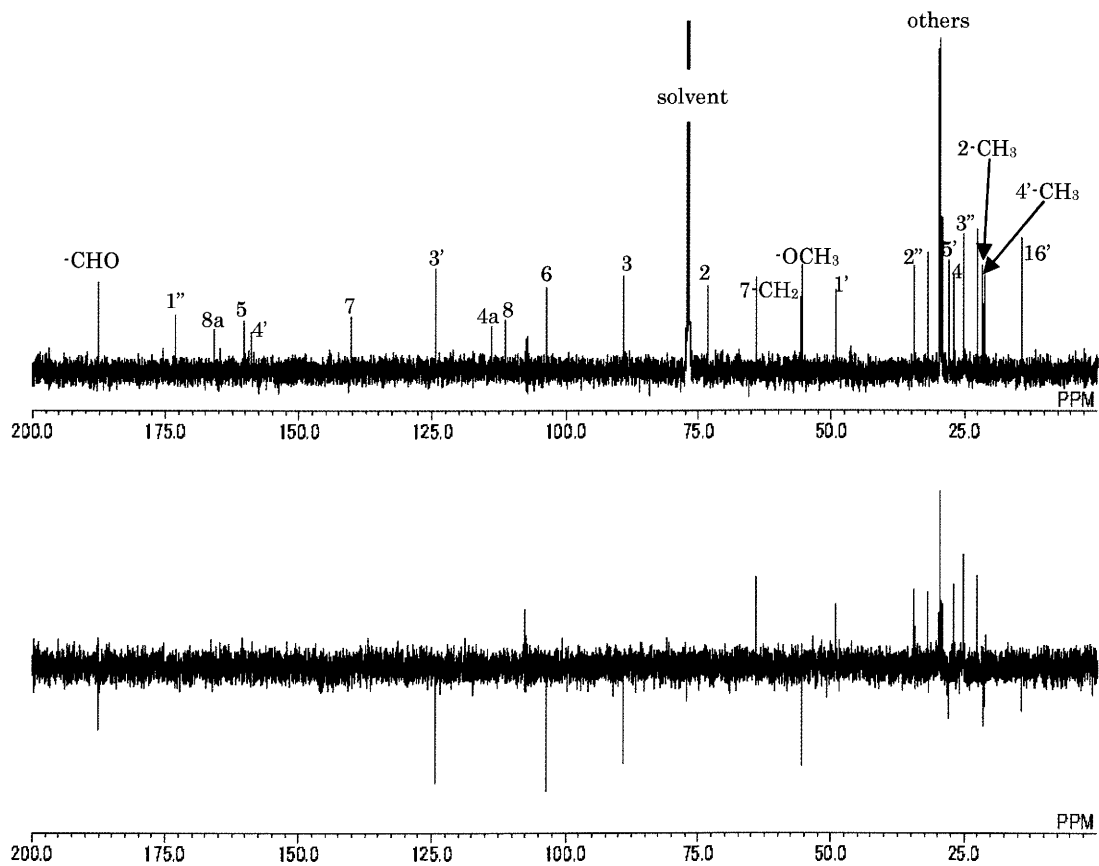


Fig. 8 DEPT spectrum of 1 (in CDCl₃).

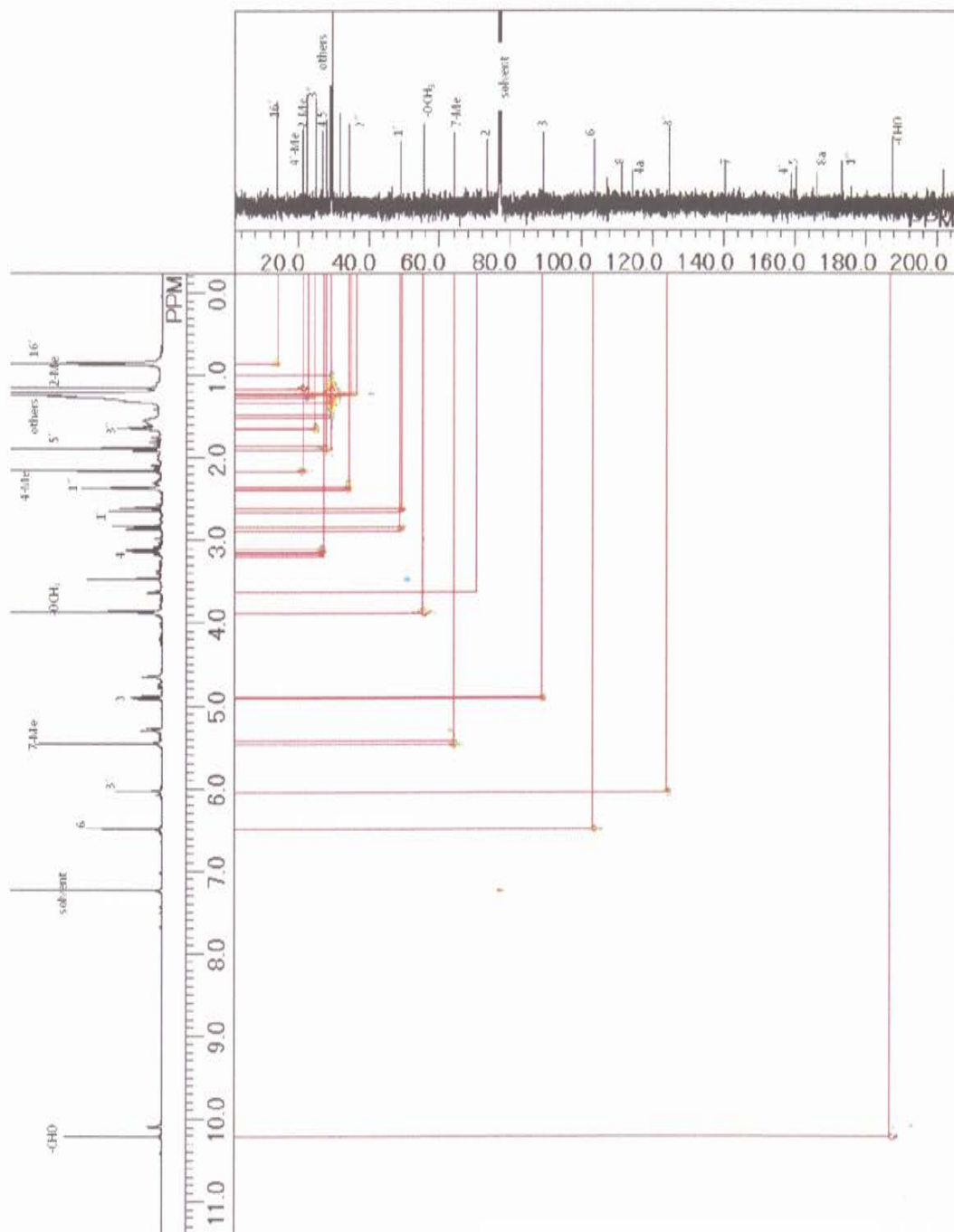


Fig. 9 HMQC spectrum of 1 (in CDCl₃).

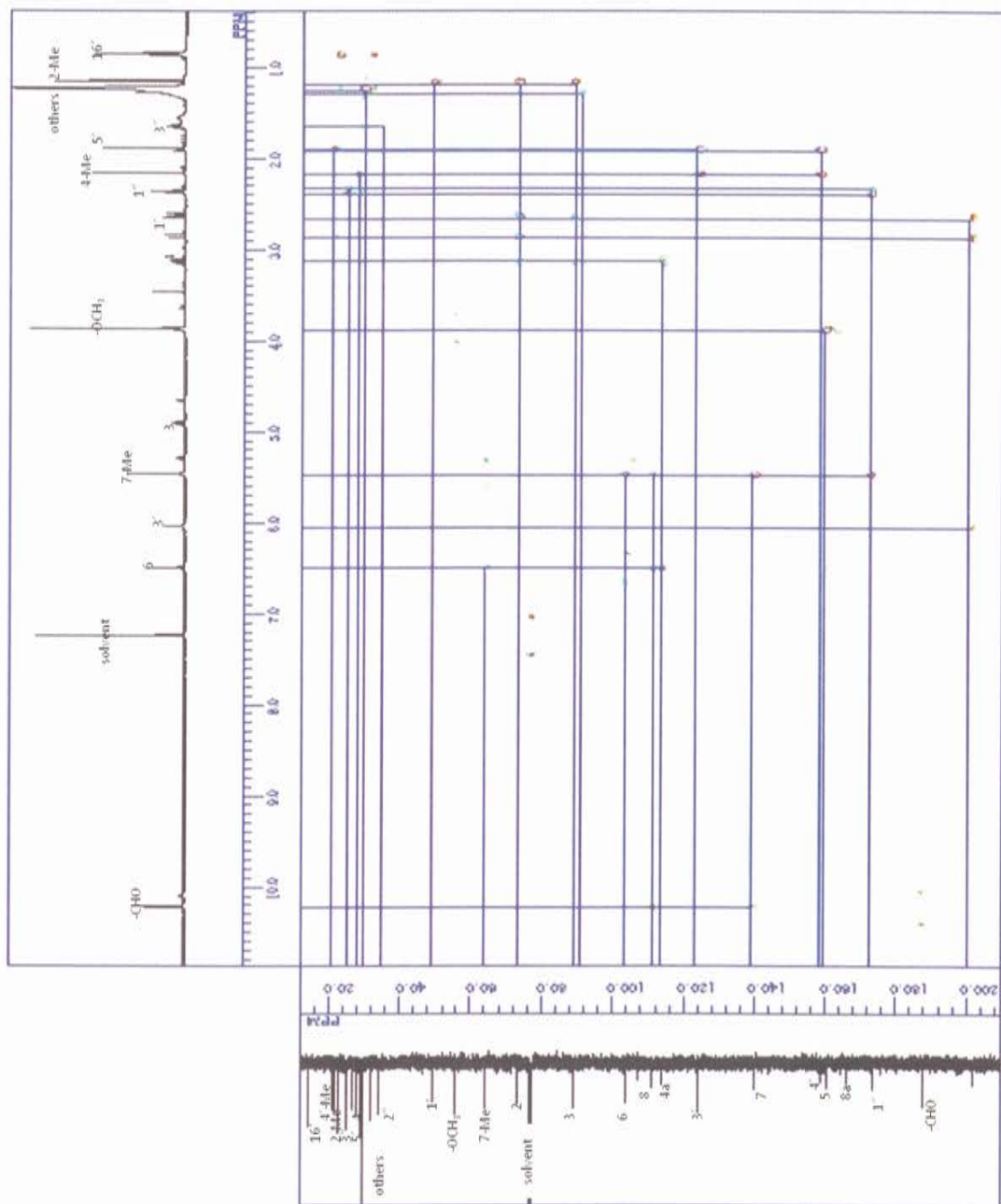
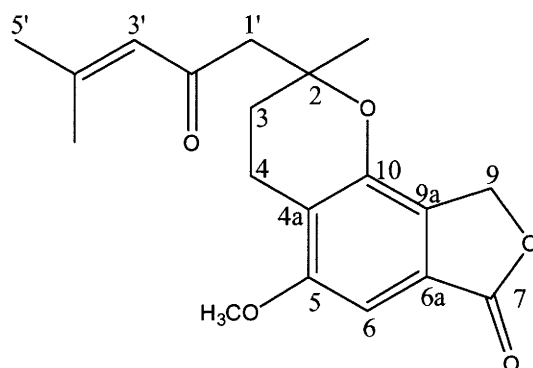


Fig. 10 HMBC spectrum of 1 (in CDCl₃).

2-2-2 化合物 2 (hericenone I)の構造決定

化合物 2 は HRESIMS(+)において m/z 356.1328 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{19}H_{22}NaO_5$, 353.1365)に分子イオンピークが示されたことより、分子式を $C_{19}H_{22}O_5$ と決定した(Fig. 11)。IR スペクトルで 1768 cm^{-1} にラクトン、 1682 cm^{-1} にケトンを示唆する吸収ピークが観測された(Fig. 12)。 ^{13}C -NMR 及び DEPT スペクトルより、メチルが 4 つ、メチレンが 4 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 8 つと決定した(Fig. 14)。HMBC 相関($H_2\text{-Me} \rightarrow C_2, C_3$; $H_3 \rightarrow C_2, C_4$; $H_4 \rightarrow C_3, C_4a, C_5, C_{10}$; $H_6 \rightarrow C_4a, C_5, C_7, C_{9a}$; $H_9 \rightarrow C_{6a}, C_7, C_{9a}, C_{10}$)より、クロマン骨格にラクトンが結合した構造が支持された(Fig. 17)。メトキシ基(δ_H 3.87, δ_C 56.0)は C_5 と相関を示した(Fig. 17)。側鎖部分は COSY の相関(H_5'/H_3' ; H_4'/H_3')および HMBC の相関($H_{1'} \rightarrow C_{2'}, C_{3'}, C_2, C_3, C_2\text{-Me}$; $H_{3'} \rightarrow C_{2'}$)より、構造が明らかとなった(Fig. 15,17)。これらと各種 NMR データより、化合物 2 を 5-methoxy-2-methyl-2-(4-methyl-2-oxopent-3-en-1-yl)-3,4-dihydro-2*H*-furo[3,4-*h*]chromen-7(9*H*)-one と決定した。CD スペクトルを測定したが、ラセミ体であった。この化合物は新規化合物であり、ヤマブシタケから単離されている一連の hericenone 類縁体として、hericenone I と命名した。



5-methoxy-2-methyl-2-(4-methyl-2-oxopent-3-en-1-yl)-3,4-dihydro-2*H*-furo[3,4-*h*]chromen-7(9*H*)-one

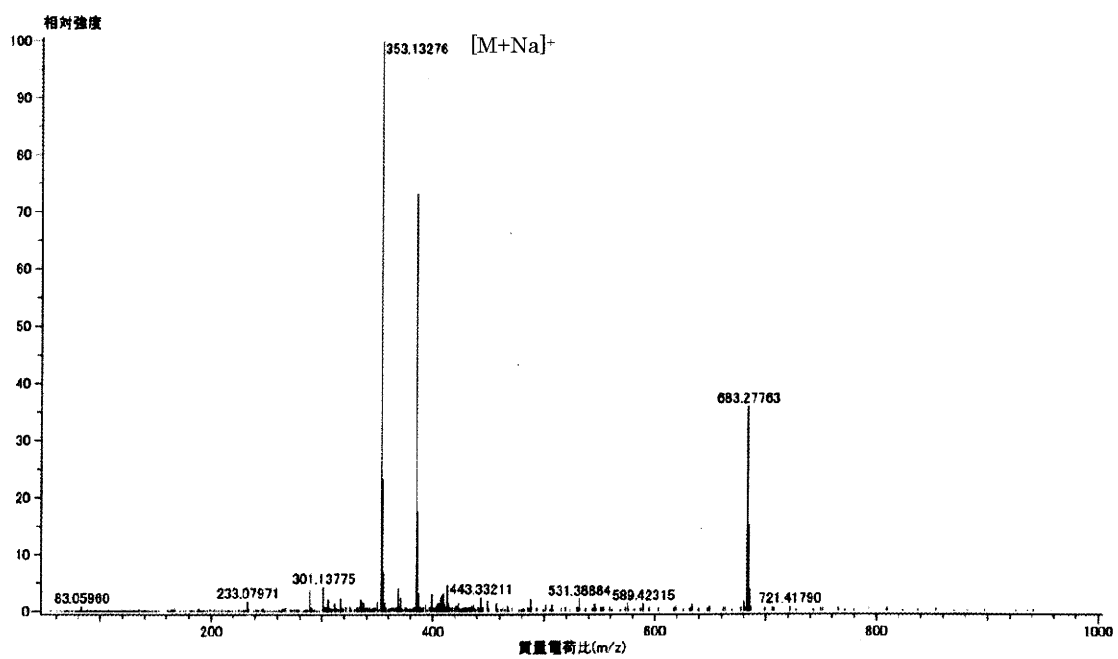


Fig. 11 HRESIMS(+) spectrum of 2.

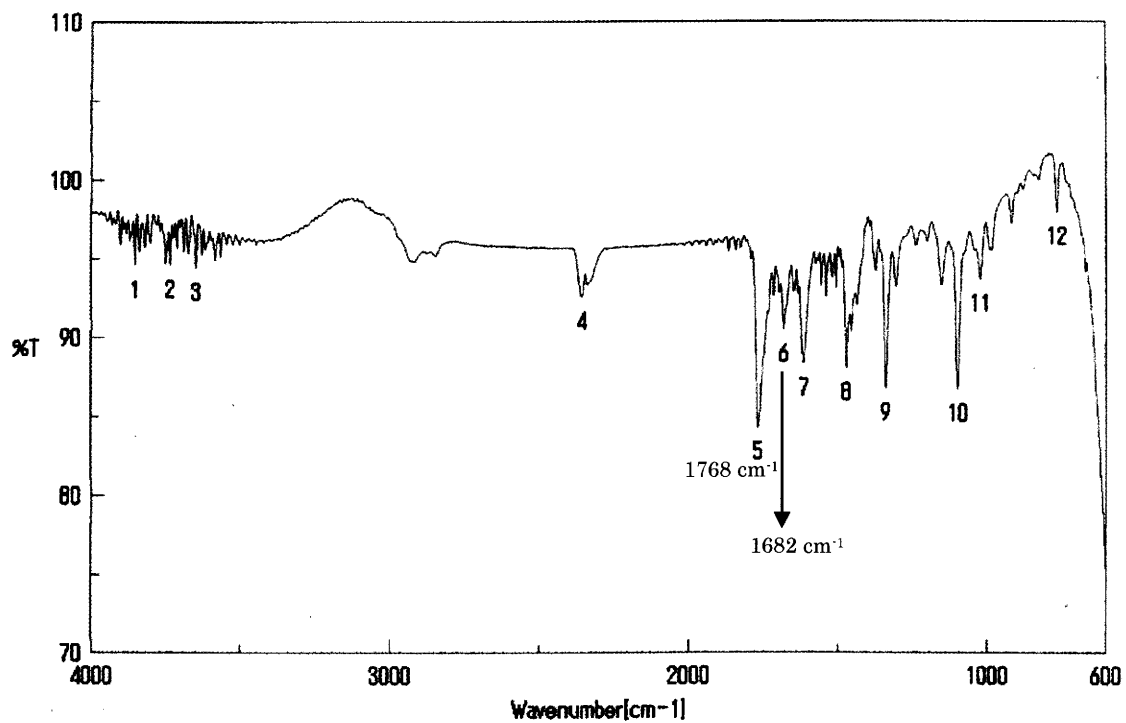


Fig. 12 IR spectrum of 2.

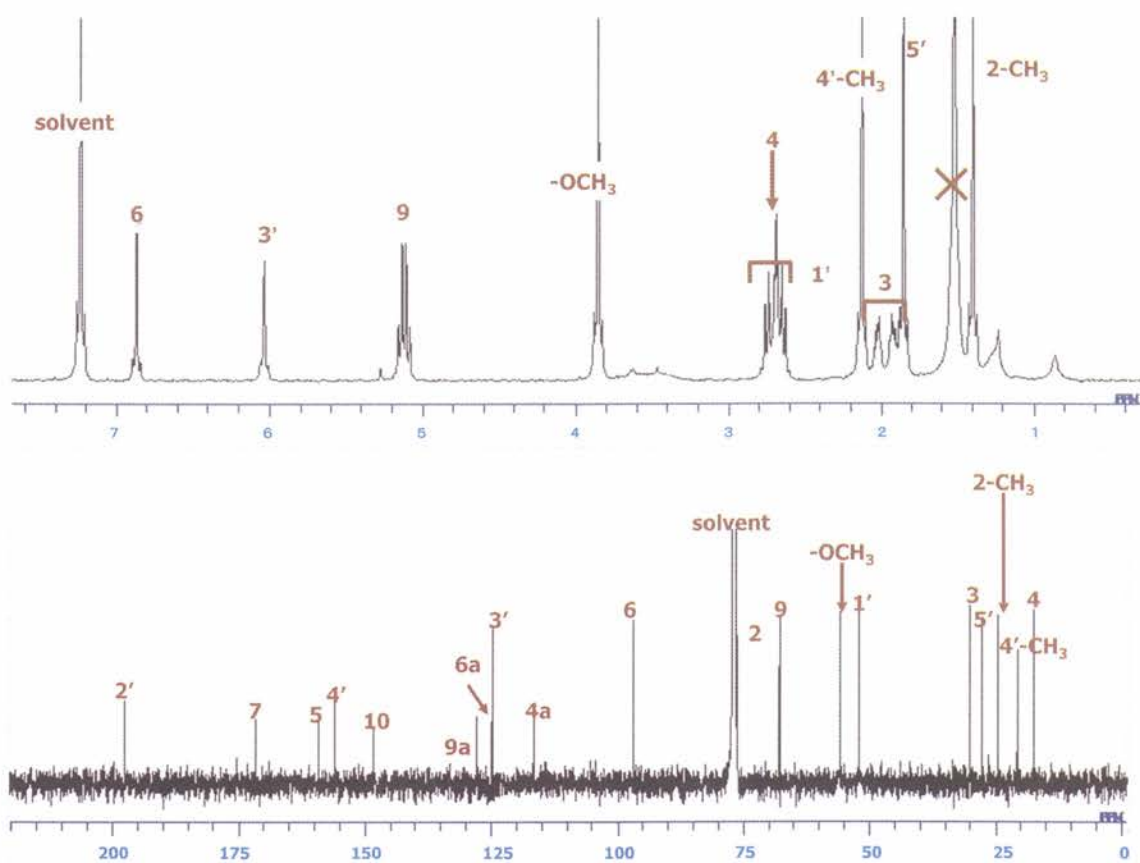


Fig. 13 ¹H and ¹³C NMR spectra of 2 (in CDCl₃).

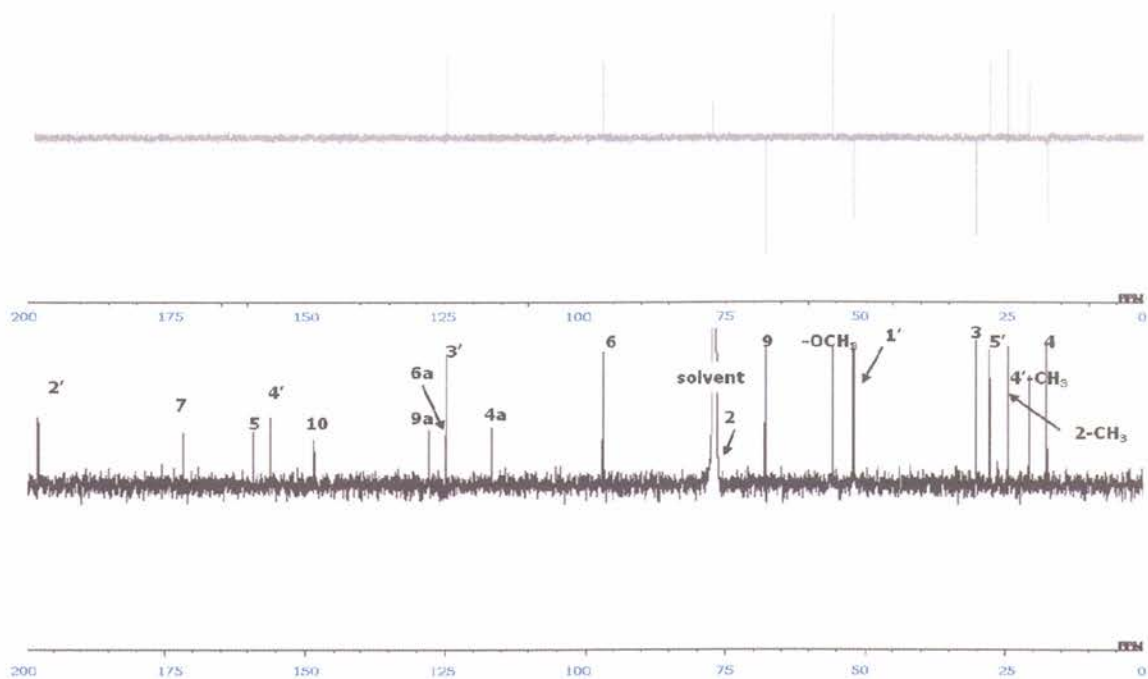


Fig. 14 DEPT spectrum of compound 2 (CDCl₃).

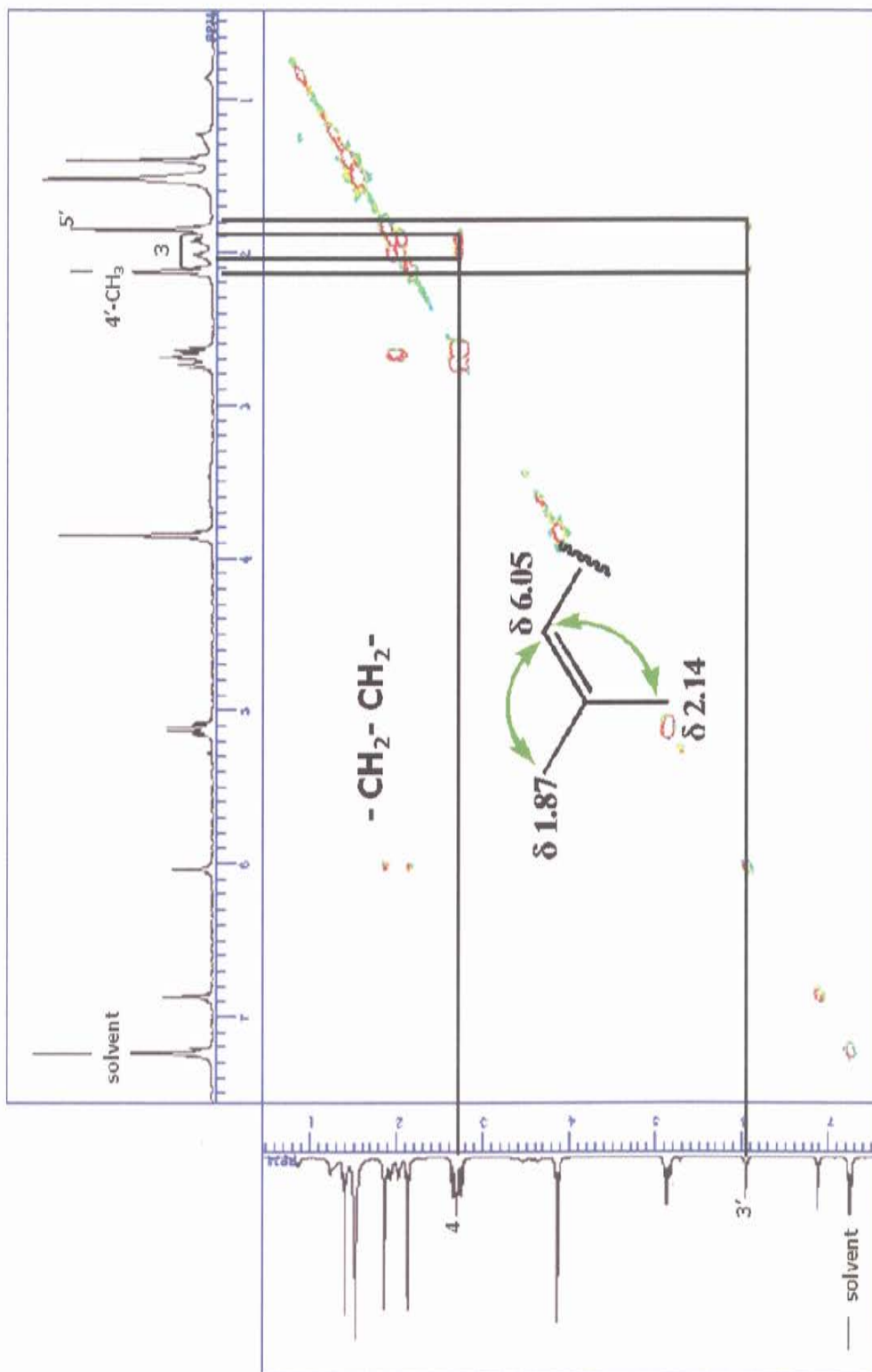


Fig. 15 H-H COSY spectrum of **2** (in CDCl₃)

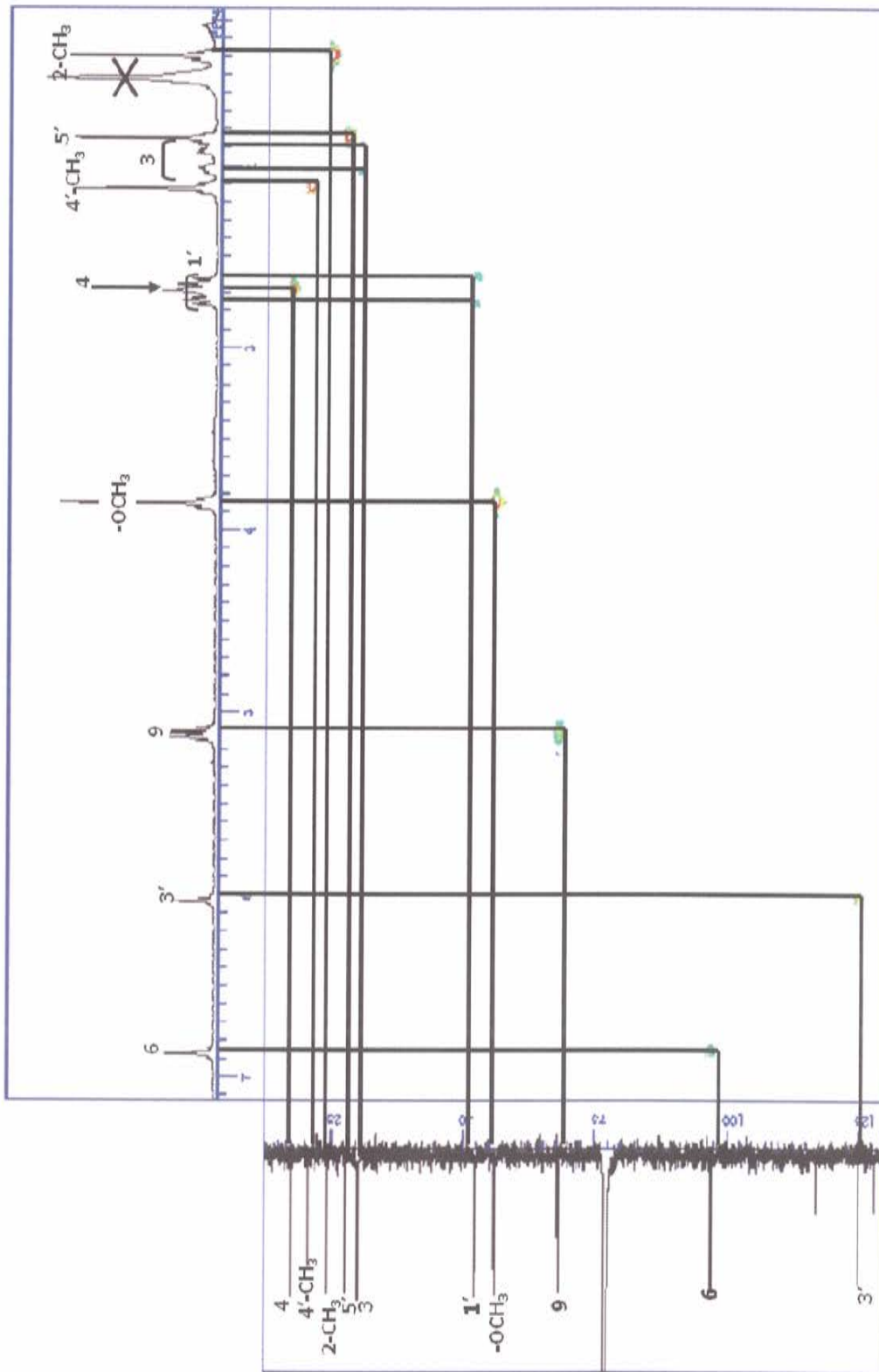


Fig. 16 HMQC spectrum of **2** (in CDCl₃)

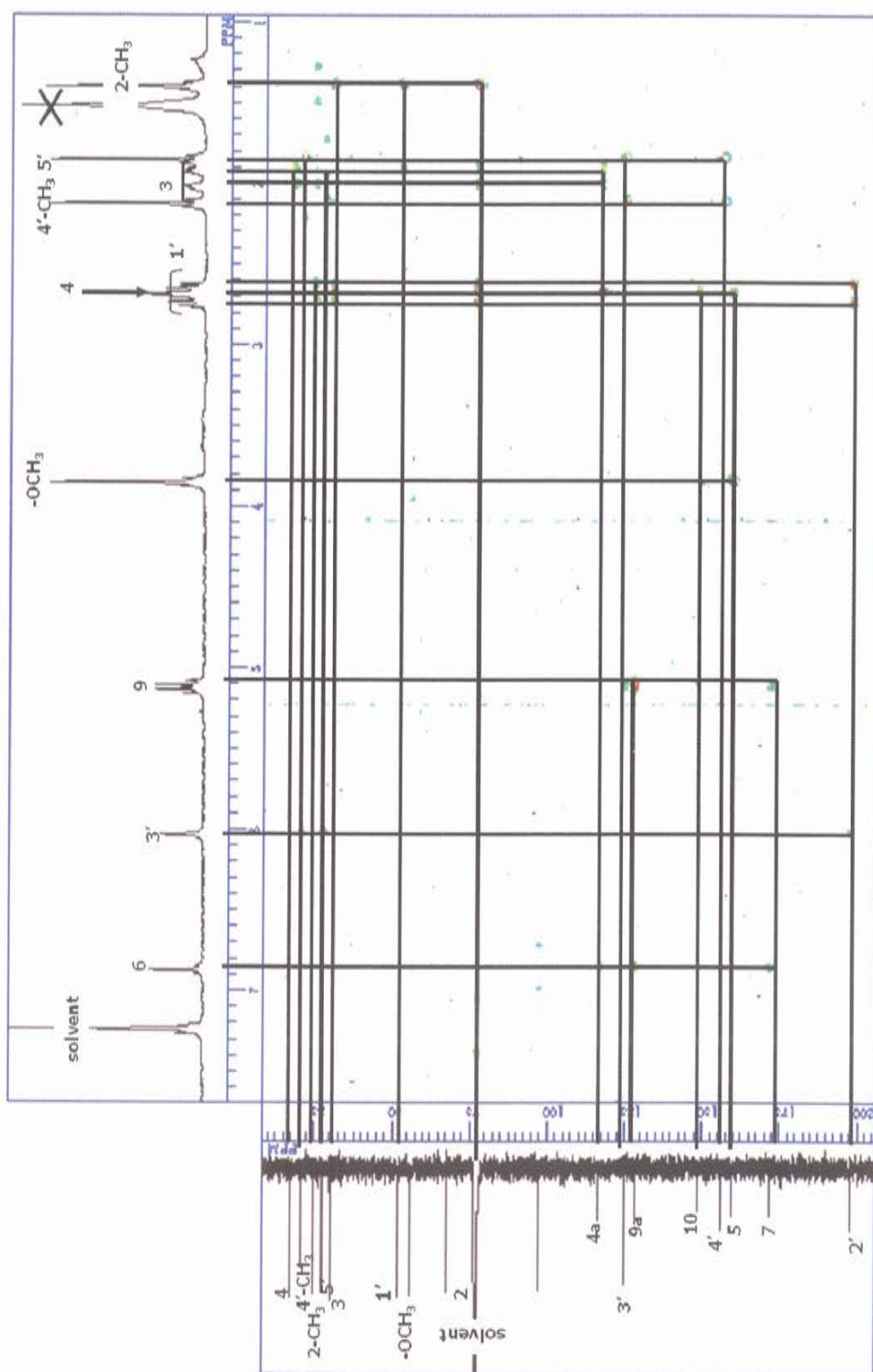
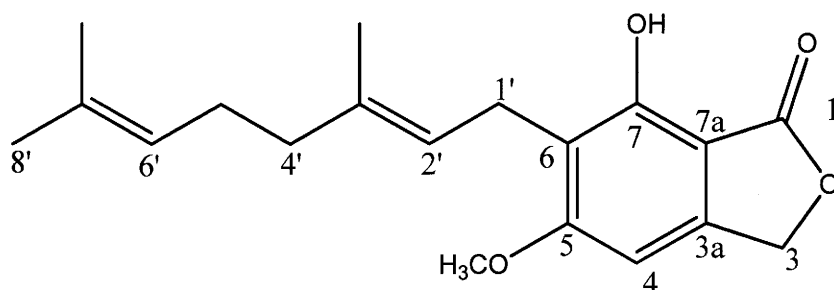


Fig. 17 HMBC spectrum of 2 (in CDCl₃)

2-2-3 化合物 3 (hericenone J) の構造解析

化合物 3 は HRESIMS(+)において、 m/z 339.1549 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{19}H_{24}NaO_4$, 339.1572) に分子イオンピークが示されたことより、分子式を $C_{19}H_{24}O_4$ と決定した (Fig. 18)。IR スペクトルで 3426 cm^{-1} に水酸基、 1731 cm^{-1} にラクトンを示唆する吸収ピークが観測された (Fig. 19)。 ^{13}C -NMR 及び DEPT スペクトルより、メチルが 4 つ、メチレンが 4 つ、メチンが 3 つ、4 級炭素が 8 つと決定した (Fig. 21)。HMBC 相関 ($H_3 \rightarrow C1, C3a, C7a$; $H_4 \rightarrow C3, C5, C6, C7a$) より、ベンゼン環にラクトンが結合した構造が示された (Fig. 24)。メトキシ基 (δ_H 3.88, δ_C 56.1) は $C5$ と相関を示した (Fig. 24)。側鎖部分は、COSY 相関 ($H7'-Me/H6'$; $H6'/H5'$; $H5'/H4'$; $H3'-Me/H1', H2'$; $H1'/H2'$) 及び、HMBC 相関 ($H1' \rightarrow C3'$; $H2' \rightarrow C4'$; $H4' \rightarrow C2', C3'$; $C3'-Me$; $H3'-Me \rightarrow C4'$; $H5' \rightarrow C3'$; $H8' \rightarrow C6', C7', C7'-Me$; $H7'-Me \rightarrow C8'$) より構造が明らかとなった (Fig. 22, 24)。これらと各種 NMR データより化合物 3 の構造を (*E*)-6-(3,7-dimethylocta-2,6'-dien-1-yl)-7-hydroxy-5-methoxyisobenzofuran-1(3*H*)-one と決定した。化合物 3 は新規化合物であり、ヤマブシタケから単離されている一連の hericenone 類縁体として、それぞれ hericenone J と命名した。



(*E*)-6-(3,7-dimethylocta-2,6'-dien-1-yl)-7-hydroxy-5-methoxyisobenzofuran-1(3*H*)-one

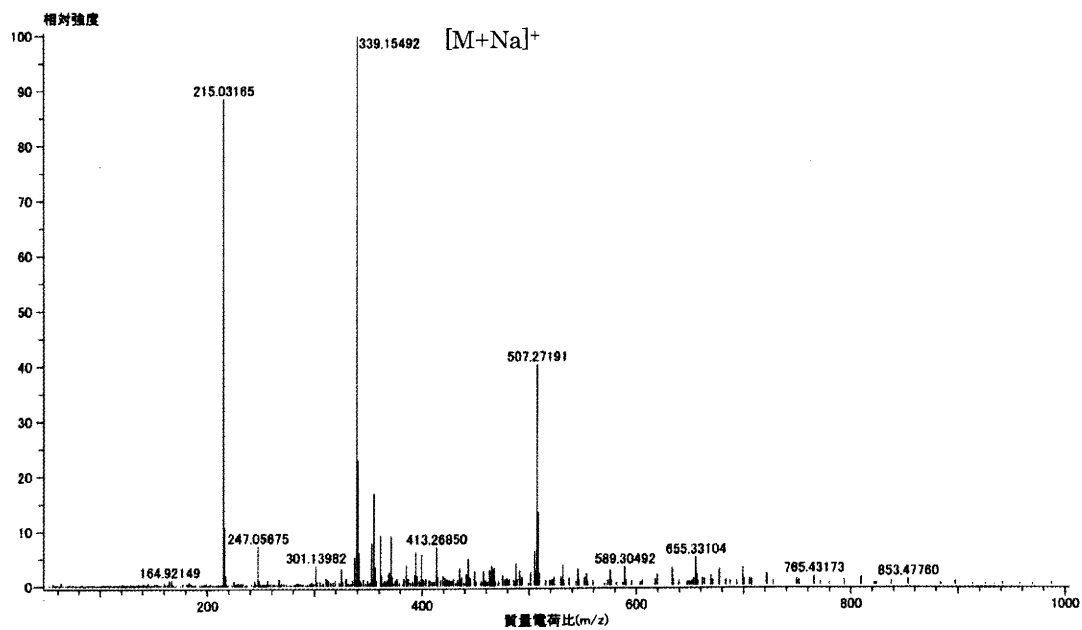


Fig. 18 HRESIMS(+) spectrum of 3

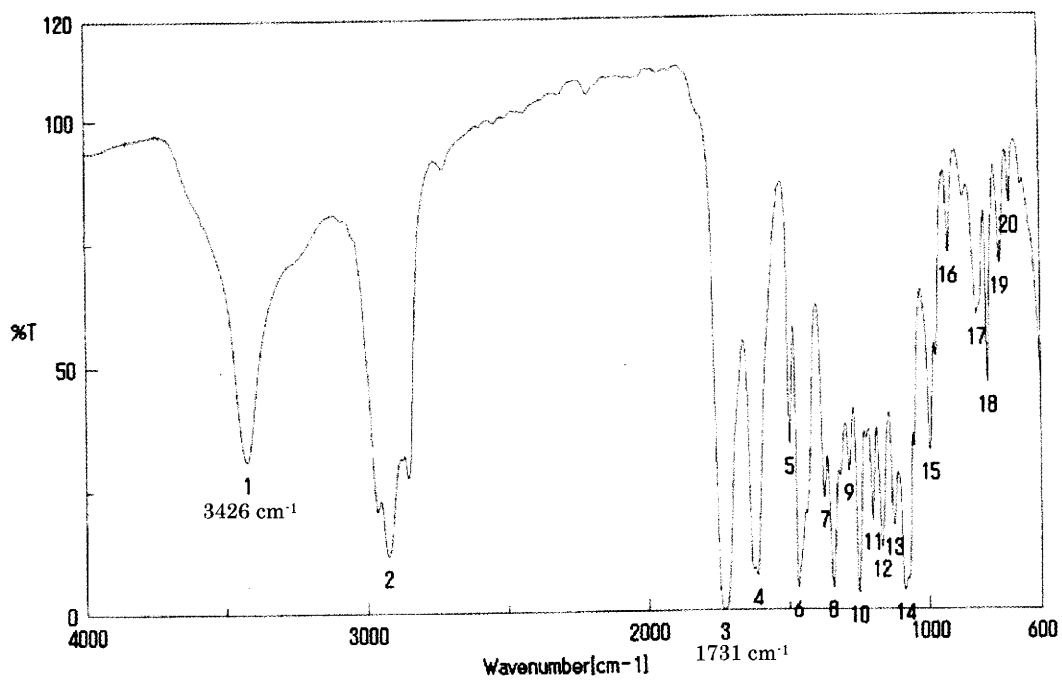


Fig. 19 IR spectrum of 3

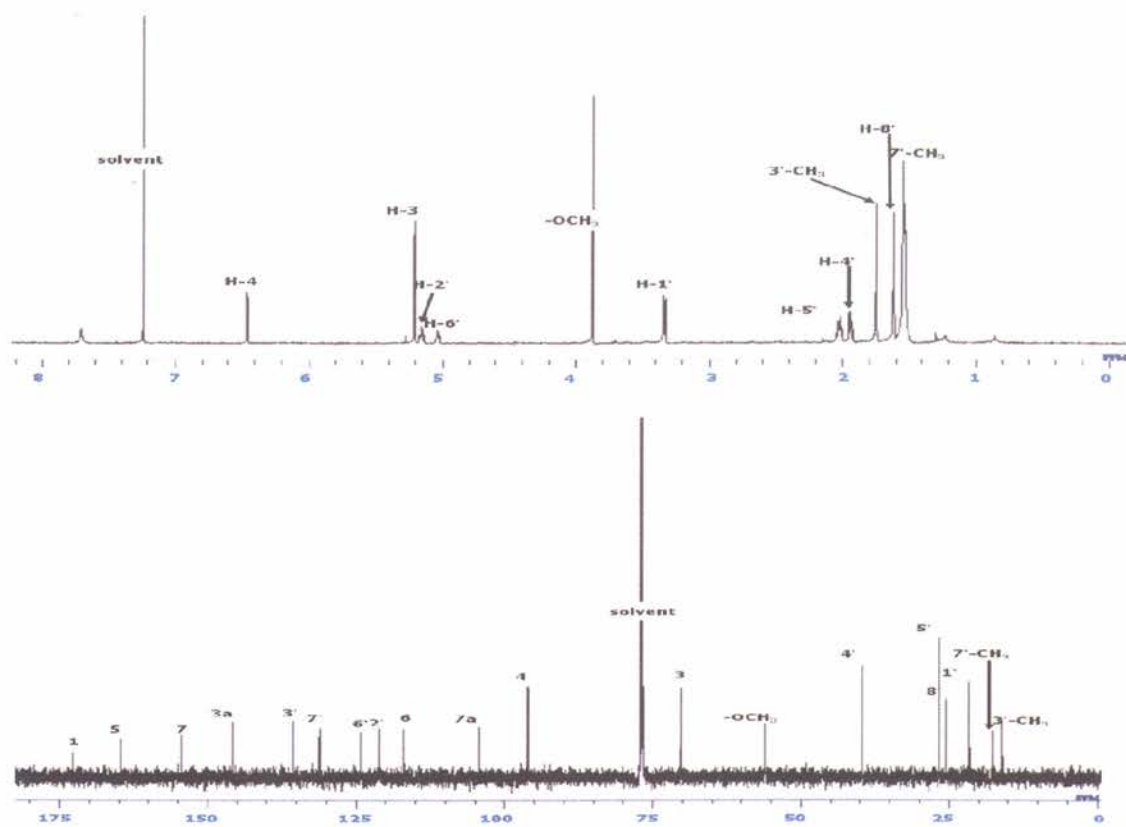


Fig. 20 ¹H and ¹³C-NMR spectra of 3 (in CDCl₃).

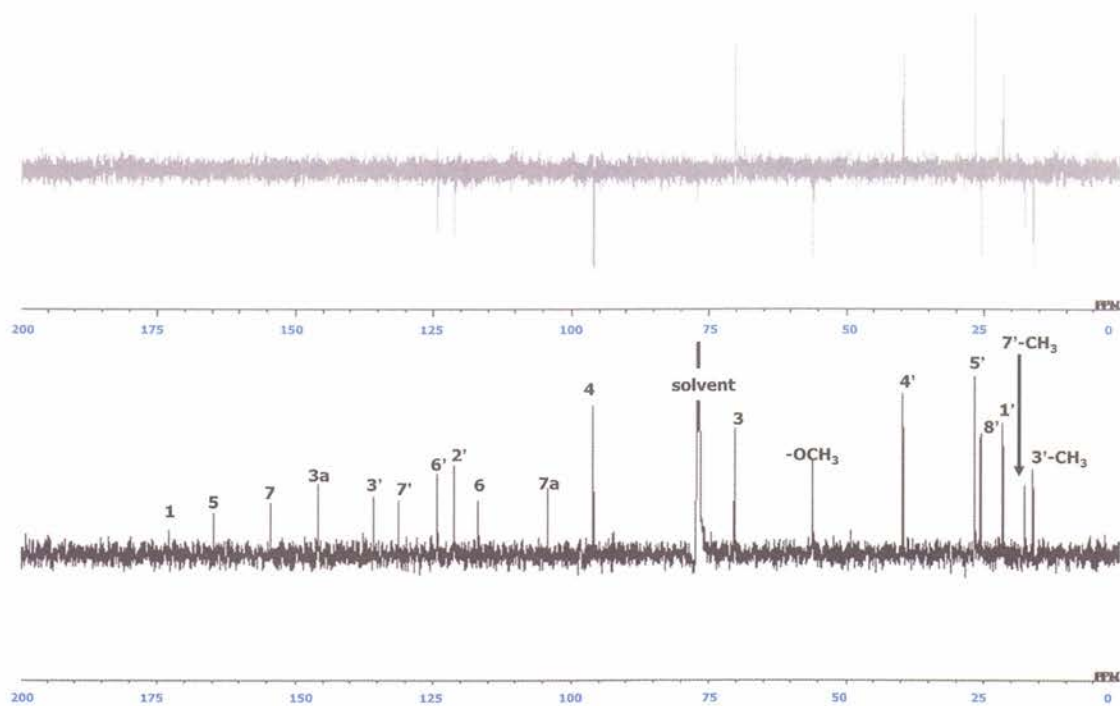


Fig. 21 DEPT spectrum of compound 3 (CDCl₃).

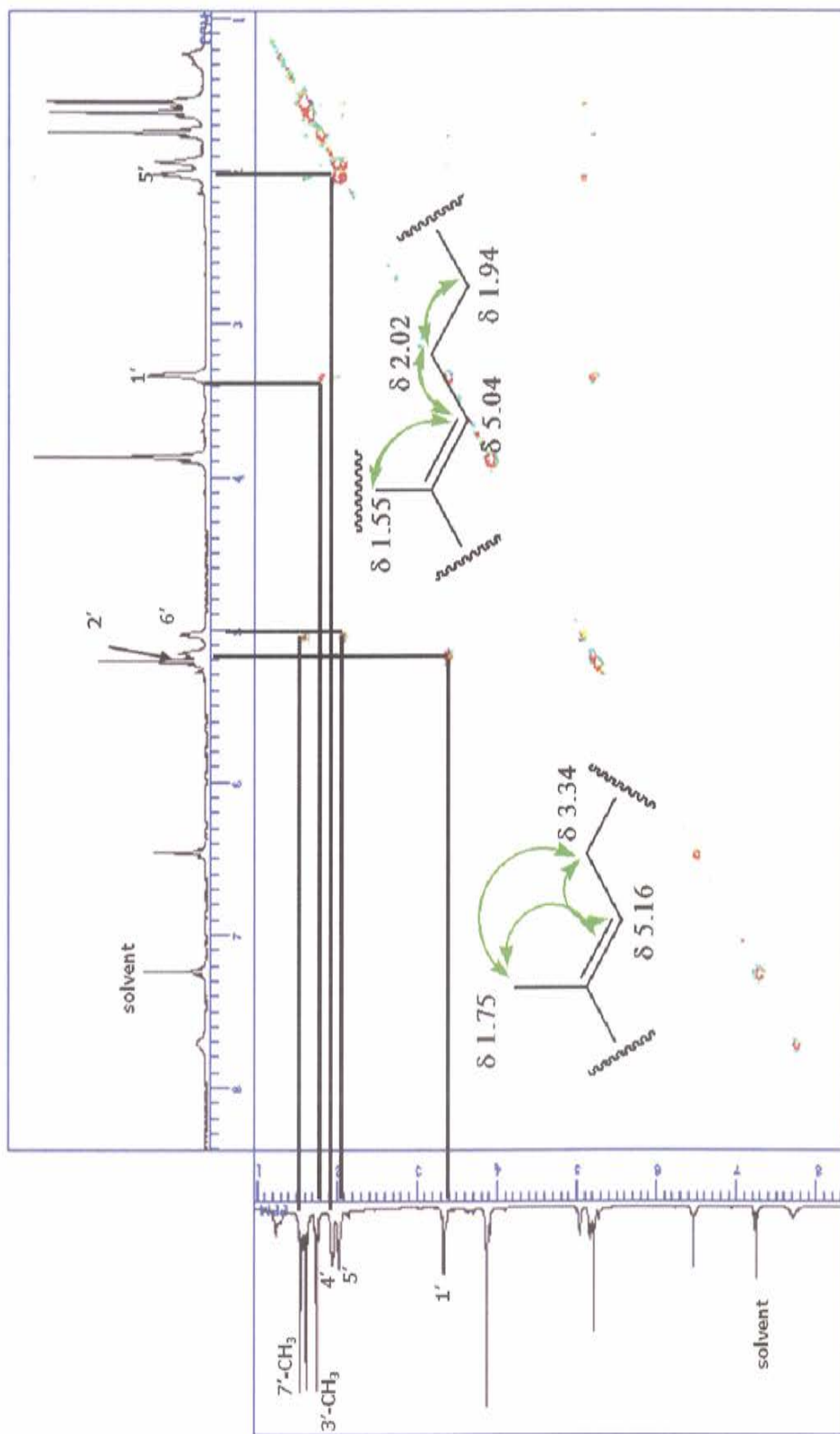


Fig. 22 H-H COSY spectrum of **3** (in CDCl_3).

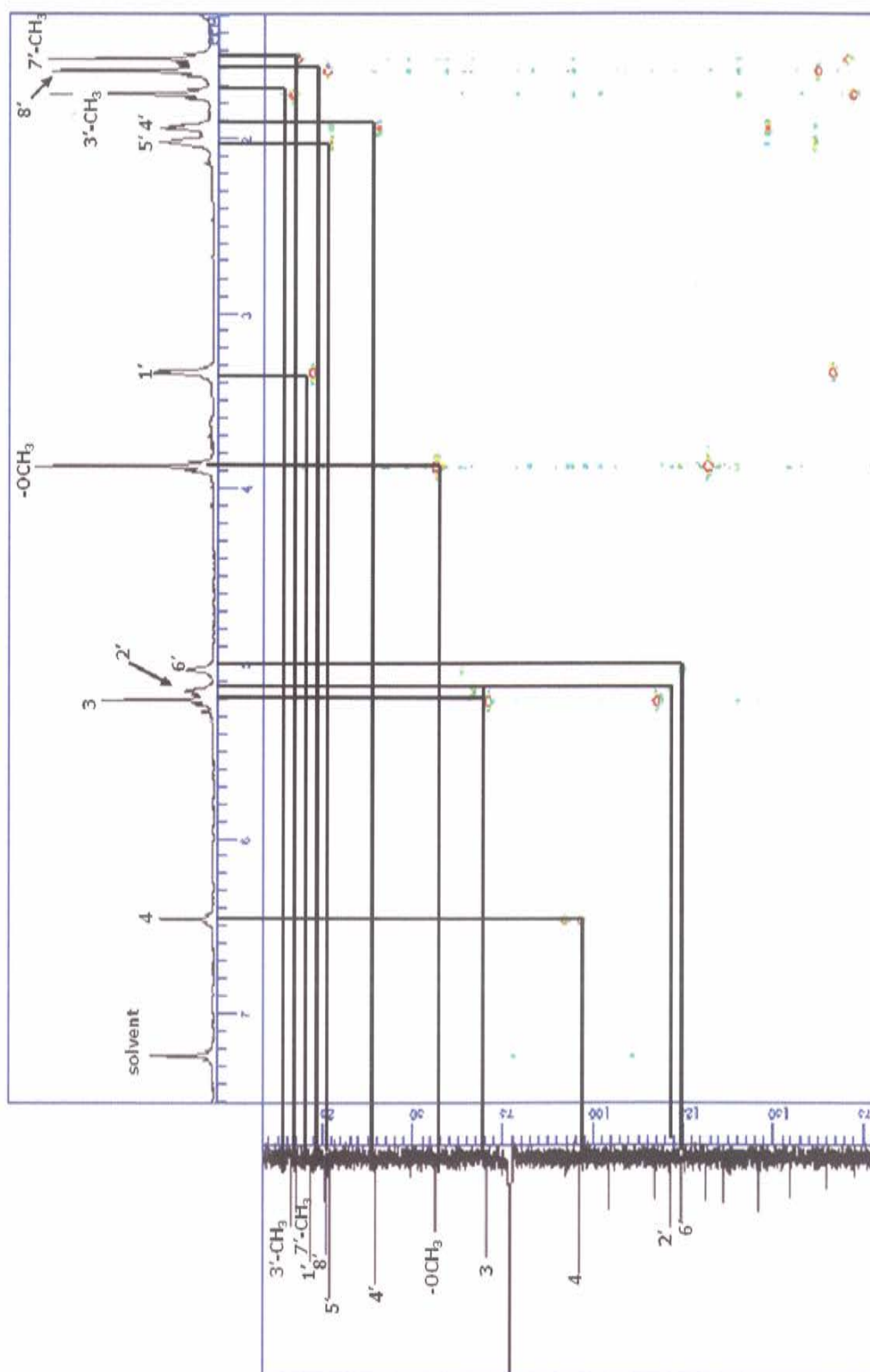


Fig. 23 HMQC spectrum of **3** (in CDCl_3).

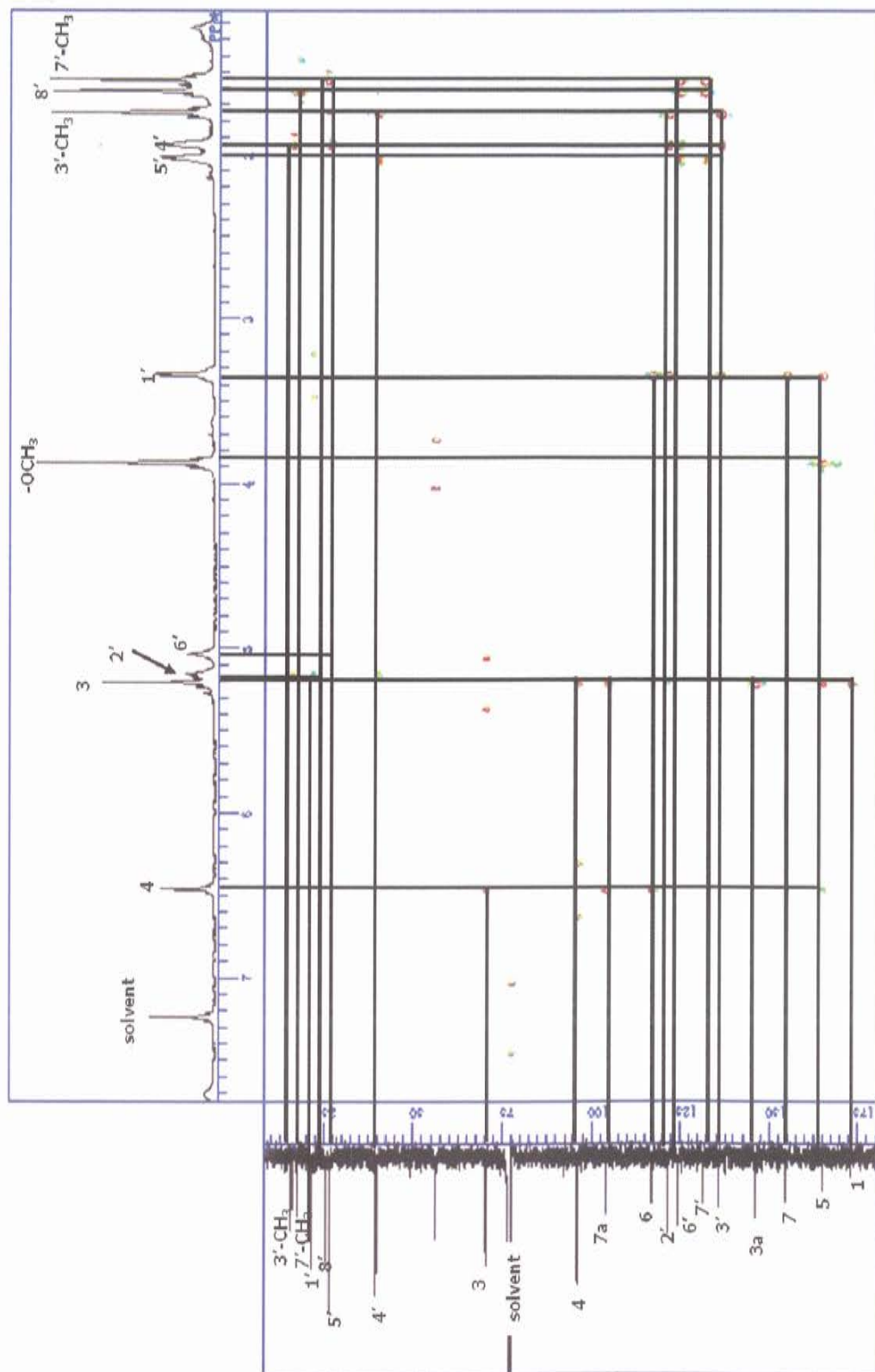


Fig. 24 HMBC spectrum of **3** (in CDCl₃).

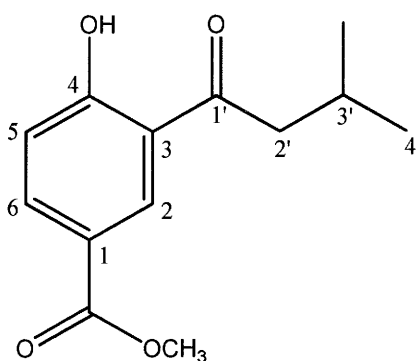
Table 1. Chemical shifts values of **1-3** in CDCl₃.

3-Hydroxy-hericenone F (1)			Hericenone I (2)			Hericenone J (3)		
Position	¹ H	¹³ C	Position	¹ H	¹³ C	Position	¹ H	¹³ C
	δ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	δ		δ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	δ		δ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	δ
2		73.3	2		76.5	1		172.8
3	4.91 (dd, 7.63, 9.80)	89.2	3	1.94 (m)	30.3	3	5.21 (s)	70.3
4	3.13 (m)	27.0		2.04 (m)		3a		145.9
5		114.0	4	2.70 (m)	17.6	4	6.46 (s)	96.0
6	6.49 (s)	160.3	4a		116.8	5		164.8
7		103.6	5		159.3	6		117.0
8		140.3	6	6.88 (s)	97.0	7		154.5
8a		165.9	6a		125.1	7a		104.3
2-CH ₃	1.15 (s)	21.5	7		171.8	5-OCH ₃	3.88 (s)	56.1
7-CH ₂	5.45 (s)	64.2	9	5.13 (dd, 15.2, 30.3)	68.0	7-OH	7.71 (s)	
1'	2.63 (d, 16.78)	49.2	9a		128.0	1'	3.34 (d, 7.0)	21.6
	2.85 (d, 16.78)		10		148.5	2'	5.16 (t, 6.7)	121.3
2'		201.8	2-CH ₃	1.41 (s)	24.7	3'		135.8
3'	6.04 (d, 1.20)	124.4	5-OCH ₃	3.87 (s)	56.0	4'	1.94 (t, 7.6)	39.7
4'		158.9	1'	2.65 (d, 14.4)	52.3	5'	2.03 (m)	26.7
5'	2.16 (s)	21.2		2.76 (d, 14.4)		6'	5.04 (t, 6.7)	124.3
6'	1.89 (s)	27.9	2'		197.7	7'		131.2
8-CHO	10.22 (s)	187.6	3'	6.05 (s)	125.1	8'	1.62 (s)	25.6
5-OCH ₃	3.87 (s)	55.6	4'		156.2	3'-CH ₃	1.75 (s)	16.1
1''		173.2	5'	1.87 (s)	27.9	7'-CH ₃	1.55 (s)	17.6
2''	2.36 (t, 7.48)	34.4	4'-CH ₃	2.14 (s)	20.9			
3''	1.64 (m)	25.1						
4''-15''	1.20-1.30 (m)	22.7-32.0						
16''	0.86 (t, 7.48)	14.1						

2-2-4 化合物 4 の構造決定

化合物 4 は HRESIMS(-) によって、 m/z 253.09272 $[M-H]^-$ (calcd. for $C_{13}H_{15}O_4$, 235.09703) の分子イオンピークを確認したことより、分子式を $C_{13}H_{16}O_4$ と決定した (Fig. 25)。IR スペクトルより、 $2500\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ に幅広い吸収ピークが確認されたことより、水酸基の存在が示唆され、さらに 1721 cm^{-1} に吸収ピークが確認されたことより、ケトンの存在が示唆された (Fig. 26)。各種 NMR のデータから化合物 1 は methyl 4-hydroxy-3-(3-methylbutanoyl)benzoate であると同定した (Fig. 27~31)。この化合物は 2' 位と 3' 位間が二重結合であるメチルタボガネートの還元体として合成されており、天然からの単離は今回が初めてであった。²²⁾ 肺ガン細胞で細胞毒性試験が行われていたが、活性はなかった。

22)



methyl 4-hydroxy-3-(3-methylbutanoyl)benzoate

Table 2. Chemical shifts values of **4** in CD_3OD .

Position	1H δ (multiplicity, J in Hz)	^{13}C δ
1		122.2
2	8.53 (d, 2.1)	133.8
3	-	120.6
4	-	167.1
5	7.00 (d, 8.9)	119.5
6	8.09 (dd, 8.9, 2.1)	137.8
1'	-	207.9
2'	2.97 (d, 6.7)	48.1
3'	2.27 (m)	26.4
4'	1.02 (d, 6.4) ^a	22.9
3'-CH ₃	1.02 (d, 6.4) ^a	22.9
1-CO	-	167.4
-OCH ₃	3.90 (3H, s)	52.7

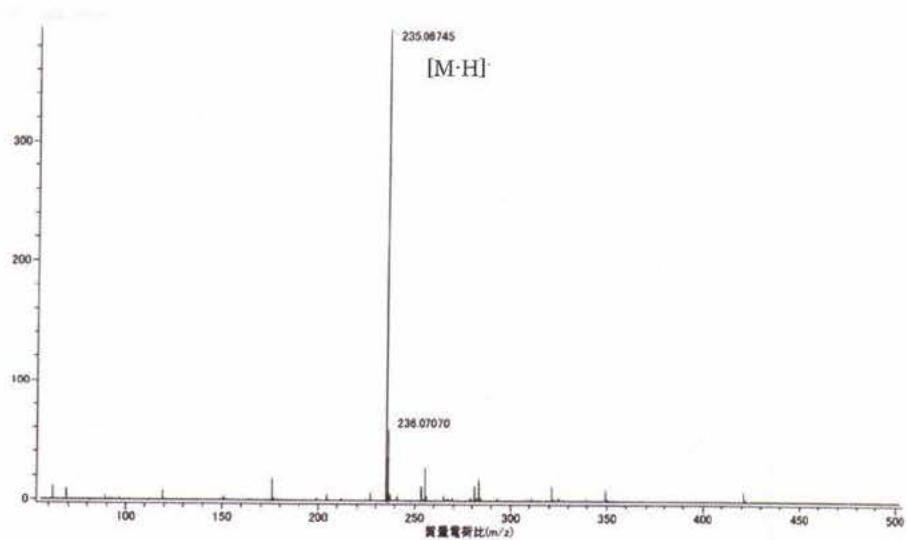


Fig. 25 HRESIMS(-) spectrum of 4.

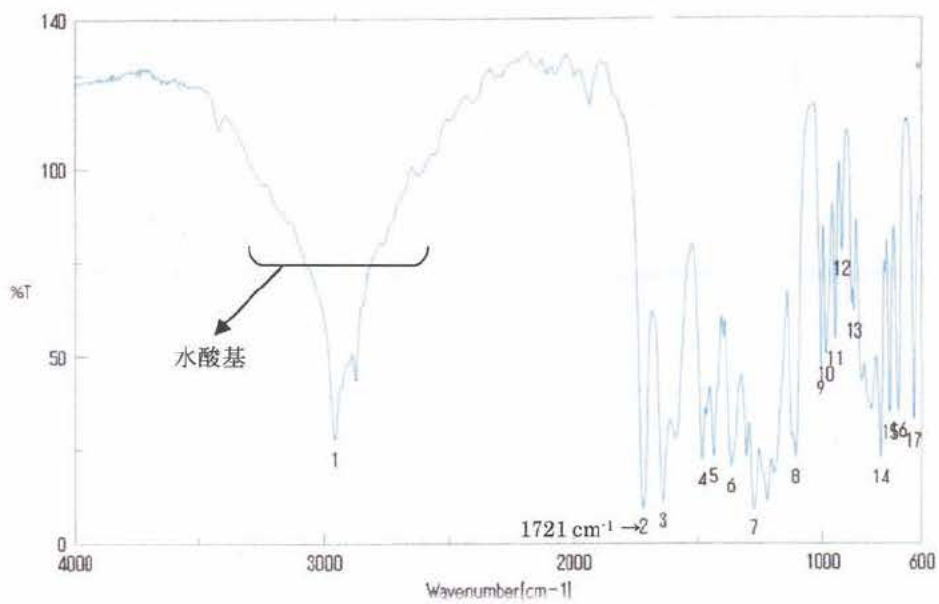


Fig. 26 IR spectrum of 4.

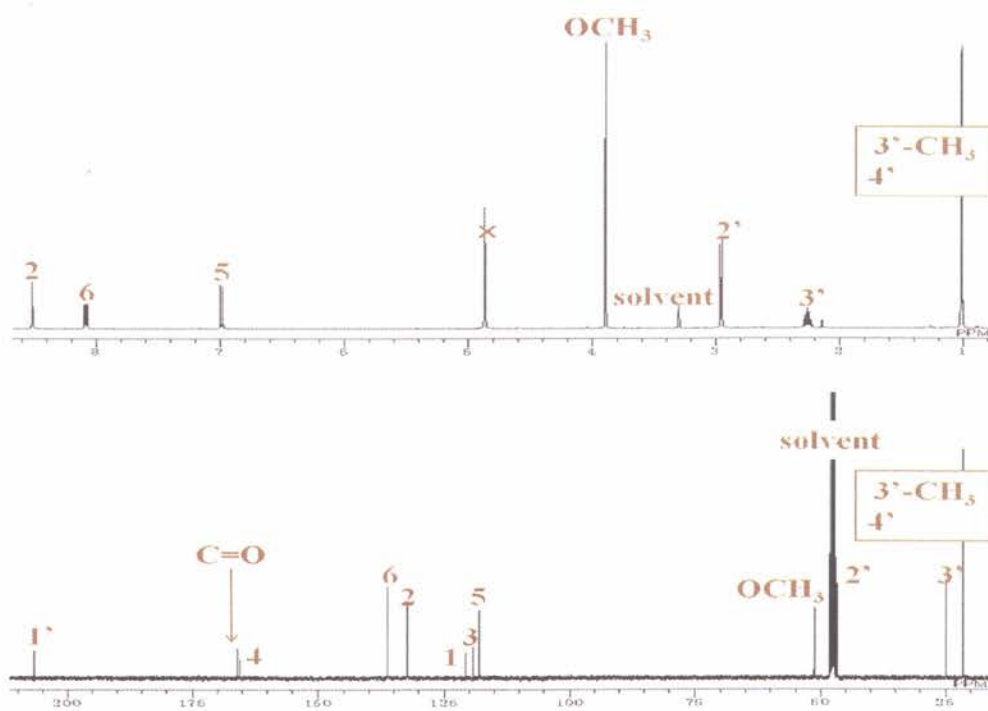


Fig. 27 ¹H and ¹³C-NMR spectra of 4 (in CD₃OD).

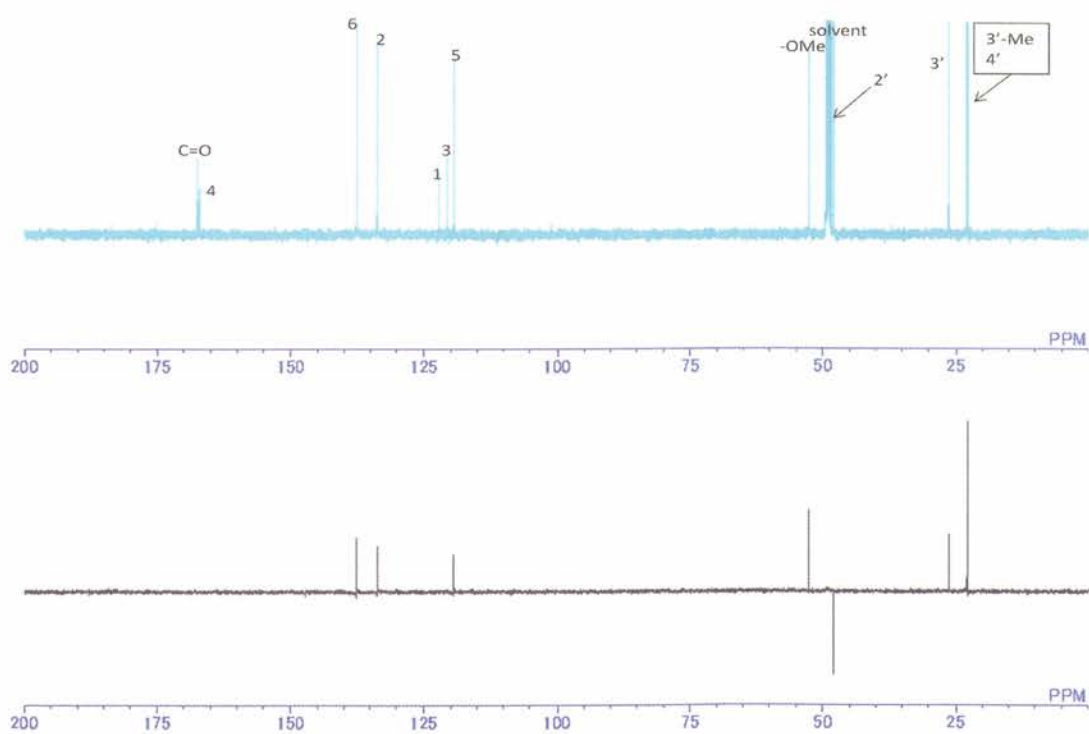


Fig. 28 DEPT spectrum of 4 (in CD₃OD).

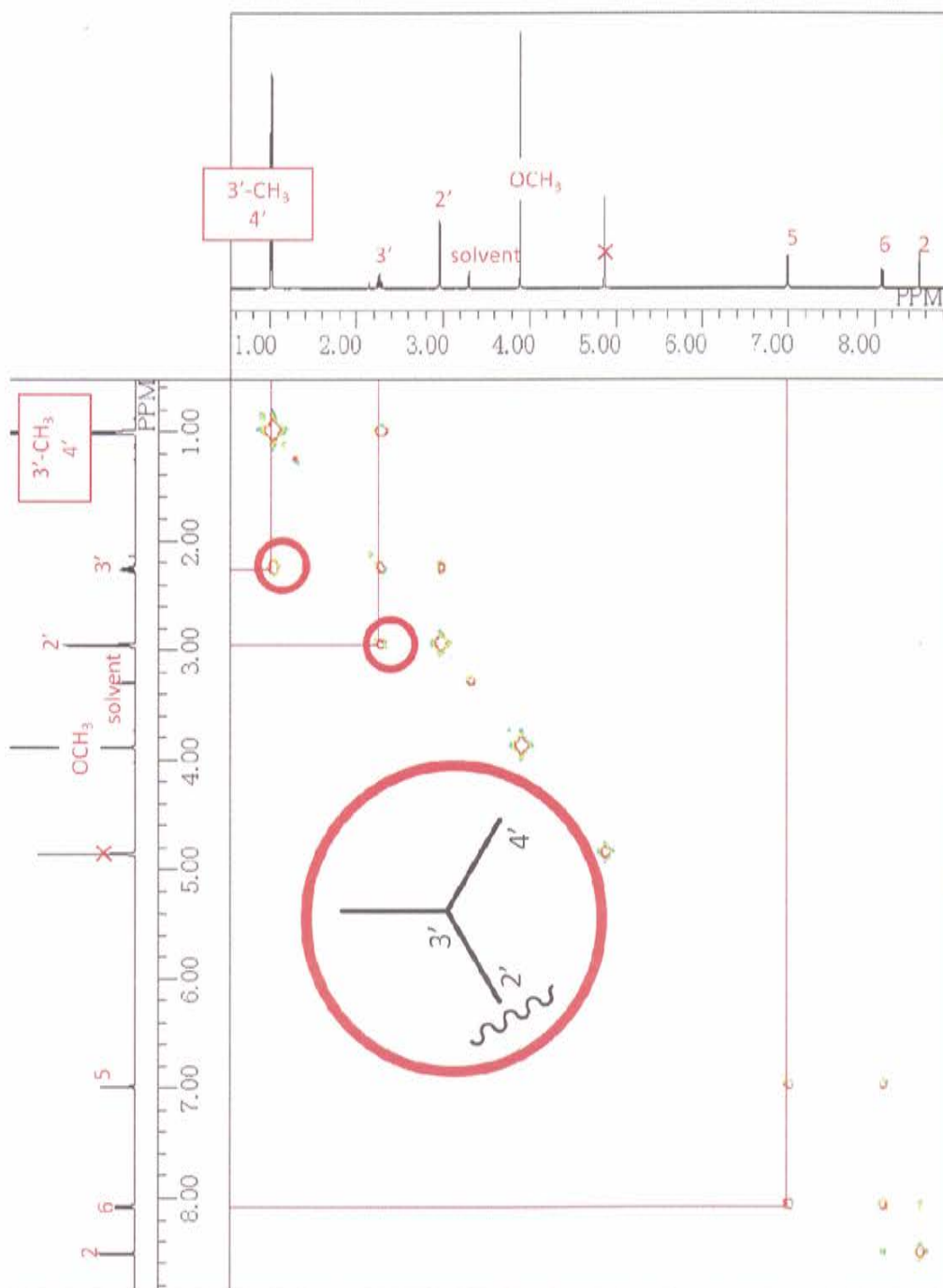


Fig.29 H-H COSY spectrum of 4 (in CD₃OD).

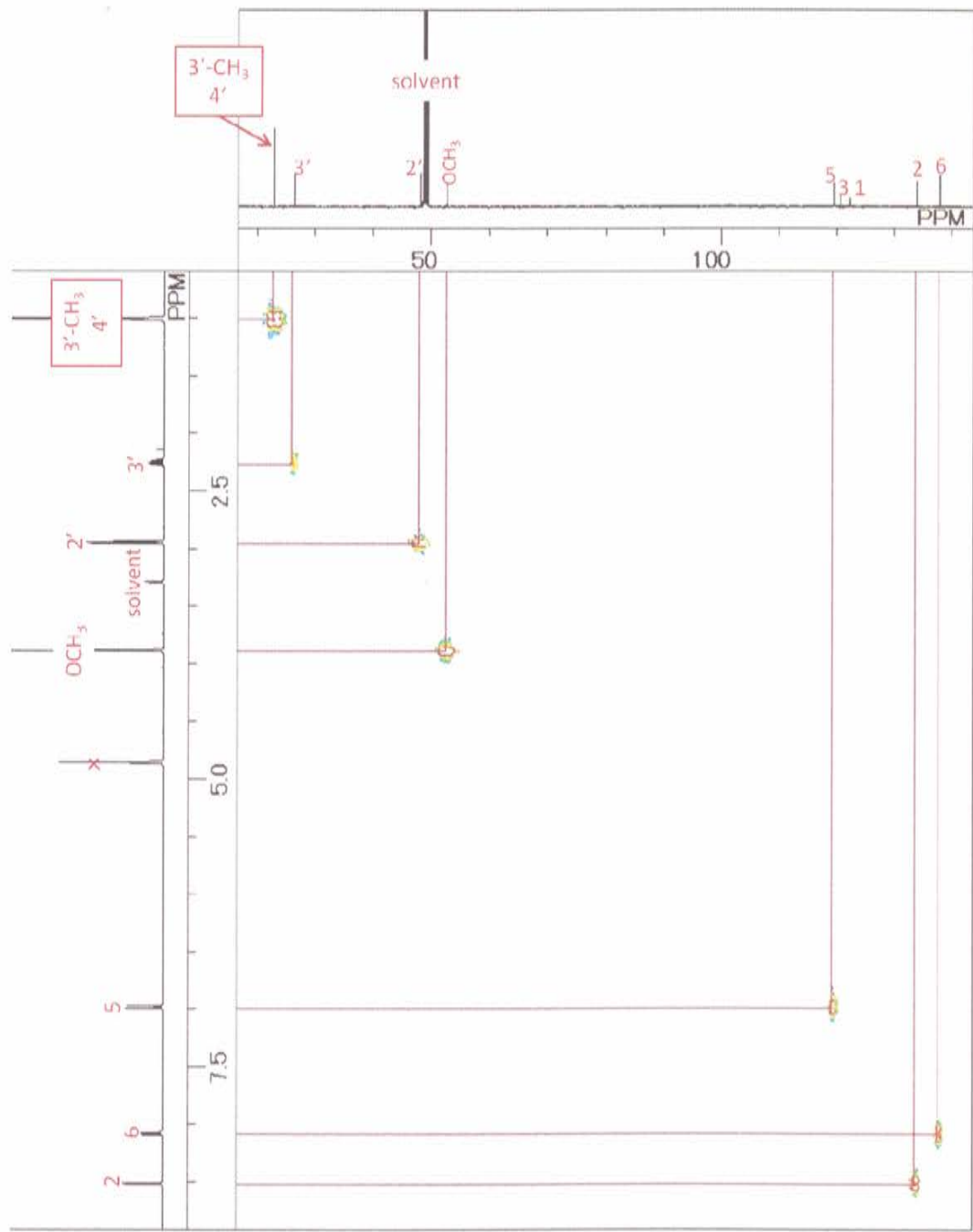


Fig. 30 HMQC spectrum of 4 (in CD₃OD).

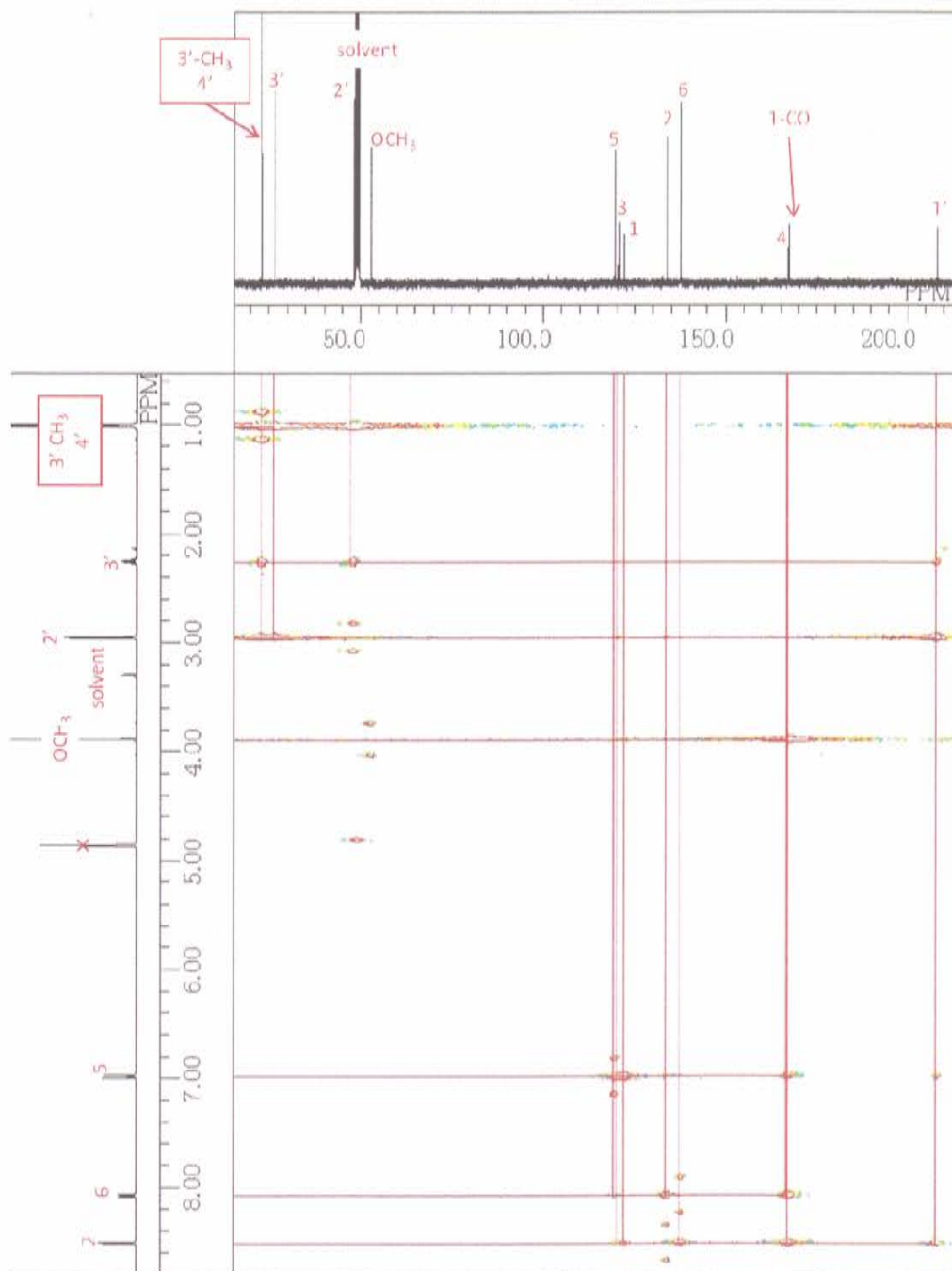
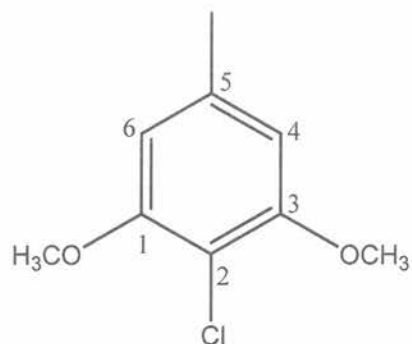


Fig. 31 HMBC spectrum of 4 (in CD₃OD).

2-2-5 化合物 5 の構造決定

化合物 5 は ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトルから、既に、本研究室においてヤマブシタケ菌糸体培養ろ液から単離されている 2-chloro-1,3-dimethoxy-5-methylbenzene と同定した (Fig. 32)。²³⁾ この化合物は *Bacillus subtilis* に対する増殖抑制活性があることが報告されている。²³⁾



2-chloro-1,3-dimethoxy-5-methylbenzene

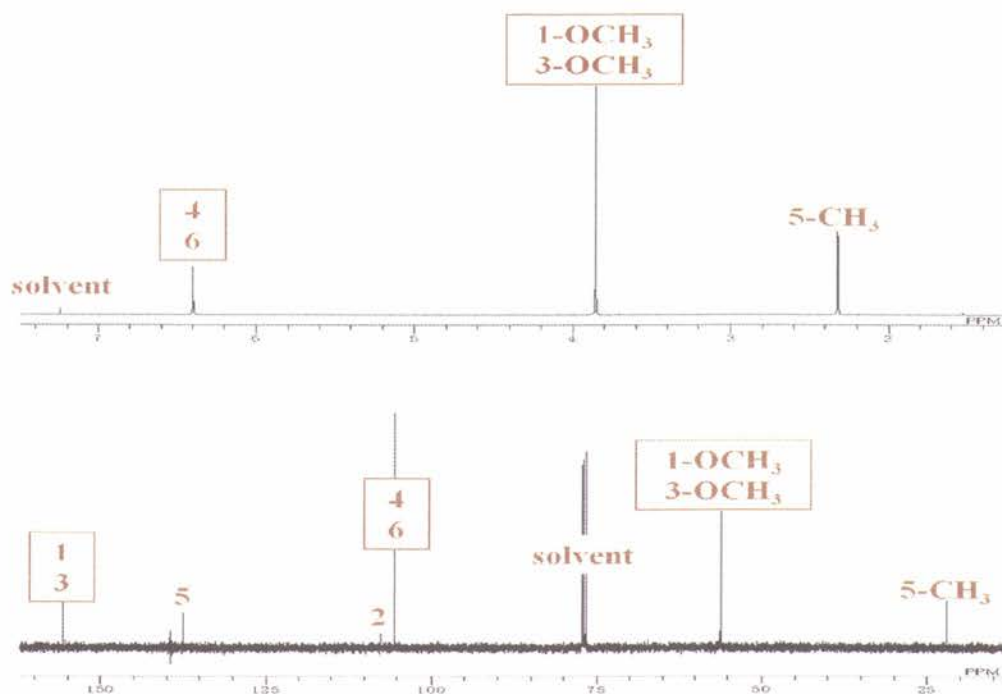


Fig. 32 ^1H and ^{13}C -NMR spectra of 5 (in CDCl_3).

2-2-6 化合物 6 の構造決定

化合物 6 は ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトルから、既に、ヤマブシタケ菌糸体培養ろ液から単離されている methyl 4-chloro-3,5-dimethoxybenzoate と同定した (Fig. 33)。²⁴⁾ この化合物に関する生物活性の報告はなかった。

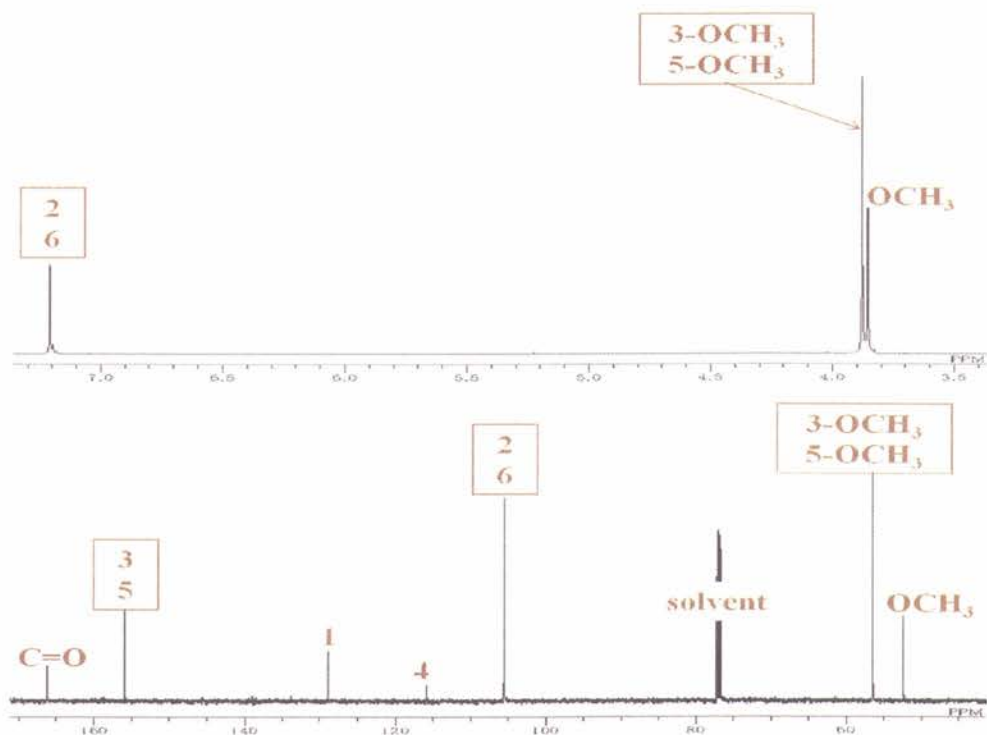
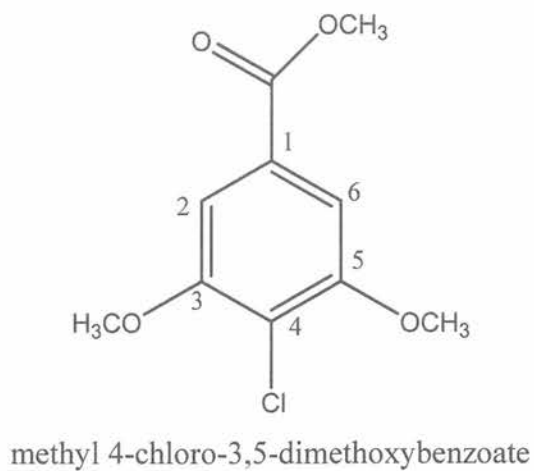


Fig. 33 ^1H and ^{13}C -NMR spectra of 6 (in CDCl_3).

2-2-7 化合物7の構造決定

化合物7は ^1H 及び ^{13}C -NMRスペクトルから、既に、本研究室においてヤマブシタケ菌糸体培養ろ液から単離されている4-chloro-3,5-dimethoxybenzaldehydeと同一した(Fig. 34)。²⁾この化合物は合成もされており、*B. subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Verticillium dahlia*, *Aspergillus niger*に対する増殖抑制活性が報告されている。^{23, 25)}

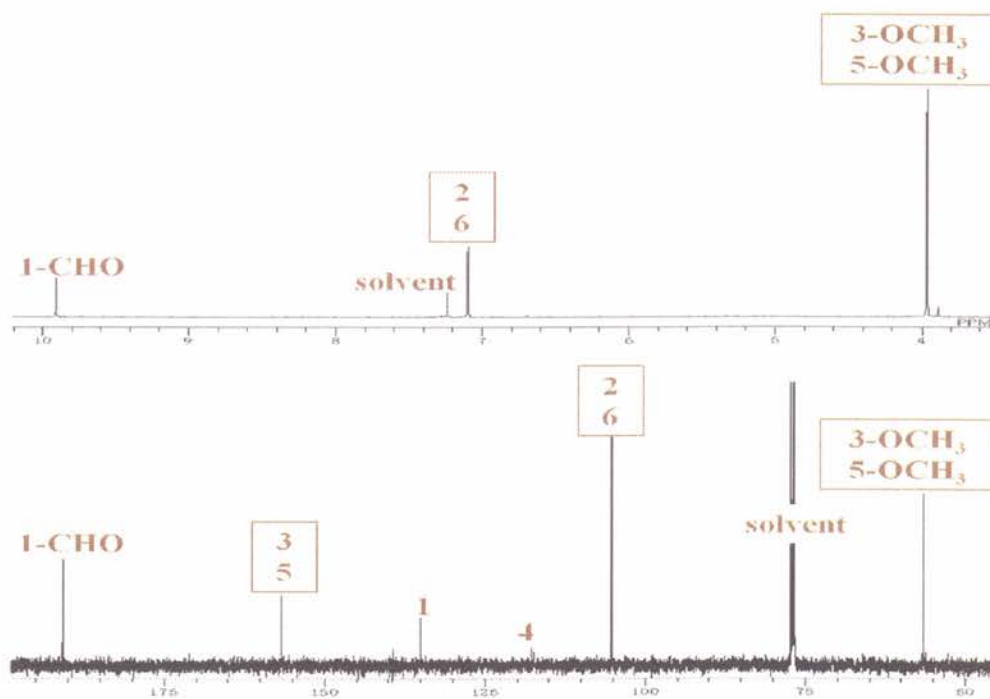
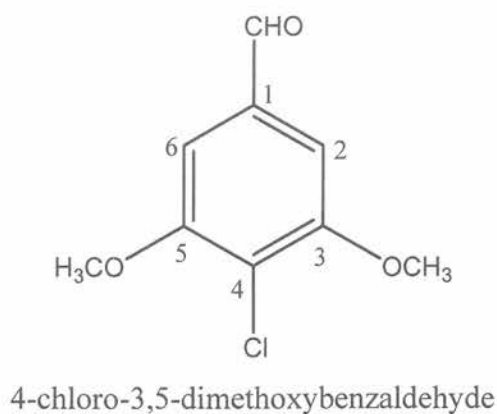


Fig. 34 ^1H and ^{13}C -NMR spectra of 7 (in CDCl_3).

2-2-8 化合物 8 の構造決定

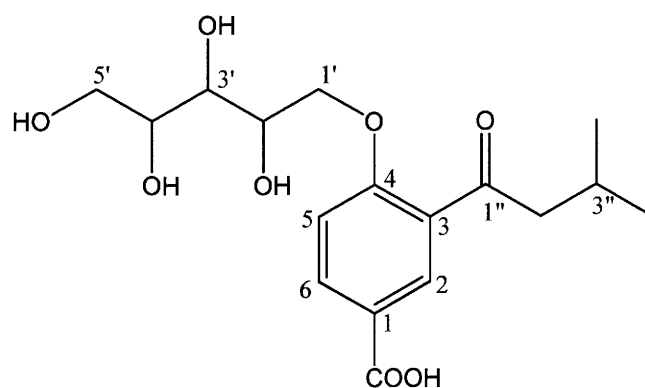
化合物 8 は、HRESIMS(+)において m/z 379.13422 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{17}H_{24}NaO_8$, 379.13689) の分子イオンピークを示したことより、分子式を $C_{17}H_{24}O_8$ と決定した (Fig. 35)。IR スペクトルにおいて、 1644 cm^{-1} にカルボキシ基、 3396 cm^{-1} に水酸基を示唆する吸収ピークが観測された (Fig. 36)。 $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルにより、 H_2 (δ 8.54, 1H, d, $J = 1.8$)、 H_5 (δ 6.97, 1H, d, $J = 8.8$ Hz)、 H_6 (δ 8.14, 1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz) にシグナルが観測されたことにより、1,2,4-置換ベンゼンの存在が示唆された (Fig. 37)。

$^{13}\text{C-NMR}$ 及び DEPT スペクトルにより、メチルが 2 つ、メチレンが 3 つ、メチンが 7 つ、4 級炭素が 5 つであることが分かった (Fig. 38)。

COSY スペクトルより、 $H_2'' \rightarrow H_3''$ 、 $H_3'' \rightarrow H_3''\text{-Me}$ に相関が確認されたので、イソブチル基の存在が示唆された (Fig. 39)。

HMBC スペクトルにより、 $H_2'' \rightarrow C_1, C_2, C_1''$; $H_3'' \rightarrow C_1''$ の相関、 $H_1' \rightarrow C_4, C_2', C_3'$; $H_2' \rightarrow C_3'$; $H_3' \rightarrow C_1', C_2', C_5'$; $H_4' \rightarrow C_5'$; $H_5' \rightarrow C_3', C_4'$ の相関、 $H_2, H_5, H_6 \rightarrow C_1\text{-COOH}$ の相関が確認されたので、3 置換ベンゼンの置換基すべてを決定した (Fig. 41)。

さらに各種 NMR の結果から、化合物 8 の平面構造を 3-(3-methylbutanoyl)-4-((2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)oxy)benzoic acid と決定した。結晶構造解析に供して、絶対立体構造を決定するために、化合物を *p*-bromobenzoate 化し、結晶化を試みている。



3-(3-methylbutanoyl)-4-((2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)oxy)benzoic acid

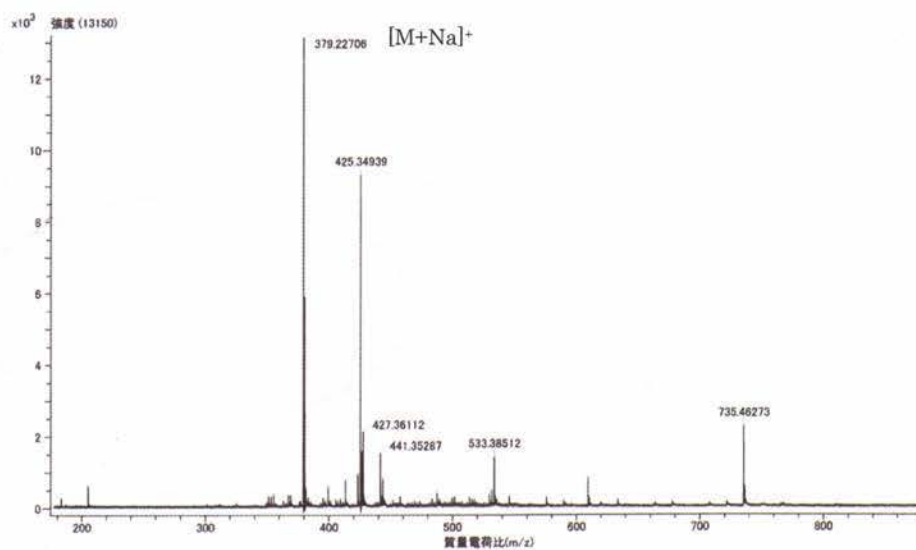


Fig. 35 HRESIMS(+) spectrum of 8.

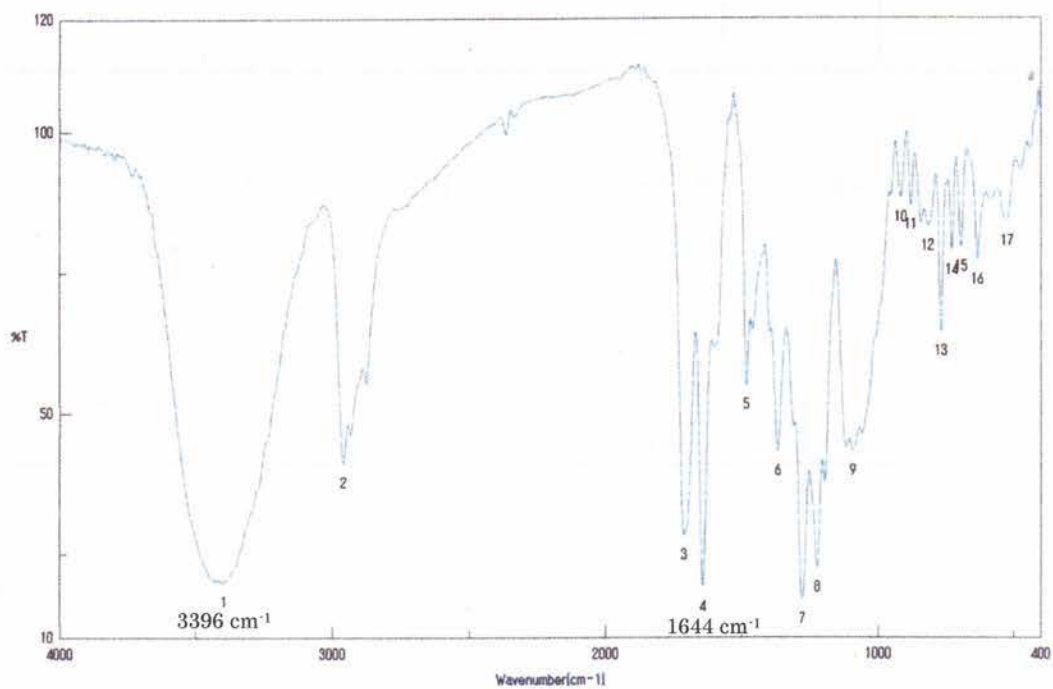


Fig. 36 IR spectrum of 8.

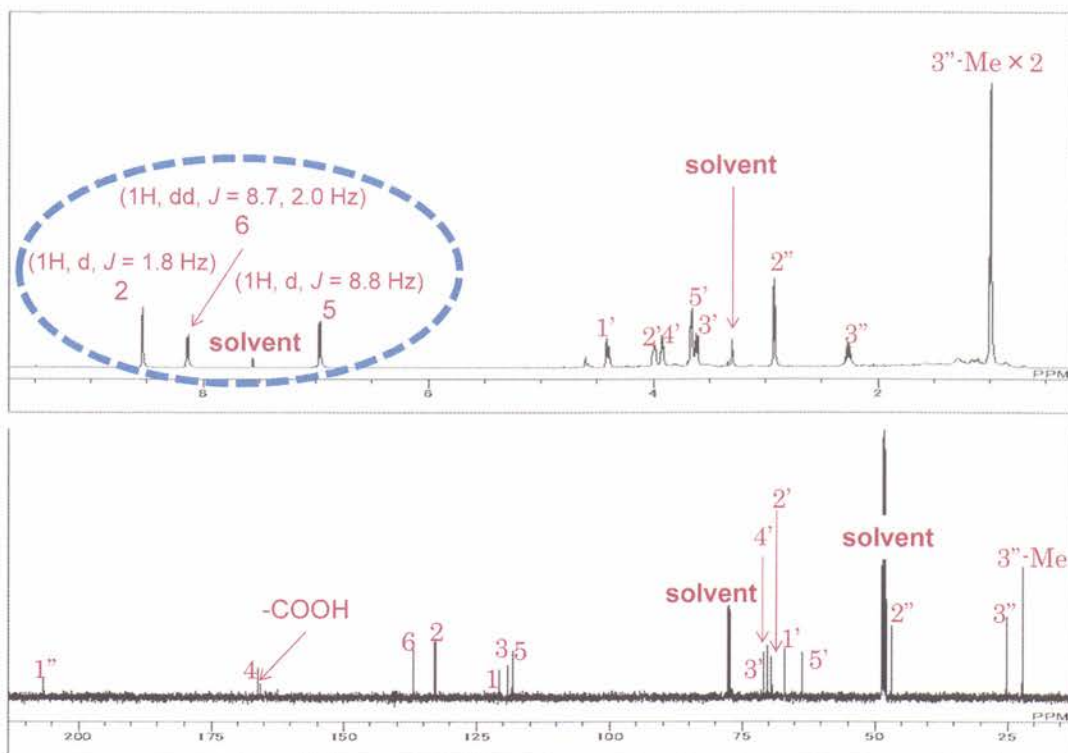


Fig. 37 ^1H and ^{13}C -NMR spectra of **8** (in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$).

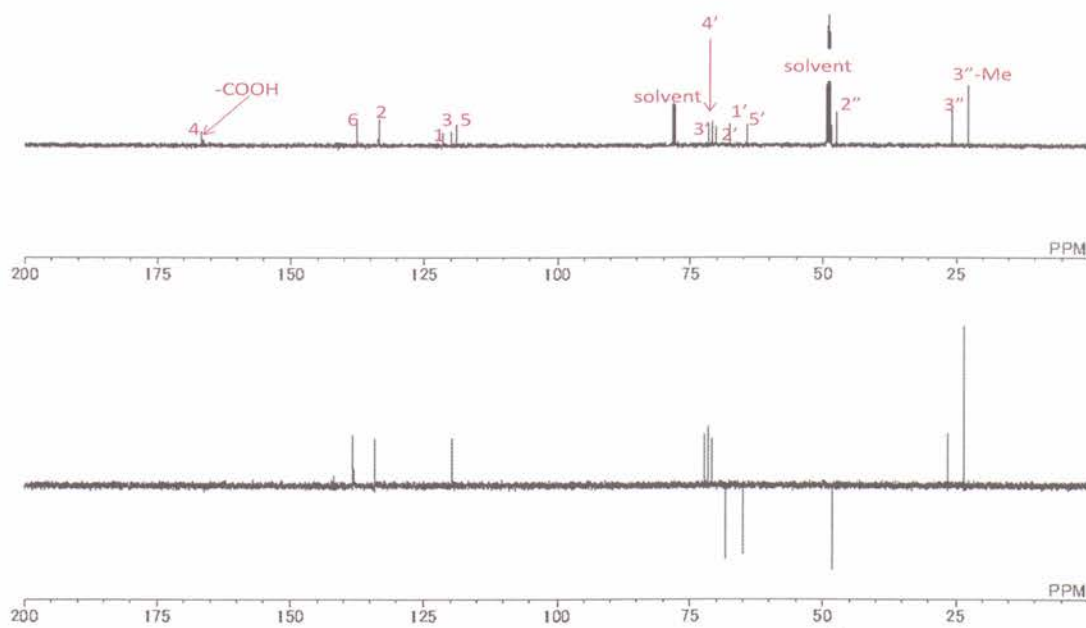


Fig. 38 DEPT spectrum of **8** (in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$).

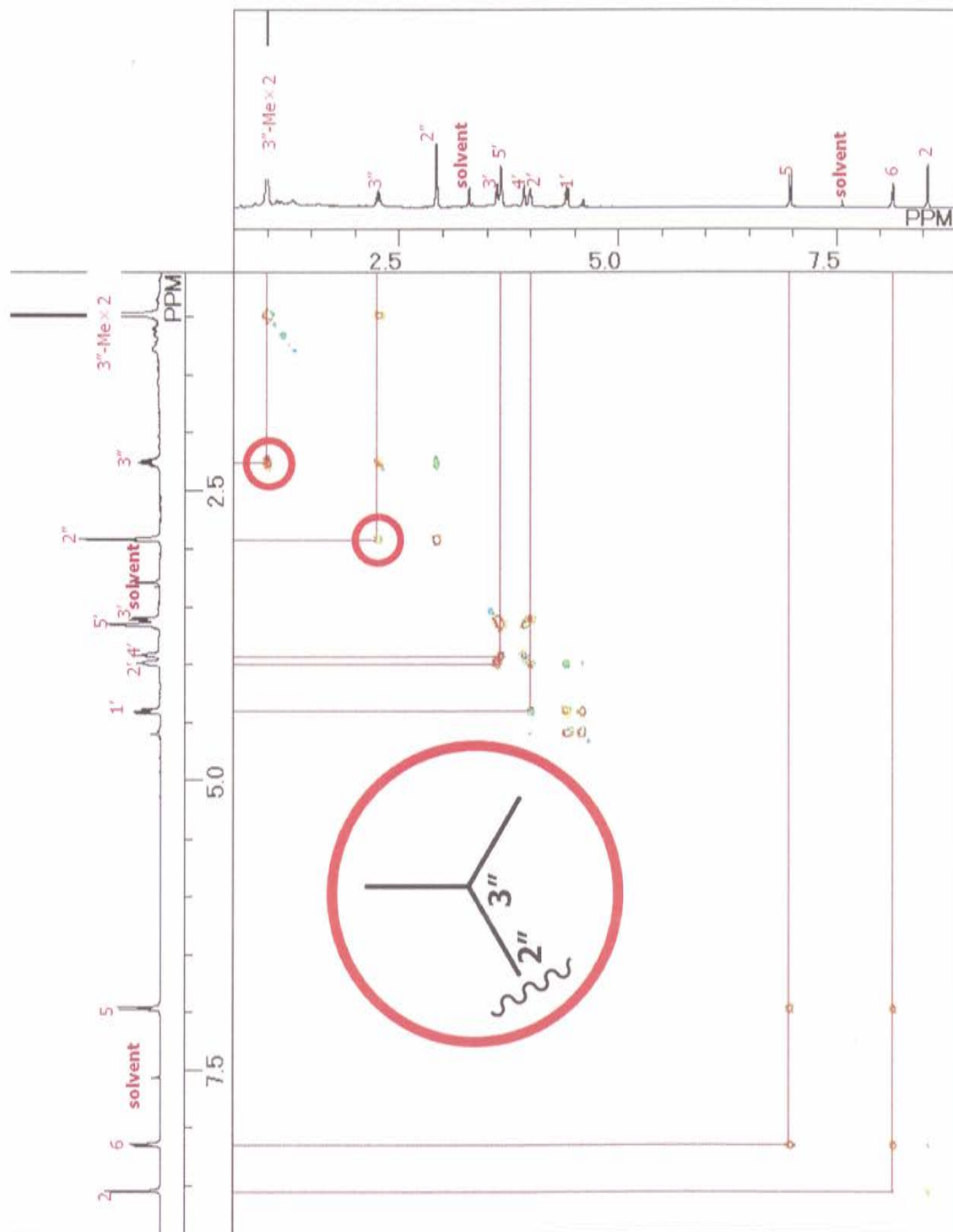


Fig. 39 H-H COSY spectrum of **8** (in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$).

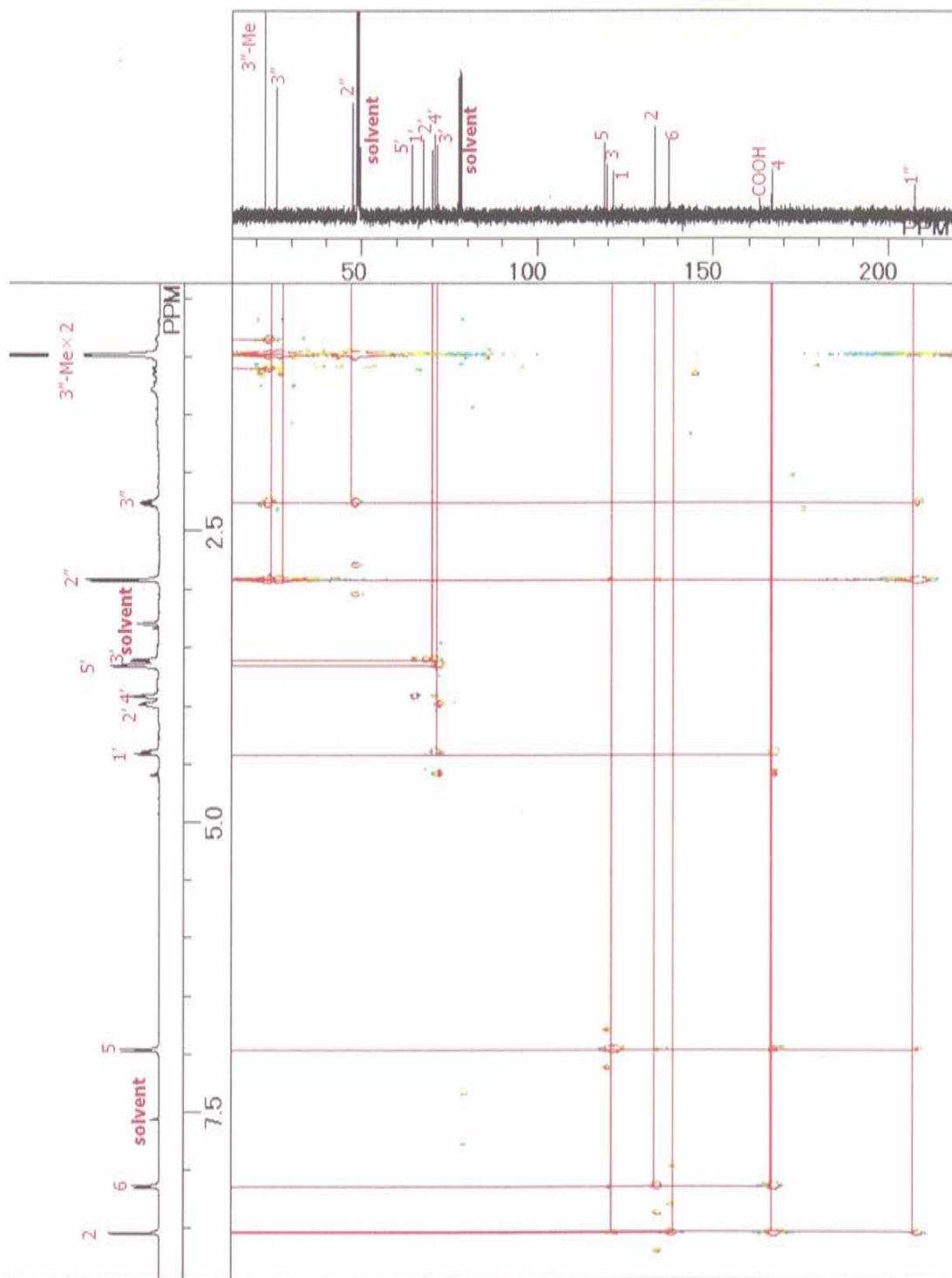


Fig. 41 HMBC spectrum of 8 (in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$).

2-2-9 化合物 9 の構造決定

化合物 9 は、HRESIMS(+)において m/z 379.13456 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{17}H_{24}NaO_8$, 379.13689) の分子イオンピークを示したことより、分子式を $C_{17}H_{24}O_8$ と決定した (Fig. 42)。IR スペクトルにおいて、 1639 cm^{-1} にカルボキシ基、 3439 cm^{-1} に水酸基を示唆する吸収ピークが観測された (Fig. 43)。 $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルにより、 H_2 (δ 8.54, 1H, d, $J = 1.8$)、 H_5 (δ 6.97, 1H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$)、 H_6 (δ 8.13, 1H, dd, $J = 8.9, 2.1\text{ Hz}$) にシグナルが観測されたことにより、1,2,4-置換ベンゼンの存在が示唆された (Fig. 44)。

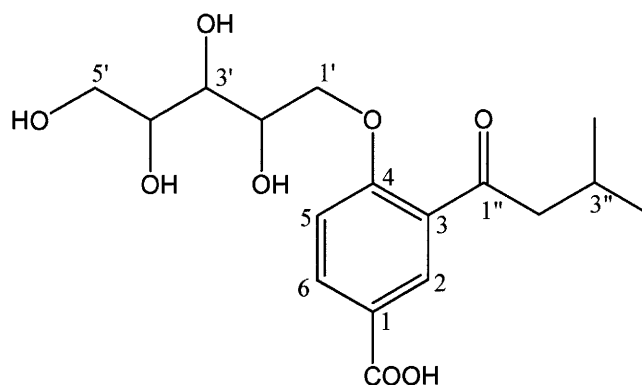
$^{13}\text{C-NMR}$ 及び DEPT スペクトルにより、メチルが 2 つ、メチレンが 3 つ、メチンが 7 つ、4 級炭素が 5 つであることが分かった (Fig. 45)。

COSY スペクトルにより、 $\text{H}_2'' \rightarrow \text{H}_3''$ 、 $\text{H}_3'' \rightarrow \text{H}_3''\text{-Me}$ に相関が確認されたので、イソブチル基の存在が示唆された (Fig. 46)。

HMBC スペクトルにより、 $\text{H}_2'' \rightarrow \text{C}_1'$ 、 C_3'' 、 $\text{C}_3''\text{-Me}$ の相関、 $\text{H}_1' \rightarrow \text{C}_4$ 、 C_2' ； $\text{H}_2' \rightarrow \text{C}_1'$ 、 C_4' ； $\text{H}_3' \rightarrow \text{C}_4'$ 、 C_5' ； $\text{H}_4' \rightarrow \text{C}_3'$ ； $\text{H}_5' \rightarrow \text{C}_3'$ 、 C_4' の相関、 H_2 、 $\text{H}_6 \rightarrow \text{C}_1\text{-COOH}$ の相関が確認されたことより、3-置換ベンゼンの全ての置換基を決定した (Fig. 48)。

さらに各種 NMR の結果から、化合物 9 は化合物 8 のジアステレオマーであることが示唆され、その平面構造を 3-(3-methylbutanoyl)-4-((2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)oxy)benzoic acid と決定した。

結晶構造解析に供して、絶対立体構造を決定するために、化合物を *p*-bromobenzoate 化し、結晶化を試みている。



3-(3-methylbutanoyl)-4-((2,3,4,5-tetrahydroxypentyl)oxy)benzoic acid

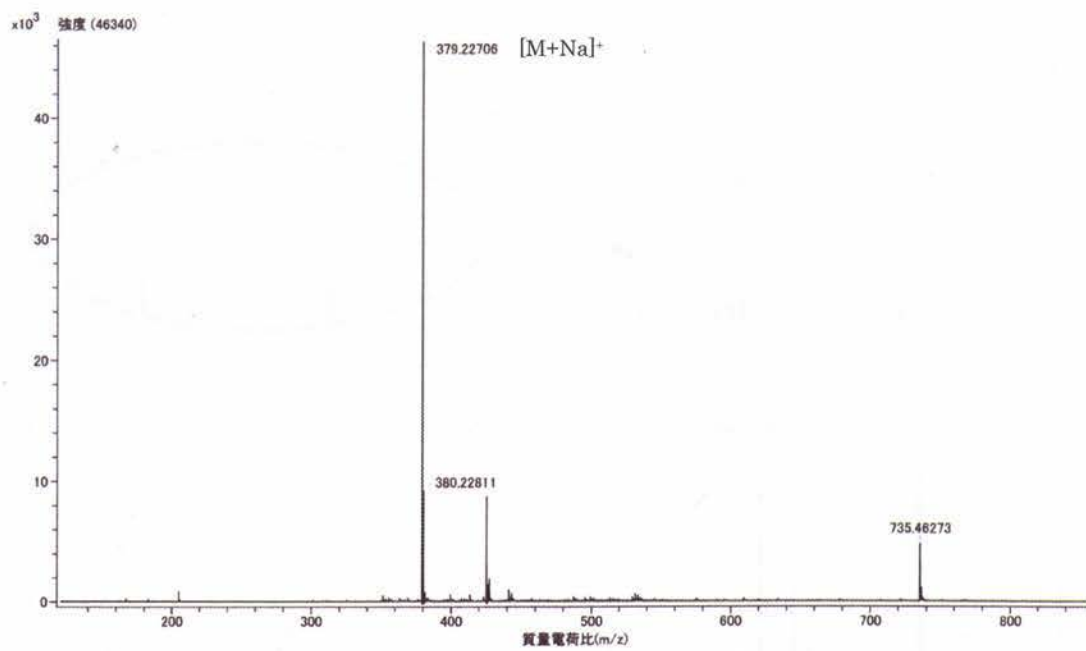


Fig. 42 HRESIMS(+) spectrum of **9**.

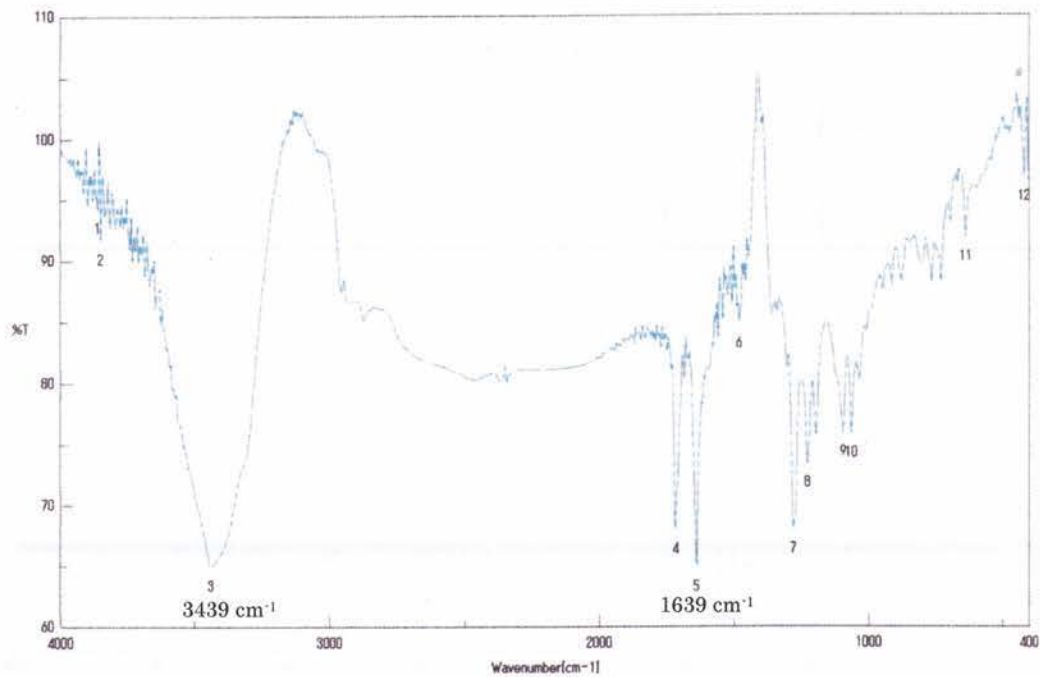


Fig. 43 IR spectrum of **9**.

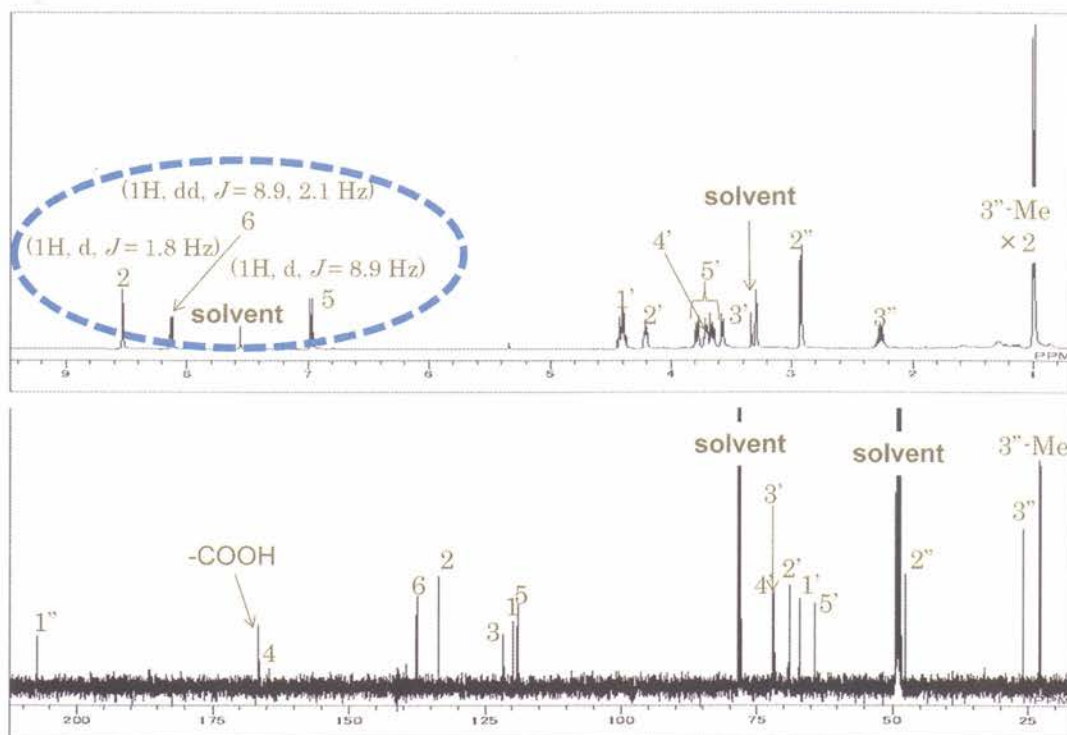


Fig. 44 ^1H and ^{13}C -NMR spectra of **9** (in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$).

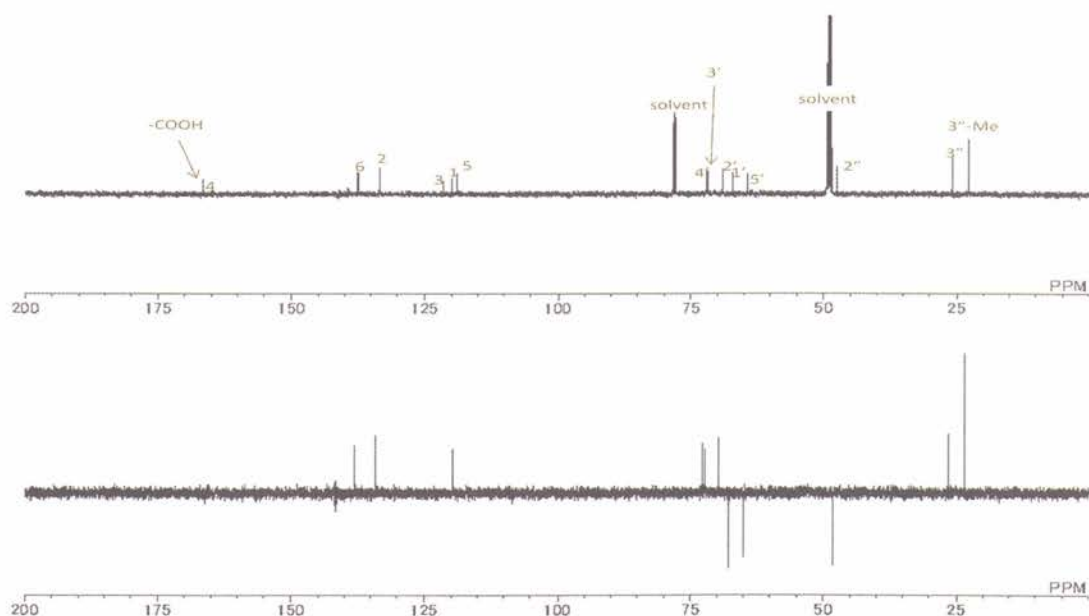


Fig. 45 DEPT spectrum of **9** (in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$).

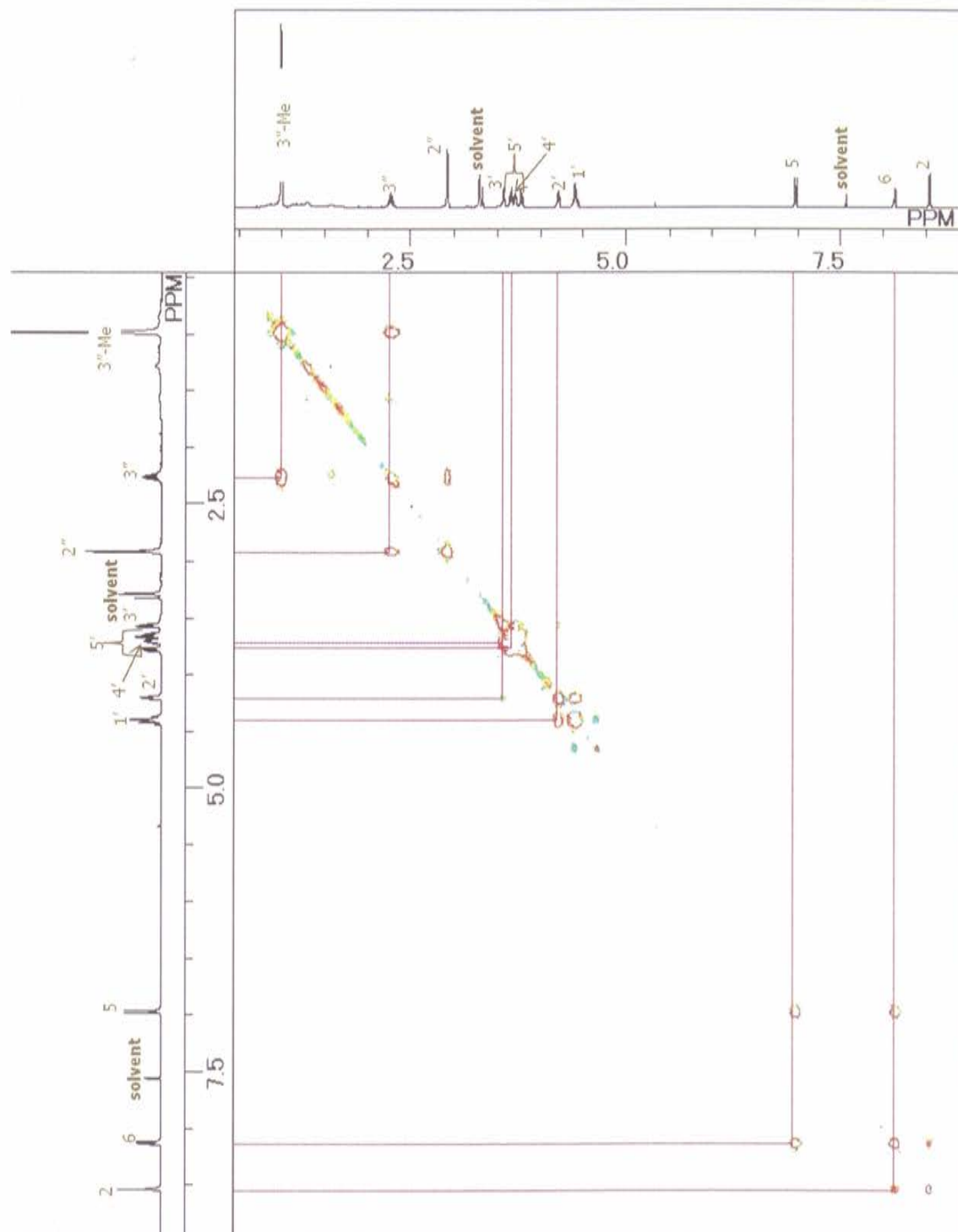


Fig. 46 H-H COSY spectrum of **9** (in CDCl₃/ CD₃OD=1:1).

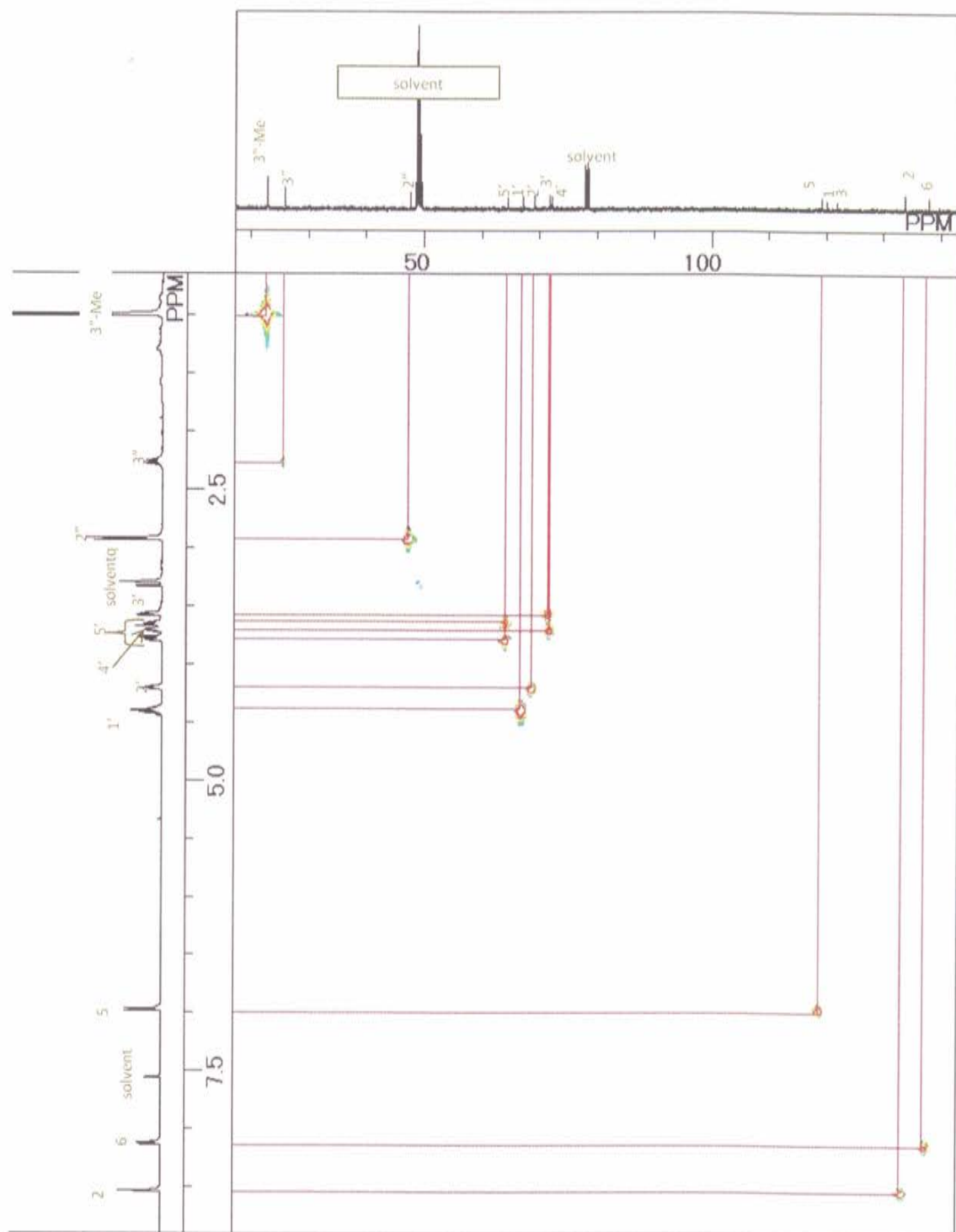


Fig. 47 HMQC spectrum of 9 (in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$).

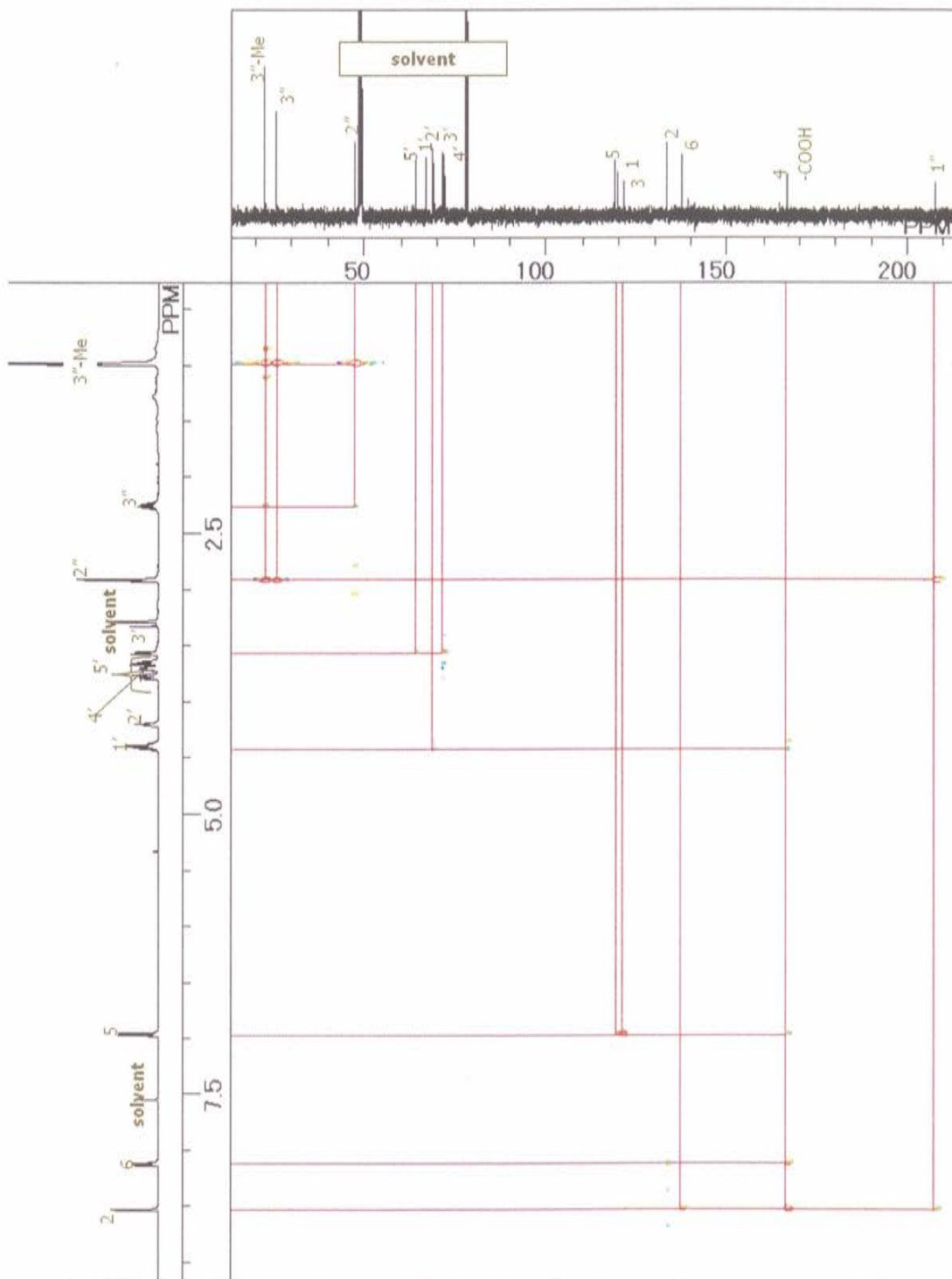


Fig. 48 HMBC spectrum of **9** (in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}=1:1$).

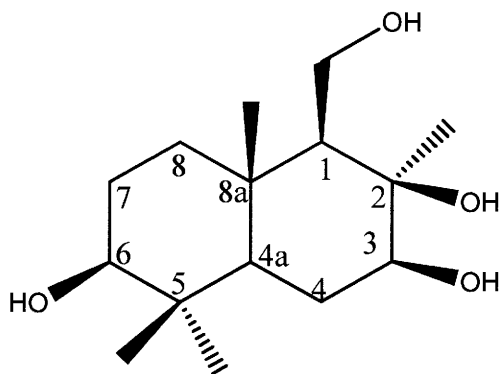
2-2-10 化合物 10 の構造決定

化合物 10 は、HRESIMS(+)において m/z 295.18584 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{15}H_{28}NaO_4$, 295.18853) の分子イオンピークを示したことから、分子式を $C_{15}H_{28}O_4$ と決定した (Fig. 49)。IR スペクトルにおいて、3358, 3475 cm^{-1} に水酸基を示唆する吸収ピークが観測された (Fig. 50)。

^{13}C -NMR 及び DEPT スペクトルにより、メチルが 4 つ、メチレンが 4 つ、メチンが 4 つ、4 級炭素が 3 つであることが確認された (Fig. 52)。

HMBC スペクトルにより、 $H1 \rightarrow C3, C8, C8a$; $H3 \rightarrow C4, C4a$; $H4 \rightarrow C8a$; $H7 \rightarrow C8, C4a, C8a$; $H8 \rightarrow C7, C8a$; $H4a \rightarrow C8a$ の相関が確認されたことにより、デヒドロナフタレンの骨格が決定した (Fig. 55)。さらに、 $H1-CH_2OH \rightarrow C2, C8a$; $H2-Me \rightarrow C2$; $H5-Me (\delta_H 0.74) \rightarrow C7, C4a, C5-Me (\delta_C 28.7)$; $H5-Me (\delta_H 0.92) \rightarrow C7, C4a, C5-Me (\delta_C 16.3)$; $H8a-Me \rightarrow C8a, C4a$ に相関が確認されたので、デヒドロナフタレン骨格に結合する置換基を決定した (Fig. 55)。

立体構造の決定のため、NOE を測定した。NOE 差スペクトルより、 $H1 \rightarrow H2-Me$; $H3 \rightarrow H2-Me$; $H4 \rightarrow H8a-Me$; $H6 \rightarrow H5-Me (\delta_H 0.92), H8, H4a$; $H4a \rightarrow H1, H3, H6, H5-Me (\delta_H 0.92)$; $1-CH_2OH \rightarrow H8$; $H2-Me \rightarrow H3$; $H5-Me (\delta_H 0.74) \rightarrow H4, H7, H8a-Me$; $H5-Me (\delta_H 0.92) \rightarrow H6$ に相関が確認された (Fig. 56)。よって、化合物 10 の構造を $(1S^*,2R^*,3S^*,6S^*,8aS^*)$ -1-(hydroxymethyl)-2,5,5,8a-tetramethyldecahydronaphthalene-2,3,6-triol と決定した。また、結晶構造解析に供し、絶対立体配置を決定するために、*p*-bromobenzoate 化し、結晶化を試みている。



$(1S^*,2R^*,3S^*,6S^*,8aS^*)$ -1-(hydroxymethyl)-2,5,5,8a-tetramethyldecahydronaphthalene-2,3,6-triol

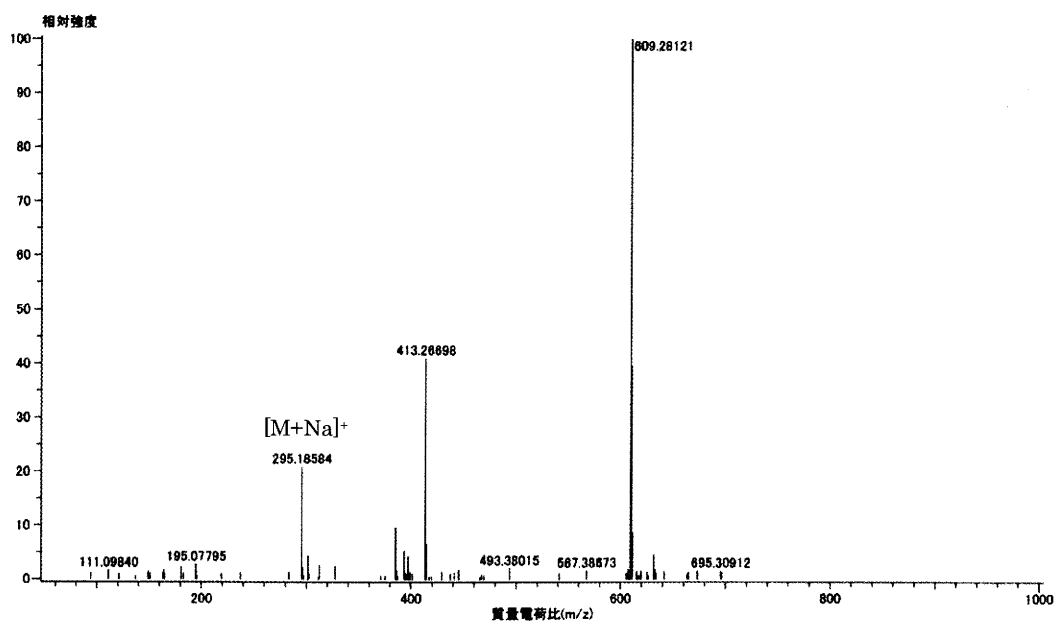


Fig. 49 HRESIMS(+) spectrum of 10.

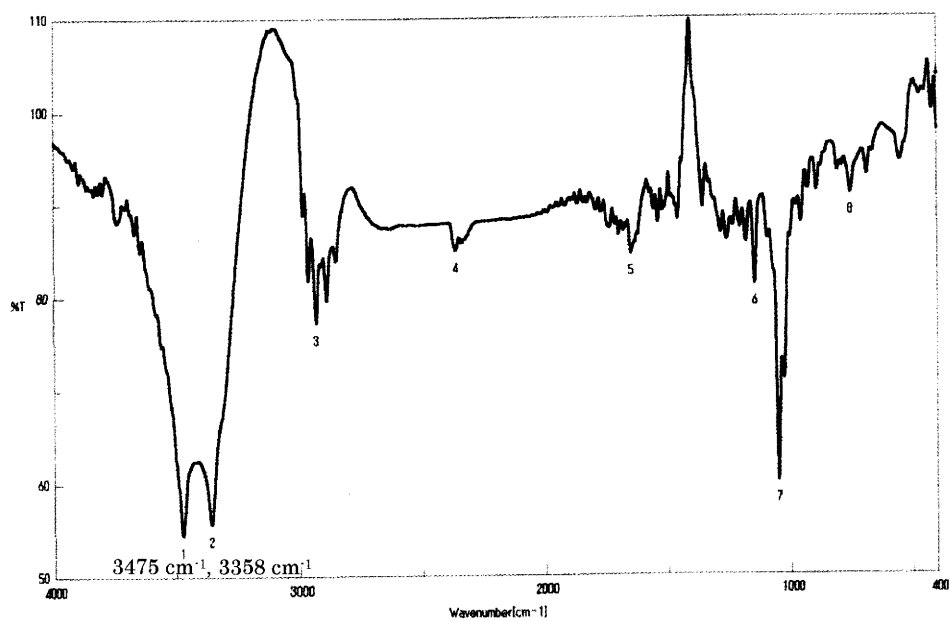


Fig. 50 IR spectrum of 10.

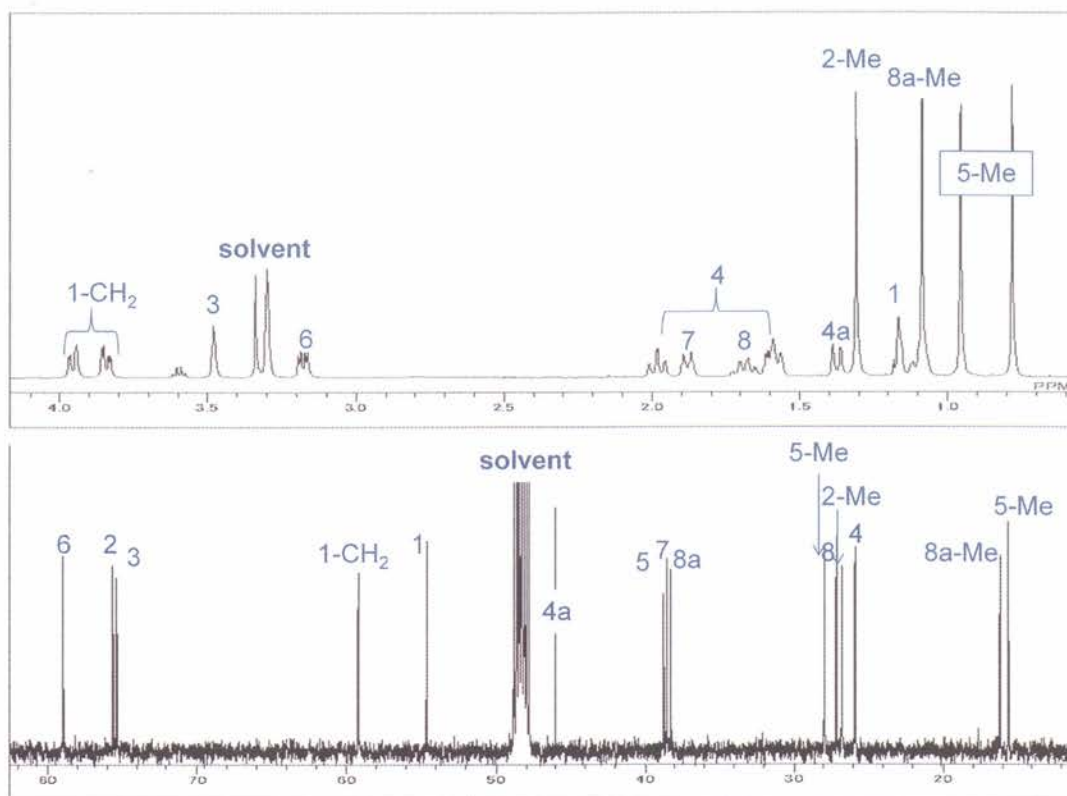


Fig. 51 ¹H and ¹³C-NMR spectra of 10 (in CD₃OD).

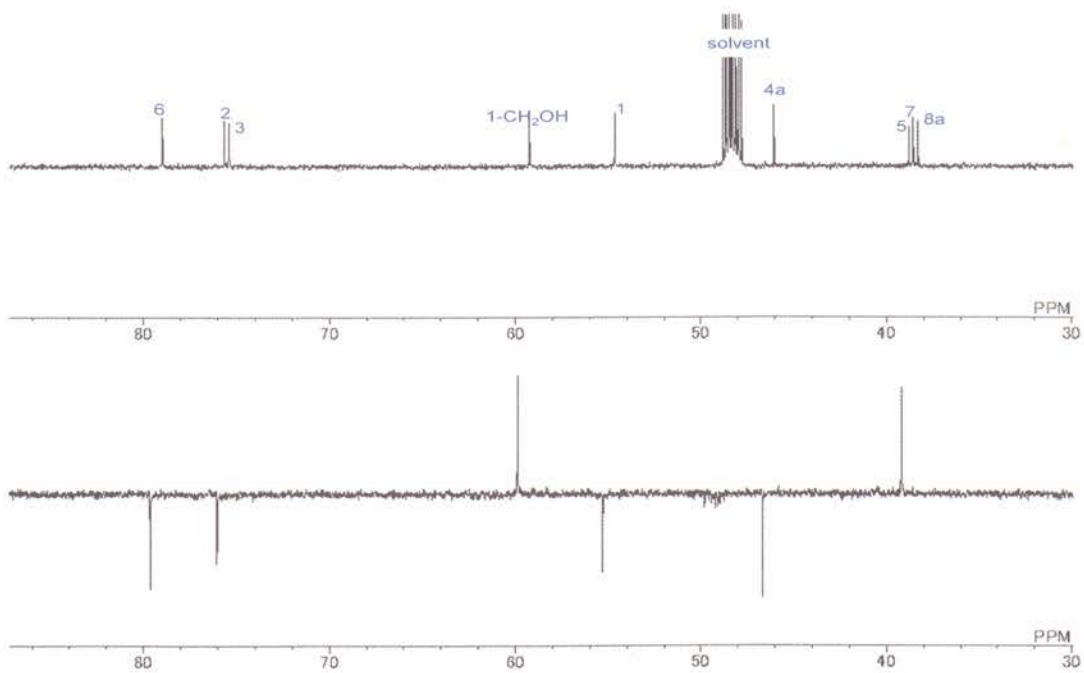


Fig. 52 DEPT spectrum of 10 (in CD₃OD).

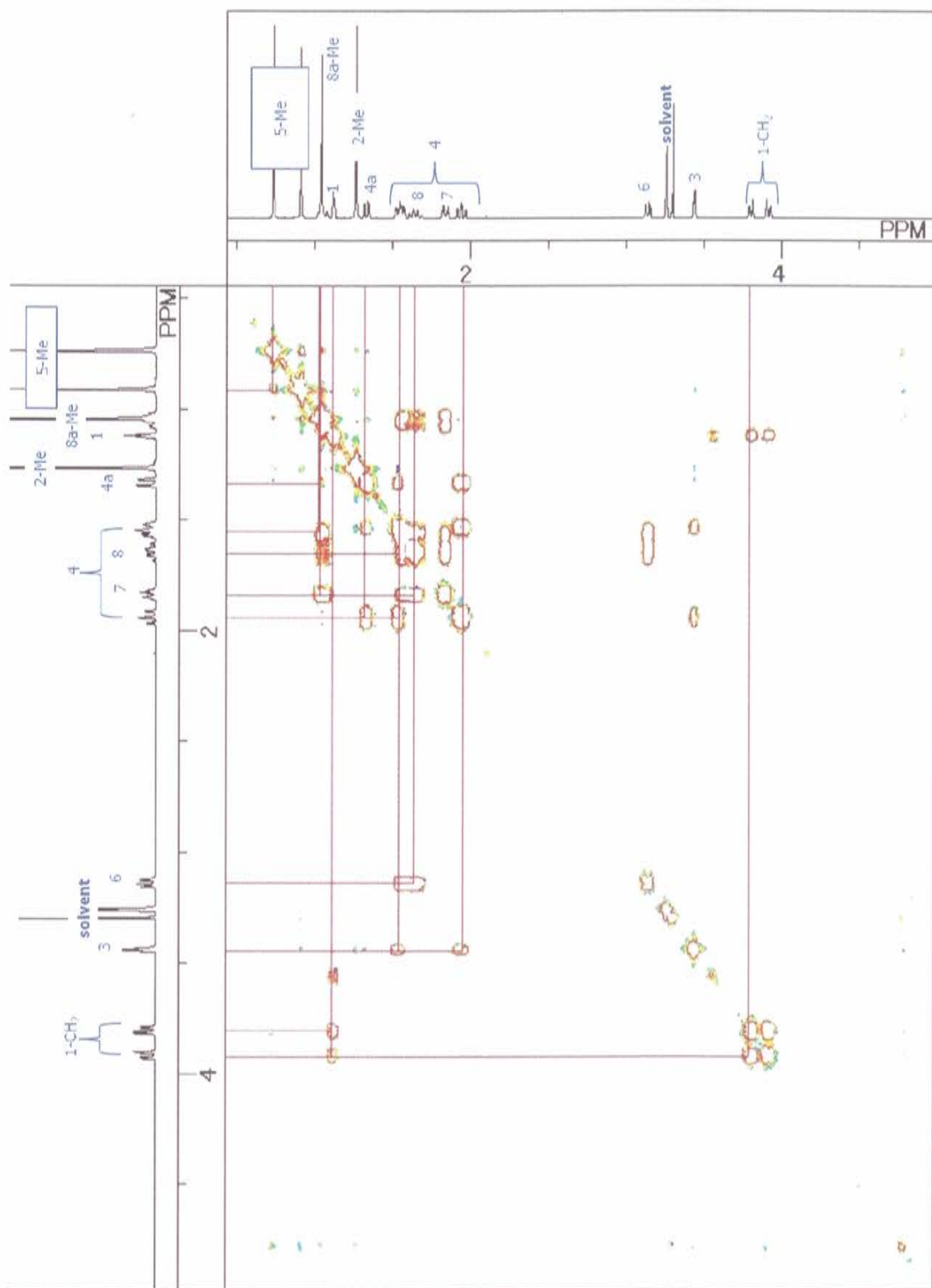


Fig. 53 H-H COSY spectrum of 10 (in CD₃OD).

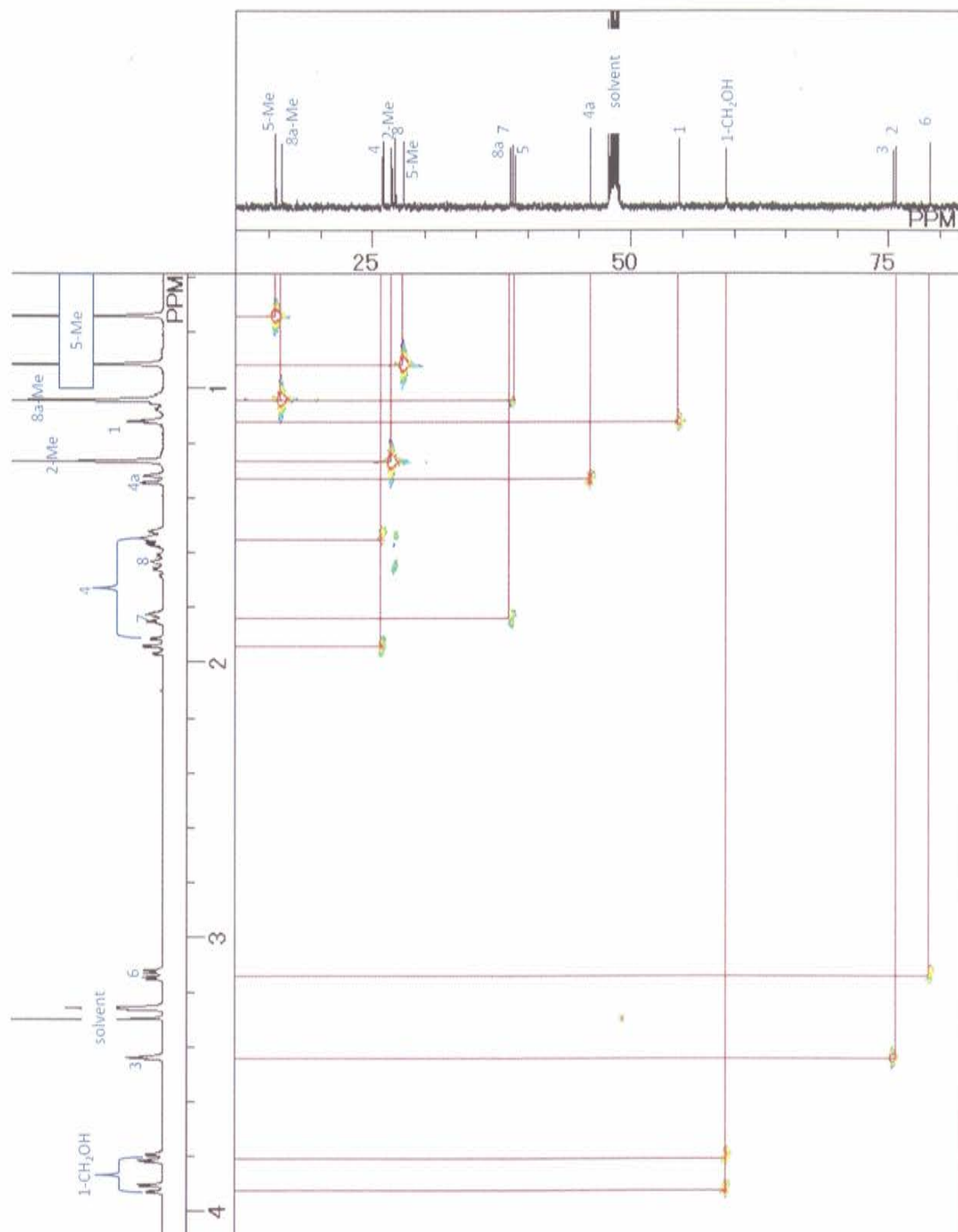


Fig. 54 HMQC spectrum of 10 (in CD₃OD).

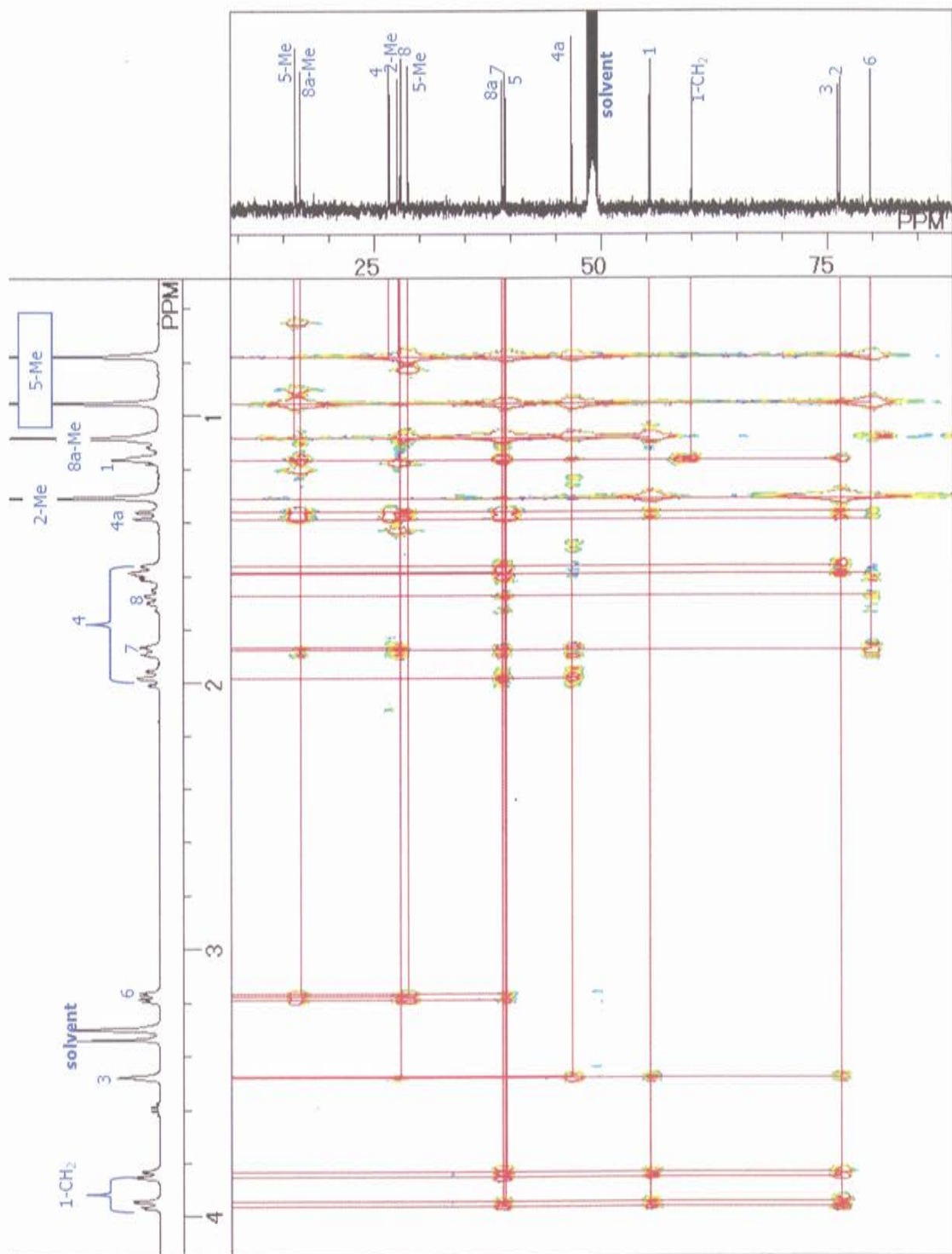


Fig. 55 HMBC spectrum of 10 (in CD₃OD).

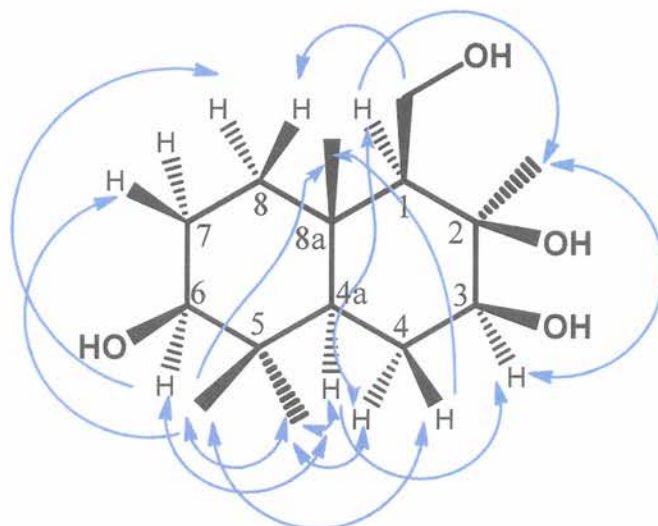


Fig. 56 NOE correlations of 10

Table 3. Chemical shifts values of **8-10** in CDCl₃

8			9			10		
Position	¹ H δ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	¹³ C δ	Position	¹ H δ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	¹³ C δ	Position	¹ H δ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	¹³ C δ
1		121.6	1		119.9	1	1.13 (m)	55.4
2	8.54 (d, 1.8)	133.6	2	8.54 (d, 1.8)	133.5	2		76.4
3		119.8	3		121.6	3	3.44 (t, 2.8)	76.1
4		166.8	4		166.6	4	1.94 (ddd, 2.3, 2.6, 10.9)	26.7
5	6.97 (d, 8.8)	119.0	5	6.97 (d, 8.9)	119.1	4a	1.33 (dd, 1.8, 11.2)	46.7
6	8.14 (dd, 2.0, 8.7)	137.6	6	8.13 (dd, 2.1, 8.9)	137.6	5		39.5
1-COOH		166.6	1-COOH	6.88 (s)	166.6	6	3.14 (dd, 4.6, 7.0)	79.7
1'	4.41 (dd, 6.1, 6.4)	67.7	1'	4.41 (m)	67.2	7	1.64 (ddd, 3.5, 9.8, 11.9)	39.2
2'	3.99 (t, 6.1)	70.2	2'	4.21 (ddd, 1.8, 2.1, 3.4)	69.0	8	1.84 (m)	27.9
3'	3.62 (ddd, 1.5, 1.8, 6.7)	71.6	3'	3.58 (dd, 1.8, 6.1)	71.8	8a		39.0
							3.92 (dd, 2.7, 8.9)	
4'	3.93 (t, 6.0)	70.9	4'	3.71 (m)	72.1	1-CH ₂ OH	3.80 (dd, 3.5, 8.1)	59.9
				3.79 (dd, 3.7, 7.3)				
5'	3.67 (dd, 1.8, 5.8)	64.4	5'	3.66 (dd, 5.5, 5.5)	64.4	2-Me	1.27 (s)	27.5
1''		207.5	1''		207.5	5-Me	0.92 (s)	28.7
2''	2.93 (d, 6.7)	47.6	2''	2.93 (d, 6.7)	47.6	5-Me	0.74 (s)	16.3
3''	2.27 (m, 6.7)	25.9	3''	2.26 (m, 6.7)	25.9	8a-Me	1.05 (s)	16.9
3''-Me	1.00 (d, 6.7)	22.9	3''-Me	1.00 (d, 6.7)	22.9			

第3節 単離化合物の生合成についての考察

菌類の糖代謝は以下に示すようなものであり、様々な二次代謝産物を生成する(Fig. 57)。

26)

本研究において、単離した化合物の生合成について詳しい研究を行っていないため、詳細なことは言及できないが、今回単離した化合物もヤマブシタケ由来の二次代謝産物であり、これら化合物はシキミ酸経路やメバロン酸経路といった主要な二次代謝経路が複合して生成されたものであると考えられる。

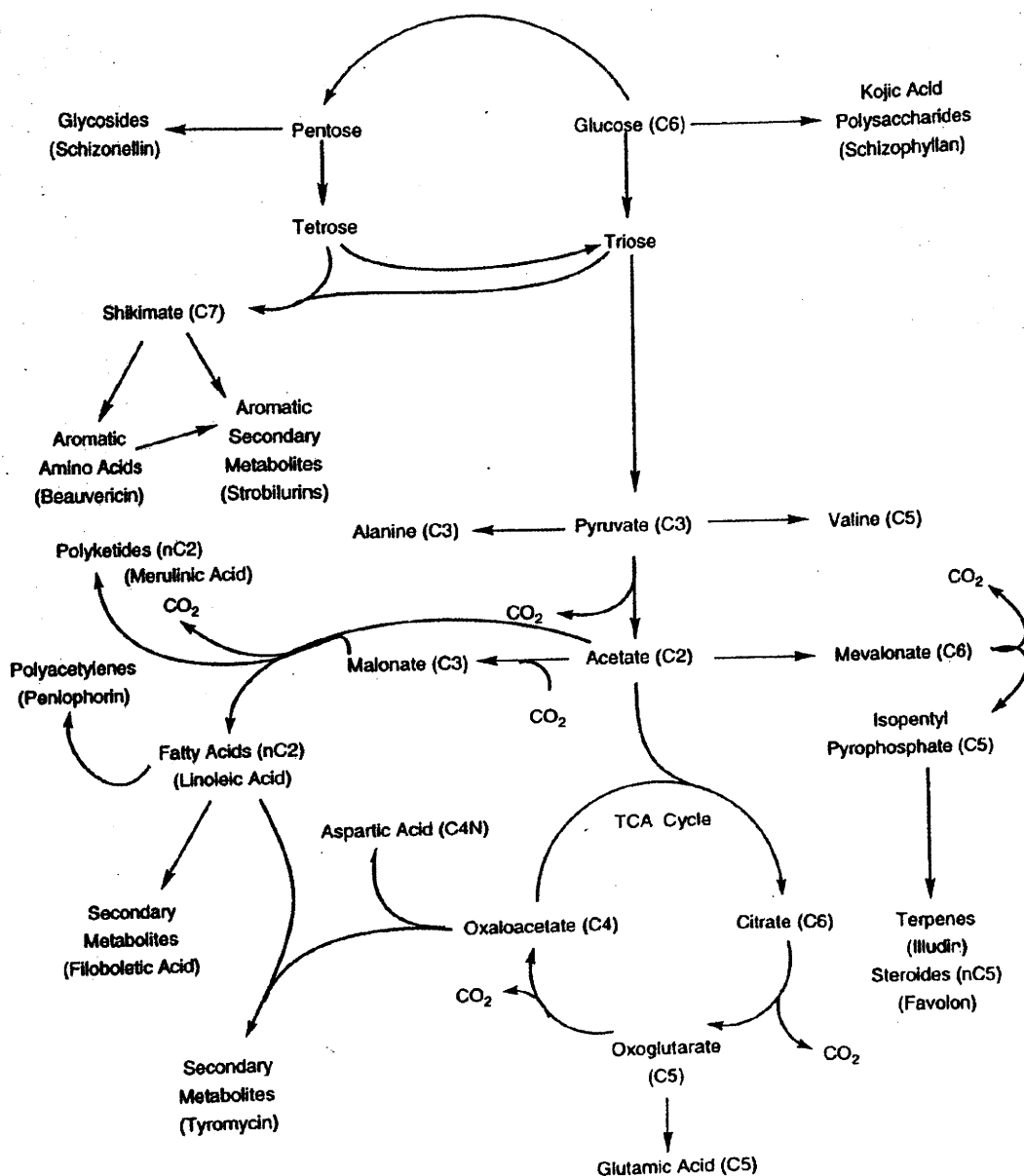


Fig. 57 Glucose metabolism in fungi. 26)

また、ヤマブシタケ廃菌床由来の化合物 **5-7** は、塩素化合物であり、大変興味深い。塩素化合物は、幅広い生物種から単離及び精製されている。²⁷⁾過酸化水素依存的にハロゲンを添加する反応を触媒する酵素はハロペルオキシダーゼと総称されており、クロロペルオキシダーゼ(Chloroperoxidase: CPO)が古くから知られている。この一群の酵素には、バナジウムもしくはプロトヘムが補酵素として含まれる。バナジウム含有プロモペルオキシダーゼは、褐藻類の *Ascophyllum nodosum* で初めて発見された。²⁸⁾同様に塩素化、臭素化反応を触媒する酵素が緑藻やグラム陰性バクテリア、放線菌で見出されている。²⁹⁻³¹⁾これらの生物において、ハロペルオキシダーゼがハロゲン化二次代謝産物の生合成に関与していることが明らかとなっている。ハロペルオキシダーゼは様々な生物種から発見されており³²⁾、近年、食用キノコである *Agrocybe aegerita* においても同様の酵素が発見され、その性状が調べられたところ、塩素、臭素、ヨウ素の付加反応を触媒することが明らかとなった。^{33,34)}そのため、本研究の研究材料であるヤマブシタケにも CPO が存在し、塩素化合物 **5-7** が生成されたと考えられる。

第4節 小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性試験の評価及び考察

得られた10個の化合物について小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性試験の評価を行った。試験はマウス神経芽細胞腫細胞株 Neuro2a に対し、小胞体ストレス誘導物質であるツニカマイシン(TM)またはタブシガルギン(TG)の添加による小胞体ストレスによる致死からの保護作用を評価する方法で行った。

小胞体内では、多くの膜タンパク質や分泌タンパク質が生合成されており、生合成されるこれらタンパク質は粗面小胞体膜上で合成され、小胞体内腔で *N*-グリコシド結合糖鎖の修飾を受け、正しくフォールディングされたのちにゴルジ体へと輸送される。ツニカマイシンは、この *N*-グリコシド結合タンパク質糖鎖の合成を阻害することで、小胞体ストレスを誘導する。³⁵⁾また、小胞体は細胞内において最大のカルシウム貯蔵庫であり、カルシウムを小胞体から放出することでカルシウムの恒常性に大きく寄与している。カルシウム代謝の異常は異常タンパク質蓄積と並んで、神経変性疾患における神経細胞死のメカニズムとして注目されている。そして、生理的現象である興奮毒性は、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体や AMPA 受容体が過度の興奮を起こすことで神経細胞内にカルシウムを過剰に流入させ、神経毒性を引き起こし、多くの神経変性疾患の病体メカニズムと関係していることが知られている。³⁶⁾このカルシウムの恒常性の乱れが、小胞体ストレスを惹起するという報告がなされている。^{37,38)}タブシガルギンは小胞体内の Ca^{2+} ATPase 阻害剤であり、小胞体内の Ca^{2+} を枯渇させることで、細胞内のカルシウムの恒常性を攪乱し、小胞体ストレスを誘導する。³⁹⁾

活性試験結果について、化合物 2 及び 3 については、活性が確認できなかったが、化合物 1、4~7 については有意な小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性が確認された(Fig. 58)。また、化合物 8~10 については有意な活性こそ見られなかったが、保護傾向にあることが確認できた(Fig. 59)。

結果の考察として、ヤマブシタケ子実体から単離した化合物 1~3 において、化合物 1 のみに活性が確認されたのは側鎖のパルミチン酸の存在が大きく影響していると考えている。ホスファチジルセリンなどのリン脂質が認知機能の低下を抑制していることが知られている。⁴⁰⁾また、プロテインキナーゼ C (PKC) は、ホスファチジルセリンなどのリン脂質や不飽和脂肪酸によって活性化されることがわかっており⁴¹⁾、PKC の活性化が神経細胞死を抑制するという報告もなされている。⁴²⁾本研究室では、ヤマブシタケより小胞体ストレス誘導細胞死抑制物質である *dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine* (DLPE) を見出しており、この化合物は2つの不飽和脂肪酸からなるリン脂質である。その作用機序は PKC のホスファチジルセリンあるいは不飽和脂肪酸結合部位に DLPE が結合することで、PKC を活性化させることが示唆された。²¹⁾これにより、神経細胞に対する小胞体ストレス毒性低減作用がリン脂質の脳機能への有効性の1つの機構であることが示唆された。⁴³⁾化合物 1 の脂肪酸は飽和脂肪酸であるパルミチン酸であるが、パルミチン酸は小胞体膜に存在する *elongase*

といった4種類の酵素による脂肪酸極長鎖反応により、極長鎖脂肪酸に合成される。⁴⁴⁾この極長鎖脂肪酸はリン脂質、コレステロールなどに取り込まれると考えられている。⁴⁴⁾そこで、化合物1の小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性は、化合物の有するパルミチン酸が極長鎖脂肪酸に合成されたのち、リン脂質に取り込まれ、そのリン脂質がPKCを活性化するためではないかと考えた。しかし、長鎖飽和脂肪酸のパルミチン酸は酵母及び膵臓のβ細胞において小胞体ストレスを誘導し、細胞のアポトーシスを引き起こすことが、最近の研究で報告されている。⁴⁵⁾さらに、パルミチン酸がβ細胞において実際に小胞体内のCa²⁺を枯渇させることが証明されているため^{46,47)}、本研究で単離した化合物1の作用機序は大変興味深いものであり、今後さらなる研究が必要である。

ヤマブシタケ廃菌床から単離した化合物4~10について、全ての化合物の構造が異なるため構造による活性相関の比較はできない。しかし、化合物4~7は濃度依存的に有意な小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性を示したのに対し、化合物8~10は保護傾向にあるという結果に止まってしまったのは、サンプル濃度が影響していると考えた。化合物4~7は、10 µg/mlの投与のとき、それぞれの濃度が42 µM, 54 µM, 16 µM, 50 µMであるのに対し、化合物8~10はそれぞれ、28 µM, 28 µM, 36 µMと低濃度である。そのため、化合物8~10はさらに高濃度で検討すれば、有意な保護活性が確認できるのではないかと示唆した。また、化合物の投与サンプルのモル濃度を一定にして再試験し、比較検討するとともに、その作用機序の解明を行う必要がある。

以上、ヤマブシタケのさらなる小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性物質の単離に成功し、また、ヤマブシタケ廃菌床の有効利用の可能性を見出すことに成功した。

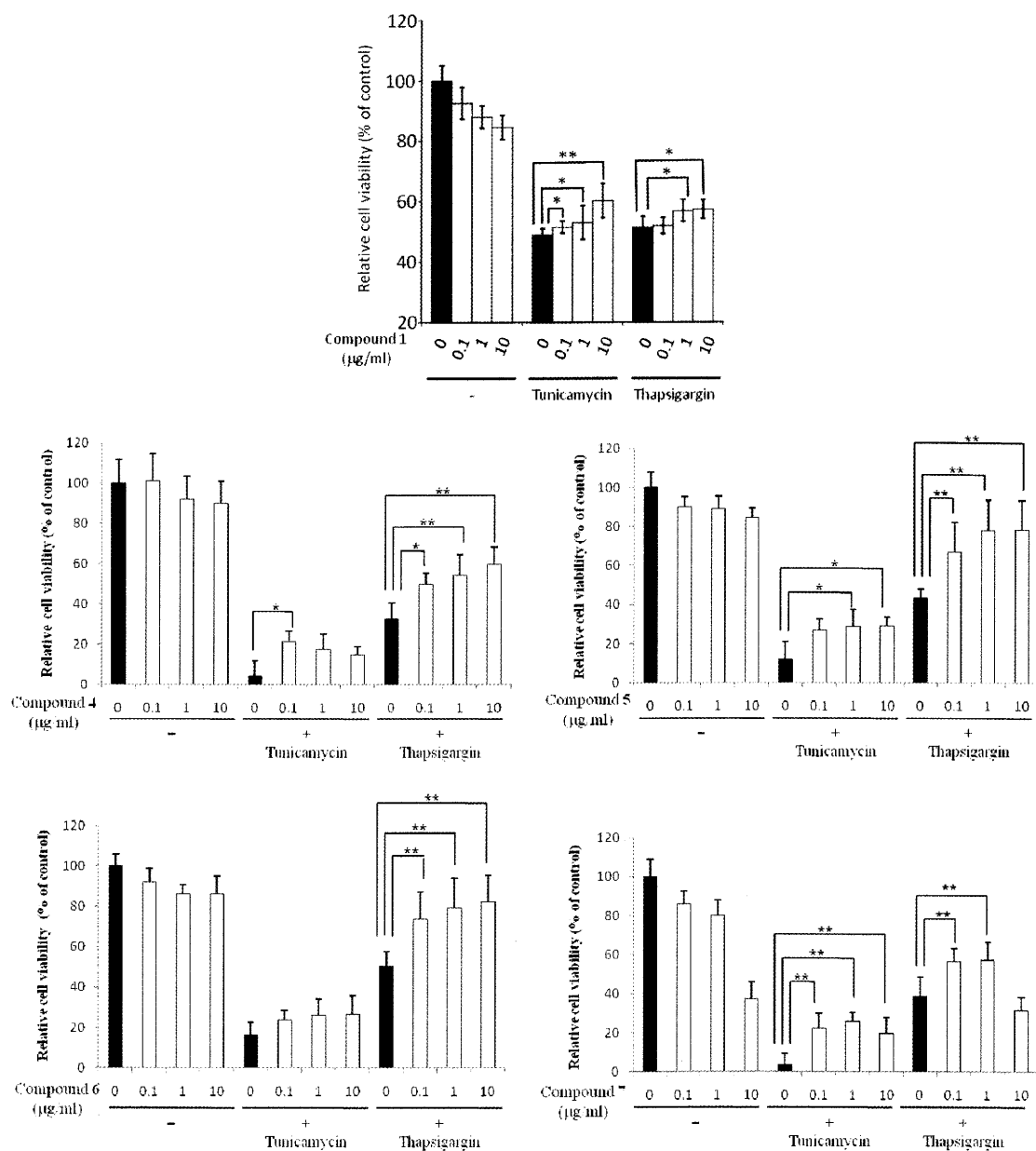


Fig. 58 Protective effects of 1 and 4-7 on ER stress-induced cell death.

Neuro2a cells were incubated with various concentrations of compounds 1 and 4-7 in the presence of 0.5 mg/ml of tunicamycin or 20 nM thapsigargin for 24 h after treatment. Data are the mean \pm S. E. of two cultures (*p < 0.05, **p < 0.01 vs control).

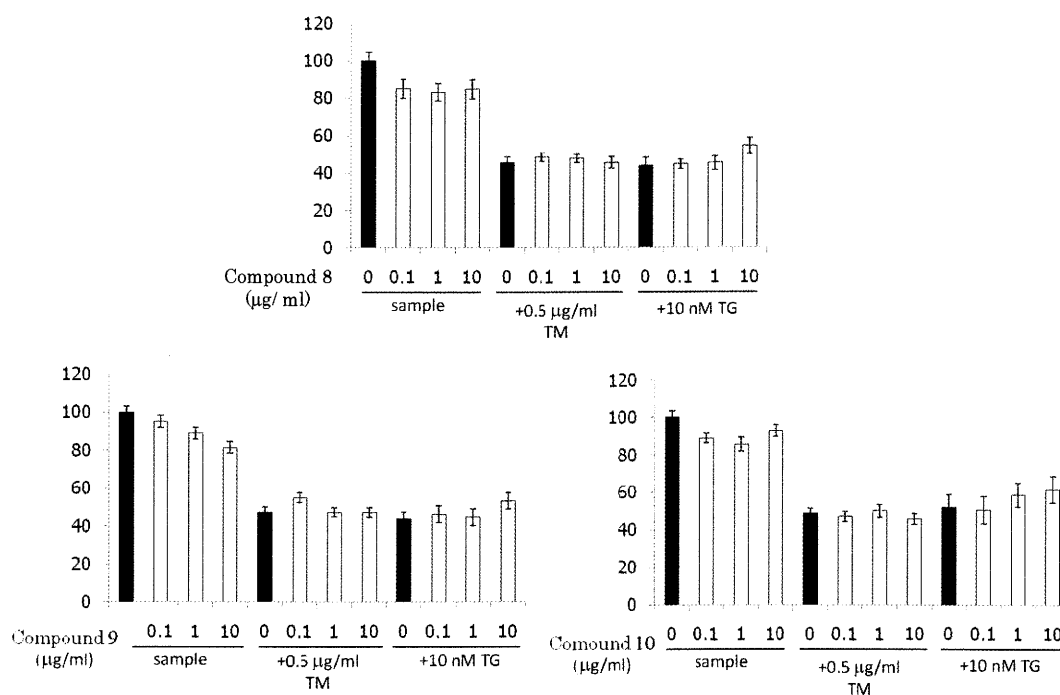


Fig. 59 Protective effects of **8-10** on ER stress-induced cell death.

Neuro2a cells were incubated with various concentrations of compounds **8-10** in the presence of 0.5 mg/ml of tunicamycin or 20 nM thapsigargin for 24 h after treatment. Data are the mean \pm S. E. of two cultures (* p <0.05, ** p <0.01 vs control).

第3章 実験部

第1節 使用器具

本研究で使用した機器類は以下の通りである.

NMR: JMN-EX-270 FT NMR Spectrometer (JEOL)

Lambda 500 FT NMR Spectrometer (JEOL)

MS: MS-DX320 (JEOL)

JMS-DX320HF (JEOL)

JMS-T100LP (JEOL)

IR: A-102 Diffraction Grating Infrared Spectrometer (JASCO)

HPLC: Pump: PU-2089 Plus Quaternary Gradient Pump (JASCO)

PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump (JASCO)

L-2130(HITACHI)

Detector: UV-2075 Plus Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)

875-UV Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)

diode Array Detector L-2455(HITACHI)

Recorder: 807-IT Integrator (JASCO)

Automatic sampler: AS-2055 Plus Intelligent Sampler (JASCO)

Software: Chromatography Data Station ChromNAV (JASCO)

ELITE(HITACHI)

Interface: LC-NetII/ADC (JASCO)

第2節 ヤマブシタケ由来の機能性物質の単離

3-2-1 ヤマブシタケ子実体及び廃菌床

信州キノコ工房久保産業有限会社から供与されたヤマブシタケ及びその廃菌床を用いた。廃菌床とは、子実体収穫後、菌床用容器からかき出され、オートクレーブにかけた菌床である。菌床の培地基材は国産ブナ木のおがくず(450 g)、栄養材として豆皮(35 g)、コーンブラン(36 g)、乾燥オカラ(10 g)、活性炭(2 g)を用い、水分含有率 62%とした。

3-2-2 子実体由来の機能性物質の単離

生のヤマブシタケ子実体(4.0 kg)を 85%エタノール、アセトンで抽出後減圧濃縮し、 CHCl_3 、 EtOAc 、水で順次抽出を行った。このうち CHCl_3 可溶部 (186.3 g)をシリカゲルカラムのフラッシュクロマトグラフィー(silica gel 60N, 900 g, ϕ 7×50 cm) に供し、 CHCl_3 、 CHCl_3 /アセトン=9:1, 7:3, CHCl_3 /MeOH=9:1, 7:3, 1:1, 3:7, MeOH 各 2 L で順次溶出し、YA-Cl-1~16の画分を得た。このうち YA-Cl-4(2.5 g)を ODS 中圧カラム (ULTRA PACK, ϕ 50×300 mm)を用いた MPLC(99% MeOH, UV=260 nm, 6ml/min)でさらに分画した。この画分を HPLC(①Wakopak, ϕ 4.6×250 mm, 98% MeOH, UV=260 nm, ②Grand Pak, ϕ 4.6×250 mm, 95% MeOH, UV=260 nm, ③CAPCELL PAK AQ, ϕ 4.6×250 mm, 95% MeOH, UV=260 nm)に順次供して、化合物 1 を単離した。

温風乾燥させたヤマブシタケ子実体 (1.9 kg)をヘキサンで 4 回抽出後 (合計 7 L)、酢酸エチルで 3 回抽出 (合計 7.3 L)を行った。減圧濃縮後、ヘキサン層、酢酸エチル層を得た。ヘキサン層 (30.3 g)をフラッシュカラムクロマトグラフィー(silica gel 60N, 1.6 kg, ϕ 7×50 cm)に供し、ヘキサン/アセトン=95:5, 9:1, 8:2, 1:1, アセトン, EtOH, 80% EtOH (各 2~5 L)で順次溶出を行い、ya2-he-1~17の画分を得た。ya2-he-9 (977.6 mg)をさらにフラッシュカラムクロマトグラフィー(silica gel 60N, 900 g, ϕ 7×50 cm)に供し、ヘキサン/アセトン=95:5, 9:1, 7:3, 1:1, acetone, EtOH (各 1~2 L)で順次溶出を行い、ya2-he-9-A~I の 9 つのフラクションを得た。得られた ya2-he-9-G (30.4 mg)を ODS カラム (Develosil C30-UG-5 ϕ 30×250 mm, 99% MeOH)を用いた HPLC に供し、化合物 2(0.8 mg)及び化合物 3(1.5 mg)を得た。

3-2-3 廃菌床由来の機能性物質の単離

ヤマブシタケ廃菌床(2.7 kg)を 85%EtOH、アセトンで抽出後減圧濃縮し、ヘキサン、酢酸エチル、水で順次抽出を行った。

このうちヘキサン層 (9.9 g)をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィー(silica gel 60N, 1.6 kg, ϕ 7×50 cm) に供し、ヘキサン/ アセトン=95:5, 9:1,7:3, 1:1, アセトン, MeOH 各 2 L で順次溶出し、Sya-he-1/5~175/200 の画分を得た。このうち Sya-he-17/29 を ODS sep-Pak に供し、MeOH で溶出した。非吸着部を C30 カラム(Wakopak navi ϕ 30×250 mm, MeOH)を用いて HPLC に供し、化合物 4 を得た。続いて、Sya-he-30/55 をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィー(silica gel 60N, 1.6 kg, ϕ 7×50 cm) に供し、CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/ アセトン=9:1,7:3,1:1, アセトン, MeOH 各 2 L で順次溶出し、フラクション 1~13 に分画し、化合物 5 (908.4 mg)を得た。さらに、フラクション 5 を ODS sep-Pak に供し、80%MeOH で溶出した。非吸着部を C30 カラム(Develosil C30 UG-5 ϕ 30×250 mm, 80%MeOH)を用いて HPLC に供し、化合物 1 及び 6 (8.4 mg)を得た。化合物 1 は前に単離したものと合わせて収量 16.7 mg 得た。さらに、Sya-he-56/71 をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィー(silica gel 60N, 1.6 kg, ϕ 7×50 cm) に供し、ヘキサン/アセトン=95:5,9:1,7:3,1:1,2:8,アセトン, MeOH 各 2 L で順次溶出し、フラクション 1~9 に分画した。フラクション 4 を Silica sep-Pak に供し、CHCl₃ で溶出した。非吸着部を順層カラム(Develosil 60, ϕ 30×250 mm, CHCl₃)を用いて、HPLC に供し、フラクション 1~17 に分画した。得られたフラクション 4 をさらに ODS sep-Pak に供し、90%MeOH で溶出した。非吸着部を C30 カラム(Develosil C30 UG-5 ϕ 30×250 mm, 90%MeOH)を用いて HPLC に供し、化合物 7 (3.0 mg) 得た。

酢酸エチル層(19.6 g)をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィー(silica gel 60N, 1.6 kg, ϕ 7×50 cm) に供し、ヘキサン/ アセトン=8:2,7:3,6:4,4:6,アセトン, MeOH 各 2 L で順次溶出し、フラクション 1~14 に分画した。フラクション 11 をさらにシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィー(silica gel 60N, 0.8 kg, ϕ 4×60 cm)に供し、CH₂Cl₂/ MeOH=99:1,95:5,9:1,7:3,6:4,1:1, EtOH で順次抽出し、15 フラクション(11-1~15)を得た。フラクション 11-9 を ODS sep-Pak に供し、60%MeOH, MeOH で順次溶出した。60%MeOH 非吸着部を C30 カラム(Develosil C30 UG-5 ϕ 30×250 mm, 60%MeOH)を用いて HPLC に供し、化合物 8 (12.1 mg)及び 9(17.5 mg) を得た。フラクション 11-10 を CH₂Cl₂ 及び MeOH で溶かしたところ、可溶部及び不溶部に分かれ、可溶部を化合物 10(3.6 mg)として得た。

第3節 小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性試験

小胞体ストレスモデルとなるツニカマイシン(TM：糖鎖生合成阻害)およびタブシガルギン(TG：小胞体内カルシウム枯渇)を用いて神経系細胞(Neuro2a)に対する細胞毒性の抑制効果を調べた。

マウス神経芽細胞腫細胞株 Neuro2a を 5,000 cell/well の密度で 24 時間培養した。培養は、10%牛胎児血清(FBS)および抗生物質としてペニシリン 100 units/ml とストレプトマイシン 100 μ g/ml を添加したダルベッコ改変イーグル培地(D-MEM)を使用し、温度 37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度 5%の条件で行った。24 時間培養後、FBS を含まない上記培地に小胞体ストレスモデルとなる 0.5 μ g/ml のツニカマイシンまたは 10 nM タブシガルギンと 0.1, 1, 10 μ g/ml のサンプルを加えた培地でさらに 24 時間培養を行った。

培養後、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT)法による生細胞数の定量解析を行った。培地を 250 μ g/ml の MTT を含む無血清の上記培地に交換し、さらに 2 時間培養を行い、反応停止液 (20% (w/v) SDS, 50% (v/v)ジメチルホルムアミド水溶液)を培地と同量添加して反応を停止した。細胞と生成物の可溶化後、マイクロプレートリーダーにより 570 nm の吸光度測定を行うことで生細胞数の定量評価を行った。⁴⁸⁾

第 2 部

キノコ由来の奇形子実体誘導物質の 生物有機化学的研究

第1章 緒論

キノコは、その成長段階において、栽培環境の変化などといったことが原因で奇形の子実体を形成することがある(Fig. 1)。⁴⁹⁾人工栽培されているキノコの奇形の原因として、

- 培養工程における温度管理の不適正
- 換気管理などの不適正
- 仕込み時の充填における軟詰め
- 或いは芽出し初期における乾燥
- 生育管理時の換気不足による炭酸ガス障害
- 生育時の管理温度の不適正

などが挙げられる。⁵⁰⁾シイタケにおいてはウィルスによって、子実体の形状異常が起こることが分かっている。⁵¹⁾

我々は、一つの現象には必ず何らかの物質が関与しているという考えのもと、キノコを奇形にする奇形子実体誘導物質の存在を仮説として立てた。また、そのような物質は、子実体発生の機構解明の鍵となるのではないかと考え、その活性物質の探索を行うこととした。キノコの子実体形成促進物質については様々研究されているが⁵²⁻⁵⁵⁾、どんなキノコにも有効な促進物質は見つかっていない。

研究材料として、栽培時に奇形になったハタケシメジを用い、このキノコからの活性物質の単離を目指した(Fig. 1B)。

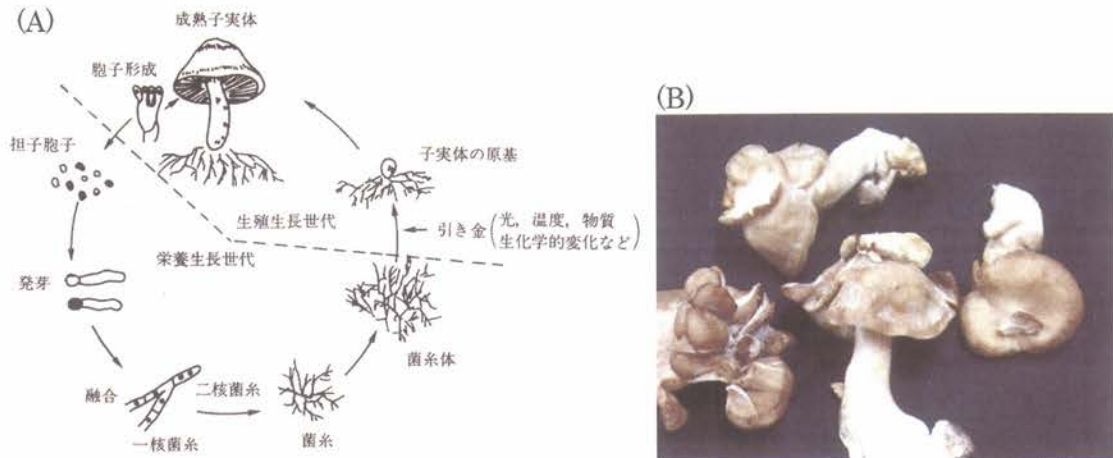


Fig. 1 (A) Lifecycle of mushroom ⁴⁹⁾ and (B) Deformed mushroom of *Lyophyllum decastes*.

第2章 本論

第1節 奇形子実体誘導活性試験の確立

最初に、キノコが奇形の子実体を形成するかどうかの実験方法を確立した。キノコを実験室レベルで子実体を形成させることは簡単ではない。そこで、人工栽培されているブナシメジの菌床(原基を形成しているもの)を用いて、サンプルをアッセイすることとした(Fig. 2A)。菌床を用いれば、確実に子実体を形成させることができると考えた。この菌床に奇形ハタケシメジ抽出物であるヘキサン層、酢酸エチル層、メタノール層、水層を滴下したところ、ヘキサン層にて顕著な奇形子実体が確認された(Fig. 2B)。

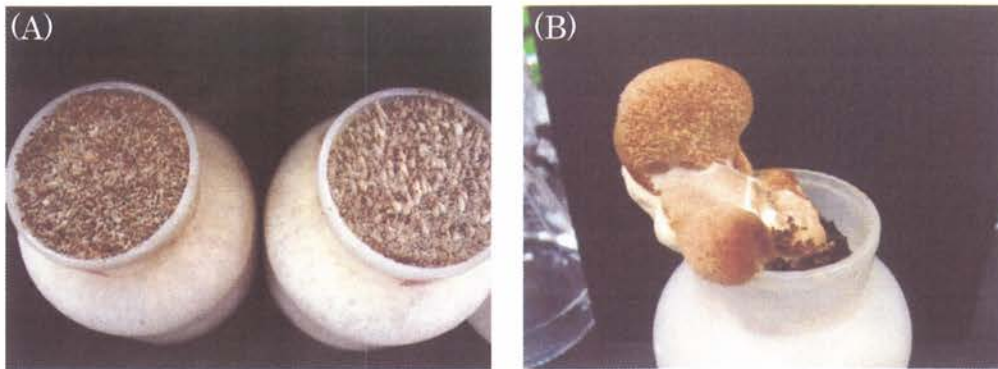


Fig. 2 (A) The cultivation beds of *Hypsizygus marmoreus* and (B) deformed fruiting body of *H. marmoreus* by treatment with hexane layer.

再現性を確認するために、再度実験を行ったところ、今度はコントロールを含めた全ての菌床において奇形の子実体が形成した。この原因として、栽培器が開放系であることと、温度・湿度の管理が難しいということが挙げられた。そこで、サンプル別に栽培でき、温度・湿度・照度の管理がしやすい培養器で栽培実験を行うこととした。

しかし、ここで新たな問題が起きた。サンプル数が増えると、栽培する菌床の数も増えるため、栽培場所の確保が困難になってしまった。そこで、寒天培地でキノコが形成しやすい、エノキタケの菌糸体を用いた奇形子実体形成実験を試みた。

第2節 奇形ハタケシメジ由来機能性物質の単離

生の奇形ハタケシメジ子実体を85%エタノール、アセトンで順次抽出後、分液ロートを用いて、ヘキサン層、CH₂Cl₂層、酢酸エチル層、メタノール層、水層を得た(Fig. 3)。活性の確認されたヘキサン層を各種クロマトグラフィーに供し、化合物1及び2を得た(Fig. 4)。

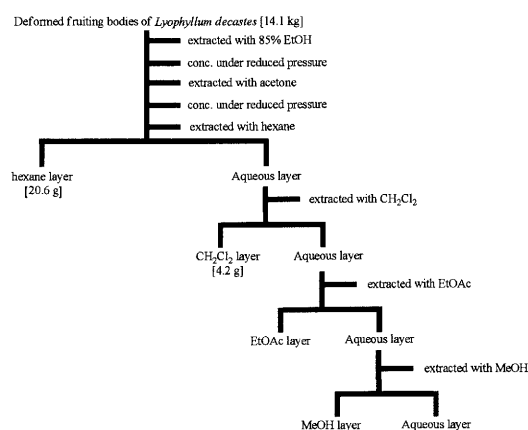


Fig. 3 Extraction of hexane layer of the fresh fruiting bodies of *Lyophyllum decastes*.

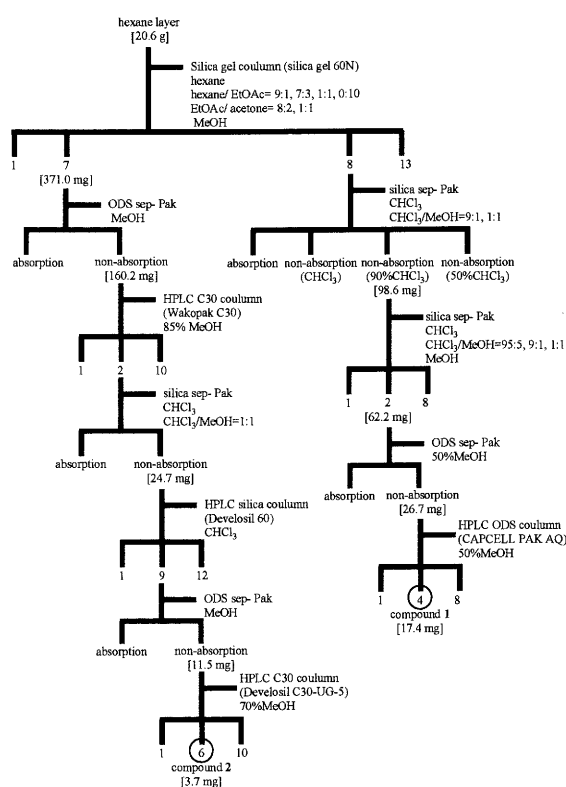


Fig. 4 Chromatographic fractionation of hexane layer of the fresh fruiting bodies of *L. decastes*.

第3節 化合物の構造解析

2-3-1 化合物1の構造解析

化合物1はESIMS(-)スペクトルから、分子量214と示唆された(Fig. 5)。また、IRスペクトルより 3160 cm^{-1} に吸収ピークが確認されたことから、水酸基の存在が示唆された(Fig. 6)。 ^{13}C -NMR及びDEPTスペクトルより、メチルが1つ、メチレンが1つ、メチンが3つ、4級炭素が5つであると示唆された(Fig. 8)。さらに、その他のNMRデータより、アセチレン骨格を有していることが示唆されたが、1次元及び2次元のNMRデータからの構造解析が困難であったため、構造決定には至らなかった。しかし、NMRのデータからアセチレン骨格を有することが示唆される。

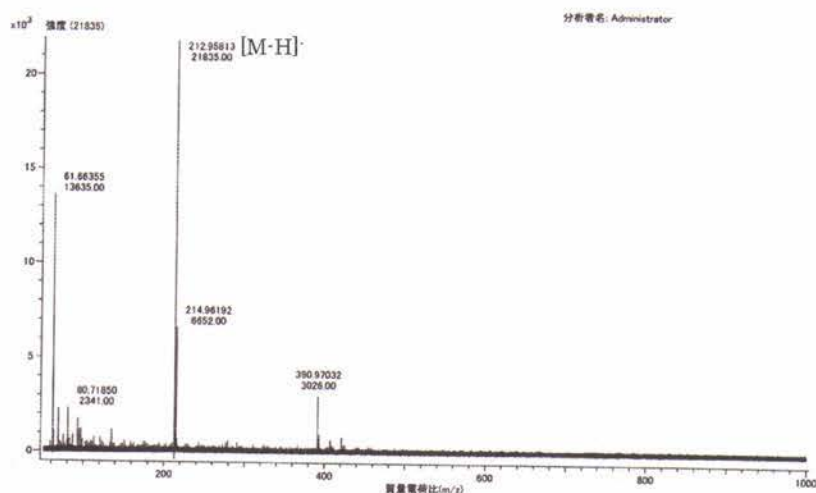


Fig. 5 ESIMS (-) spectrum of 1

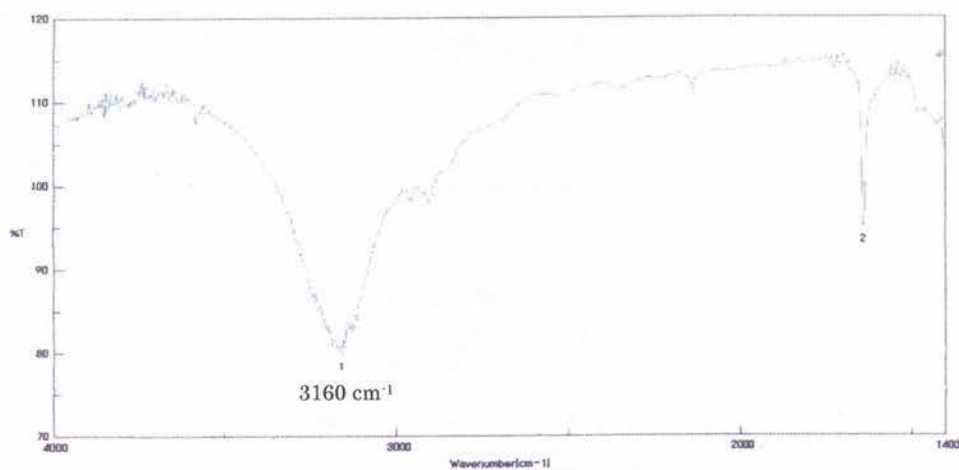


Fig. 6 IR spectrum of 1.

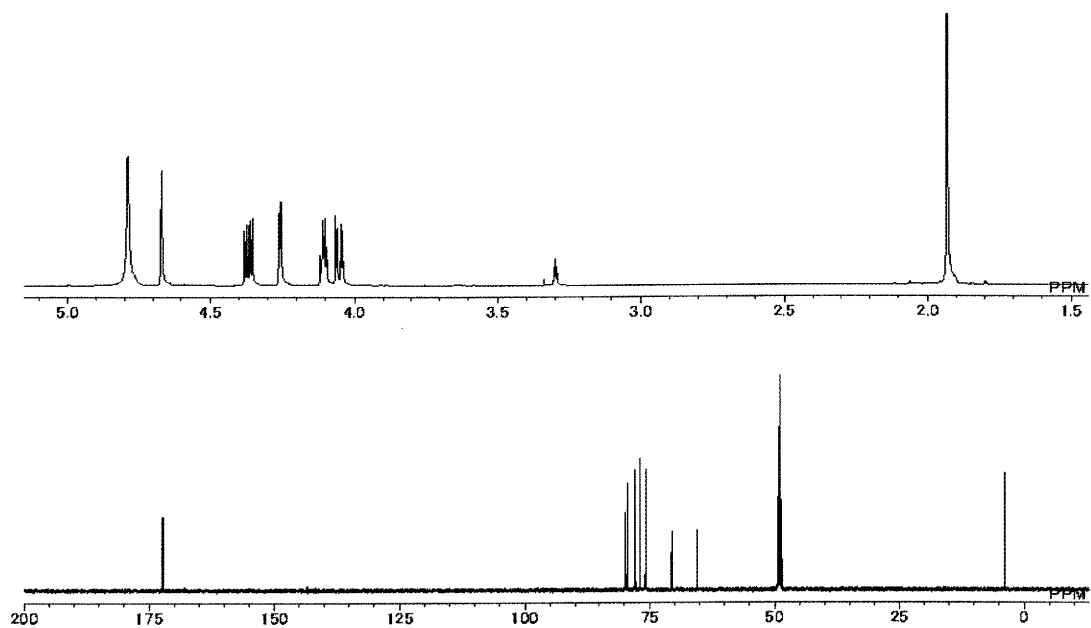


Fig. 7 ¹H and ¹³C-NMR spectrum of 1 (in CD₃OD).

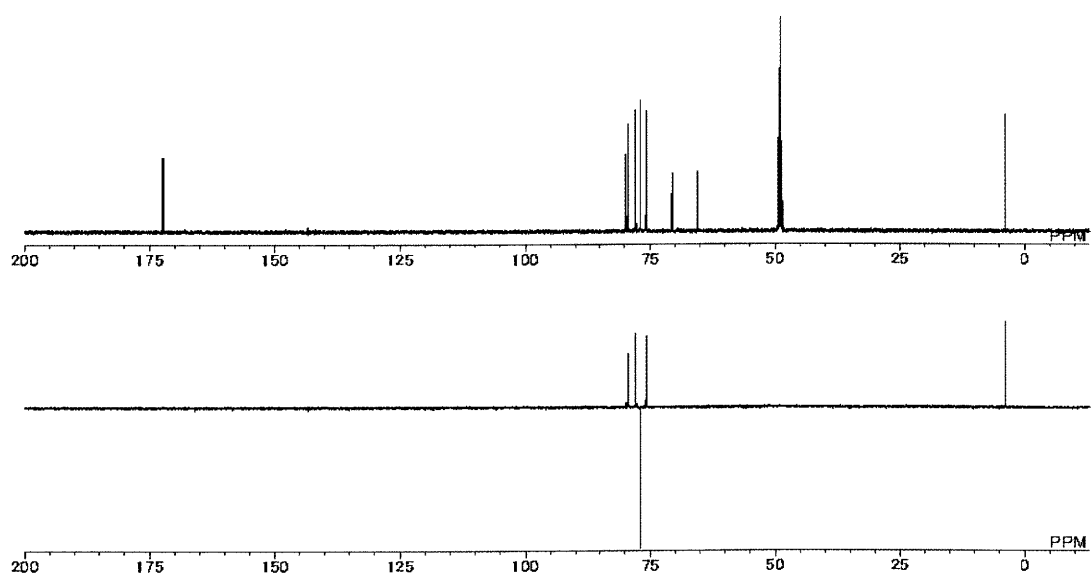


Fig. 8 DEPT spectrum of 1 (in CD₃OD).

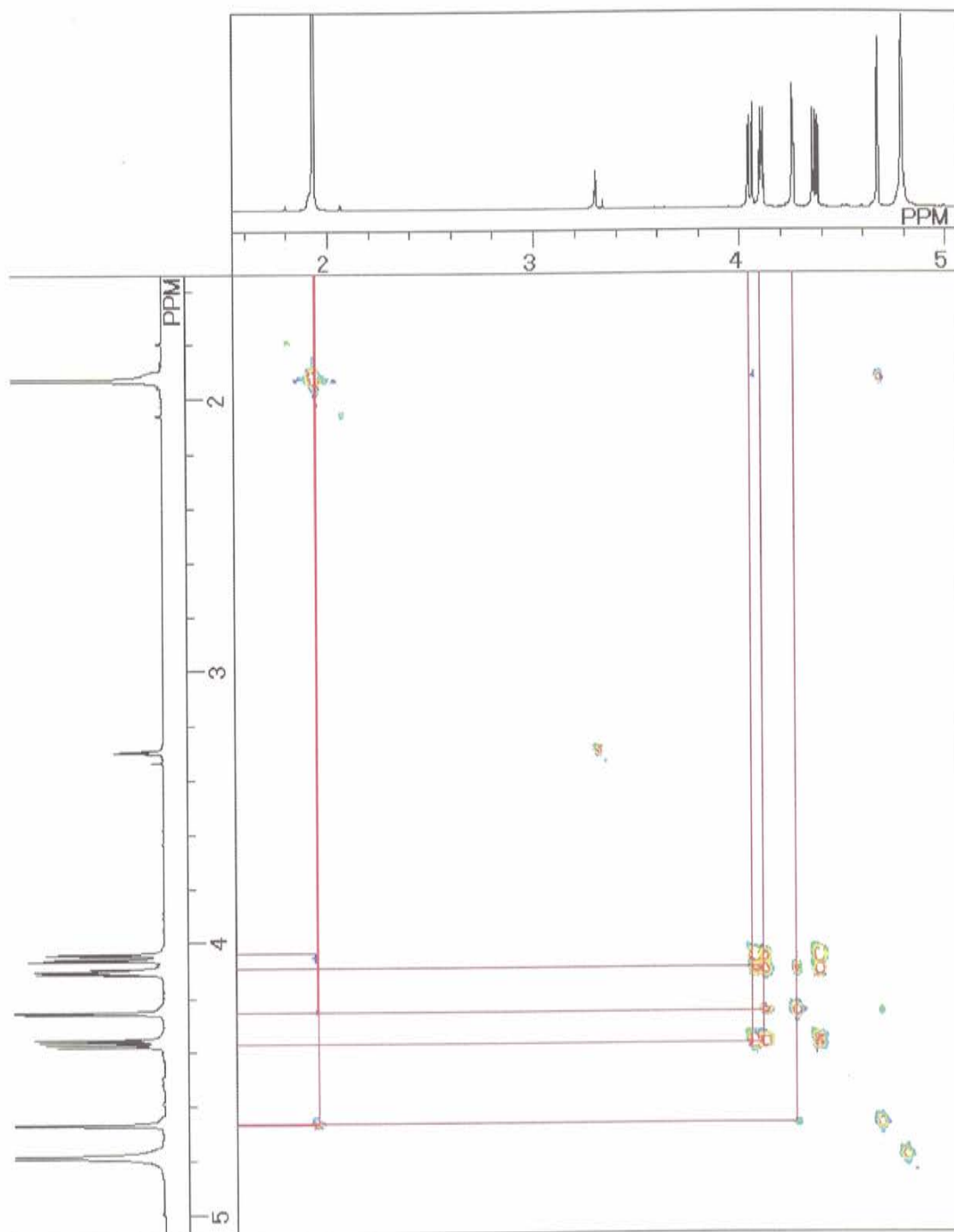


Fig. 9 H-H COSY spectrum of 1 (in CD₃OD).

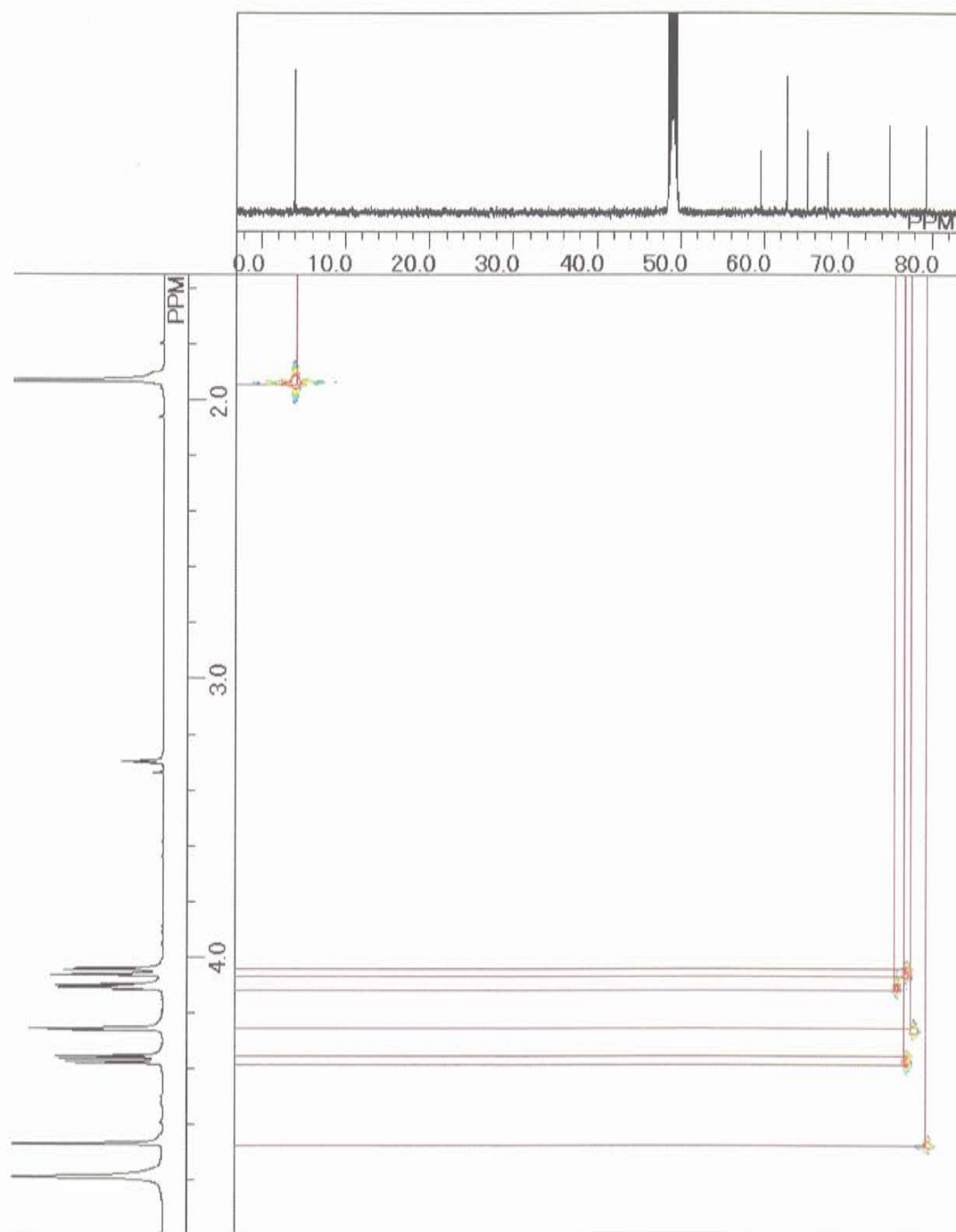


Fig. 10 HMQC spectrum of 1 (in CD₃OD).

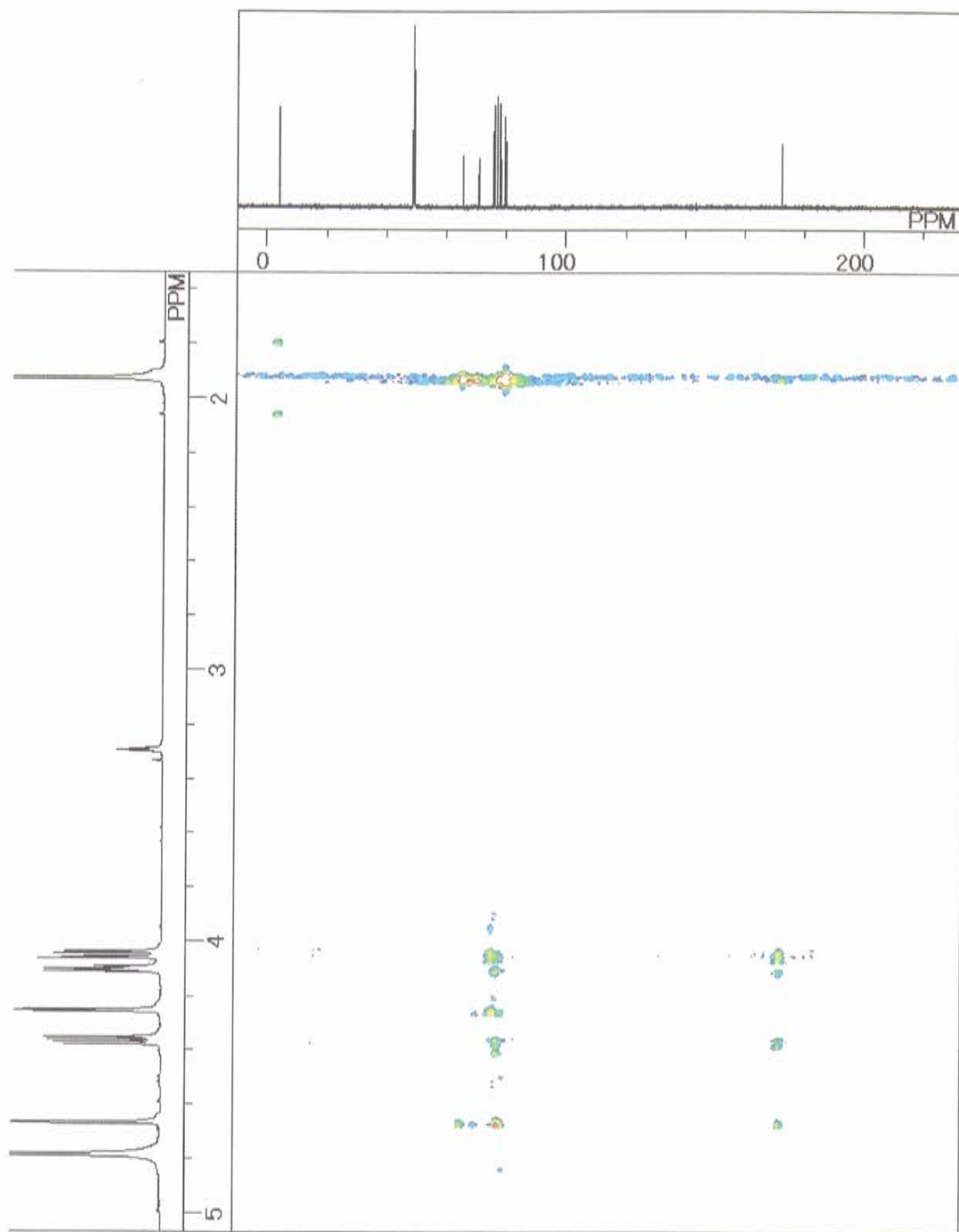
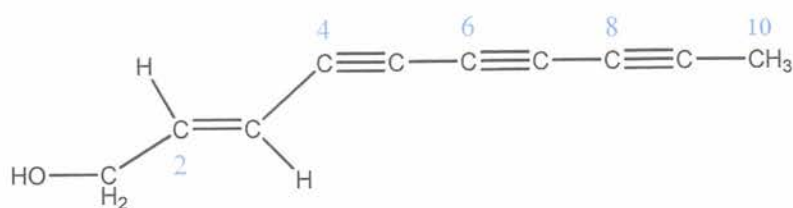


Fig. 11 HMBC spectrum of 1 (in CD₃OD).

2-3-2 化合物 2 の構造解析

化合物 2 は ^1H 及び ^{13}C -NMR スペクトルから、(*E*)-deca-2-en-4,6,8-triyn-1-ol であると
同定した(Fig. 12)。この化合物は、カンゾウタケ、オオザラミノシメジ、ミネシメジといっ
た様々なキノコから単離・精製されている化合物であった。⁵⁶⁻⁵⁹この化合物は *Pratylenchus*
coffea に対する抗線虫活性を有している。⁶⁰ *P. coffea* は和名をミナミネグサレセンチュ
ウといい、本州以南に広く分布する広食性の線虫であり、サトイモの連作障害の原因菌で
あることが知られている。⁶¹



(*E*)-deca-2-en-4,6,8-triyn-1-ol

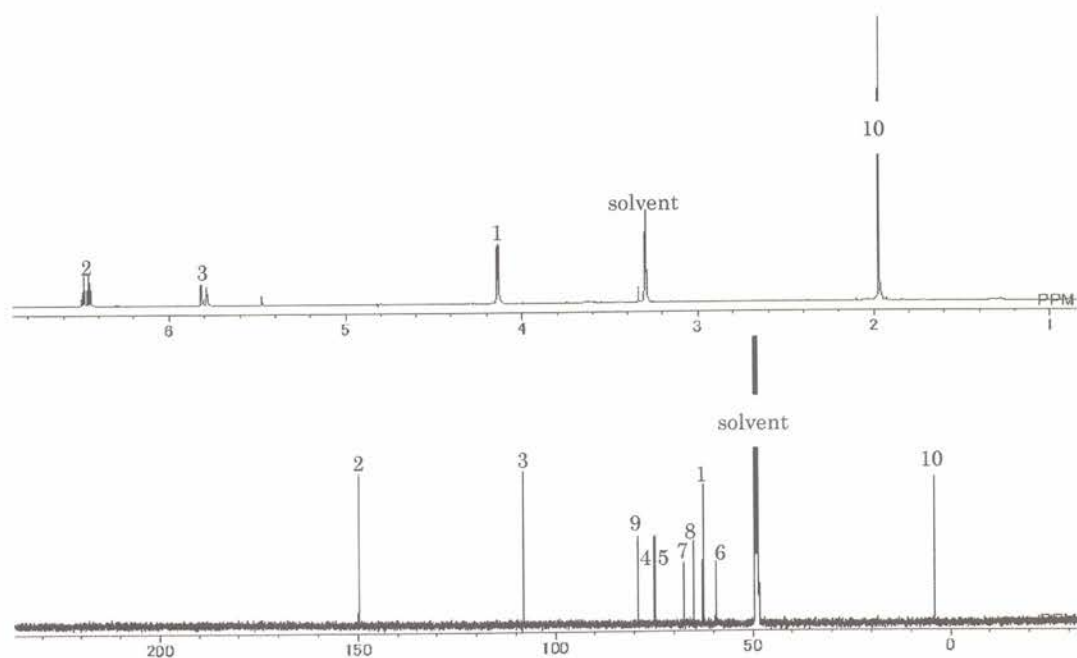


Fig. 12 ^1H and ^{13}C -NMR spectra of 2 (in CD_3OD)

第4節 奇形子実体誘導活性試験の評価及び今後の予定

奇形ハタケシメジ子実体の粗抽出物をブナシメジ菌床にアッセイしたところ、ヘキサソール層において著しい奇形子実体が形成された(Fig. 2B)。このことから、奇形の子実体には何らかの奇形子実体誘導物質の存在が示唆された。

しかし、現在行っている奇形子実体誘導実験は、菌床栽培実験においては大量のサンプルを同時に実験するためには栽培場所の確保の問題が出てくること、エノキ菌糸を用いた寒天培地実験においては個体差が激しいという問題点がある。また、どちらの実験も培養期間が長期にわたるため、早急な改良が必要である。

そして、今後、今回単離した化合物 **1** 及び **2** の活性を確認するとともに、活性物質の単離及び精製をし、そのメカニズムを解明する必要がある。

第3章 実験部

第1節 使用器具

本研究で使用した機器類は以下の通りである。

NMR: JMN-EX-270 FT NMR Spectrometer (JEOL)

Lambda 500 FT NMR Spectrometer (JEOL)

MS: MS-DX320 (JEOL)

JMS-DX320HF (JEOL)

JMS-T100LP (JEOL)

IR: A-102 Diffraction Grating Infrared Spectrometer (JASCO)

HPLC: Pump: PU-2089 Plus Quaternary Gradient Pump (JASCO)

PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump (JASCO)

L-2130(HITACHI)

Detector: UV-2075 Plus Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)

875-UV Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)

diode Array Detector L-2455(HITACHI)

Recorder: 807-IT Integrator (JASCO)

Automatic sampler: AS-2055 Plus Intelligent Sampler (JASCO)

Software: Chromatography Data Station ChromNAV (JASCO)

ELITE(HITACHI)

Interface: LC-NetII/ADC (JASCO)

第2節 機能性物質の単離

3-2-1 用いたキノコ

奇形ハタケシメジは王子木材緑化株式会社より提供していただいた亀山1号を用いた。奇形子実体誘導実験には、菌床栽培実験において久保産業有限会社から提供していただいたブナシメジ NN-11 号菌、寒天培地実験において本研究室で保有しているエノキタケ AFV-101 を使用した。

3-2-2 活性物質の単離

奇形ハタケシメジ子実体(14.1 kg)を85%エタノール、アセトンで順次抽出後、減圧濃縮し、ヘキサン、 CH_2Cl_2 、EtOAc、メタノール、水で順次抽出を行った。このうちヘキサン層(20.6 g)をシリカゲルカラムのフラッシュクロマトグラフィー(silica gel 60N, 1.6 kg, ϕ 7×50 cm)に供し、ヘキサン、ヘキサン/酢酸エチル=9:1,7:3, 1:1、酢酸エチル、酢酸エチル/アセトン=8:2, 1:1, MeOH 各2 Lで順次溶出し、13 フラクシオンを得た。このうちフラクシオン8を silica sep-Pak に供し、 CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ =9:1, 1:1, MeOH で順次溶出させた。 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ =9:1 で溶出させた画分をさらに silica sep-Pak に供し、 CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ =95:5, 9:1, 1:1, MeOH で順次溶出させ、8 フラクシオン(8-1~8-8)を得た。フラクシオン8-2を ODS sep-Pak に供し、50%MeOH で溶出した。非吸着部を C18 カラム(CAPCELL PAK AQ, ϕ 30×250 mm, 50%MeOH)を用いた HPLC に供し、化合物 1(17.4 mg)を得た。

シリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーで得たフラクシオン7を ODS sep-Pak に供し、MeOH で溶出した。非吸着部を C30 カラム(Develosil C30-UG-5, ϕ 30×250 mm, 85%MeOH)を用いた HPLC に供し、10 フラクシオン(7-1~7-10)を得た。フラクシオン7-2を silica sep-Pak に供し、 CHCl_3 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ =1:1 で溶出した。非吸着部を順層カラム(Develosil 60, ϕ 30×250 mm, CHCl_3)を用いた HPLC に供し、12 フラクシオン(7-2-1~7-2-12)を得た。フラクシオン7-2-9を ODS sep-Pak に供し、MeOH で溶出した。非吸着部を C30 カラム(Develosil C30-UG-5, ϕ 30×250 mm, 70%MeOH)を用いた HPLC に供し、化合物 2(3.7 mg)を得た。

第3節 奇形子実体誘導活性試験

菌床栽培実験においては、サンプル（粗抽出物：100mg，単離した化合物：1 mg）をペーパーディスクに染み込ませ、乾燥したものをブナシメジ菌床にのせた。コントロールはDWを染み込ませたものを用いた。16℃、湿度70-90%、明所で子実体が形成するまで培養した。培養期間は約2ヵ月間である。

寒天培地での実験は、PDA培地を用いて行った。サンプル(1 mg)をペーパーディスクに染み込ませ、寒天培地にのせた(Fig. 13)。菌糸が蔓延するまで、室温、暗所で培養し、菌糸が蔓延したのち、15℃、明所に移して培養を行った。

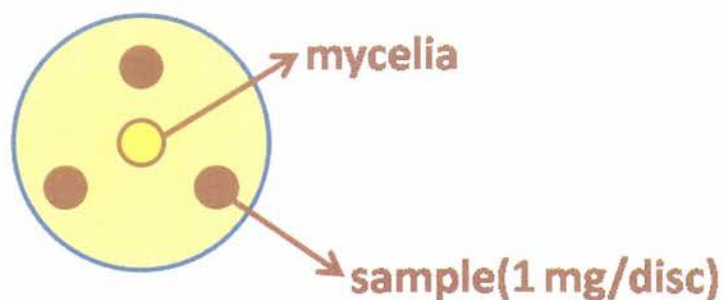


Fig. 13 The assay of incubation of mycelia *Flammulina velutipes*.

論文要旨

1. ヤマブシタケ由来の小胞体ストレス誘導細胞死抑制物質の生物有機化学的研究

ヤマブシタケは以前から本研究室の研究材料であり、子実体から HeLa 細胞に対する毒性活性を示す hericenone A 及び B や、前脳基底核コリン作動性神経細胞(BFCN)の働きを活性化させる神経成長因子(NGF)の合成を誘導する hericenone C~H などの化合物が単離・精製されている。また、近年、アルツハイマー病を代表とする神経変性疾病について、小胞体ストレスにより引き起こされる細胞死と関連しているということが報告されていることから、当研究室では、キノコ類からの小胞体ストレス誘導細胞死抑制物質の探索を行った。それにより、ヤマブシタケから活性物質である *dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine* を見出した。そこで、本研究では、ヤマブシタケよりさらなる小胞体ストレス誘導細胞死抑制物質の探索を目的とした。

ヤマブシタケ子実体及びヤマブシタケ廃菌床を研究材料とし、有機溶媒で抽出を行った。活性の確認できた子実体のヘキサン層及びクロロホルム層から 3 種類、同じく活性の確認された廃菌床のヘキサン層及び酢酸エチル層から 7 種類の化合物の単離に成功し、それら化合物の活性について検討した。その結果、8 種類の化合物が、小胞体ストレス誘導の細胞死に対して有意な抑制活性を示した (図 1)。

2. キノコ由来の奇形子実体誘導物質の生物有機化学的研究

キノコは、その成長段階において、環境の変化などが原因で奇形の子実体を形成することがある (図 2)。⁴⁹⁾そのため、本研究では、キノコを奇形に誘導する奇形子実体誘導物質が存在するのではないか、また、そのような物質は、子実体発生の機構解明の鍵となるのではないかと考え、その活性物質の探索を行うこととした。

そこで、人工栽培がされていて、栽培中に奇形になったハタケシメジを提供してもらい、有機溶媒で抽出を行った。また、奇形子実体誘導活性試験方法の確立を並行して行った。その活性試験の方法として、キノコの菌床を用いた栽培実験と、寒天培地で子実体形成のしやすいキノコを用いた寒天培地での栽培実験の 2 種類で行うこととした。現在、奇形子実体誘導物質の探索中である。この奇形子実体誘導物質の単離に成功し、奇形子実体形成のメカニズムが解明すれば、最終的には、キノコの最大の謎であるキノコの菌糸体から子実体へと形態を変化させるメカニズムの解明につながると考えている。

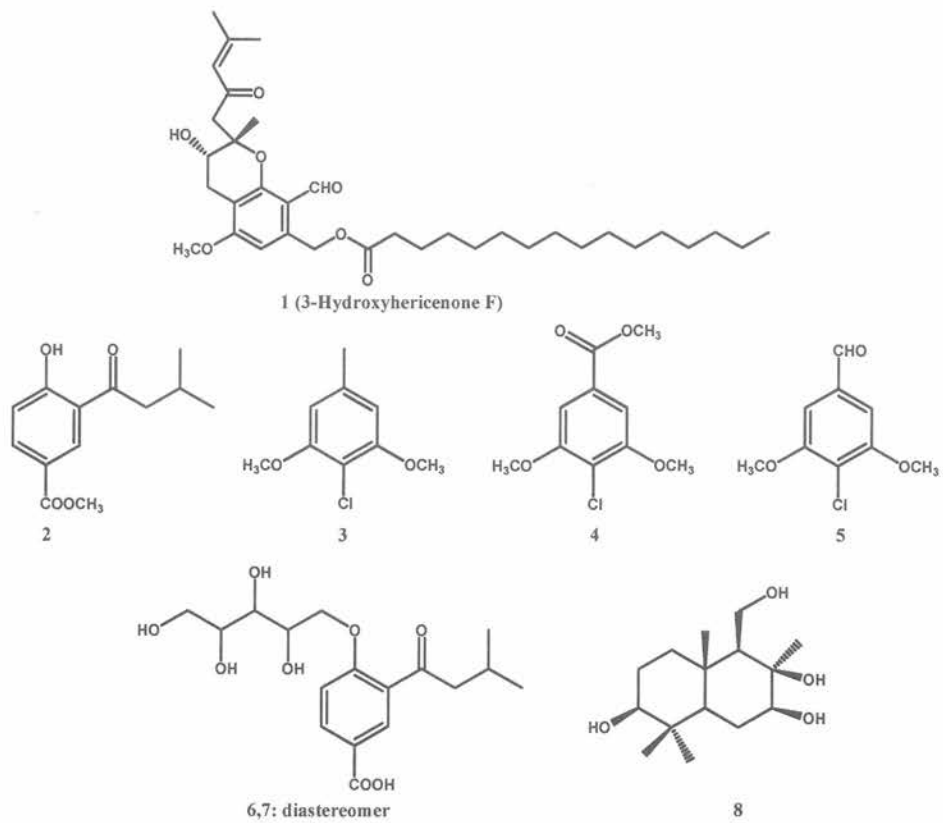


図1 ヤマブシタケ由来の小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性物質

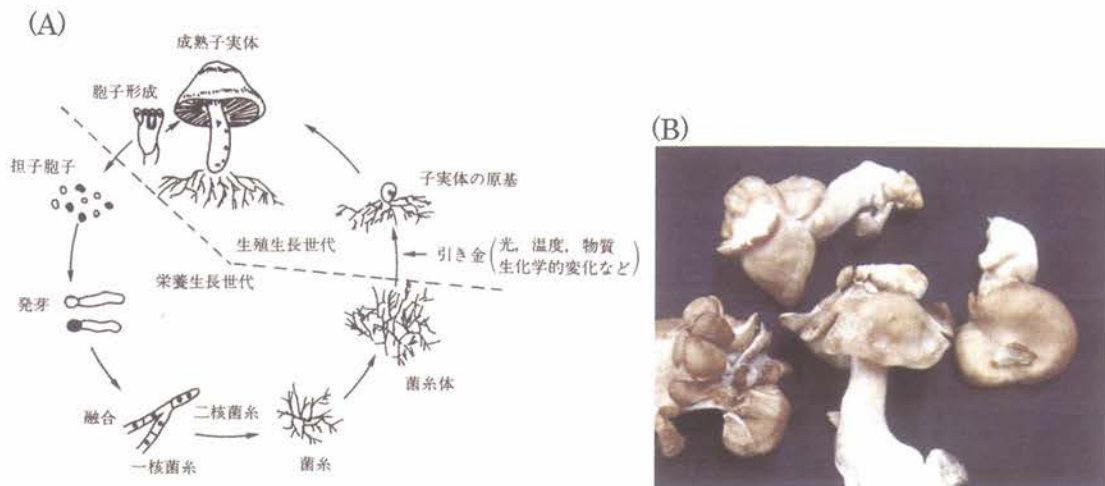


図2 A:キノコの生活環⁴⁹⁾及びB:奇形になったハタケシメジ

Summary

Chapter 1. Bioorganic chemical study on Endoplasmic reticulum (ER) stress dependent cell death suppressive compounds from the mushroom *Hericium erinaceum*.

Endoplasmic reticulum (ER) stress induces an apoptotic pathway in cells with signaling between ER and mitochondria. By triggering apoptosis in neural cells, stress is a major cause of such degenerative disorders as Alzheimer disease. The demand for new protective substances against the ER stress-dependent cell death prompted us to screen the protective activity of mushroom extracts. We have recently found dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine as protective principles from the mushroom, *Hericium erinaceum*. In the course of further extensive screening, we found protective activity in an extract from the fruiting body and the scrap cultivation bed of *H. erinaceum*. The cultivation beds are usually discarded by the mushroom growers after harvesting the fruiting bodies. Another purpose of this study is efficient use of scrap cultivation beds.

Three new compounds, 3-hericenone F (1), hericenone I (2), and hericenone J (3), were isolated from the fruiting body of *H. erinaceum*. Seven (4-10) compounds were isolated from the scrap cultivation beds of *H. erinaceum*. Compounds 4-7 were identified as methyl 4-hydroxy-3-(3-methylbutanoyl) benzoate, 2-chloro-1,3-dimethoxy-5-methylbenzene, methyl 4-chloro-3,5-dimethoxybenzoate, and 4-chloro-3,5-dimethoxybenzaldehyde by the interpretation of the NMR and MS data, respectively. This is the first reported isolation of 4 from a natural source. 3-(3-Methylbutanoyl)-4-((2,3,4,5-tetrahydroxy)oxy)benzoic acid (8, 9) and (1*S**,2*R**,3*S**,6*S**,8*aS**)-1-(hydroxymethyl)-2,5,5,8*a*-tetramethyldecahydronaphthalene-2,3,6-triol (10) were also novel compounds. Compound 8 and 9 are diastereomers each other. Compounds 1 and 4-10 showed protective activity against endoplasmic reticulum stress-dependent cell death.

Chapter 2. Bioorganic chemical study on inducers of forming deformed fruiting bodies of mushrooms from mushroom.

During cultivation of mushrooms, occasionally deformed fruiting bodies appear. I hypothesized the existence of the specific deforming inducer(s) in the abnormal fruiting bodies. In addition, such active compound(s) may be the trigger of the formation of fruiting bodies. Therefore, I searched for the inducer(s) from the deformed fruiting bodies. I used deformed fruiting bodies of *Lyophllum decastes* cultivated artificially. The fruiting bodies were extracted with EtOH and then acetone. The extracts were combined and concentrated. The concentrated extracts were partitioned between hexane and H₂O, and then CH₂Cl₂ and H₂O. Since hexane-soluble fraction caused deforming in the bioassay, it was fractionated by repeated chromatography. As a result, two compounds were purified. At present, I am examining activity of these compounds.

参考文献

1. 小林 徹、人工栽培の現状「東北のキノコ」(日本菌学会東北支部編)、*無明舎出版*, 253-255, (2001)
2. 本郷 次雄・井沢 正名、山溪フィールドブックス⑩ きのこと、*山と溪谷社*, 215 (1994)
3. Kawagishi, H., et al., Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 373-376 (1990)
4. Kawagishi, H. *et al.*, Hericenone C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4561-4564 (1991)
5. Kawagishi, H. *et al.*, Hericenones F, G and H from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Phytochemistry*, **32**, 175-178 (1993)
6. Scherer, W. F., Syverton, J. T. and Gey, G. O., Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, **97**, 695-715 (1953)
7. Salehi, A., Delcroix, J. D. and Swaab, D. F., Alzheimer's disease and NGF signaling. *J. Neural. Transm.*, **111**, 323-345 (2004)
8. Katayama, T. *et al.*, Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat. Cell. Biol.* **1**, 479-85 (1999).
9. Tamatani, M. *et al.*, ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nat. Med.* **7**, 317-323 (2001).
10. Kouroku, Y. *et al.*, Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1505-15 (2002).
11. Lindholm, D., Wootz, H. and Korhonen, L., ER stress and neurodegenerative diseases, *Cell Death & Differentiation*, **13**, 385-392 (2006)
12. Rao, R. V. and Bredesen, D. E., Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 653-662 (2004)
13. Uehara, T., *et al.*, S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration, *Nature*, **441**, 513-517 (2006)
14. Yoshida, H., ER stress and diseases *FEBS J.* **274**, 630-658 (2007).
15. Oyadomari, S. and Mori, M., Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **11**, 381-9 (2004).
16. Meusser, B., *et al.*, ERAD: the long road to destruction, *Nat. Cell Biol.*, **7**, 766-772 (2005)
17. Vembar, S. S. and Brodsky, J. L., One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 944-957 (2008)

18. Loo, T.W. and Clarke, D.M., Chemical and pharmacological chaperones as new therapeutic agents. *Expert Rev Mol Med* **9**, 1-18 (2007).
19. Petot, G.J. and Friedland, R.P., Lipids, diet and Alzheimer's disease: an extended summary. *J. Neurol. Sci.*, **226**, 31-33 (2004)
20. Luchsinger, J.A. and Mayeux, R., Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet. Neurol.* **3**, 579-587 (2004)
21. Nagai, K., *et al*, Dilinoleoyl-phosphatidylethanolamine from *Hericium erinaceum* protects against ER stress-dependent Neuro2a cell death via protein kinase C pathway. *J Nutr Biochem* **17**, 525-30 (2006).
22. Detsi, A., *et al.*, A concise approach to benzoic acid derivatives bearing an α,β -unsaturated ketone substituent: Synthesis of methyl taboganete. *SYNLETT*, **20**, 3131-3135 (2005)
23. Okamoto, K., *et al.*, Antimicrobial chlorinated orcinol derivatives from mycelia of *Hericium erinaceum*. *Phytochemistry*, **34**, 1445-1446 (1993)
24. Qian, F.G., *et al*, Isolation and identification of two new pyrone compounds from the culture of *Hericium erinaceus*. *Xue. Xue. Bao.*, **25**, 522-525 (1990).
25. Kompis, I and Wick, A., The synthesis of 4-halogen-substituted analogs of trimethoprim. *Helvetica. Chimica. Acta.*, **60**, 3025-3034 (1977)
26. Lorenzen, K. and Anke, T., Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. *Current Organic Chemistry*, **2**, 329-364 (1998)
27. Gribble, G. W., The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere.*, **52**, 289-297 (2003)
28. Vilter, H., Peroxidases from Phaeophyceae. III: Catalysis of Halogenation by Peroxidases from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *Botanica Marina*, **26**, 429-436 (1983)
29. Almeida, M. G., *et al.*, Purification and characterisation of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry*, **54**, 5-11 (2000)
30. Almeida, M., *et al.*, Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry*, **57**, 633-642 (2001)
31. van Pee, K. H., G. Sury, and Lingens, F., Purification and properties of a nonheme bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **368**, 1225-32 (1987).
32. Hofrichter, M. and Ullrich, R., Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 276-288 (2006)
33. Ullrich, R., *et al.*, Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe*

- aegerita oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4575-4581 (2004)
34. Ullrich, R. and Hofrichter, M., The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene. *FEBS Lett.*, **579**, 6247-6250 (2005)
 35. 高月 昭・田村 学造、糖蛋白質の糖鎖合成・細胞内転送阻害剤 - 糖蛋白質の生合成と機能解析の有用手段 -、*タンパク質 核酸 酵素*, **30**, 417-440 (1985)
 36. 石垣 診祐、神経変性疾患の発症にかかわる小胞体ストレスのメカニズム、*実験医学*, **27**, 519-525 (2009)
 37. Concannon, C. G., *et al.*, NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal apoptosis in vitro and in vivo occurs in an ER stress and PUMA independent manner. *J. Neurochem.*, **105**, 891-903 (2008)
 38. Sokka, A. L., *et al.*, Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *J. Neurosci.*, **27**, 901-908 (2007)
 39. Rogers, T. B., *et al.*, Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells. *Bioscience Report*, **15**, 341-349 (1995)
 40. Kataoka-Kato, A., *et al.*, Enhanced learning of normal adult rodents by repeated oral administration of soybean transphosphatidylated phosphatidylserine. *J. Pharmacol. Sci.*, **98**, 307-314 (2005)
 41. Huang, K. P. and Huang, F. L., How is protein kinase C activated in CNS. *Neurochem. Int.*, **22**, 417-433 (1993)
 42. Olariu, A., Yamada, K. and Nabeshima, T., Amyloid pathology and protein kinase C (PKC): possible therapeutic effects of PKC activators. *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 1-5 (2005)
 43. Nagai, K. and Ito, Y., Protective Effects of Dilinoleoylphosphatidylethanolamine on Endoplasmic Reticulum Stress Induced Neuronal and Pancreatic β -cell Death. *Soy Protein Research*, **12**, 153-157 (2009)
 44. Morita, M. and Imanaka, T., Very long chain fatty acid metabolism and diseases. *Seikagaku*, **80**, 434-439 (2008)
 45. Pineau, L. and Ferreira, T., Lipid-induced ER stress in yeast and beta cells: parallel trails to a common fate. *FEMS Yeast Res.*, **10**, 1035-1045 (2010)
 46. Cunha, D. A., *et al.*, Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J. Cell Sci.*, **121**, 2308-2318 (2008)
 47. Gwiazda, K. S., *et al.*, Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, 690-701 (2009)
 48. Liu, Y., *et al.*, Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.* **69**, 581-93 (1997).

49. 寺下 隆夫、注目のバイオテクノロジー [改定] きのこの生化学と利用、*応用技術出版*, 4 (1988)
50. 木村 栄一、図説基礎からのエリンギ栽培—安定生産技術へのアプローチ、*(株)プランツワールド*, 226-231 (1999)
51. Ohta, C., *et al.*, Detection of double stranded RNA elements in cultivated *Lentinula edodes*. *Japanese Society of Mushroom Science and Biotechnology*, **16**, 155-158 (2008)
52. Magae, Y., *et al.*, Fruiting Body Formation from Regenerated Mycelium of *Pleurotus ostreatus* Protoplasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 441-442 (1985)
53. Magae, Y., *et al.*, 3-O-alkyl-D-glucose derivatives induce fruit bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Mycol. Res.*, **109**, 374-376 (2005)
54. Magae, Y. and Ohara, S., Structure-activity relationship of triterpenoid saponins on fruiting body induction in *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. biochem.*, **70**, 1979-1982 (2006)
55. Magae, Y., Nishimura, T. and Ohara, S., An active compound for fruiting body induction. *Curr. Chem. Biol.*, **3**, 231-237 (2009)
56. Jones, E. R. T., Lowe, G. and Shannon, P. V. R., Natural acetylenes. Part XX. Tetra-acetylenic and other metabolites from *Fistulina hepatica* (Huds) Fr. *J. Chem. Soc. (C) Org.*, 139-144 (1966)
57. Bu' Lock, J. D. and Smith, G. N., The origin of naturally-occurring acetylenes. *J. Chem. Soc. (C) Org.*, 332-336 (1967)
58. Barley, C. G., *et al.*, Natural acetylenes. Part 61. Fungal polyacetylenes and the crepenynate pathway: the biosynthesis of some C₉-C₁₄ polyacetylenes in fungal cultures. *J. Chem. Research (S)*, 232-233 (1987)
59. Lu, G. and Wu, L., Studies on the chemical constituents of *Tricholoma Saponaceum*. *Modern Chinese Medicine*, **11**, 21-22 (2009)
60. Kimura, Y., *et al.*, Isolation and identification of two nematocidal substances from roots of *Erigeron philadelphicus* L. and nematocidal activities of their related compounds. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2915-2917 (1981)
61. Uesugi, K., Iwahori, H. and Tateishi, Y., Reproduction of *Pratylenchus coffeae* on sweet potato cultivars. *Jpn. J. Nematology*, **38**, 35-40 (2008)

謝辞

本研究の指導教官である、静岡大学創造科学技術大学院自然科学教育部バイオサイエンス専攻教授 河岸洋和 先生には、本研究の実施の機会を与えて下さり、その遂行にあたって終始、ご指導して下さいましたことをここに深謝の意を表します。九州大学農学研究院環境農学部門教授 近藤隆一郎 先生、並びに、静岡大学農学部応用生物化学科教授 衛藤英男 先生、同学科准教授 平井浩文 先生には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いたことを、ここに深謝の意を表します。

本研究の第1部において、山梨大学大学院医学工学総合研究部准教授 長井薫 先生には、小胞体ストレス誘導細胞死抑制活性試験を行って戴くとともに、小胞体ストレスについての資料の提供、並びに、有益なご助言を戴いたことを、ここに深謝の意を表します。静岡大学農学部応用生物化学科助教 小谷真也 先生には、研究のご助言を戴くとともに、学術論文の書き方を丁寧に教えて戴いたことを、ここに深謝の意を表します。本研究の研究材料であるキノコをご提供戴いた久保産業有限会社専務取締役 久保昌一氏、並びに、長野県林業総合センター主任研究員 増野和彦氏、独立行政法人森林総合研究所研究室長 関谷敦 博士に、深謝の意を表します。

修士課程時代から研究のご指導及びご助言戴いた、元静岡大学農学部応用生物化学科教授 現副学長 碓氷泰市 先生、並びに、静岡大学農学部応用生物化学科准教授 村田健臣 先生をはじめとする同学科の諸先生方に、深謝の意を表します。本研究室である生物化学研究室の鈴木智大 博士、崔宰熏 博士、尾形慎 博士、Aditya Kulkarni 博士、服部武史 氏をはじめとする諸先輩方、並びに、同期、後輩たちには、この5年間本当にお世話になりました。ここに、皆様に、深謝の意を表します。

本研究室を紹介して下さいました玉川大学学術研究所菌学応用研究センターの石崎孝之 博士、並びに、卒業研究をさせて戴いた、当時の財団法人日本きのこ研究所の皆様、この場を借りて、厚く御礼申し上げます。もし、この研究所で研究をしていなかったら、今の私はいなかったはずです。

最後に、金銭面だけでなく精神面においても支えてくれた家族には、どれだけ感謝してもし尽くせません。本当にありがとうございました。