

学 位 論 文 題 名

Chemical constituents produced by *Inonotus obliquus*

(カバノアナタケの生産する化学成分)

学位論文内容の要旨

カバノアナタケ(*Inonotus obliquus*; 別の学名: *Fuscoporia obliqua* ロシア名: Charga)は Hymenochaetaceae に属する白色腐朽菌である。最近の研究により、カバノアナタケの抽出成分には、制癌作用や抗 Hiv-1 作用などがあると指摘されている。しかしながら、薬効本体については、十分に明らかにされていない。

そこで本研究は、日本産の天然のカバノアナタケ菌核に含有される化学成分および人工培養したカバノアナタケ菌が生産する化学成分の単離及びその化学構造の検討とともにカバノアナタケ菌の生長条件を検討することを目的とした。

1. 天然のカバノアナタケ菌核に含有される化学成分

カバノアナタケ菌核を 95%エタノールで抽出、濃縮頑固し、*n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン:酢酸エチル(25:1、v/v)、酢酸エチル、水和酢酸エチルとエタノールで順次分画をして、Fr3、4、5 と 6 から 3 つの既知物質(lanosterol (1)、inotodiol (2)、trametenolic acid (3))および 3 つの新しいトリテルペンを単離し、その化学構造を検討し、これらの新しいトリテルペンの化学構造を 3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene (4)、3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone (5)、21,24-cyclopentalanosta-3 β ,21,25-triol-8-ene (6)であると決定した。これらはいずれもラノスタンタイプのトリテルペンであり、1 つは側鎖の C-22 および C-25 に水酸基を置換した化合物 (4)、1 つはラクトン環を有する化合物 (5)、1 つはシクロペンタノール環 (6)であった。今回、3 つの新しく単離された化合物はいずれも酸化反応の最終産物であると考えられた。すなわち、lanosterol (1)はラノスタンタイプのトリテルペンの前駆体であり、C-22 へのヒドロキシレーションにより inotodiol (2)に変換し、C-25 へのヒドレーションにより 3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene (4)に変換する。また、C-21 へのヒドロキシレーションにより生じたアルコールがアルデヒドへ、アルデヒドがカルボキシルを有する trametenolic acid (3)へと順次酸化され、C-24 へのヒドロキシレーションおよび引き続くラクトニゼーションにより 3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone (5)に変換する。また、アルデヒドから C-25 の二重結合へのヒドレーション、続くシクロペンタン環形成により 21,24-cyclopentalanosta-3 β ,21,25-triol-8-ene (6)に変換する生合成経路が推定された。

これまでの文献上の抗癌試験結果を整理すると、ラノスタンタイプの化合物中、水酸基の C-22 位への導入 (inotodiol) は、側鎖の C-21 位への水酸基の導入よりも抗がん効果を増加させる傾向がある。このことから、C-22 位に水酸基を置換している新トリテルペン、3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene (4)には抗癌効果が期待される。また、3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone (5)、21,24-cyclopentalanosta-3 β ,21,25-triol-8-ene (6)のように側鎖

中で環を形成しているラノスタンタイプのトリテルペンはこれまで単離されていない。

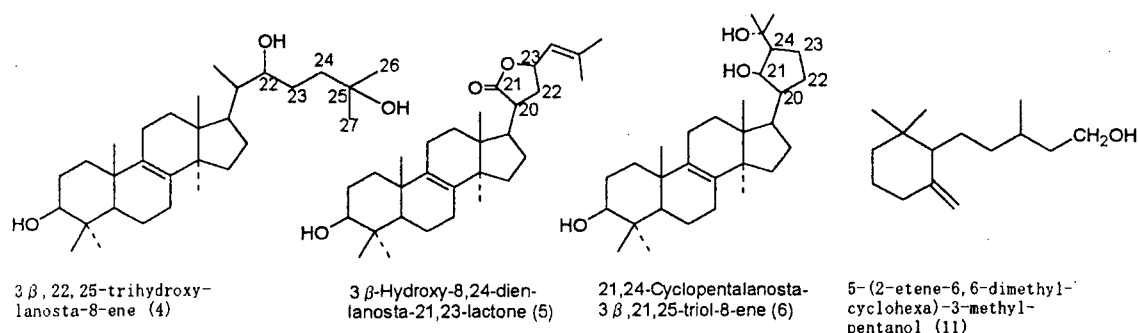
2. 人工培養されたカバノアナタケ菌が生産する化学成分

カバノアナタケ菌核から菌糸を分離し、MYG 培地で 2 ヶ月間人工液体培養を行った。カバノアナタケ菌糸体を凍結乾燥し、95%エタノールで抽出、濃縮頑固し、*n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン:酢酸エチル(4:1、v/v)、酢酸エチル、エタノールで順次分画をして、Fr2、3 から少量の2つのトリテルペン lanosterol (1)および $3\beta, 22$ -dihydroxy-lanosta-7,9(11),24-triene (7) と2つのステロイド ergosterol (8)および ergosterol peroxide (9)を単離、同定した。ergosterol peroxide (9)は強い抗癌効果を有する化合物であり、カバノアナタケからは初めて単離された。この他 glucositol (10)とセスキテルペン、5-(2'-etene-6',6'-dimethyl-cyclohexa)-3-methyl-pentanol (11)の化学構造を明らかにした。このセスキテルペンは新規化合物であると考えられる。

3. カバノアナタケ菌の生長およびアミノ酸の影響

カバノアナタケ菌の培養条件として、温度 26℃と pH 6.0 を用いた。PDA 培地の脱イオン水の代わりにシラカンバ樹液を用い、カバノアナタケ菌の生長を比較した。その結果、PDA 培地作りにシラカンバ樹液を用いた培地ではコントロールの培地より菌糸の生長が多少向上した。また、15種類のアミノ酸のカバノアナタケ菌の生長への影響を CZAPEK-DOK BROTH の最少基本栄養培地で調べた結果、8種類のアミノ酸を添加した培地でコントロール(アミノ酸の無添加)より菌糸の生長が 1.5~2.0 倍まで向上した。その効果の順位は、Ile>Thr>Val>Leu>Gly>Ala>Cys>Arg であった。特に Ile はカバノアナタケ菌の生長を 2 倍近く促進させた。逆に 7種類のアミノ酸を添加した培地では生長阻害効果があり、その阻害の順位は His>Trp>Pro>Phe>Met>Lys>Ser であった。特に His と Trp は菌の強い生長阻害を示した。硫黄基を持つ Cys と Met は菌糸生長を減少させるとの報告があるが、今回の研究では阻害効果はほとんど観察されなかった。

以上、カバノアナタケ菌は lanosterol (1)を前駆体として生成し、菌核の形成中に各種の酸化反応により inotodiol (2)、trametenolic acid (3)、 $3\beta, 22, 25$ -trihydroxy-lanosta-8-ene (4)、 3β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone (5)、21,24-cyclopentalanosta- $3\beta, 21, 25$ -triol-8-ene (6)などへ変換すること、菌糸の人工培養においては、lanosterol (1)とともに、 $3\beta, 22$ -dihydroxy-lanosta-7,9(11),24-triene (7)、ergosterol (8)、ergosterol peroxide (9)、glucositol (10)と 5-(2'-etene-6',6'-dimethyl-cyclohexa)-3-methyl-pentanol (11)などを生産していることなどが判明した。特に、カバノアナタケ菌の生長促進には、PDA 培地にシラカバ樹液を用いること、および CZAPEK-DOK BROTH の最少基本栄養培地へアミノ酸 (Ile) を添加することが有効であることが判明した。



学位論文審査の要旨

主査	教授	寺沢	実
副査	教授	高橋	邦秀
副査	教授	矢島	崇
副査	助教授	小島	康夫
副査	講師	玉井	裕

学位論文題名

Chemical constituents produced by *Inonotus obliquus*

(カバノアナタケの生産する化学成分)

本論文は、図 54、表 13、写真 2、引用文献 54 を含む、5 章、143 頁からなる英文論文であり、別に参考論文 7 編が添えられている。

カバノアナタケ(*Inonotus obliquus*)は、Hymenochaetaceae に属する白色腐朽菌である。最近の研究により、カバノアナタケの抽出成分には、制癌作用や抗 Hiv-1 作用などがあると指摘されている。しかしながら、薬効本体については、十分に明らかにされていない。

そこで本研究は、天然のカバノアナタケ菌核に含有される化学成分およびカバノアナタケ培養菌糸が生産する化学成分の検索、カバノアナタケの最適培養条件を検討することを目的とした。

1. 天然のカバノアナタケ菌核に含有される化学成分

カバノアナタケ菌核の 95 %エタノール抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、3 種の既知物質 (lanosterol (1)、inotodiol (2)、trametenolic acid (3))および 3 種の新しいトリテルペン、3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone (4)、21,24-cyclopentalanosta-3 β , 21,25-triol-8-ene (5)、3 β ,22,25-trihydroxy-lanosta-8-ene (6)を単離した。これら新規化合物はいずれもラノスタンタイプのトリテルペンであり、1 つはラクトン環を有する化合物 (4)、1 つはシクロペンタノール環を有する化合物 (5)、1 つは側鎖の C-22 および C-25 に水酸基を置換する化合物 (6)であった。lanosterol を基本にした場合、側鎖の C-22 位への水酸基の導入 (inotodiol) は、C-21 位への水酸基の導入・酸化 (trametenolic acid) よりも抗癌効果を増加させる傾向がある。このことから、C-22 位に水酸基を置換している新トリテルペン、3 β ,22,25-trihydroxylanosta-8-ene (6)には抗癌効果が期待される。また、3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone (4)や 21,24-cyclopentalanosta-3 β ,21,25-triol-8-ene (5)のように側鎖中で環を形成しているラノスタンタイプのトリテルペンはこれまで単離されていない。

2. カバノアナタケ培養菌糸が生産する化学成分

MYG 培地で 2 ヶ月間液体培養した後のカバノアナタケ菌糸体凍結乾燥物の 95 % エタノール抽出物から 2 種のトリテルペン lanosterol (1) および 3 β ,22-dihydroxylanosta-7,9(11),24-triene (7) と 2 種のステロイド ergosterol (8)、ergosterol peroxide (9)、および glucositol (10) を単離した。ergosterol peroxide は強い抗癌効果を有する化合物であり、カバノアナタケからは初めて単離された。この他、新規化合物であるセスキテルペン 5-(2'-ene-6',6'-dimethyl-cyclohexa)-3-methylpentanol (11) の化学構造を明らかにした。

3. カバノアナタケの生長に及ぼすアミノ酸の影響

最少基本栄養培地でのアミノ酸添加の菌糸生長への影響を調べた。8 種類のアミノ酸添加培地で、コントロールよりも菌糸の生長が 1.5 ~ 2.0 倍まで向上し、特にイソロイシンとトレオニンの添加はカバノアナタケ菌の生長を強く促進した。逆に 7 種類のアミノ酸を添加した培地では生長阻害効果があり、特にヒスチジンとトリプトファンは菌糸成長を強く阻害した。

以上のように、カバノアナタケ菌核から 3 種の新規化合物を含む 6 種のトリテルペンを単離し、培養菌糸体からは lanosterol を含む 2 種のトリテルペンおよび 2 種のステロイドおよび 1 種の新規セスキテルペンを単離し、それらの構造を明らかにした。これらの内、lanosterol や inotodiol などは抗癌性、抗 HIV 性を有する化合物であった。また、培地へのイソロイシンやトレオニンの添加による菌糸生長促進効果を実証し、有用産物の培養生産への可能性を示した。これらの成果は、カバノアナタケ菌の利用に関して重要な基礎的資料を提供するものであり、学会や関連業界で高く評価されている。

よって審査員一同は、申有秀が博士（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。

