

キノコに由来する機能性物質に関する化学的研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2017-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 邱, 偉涛 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00010203

静岡大学博士論文

キノコに由来する機能性物質に
関する化学的研究

邱 偉涛

大学院自然科学系教育部

バイオサイエンス専攻

2016年12月

**Chemical studies on functional compounds from
mushrooms**

Weitao Qiu
Department of Bioscience
Graduate School of Science and Technology
Shizuoka University

目次

第 1 部 キシメジ (<i>Tricholoma flavovirens</i>) 由来の植物成長調節化合物の探索	
第 1 章 緒論	2
第 2 章 本論	4
第 1 節 キシメジ子実体粗抽出液由来の化合物の単離・精製	4
第 2 節 キシメジ子実体粗抽出液由来の化合物の構造決定および同定	7
2-2-1 化合物 1 の構造解析	7
2-2-2 化合物 2 の構造解析	19
2-2-3 化合物 3 の構造解析	24
2-2-4 化合物 4 の構造解析	36
第 3 節 植物成長調節活性	42
第 4 節 化合物 1-4 の考察	44
第 3 章 実験部	46
第 1 節 器具類	46
3-1-1 機器類	46
3-1-2 材料	47
第 2 節 キシメジ子実体粗抽出液由来の化合物の単離・精製	48
3-2-1 キシメジ子実体の抽出	48
3-2-2 キシメジ <i>n</i> -hexane 可溶部由来の化合物の単離・精製	48
3-2-3 キシメジ EtOAc 可溶部由来の化合物の単離・精製	48
第 3 節 植物成長調節活性試験	50
3-3-1 レタスに対する植物成長調節活性試験	50
論文要旨	51
Summary	52
参考文献	53
第 2 部 冬虫夏草 (<i>Cordyceps militaris</i>) 由来の機能性化合物の探索	
第 1 章 緒論	55
第 2 章 本論	58
第 1 節 冬虫夏草抽出物由来の化合物の単離・精製	58
2-1-1 冬虫夏草キノコ部粗抽出物由来の化合物の単離・精製	58
2-1-2 冬虫夏草カイコ部粗抽出物由来の化合物の単離・精製	61
第 2 節 冬虫夏草抽出物由来の化合物の同定	64

2-2-1	化合物 1 の構造解析	64
2-2-2	化合物 2 の構造解析	72
2-2-3	化合物 3 の構造解析	77
2-2-4	化合物 4 の構造解析	83
第 3 節	癌細胞に対する細胞毒性活性	88
第 4 節	植物成長調節活性	90
第 5 節	化合物 1-4 の考察	92
第 3 章	実験部	94
第 1 節	器具類	94
3-1-1	機器類	94
3-1-2	材料	95
第 2 節	冬虫夏草抽出物由来の化合物の単離・精製	96
3-2-1	冬虫夏草キノコ部の抽出	96
3-2-2	冬虫夏草キノコ部の <i>n</i> -hexane 可溶部由来の化合物の単離・精製	96
3-2-3	冬虫夏草キノコ部の EtOAc 可溶部由来の化合物の単離・精製	97
3-2-4	冬虫夏草カイコ部の抽出	97
3-2-5	冬虫夏草キノコ部の EtOAc 可溶部由来の化合物の単離・精製	97
第 3 節	活性試験	95
3-3-1	癌細胞に対する細胞毒性活性試験	99
3-3-2	レタスに対する植物成長調節活性試験	99
第 4 節	化合物 1 のメタノリシス	100
論文要旨		101
Summary		103
参考文献		105
謝辞		113

第 1 部

キシメジ (*Tricholoma flavovirens*) 由来の植物 成長調節化合物の探索



第 1 章 緒論

キノコは真菌の一種類であり、植物に寄生あるいは枯死した植物に腐生する事から、キノコと植物の関係は深いことと知られている。

自然界において、「フェアリーリング」という芝生にキノコの子実体がリング状に発生し、芝草がリング状に濃緑色を呈して繁茂した後に枯死する現象や、「ナラタケ病」というナラタケ属のキノコが活着している植物に寄生し、植物の成長を病害する現象などから、キノコが植物成長調節物質を産生することが示唆されている。近年、キノコ由来の植物成長調節化合物が多数発見されている。¹⁻⁶⁾ この様な植物成長調節化合物の発見やその作用機序の化学的解明は農業面の応用に対して非常に重要である。

本研究室では、植物成長調節化合物としてフミツキタケ (*Agocybe praecox*) の培養濾液から *agocybyne* 類、ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) の培養濾液から *erinaceolactone* 類、ナラタケ (*Armillaria* spp.) の培養濾液から *armillariol* 類および *melleolide* 類が単離されている (Fig. 1)。³⁻⁶⁾

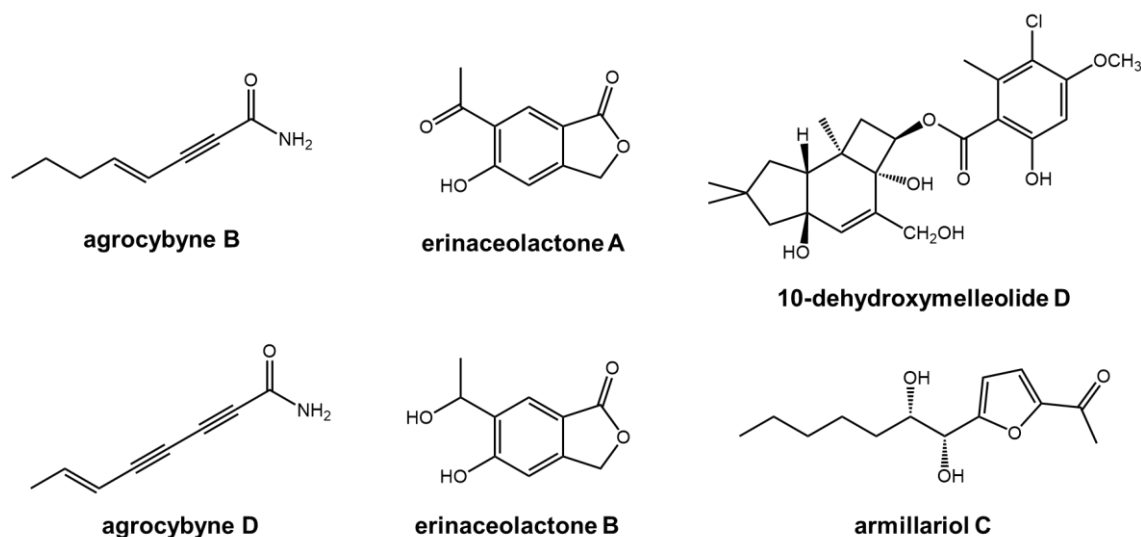


Fig. 1. Plant grow regulators from mushrooms

本研究において、材料として用いたキシメジ (*Tricholoma flavovirens*) はキシメジ科キシメジ属のキノコである (Fig. 2)。秋季にマツなどの針葉樹林やコナラ、ミズナラなどのナラ類の広葉樹林内地上に発生し、北半球一帯に広く分布している。古くから可食性のキノコとして利用されてきたが、化学的研究はほとんど報告されていなかった。



Fig. 2. *Tricholoma flavovirens*⁷⁾

我々は以前の研究で、このキノコから植物成長調節化合物である 4-ethoxymethyl-2-methylindole および 4-methoxymethyl-2-methylindole の単離に成功した (Fig. 3)。⁸⁾ このため、キシメジ子実体に由来する植物成長調節活性化合物の更なる探索を目的とした。

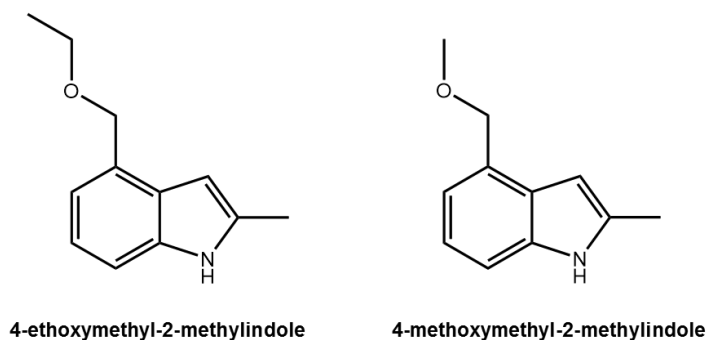


Fig. 3. Plant growth regulators isolated from *Tricholoma flavovirens*

第 2 章 本論

第 1 節 キシメジ子実体粗抽物由来の化合物の単離・精製

キシメジ子実体を EtOH、acetone によって順次抽出を行った。抽出液を減圧濃縮後、分液ロートを用いて液-液分配することにより、*n*-hexane 可溶部、EtOAc 可溶部、*n*-BuOH 可溶部に分画した (Fig. 4)。そのうち、得られた各可溶部から化合物の単離を試みるために、*n*-hexane 可溶部および EtOAc 可溶部の分画を行った。

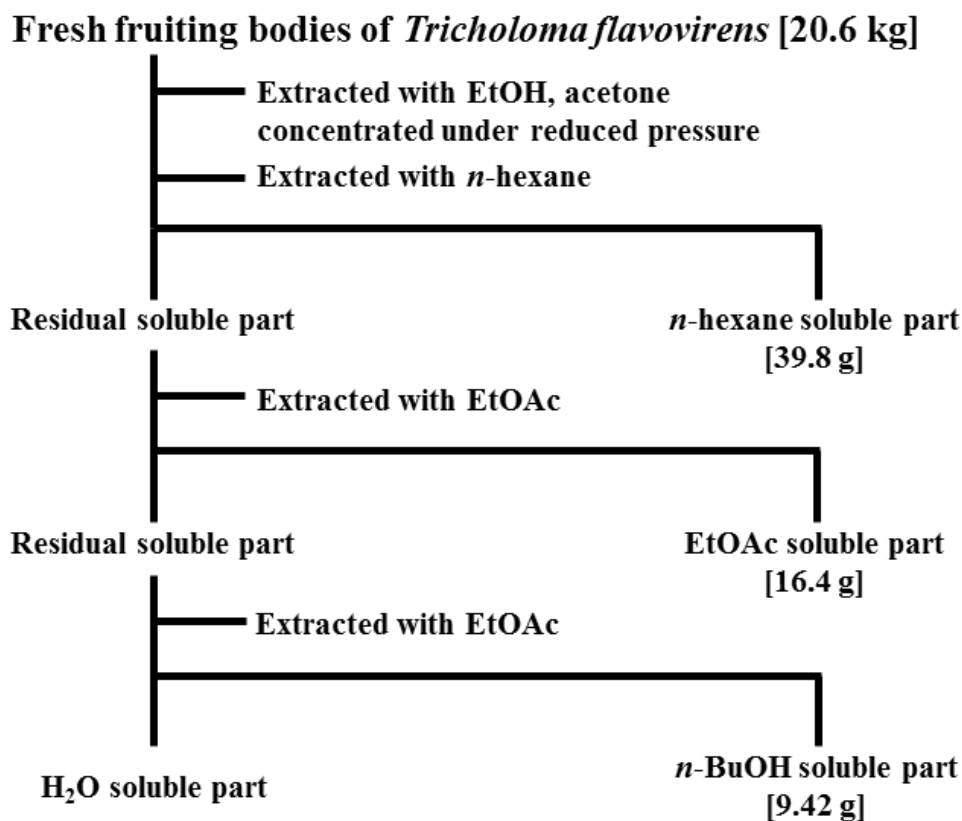


Fig. 4. Extraction of the fruiting bodies of *Tricholoma flavovirens*

n-hexane 可溶部をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーに供し、20 のフラクションに分画した (Fig. 5)。得られたフラクション 7 を

シリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーで分画し、14 のフラクションを得た。得られたフラクション 7-4 を 各種クロマトグラフィーに供したところ、化合物 **1** の単離に成功した。また、フラクション 7-3 を 各種クロマトグラフィーに供したところ、化合物 **2** の単離に成功した (Fig. 5)。

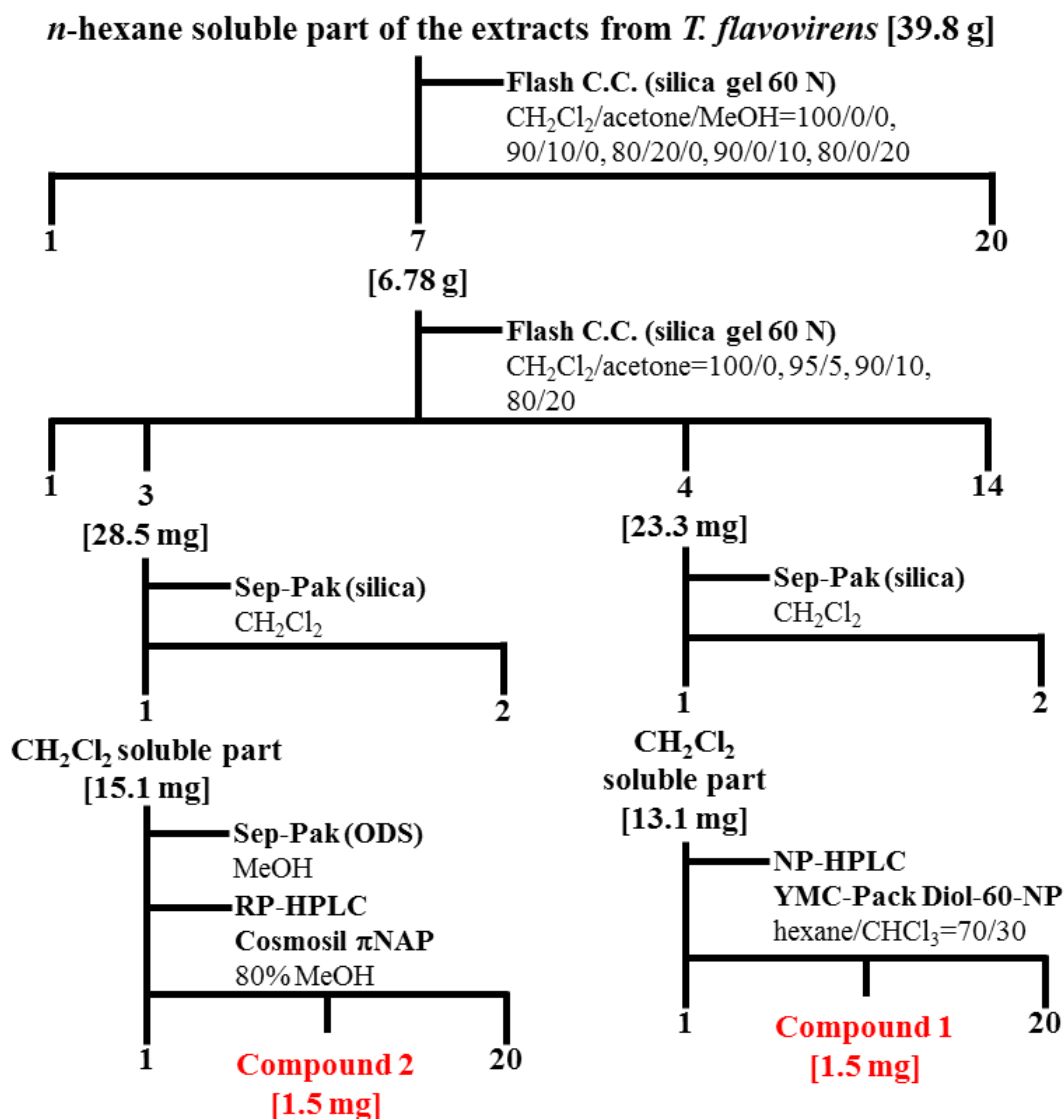


Fig. 5. Purification of compounds 1 and 2 from *n*-hexane soluble part

EtOAc 可溶部をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーに供し、17 のフラクションに分画した (Fig. 6)。得られたフラクション 8 を

Sep-pak で分画し、二つのフラクションを得た (8-1~8-2)。フラクション 8-1 をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーで分画し、8 のフラクションを得た (8-1-1~8-1-8)。得られたフラクション 8-1-5 を 各種クロマトグラフィーに供したところ、化合物 **3** の単離に成功した。また、フラクション 10 をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーで分画し、11 のフラクションを得た (10-1~10-11)。得られたフラクション 10-4, 10-5 および 10-6 をまとめ、各種クロマトグラフィーに供したところ、化合物 **4** の単離に成功した (Fig. 6)。

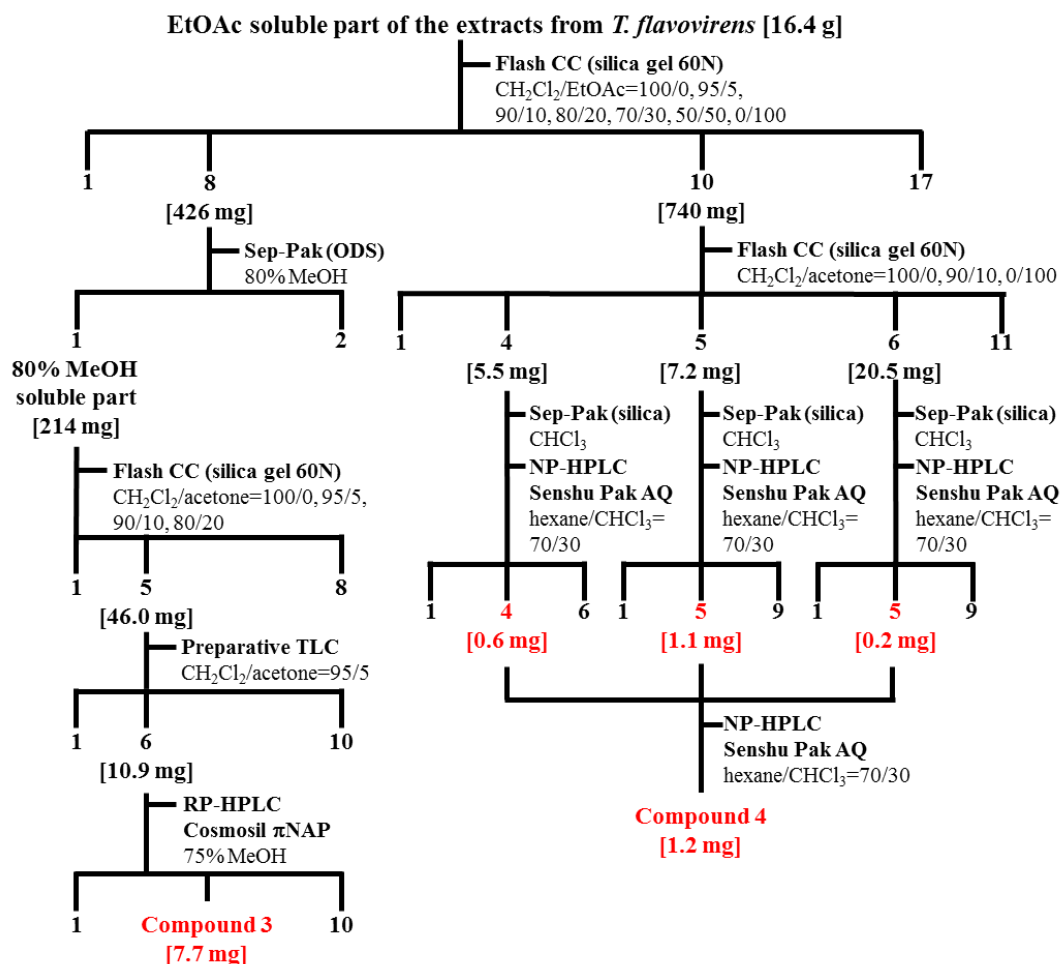


Fig. 6. Purification of compounds 3 and 4 from EtOAc soluble part

第 2 節 キシメジ子実体抽出物由来の化合物の構造決定および同定

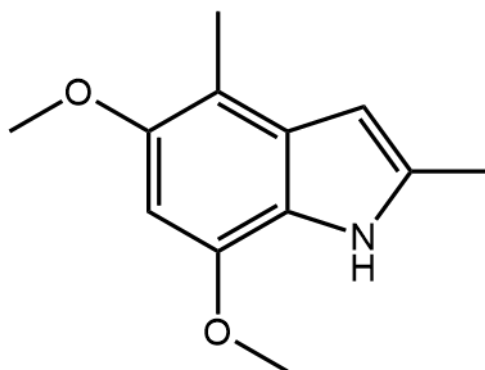
2-2-1 化合物 1 の構造解析

化合物 1 は白色の非晶質として単離された。

ESI-TOF-MS において m/z 206 に $[M+H]^+$ の分子イオンピークを示した (Fig. 7)。また、HR-ESI-TOF-MS において m/z 206.1165 (Δ -1.6 mmu) に $[M+H]^+$ の分子イオンピークが確認され、分子式 $C_{12}H_{15}NO_2$ と決定した。このことから、分子量が 205、不飽和度が 6 であることが示唆された。IR スペクトルにおいて 3362 cm^{-1} の吸収が確認されたことより、N-H の存在が示唆された (Fig. 8)。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル、DEPT スペクトルおよび HMQC スペクトルにより、化合物 1 はメチル基が 4 個 [δ_{H} 2.31 (s), 2.41 (s), 3.83 (s), 3.91 (s); δ_{C} 11.4, 13.7, 58.6, 55.5]、メチレン基が 2 個 [δ_{H} 6.14 (br. s), 6.36 (s); δ_{C} 99.4, 92.3]、四級炭素が 6 個 [δ_{C} 109.2, 121.7, 130.6, 135.0, 143.5, 151.1] 有すると決定した (Fig. 9-12; Table 1)。

COSY スペクトルにおいてメチルプロトン [δ_{H} 2.41 (s)] とメチンプロトン [δ_{H} 6.14 (br. s)] の間の相関が見られた (Fig. 13; Table 1)。また、HMBC スペクトルにおいて、メチンプロトン [δ_{H} 2.41 (s)] と炭素 [δ_{C} 135.0, 99.4] の間の相関、メチンプロトン [δ_{H} 2.31 (s)] と炭素 [δ_{C} 130.6, 109.2, 151.1] の間の相関およびメチレンプロトン [δ_{H} 6.36 (s)] と炭素 [δ_{C} 109.2, 151.1, 143.5, 121.7] の間の相関により、2,4-dimethylindole の部分構造が示唆された (Fig. 14; Table 1)。一方、メチンプロトン [δ_{H} 3.83 (s)] と炭素 [δ_{C} 151.1] の間の相関およびメチンプロトン [δ_{H} 3.91 (s)] と炭素 [δ_{C} 143.5] の間の相関は二つのメトキシ基が 2,4-dimethylindole の 5 位と 7 位にそれぞれ繋がることを示唆された (Fig. 15; Table 1)。



5,7-dimethoxy-2,4-dimethylindole

以上のことにより、化合物 **1** の構造を決定した。化合物 **1** は 5,7-methoxy-2,4-dimethylindole であり、新規化合物であった。

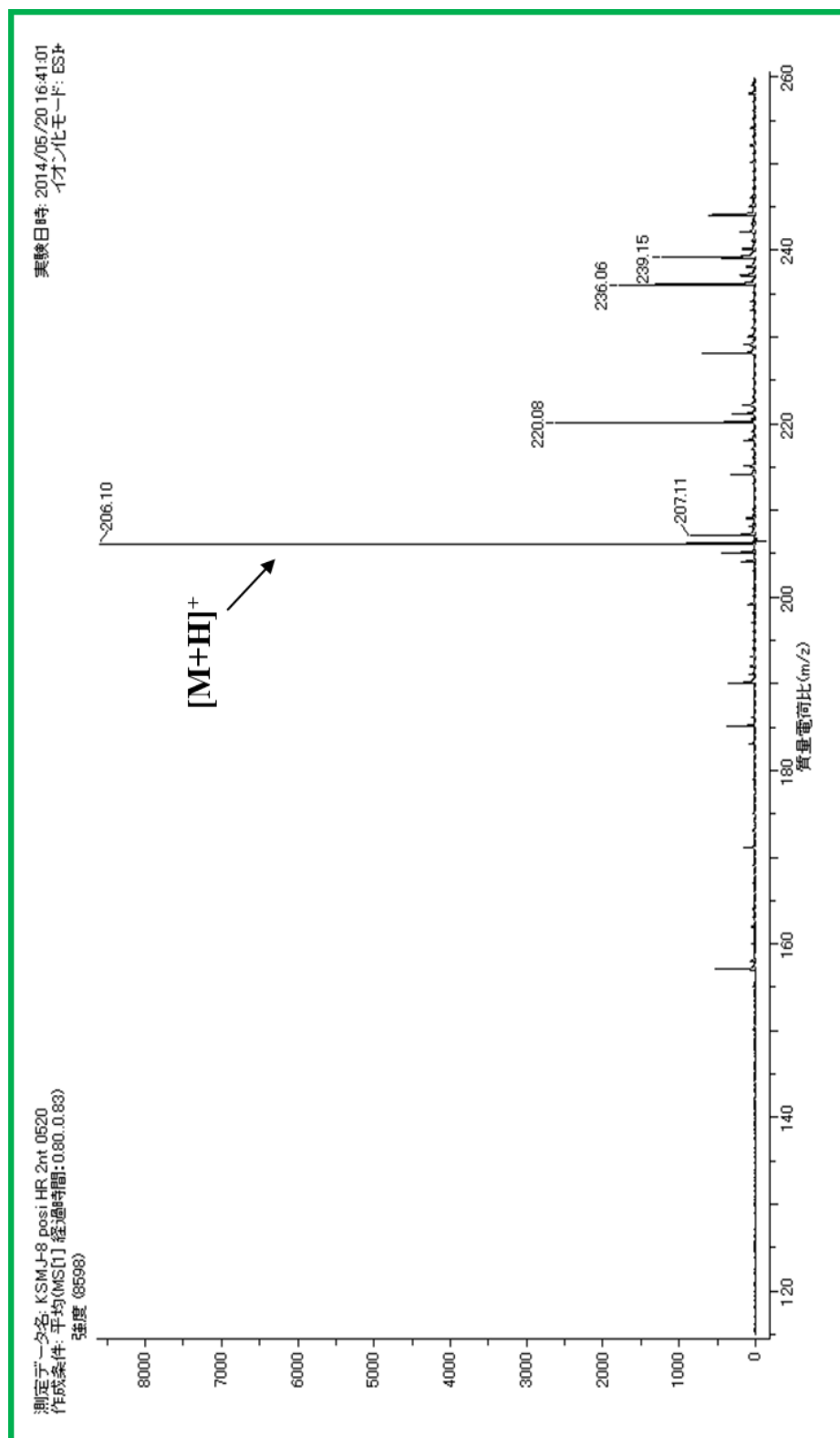


Fig. 7. ESI-TOF-MS (positive) spectrum of compound 1

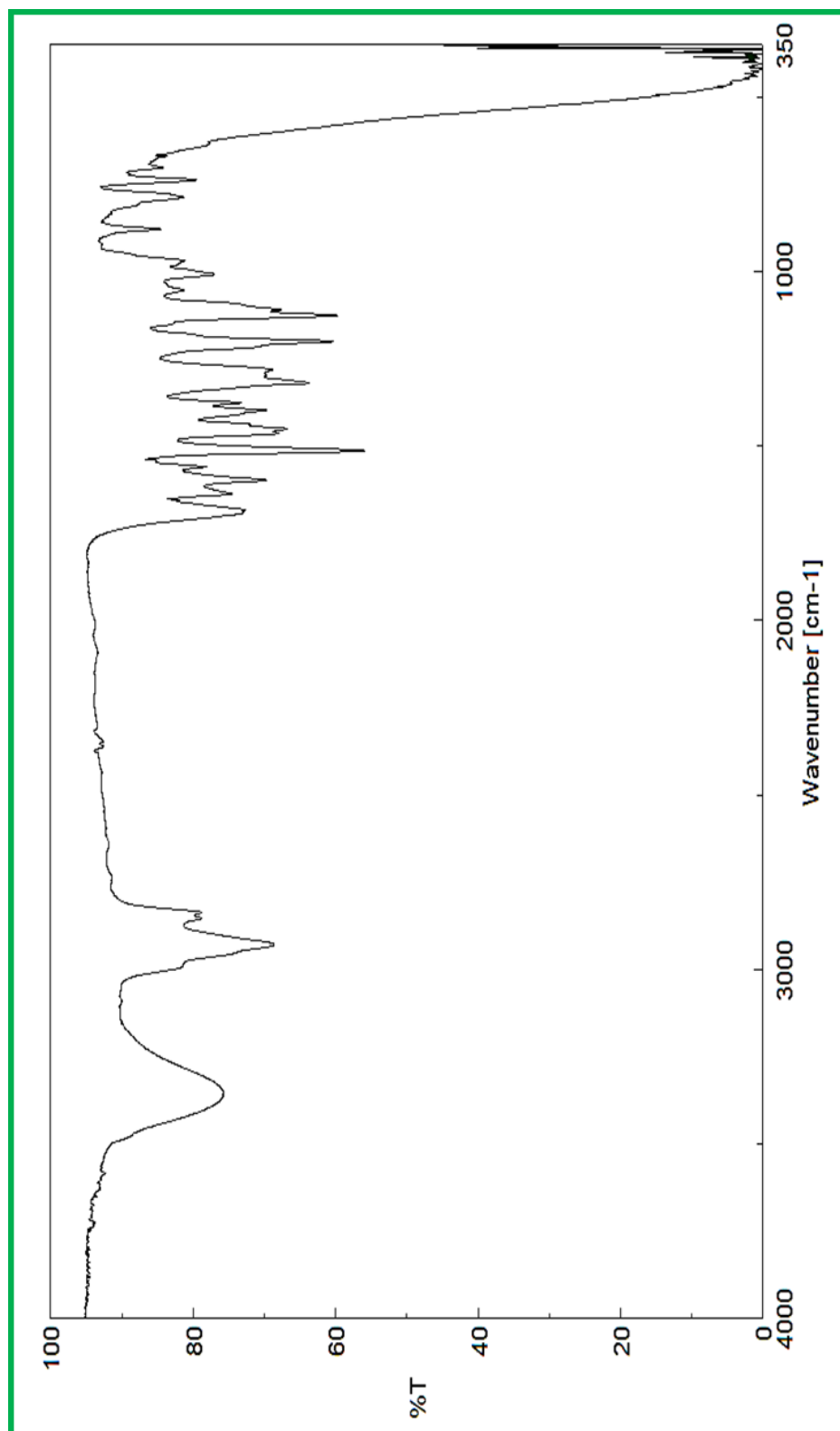


Fig. 8. IR spectrum of compound 1

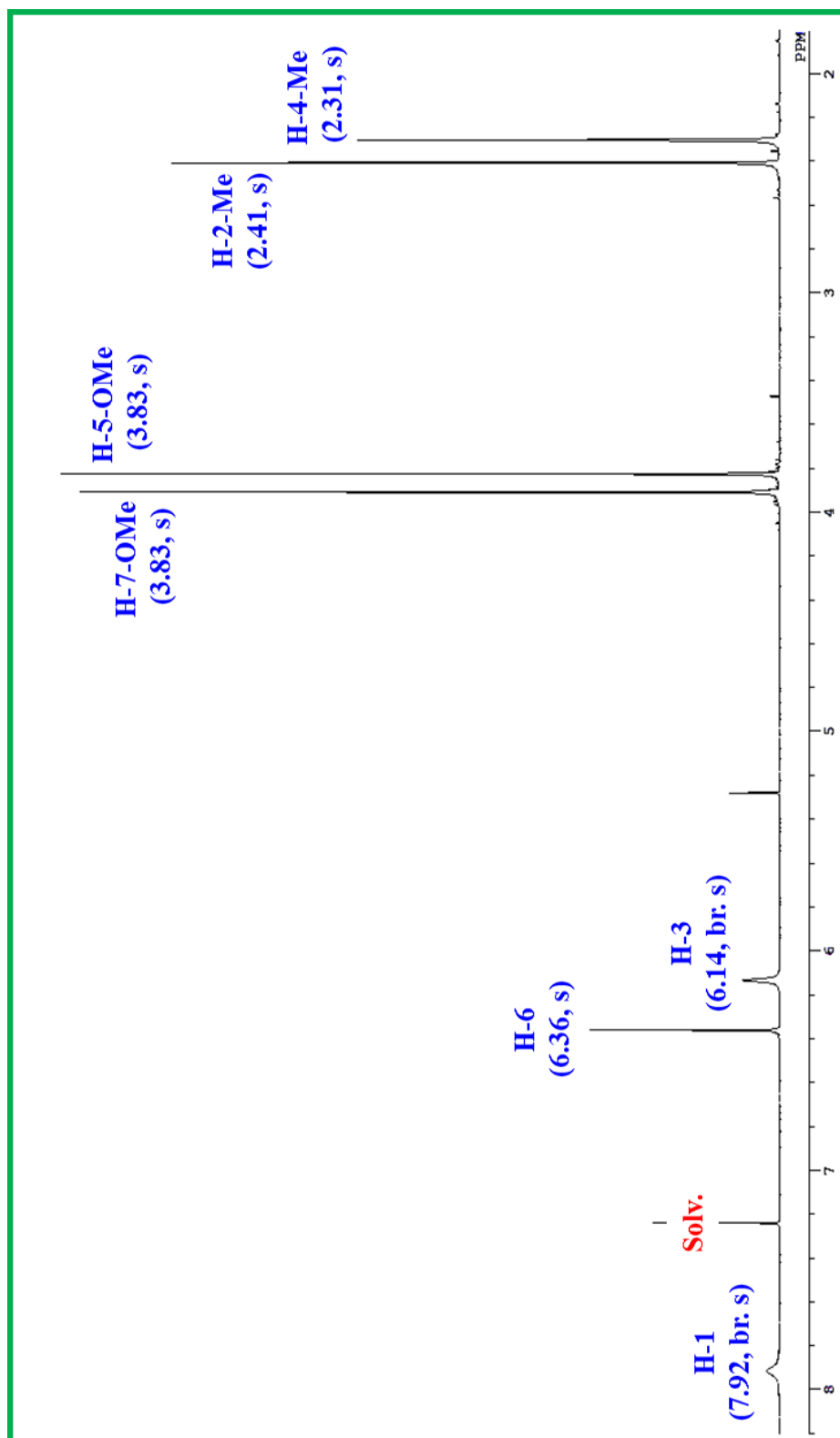


Fig. 9. ¹H-NMR spectrum of compound 1 (in CDCl₃)

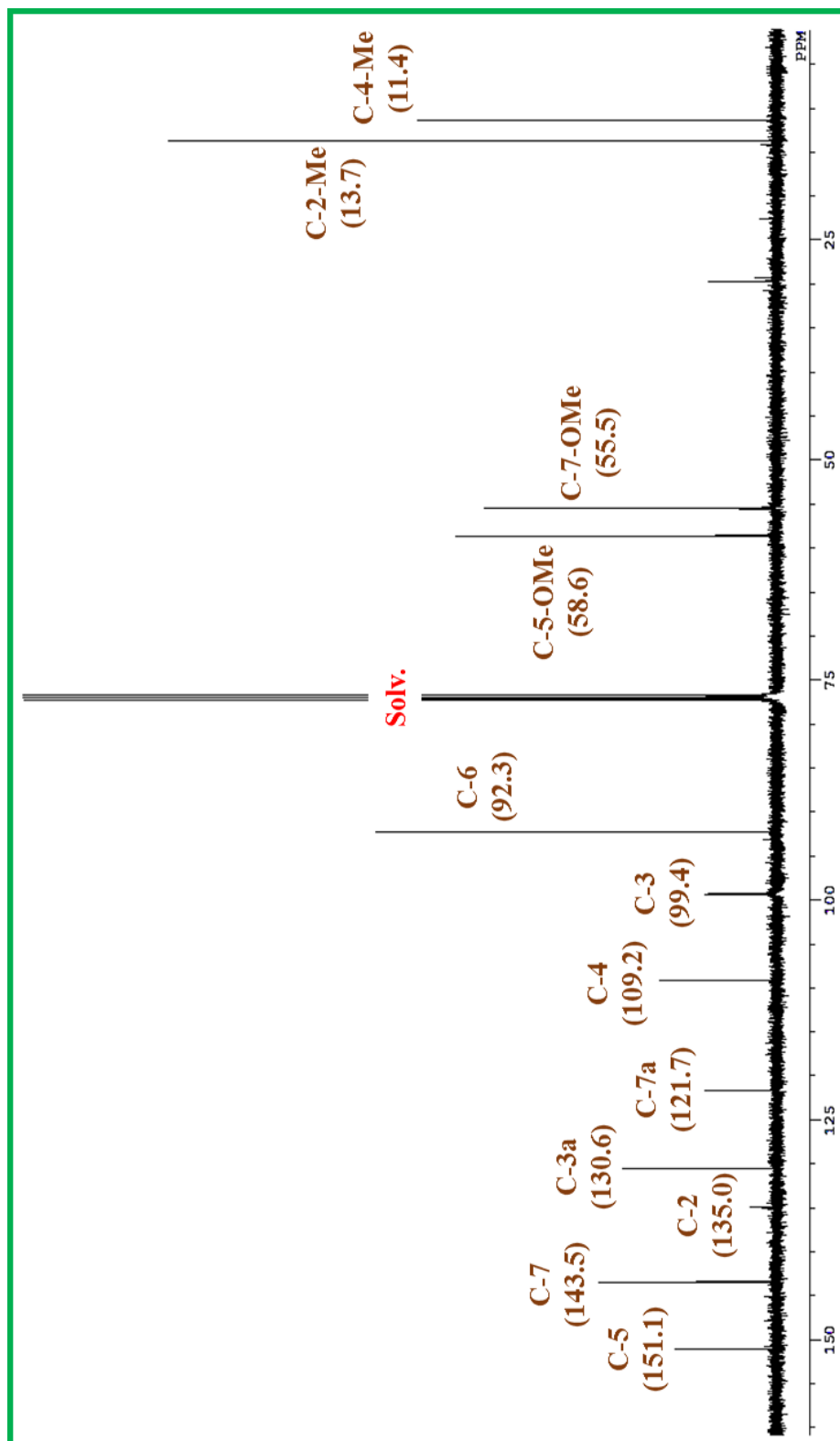


Fig. 10. ¹³C-NMR spectrum of compound 1 (in CDCl₃)

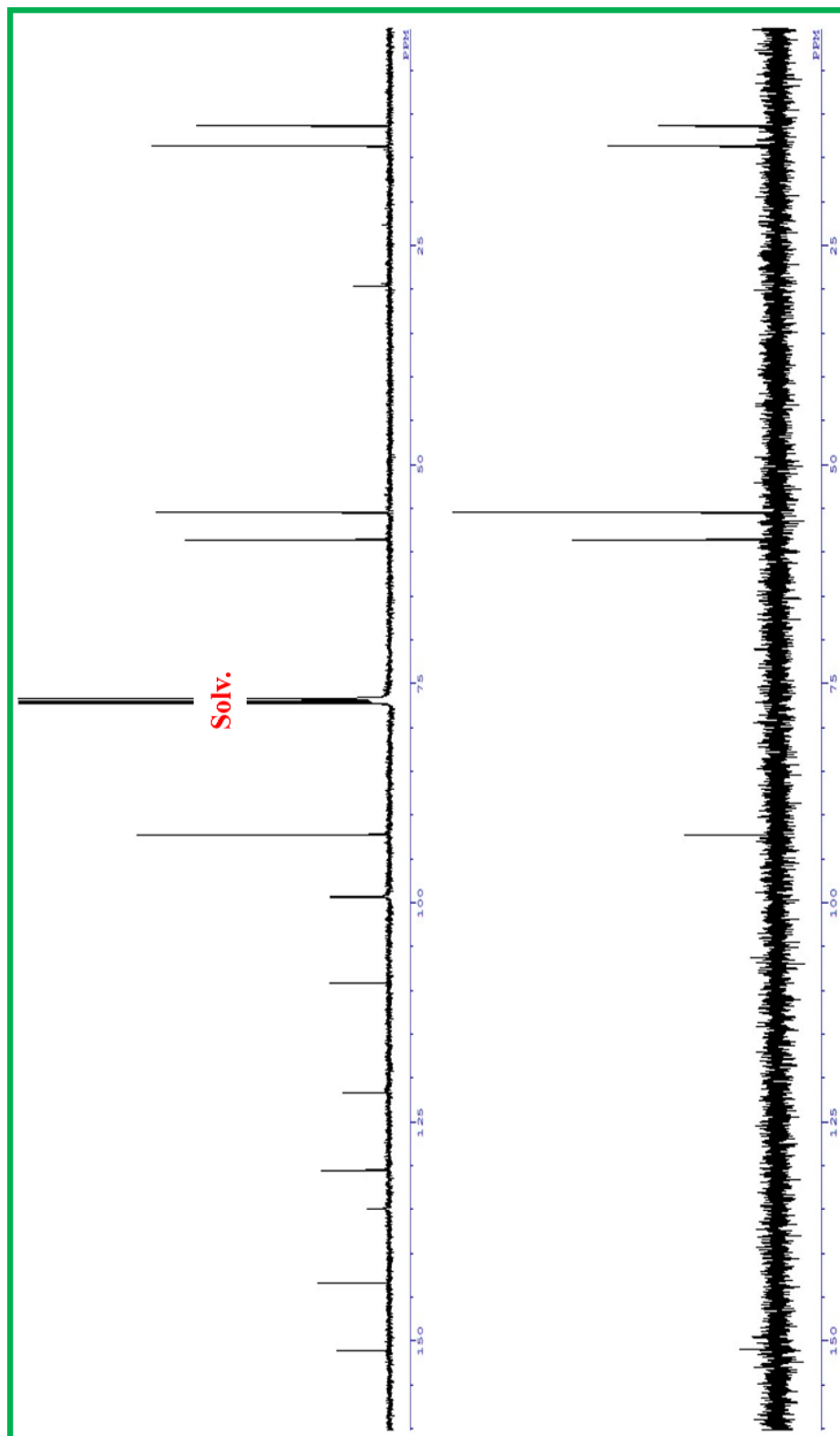


Fig. 11. ¹³C-NMR and DEPT spectra of compound 1 (in CDCl₃)

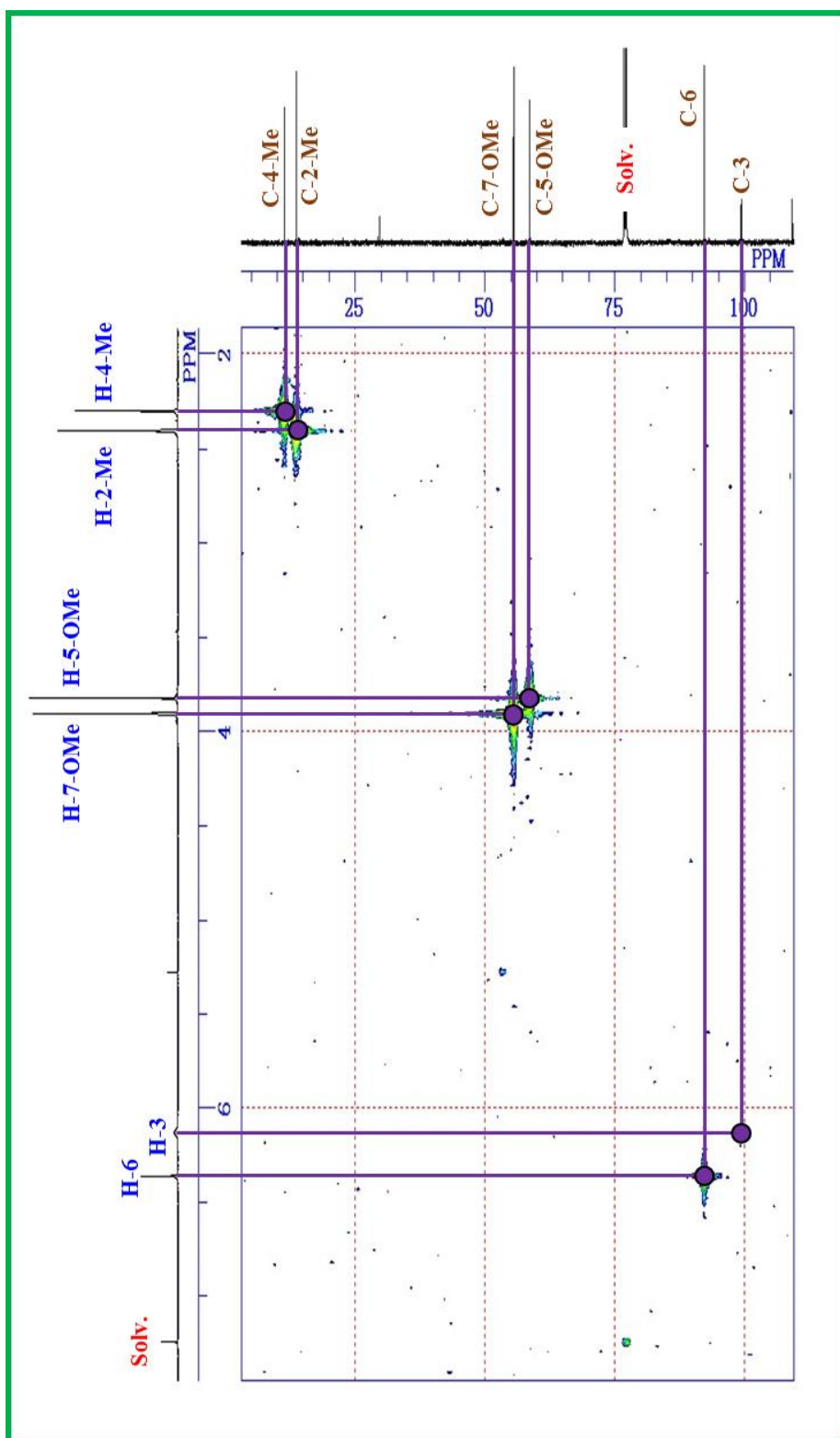


Fig. 12. HMQC spectrum of compound 1 (in CDCl₃)

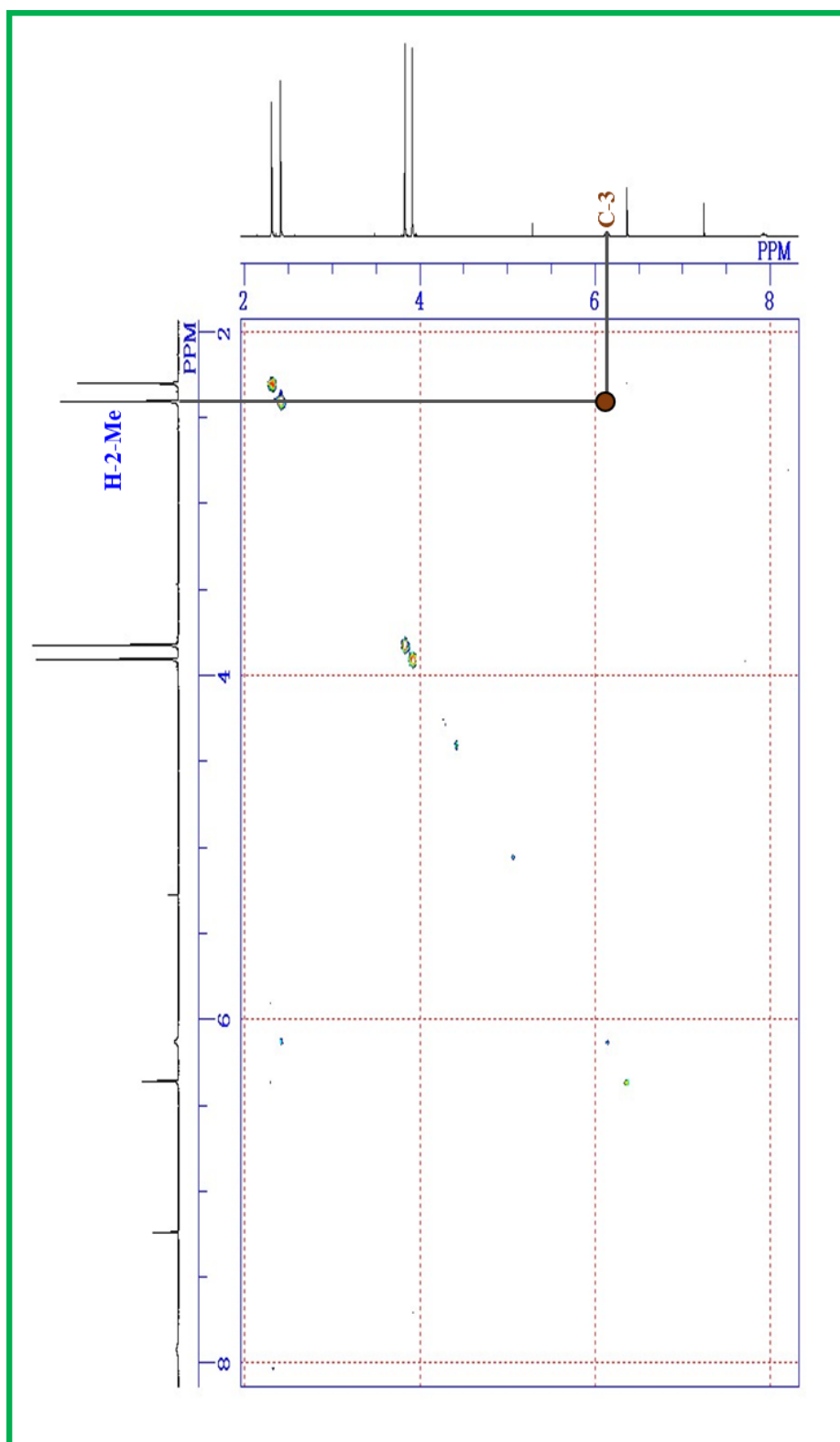


Fig. 13. COSY spectrum of compound 1 (in CDCl₃)

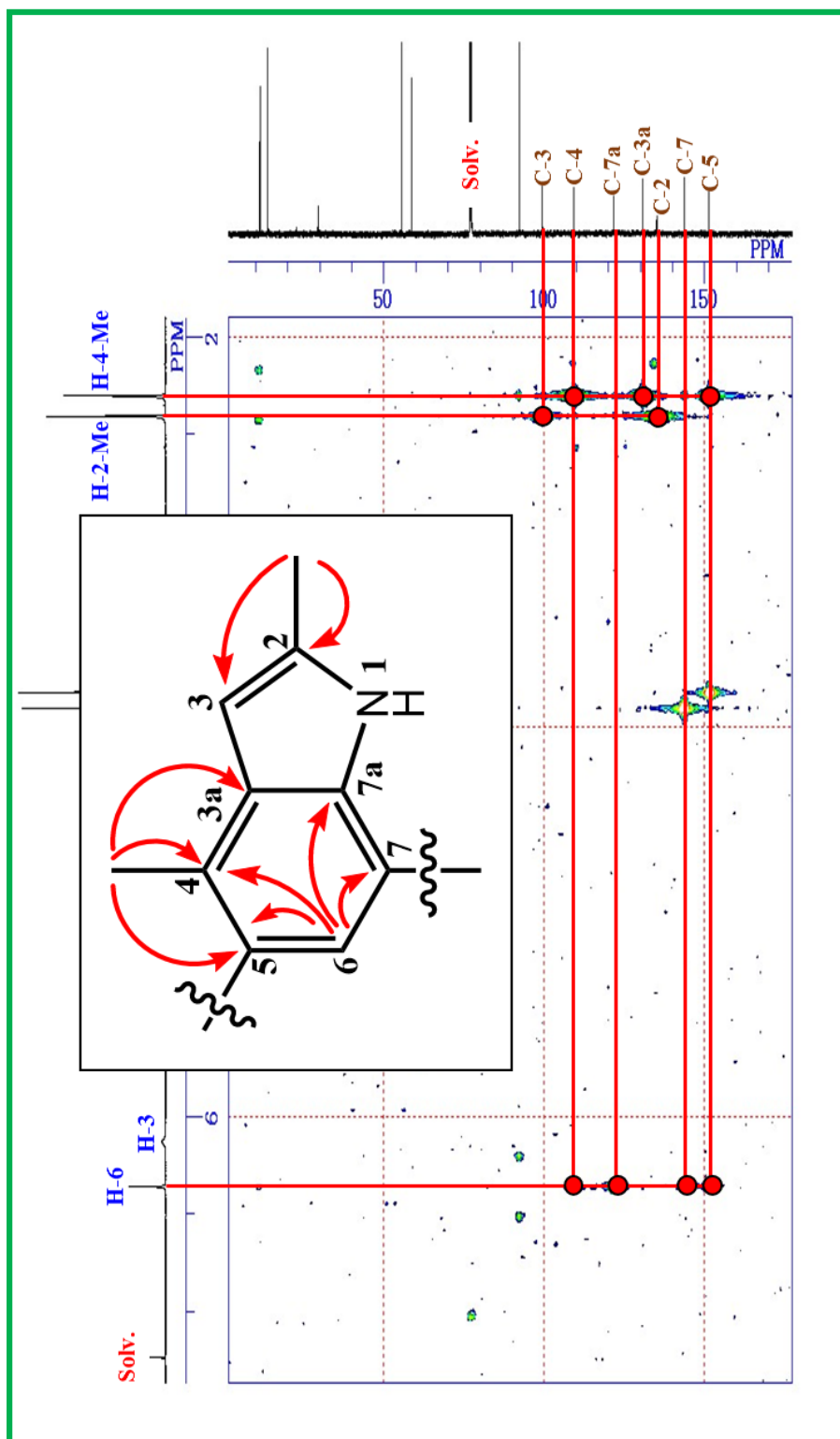


Fig. 14. HMBC spectrum and correlations of the 2,4-dimethylindole moiety in compound 1 (in CDCl₃)

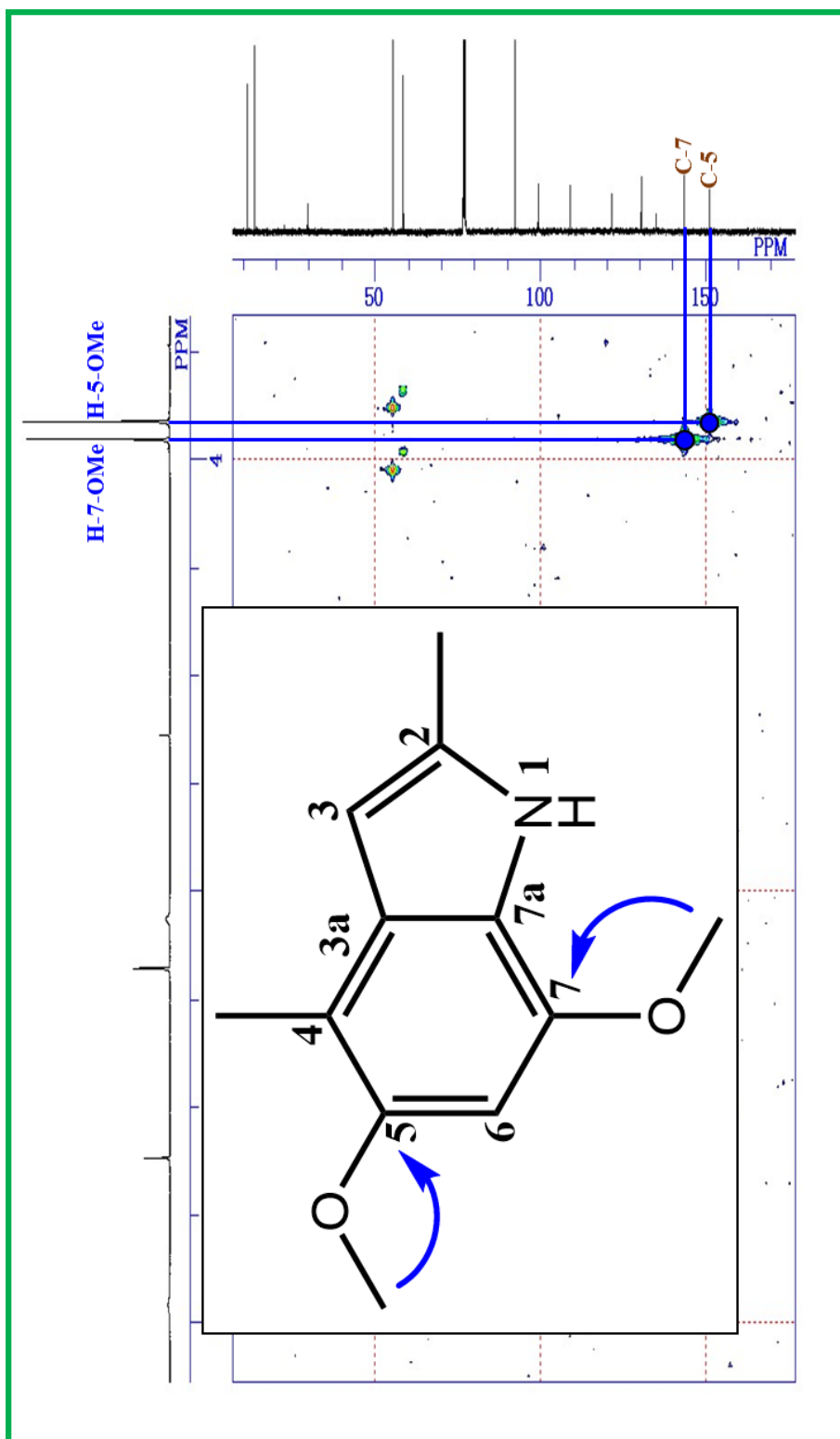
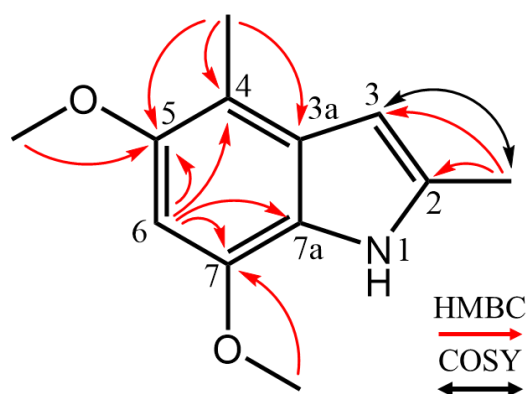


Fig. 15. HMBC spectrum and correlations of the 5-methoxy and 7-methoxy moieties in compound 1 (in CDCl₃)

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data for **1** (in CDCl_3)

Position	^1H δ (multiplicity, J in Hz)	^{13}C δ	COSY	HMBC
1	7.92 (br. s)			
2		135.0		
3	6.14 (br. s)	99.4	2-Me	
3a		130.6		
4		109.2		
5		151.1		
6	6.36 (s)	92.3		4, 5, 7, 7a
7		143.5		
7a		121.7		
2-Me	2.41 (s)	13.7	3	2, 3
4-Me	2.31 (s)	11.4		3a, 4, 5
5-OMe	3.83 (s)	58.6		5
7-OMe	3.91 (s)	55.5		7

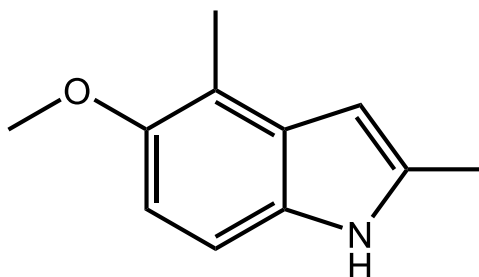


2-2-2 化合物 2 の構造解析

化合物 2 は白色の非晶質として単離された。

化合物 2 は ESI-TOF-MS において m/z 174 に $[M-H]^-$ の分子イオンピークを示した。HR-ESI-TOF-MS において m/z 174.0910 (Δ -0.9 mmu) に $[M-H]^-$ の分子イオンピークが確認され、分子式 $C_{11}H_{13}NO$ と決定した。このことから、分子量が 175、不飽和度が 6 であることが示唆された。IR スペクトルにおいて 3393 cm^{-1} の吸収が確認されたことより、N-H の存在が示唆された (Fig. 16)。

$^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルなどの各種スペクトルから、化合物 2 を 5-methoxy-2,4-dimethylindole と同定した (Fig. 17, 18; Table 2)。



5-methoxy-2,4-dimethylindole

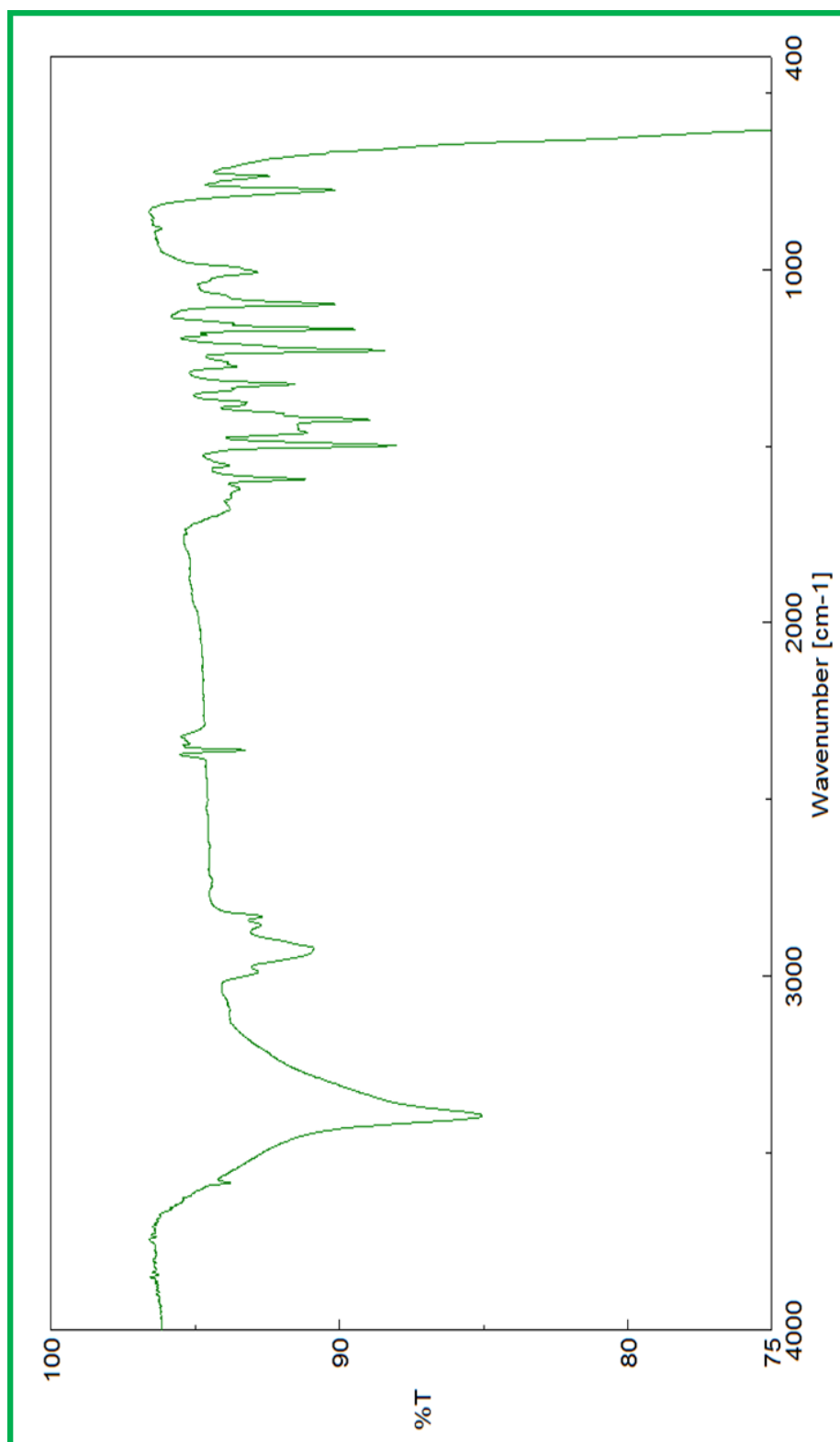


Fig. 16. IR spectrum of compound 2

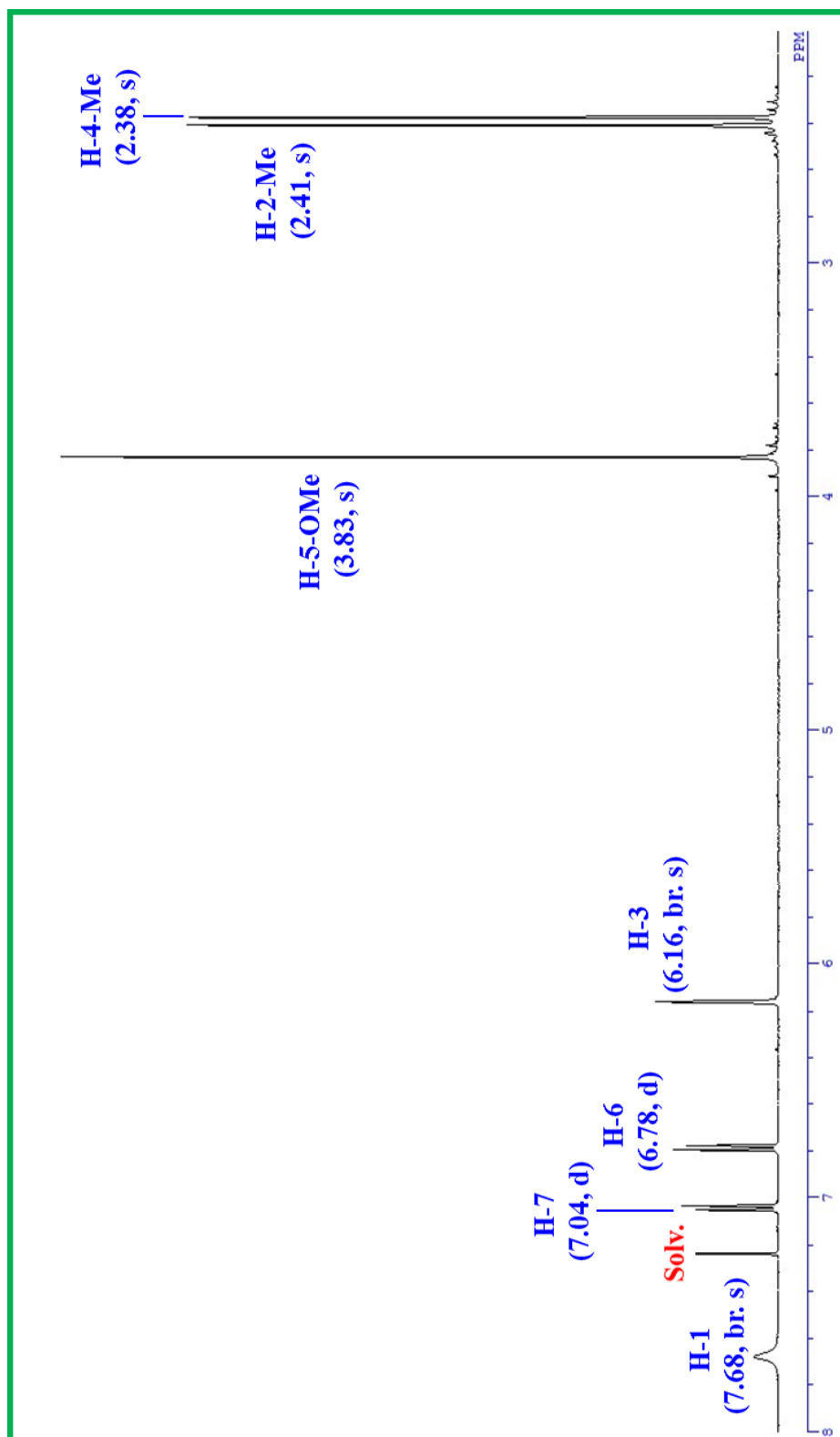


Fig. 17. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2 (in CDCl_3)

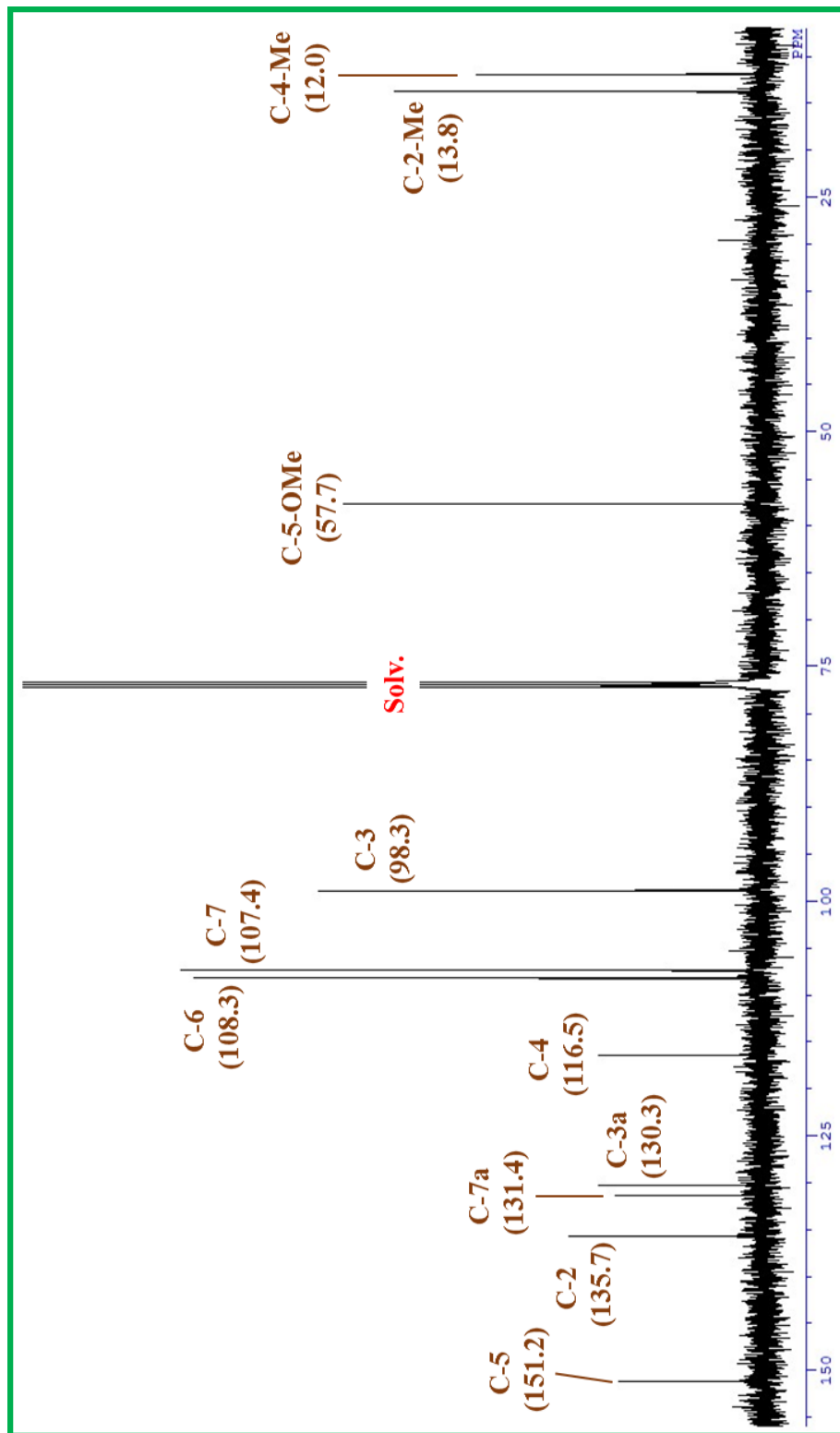
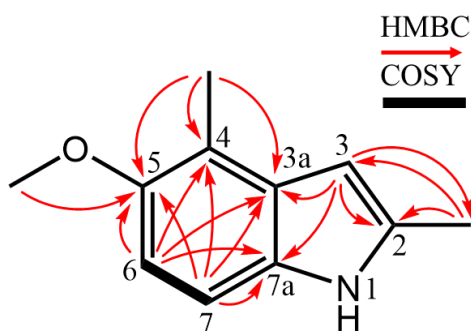


Fig. 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 (in CDCl_3)

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data for **2** (in CDCl_3)

Position	^1H δ (multiplicity, J in Hz)	^{13}C δ	COSY	HMBC
1	7.68 (br. s)			
2		135.7		
3	6.16 (br. s)	98.3	2-Me	2, 3a, 7a, 2-Me
3a		130.3		
4		116.5		
5		151.2		
6	6.78 (d, 8.9)	108.3	7	4, 5, 3a, 7a
7	7.04 (d, 8.9)	107.4	6	3a, 4, 5
7a		131.4		
2-Me	2.41 (s)	13.8	3	2, 3
4-Me	2.38 (s)	12.0		3a, 4, 5
5-OMe	3.83 (s)	57.7		5



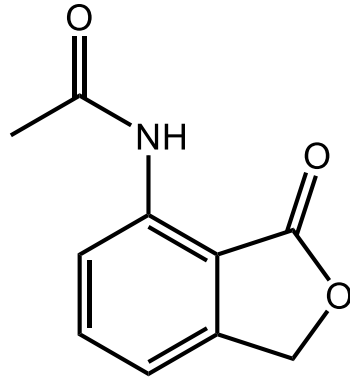
2-2-3 化合物 3 の構造解析

化合物 3 は白色の針状結晶として単離された。

ESI-TOF-MS において m/z 214 に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークを示した (Fig. 19)。また、HR-ESI-TOF-MZS において m/z 214.0475 (Δ -0.6 mmu) に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークが確認され、分子式 $C_{10}H_9NO_3$ と決定した。このことから、分子量が 191、不飽和度が 7 であることが示唆された。IR スペクトルにおいて 3336 cm^{-1} の吸収が確認されたことより、N-H の存在が示唆された (Fig. 20)。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトル、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル、DEPT スペクトルおよび HMQC スペクトルにより、化合物 3 はメチル基が 1 個 [δ_{H} 2.24 (s), δ_{C} 24.9]、メチン基が 4 個 [δ_{H} 5.28 (s), 7.08 (d, $J=7.6$ Hz), 7.60 (dd, $J=7.6, 8.2$ Hz), 8.50 (d, $J=8.2$); δ_{C} 69.9, 115.9, 136.3, 118.3]、四級炭素が 5 個 [δ_{C} 111.4, 138.8, 146.6, 169.1, 172.1] 有すると決定した (Fig. 21-24; Table 3)。

COSY スペクトルにおいてメチンプロトン [δ_{H} 7.08 (d, $J=7.6$ Hz)] とメチンプロトン [δ_{H} 7.60 (dd, $J=7.6, 8.2$ Hz)] の間の相関およびメチンプロトン [δ_{H} 7.60 (dd, $J=7.6, 8.2$ Hz)] とメチンプロトン [δ_{H} 8.50 (d, $J=8.2$ Hz)] の間の相関が見られた (Fig. 25; Table 3)。また、HMBC スペクトルにおいて、メチンプロトン [δ_{H} 5.28 (s)] と炭素 [δ_{C} 172.1, 146.6, 115.9, 111.4] の間の相関、メチンプロトン [δ_{H} 7.08 (d, $J=7.6$ Hz)] と炭素 [δ_{C} 69.9, 146.6, 136.3, 118.3, 138.8, 111.4] の間の相関、メチンプロトン [δ_{H} 7.60 (dd, $J=7.6, 8.2$ Hz)] と炭素 [δ_{C} 146.6, 115.9, 118.3, 138.8, 111.4] の間の相関およびメチンプロトン [δ_{H} 8.50 (d, $J=8.2$ Hz)] と炭素 [δ_{C} 146.6, 115.9, 136.3, 138.8, 111.4] の間の相関により、フタリドの部分構造が示唆された (Fig. 26; Table 3)。一方、メチルプロトン [δ_{H} 2.24 (s)] と炭素 [δ_{C} 169.1] の間の相関により、アセタミド基の存在が示唆された。さらに、アミドプロトン [δ_{H} 9.56 (br. s)] と炭素 [δ_{C} 118.3, 138.8, 111.4] の間の相関によりアセタミド基がフタリドの 7 位と繋がる事が示唆された (Fig. 27; Table 3)。



7-acetamidophthalide

以上の事により、化合物 **3** の構造を決定した。化合物 **3** は 7-acetamidophthalide であると同定した。

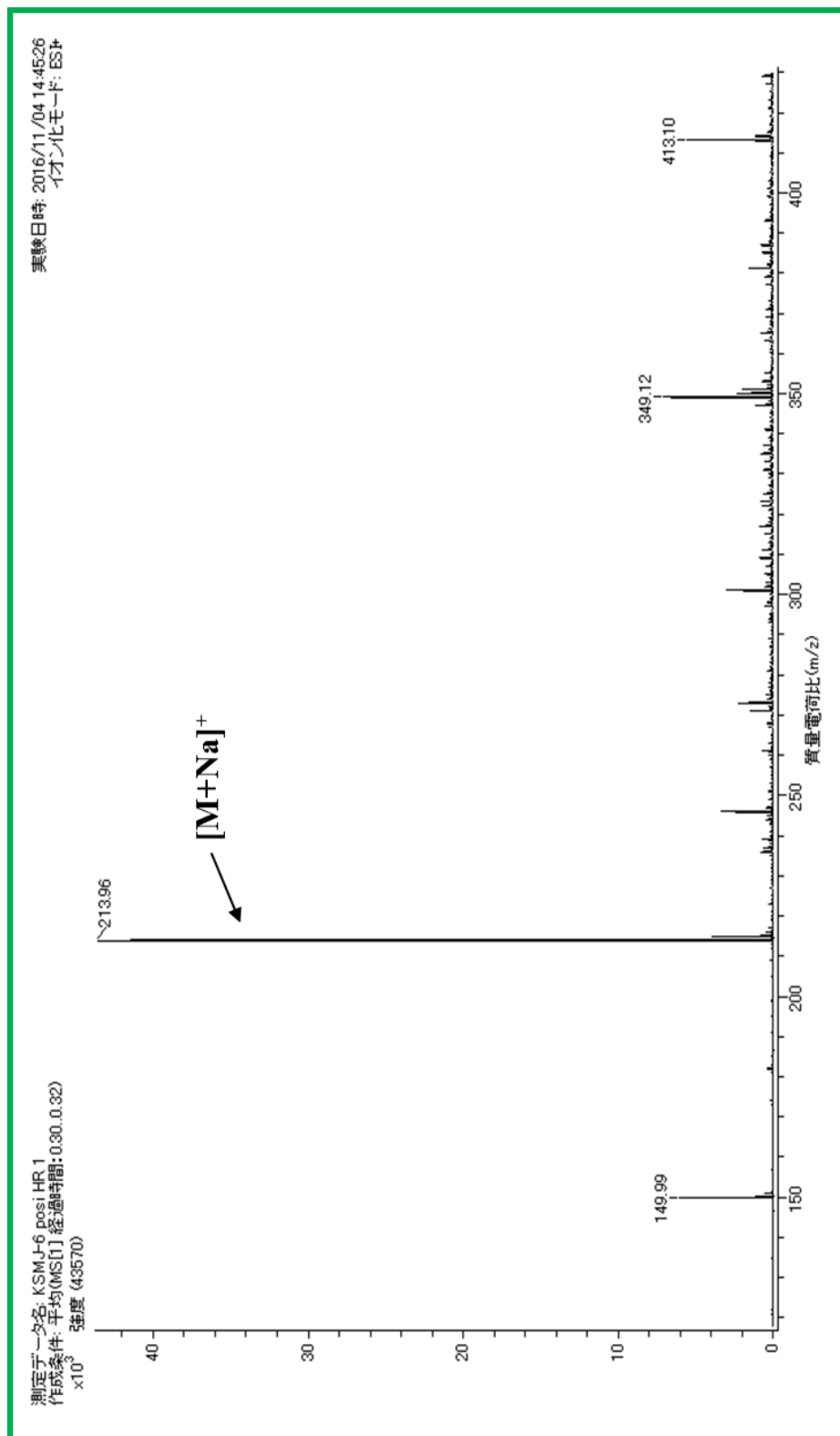


Fig. 19. ESI-TOF-MS (positive) spectrum of compound 3

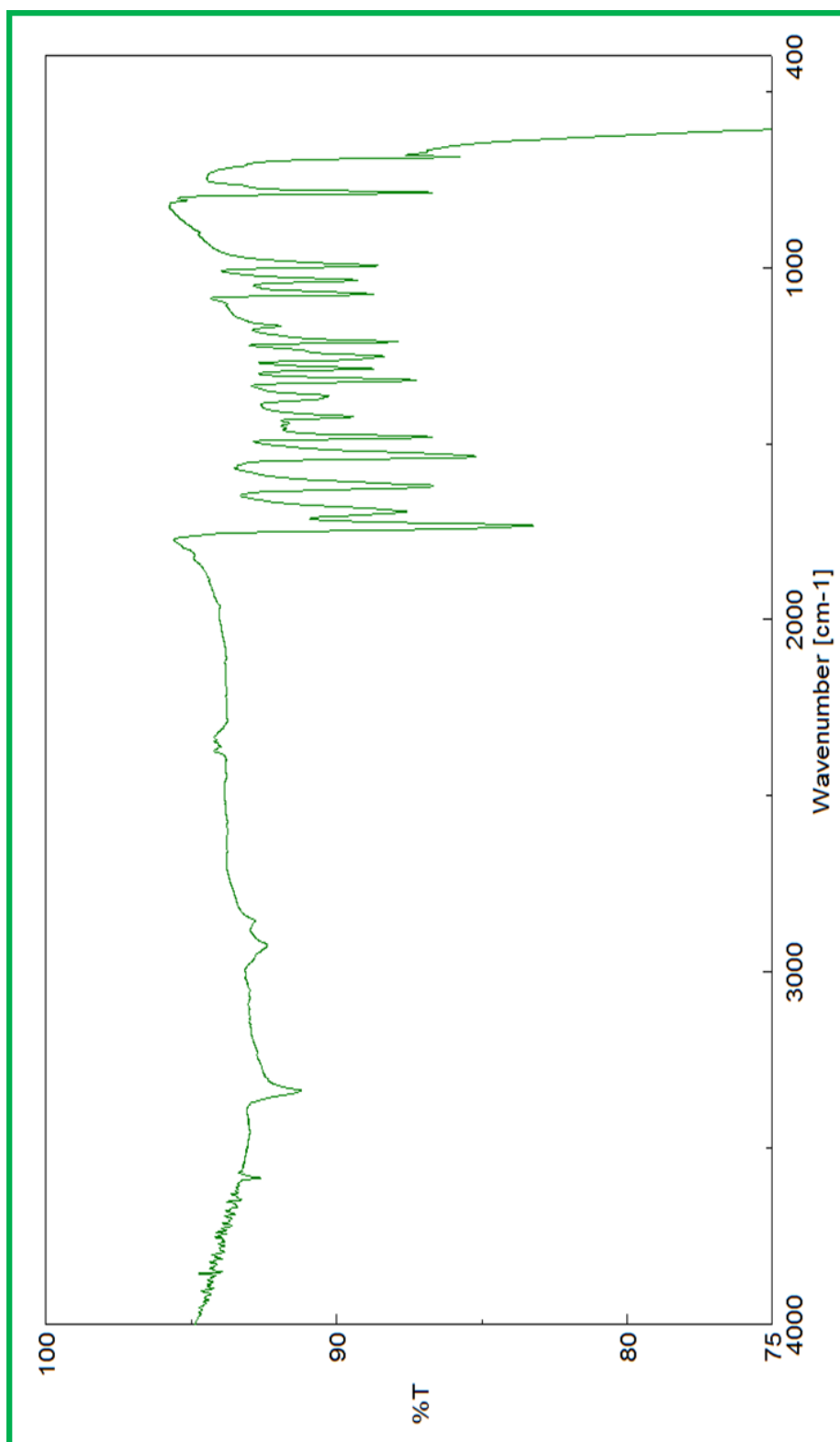


Fig. 20. IR spectrum of compound 3

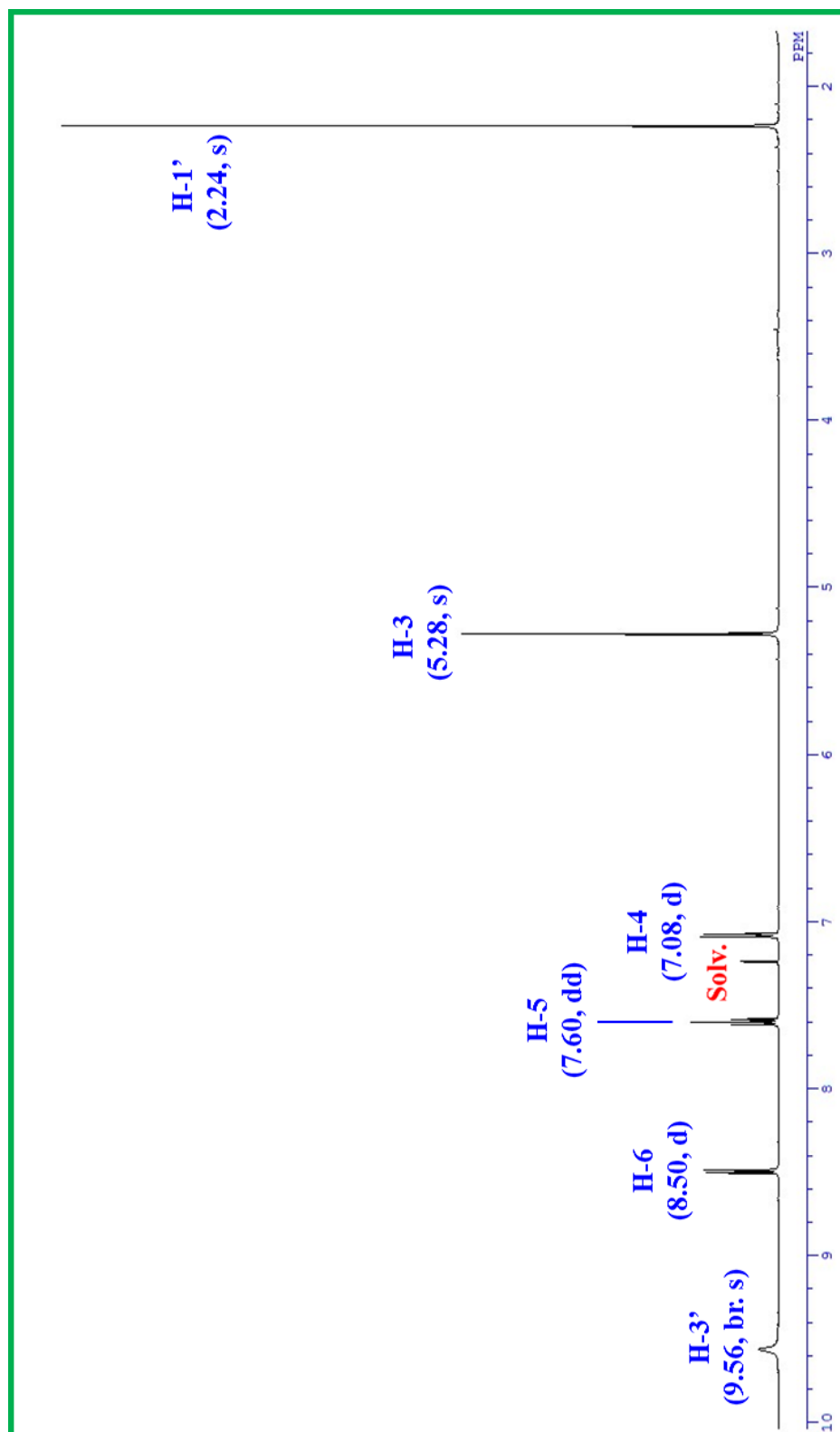


Fig. 21. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 3 (in CDCl_3)

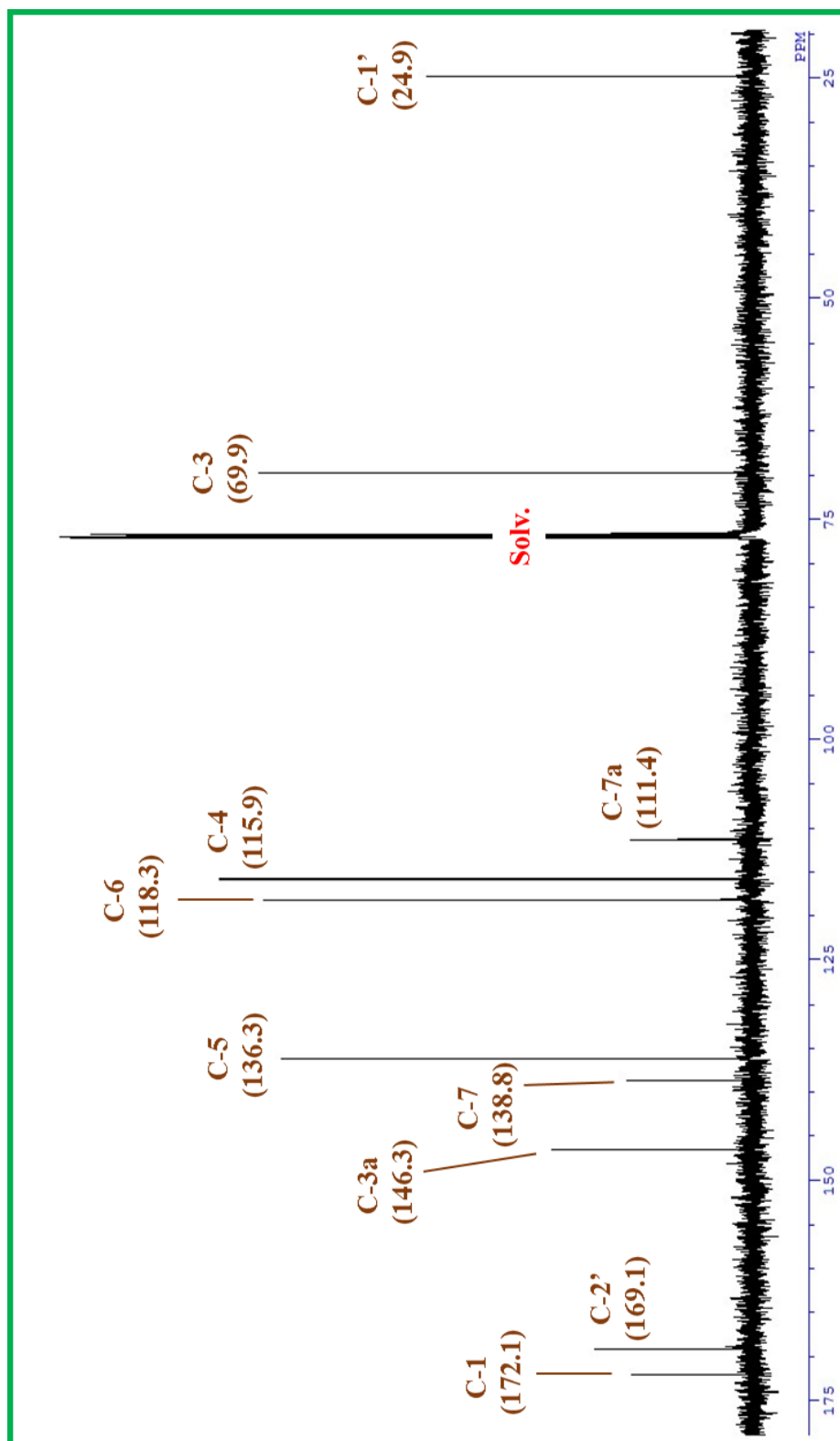


Fig. 22. ¹³C-NMR spectrum of compound 3 (in CDCl₃)

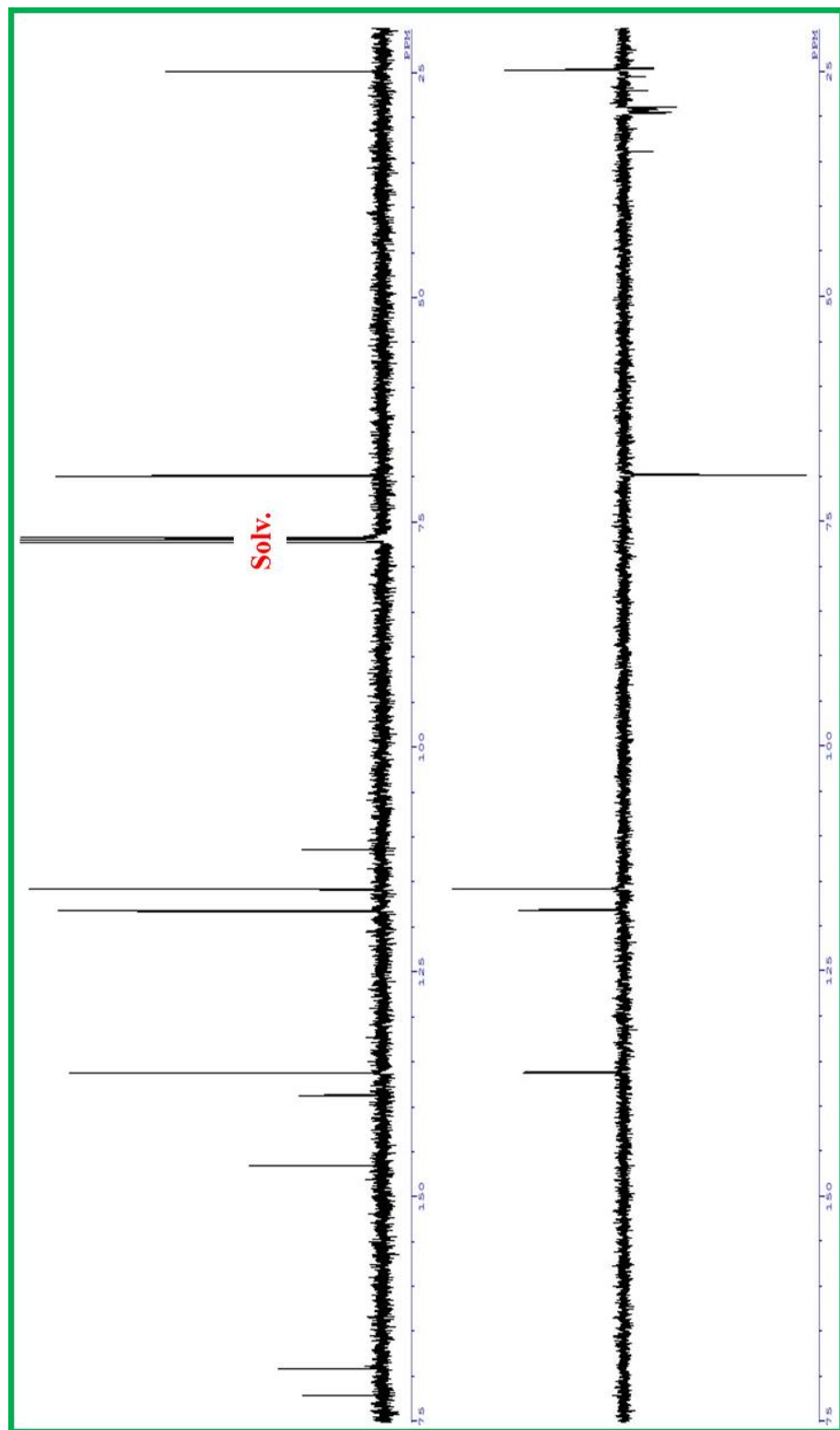


Fig. 23. ¹³C-NMR and DEPT spectra of compound 3 (in CDCl₃)

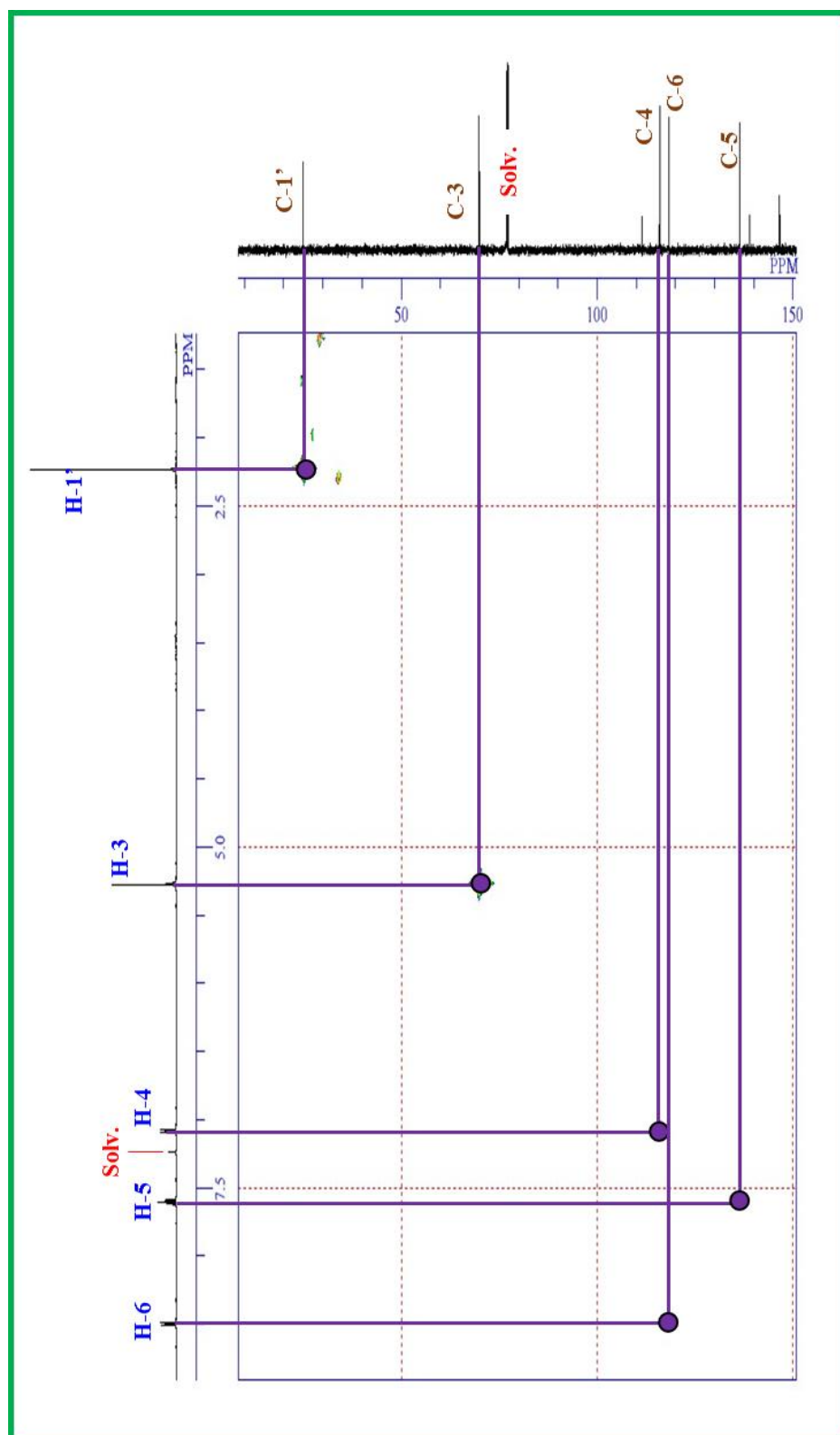


Fig. 24. HMQC spectrum of compound 3 (in CDCl_3)

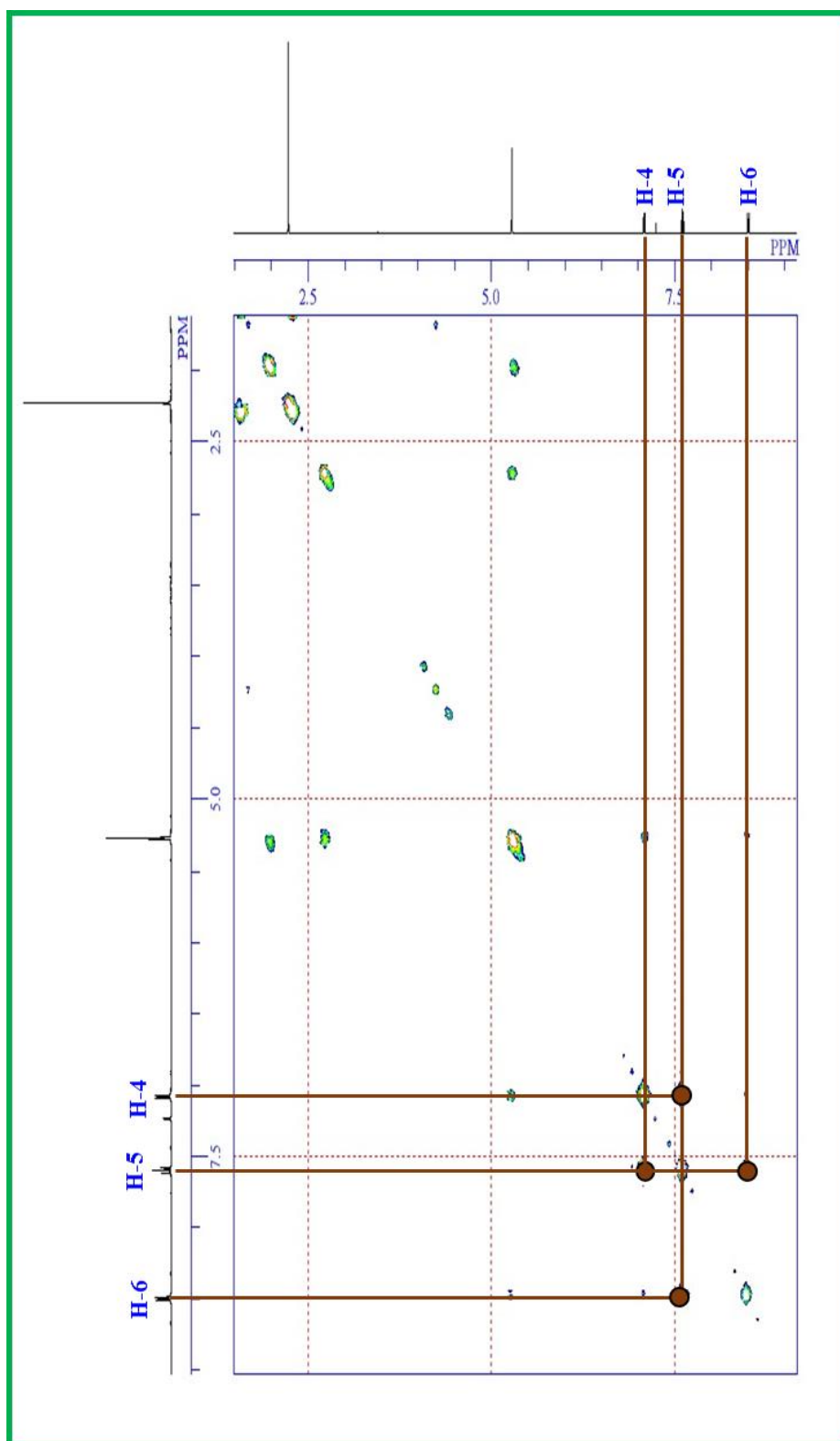


Fig. 25. COSY spectrum of compound 3 (in CDCl₃)

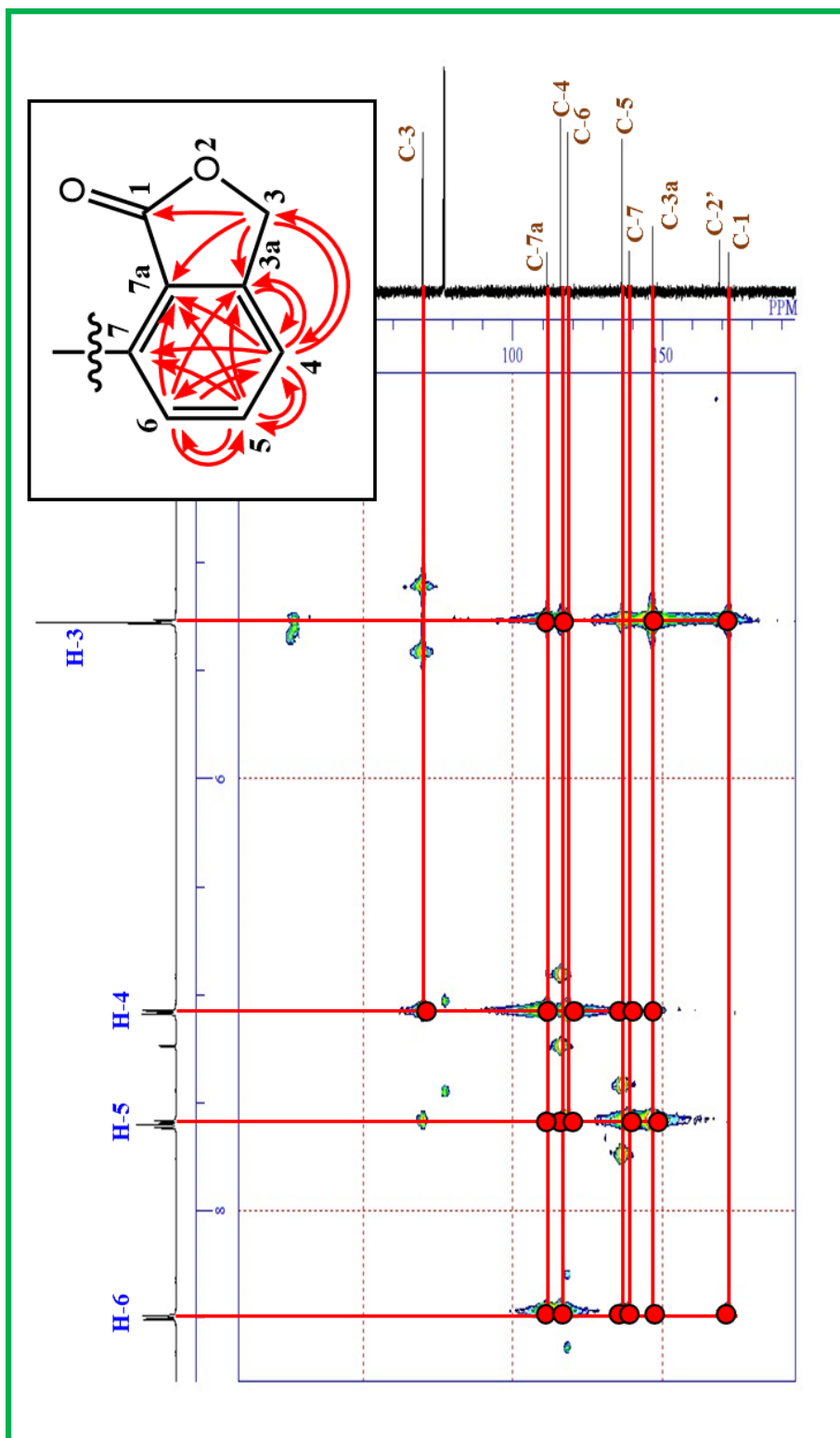


Fig. 26. HMBC spectrum and correlations of the phthalide moiety in compound 3 (in CDCl₃)

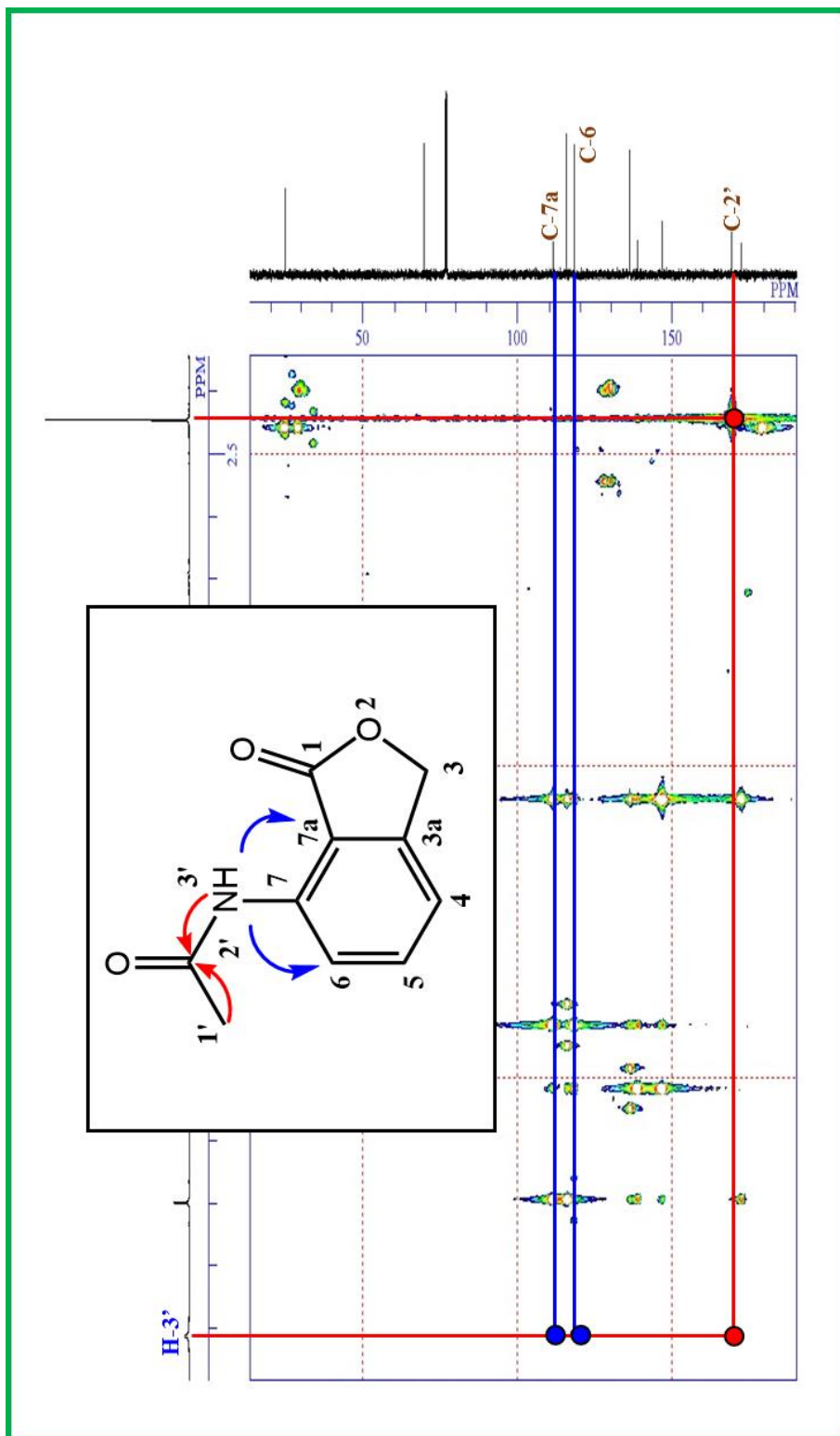


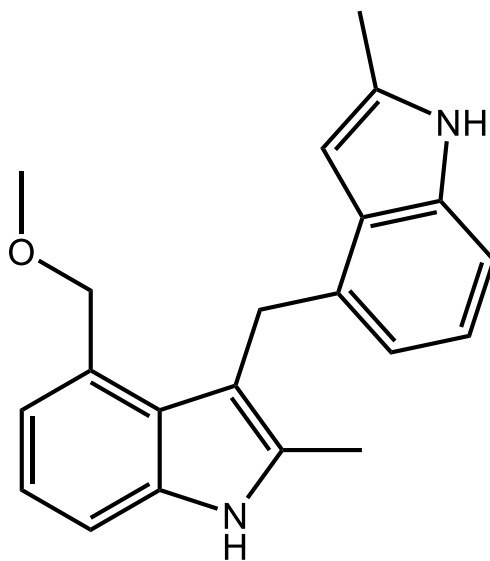
Fig. 27. HMBC spectrum and correlations of the 7-acetamide moiety in compound 3 (in CDCl₃)

2-2-4 化合物 4 の構造解析

化合物 4 は白色の非晶質として単離された。

化合物 4 は ESI-TOF-MS において m/z 341 に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークを示した (Fig. 28)。HR-ESI-TOF-MS において m/z 341.1657 (Δ 2.68 mmu) に $[M+H]^+$ の分子イオンピークが確認され、分子式 $C_{21}H_{22}N_2O$ と決定した。このことから、分子量が 318、不飽和度が 12 であることが示唆された。IR スペクトルにおいて 3396 cm^{-1} の吸収が確認されたことより、N-H の存在が示唆された (Fig. 29)。

$^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルなどの各種スペクトルから、化合物 4 を 4-methoxymethyl-3-[(2-methyl-4-indolyl)-methyl]-2-methylindole と同定した (Fig. 30, 31; Table 4)。



4-methoxymethyl-3-[(2-methyl-4-indolyl)-methyl]-2-methylindole

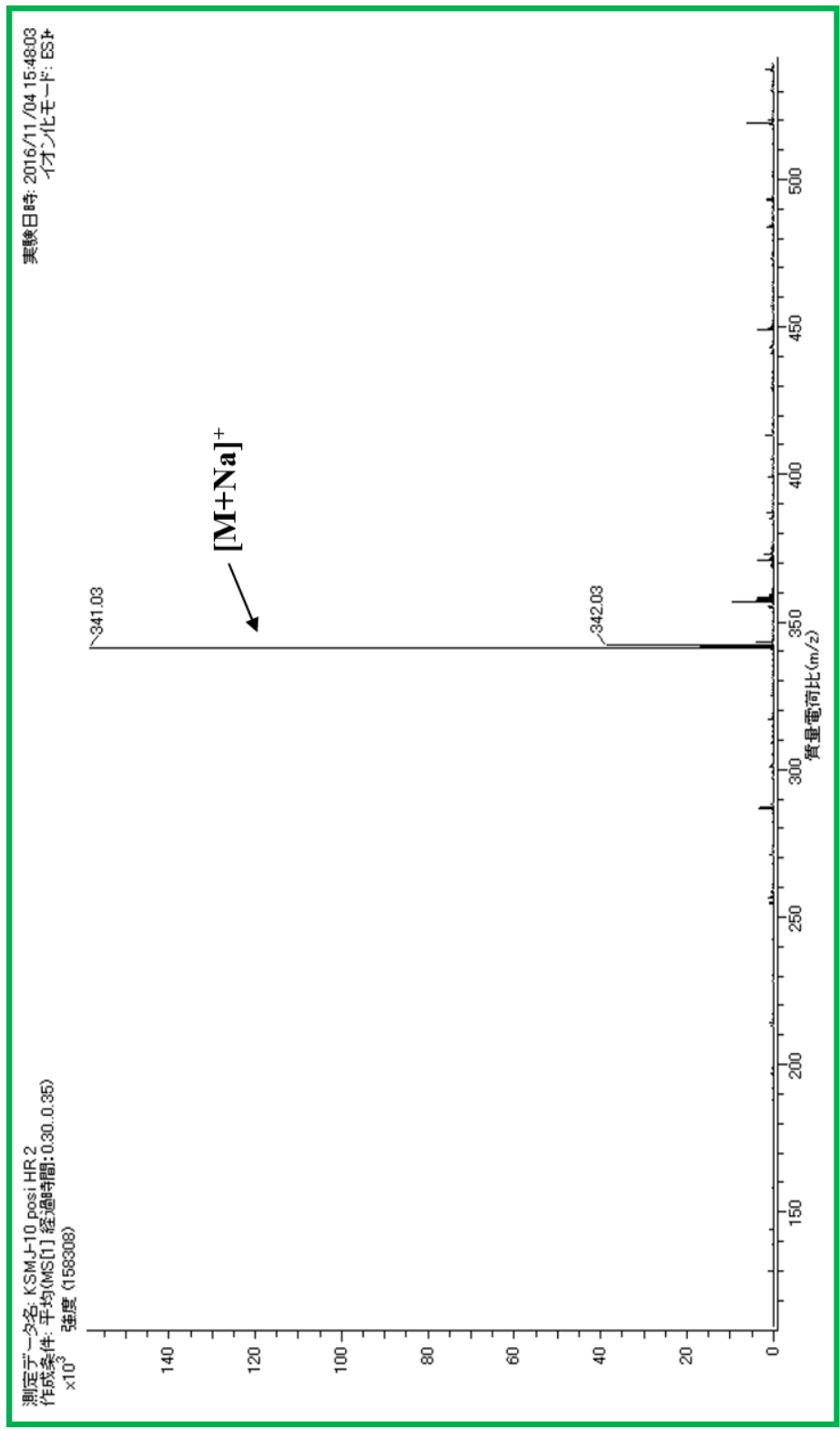


Fig. 28. ESI-TOF-MS (positive) spectrum of compound 4

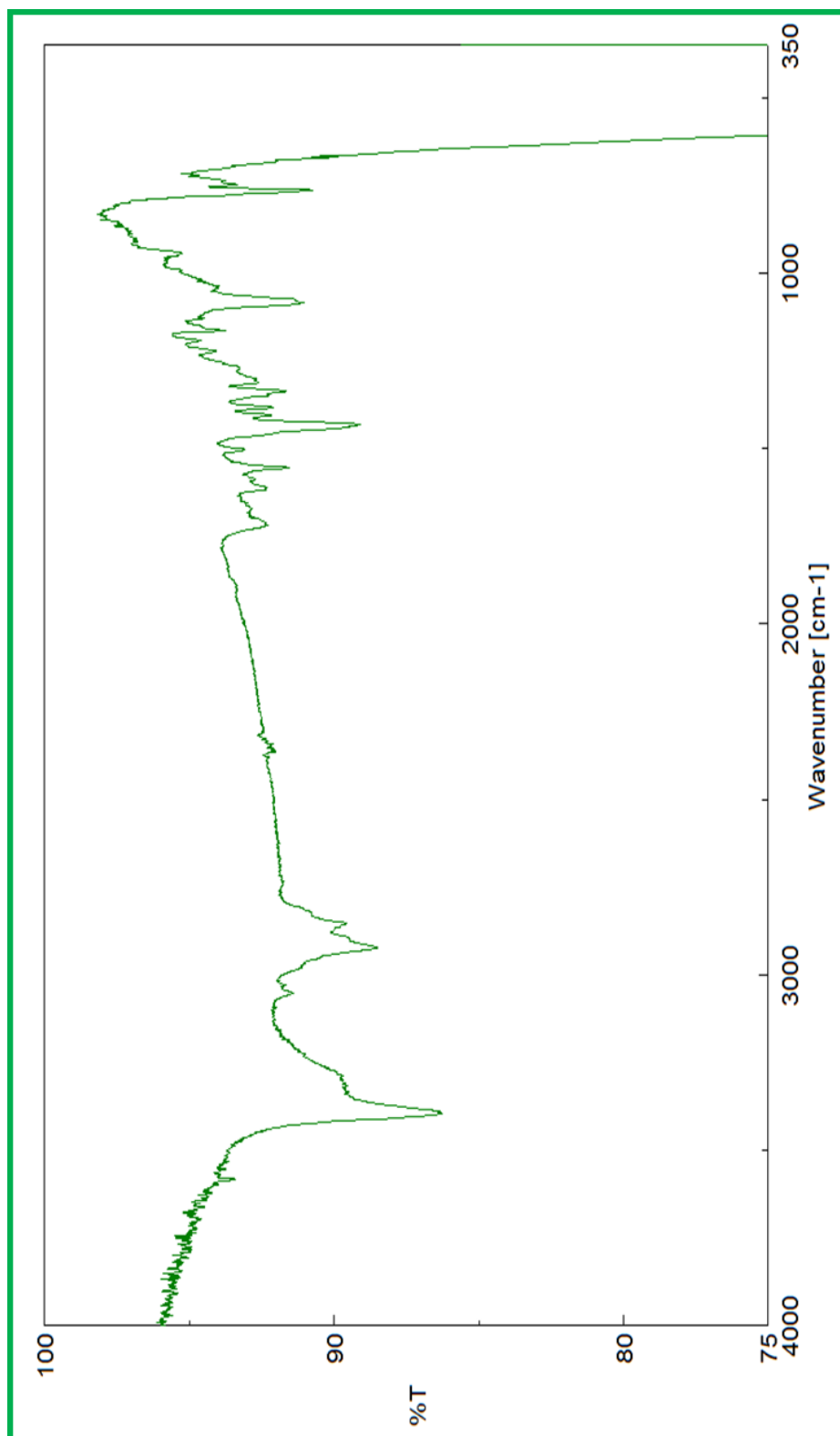


Fig. 29. IR spectrum of compound 4

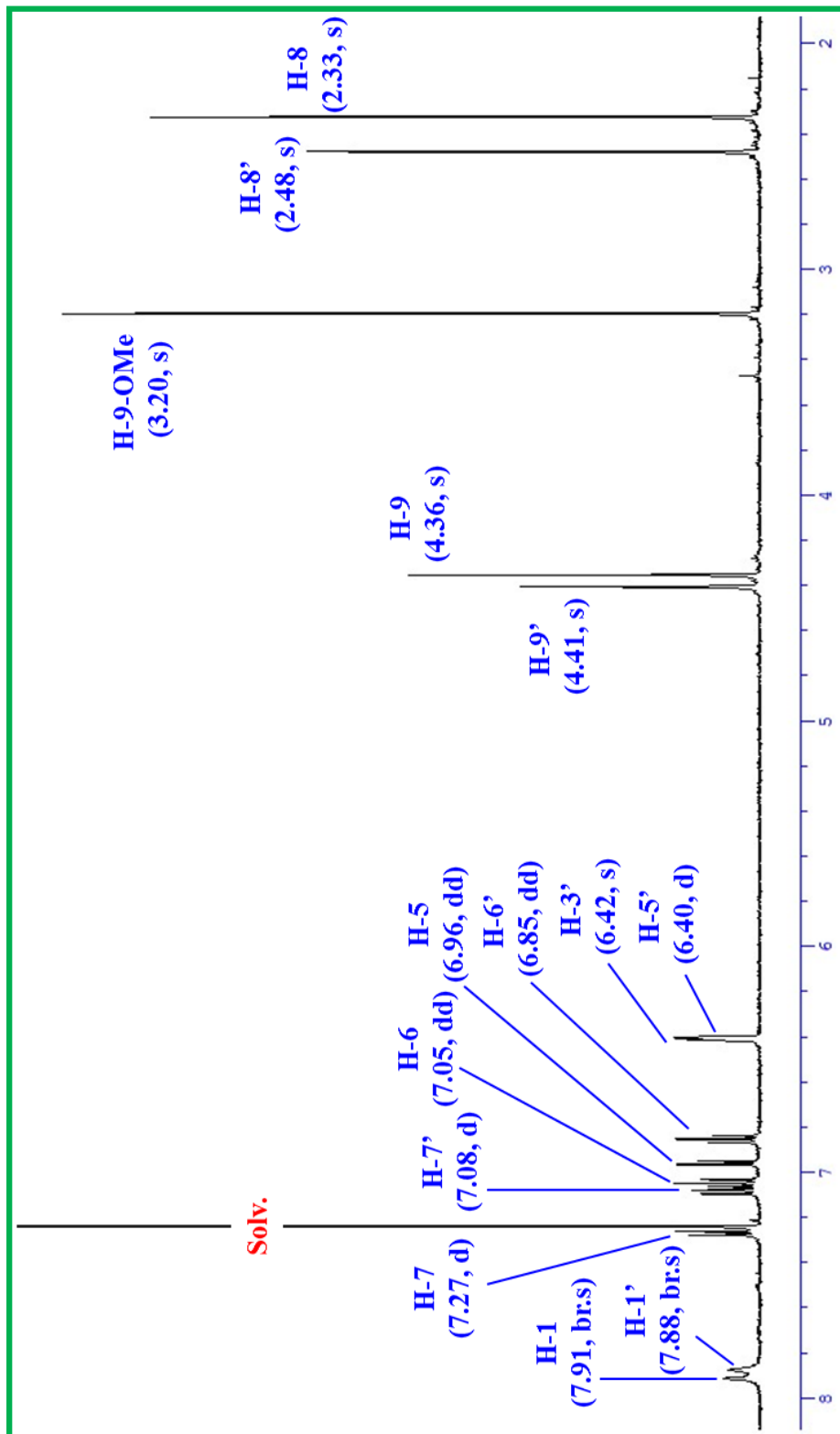


Fig. 30. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 4 (in CDCl_3)

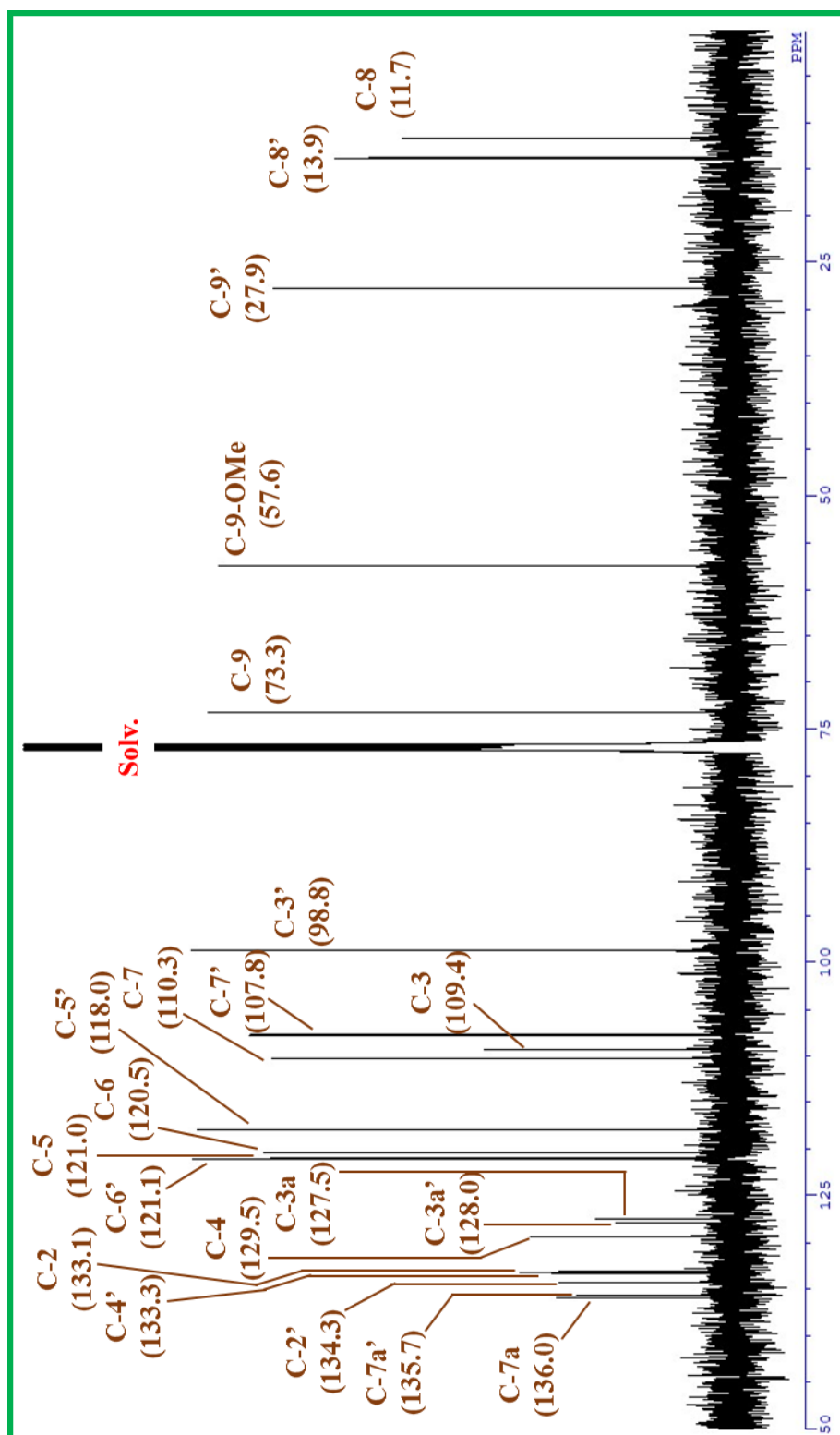
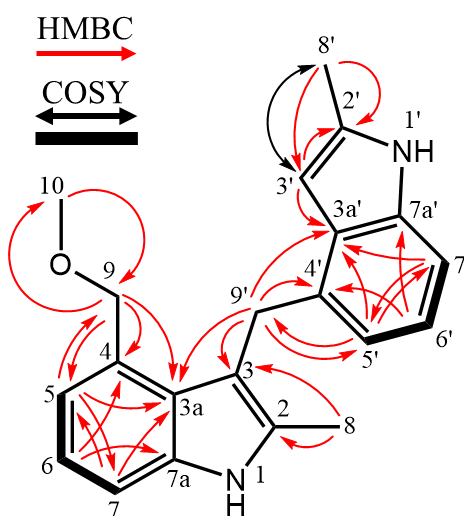


Fig. 31. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 (in CDCl_3)

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data for **4** (in CDCl_3)

Position	^1H δ (multiplicity, J in Hz)	^{13}C δ	COSY	HMBC
1	7.91 (br. s)			
2		133.1		
3		109.4		
3a		127.5		
4		129.5		
5	6.96 (d; 7.3)	121.0	6	7, 9, 3a
6	7.05 (dd; 7.3, 7.9)	120.5	5, 7	4, 7a
7	7.27 (d; 7.9)	110.3	6	3a, 5
7a		136.0		
8	2.33 (s)	11.7		2, 3
9	4.36 (s)	73.3		3a, 4, 5, 10
10	3.20 (s)	57.6		9
1'	7.88 (br. s)			
2'		134.3		
3'	6.42 (s)	98.8	8'	2', 3a'
3a'		128.0		
4'		133.3		
5'	6.40 (d; 5.8)	118.0	6'	7', 9', 3a'
6'	6.85 (dd; 5.8, 7.6)	121.1	5', 7'	7'a, 4'
7'	7.08 (d, 7.6)	107.8	6'	3a', 5'
7a'		135.7		
8'	2.48 (s)	13.9	3'	2', 3'
9'	4.41 (s)	27.9		3, 3a, 3'a, 4', 5'



第 3 節 植物成長調節活性

キシメジ子実体 *n*-hexane 可溶部および EtOAc 可溶部から単離した化合物が植物成長に対する影響を調べるために、レタスを用いて成長調節活性試験を行った。

化合物 **3** の 7 位のアセタミド基の構造活性相関を考察するため、化合物 **3** の類縁体 *phthalide* を使用した。収量と実験の再現性を考慮し、化合物 **4** は活性試験に供していない。

化合物 **1** および **2** は 1 $\mu\text{mol}/\text{paper}$ の条件下でレタスの胚軸の伸長を有意に阻害した一方、レタスの根の伸長を有意に促進した。化合物 **3** および *phthalide* は 100 nmol/paper の条件下でレタスの根の伸長を有意に阻害した一方、化合物 **3** は胚軸の伸長も有意に阻害した。また、化合物 **3** および *phthalide* は 1 $\mu\text{mol}/\text{paper}$ の条件下でレタスの胚軸および根の伸長に対する著しい阻害活性を示した (Fig. 32)。

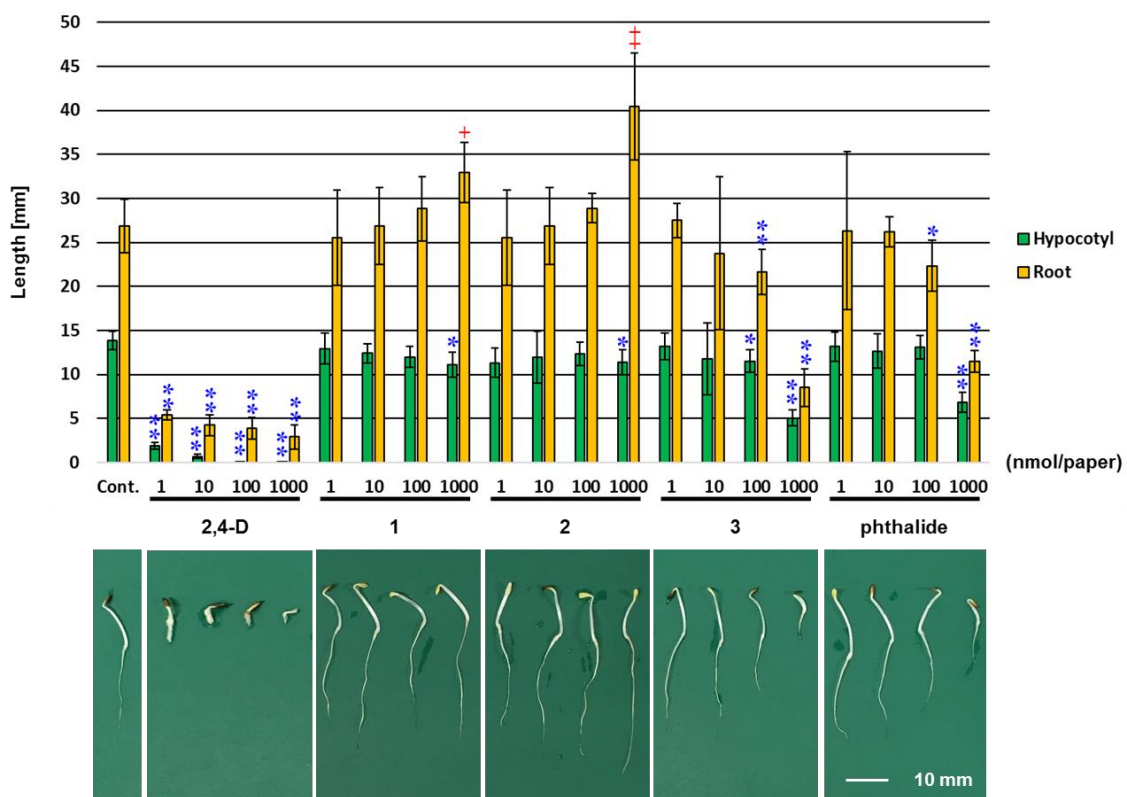


Fig. 32. Growth regulating activity against lettuce

Note: Green and orange columns indicate the length of the hypocotyl and the root, respectively. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was used as positive control. Results are the mean \pm standard deviation (n=9). [$*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (growth inhibition); $+p < 0.05$, $++p < 0.01$ (growth promotion)]

第 4 節 化合物 1-4 の考察

化合物 2 は *T. flavovirens* と同属の *T. lascivum* から単離された苦味物質である lascivol を強酸に供した産物として初めて得られた。⁹⁾ また、*T. sciodes* からの単離および *T. caligatum* からの検出が報告されている。^{10,11)} 生物活性については報告されていない。

化合物 3 は 合成品として知られている。¹²⁾ 生物活性については報告されていない。

化合物 4 は 化合物 2 と同様に *T. sciodes* からの単離が報告されている。¹⁰⁾ 生物活性については報告されていない。

レタスに対する成長調節活性試験に供したところ、1 $\mu\text{mol}/\text{paper}$ の条件下で、化合物 1 と比較して、化合物 2 はより強い根の伸長に対する促進活性を示した。この事から、5-methoxy-2,4-dimethylindole 骨格の 7 位のメトキシ基の存在はレタスの根の成長に対する促進作用を弱化する事が示唆された (Fig. 33A)。1 $\mu\text{mol}/\text{paper}$ の条件下で、phthalide と比較したところ、化合物 3 は強い根と胚軸の伸長に対する阻害活性を示した。この事から、phthalide 骨格の 7 位のアセタミド基の存在はレタスの根と胚軸の成長に対する阻害活性を促す事が示唆された (Fig. 33B)。

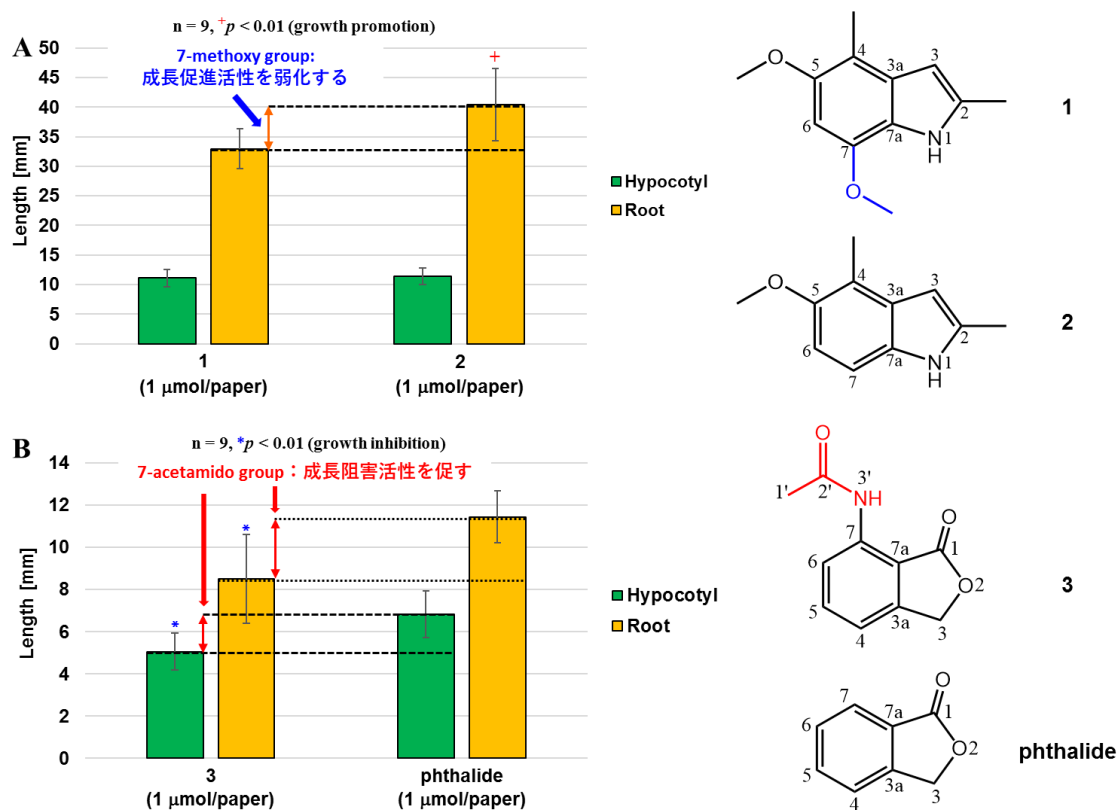


Fig. 33. A) Structure activity relationship of compounds 1 and 2

B) Structure activity relationship of compounds 3 and phthalide

Note: Green and orange columns indicate the length of the hypocotyl and the root, respectively. Results are the mean \pm standard deviation ($n=9$). [$^*p < 0.01$, (growth inhibition); $^+p < 0.01$ (growth promotion)]

第 3 章 実験部

第 1 節 使用機器および材料

3-1-1 機器類

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: AccuTOF LC-plus JMS-T100LP MS Spectrometer (JEOL)
- IR: A-102 Diffraction Grating Infrared Spectrometer (JEOL)
- HPLC: Pump: PU-2089 Plus Quaternary Gradient Pump (JASCO)
L-2130 (HITACHI)
PU-987 intelligent Prep. pump (JASCO)
Detector: UV-2075 Plus Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)
MD-2010 Plus Multinavelength Detector (JASCO)
diode Array Detector L-2455 (HITACHI)
Waters 484 Tunable Absorbance Detector (Waters)
Recorder: 807-IT Integrator (JASCO)
Software: Chromatography Data Station ChromNAV (JASCO)
ELITE (HITACHI)
Interface: LC-NetII/ADC (JASCO)
Column: COSMOSIL π NAP Waters (nacalai tesque)
YMC-pack Diol-60-NP (YMC Co., Ltd.)
Senshu Pak AQ (Senshu Scientific Co., Ltd.)

Incubator: GROWTH CABINET (SANYO)

Centrifugal Evaporator: EZ-2 plus HCl COMPATIBLE (genevac)

Silica gel: 60N for column chromatography (Kanto Chemical Co., Inc.)

ODS gel: 60N for column chromatography (Kanto Chemical Co., Inc.)

Sep-Pak: Silica cartridge (Waters)

ODS cartridge (Waters)

TLC: DC-Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck)

DC-Alufolien RP-18F₂₅₄ (Merck)

Preparative TLC: DC-Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck)

3-1-2 材料

山梨県鳴沢村から採集した野生キノコのキシメジ (*Tricholoma flavovirens*) を使用した。

植物成長調節活性試験はレタスの種子 (*lactuca sativa* L. cv. Cisco, and Great Lakes 366) を使用した。

第 2 節 キシメジ子実体粗物由来の化合物の単離・精製

3-2-1 キシメジ子実体の抽出

キシメジ子実体 (20.6 kg) を EtOAc、acetone で順次抽出し、減圧濃縮後、分液ロートを用いて、液-液分配することにより、*n*-hexane 可溶部 (39.8 g)、EtOAc 可溶部 (16.4 g)、*n*-BuOH 可溶部 (9.42 g) および H₂O 可溶部に分画した。

3-2-2 キシメジ *n*-hexane 可溶部由来の化合物の単離・精製

キシメジ *n*-hexane 可溶部 (39.8 g) をシリカゲルカラムフラッシュクマトグラフィー (silica gel 60N; ϕ 7×50 cm; CH₂Cl₂/acetone/MeOH = 100/0/0, 90/10/0, 80/20/0, 90/0/10, 80/0/20) に供し、20 のフラクションに分画しました (フラクション 1 ~ 20)。得られたフラクション 7 (6.78 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; ϕ 7×50 cm; CH₂Cl₂/acetone/MeOH = 100/0/0, 95/5/0, 90/10/0, 80/20/0) によって分画し、14 のフラクションを得た (フラクション 7-1 ~ 7-14)。フラクション 7-4 (23.3 mg) を Sep-Pak (silica) に分画し、2 のフラクションを得た (フラクション 7-4-1 ~ 7-4-2)。フラクション 7-4-1 を順相 HPLC (YMC-pack Diol-60-NP; ϕ 20×250 mm; hexane/CHCl₃ = 70/30) で分画した結果、化合物 **1** (1.5 mg) の単離に成功した。また、フラクション 7-3 (28.5 mg) を Sep-Pak (silica) し、2 のフラクションを得た (フラクション 7-3-1 ~ 7-3-2)。フラクション 7-3-1 を逆相 HPLC (Cosmosil π NAP; ϕ 20×250 mm; 80% MeOH) で分画した結果、化合物 **2** (1.5 mg) の単離に成功した。

3-2-3 キシメジ EtOAc 可溶部由来の化合物の単離・精製

キシメジ EtOAc 可溶部 (16.4 g) をシリカゲルカラムフラッシュクマ

トグラフィー (silica gel 60N; ϕ 7×50 cm; CH₂Cl₂/EtOAc = 100/0, 95/5, 80/20, 70/30, 50/50, 0/100) に供し、17 のフラクションに分画しました (フラクション 1~17)。得られたフラクション 8 (426 mg) を Sep-Pak (ODS) に分画し、2 のフラクションを得た (フラクション 8-1 ~ 8-2)。フラクション 8-1 (214 mg) 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; ϕ 4×50 cm; CH₂Cl₂/acetone = 100/0, 95/5, 90/10, 80/20) によって分画し、8 のフラクションを得た (フラクション 8-1-1 ~ 8-1-8)。フラクション 8-1-5 (46.0 mg) を掻きとり TLC (Preparative TLC) に分画し、10 のフラクションを得た (フラクション 8-1-5-1 ~ 8-1-5-10)。フラクション 8-1-5-6 (10.9 mg) を逆相 HPLC (Cosmosil π NAP; ϕ 20×250 mm; 75% MeOH) で分画した結果、化合物 **3** (7.7 mg) の単離に成功した。また、フラクション 10 (740 mg) 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; ϕ 7×50 cm; CH₂Cl₂/acetone = 100/0, 90/10) によって分画し、11 のフラクションを得た (10-1 ~ 10-11)。その内、フラクション 10-4 (5.5 mg)、10-5 (7.2 mg)、10-6 (20.5 mg) をそれぞれ順相 HPLC (Senshu Pak AQ; ϕ 20×250 mm; hexane/CHCl₃ = 70/30) で分画した結果、化合物 **4** (1.2 mg) の単離に成功した。

第3節 植物成長調節活性試験

3-3-1 レタスに対する植物成長調節活性試験⁶⁾

ガラス製のシャーレ（60 φ×20 mm）を使用し、1 mL の蒸留水を浸透させた濾紙（Advantec No. 2, 55 φ）にレタスの種子を播種し、25°C 暗所の条件下で 1 日間前培養を行った。一方、別のガラス製のシャーレ（60 φ×20 mm）を用いて、コントロールにはメタノールで濾紙を浸透させ、試験区にはメタノールで濃度調製した各化合物を濾紙に浸透させた。自然乾燥の後、それぞれのシャーレに 1 mL の蒸留水を加え、濾紙に浸透させ、前培養で発芽したレタスの種子を濾紙の上に移植した。25°C、暗所の条件下で 3 日間本培養を行った。培養後、レタスの形態を観察すると共に、根および胚軸の長さを測定した。

論文要旨

キシメジ (*Tricholoma flavovirens*) はキシメジ科キシメジ属のキノコである。古くから可食性のキノコとして利用されてきたが、化学的研究はほとんど報告されていない。以前の研究では、このキノコから植物成長調節化合物である 4-ethoxymethyl-2-methylindole および 4-methoxymethyl-2-methylindole の単離に成功した。そのため、本研究ではキシメジ子実体に由来する植物成長調節活性物質の更なる探索を目的とした。

キシメジ子実体を EtOH、acetone で順次抽出し、減圧濃縮後、分液ロータを用いて液-液分配することにより、*n*-hexane 可溶部、EtOAc 可溶部、*n*-BuOH 可溶部に分画した。得られた各可溶部から化合物の単離を試み、*n*-hexane 可溶部および EtOAc 可溶部をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーに供し、さらなる精製を進めた結果、化合物 **1-4** の単離に成功した。化合物 **1** は 5,7-methoxy-2,4-dimethylindole と決定し、新規化合物であった。化合物 **2** は 5-methoxy-2,4-dimethylindole と同定した。化合物 **3** は 7-acetamidophthalide と同定し、天然からの単離が初めてであった。化合物 **4** は 4-methoxymethyl-3-[(2-methyl-4-indolyl)-methyl]-2-methylindole と同定した。

化合物 **1-3** はレタスに対する成長調節活性試験に供した。化合物 **1** および化合物 **2** は 1 $\mu\text{mol/paper}$ の条件下でレタスの胚軸の伸長を有意に阻害した一方、レタスの根の伸長を有意に促進した。化合物 **3** は 100 nmol/paper および 1 $\mu\text{mol/paper}$ の条件下でレタスの根と胚軸の伸長を有意に阻害した。

Summary

Tricholoma flavovirens belongs to the family Tricholomataceae. This mushroom is widespread in northern temperate zones throughout the world and recognized as an edible mushroom from the ancient. Up to the present date, there are still few chemical studies about this mushroom. In our previous study, we have reported the isolation of 4-ethoxymethyl-2-methylindole and 4-methoxymethyl-2-methylindole as plant growth regulators from the mushroom. With the purpose of finding other plant growth regulating compounds from the mushroom, we continued the studies.

The fresh fruiting bodies of *T. flavovirens* were extracted with EtOH and then with acetone. After the solutions were combined and concentrated under reduced pressure, the concentrate was partitioned between *n*-hexane and H₂O, EtOAc and H₂O, and then *n*-BuOH and H₂O. The *n*-hexane soluble part and EtOAc soluble part were fractionated by silica gel flash column chromatography, respectively. After repeated chromatography of the fractions from the two soluble parts, compounds **1** to **4** were successfully purified. The novel compound (**1**) was determined to be 5,7-methoxy-2,4-dimethylindole. Compound **2** was identified to be 5-methoxy-2,4-dimethylindole. Compound **3** was identified to be 7-acetamidophthalide. This compound was isolated as a natural compound for the first time. Compound **4** was identified to be 4-methoxymethyl-3-[(2-methyl-4-indolyl)-methyl]-2-methylindole.

The plant growth regulating activities of compounds **1** to **3** against lettuce were tested. Compounds **1** and **2** showed inhibited the hypocotyl growth but promoted the root growth of lettuce at 1 μ mol/paper significantly. Compound **3** inhibited the hypocotyl growth and root growth of lettuce at 100 nmol/paper and 1 μ mol/paper significantly.

参考文献

1. J-H. Choi *et al.*, *ChemBioChem*, **2010**, 11, 1373-1377
Disclosure of the “Fairy” of Fairy-Ring-Forming Fungus *Lepista sordida*.
2. J-H. Choi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 9956-9959
Plant-Growth Regulator, Imidazole-4-Carboxamide, Produced by the Fairy Ring Forming Fungus *Lepista sordida*.
3. K. Fushimi *et al.*, *Tetrahedron*, **2012**, 68, 1262-1265
Agrocybynes A-E from the Culture Broth of *Agrocybe praecox*.
4. J. Wu *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 155-158
Erinaceolactones A to C, from the Culture Broth of *Hericium erinaceus*.
5. H. Kobori *et al.*, *Tetrahedron lett.*, **2013**, 54, 5481-5483
Armillariols A to C from the Culture Broth of *Armillaria* sp..
6. H. Kobori *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 163-167
Bioactive Sesquiterpene Aryl Esters from the Culture Broth of *Armillaria* sp..
7. P. Nieminen *et al.*, *Food Chem. Toxicol.*, **2005**, 43, 133-138
Increased Plasma Creatine Kinase Activities Triggered by Edible Wild Mushrooms.
8. W. Qiu *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2014**, 78, 755–757
A New Compound from the Mushroom *Tricholoma flavovirens*.
9. T. Eizenhöfer *et al.*, *Liebigs Ann. Chem.*, **1990**, 11, 1115–1118
Lascivol. the Bitter Component of *Tricholoma lascivum* (Agaricales).
10. Z. Pang, O. Sterner, *Acta Chem. Scand.*, **1996**, 50, 303–304
Novel Indole Derivatives from the Fruit Bodies of *Tricholoma sciodes*.
11. F. Fons *et al.*, *Cryptogamie Mycol.*, **2006**, 27,45-55
Volatile Composition of *Clitocybe amoenolens*, *Tricholoma caligatum* and *Hebeloma radicosum*.
12. J. Vene, J. Tirouflet, *Compt. Rend.*, **1950**, 231, 911–912
Synthesis of 4-Amino- and 7-Aminophthalide and some of Their Derivatives.

第 2 部

冬虫夏草 (*Cordyceps militaris*) 由来の 機能性化合物の探索



第 1 章 緒論

広義的な冬虫夏草は昆虫などに寄生し子実体を発生する子囊菌門 (Ascomycota phylum) フンタマカビ綱 (Sordariomycetes class) ボタンタケ目 (Hypocreales order) ノムシタケ科 (*Clavicipitaceae* family) のノムシタケ (*Cordyceps*) 属に帰属されているキノコであり、世界的に約 400 種が確認されている。狭義的な冬虫夏草は中国のチベット山岳地帯等に棲息するコウモリガ (*Hepialus armoricanus* Oberthur) の幼虫に寄生し子実体を発生する *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. のことを言う (Fig. 1A)。¹⁾



Fig. 1. A: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; B: *Cordyceps militaris*^{2,3)}

冬虫夏草は古くから中国、日本、韓国等の東アジアの諸国で漢方の生薬として使用されてきた。1757 年に清朝呉儀洛が著作した『本草従新』では「冬虫夏草，甘平，保肺益腎，止血化痰，止劳嗽」などの冬虫夏草に関する情報が初めて記載された。科学研究において、冬虫夏草は免疫調節作用、抗酸化作用、抗癌作用、アポトーシス調節作用など生理活性を有する事が報告されている。⁴⁻²³⁾

天然の冬虫夏草は過剰に採取されるため、その産量が急激に減少し、価格高騰になっている。冬虫夏草の中に最も珍重である *C. sinensis* (Berk.) Sacc. には、2012 年に 1 キログラムの価額が 111,560 ドルである事が報告されている。²⁴⁾ そのため、人工的に栽培する事によって *C. sinensis*

(Berk.) Sacc. を取得する事が注目されている。残念ながら、*C. sinensis* (Berk.) Sacc. の人工栽培の研究がされたが、ユニフォームの菌糸体あるいは子実体が形成できない。²⁵⁾

C. militaris はチョウ目 (Lepidoptera) の蛹に寄生し子実体を発生するため、日本ではサナギタケと呼ばれている (Fig. 1B)。研究において、*C. militaris* の生理活性が *C. sinensis* (Berk.) Sacc. の生理活性に類似している事を示している。²⁶⁾ また、天然の *C. militaris* は貴重であるが、人工的に栽培する事が可能になっている。そのため、*C. militaris* は *C. sinensis* (Berk.) Sacc. の代替品として認識され、商品または研究材料として広く利用されている。以前の研究により、*C. militaris* 菌糸体から cordycepin などの nucleoside 類、isoflavone 類が単離されている。^{27,28)} また、*C. militaris* 子実体からも多数の nucleoside 類化合物が単離されているほか、新規 steroid 化合物および数種の macrolide 化合物の単離が報告されている。^{20,29,30)}

C. militaris の人工栽培に関する研究が多く報告されている。³¹⁻⁴⁵⁾ そのうち、宿主に人工的に *C. militaris* 菌糸体を注射感染し、子実体を発生する方法は一般的に使用される方法である。³⁷⁻⁴⁵⁾ コガネムシ (*Mimela splendens*)、シロテンハナムグリ (*Protaetia orientalis*) やカイコ (*Bombyx mori*) などの宿主を使用する人工栽培の研究が報告されているが、*B. mori* は最も使用されている宿主である。*B. mori* の蛹に人工的に感染させて発生させた *C. militaris* から、数件の生理活性または生理活性物質に関する研究がされた一方、化学的研究がほとんど報告されていない。⁴⁶⁻⁵³⁾



Fig. 2. *Cordyceps militaris* appeared from the pupa of *Bombyx mori* by artificial injection

本研究では、カイコの蛹に人工的に感染させて発生させた *C. militaris* (Fig. 2) 由来の抽出物が肺癌細胞 (A549 細胞) に対する細胞毒性作用およびレタスに対する成長阻害活性を示した。そこで、これらの活性を指標にし、*C. militaris* 抽出物由来の機能性化合物の探索を目的とした。

第 2 章 本論

第 1 節 冬虫夏草抽出物由来の化合物の単離・精製

冬虫夏草 [人工的にカイコ (*Bombyx mori*) に感染させて発生させたサナギタケ (*Cordyceps militaris*)] をキノコ部とカイコに分け、実験を行った。

2-1-1 冬虫夏草キノコ部粗抽出物由来の化合物の単離・精製

冬虫夏草キノコ部を EtOH、acetone によって順次抽出を行い、抽出液が減圧乾固した。その後、固-液分配することにより、*n*-hexane 可溶部、EtOAc 可溶部、MeOH 可溶部に分画した (Fig. 3)。

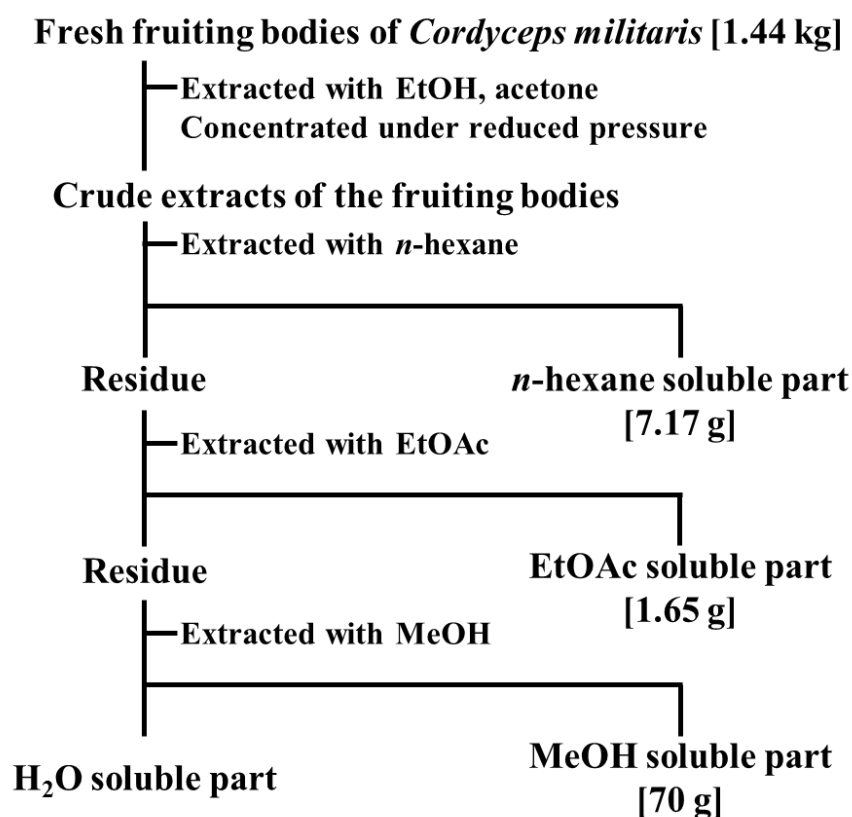


Fig. 3. Extraction of the fruiting bodies of *Cordyceps militaris*

得られた各可溶部を癌細胞（A549 細胞）に対する細胞毒性試験に供したところ、各可溶部が癌細胞に細胞毒性作用を示した。特に *n*-hexane 可溶部および EtOAc 可溶部がより強い細胞毒性を示した (Fig. 4)。また、レタスに対する成長調節試験に供したところ、各可溶部がレタスに成長阻害活性を示した (Fig. 5)。以上の活性試験の結果を指標によって、化合物の単離を行った。

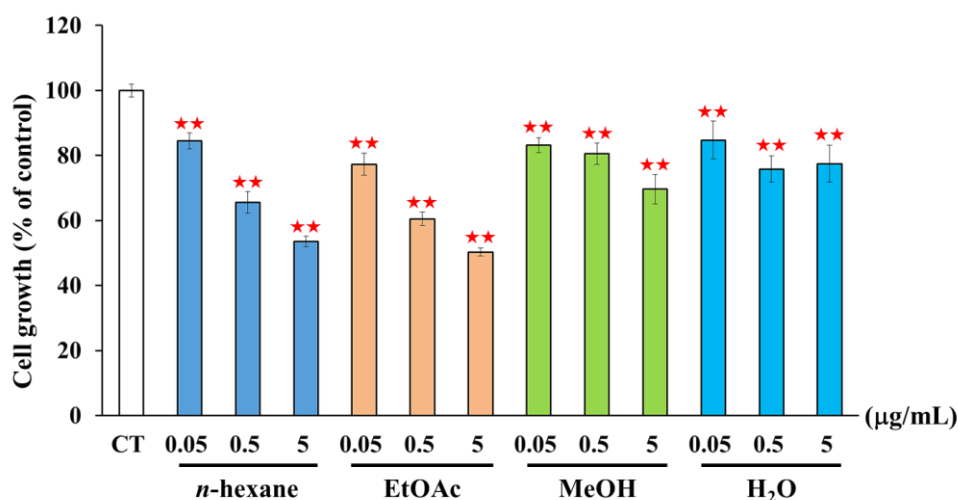


Fig. 4. Cell viabilities of the A549 cancer cells treated with the extracts of *Cordyceps militaris*

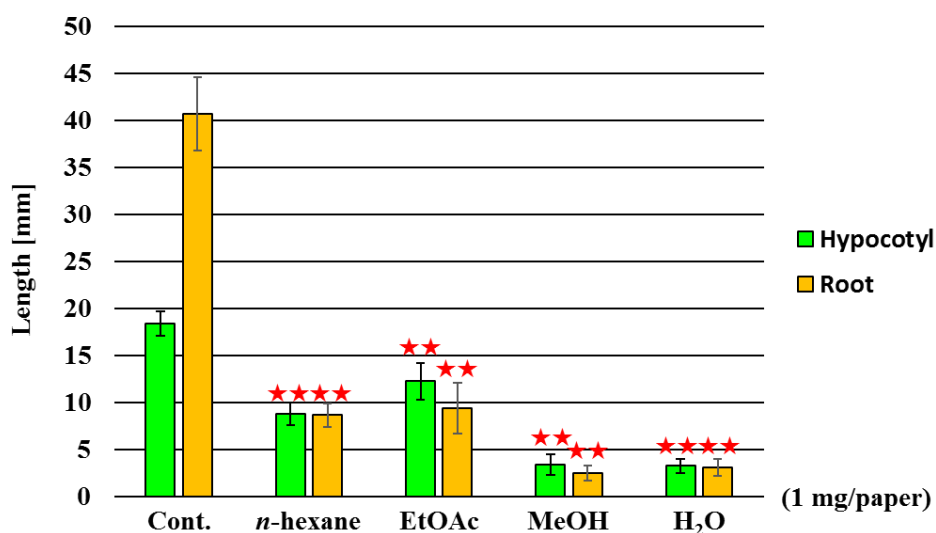


Fig. 5. Inhibitory activity of the extracts of *Cordyceps militaris* against growth of lettuce

n-hexane 可溶部をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーに供し、20 のフラクションに分画した (フラクション 1-20)。フラクション 13 およびフラクション 14 を各種クロマトグラフィーで分画する事によって、化合物 **1** の単離に成功した (Fig. 6)。

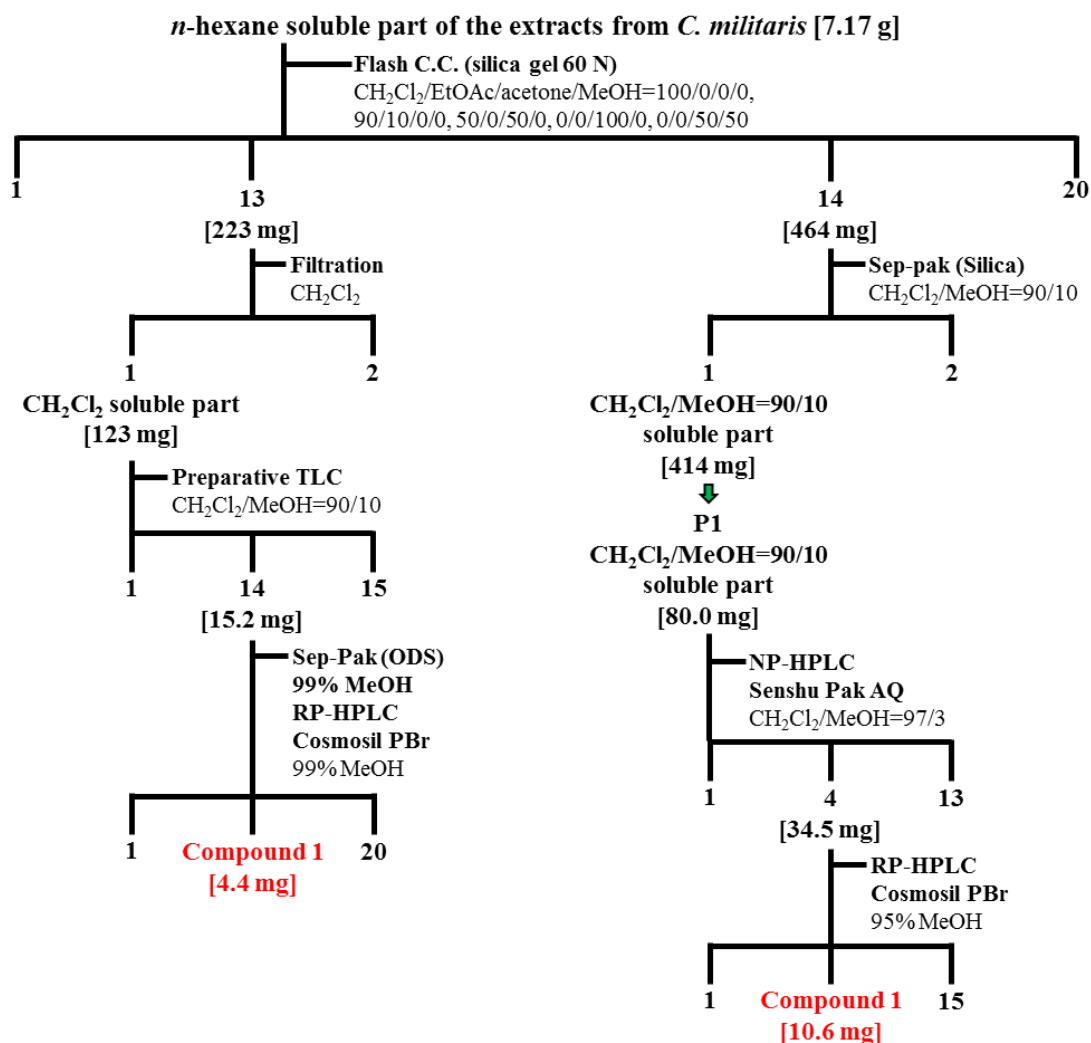


Fig. 6. Purification of compound 1 from *n*-hexane soluble part of *Cordyceps militaris*

EtOAc 可溶部をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーに供し、19 のフラクションに分画した (フラクション 1-19)。得られたフラクション 14 を Sep-pak で分画し、3 のフラクションを得た (14-1~14-3)。

フラクション 14-1 を逆相 HPLC に供したところ、化合物 2 の単離に成功した (Fig. 7)。

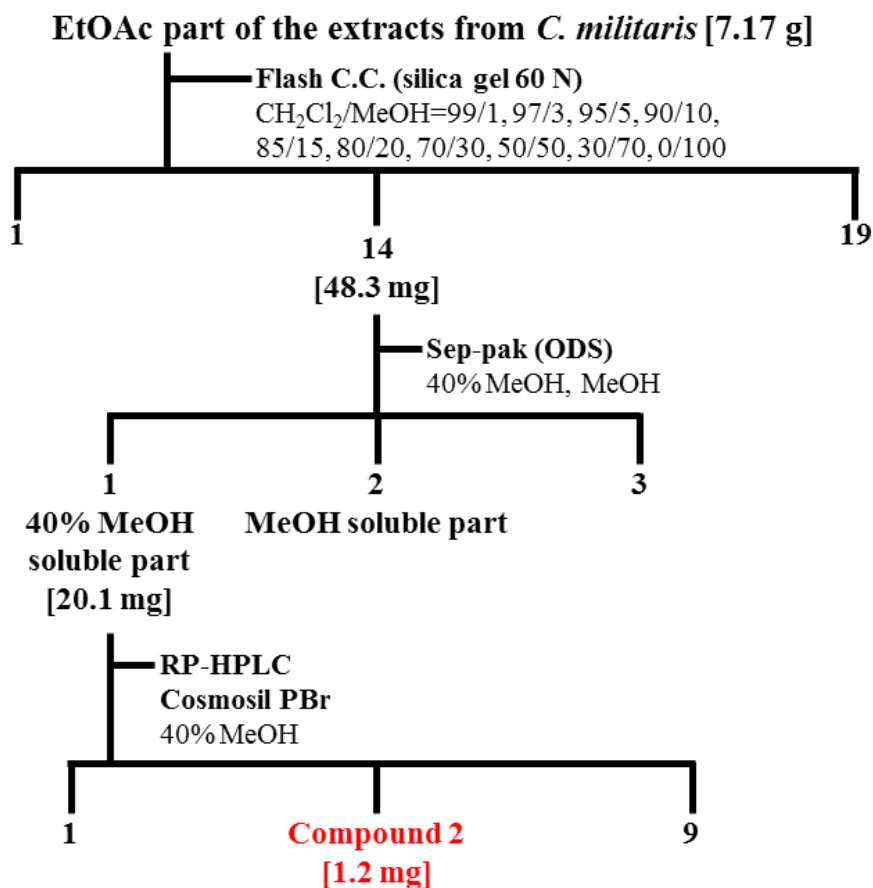


Fig. 7. Purification of compound 2 from EtOAc soluble part of *Cordyceps militaris*

2-1-2 冬虫夏草カイコ部粗抽物由来の化合物の単離・精製

冬虫夏草のカイコ部を EtOH、acetone によって順次抽出を行い、抽出液が減圧乾固した。その後、固-液分配することにより、*n*-hexane 可溶部、EtOAc 可溶部、MeOH 可溶部に分画した (Fig. 8)。

Fresh bodies of *Bombyx mori* infected with *C. militaris* [14.3 kg]

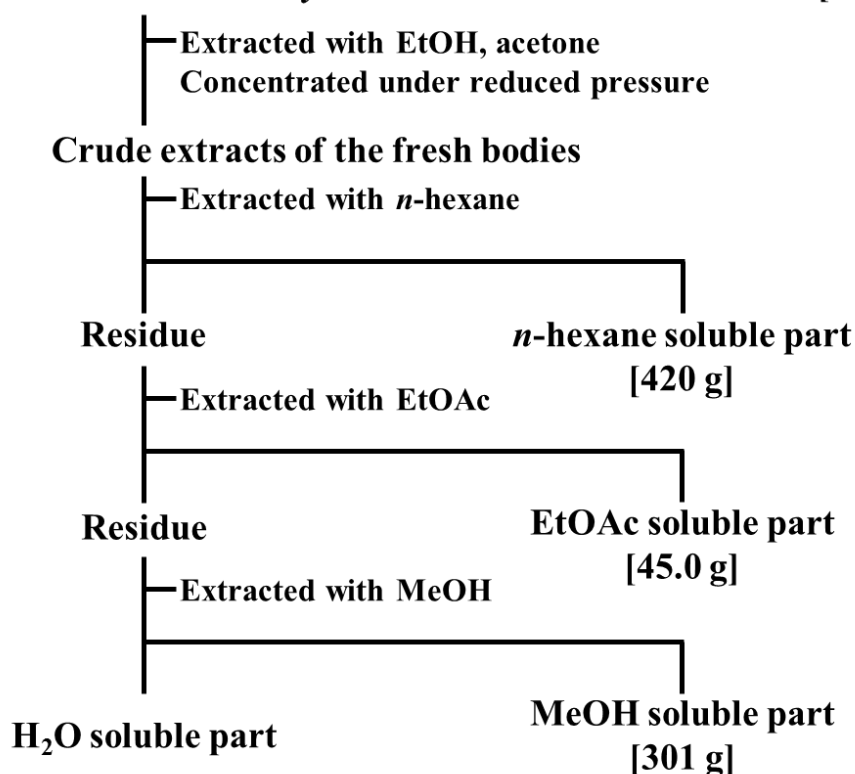


Fig. 8. Extraction of the bodies of *Bombyx mori* infected with *Cordyceps militaris*

EtOAc 可溶部をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィーに供し、24 のフラクションに分画した (フラクション 1-24)。得られたフラクション 21 を Sep-Pak で分画し、3 のフラクションを得た (21-1~21-3)。フラクション 21-1 を逆相 HPLC に供したところ、23 のフラクションに分画した (21-1-1~21-1-23)。その内、化合物 **2** の単離に成功した。一方、フラクション 21-1-11 を逆粗 HPLC に供したところ、化合物 **3** の単離に成功した。また、フラクション 21-1-7 を逆粗 HPLC に供したところ、化合物 **4** の単離に成功した (Fig. 9)。

EtOAc soluble part of the extracts from *B. mori* infected with *C. militaris* [45.0 g]

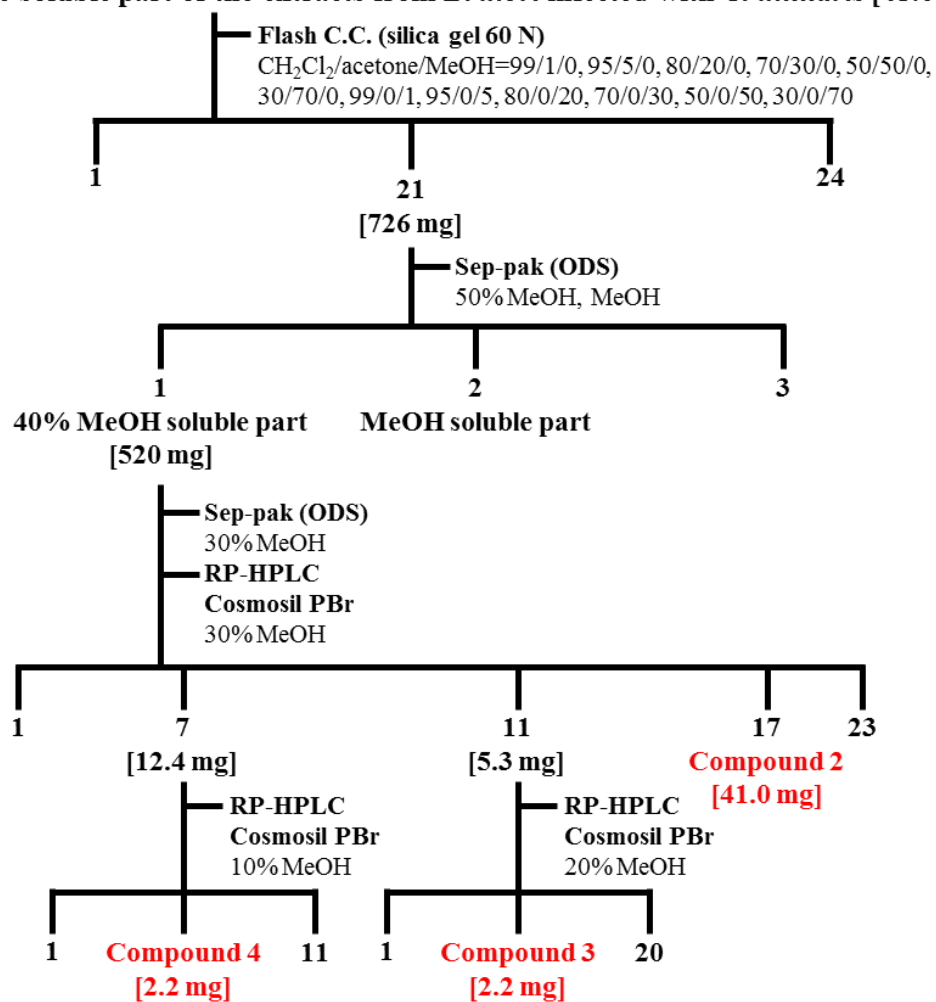


Fig. 9. Purification of compounds 2-4 from the EtOAc soluble part of the extracts from *Bombyx mori* infected with *Cordyceps militaris*

第2節 冬虫夏草抽出物由来の化合物の同定

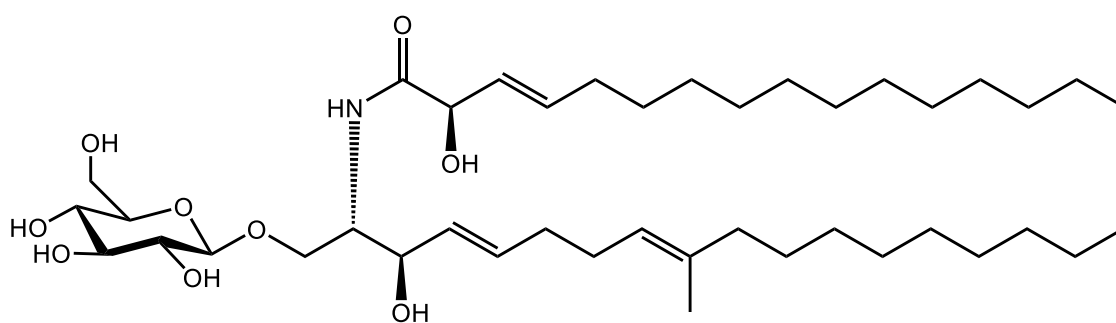
2-2-1 化合物 1 の構造解析

化合物 1 は白色の非晶質として単離された。

化合物 1 は ESI-TOF-MS において m/z 748 に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークを示した (Fig. 10)。HR-ESI-TOF-MS において m/z 748.5326 (Δ -0.9 mmu) に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークが確認され、分子式 $C_{41}H_{75}NO_9$ と決定した。このことから、分子量が 725、不飽和度が 5 であることが示唆された。比旋光度は $[\alpha]^{26}_D = 12$ ($c = 0.3, MeOH$) であった。

IR スペクトル、 1H -NMR スペクトルおよび ^{13}C -NMR スペクトルなどの各種スペクトルを用い、Fig. 14 で示している部分構造を解析した

(Fig.11-14; Table 1)。また、メタノリシスによって、化合物 1 の脂肪酸部分およびスフィンゴイド部分のアルキル鎖の長さを決定した (Fig. 15)。以上のデータに加えて、スペクトルデータ文献値との比較から、化合物 1 は cordycerebroside A であると同定した。³⁰⁾



cordycerebroside A

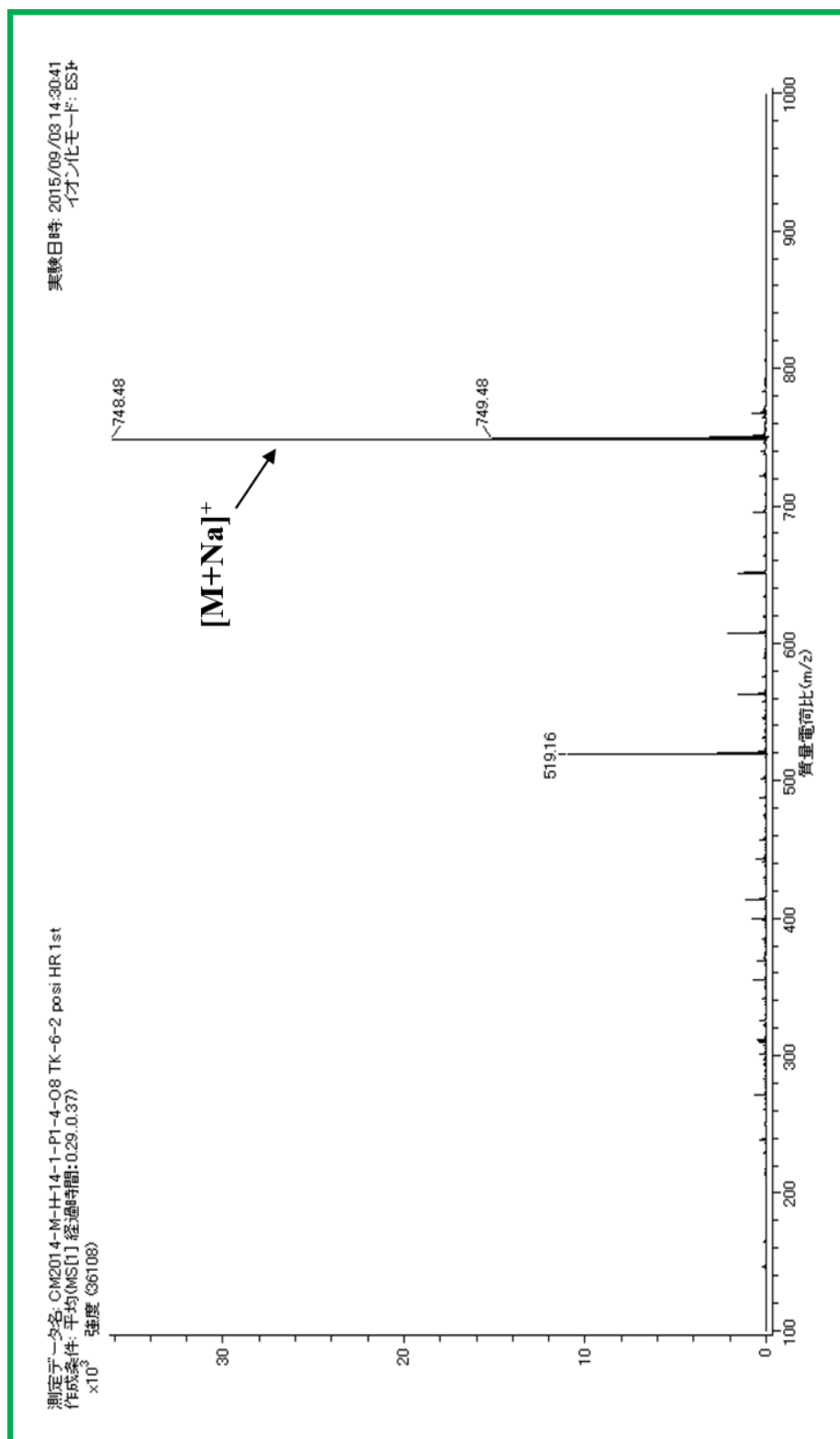


Fig. 10. ESI-TOF-MS (positive) spectrum of compound 1

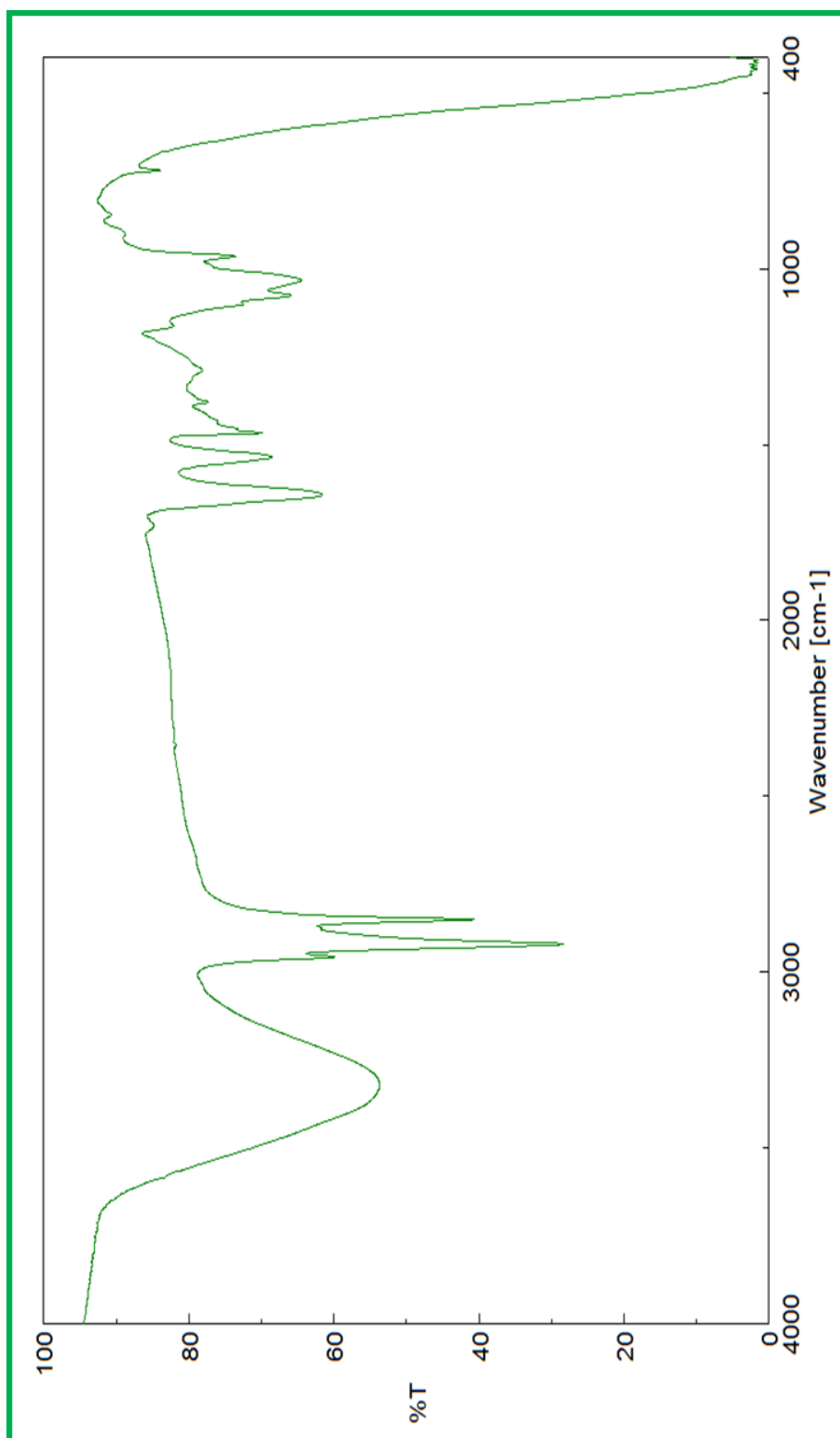


Fig. 11. IR spectrum of compound 1

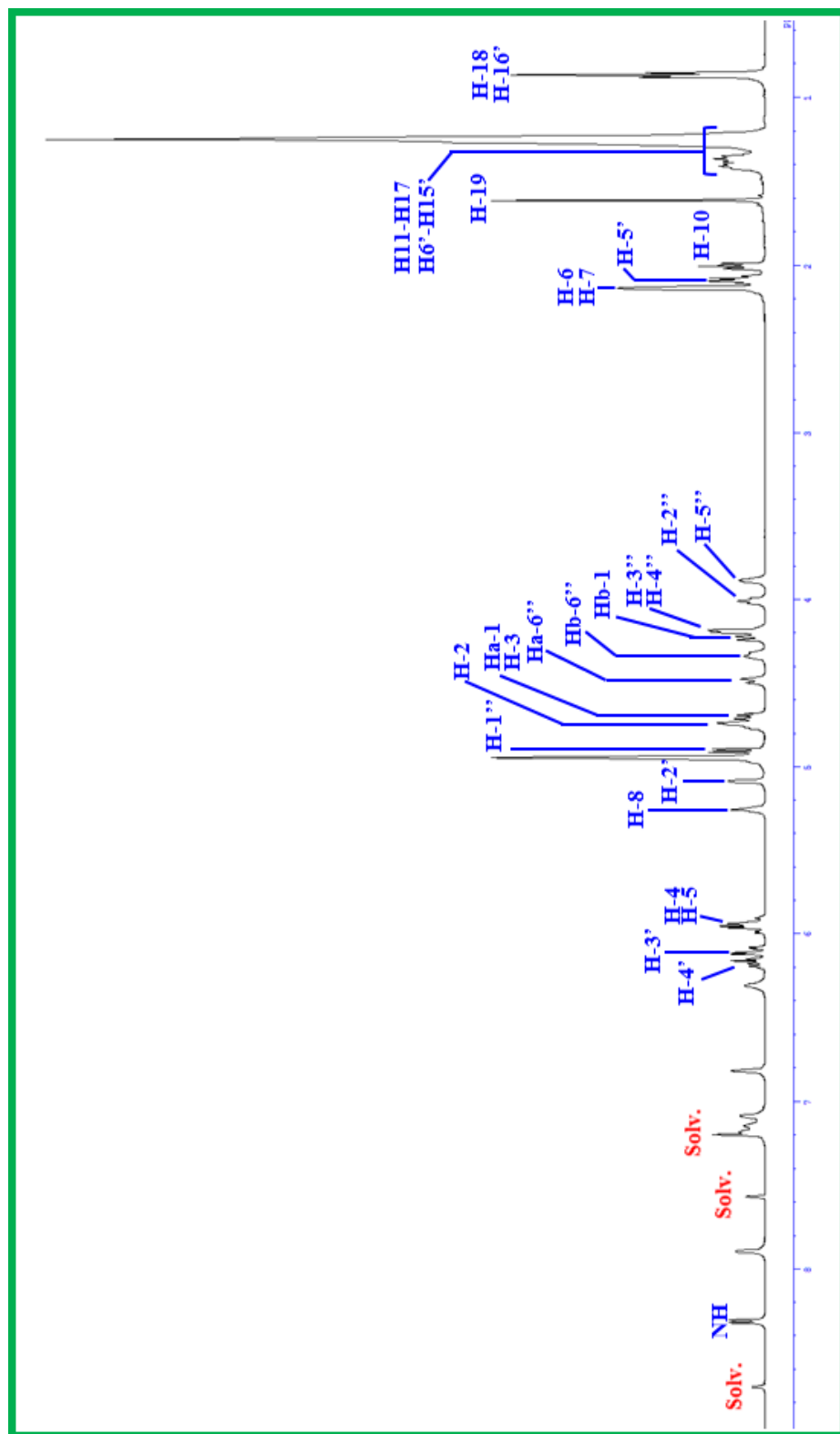


Fig. 12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **1** (in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

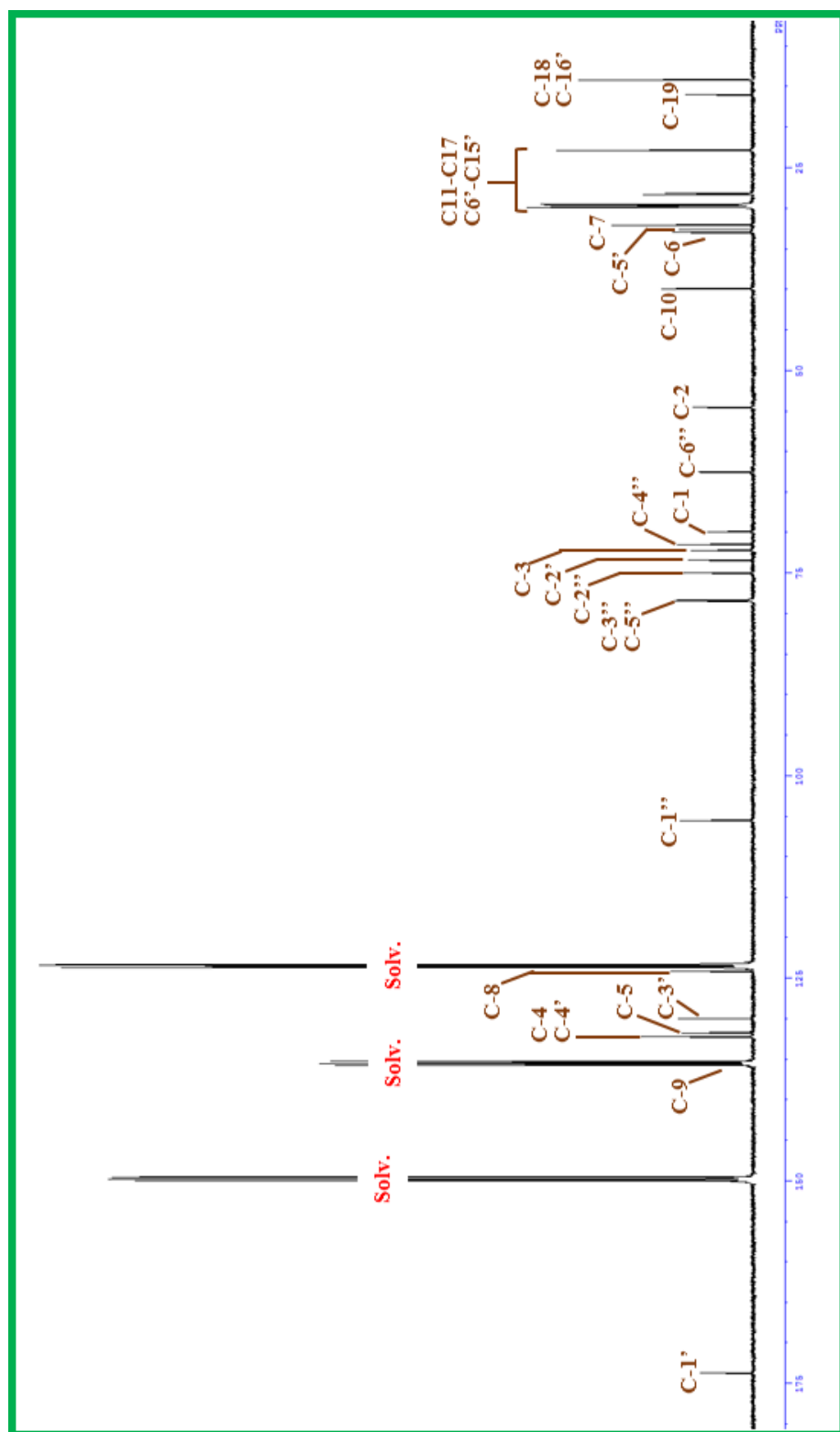


Fig. 13. ^{13}C -NMR spectrum of compound 1 (in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

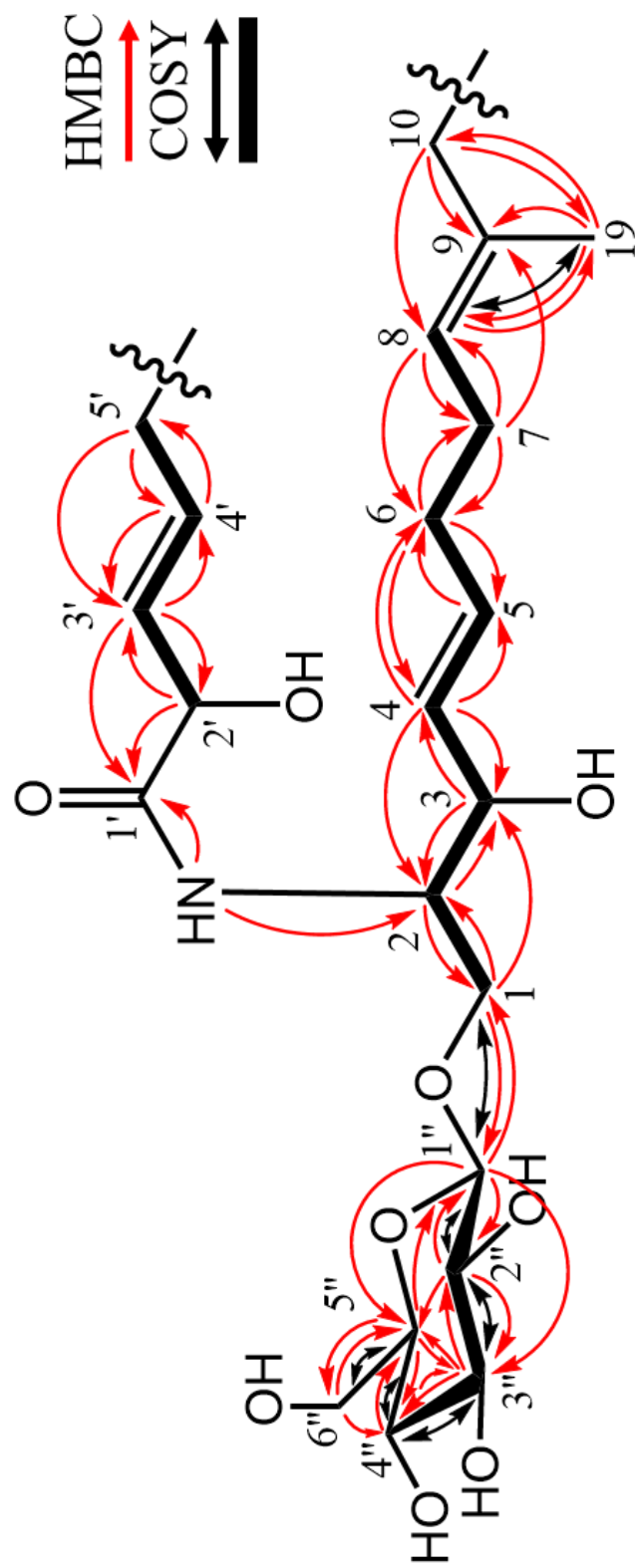


Fig. 14. Structure analysis of the partial structure of compound 1 by spectra data

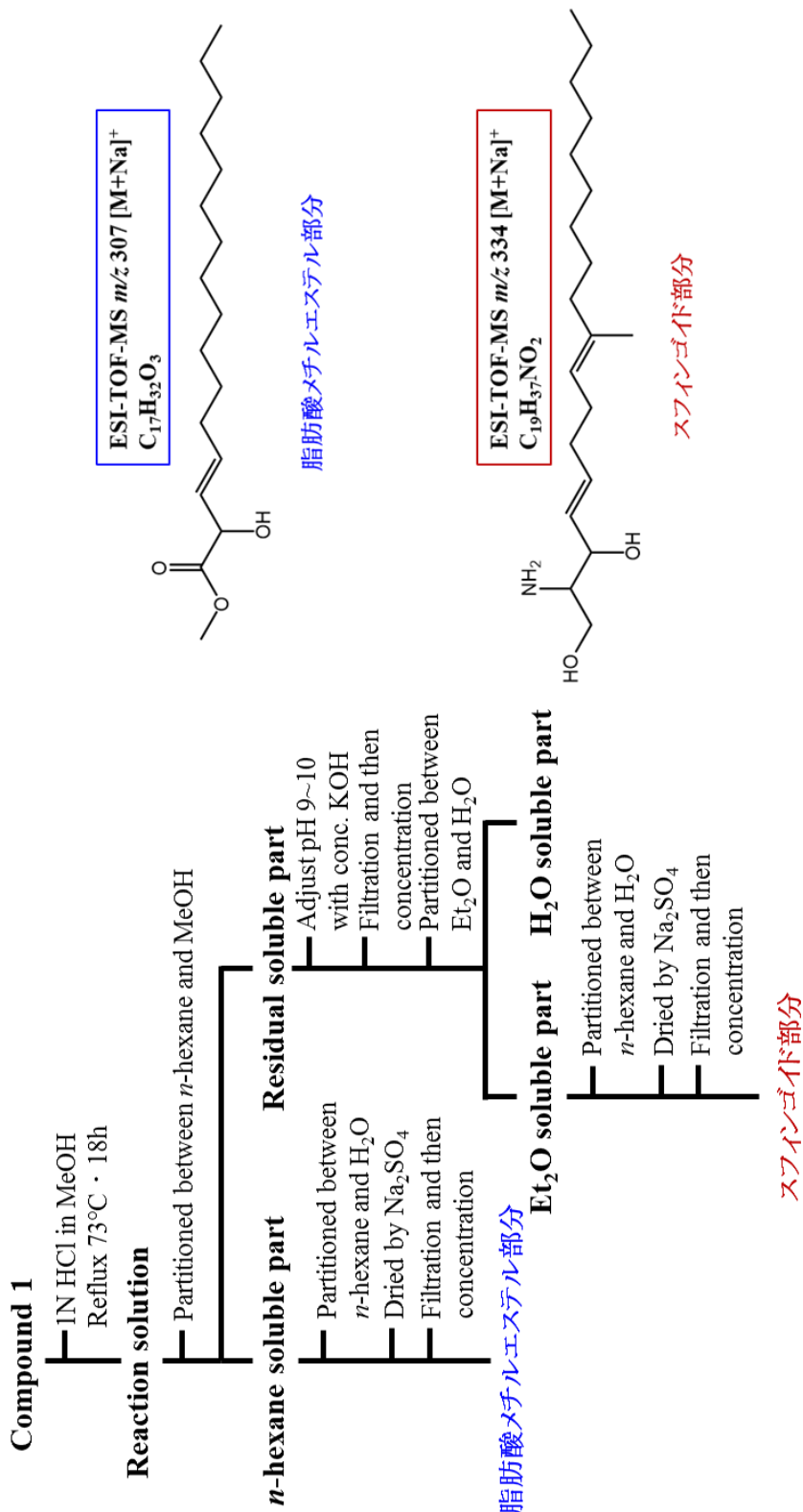
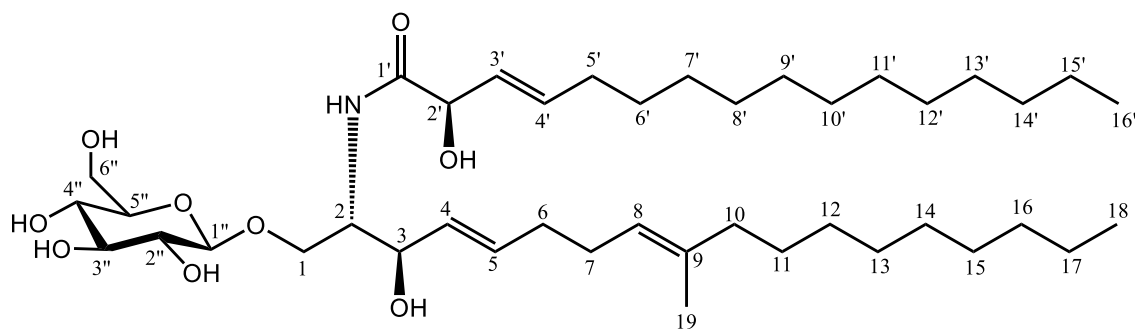


Fig. 15. Methanalysis of compound 1

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data for **1** (in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

Position	^1H δ (multiplicity, J in Hz)	^{13}C δ	COSY ^a	HMBC ^b
NH	8.32 (d; 8.24)		2	2, 1'
1	4.73 (m) : Ha 4.23 (m) : Hb	69.9	2, 1''	2, 3, 1''
2	4.76 (m)	54.7	1, 3, NH	1, 3
3	4.73 (m)	72.3	2, 4	2, 4
4	5.97 (m)	132.2	3, 5	2, 3, 5, 6
5	5.94 (m)	131.8	4, 6	6
6	2.14 (m)	33.0	5, 7	4, 5, 7
7	2.14 (m)	28.2	6, 8	6, 8, 9
8	5.26 (m)	124.2	19	6, 7, 19
9		135.5		
10	2.01 (m)	39.9		8, 9, 19
11-17	1.20-1.41	22.9-29.7		
18	0.88 (s)	14.3		
19	1.62 (s)	16.1	8	8, 9, 10
1'		173.8		
2'	5.09 (br. s)	73.4	3'	1', 3'
3'	6.10 (m)	130.0	2', 4'	1', 2', 4'
4'	6.16 (m)	132.3	3', 5'	3', 5'
5'	2.09 (m)	32.7	4'	3', 4'
6'-15'	1.20-1.41	22.9-29.7		
16'	0.87 (s)	14.3		
1''	4.90 (d; 7.63)	105.6	1, 2''	1, 2'', 3'', 5''
2''	4.01 (m)	75.1	1'', 3''	1'', 3'', 5''
3''	4.20 (m)	78.4	2'', 4''	2'', 4'', 5''
4''	4.19 (m)	71.5	3'', 5''	3'', 5''
5''	3.89 (m)	78.5	4'', 6''	1'', 3'', 4'', 6''
6''	4.49 (m) : Ha 4.33 (m) : Hb	62.4	5''	4'', 5''

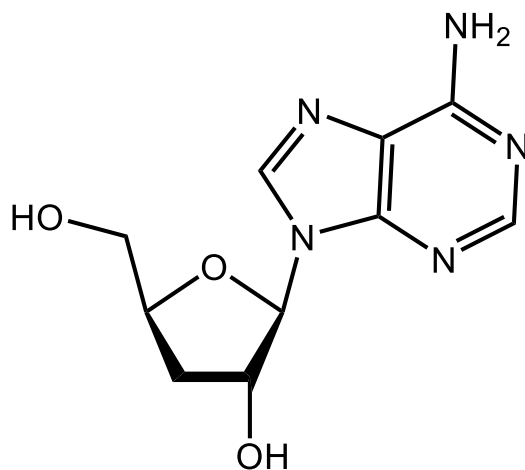


2-2-2 化合物 2 の構造解析

化合物 2 は白色の非晶質として単離された。

化合物 2 は ESI-TOF-MS において m/z 274 に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークを示した (Fig. 16)。HR-ESI-TOF-MS において m/z 274.0890 (Δ -2.59 mmu) に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークが確認され、分子式 $C_{10}H_{13}N_5O_3$ と決定した。このことから、分子量が 251、不飽和度が 7 であることが示唆された。

1H -NMR スペクトルおよび ^{13}C -NMR スペクトルを cordycepin 標品のスペクトルと比較したところ、ケミカルシフト値が一致であったため、化合物 2 を cordycepin (3'-deoxyadenosine) と同定した (Fig. 17, 18; Table 2)。



cordycepin

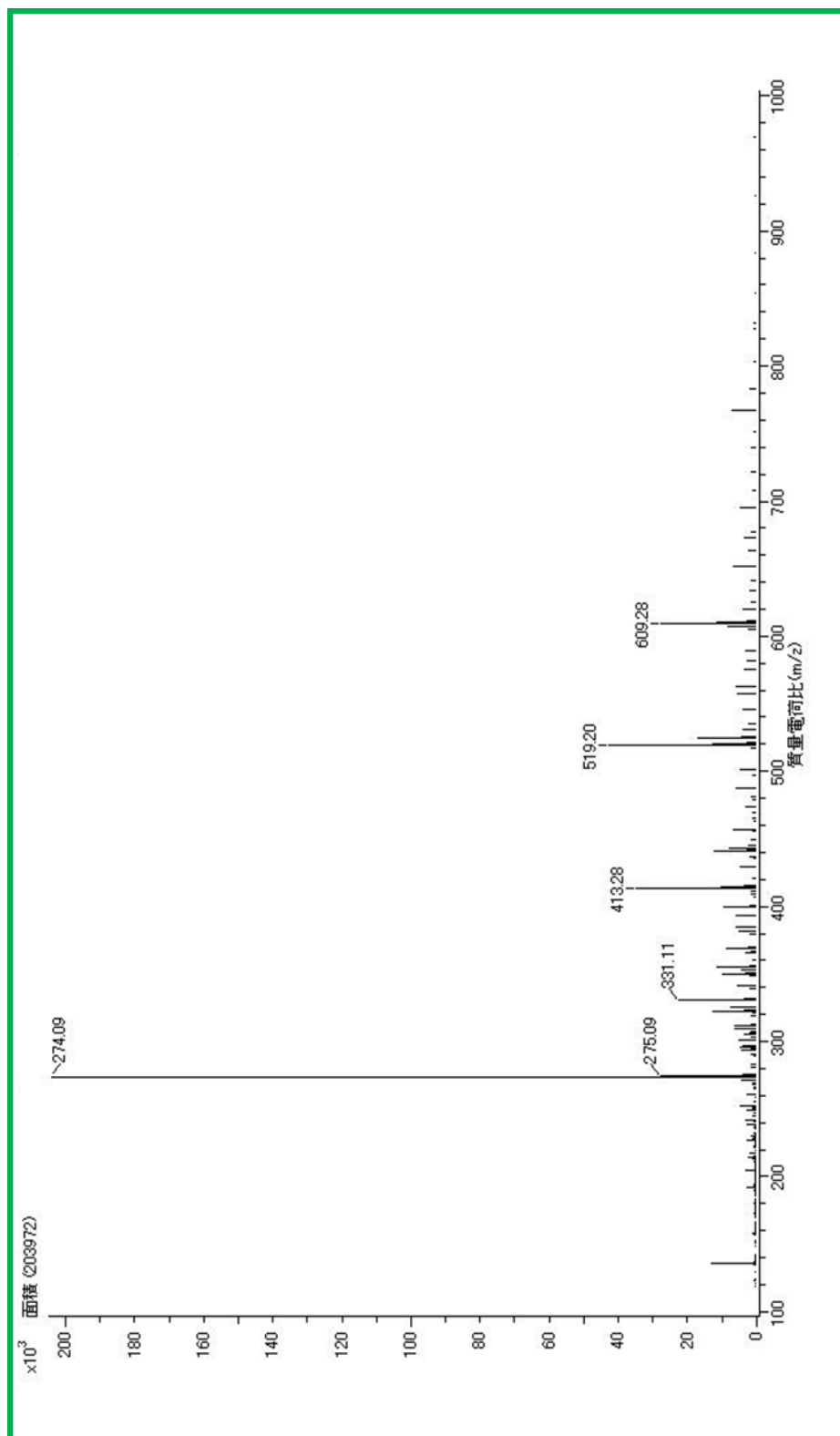


Fig. 16. ESI-TOF-MS (positive) spectrum of compound 2

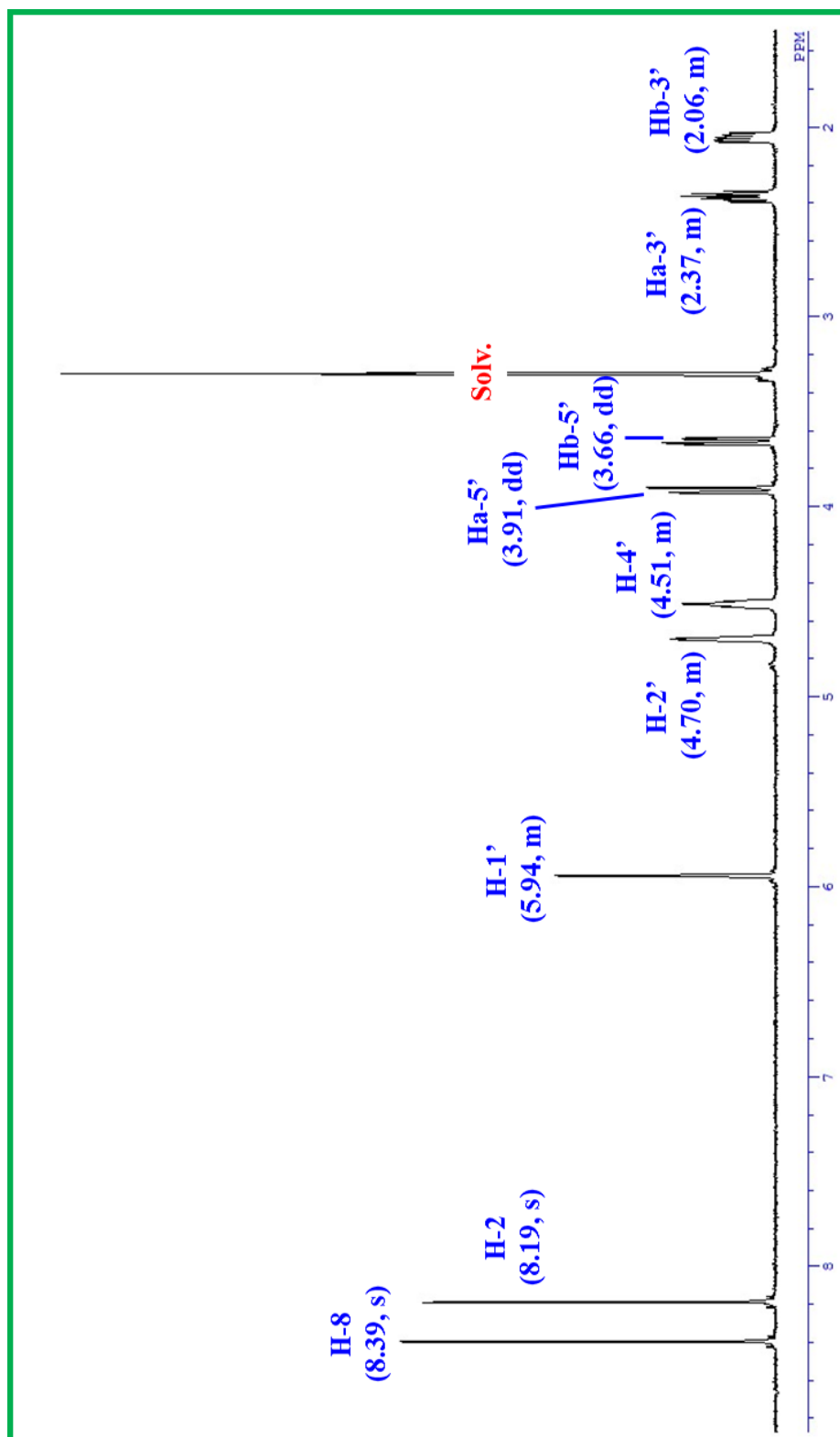


Fig. 17. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2 (in CD_3OD)

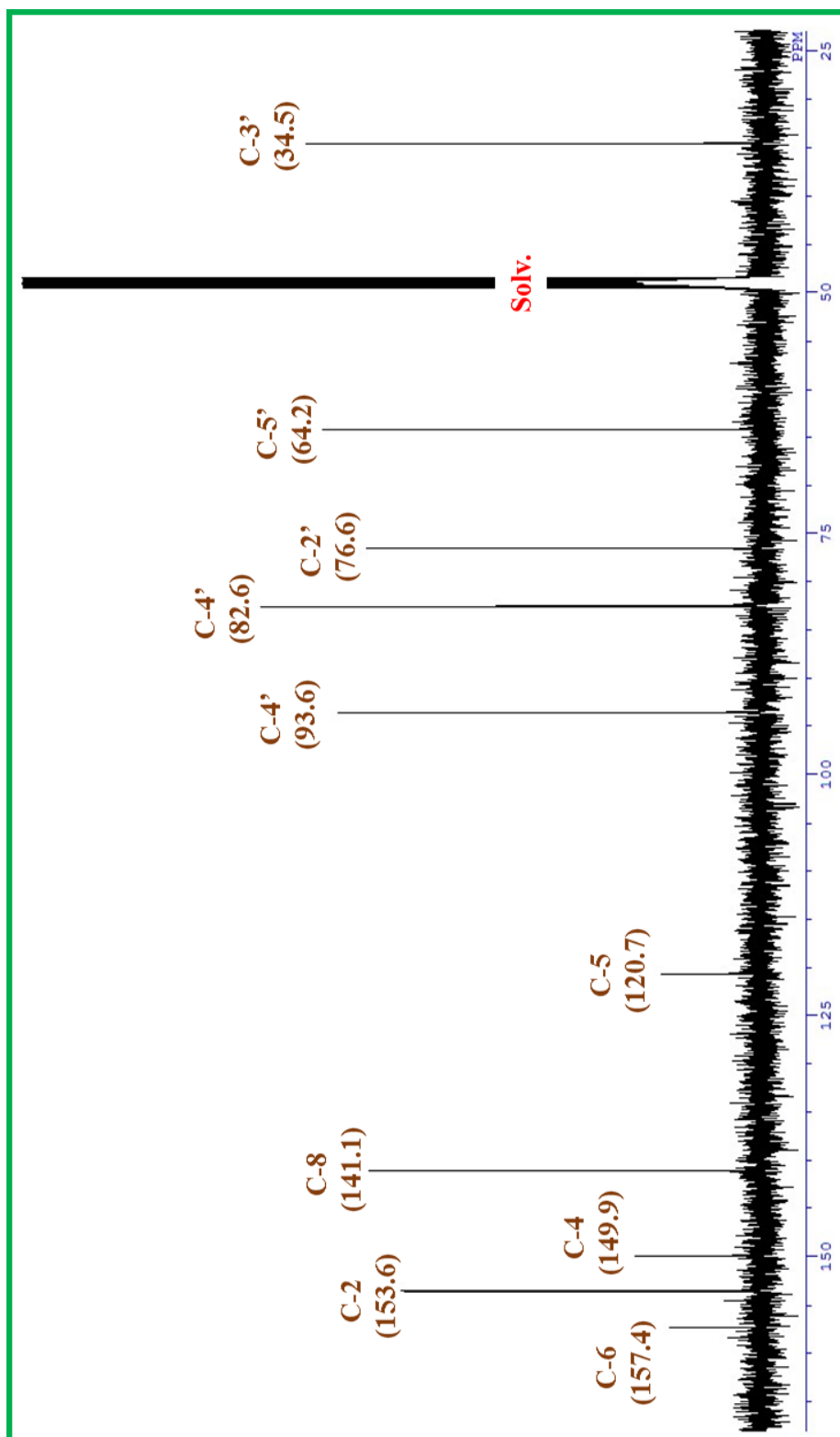
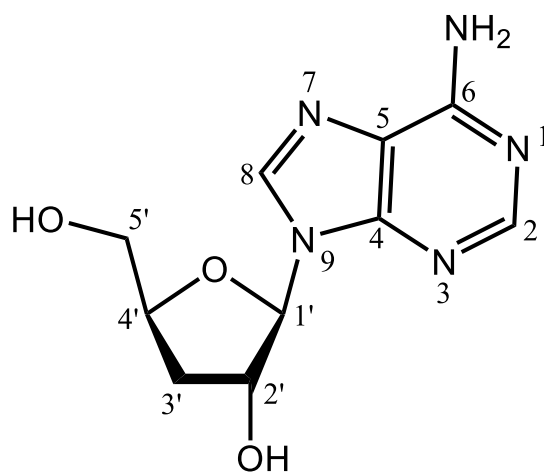


Fig. 18. ^{13}C -NMR spectrum of compound 2 (in CD_3OD)

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data for **2** (in CD_3OD)

Position	^1H δ (multiplicity, J in Hz)	^{13}C δ
1		
2	8.19 (s)	153.6
3		
4		149.9
5		120.7
6		157.4
7		
8	8.39 (s)	141.1
9		
1'	5.94 (d; 2.6)	93.6
2'	4.70 (m)	76.6
3'	2.37 (m) : Ha 2.06 (m) : Hb	34.5
4'	4.51 (m)	82.6
5'	3.91 (dd; 12.3, 2.6) : Ha 3.66 (dd; 12.3, 3.3) : Hb	64.2

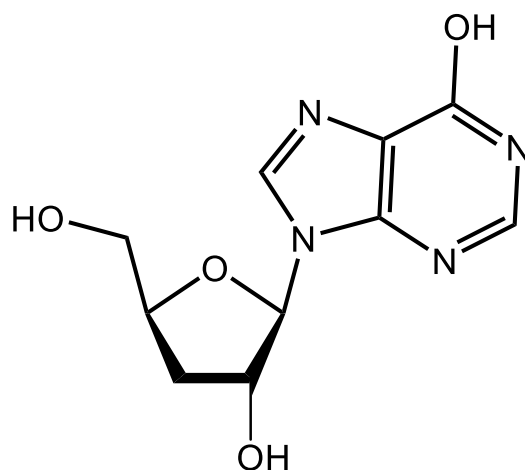


2-2-3 化合物 3 の構造解析

化合物 3 は白色の非晶質として単離された。

化合物 3 は ESI-TOF-MS において m/z 275 に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークを示した (Fig. 19)。HR-ESI-TOF-MS において m/z 275.0751 (Δ -0.5 mmu) に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークが確認され、分子式 $C_{10}H_{12}N_4O_4$ と決定した。このことから、分子量が 252、不飽和度が 9 であることが示唆された。

IR、 1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトルなどの各種スペクトルから、化合物 3 を 3'-deoxyinosine と同定した (Fig. 20-22; Table 3)。



3'-deoxyinosine

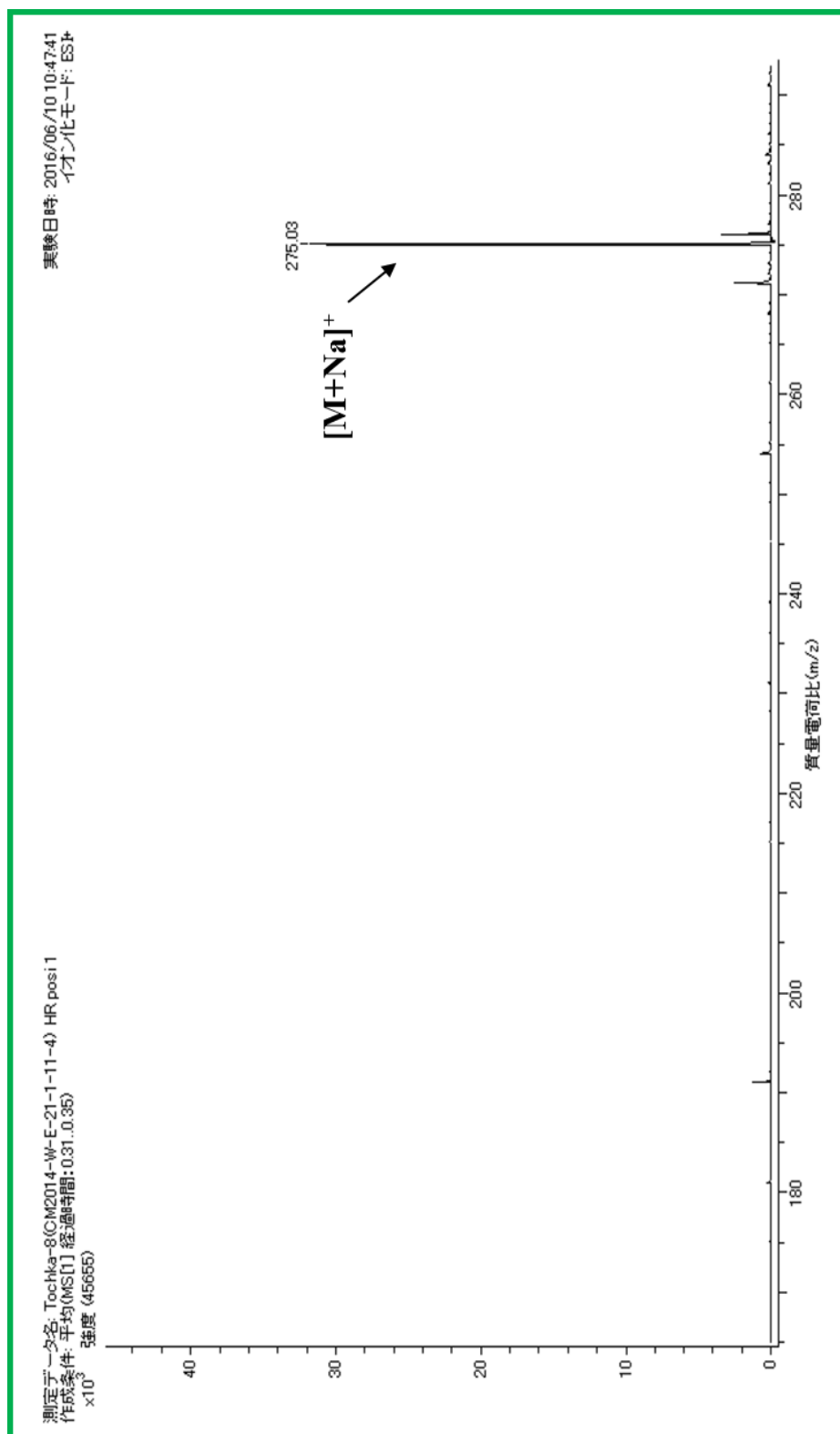


Fig. 19. ESI-TOF-MS (positive) spectrum of compound 3

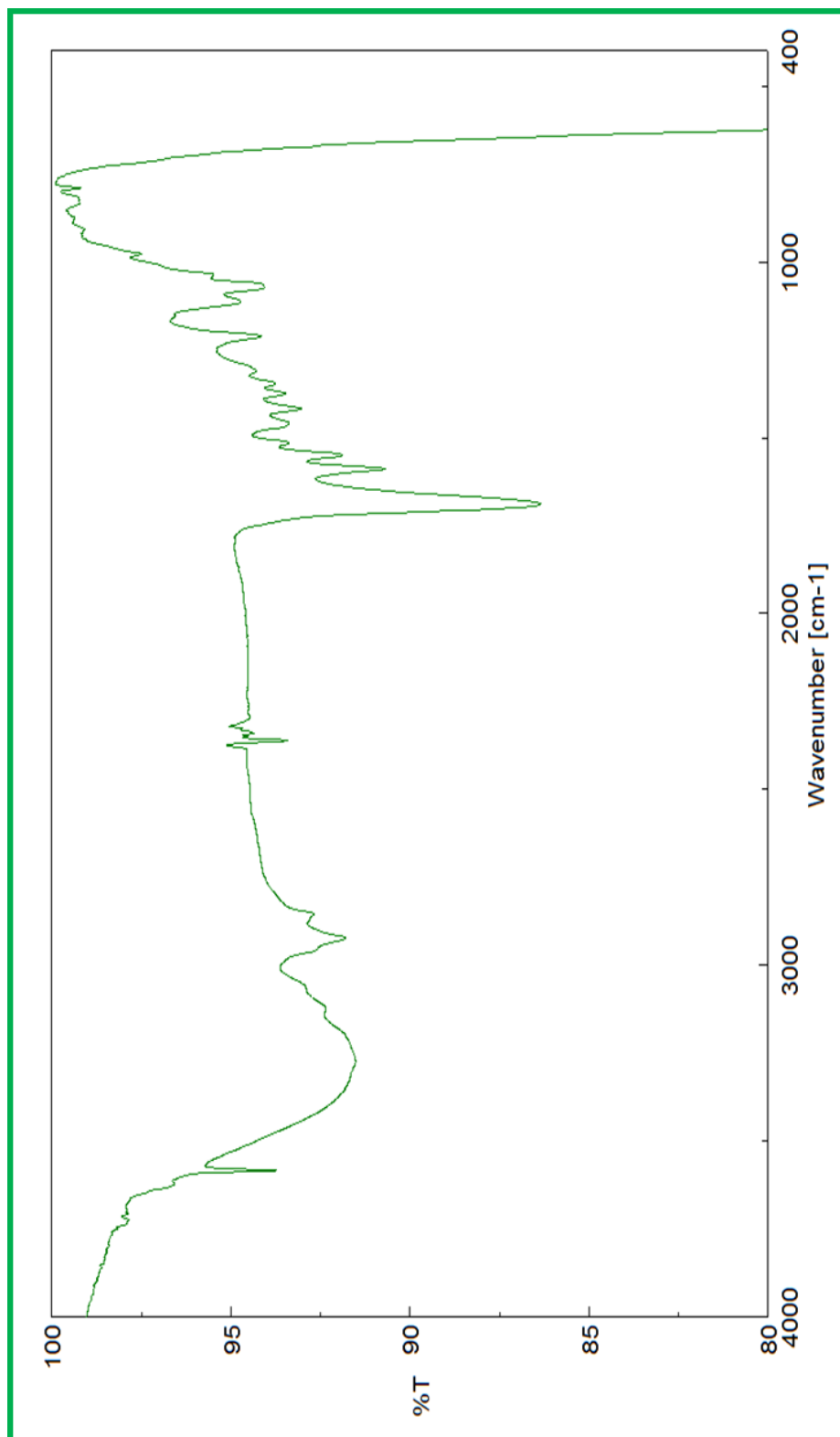


Fig. 20. IR spectrum of compound 3

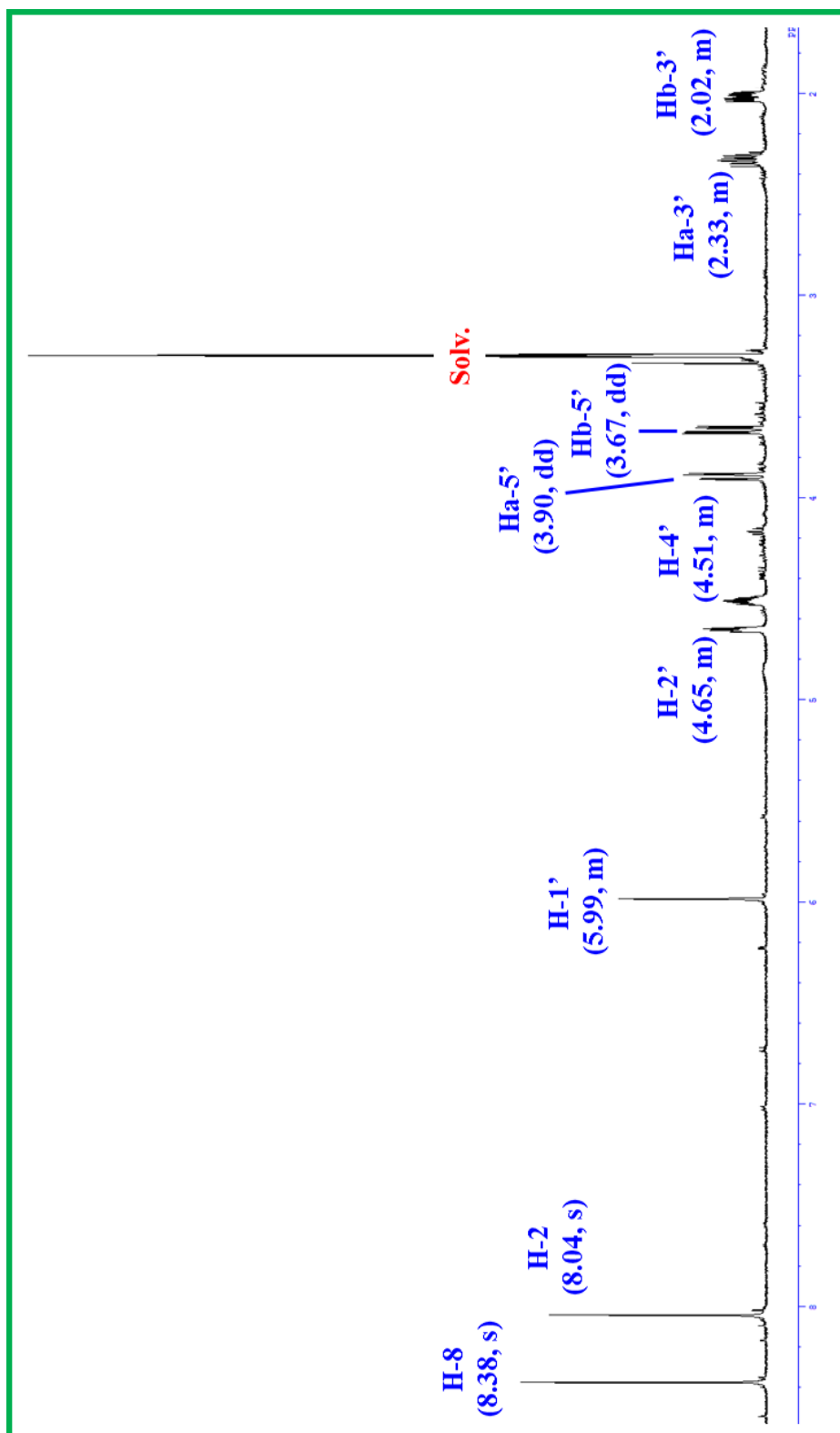


Fig. 21. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 3 (in CD_3OD)

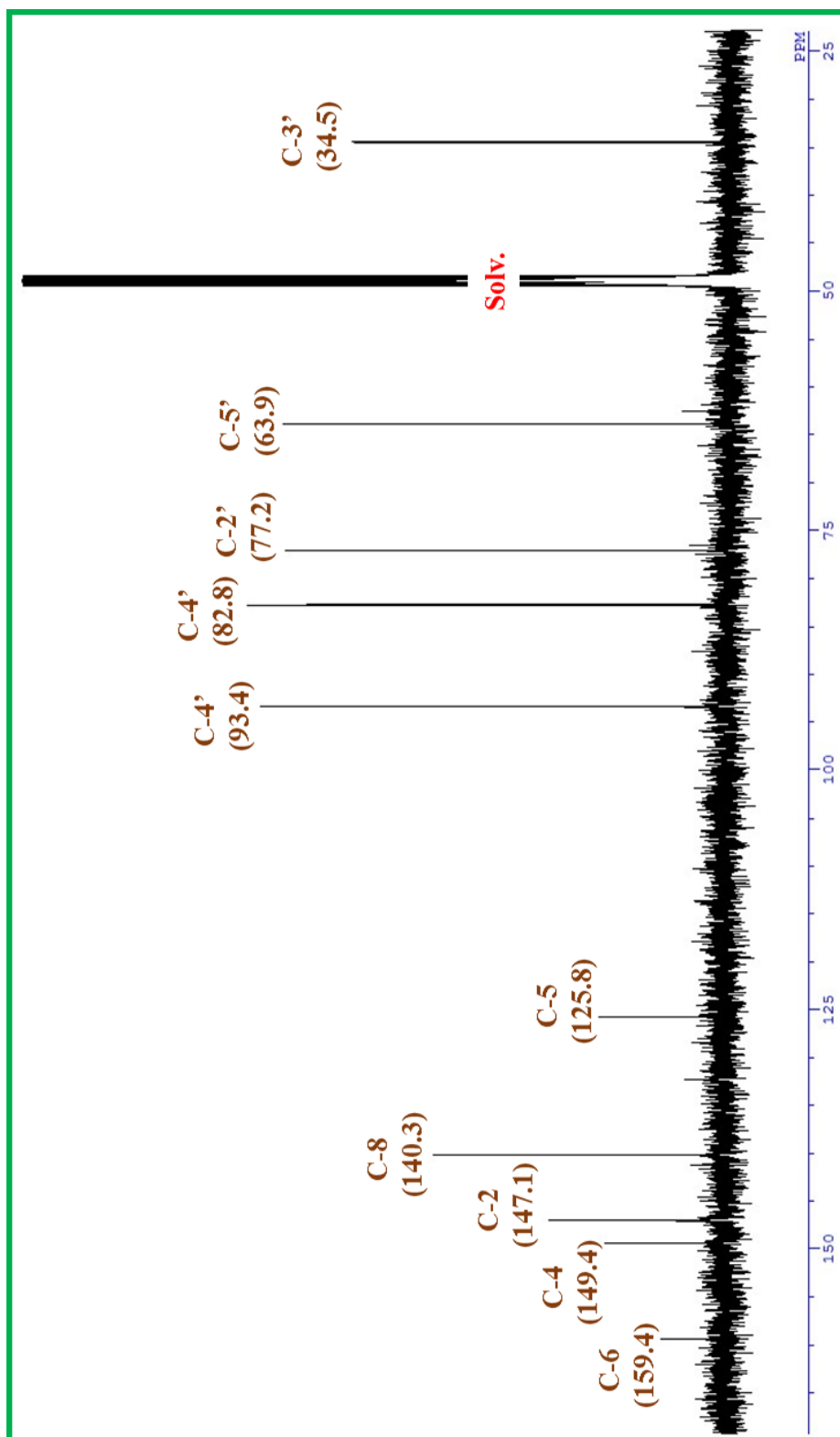
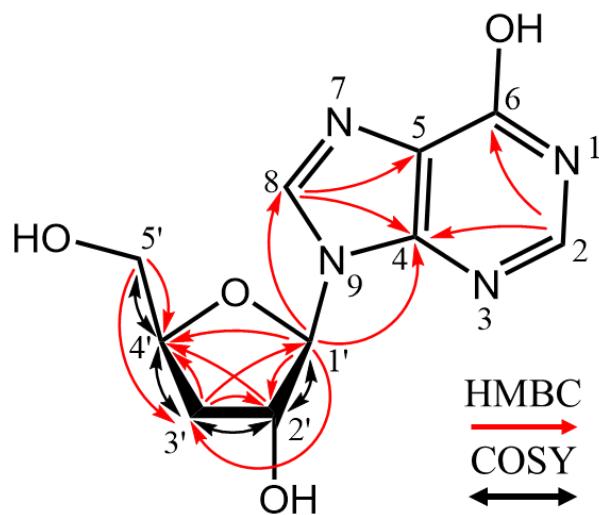


Fig. 22. ^{13}C -NMR spectrum of compound 3 (in CD_3OD)

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data for **3** (in CD_3OD)

Position	^1H δ (multiplicity, J in Hz)	^{13}C δ	COSY	HMBC
1				
2	8.04 (s)	147.1		4, 6
3				
4		149.4		
5		125.8		
6		159.4		
7				
8	8.38 (s)	140.3		4, 5
9				
1'	5.99 (d; 2.1)	93.4	2'	4, 8, 2', 3', 4'
2'	4.65 (m)	77.2	1', 3'	4'
3'	2.33 (m) : Ha 2.02 (m) : Hb	34.5	2', 4'	1', 2', 4'
4'	4.51 (m)	82.8	3', 5'	
5'	3.90 (dd; 12.2, 2.7) : Ha 3.67 (dd; 12.2, 3.7) : Hb	63.9		3', 4'

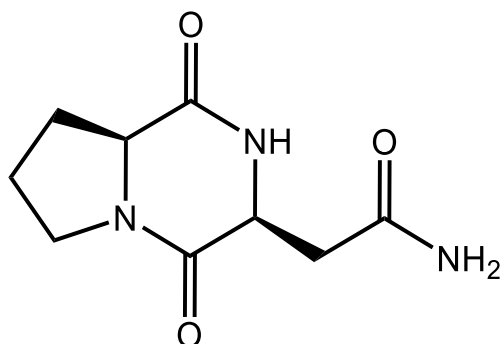


2-2-4 化合物 4 の構造解析

化合物 4 は白色の結晶として単離された。

化合物 4 は ESI-TOF-MS において m/z 234 に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークを示した (Fig. 23)。HR-ESI-TOF-MS において m/z 234.0847 (Δ -0.74 mmu) に $[M+Na]^+$ の分子イオンピークが確認され、分子式 $C_9H_{13}N_3O_3$ と決定した。このことから、分子量が 211、不飽和度が 5 であることが示唆された。比旋光度は $[\alpha]^{23}_D = -55$ ($c = 0.1$, pyridine) であった。

1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトルなどの各種スペクトルから、化合物 4 を cyclo(L-Pro-L-Asn) と同定した (Fig. 24, 25; Table 4)。



cyclo(L-Pro-L-Asn)

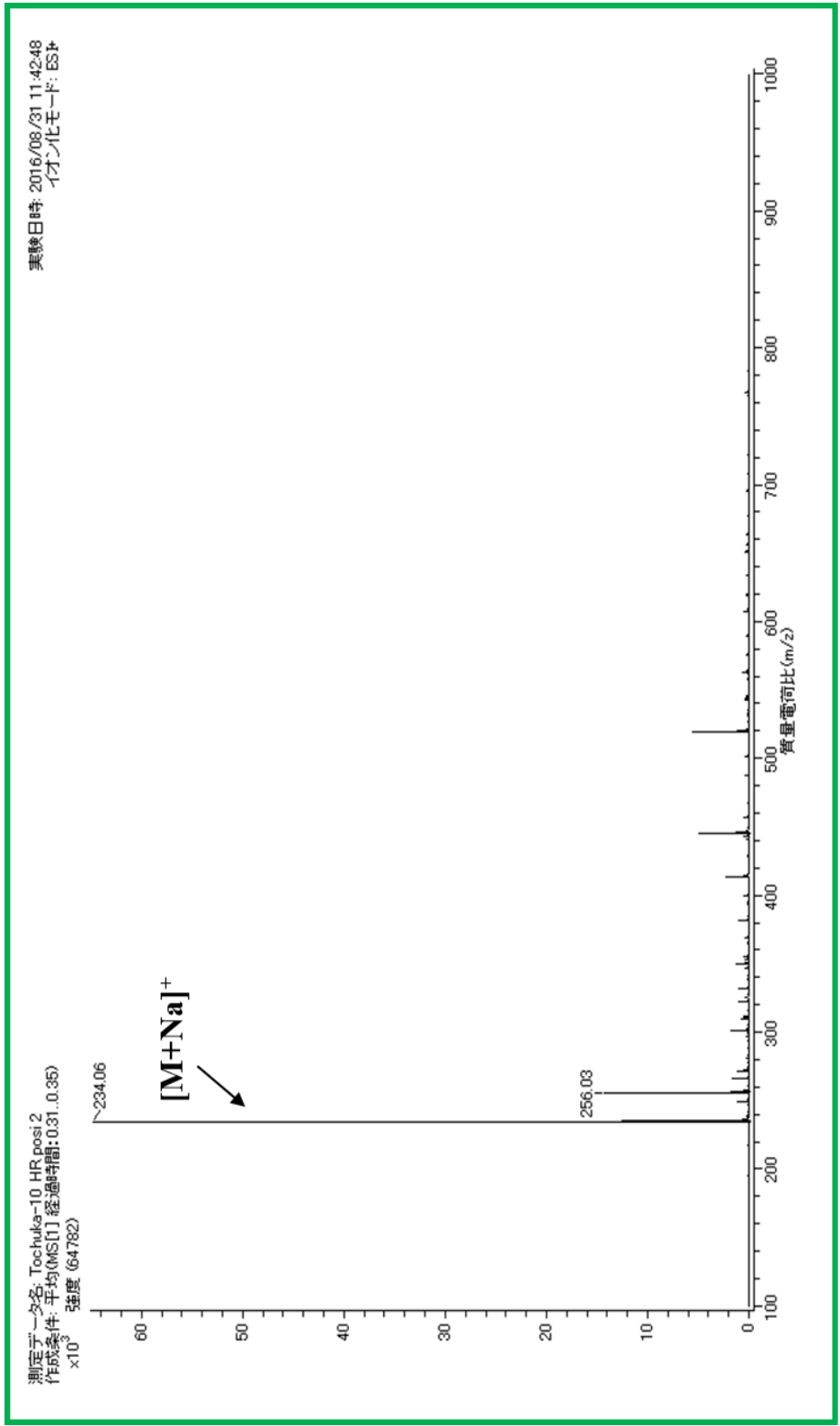


Fig. 23. ESI-TOF-MS (positive) spectrum of compound 4

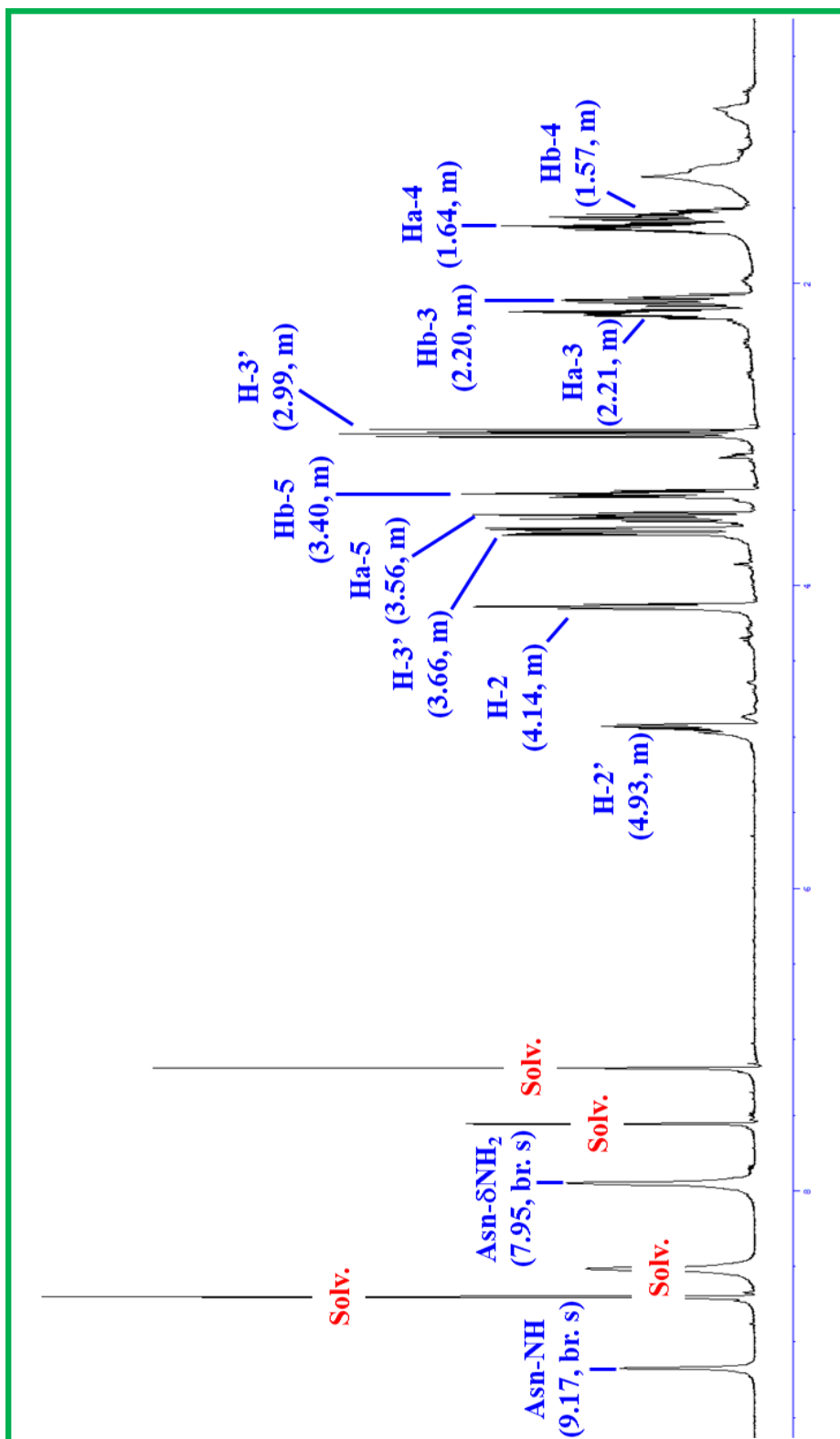


Fig. 24. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 4 (in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

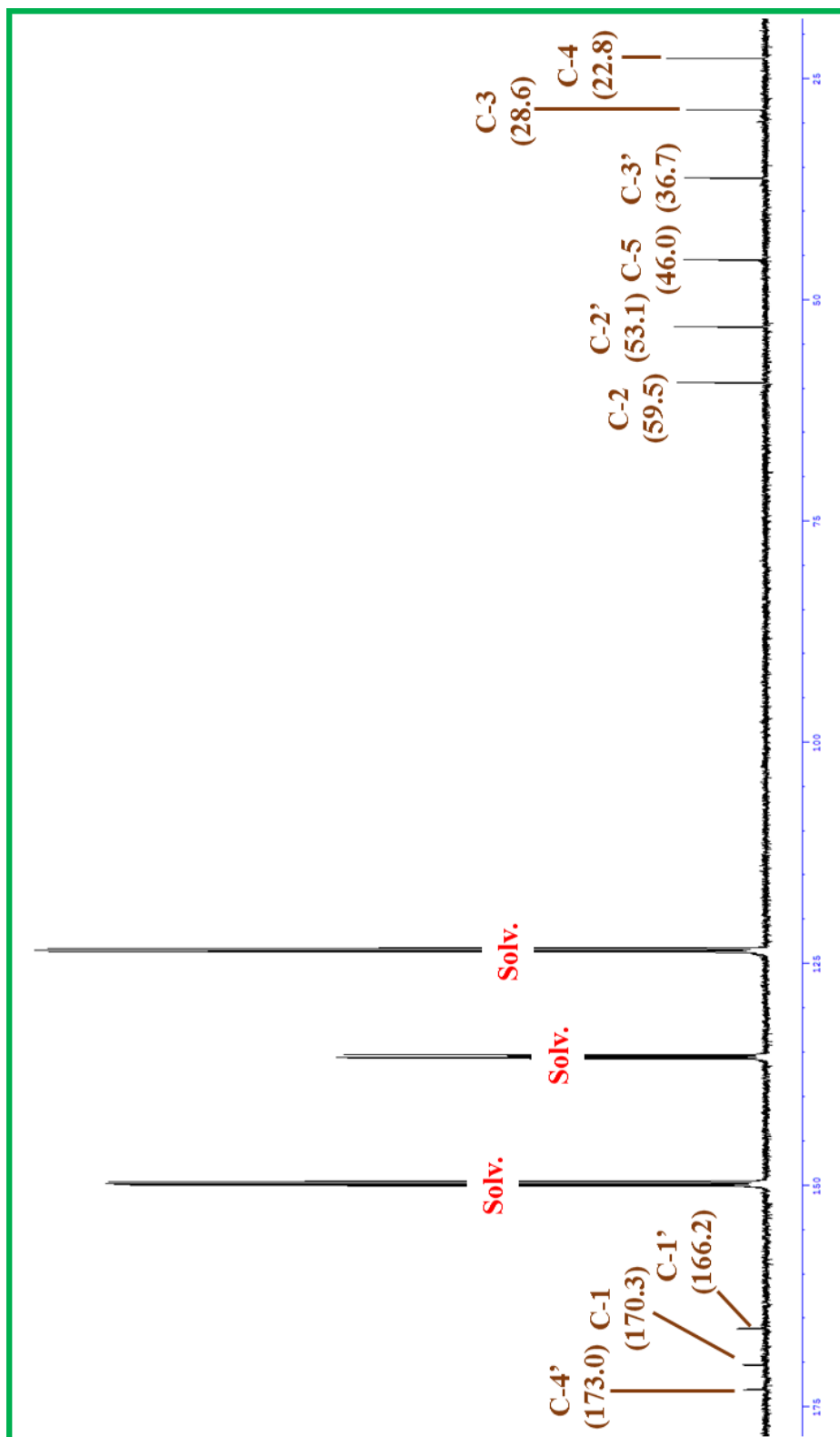
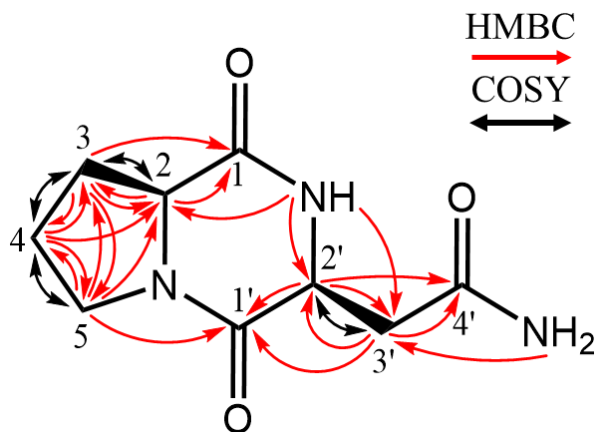


Fig. 25. ^{13}C -NMR spectrum of compound 4 (in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data for **4** (in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

Position	^1H δ (multiplicity, J in Hz)	^{13}C δ	COSY	HMBC
Pro-CO (1)		170.3		
Pro- αCH (2)	4.14 (dd; 7.5, 8.6)	59.5	3	1, 3
Pro- βCH_2 (3)	2.21 (m) : Ha 2.20 (m) : Hb	28.6	2, 4	1, 2, 4, 5
Pro- γCH_2 (4)	1.64 (m) : Ha 1.57 (m) : Hb	22.8	3, 5	2, 3, 5
Pro- δCH_2 (5)	3.56 (m) : Ha 3.40 (m) : Hb	46.0	4	2, 3, 4, 1'
Asn-NH	9.17 (br. s)			2, 2', 3'
Asn-CO (1')		166.2		
Asn- αCH (2')	4.93 (m)	53.1	3'	1', 3', 4'
Asn- βCH_2 (3')	3.66 (m) : Ha 2.99 (m) : Hb	36.7	2'	1', 2', 4'
Asn- γCO (4')		173.0		
Asn- δNH_2	7.95 (s)			3'



第 3 節 癌細胞に対する細胞毒性活性

化合物 **2** および **3** の癌細胞 (A549, PANC-1 および MCF-7) に対する細胞毒性活性試験を行った。

化合物 **2** および **3** は PANC-1 と MCF-7 癌細胞に対して、類似の濃度依存の細胞毒性を示した。活性試験では、30 μM で処理した時に、両化合物とも最も強い細胞毒性を示した。A549 癌細胞を用いた活性試験では、化合物 **2** は濃度依存的に細胞毒性を示した一方、化合物 **3** は弱い細胞毒性を示した (Fig. 26)。

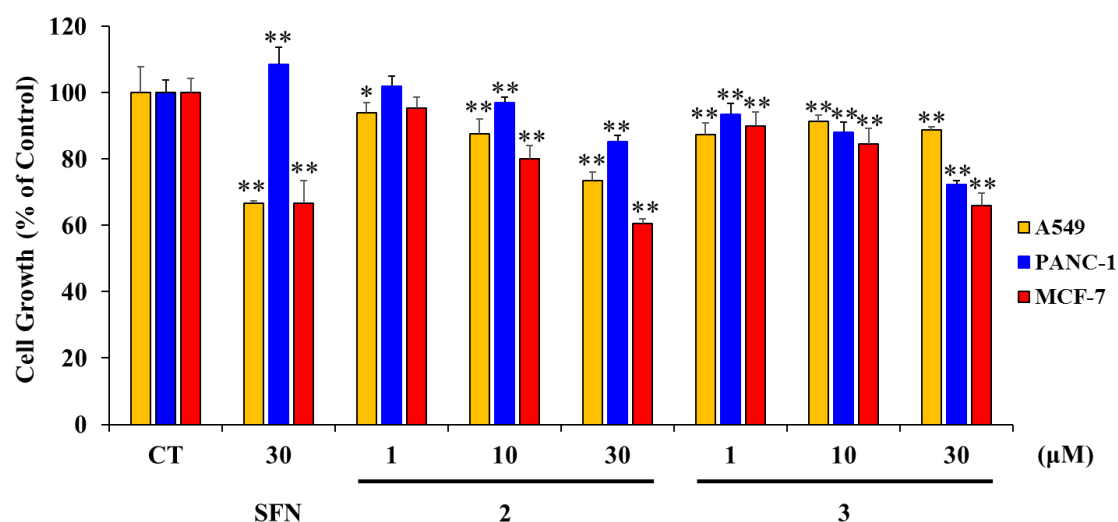


Fig. 26. Cytotoxicity against cancer cells

Note: Orange, blue and red columns indicate the cell viability of the A549, PANC-1 and MCF-7 cancer cells, respectively. The concentrations of compounds 2 and 3 were adjusted to be 1 μM, 10 μM and 30 μM, respectively. Sulforaphane (SFN; 30 μM) was used as positive control. All data are shown as means ± SD (n=5-6). Differences among the all groups were evaluated using a 1-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnet test.* indicates significant difference compared with CT ($P < 0.05$); ** indicates significant difference compared with CT groups ($P < 0.01$). Sulforaphane (30 μM) was used as the positive control.

第 4 節 植物成長調節活性

化合物 **1-3** のレタスに対する成長調節活性試験を行った。

化合物 **2** は 100 nmol/paper と 1 μ mol/paper の条件下でレタスの胚軸および根の伸長に有意に阻害した。化合物 **3** は 100 nmol/paper と 1 μ mol/paper の条件下でレタスの根の伸長に有意に阻害した。化合物 **1** は活性を示さなかった (Fig. 27)。

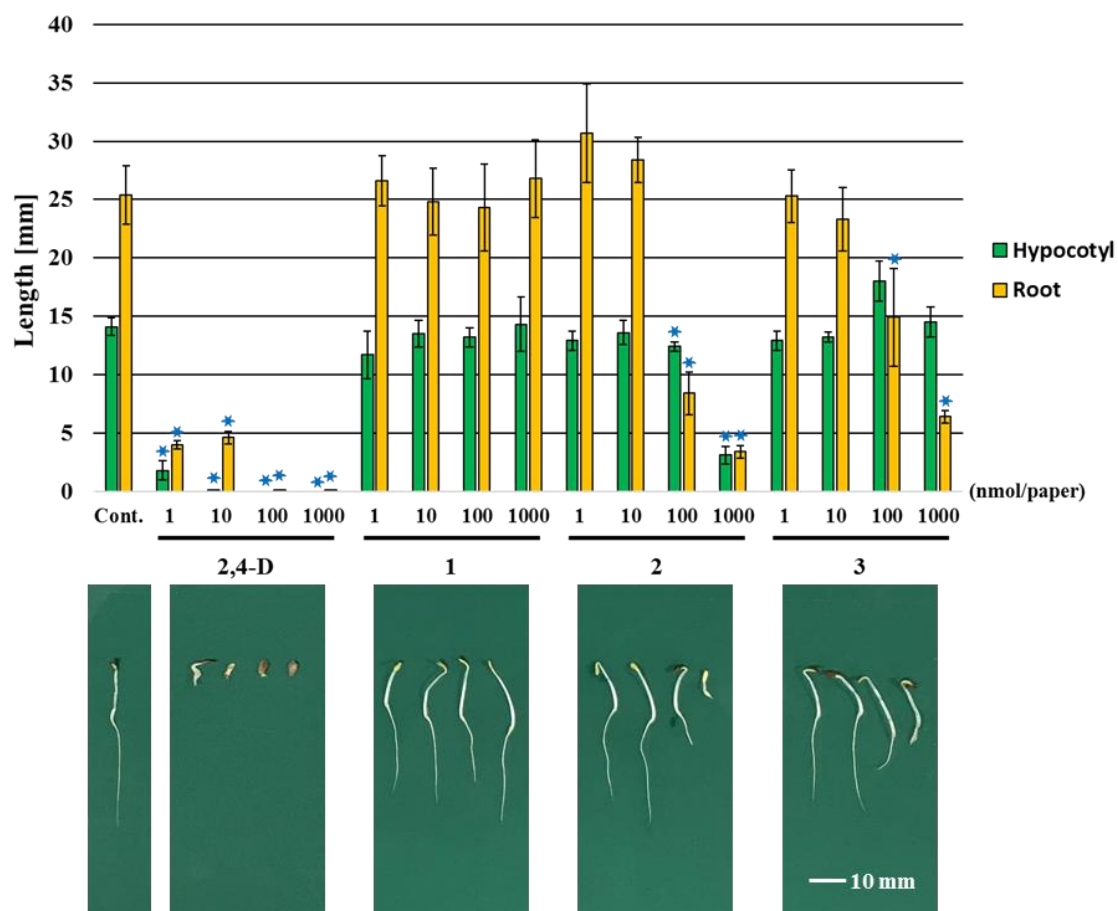


Fig. 27. Growth regulating activity against lettuce

Note: Green and orange columns indicate the length of the hypocotyl and the root, respectively. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) was used as positive control. Results are the mean \pm standard deviation (n=5). [$*p < 0.01$ (growth inhibition)]

第 5 節 化合物 1-4 の考察

化合物 1 は玄米培地で培養され、形成した *C. militaris* の子実体から初めて単離された化合物であり、RAW 264.7 細胞（マクロファージ細胞）の LPS (Lipopolysaccharide) 刺激により産生する NO の量を抑制する活性が報告されている。³⁰⁾

化合物 2 は培養した *C. militaris* 菌糸体から初めて単離された化合物である。²⁷⁾ 同属の *C. sinensis*、*C. cicadae* および *Aspergillus nidulans* からの単離が報告されているが、他からの単離は報告されていない。⁵⁴⁻⁵⁷⁾ また、この化合物は抗酸化活性や抗癌活性などの生物活性が報告されている。⁵⁶⁻⁵⁹⁾

化合物 3 は合成品として初めて得られた。⁶⁰⁾ 化合物 2 または 3'-deoxyguanosine が adenosine deaminase によって、化合物 3 に変換されることが報告されている。^{61,62)} 化合物 3 はオクラ (*Abelmoschus esculentus*) からの単離が報告されているが、他からの単離の報告はない。⁶³⁾ また、化合物 3 は *Trypanosoma cruzi*、*Leishmania tropica* などの原虫に対する抗原虫活性を持つ事が報告されている。^{64,65)}

化合物 4 はココア粉末およびチキンエッセンスからの検出が報告されているが、*C. militaris* に感染されたカイコからの単離が初めてである。^{66,67)} また、化合物 4 は *Sphaerisorangium album* からの単離および慢性骨髄性白血病細胞 (K562) に対する細胞毒性が報告されている。⁶⁸⁾

レタスに対する成長調節活性試験では、100 nmol/paper および 1 μ mol/paper で処理した場合、化合物 3 と比較して、化合物 2 はより強い阻害活性を示した。構造活性相関を考えると、化合物 2 と化合物 3 の違いは 6 位の NH₂ と OH であり、化合物 2 の NH₂ がこの活性に深く関与していると考えられる (Fig. 28)。

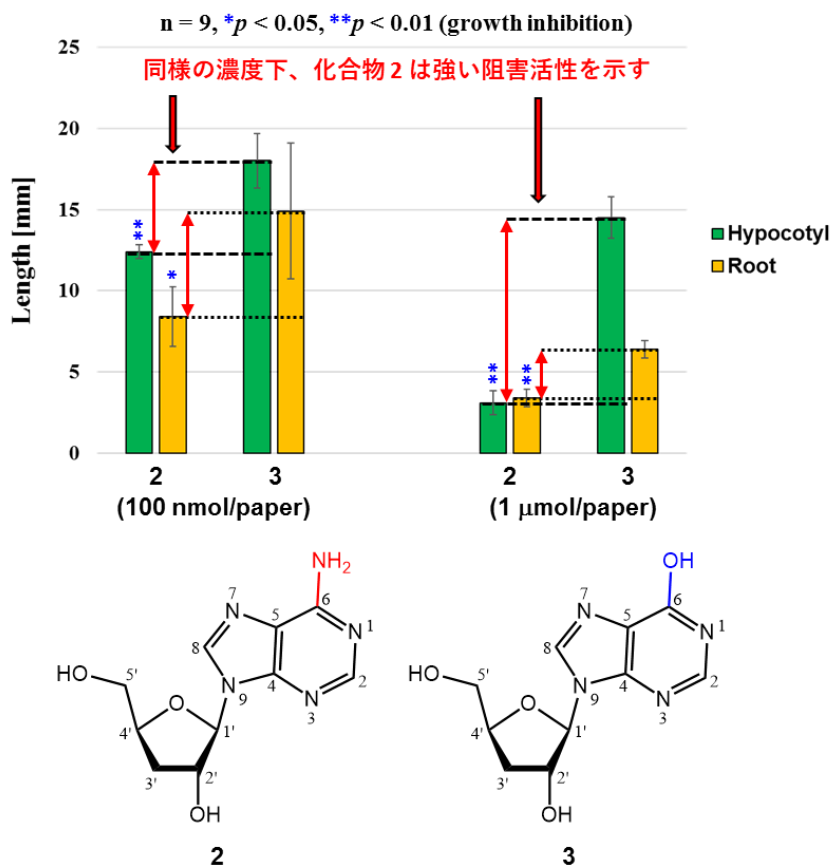


Fig. 28. Structure activity relationship of compounds 2 and 3

Note: Green and orange columns indicate the length of the hypocotyl and the root, respectively. Results are the mean \pm standard deviation (n=9). [* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (growth inhibition)]

第 3 章 実験部

第 1 節 使用機器および材料

3-1-1 機器類

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: AccuTOF LC-plus JMS-T100LP MS Spectrometer (JEOL)

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

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

L-2130 (HITACHI)

PU-987 intelligent Prep. pump (JASCO)

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

MD-2010 Plus Multinavelength Detector (JASCO)

diode Array Detector L-2455 (HITACHI)

Waters 484 Tunable Absorbance Detector (Waters)

Recorder: 807-IT Integrator (JASCO)

Software: Chromatography Data Station ChromNAV (JASCO)

ELITE (HITACHI)

Interface: LC-NetII/ADC (JASCO)

Column: Cosmosil PBr (nacalai tesque)

Develosil C30-UG-5 (Nomura chemical Co., Ltd.)

Senshu Pak AQ (Senshu Scientific Co., Ltd.)

Incubator: GROWTH CABINET (SANYO)

Centrifugal Evaporator: EZ-2 plus HCl COMPATIBLE (genevac)

Silica gel: 60N for column chromatography (Kanto Chemical Co., Inc.)

ODS gel: 60N for column chromatography (Kanto Chemical Co., Inc.)

Sep-Pak: Silica cartridge (Waters)

ODS cartridge (Waters)

TLC: DC-Alufolien Kieselgel 60F254 (Merck)

DC-Alufolien RP-18F254 (Merck)

Preparative TLC: DC-Alufolien Kieselgel 60F254 (Merck)

3-1-2 材料

株式会社にはら総合研究所より購入した冬虫夏草 [人工的にカイコ (*Bombyx mori*) に感染させて発生させたサナギタケ (*Cordyceps militaris*)] を使用した。

植物成長調節活性試験はレタスの種子 (*lactuca sativa* L. cv. Cisco, and Great Lakes 366) を使用した。

癌細胞に対する細胞毒性試験は ATCC から取得した A549 (ヒト肺癌細胞)、PANC-1 (ヒト膵臓腺癌細胞) および MCF-7 (ヒト乳腺癌細胞) を使用した。すべての癌細胞はインビトロジェンから購入した 10% ウシ胎児血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン および 100 units/mL ペニシリンを補充した DMEM 培地で保存した。保存条件は 37°C、5% CO₂ の加湿雰囲気であった。

第 2 節 冬虫夏草抽出物由来の化合物の単離・精製

冬虫夏草をキノコ部 (サナギタケ子実体; サナギタケ: *Cordyceps militaris*) およびカイコ部 (サナギタケに感染されたカイコ; カイコ: *Bombyx mori*) にそれぞれ分け、実験を行った。

3-2-1 冬虫夏草キノコ部の抽出

冬虫夏草キノコ部 (1.44 kg) を EtOH、acetone で順次抽出し、減圧乾固した。その後、固-液分配することにより、*n*-hexane 可溶部 (7.17 g)、EtOAc 可溶部 (1.65 g)、MeOH 可溶部 (70 g) および H₂O 可溶部に分画した。

3-2-2 冬虫夏草キノコ部 *n*-hexane 可溶部由来の化合物の単離・精製

冬虫夏草キノコ部 *n*-hexane 可溶部 (7.17 g) をシリカゲルカラムフラッシュマトグラフィー (silica gel 60N; ϕ 7×50 cm; CH₂Cl₂/EtOAc/acetone/MeOH = 100/0/0/0, 90/10/0/0, 50/0/50/0, 0/0/100/0, 0/0/50/50) に供し、20 のフラクションに分画した (フラクション 1~20)。フラクション 13 (223 mg) を濾過する事により、2 のフラクションを得た (13-1~13-2)。フラクション 13-1 (123 mg) を掻きとり TLC (DC-Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄; CH₂Cl₂/MeOH = 90/10) によって分画し、15 のフラクションを得た (13-1-1~13-1-15)。フラクション 13-1-14 (15.2 mg) を Sep-Pak (ODS; 99% MeOH) し、逆相 HPLC (Cosmosil PBr; ϕ 20×250 mm; 99% MeOH) に供した結果、化合物 **1** (4.4 mg) の単離に成功した。また、フラクション 14 (464 mg) を Sep-Pak (Silica; CH₂Cl₂/MeOH = 90/10) し、2 のフラクションに分画した (フラクション 14-1~14-2)。フラクション 14-1 の一部フラクション 14-1-P1 (80.0 mg) を 順相 HPLC (Senshu Pak AQ; ϕ 20×250 mm; CH₂Cl₂/MeOH = 97/3) によって分画し、13 のフラクションを得た (フラクション 14-1-P1-1~14-1-P1-13)。そのうち、フラクション

14-1-P1-4 (34.5 mg) を逆相 HPLC (Cosmosil PBr; ϕ 20×250 mm; 95% MeOH) に供した結果、化合物 **1** (10.6 mg) の更なる単離に成功した。

3-2-3 冬虫夏草キノコ部 EtOAc 可溶部由来の化合物の単離・精製

冬虫夏草キノコ部 EtOAc 可溶部 (1.65 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; ϕ 7×50 cm; CH₂Cl₂/MeOH = 99/1, 97/3, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30, 50/50, 30/70, 0/100) に供し、19 のフラクションに分画しました (フラクション 1~19)。その内、フラクション 14 (48.3 mg) を Sep-Pak (ODS; 40% MeOH, MeOH) し、3 のフラクションを得た (フラクション 14-1~14-3)。フラクション 14-1 を逆相 HPLC (Cosmosil PBr; ϕ 20×250 mm; 40% MeOH) に供した結果、化合物 **2** (1.2 mg) の単離に成功した。

3-2-4 冬虫夏草カイコ部の抽出

冬虫夏草カイコ部 (14.3 kg) を EtOH、acetone で順次抽出し、減圧乾固した。その後、固-液分配することにより、*n*-hexane 可溶部 (420 g)、EtOAc 可溶部 (45.0 g)、MeOH 可溶部 (301 g) および H₂O 可溶部に分画した。

3-2-5 冬虫夏草カイコ部 EtOAc 可溶部由来の化合物の単離・精製

冬虫夏草カイコ部 EtOAc 可溶部をシリカゲルカラムフラッシュクロマトグラフィー (CH₂Cl₂/acetone/MeOH = 99/1/0, 95/5/0, 80/20/0, 70/30/0, 50/50/0, 30/70/0, 99/0/1, 95/0/5, 80/0/20, 70/0/30, 50/0/50, 30/0/70) に供し、24 のフラクションに分画した (フラクション 1-24)。得られたフラクション 21 を Sep-Pak (ODS; 30% MeOH) で分画し、3 のフラクションを得た (21-1~21-3)。フラクション 21-1 を逆相 HPLC (Cosmosil PBr; ϕ 20×250 mm; 30% MeOH) に供したところ、23 のフラクションに分画した

(21-1-1~21-1-23)。その内、化合物 **2** の単離に成功した。一方、フラクション 21-1-11 を逆粗 HPLC (Cosmosil PBr; ϕ 20×250 mm; 20% MeOH) に供したところ、化合物 **3** (2.2 mg) の単離に成功した。また、フラクション 21-1-7 を逆粗 HPLC (Cosmosil PBr; ϕ 20×250 mm; 10% MeOH) に供したところ、化合物 **4** の単離に成功した

第3節 活性試験

3-3-1 癌細胞に対する細胞毒性活性試験⁶⁹⁾

癌細胞 (A549, PANC-1 および MCF-7) は 96 ウェルのマイクロプレートで 24 時間前培養した。前培養した癌細胞に 1 μ M, 10 μ M と 30 μ M の化合物をそれぞれ添加し、48 時間共培養した。30 μ M の sulforaphane (SFN) を活性コントロールとして使用した。その後、DMEM 培地 (Dulbecco's modified eagle's medium) を除去し、それぞれの癌細胞に 0.05% MTT 溶液を 100 μ L を添加し、更に 4 時間培養した。100 μ L の lysis buffer [20% SDS, 50% N,N-dimethyl formamide (DMF), pH 4.7] を添加・培養する事により、癌細胞を溶解した。癌細胞溶液の吸光度を 595 nm で測定し、細胞の生存率を計算した。すべての培養は 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

3-3-2 レタスに対する植物成長調節活性試験⁷⁰⁾

ガラス製のシャーレ (60 ϕ × 20 mm) を使用し、1 mL の蒸留水を浸透させた濾紙 (Advantec No. 2, 55 ϕ) にレタスの種子を播種し、25°C 暗所の条件下で 1 日間前培養を行った。一方、別のガラス製のシャーレ (60 ϕ × 20 mm) を用いて、コントロールにはメタノールで濾紙を浸透させ、試験区にはメタノールで濃度調製した各化合物を濾紙に浸透させた。自然乾燥の後、それぞれのシャーレに 1 mL の蒸留水を加え、濾紙に浸透させ、前培養で発芽したレタスの種子を濾紙の上に移植した。25°C 暗所の条件下で 3 日間本培養を行った。培養後、レタスの形態を観察すると共に、根および胚軸の長さを測定した。

第 4 節 化合物 1 のメタノリシス

化合物 1 (5.2 mg) を 0.1 N HCl の MeOH 溶液 (6 mL) に溶解し、73°C の条件下で、18 時間還流した。反応溶液に *n*-hexane (6 mL) を入れ、分液ロートを用い、液-液分配を 2 回行った (6 mL×2)。得られた *n*-hexane 可溶部を水洗し (12 mL×2)、無水 Na₂SO₄ で一晩乾燥した。その後、*n*-hexane 可溶部を濾過・濃縮し、得られたフラクション (1.3 mg) を ESI-TOF-MS に供した。結果として、*m/z* 307 に [M+Na]⁺ のピークが確認され、分解産物である脂肪酸メチルエステル構造の分子式が C₁₇H₃₂O₃ である事が分かった。また、MeOH 可溶部に高濃度 KOH (conc. KOH) の MeOH 溶液を滴下する事により、pH 試験紙で確認しながら、溶液の pH を 9~10 に調節した。生成した KCl を濾過してから、溶液を乾固した。その後、H₂O (12 mL) および Et₂O (12 mL) の混合溶媒で溶解し、分液ロートを用いて液-液分配を行った。得られた Et₂O 可溶部を水洗し (12 mL×2)、無水 Na₂SO₄ で一晩乾燥した。その後、Et₂O 可溶部を濾過・濃縮し、得られたフラクション (1.5 mg) を ESI-TOF-MS に供した。結果として、*m/z* 334 に [M+Na]⁺ のピークが確認され、分解産物であるスフィンゴイド構造の分子式が C₁₉H₃₇NO₂ である事が分かった。

論文要旨

冬虫夏草 (*Cordyceps militaris*) はチョウ目 (Lepidoptera) の蛹に寄生し子実体を発生するキノコであり、日本ではサナギタケと呼ばれている。以前の研究により、冬虫夏草 (*C. militaris*) 菌糸体および子実体から nucleoside 類、isoflavone 類および macrolide 類などの化合物の単離が報告されている。その一方、蚕 (*Bombyx mori*) の蛹に人工的に感染させて発生させた冬虫夏草 (*C. militaris*) に関する研究がほとんどされていない。そこで、冬虫夏草 (*C. militaris*) 抽出物由来の機能性化合物の探索を目的とした。

冬虫夏草キノコ部を EtOH、acetone によって順次抽出を行い、抽出液を減圧乾固した。その後、固-液分配することにより、*n*-hexane 可溶部、EtOAc 可溶部、MeOH 可溶部に分画した。得られた各可溶部を癌細胞 (A549 細胞) に対する細胞毒性試験に供したところ、各可溶部が癌細胞に細胞毒性作用を示した。特に *n*-hexane 可溶部および EtOAc 可溶部がより強い細胞毒性を示した。また、レタスに対する成長調節試験に供したところ、各可溶部がレタスに成長阻害活性を示した。以上の活性試験の結果を指標にし、化合物の単離を行った。その結果、*n*-hexane 可溶部により、化合物 **1** の単離に成功し、EtOAc 可溶部により、化合物 **2** の単離に成功した。

冬虫夏草のカイコ部はキノコ部と同様な方法によって抽出・固-液分配を行い、*n*-hexane 可溶部、EtOAc 可溶部、MeOH 可溶部に分画した。EtOAc 可溶部により、化合物 **2-4** の単離に成功した。

これらの化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。化合物 **1-4** をそれぞれ cordycerebroside A (**1**)、cordycepin (**2**)、3'-deoxyinosine (**3**)、cyclo(L-Pro-L-Asn) (**4**) と同定した。

化合物 **2** と **3** を癌細胞 (A549、PANC-1 および MCF-7) に対する細胞毒性活性試験に供したところ、化合物 **2** と **3** は類似の PANC-1 および MCF-7 癌細胞に対する濃度依存の細胞毒性を示した。また、化合物 **2** は

A549 癌細胞に対する濃度依存の細胞毒性を示した。一方、化合物 **3** は A549 癌細胞に対する弱い細胞毒性を示した。

化合物 **1-3** をレタスに対する成長調節活性試験に供したところ、化合物 **2** は 1 $\mu\text{mol/paper}$ と 100 nmol/paper の条件下でレタスの根と胚軸の伸長を有意に阻害した。化合物 **3** は 1 $\mu\text{mol/paper}$ と 100 nmol/paper の条件下でレタスの根の伸長を有意に阻害した。化合物 **1** は活性を示さなかった。

Summary

Cordyceps militaris is the mushroom, which parasites the Lepidoptera pupa and forms its fruiting bodies. It is called sanagitake in Japanese. In previous studies, the isolation the compounds, such as nucleoside compounds, isoflavone compounds and macrolide compounds, from the mycelia and fruiting bodies of *C. militaris* have been reported. On the other hand, there are few studies on the mushroom, which parasites *Bombyx mori* through an artificial injection and forms its fruiting bodies. With the purpose of finding out the bioactive compounds from the mushroom, we started the study.

The fresh fruiting bodies of *C. militaris* were extracted with EtOH and then with acetone. After the solutions were combined and concentrated under reduced pressure, the concentrate was extracted with *n*-hexane, EtOAc, and then MeOH, respectively. The crude fractions were tested the cytotoxicity against A549 cancer cell line and the activity against the growth of lettuce. *n*-Hexane soluble part and EtOAc soluble part showed relatively strong cytotoxicity as well as inhibitory activity against the growth of lettuce. *n*-hexane soluble part and EtOAc soluble part were fractionated by repeated chromatography for their activities. As a result, compound **1** was purified from *n*-hexane soluble part and compound **2** was purified from EtOAc soluble part.

The fresh bodies of *B. mori*, the host of *C. militaris*, was extracted and fractionated by the same method as that of the mushroom. EtOAc soluble part was fractionated by repeated chromatography. As a result, the purification of compounds **2-4** were succeeded.

Compound **1-4** were identified to be cordycerebroside A (**1**), cordycepin (**2**), 3'-deoxyinosine (**3**), and cyclo(L-Pro-L-Asn (**4**), respectively.

Compounds **2** and **3** were offered to test the cytotoxicity against the cancer cells (A549, PANC-1 and MCF-7). The results indicated that both the two compounds have the similar dose-dependent cytotoxicity against PANC-1 and MCF-7 cells.

Compound **2** also showed dose-dependent cytotoxicity against A549 cells, but compound **3** just showed a weak cytotoxicity against the cells.

Compounds **1-3** were offered to test the activity against the growth of lettuce. Compound **2** showed inhibitory activities against both the hypocotyl and root growth at 100 nmol/paper and 1 μ mol/paper, significantly. Compound **3** just show the inhibitory activities against the root growth at the same concentration with that of compound **2**. Compound **1** didn't show any activities in this bioassay.

参考文献

1. K. Yue *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **2013**, 65, 474-493
The Genus *Cordyceps* : A Chemical and Pharmacological Review.
2. D. Winkler, *Econ. Bot.*, **2008**, 62, 291-305
Yartsa Gunbu (Cordyceps sinensis) and the Fungal Commodification of Tibet's Rural Economy.
3. Originator : Holger Krisp, Ulm, Germany
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Puppen-Kernkeule_Cordyceps_militaris.jpg#filehistory.
4. C. Kuo *et al.*, *J. Med. Microbiol.*, **2005**, 54, 795-802
Cordyceps sinensis Mycelium Protects Mice from Group A Streptococcal Infection.
5. C. Kuo *et al.*, *Food Chem. Toxicol.*, **2007**, 45, 278-285
Abrogation of Streptococcal Pyrogenic Exotoxin B-Mediated Suppression of Phagocytosis in U937 Cells by *Cordyceps sinensis* Mycelium via Production of Cytokines.
6. L. Yang *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, **1999**, 134, 492-500
Efficacy of A Pure Compound H1-A Extracted from *Cordyceps sinensis* on Autoimmune Disease of MRL lpr/lpr Mice.
7. Y. Li *et al.*, *Transplant. Proc.*, **2009**, 41, 1565-1569
Clinical Application of *Cordyceps sinensis* on Immunosuppressive Therapy in Renal Transplantation.
8. Y. Kuo *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **2003**, 140, 895-906
Activation and Proliferation Signals in Primary Human T Lymphocytes Inhibited by Ergosterol Peroxide Isolated from *Cordyceps cicadae*.
9. X. Luo *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, **2017**, 157, 794-802
Structural Elucidation and Immunostimulatory Activity of Polysaccharide Isolated by Subcritical Water Extraction from *Cordyceps militaris*.

10. W. Zhang *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2005**, 42, 9-15
Immunomodulatory and Anti-Tumor Effects of An Exopolysaccharide Fraction from Cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on Tumour-Bearing Mice.
11. K. Shin *et al.*, *Phytother. Res.*, **2003**, 17, 830-833
Anti-tumor and Immuno-Stimulating Activities of the Fruiting Bodies of *Paecilomyces japonica*, A New Type of *Cordyceps* spp..
12. J. Liu *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2016**, 86, 594-598
Immunomodulatory and Antioxidative Activity of *Cordyceps militaris* Polysaccharides in Mice.
13. O. Olatunji *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, **2016**, 153, 187-195
Polysaccharides Purified from *Cordyceps cicadae* Protects PC12 Cells against Glutamate-Induced Oxidative Damage.
14. Z. Zhu *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2016**, 93, 1090-1099
Synthesis, Characterization and Antioxidant Activity of Selenium Polysaccharide from *Cordyceps militaris*.
15. O. Olatunji *et al.*, *Environ. Toxicol. Phar.*, **2016**, 44, 53-61
Neuroprotective Effects of Adenosine Isolated from *Cordyceps cicadae* against Oxidative and ER Stress Damages Induced by Glutamate in PC12 Cells.
16. N. Yoshikawa *et al.*, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2007**, 34, S61-S63
Cordycepin and *Cordyceps sinensis* Reduce the Growth of Human Promyelocytic Leukaemia Cells through the Wnt Signaling Pathway.
17. H. Yoo *et al.*, *Acta Pharmacol. Sin.*, **2004**, 25, 657-665
Effects of *Cordyceps militaris* Extract on Angiogenesis and Tumor Growth.
18. J. Song *et al.*, *Mol. Med. Report.*, **2016**, 13, 5132-5140
Cordyceps militaris Induces Tumor Cell Death via the Caspase-Dependent Mitochondrial Pathway in HepG2 and MCF-7 Cells.
19. Q. Yang *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, 80, 385-391
A Novel Protein with Anti-Metastasis Activity on 4T1 Carcinoma from

Medicinal Fungus *Cordyceps militaris*.

20. J. Sun *et al.*, *Chromatographia*, **2015**, 78, 495-506

Bioassay-Guided Separation and Identification of A New Anti-Lung Cancer Compound from *Cordyceps militaris* by Means of Off-Line Two-Dimensional Preparative Chromatography, Real-Time Cell Analysis, and X-Ray Single-Crystal Diffraction.

21. E.J. Buenz *et al.*, *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 96, 19-29

The Traditional Chinese Medicine *Cordyceps sinensis* and Its Effects on Apoptotic Homeostasis.

22. H.S. Tuli *et al.*, *Turk. J. Biol.*, **2015**, 39, 306-311

Apoptotic Effect of Cordycepin on A549 Human Lung Cancer Cell Line.

23. L. Yang *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, **2003**, 141, 74-80

H1-A Extracted from *Cordyceps sinensis* Suppresses the Proliferation of Human Mesangial Cells and Promotes Apoptosis, Probably by Inhibiting the Tyrosine Phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL.

24. H. Lo *et al.*, *J. Tradit. Complement. Med.*, **2013**, 3, 16-32

A Systematic Review of the Mysterious Caterpillar Fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChongXiaCao (冬蟲夏草 *dōng chóng xià cǎo*) and Related Bioactive Ingredients.

25. C. Chiu *et al.*, *Food Sci. Hum. Wellness.*, **2016**, 5, 177-185

Research and Development of *Cordyceps* in Taiwan.

26. T. Yong *et al.*, *J. Ethnopharmacol.*, **2016**, 194, 403-411

Actions of Water Extract from *Cordyceps militaris* in Hyperuricemic Mice Induced by Potassium Oxonate Combined with Hypoxanthine.

27. K.G. Cunningham *et al.*, *Nature*, **1950**, 166, 949

Cordycepin, A Metabolic Product Isolated from Cultures of *Cordyceps militaris*.

28. J. Choi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58, 4258–4267

Metabolomics Revealed Novel Isoflavones and Optimal Cultivation Time of *Cordyceps militaris* Fermentation.

29. V. Rukachaisirikul *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 1953-1955
10-Membered Macrolides from the Insect Pathogenic Fungus *Cordyceps militaris* BCC 2816.
30. C. Chiu *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, 64, 1540–1548
Anti-Inflammatory Cerebrosides from Cultivated *Cordyceps militaris*.
31. I. Hong *et al.*, *Mycobiology*, **2010**, 38, 128-132
Fruit Body Formation on Silkworm by *Cordyceps militaris*.
32. Z. Liu and X. Zhao, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 1944625, A, 2007-4-11
Method for Culturing Mycelia of *Cordyceps militaris* in Rice Solid Fermentation Medium.
33. Z. Xu and C. Wang, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 101707966, A, 2010-5-19
Method for Artificial Cultivation of Living *Cordyceps* with insect larva as host.
34. Y. Bian *et al.*, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 102450157, A, 2012-5-16
Solid State Fermentation Method for *Cordyceps militaris*.
35. Q. Liu *et al.*, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 103563649, A, 2014-2-12
A Culture Method for *Cordyceps militaris*.
36. J. Wu and Q. Wu, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 105724054, A, 2016-7-6
Culture Solution for Culturing *Cordyceps militaris* on Dry Silkworm and Its Culture Method.
37. I. An *et al.*, *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*, KR 2005036382, A, 2005-4-20
Preparation of *Cordyceps militaris* Using White Grubs of *Mimela splendens*.
38. T. Li *et al.*, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 1793317, A, 2006-11-16
Fruiting Body of *Cordyceps militaris* with the Pupa of *Tenebrio molitor* as Host and Its Culture Method.
39. S. Lee *et al.*, *Repub. Korea*, KR 674123, B1, 2007-1-29
Artificial Cultivation Method of *Cordyceps militaris* by Employing *Protaetia orientalis* larva.
40. X. Ding and Z. Ding, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 101215527, A, 2008-7-9

Culture Method for *Cordyceps militaris* by Inoculating Wild *Cordyceps* sp. Spores in Living Silkworm Pupa.

41. Z. Yang, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 102037850, A, 2011-5-4

Method for Culturing *Cordyceps militaris* with Silkworm Pupae.

42. I. Hong *et al.*, *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*, KR 2011101790, A, 2011-9-16

Culture Method for Fruiting Body of *Cordyceps militaris* Using Living Silkworm Pupae.

43. Z. Xu *et al.*, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 102523912, A, 2012-7-4

Cordyceps militaris Fruiting Body Using *Bombyx mori* Larva as Host and Its Cultivation Method.

44. G. Li and Q. Zhang, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 104164367, A, 2014-11-26

A Dry *Cordyceps militaris* and Its Culture Method.

45. C. Zhang *et al.*, *Faming Zhuanli Shenqing*, CN 104322272, A, 2015-2-4

Artificial Cultivation Method for *Cordyceps militaris* Using *Pheretima* as Carrier.

46. L. Jin *et al.*, *Shipin Kexue*, **2015**, 36, 243-246

Determination of Active Components in *Cordyceps militaris* from Different Sources and Their Impacts on Immune Function of Mice.

47. L. Wen *et al.*, *Shipin Kexue*, **2004**, 25, 155-157

Assay and Comparison of the Effective Compositions Produced in *Cordyceps Militaris* (*Bombyx Mori*).

48. J. Zhang *et al.*, *Kunchong Xuebao*, **2003**, 46, 674-678

Physiological and Biochemical Changes of the Silkworm, *Bombyx mori* Infected by *Cordyceps militaris*.

49. X. Shi *et al.*, *Canye Kexue*, **2015**, 41, 134-139

A Comparison on Morphological Characters and Active Component Contents of Aweto Cultured on Silkworm Larva Inoculated with Different *Cordyceps militaris* strains.

50. S. Yeon *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, **2007**, 87, 54-59
Comparison of Growth-Inhibiting Activities of *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces japonica* Cultured on *Bombyx mori* Pupae towards Human Gastrointestinal Bacteria.
51. J. Kim *et al.*, *Pest Manag. Sci.*, **2002**, 58, 713-717
Larvicidal Activity against *Plutella xylostella* of Cordycepin from the Fruiting Body of *Cordyceps militaris*.
52. C. Chen *et al.*, *J. Asia Pac. Entomol.*, **2015**, 18, 433-438
Cordyceps militaris Polysaccharide Triggers Apoptosis and G0/G1 Cell Arrest in Cancer Cells.
53. F. Wu *et al.*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, 28, 2029-2038
Comparison of the Structural Characterization and Biological Activity of Acidic Polysaccharides from *Cordyceps militaris* Cultured with Different Media.
54. E.A. Kaczka *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1964**, 14, 452-455
Isolation and Inhibitory Effects on KB Cell Cultures of 3'-Deoxyadenosine from *Aspergillus nidulans* (Eidam) wint.
55. Z. Meng *et al.*, *Plos One*, **2015**, 10, e0121669
Cordycepin and N⁶-(2-Hydroxyethyl)-Adenosine from *Cordyceps pruinosa* and Their Interaction with Human Serum Albumin.
56. O.J. Olatunji *et al.*, *Biomed. Pharmacotherapy*, **2016**, 81, 7-14
Cordycepin Protects PC12 Cells against 6-Hydroxydopamine Induced Neurotoxicity via Its Antioxidant Properties.
57. K. Nakamura *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.*, **2015**, 127, 53-56
Anticancer and Antimetastatic Effects of Cordycepin, An Active Component of *Cordyceps sinensis*.
58. H. Lee *et al.*, *Invest. New Drugs.*, **2012**, 30, 1917-1925
The Nucleoside Antagonist Cordycepin Causes DNA Double Strand Breaks in Breast Cancer Cells.
59. M. Yoou *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **2016**, 39, 90-96

Cordycepin Suppresses Thymic Stromal Lymphopoietin Expression via Blocking Caspase-1 and Receptor-Interacting Protein 2 Signaling Pathways in Mast Cells.

60. A. Yamazaki *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **1973**, 21, 1143-1146

Synthesis of 2'- and 3'-Deoxyinosines.

61. H. Chang *et al.*, *Lett. Drug Des. Discov.*, **2005**, 2, 133-136

Synthesis and in Vitro Evaluation of Adenosine Deaminase Resistant N-6 Aminal and Thioaminal Prodrugs of Cordycepin.

62. T. Fujishima and Y. Midorikawa, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP 61146194, A, 1986-7-3

3'-Deoxyguanosine Production by Microbial Enzyme.

63. L. Jia *et al.*, *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, **2011**, 42, 2186-2188

Chemical Constituents in Water Fraction of *Abelmoschus esculentus*.

64. S. Nakajima *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, 40, 2455-2458

Inhibition of *Trypanosoma cruzi* Growth in Mammalian Cells by Purine and Pyrimidine Analogs.

65. Y. Wataya and O. Hirioka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, 123, 677-683

3'-Deoxyinosine as An Antileishmanial Agent: the Metabolism and Cytotoxic Effects of 3'-Deoxyinosine in *Leishmania tropica* Promastigotes.

66. J. Van Der Greef *et al.*, *J. Chromat.*, **1987**, 394, 77-88

Identification and Quantitation of Diketopiperazines by Liquid Chromatography-MS Spectrometry, Using A Moving Belt Interface.

67. Y. Chen *et al.*, *Eur. Food Res. Technol.*, **2004**, 218, 589-597

Two-Step Mass Spectrometric Approach for the Identification of Diketopiperazines in Chicken Essence.

68. C. Liu *et al.*, *Chin. J. Nat. Med.*, **2011**, 9, 78-80

Cyclodipeptides from the Secondary Metabolites of Two Novel Actinomycetes.

69. H. Nishida *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.*, **2007**, 104, 73-81

Amyloid-Beta-Induced Cytotoxicity of PC-12 Cell Was Attenuated by

Shengmai-San through Redox Regulation and Outgrowth Induction.

70.H. Kobori *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **2015**, 78, 163-167

Bioactive Sesquiterpene Aryl Esters from the Culture Broth of *Armillaria* sp.

謝辞

本研究の遂行に当たり終始ご指導頂きました河岸洋和先生に深謝の意を表します。2012年に静岡大学大学院に入学から約5年間、河岸洋和先生には公私ともにご指導頂きました。どれだけ感謝しても尽くせません。また、碓氷泰市先生、平井浩文先生、村田健臣先生、崔宰熏先生、森智夫先生に丁寧なご指導を頂き、ここに深謝の意を表します。癌細胞に対する細胞毒性活性試験を行ってくださった新潟薬科大学西田浩志先生にもここに深く感謝を致します。また、ご助言を頂いた鈴木智大先生、尾形慎先生、呉静博士、王剣橋博士、小堀一博士など諸先輩方にも深い感謝の意を表します。特に小堀一さんには、研究に関する実験操作・知識、ゼミの仕方など、何も分からなかった私に懇切丁寧に教えて頂き、大変お世話になりました。誠にありがとうございました。

そして、共に研究を行ってきた博士同期の松崎信生君、ともに困難を乗り越えてきた修士同期の竹田翔伍君、的場隆太君、河村友香子さん、川出美咲さん、阿部智也君、山田佑人君、平林翔君および後輩の圓山和希さん、徳永大輝君、荒井勇人君、岩堀倫大君をはじめの研究室の皆様にも感謝申し上げます。

また、私の博士課程進学を支持し、国費奨学金を支援してくださった独立行政法人日本学生支援機構（JASSO）および日本政府に深謝の意を申し上げます。

最後に、私の留学・進学を支援してくれた両親に心から感謝します。私の知識および人生を豊かにするために、両親は私の日本への留学をサポートしてくれました。日本での生活は、様々な困難がありましたが、両親は経済面でも精神面でも私の支えとなってくれ、尽くしきれない感謝の意を表します。また、同様なサポートをしてくださった親戚の方々にも深謝の意を申し上げます。

皆様、誠にありがとうございました。

本論文の著作権は、国立大学法人静岡大学創造科学技術大学院自然科学系教育部バイオサイエンス専攻(邱 伟涛)が所有しています。本論文の記事・図面の無断複写、複製および無断転載を禁じます。

ただし、著者は本論文の複写権を国立大学法人静岡大学に唯一許諾します。

平成 29 年 2 月 8 日