

# キノコの生産する生理活性物質

宝酒造株式会社バイオ研究所 飯沼寛信

はじめに

新しい生理活性物質を探索するため、その給源にまだ未開の分野であったキノコの代謝産物を選んだ。1967年以来、日本、ニュージーランド、ブラジル、台湾など世界各地より約4000株のキノコを採集し、菌糸を純粋培養した。大量生産を意図し、その菌糸を液体振とう培養し、培養液中に抗生物質など生理活性物質を探索した。

キノコ菌子の液体培養

探索当初はカビ、放線菌と同様に、スラントより菌子を液体培地に接種後、直ちに振とう培養したが、生育が悪かったので種々検討し、次の様な方法で行なった。スラントより寒天を多く付けたまま菌子（約3×3mm）を液体培地に接種し、培地表面に浮かないように、26-27℃で静置培養した。培養は菌子が表面に現われることなく、液体培地中に十分生育するまで続けた後、同温で7日間往復振とう培養し、培養液をスクリーニングに用いた。また、培養液を-25℃で凍結保存し、利用している。

培地組成は種々検討の結果、次のように決定した：グルコース1.0%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%（pHは調節せず）

キノコ菌子の大量培養

上記の培地600mlおよび適当な大きさの回転子を、1リットル容三角フラスコに入れ、これにスラントより菌子約5×5mmかきとり接種し、上記のように静置培養後、菌子が培地中に生育し始めた頃、回転子を回転させ攪拌培養した。表面に生育しないように回転数を調節し、液体培地内に十分生育したものを種培養とした。この種培養液5mlを、上記培地125mlを入れた坂口フラスコに接種し、培地内に菌子が十分生育するまで静置培養後、振とう培養した。

ジャーファーマンター（30l容）による通気攪拌培養には、上記種培養液を10%添加し、菌子の生育が認められるようになるまでゆっくり攪拌（50rpm/min）し、通気量は1分間に培地の5分の1量程度にした。その後、回転数を200rpm/minに上げ、通気量は5分の1のまままで培養した。

キノコの生産する生理活性物質

## 1. 抗生物質

### 1-1. Coriolins（コリオリン類）

Coriolinsは耐性グラム陽性菌に有効な物質として、スクリーニングされた。生産菌は *Coriolum consors* (Berk.) Imaz. である。本菌は培養液中に抗菌活性を有するCoriolin、5-Ketocoriolin B、Coriolin Cを生産し、菌体中に、抗菌活性を示さないCoriolin Bを多量（10g/l）蓄積していた。

Coriolin はグラム陽性菌、特に耐性菌に対しても同様の活性を示しMICは6.25-12.5 μ/mlであった。5-Ketocoriolin B および Coriolin C はさらに活性は高く、0.78-1.56 μg/mlであった。しかし、Coriolins はグラム陰性菌、酵母、カビには100 μg/mlで無効であった。

また、Coriolinsが吉田肉腫細胞に毒性を示したので、*in vivo* で制癌作用を調べた結果、マウス白血病細胞、L-1210 に対し強い延命効果を示した。

多量に生産されるCoriolin Bをクロム酸で酸化して、得られたDiketocoriolin B (DKC) はCoriolinと

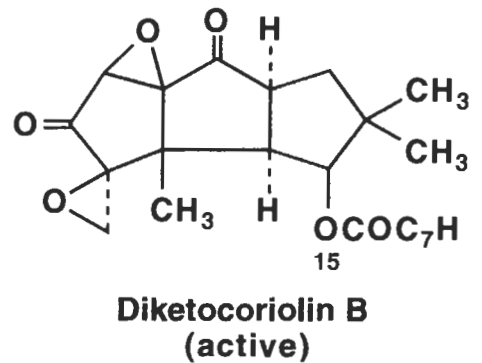
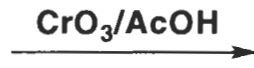
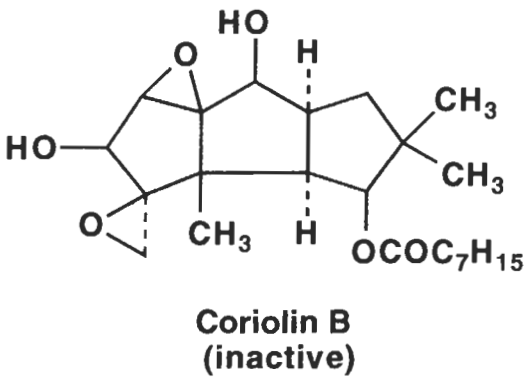
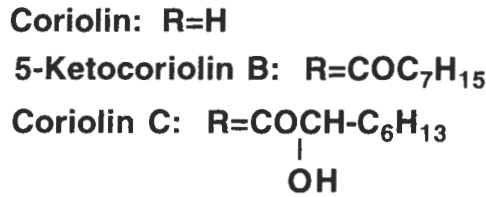
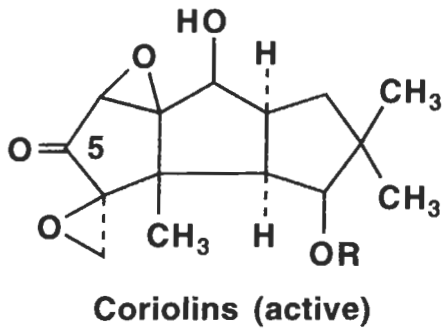
同様の抗菌活性を示し、*in vivo*でL1210に対し Coriolin より強い延命効果を示した。

Coriolins の構造-活性相関の研究から、5位のカルボニル基およびエポキシ環が活性発現に必須であることが分かった。

以上のように、Coriolinsは興味ある活性を示したので、その作用機作を調べた。その結果、DKCは吉田肉腫細胞への $K^+$ の取り込みを阻害することが明らかとなり、さらに膜に存在する酵素、例えば $Mg^{2+}$ -ATPase、 $K^+$ -dependent phosphatase、alkaline phosphatase、5'-nucleotidaseなどはほとんど阻害せず、特異的に $(Na^+-K^+)$ -ATPaseを阻害することが分かった。

さらに、膜に作用する薬剤は免疫調節作用に影響を及ぼす可能性があるため、その作用を調べた。まず、1次免疫応答に対する作用を調べた結果、DKCはマウスの液性抗体産生を強く促進した。即ち、マウスにヒツジ赤血球 $10^8$ 個を静注、免疫し、処理群には同時にDKCを投与(ip)した。48時間後にJernらの方法により抗体産生細胞数を測定した。その結果、DKC125 $\mu$ g/マウス(ip)投与では抑制が見られたが、0.01-10 $\mu$ g/マウスの低投与では強い促進が認められた。

2次免疫応答に対しては、より強い促進効果を示した。即ち、マウスにヒツジ赤血球 $10^5$ 個を静注、免疫後、7日目に $10^5$ 個を静注して、2次免疫した。DKCは2次免疫と同時に投与(ip)した。48時間後に抗体産生細胞数を測定した。その結果、DKC 2.5  $\mu$ g/マウスの投与量で、2次免疫応答を対照に比べ、15倍促進した。



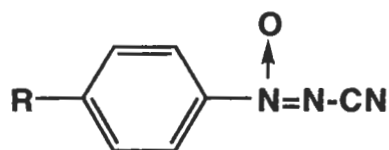
### 1-2. Calvatic acid (カルバチン酸)

Calvatic acid (CA) はグラム陽性菌および一部のグラム陰性菌に有効な比較的抗菌スペクトルの広い抗生物質として *Calvatia craniformis* (Shw.) Fr. の培養液より単離された。また、CAを合成すると共に下記の構造のRを変換した類縁化合物を合成し、生物活性を調べた。CAのグラム陽性菌に対するMICは3.12-12.5 $\mu$ g/mlであり、一部のグラム陰性菌に対し6.25-12.5 $\mu$ g/mlであったが魚病菌である *A. salmonicida* および *V. anguillarum* には0.78 $\mu$ g/ml以下で有効であった。カビには無効であった。

また、Rを水素、メチル基および塩素に変換したものはいずれも抗菌スペクトルが広くなり、グラ

ム陽性菌、*Pseudomonas*を除くグラム陰性菌、酵母およびカビに対して有効であった。さらに、CAは吉田肉腫細胞の増殖を阻害し、*in vivo*でL1210に対し延命効果をした。

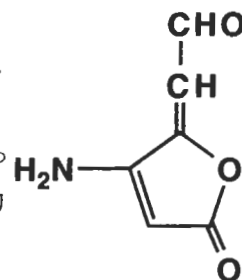
構造-活性相関を調べ、ニトリル基が必須であることを明らかにした。



Calvatic acid: R=COOH

### 1-3. Basidalin (バシダリン)

Basidalin はグラム陽性菌に有効な成分として *Leucoagaricus naucina* (Fr.) Sing. の培養液より単離されたが、活性は低くMICは100 $\mu$ g/ml程度であった。DNA、RNAおよび蛋白質合成を阻害(IC<sub>50</sub>=0.4-0.6 $\mu$ g/ml)したが、特徴は見られなかった。L1210細胞の増殖を0.11 $\mu$ g/mlで50%阻害し、*in vivo*でL1210に対し延命効果を示した。活性発現にはアルデヒド基が必須であると考えられた。



Bacidalin

## 2. 酵素阻害物質

### 2-1. Oudenone (Tyrosine hydroxylase 阻害物質)

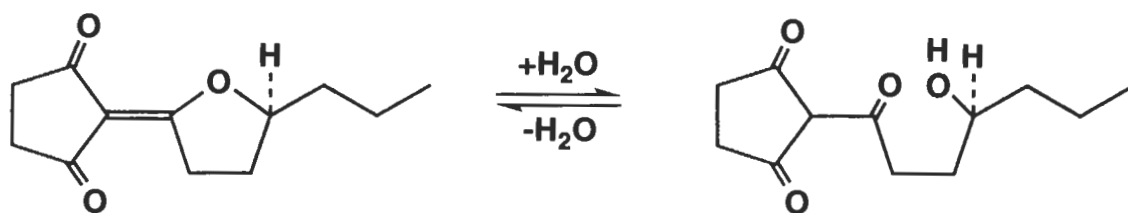
Tyrosine hydroxylase (TH) はノルエピネフリンなどカテコールアミン生合成の律速酵素である。ノルエピネフリンが昇圧作用を有することなどから血圧調節に関与していると考え、ノルエピネフリン生合成を抑制することにより血圧降下を期待した。

Oudenone はTH阻害物質として *Oudemansiella radicata* (Relhan.: Sing.)の培養液より単離された。下記のように、特異な構造を有し水、アルコール類、エステル類、エーテル類、トルエンなどほとんどの溶媒に可溶である。

TH阻害活性(IC<sub>50</sub>)は2.4 $\times 10^4$ Mであった。阻害様式は基質、チロシンに対し不拮抗型、補酵素、2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethyltetrahydropteridine に対しては拮抗型であった。

毒性は極めて低くOudenoneのナトリウム塩のマウスに対する毒性(LD<sub>50</sub>)は1000mg/kg(iv)、1850mg/kg(ip)、2000mg/kg(po)であった。

自然発症高血圧ラット(SH-rat)を用いて、血圧降下作用を調べた結果、10mg/kg投与で約20%の降下作用が認められた。



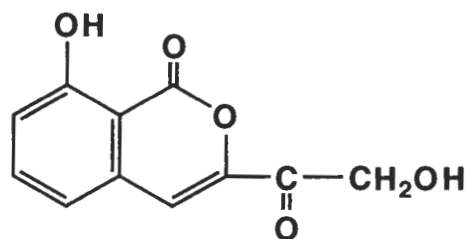
Oudenone

### 2-2. Oosponol (Dopamine $\beta$ -hydroxylase)

Oosponol はノルエピネフリン生合成に係わる酵素の1つであるDopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH)の阻害物質として *Gloeophyllum striatum* (Swartz) Murr. の培養液より単離されたが、既に *Oospora astringens* (気管支喘息患者の部屋より分離された)の代謝産物として、菌体より得られていた化合物と同一であった。

Oosponol は DBH を  $2.27 \times 10^{-4} \text{M}$  で 50% 阻害した。SH-rat に 3.12mg/kg および 6.25mg/kg の投与 (ip) でそれぞれ最高 25% および 42% の血圧低下率を示した。また、Oosponol は Bradikinin や Histanin のように強い血管透過性亢進作用を有することが明らかとなった。

Oosponol は、また別のスクリーニングにより得られた。即ち、上皮増殖因子 (EGF) レセプター (Tyrosine kinase) を過剰発現しているヒト上皮癌由来 A431 細胞の細胞膜を酵素源として、その阻害物質をスクリーニングし、Oosponol を単離した。その阻害活性は  $1.7 \times 10^{-4} \text{M}$  であった。Oosponol の、温度感受性 src を発現している RSV<sup>h</sup>NRK 細胞に対する毒性を調べた結果、33℃ の癌形態を示す細胞の増殖を  $1.9 \times 10^{-5} \text{M}$  で、39℃ の正常形態を示す細胞を  $23.2 \times 10^{-4} \text{M}$  で 50% 阻害し、癌形態の細胞に対し、より強く作用した。



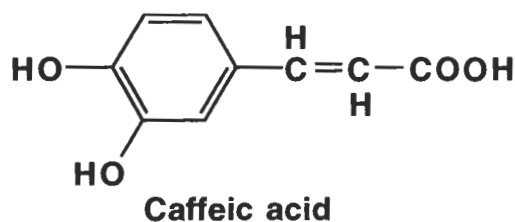
Oosponol

### 2-3. (+)-および (-)-Dehydrocaffeic acid dilactone (Catechol-O-methyltransferase 阻害物質)

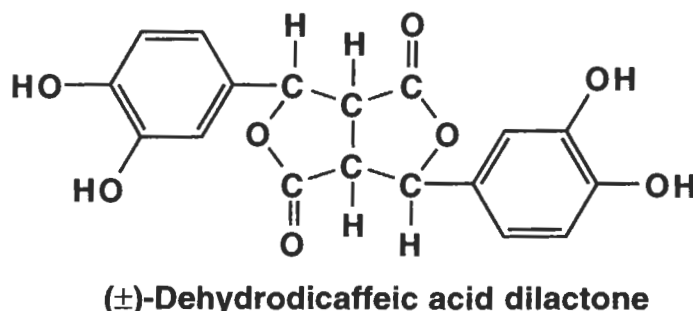
カテコールアミンの不活化酵素である Catechol-O-methyl transferase (COMT) の阻害物質として Caffeic acid と共に (±)-Dehydrocaffeic acid (DDCAD) が *Inonotus* sp. の培養液より単離された。Caffeic acid、(+)-DDCAD および (-)-DDCAD の COMT に対する阻害活性はそれぞれ  $8.3 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $3.9 \times 10^{-5} \text{M}$  および  $5.0 \times 10^{-5} \text{M}$  であった。

DDCAD の生合成経路を調べた結果、Caffeic acid から酵素的 (Tyrosinase) にも非酵素的にも生成することが明らかとなり、いずれの経路を経ても生成物はラセミ混合物であった。

SH-rat に (±)-DDCAD を 1 日、1 回、3 日間投与 (ip) し血圧の変化を測定した結果、3.1mg/kg および 12.5mg/kg の低投与量では、わずかな血圧上昇が見られ、50mg/kg の高投与量では、低下が認められた。



Caffeic acid



(±)-Dehydrocaffeic acid dilactone

### 2-4. Cyclophellitol (β-Glucosidase 阻害物質)

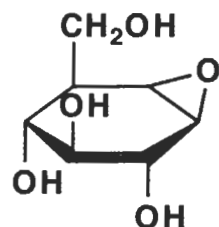
Cyclophellitol は β-glucosidase の阻害物質として、*Phellinus* sp. の培養液より単離された。Cyclophellitol は既知の阻害物質と比べ高い阻害活性を示し、その阻害型式は不可逆的拮抗型であった。また、糖分解酵素阻害スペクトルを調べた結果、α-Glucosidase も阻害せず β-glucosidase を特異的に阻害することが分かった。

Cyclophellitol は 100 μg/ml で培養細胞に対し毒性を示さなかったが、マウスに対する毒性を調べた過程で重篤な神経障害を起こすことが分かった。そこで Cyclophellitol 投与マウスについて詳細な観察を行なった。その結果、50mg/kg 投与群では投与 7 日目頃から伸縮性痙攣、興奮などの顕著な神経異常を示し、10-12 日後にかけてすべてのマウスが死亡した。

Gaucher 病は  $\beta$ -Glucosidase の1種である Glucocerebrosidase (GC) の遺伝子変異によって起こる遺伝病であるが、上記のように Cyclophellitol 投与マウスは Gaucher 病に類似の症状を呈した。そこで、Cyclophellitol のヒト培養細胞、Molt-4 の GC に対する阻害効果を測定した結果、2  $\mu\text{g/ml}$  で完全に阻害した。さらに、Cyclophellitol 投与マウス(50mg/kg/day  $\times$  5)の7日後の臓器中のGCは90%以上低下していた。また、Glucocerebrosideの蓄積が見られた。

Gaucher病では細胞毒性を示す Glucosphingosine (GS) の蓄積が見られ、これが神経細胞死を誘導するのではないかと考えられている。そこで、Cyclophellitol 投与マウスで調べた結果、各臓器でGSが顕著に増加していた。

従って、Cyclophellitol はGCを阻害してGlucocerebroside を蓄積し、これが毒性を有するGSに変換されることにより神経障害を起こすと考えられ Gaucher 病患者に見られる知見とよく一致していた。



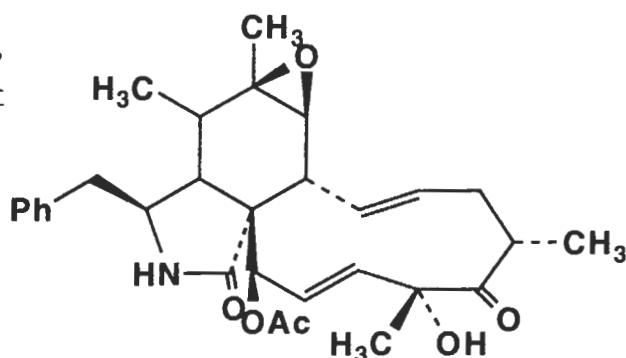
**Cyclophellitol**

### 3. ras 発現細胞の形態正常化物質

#### Cytochalasin Q

Cytochalasin Q (CQ) は *ras*<sup>H</sup>NRK 細胞の癌形態から正常形態へ変化させる物質として *Aphylllophorares* に属する1菌株の菌体より単離されたが、既にアクチン重合阻害物質として *Hypoxylyon terricola* Mill より単離されていたものと同一物質であった。

CQ は *ras* 発現細胞において可逆的な形態正常化と増殖抑制 ( $\text{IC}_{50} = 0.08\text{-}0.35 \mu\text{g/ml}$ ) を示した。また、細胞周期への影響を調べたところ、K-*ras*-NRK細胞を  $G_2/M$  アレストし、細胞分裂を阻害していることが分かった。さらに、CQ は *ras* 蛋白量を減少させた。



**Cytochalasin Q**

おわりに

以上記したように、キノコは興味ある種々の生理活性物質を生産していた。放線菌、細菌、カビなどが、それぞれに特有の分子種を生産していることは既に知られるところであるが、経験的にも文献的にもキノコも同様であると考えられた。キノコの採集、保存、培養など、取り扱い他の微生物に比べ煩雑であるが、目的物質の生産量が比較的多く、代謝物(不純物)の種類が少ないため精製が容易であるなど、培養後は利点も多い。

今後も、採集した菌株を生かすため医薬のみならず農薬、食品、健康食品など種々の分野へ利用したいと考えている。