

Antimicrobial Metabolites of Edible Mushroom *Flammulina velutipes* (Enokitake)

(食用きのこエノキタケの抗菌性代謝産物に関する研究)

学位論文内容の要旨

食用きのこエノキタケ(*Flammulina velutipes* (Curt.:Fr) Sing)の日本における生産と消費は最近 15 年間で急激に伸び、1998 年の生産量は 1 1 万トンで生シイタケの約 1.5 倍に達している。しかし、エノキタケ栽培は培地の *Bacillus* などの細菌による汚染や子実体の病気などによりかなりの損失を被っている。エノキタケからは、抗腫瘍性の多糖類や免疫増強作用を有するレクチン等の生物活性化合物が単離されているが、エノキタケ栽培に役立つような抗菌性化合物についての研究はない。本論文の目的は、エノキタケが生成する抗菌性代謝産物について抗菌活性を確認し、単離した代謝産物について、化学構造の解析、抗菌スペクトル、最小阻止量、菌糸による生成量の時間的推移、菌株による生成量の違いを明らかにすることであり、病原抵抗性や競合力に優れたエノキタケ品種の選抜や栽培法の改良に資することである。

1. 食用きのこの菌糸培養液に存在する抗菌性代謝産物の検出

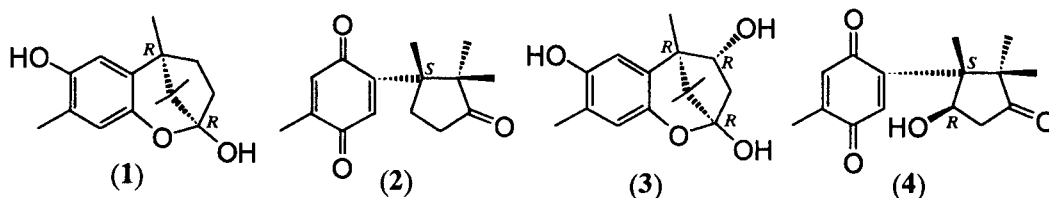
本研究の予備試験として、エノキタケ(菌株 FV-4)を含む 6 種の食用きのこ菌糸の培養液から代謝産物を抽出し、それぞれ一定量を薄層クロマトグラフィーによってシリカゲルプレート上に展開した。このプレートに *Cladosporium herbarum* の胞子を懸濁した培養液を噴霧、培養し、増殖阻止域の存在により抗菌性代謝産物の検出を試みた。その結果、シイタケに 5 点、エノキタケに 3 点、マイタケに 1 点の阻止域が出現した。シイタケの抗菌性代謝産物については多くが研究されており、本論文ではエノキタケの抗菌性代謝産物を研究対象とすることにした。そこで抗菌性代謝産物の抽出が可能となる培養日数を明らかにするため、*Bacillus subtilis* LMA0011 を接種した BHIA 培地を用い、濾紙ディスク法により、培養日数にともなう抗菌活性の変化を調べた。抗菌活性は 2 5 日目以降に出現したので、抗菌物質を単離するための菌糸の培養日数は 3 0 日以上とした。

2. エノキタケ菌糸が生成する抗菌性代謝産物の単離と構造の決定

エノキタケ菌糸(FV-4)培養液から溶媒抽出、クロマト分画により 4 種の新しいクパレン型セスキテルペンを単離し、和名に因んで enokipodin A-D と命名した。二次元 NMR 法を中心とした分光分析と、絶対配置については軸不斉誘導体の NMR 解析を原理とする MNCB 法の応用により、それらの構造を enokipodin A (1) : (2*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahydro-2,7-dihydroxy-5,8,10,10-tetramethyl-2,5-methano-1-benzoxepin,

enokipodin B(2): 2-[(1*S*)-1,2,2-trimethyl-3-oxocyclopentyl]-5-methyl-1,4-benzoquinone, enokipodin C(3): (2*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahydro-2,4,7-trihydroxy-5,8,10,10-tetramethyl-2,5-methano-1-benzoxepin, enokipodin D(4): 2-[(1*S*,5*R*)-5-hydroxy-1,2,2-trimethyl-3-oxocyclopentyl]-5-methyl-1,4-benzoquinone と結論した。

絶対配置も含め 1-4 の構造は下図のとおりである。



3. Enokipodin A-Dの抗菌スペクトル、最小阻止量および生成量の時間的推移

単離した enokipodin A-Dは寒天培地に接種したグラム陽性細菌 *Bacillus subtilis* や *Staphylococcus aureus* に対し、供試量 25 μ g で高い抗菌活性を示したが、グラム陰性細菌、酵母、糸状菌には供試量を増やしても、濾紙ディスク法では活性が認められなかった。この結果から enokipodin A-Dは、抗菌スペクトルの狭い化合物と考えられる。enokipodin A-Dのグラム陽性細菌に対する活性は、AとCできわめて高く、BとDはやや低かった。グラム陽性細菌に対する enokipodin AとCの最小阻止量を濾紙ディスク法で調べた結果、Aは 3.12 μ g、Cは 6.25 μ g であった。また、菌系の培養日数にともなう enokipodin A-Dの生成量を HPLCを用いて測定した結果、25日以降にA-Dが認められ、CとDは50日でも増加し続けたが、AとBは30日以降ほぼ一定であった。30日でAは 86 μ g/ml、Cは 88 μ g/ml、50日でCは 1019 μ g/ml、Dは 179 μ g/ml、Bはごく微量で推移した。これらの結果および構造式からみても、enokipodin AはB、C、Dの前駆体と考えられる。

4. エノキタケ菌株に見られる抗菌活性の違いと enokipodin AおよびCの生成量

エノキタケの 10 菌株（野生種 7、栽培種 3）について、菌系の培養液を試料として *Bacillus subtilis* に対する代謝産物の抗菌活性を検定し、HPLCにより enokipodin AおよびCを定量した。さらにGC-MSにより主成分が enokipodin Cであることの確認を行った。培養日数にともなう抗菌性代謝産物の生成は、40日で見られるもの3菌株、50日以降に見られるもの3菌株、70日でみられるもの1菌株、70日でもみられないもの3菌株であった。抗菌性が見られないもの3菌株のうち2種が栽培種であった。生成された抗菌性代謝産物の主要成分はいずれも enokipodin Cであり、代謝産物量の多かった4菌株には enokipodin Aがわずかに含まれていた。これら培養試験の結果から、エノキタケの抗菌性代謝産物は菌系の成長が定常期に入ってから生成されることが考えられた。

以上のように、エノキタケは菌系培養によりかなりの量の抗菌性代謝産物を生成し、この代謝産物は4種のクパレン型セスキテルペンであり、新しい化合物であることが明らかとなった。この新化合物 enokipodin A-Dは菌株や培養日数によって生成量に差が認められることから、エノキタケの生態を考察する上で重要な意味を持ち、また、人工栽培における菌害回避のための選抜育種には新たな視点の導入が必要であることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 邦 秀
副 査 教 授 田 原 哲 士
副 査 教 授 矢 島 崇
副 査 教 授 寺 澤 實

学 位 論 文 題 名

Antimicrobial Metabolites of Edible Mushroom *Flammulina velutipes* (Enokitake)

(食用きのこエノキタケの抗菌性代謝産物に関する研究)

本論文は、図113、表16、引用文献120を含む、6章、182頁からなる英文論文であり、別に参考論文2編が添えられている。

食用きのこエノキタケの日本における生産と消費は最近15年間で急激に伸び、1998年の生産量は11万トンで生シイタケの約1.5倍に達している。しかし、エノキタケ栽培は *Bacillus* などの細菌による培地の汚染や子実体の病気などによりかなりの損失を被っている。本論文の目的は、エノキタケが生成する抗菌性代謝産物について抗菌活性を確認し、単離した代謝産物について、化学構造の解析、抗菌スペクトル、最小阻止量、菌糸による生成量の経時変化、菌株による生成量の違いを明らかにすることであり、病原抵抗性や競合力に優れたエノキタケ品種の選抜や栽培法の改良に資することである。得られた結果は以下のようにまとめられる。

1. 食用きのこの菌糸培養液に存在する抗菌性代謝産物の検出

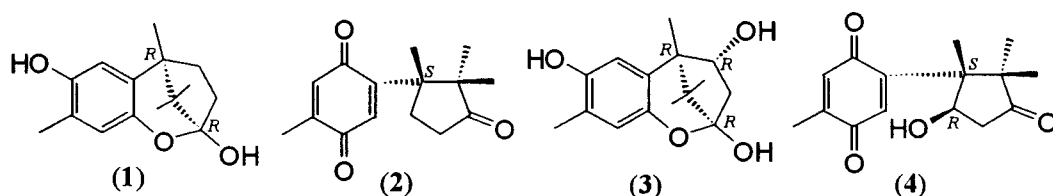
予備試験として、エノキタケ（菌株 Fv-4）を含む6種の食用きのこ菌糸の培養液から代謝産物を抽出し、TLCバイオオートグラフィーを用いて抗菌性の検出を試みた。その結果、シイタケ5個、エノキタケ3個、マイタケ1個の抗菌スポットが出現した。シイタケの抗菌性代謝産物の多くはすでに研究されており、本研究ではエノキタケを研究対象とした。エノキタケの抗菌性代謝産物の抽出が可能となる培養日数は30日以上であった。

2. エノキタケ菌糸が生成する抗菌性代謝産物の単離と構造の決定

エノキタケ菌糸培養液から溶媒抽出、クロマト分画により4種の新しいクパレン型セスキテルペンを単離し、enokipodin A-Dと命名した。二次元NMR法を中心とした分光分析と、絶対配置については軸不斉誘導体のNMR解析を原理とするMNCB法の応用により、それらの構造を enokipodin A (1): (2R,5R)-2,3,4,5-tetrahydro-2,7-dihydroxy-5,8,10,10-

tetramethyl-2,5-methano-1-benzoxepin、 enokipodin B(2): 2-[(1*S*)-1,2,2-trimethyl-3-oxocyclopentyl]-5-methyl-1,4-benzoquinone、 enokipodin C(3): (2*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahydro-2,4,7-trihydroxy-5,8,10,10-tetramethyl-2,5-methano-1-benzoxepin、 enokipodin D(4): 2-[(1*S*,5*R*)-5-hydroxy-1,2,2-trimethyl-3-oxocyclopentyl]-5-methyl-1,4-benzoquinone と結論した。

絶対配置も含め 1 - 4 の構造は下図のとおりである。



3. Enokipodin A-Dの抗菌スペクトル、最小阻止量および生成量の時間的推移

単離した enokipodin A-Dはグラム陽性細菌 *Bacillus subtilis* や *Staphylococcus aureus* に対し、供試量 25 μ g で高い抗菌活性を示したが、グラム陰性細菌、酵母、糸状菌には活性が認められなかった。 enokipodin のグラム陽性細菌に対する活性は、AとCで高く、最小阻止量を調べた結果、Aは 3.12 μ g、Cは 6.25 μ g であった。また、菌糸の培養日数にともなう enokipodin A-Dの生成量は25日以降に認められ、その後CとDは増加し続けたが、AとBは30日以降ほぼ一定であった。これらの結果および構造式から、enokipodin AはB、C、Dの前駆体と考えられた。

4. エノキタケ菌株に見られる抗菌活性の違いと enokipodin AおよびCの生成量

栽培種3種を含むエノキタケの10菌株の代謝産物について、*Bacillus subtilis* に対する抗菌活性を検定し、HPLCによる enokipodin AおよびCの定量と、主成分が enokipodin CであることをGC-MSにより確認した。培養日数に伴う抗菌性成分の生成は菌株により異なり、40日から70日の間に7菌株で生成されたが、3菌株は70日でも抗菌性成分を生成せず、そのうち2種が栽培種であった。生成された抗菌性代謝産物の主要成分はいずれも enokipodin Cであり、代謝産物量の多かった4菌株には enokipodin Aがわずかに含まれていた。培養試験の結果から、エノキタケの抗菌性代謝産物は菌糸の成長が定常期に入ってから生成されると考えられた。

以上のように、エノキタケ菌糸が生成する抗菌性代謝産物は4種のクパレン型セスキテルペンであり、新しい化合物であることが明らかとなった。この新化合物 enokipodin 類は菌株や培養日数によって生成量に差が認められることから、エノキタケの生態を考察する際や人工栽培における選抜育種に新たな視点をもたらすものとして、学術及び応用の両面で高く評価され、関連学会からも注目されている。

よって審査員一同は、イシカワ ノエミア カズエ が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。