

2021年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

「きのこ抽出物に由来する体内リズム改善物質の探索及びその事業化」

[鳥取大学農学部・教授] [石原 亨]

1. はじめに

哺乳動物は、明るさや気温が一定の部屋の中でも、およそ 24 時間周期で活動することができる。このことから、外部からの刺激と無関係に、24 時間周期を刻む体内時計(概日リズム)が備わっていることがわかる。概日リズムは、生物が地球の自転により 24 時間周期で変化する環境に適応するため獲得したものと推定されている。細胞レベルの概日リズムは、時計遺伝子の発現における自動調節フィードバックループが連動するネットワークによって決定されている。主要な時計タンパク質は、正の発現制御因子である BMAL1 (Brain and Muscle Arnt-protein 1, Arnt1) と CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) である。CLOCK と BMAL1 のヘテロダイマーは核内に移行し、時計制御遺伝子 (Clock controlled genes: CCG) のプロモーター領域に存在する E-box エンハンサーに結合して、CCG 遺伝子の発現を活性化する。一方、CCG 遺伝子のメンバーがコードする PER (Period) や CRY (Cryptochrome) は、カゼインキナーゼ 1 (CK1) と相互作用し、CLOCK-BMAL1 の活性を抑制して夜間の CCG の発現を停止させ、負のフィードバックループを形成している。また、ROR (レチノイン酸受容体関連オーファン受容体) や REV-ERB も CCG 遺伝子にコードされている。ROR は夜間に BMAL1 の発現を活性化し、一方、REV-ERB は BMAL1 プロモーターにある ROR 応答エレメントに結合することで日中の BMAL1 の発現を抑制する(図1)。

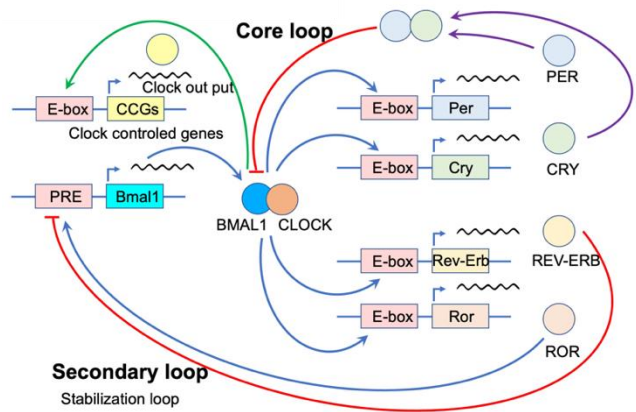


図1 サーカディアン・クロック

時差ぼけや交代勤務などの生活習慣によって引き起こされる概日リズムの乱れは、がんや心血管疾患、その他の代謝異常などの疾病リスクを高め、健康に悪影響を及ぼす。そのため、概日時計の主要な構成要素を標的とする様々な低分子化合物が研究されてきた。これらの化合物の標的は、REV-ERBs、RORs、PERs、CRYs、および CK1 などである。例えば、ピロール環を持つ REV-ERB のアゴニストである SR9009 や SR9011 は、抗がん作用と抗不安作用を示すことが見出された。さらに、天然フラボノイドのノビレチンは、マウスの ROR の活性化化合物であり、食餌誘導性肥満マウスと *db/db* 糖尿病マウスの両方で体重を減らし、エネルギーホメオスタシスを回復させることなどが見出されている。

概日リズム異常を原因とする睡眠障害は、現代社会の非常に大きな問題でもある。我が国では、睡眠について不満を持っている人が 3000 万人に達し、睡眠不足による国内年間経済損失は 15 兆円にも及ぶとの推計もある。このため、睡眠改善商品が多くの企業から売り出されており、いわゆるスリープテック市場は 2020 年に、世界では 9 兆円、我が国だけでも、1 兆 2000 億円に達すると言われている。

きのこは、目に見える大きさの子実体を形成する菌類で、新規生理活性物質の貴重な供給源である。鳥取大学農学部附属菌類・きのこ遺伝資源研究センターは、1,800 種、約 9,100 株 (2021 年 1 月現在) のきのこからなる世界有数のきのこコレクションを保有している。このきのこのコレクションに含まれる菌株を培養し、抽出物を系統的に作成することで、キノコ抽出物ライブラリーが作成されている。私達は、このライブ

ラリーを用いて、きのこに存在する生理活性化合物の調査を開始し、抗菌化合物、チロシナーゼ阻害物質、植物成長促進物質などを発見してきた。これらの知見から、きのこには、生物活性を有する新たな二次代謝物がまだまだ未発見のまま残されていると考えられる。

Cyclocybe erebia は、Tubariaceae 科、ヒラタケ目、担子菌門に属する腐生菌性のきのこで、和名は「ツチナメコ」である。本種の外形が ナメコに似ており、褐色の粘性を持つことから、この和名が付けられた。日本では夏から秋にかけて、庭先や林内の土の上に子実体が見られる。*Cyclocybe erebia* は *C. cylindracea* および *C. aegerita* と系統的に近縁である。後者 2 種は食用きのことして経済的に重要であり、広く栽培されているが、*C. erebia* を対象とした研究はほとんどない。

私達は、これまでの研究で、ツチナメコの培養ろ液に細胞レベルで概日リズムに影響を及ぼす化合物 Fr.2 が含まれていることを見出し、その単離精製、および、平面構造の推定に成功した(図2)。そこで、本課題では、この化合物の化学構造を立体化学を含めて明らかにすることを目的とした。さらに、ツチナメコの培養ろ液には、この化合物以外にも概日リズムに影響を及ぼす物質が存在する可能性がある。そこでその探索を行った。さらに、培養条件によって、この化合物の蓄積量が大きく異なることも想定されたため、培地成分を変え培養を行い、Fr.2 を最も多く蓄積する培地を検討した。

2.概要

主要な時計遺伝子 *Bmal1* のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないで、発現させることで *Bmal1* の転写活性をモニターできる細胞を用い、様々なきのこ抽出物の効果を調べた。その結果、ツチナメコ(*Cyclocybe erebia*)の培養ろ液抽出物が *Bmal1* の発現に影響を与えることがわかった。そこで、ツチナメコを大量に培養し、このような効果を示す物質 Fr.2 を単離した。NMR および MS スペクトルから、Fr.2 は、3つの縮合環を有するのテルペノイドであることが判明した。さらに、単結晶 X 線構造解析を行い、Fr.2 の構造を立体化学も含めて、確定した。また、Fr.2 とは、別のフラクション Fr.1-2-6 に概日リズムに影響する活性があることが見出された。そこでこの化合物についても NMR などにより構造解析をおこない、Fr.2 にエポキシドが導入された化合物であることがわかった。Fr.2 については、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の濃度から活性を示し、また、投与のタイミングによっても効果が異なることが判明した。マウスに腹腔に投与する実験を行ったところ、5 mg/kg の投与量でマウスの活動リズムを遅らせる効果があることが見出された。

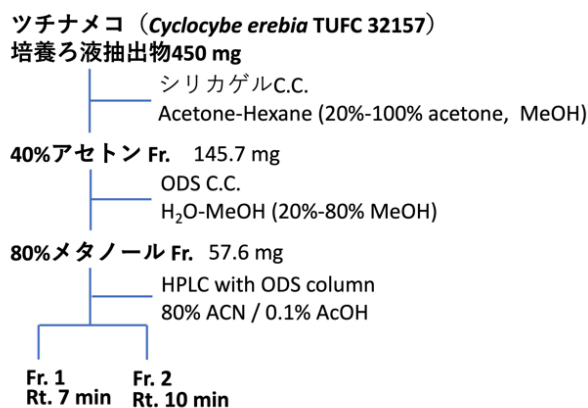


図2 活性物質の精製スキーム

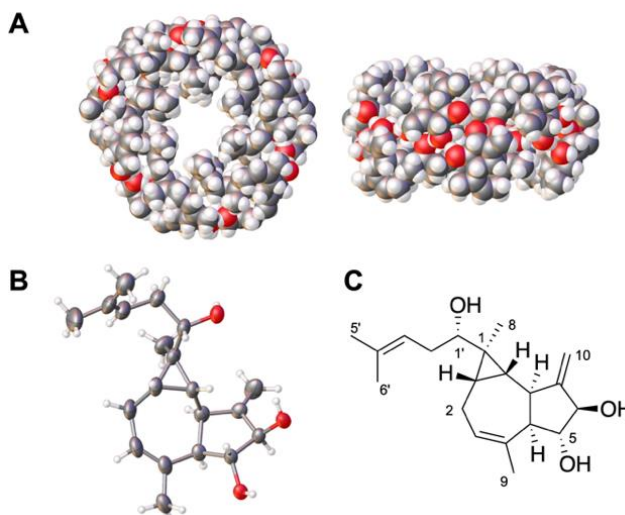


図3 Fr. 2 の化学構造

3. 研究成果および今後の課題

きのこ抽出物ライブラリーから、Bmal1 の発現レポーター細胞を用いて、概日リズムに影響を与える物質のスクリーニングを行ったところ、ツチナメコ (*Cyclocybe eredia*) の培養ろ液抽出物が Bmal1 の発現に影響を与えることが見出された。そこで、ツチナメコを 5 L の培地で培養し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー、分取 HPLC によって活性を有する Fr.1 および Fr.2 を精製した。精製スキームを図2に示す。

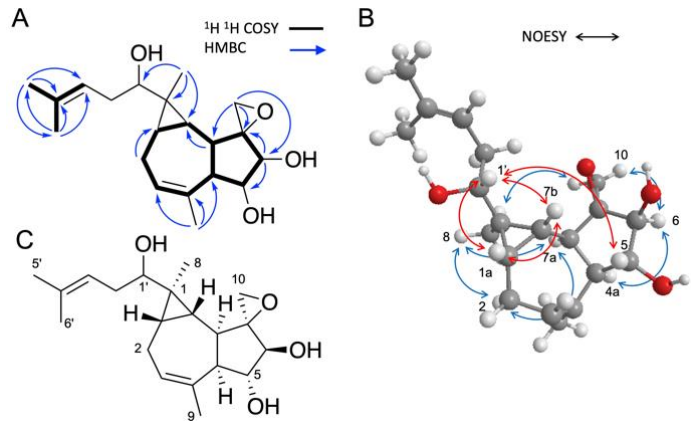


図4 Fr.1-2-6 の化学構造

Fr.2 を NMR や MS スペクトルによって分析したところ、分子式 $C_{20}H_{30}O_3$ のテルペノイドであった。さらに、立体化学を明らかにするために、トルエンから $4^{\circ}C$ で再結晶を行い、X 線単結晶構造解析を行った。化合物は、結晶中で分子間水素結合により中空構造を持つドーナツ状の 12 量体を形成しており、その内部にはトルエン分子が包接されていた。得られた 12 分子の構造はすべて予想構造と一致し、同一の立体配置を持っていた (図3)。

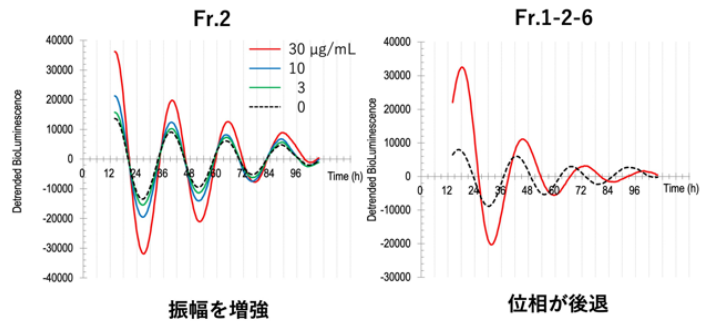


図5 Fr.2 と Fr.1-2-6 の影響

続いて、Fr.1 について分取 HPLC を繰り返し、Fr.1-2-6 を得た。この化合物は、マスペクトルから Fr.2 に酸素が 1 原子結合した化合物であることがわかった。さらに 1H および ^{13}C NMR スペクトルを Fr.2 と詳細に比較することで図4に示すように、Fr.2 の 7 位と 10 位の間にエポキシドが形成された構造であることがわかった。NOESY スペクトルから立体配置を推定したところ、相対立体配置は Fr.2 と同一であると推定された (図3)。また、リチャーズ、サブロー、PDB、モルト培地で培養を行い、菌糸の生育と Fr.2 の生産を調べた。いずれもモルト培地を用いた場合が最大となった。

Fr.2 について濃度依存性を調べたところ、 $3 \mu g/mL$ 以上の濃度で化学発光の振幅の増大が観察されることがわかった (図5)。また、発光がピークになると予想された時間の 2 時間前に投与すると、位相が後ろにずれたのに対し、ピークの 4 時間後に投与すると振幅が増大するとともに、位相がやや前にずれる傾向を示した。また、Fr.1-2-6 を投与すると、振幅が増大するとともに、位相がやや

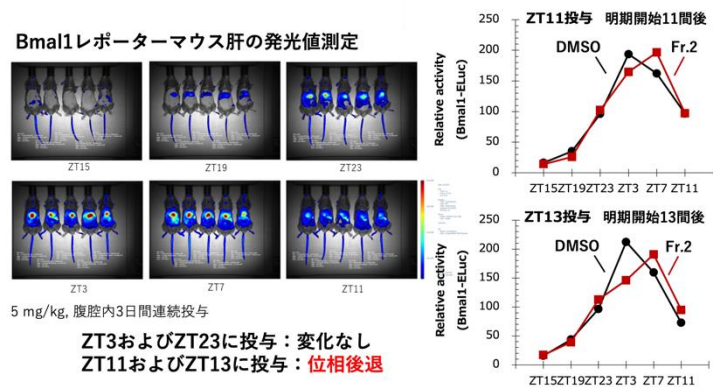


図6 Fr.2 がマウスの概日リズムに及ぼす影響

後ろにずれることがわかった。

Bmal1 レポーターマウスの腹腔内に Fr.2 を 5 mg/kg の濃度で投与した。この場合も、効果は投与のタイミングに依存することがわかった。ZT3 (暗期から明期に変わって 3 時間後) および ZT23 (暗期から明期に変わる 1 時間前) に投与した場合には、マウスでの発光に変化が見られなかったのに対し、ZT11 (明期から暗期に変わる 1 時間前) および ZT13 (明期から暗期に変わった 1 時間後) に投与した場合には、位相の後退が観察された (図6)。

4. おわりに

本課題では、Bmal1 レポーター細胞を用いて、きのこ抽出物ライブラリーのスクリーニングを実施し、2種の活性物質の単離に成功した。概日リズムに影響を与える化合物はこれまでに複数合成されてきているが、いずれも、がん細胞の増殖を抑制するなど、さまざまな生物活性を示すことがわかっている。Fr.2 や Fr.1-2-6 がさらにどのような生物活性を有するのか探索する必要があるだろう。

5. 本研究の今後の計画

本研究では、ツチナメコが生産する概日リズム調節物質の化学的実態を解明し、細胞レベルおよび個体レベルでの解析を行った。いずれのレベルでも単離した化合物は、概日リズムに影響を及ぼすことがわかった。さらに、投与のタイミングによって効果が異なることを見出されたが、そのメカニズムの解明には至っていない。また、動物実験も、まだ、予備的な実験に留まっており、今後、マウスの行動に及ぼす影響や毒性の評価を行う必要もある。さらに、近縁種や子実体にも、類似の効果を示す物質が存在する可能性は大きい。特に食用きのこの子実体から活性物質を検出することができれば、新たな製品の開発にはずみがつくものと考えられる。

6. その他

(1) 出願特許 (タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)

きのこ由来の概日リズム調節物質

発明者：石原亨、一柳剛、西田直史

出願人：国立大学法人鳥取大学、株式会社ジーピーシー研究所、鳥取県

PCT 出願中、2021-072719

(2) 投稿論文 (タイトル・学会名等)

Identification of *Cyclocybe erebia* metabolites that affect the circadian rhythm of cells expressing a biological clock gene *Bmal1*. 投稿準備中

(3) 本研究会の参加企業・団体名

ジーピーシー研究所



競輪の補助事業

この報告書は、競輪の補助により作成しました。

<https://jka-cycle.jp>