

令和元年6月11日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02546

研究課題名(和文) 高等菌類の子実体発生物質の解明と応用展開

研究課題名(英文) Elucidation and application development of the fruiting body generating compounds of higher fungi

研究代表者

河岸 洋和 (Kawagishi, Hirokazu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：70183283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,800,000円

研究成果の概要(和文)：4つの課題から「キノコ共通の子実体発生物質」を見出すことを目的として、以下の結果を得た。

1) 「子実体発生物質のひとつはステロイド」説の証明：多くのキノコにstrophasterol類とchaxine類の内生を証明し、それらの子実体誘導活性を見出した。2) Fruiting liquidからの子実体発生物質の探索：ヤマブシタケFLからの新規物質に子実体誘導活性を見出した。3) フェアリー化合物のキノコにおける子実体発生物質としての証明：フェアリー化合物のキノコにおける内生を証明し、マツタケへの成長促進活性を発見した。4) 胞子からの生活環制御分子の探索：ヤマブシタケ胞子から新規物質を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

4つの課題は全て研究代表者の研究成果、発想、仮説に基づいており、独創性は際立っている。キノコ共通の子実体発生物質(発芽ホルモン候補分子)を明らかにできれば、天然物化学、基礎生物学等における学術的成果は極めて大きく(NatureやScienceにも掲載可能)、加えて、これまで不可能であったトリュフやマツタケの人工栽培への道を開き、産業、社会に与えるインパクトも極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify fruiting body-forming compound(s) common to mushrooms from four issues. 1) The proof of the theory that one of the fruiting body-forming compound(s) is steroids: Endogenous existence of strophasterols and chaxines in many mushrooms have been proved. 2) Search for fruiting body-forming compound(s) from fruiting liquid: A fruiting body-forming compound was found as a novel substance from fruiting liquid of Yamabushitake (*Hericium erinaceus*). 3) Demonstration of fairy chemicals as fruiting body-forming compound(s) in mushrooms: Endogenous existence of fairy chemicals in mushrooms was found, and they stimulated the growth of Matsutake (*Tricholoma matsutake*). 4) Search for life-cycle regulating molecules from spores: New substances were obtained from the spores of Yamabushitake.

研究分野：天然物化学

キーワード：高等菌類 子実体発生物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物には、それぞれに特有なホルモンが存在する。しかし、キノコにおけるホルモンは一切明らかにされていない。キノコを発生させる菌類は、胞子から菌糸、菌糸から子実体(キノコ)、子実体から胞子という生活環を持っている。研究代表者は、『これらの生活環の各段階はキノコ特有のホルモンによって制御されている』という仮説を抱き続けてきた。

2. 研究の目的

本研究では菌糸から子実体が発生する段階に注目し、以下の4つの全く異なるアプローチ(課題)から「キノコ共通の子実体発生物質(発芽ホルモン候補化合物)」を明らかにする。1)「子実体発生物質のひとつはステロイド」仮説の証明(課題1)、2)「Fruiting liquid (FL)」からの子実体発生物質の探索(課題2)、3)フェアリー化合物のキノコにおける子実体発生物質としての可能性(課題3)、4)胞子からの子実体発生物質の探索(課題4)。

3. 研究の方法

1)「子実体発生物質のひとつはステロイド」仮説の証明(課題1)

1-1) 候補ステロイドの内生確認、精製・構造決定

子実体発生ステロイドの候補の strophasterol 類と chaxine 類のキノコにおける普遍的な内生を証明するため、なるべく多数のキノコを入手し、エタノールで抽出する。抽出液を減圧濃縮後、ヘキサン、酢酸エチル、メタノール、水可溶部に分ける。ヘキサン可溶部と酢酸エチル可溶部を LC-MS/MS に供する。目的物質が検出できない場合は、これら画分を HPLC で分画し、その画分を LC-MS/MS に供する。

他のキノコからキノコ成長に関わる化合物(特にステロイド)を探索する。

1-2) 候補ステロイドの活性評価・活性発現機構の解明

Strophasterol 類と chaxine 類の子実体発生への効果を、各種キノコを用いてシャーレとポット[子実体発生には必須な菌掻き(ポットの表面の菌糸を掻きだし、物理的に刺激を与えて、子実体を誘導する。キノコ栽培では必須の工程)を行わずに、サンプル溶液を一度だけ注ぐ]を用いて確認する。また、子実体発生時の2次代謝産物・遺伝子・タンパク質の発現の変化を網羅的に解析するため、まず strophasterol 類と chaxine 類を産生するサケツバタケとチャジュタケの菌糸体及び子実体の RNAseq 解析を次世代シーケンサーを用いて行い、子実体で発現する遺伝子を探索する。その後、同様に strophasterol 類と chaxine 類の添加によって変動する遺伝子の探索を行い、子実体発生に関与する遺伝子群の絞込みを行う。得られた解析結果は既にゲノムが解読され、遺伝子情報が公開されている全てのキノコの遺伝子と網羅的な比較解析を行い、これら遺伝子が普遍的に存在するか、検討を行う。

2)「Fruiting liquid (FL)」からの子実体発生物質の探索(課題2)

キノコ栽培業者の協力を得て、ブナシメジ、ヤマブシタケ、マンネンタケ等の FL を大量に入手する。キノコ発生実験の結果を指標に、各 FL から各種クロマトグラフィーを駆使して精製、構造決定を試みる。

3) フェアリー化合物のキノコにおける子実体発生物質としての証明(課題3)

3-1) フェアリー化合物の内生確認、精製・構造決定

フェアリー化合物の各種キノコに対する活性を検討する。フェアリー化合物のキノコにおける生合成・代謝経路を明らかにする。

3-2) フェアリー化合物の合成

既に 100 グラムスケールにて確立した AHX と ICA の合成を、プラントスケール(Kg スケール)にて実施可能な方法にブラッシュアップする。また、フェアリー化合物の類縁体を合成し、構造活性相関を検討し、さらに高活性化化合物を創製する。

4) 胞子からの生活環制御分子の探索(課題4)

各菌の胞子からの子実体発生物質の単離、構造決定、生合成経路解明、活性発現機構解明を行う。

4. 研究成果

1)「子実体発生物質のひとつはステロイド」説の証明

106 種のキノコ抽出物の LC-MS/MS と NMR 分析の結果、分類学的には異なった 62 種の strophasterol 類が、85 種の chaxine 類が内生することが判明した(投稿準備中)。研究協力者の桑原重文(東北大学)が合成した strophasterol A と研究協力者の西川俊夫(名古屋大学)が合成した chaxine B を用いて各種キノコの成長に対する効果を検討した。その結果、これらの化合物はマツタケを含む複数の菌糸体成長に対して促進活性を示し、ヤマブシタケなどの複数のキノコに対して子実体形成誘導活性を示した(投稿準備中)。サケツバタケのゲノム配列を明らかにした。

2) Fruiting liquid からの子実体発生物質の探索

ヤマブシタケ FL から得られた物質のエノキタケに対する子実体誘導活性を発見し、この FL から新規物質を数種発見した(未発表データ)。

3) フェアリー化合物のキノコにおける子実体発生物質としての証明

フェアリー化合物が多くのキノコに内生していることを証明し(投稿準備中)、マツタケ菌糸

に対して成長促進活性があることを発見した(投稿準備中)。また、コムラサキシメジにおける生合成経路を一部明らかにした。フェアリー化合物のプラントスケール(Kg スケール)の合成に耐えうる方法を開発し、協力企業が実施している。

4) 胞子からの生活環制御分子の探索

ヤマブシタケの胞子から新規物質数種の精製、構造決定に成功した。

上記の4課題は全て独創性に富み、国内外では同様の研究は行われていない。得られた成果によって、高等菌類の子実体発生物質の解明に大きく近づいた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件、全て査読有り)

1) Suzuki, T., Ono, A., Choi, J-H., Wu, J., Kawagishi, H., and Dohra, H., The complete mitochondrial genome sequence of the edible mushroom *Stropharia rugosoannulata* (Strophariaceae, Basidiomycota), Mitochondrial DNA Part B: Resources, 4, 570-572 (2019). DOI: 10.1080/23802359.2018.1558120

2) Takano, T., Yamamoto, N., Suzuki, T., Dohra, H., Choi, J-H., Terashima, Y., Yokoyama, K., Kawagishi, H., Yano, K., Genome sequence analysis of the fairy ring-forming fungus *Lepista sordida* and gene candidates for interaction with plants, Sci. Rep., 9, 5888 (2019) DOI: 10.1038/s41598-019-42231-9

3) Ridwan, Y. A., Wu, J., Choi, J-H., Hirai, H., and Kawagishi, H., Bioactive compounds from the edible mushroom *Cortinarius caperatus*, Mycoscience, 59, 172-175 (2018). doi.org/10.1016/j.myc.2017.08.015

4) 河岸洋和, きのが産生する生体機能性物質に関する研究, 日本きのこ学会誌, 25(4), 122-128 (2018)

https://www.jsmsb.jp/setting/online_journal

5) Reddy, M. D., Kobori, H., Mori, T., Wu, J. Kawagishi, H., and Watkins, E. B., Gram-scale, stereoselective synthesis and biological evaluation of (+)-armillariol C, J. Nat. Prod., 80, 2561-2565 (2017).

dDOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00484

[学会発表](計33件)

1) Hirokazu Kawagishi, Fairy chemicals -a candidate for a new family of plant hormones and for new agrochemicals-, The 1st International Symposium on Chemical Communications (ISCC2019), 2019

2) 二木美咲, 西川俊夫, 河岸洋和ら, Chaxine 類とその類縁体の合成研究, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年

3) 古田島颯, 崔宰熏, 鈴木智大, 平井浩文, 菅敏幸, 河岸洋和ら, コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物 ICA 及び AOH の生合成研究, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年

4) 稲木僚, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, フェアリー化合物 2-azahypoxanthine の代謝酵素における生化学的研究, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年

5) 呉静, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) の生活環各段階における生物活性物質の網羅的探索, 日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年

6) Hirokazu Kawagishi, Fairy chemicals -a candidate for a new family of plant hormones and for new agrochemicals-, 6th Biennial International Conference on New Developments in Drug Discovery from Natural Products and Traditional Medicines, 2018.

7) 河岸洋和, フェアリー化合物は新しい植物ホルモンか?, 日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会 日本農芸化学会合同シンポジウム, 2018 年

8) 河岸洋和, フェアリー化合物の化学, そして農業への応用の可能性 フェアリー化合物は新しい植物ホルモン?, 日本農薬学会第43回大会「未来を照らせ!新成分・新活性-第35回農薬生物活性研究会シンポジウム」, 2018 年

9) 河岸洋和, フェアリーリングを引き起こす小さな分子, 日本薬学会第138年会シンポジウム「天然物パワー5:生物現象を制御する天然分子」, 2018 年

10) 呉静, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) の生活環各段階における生物活性物質の網羅的探索, 第60回天然有機化合物討論会, 2018 年

11) 二木美咲, 西川俊夫, 河岸洋和ら, Chaxine 類とその類縁体の合成研究, 日本農芸化学会中部支部第183回例会, 2018 年

12) 鈴木智大, 河岸洋和ら, 冬虫夏草サナギタケ (*Cordyceps militaris*) の各交配型における比較ゲノム解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

13) 古田島颯, 崔宰熏, 鈴木智大, 平井浩文, 菅敏幸, 河岸洋和ら, フェアリー化合物 2-azahypoxanthine のコムラサキシメジにおける生合成研究, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

14) 呉静, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, 高等菌類の子実体形成物質の探索, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

15) 碓井梓美, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, 白きょう病菌 (*Beauveria bassiana*) 由来の生

理活性物質の探索, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

16) Arif Yanuar RIDWAN, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, Bioorganic chemicals studies on the edible mushroom *Cortinarius caperatus*, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

17) 伊藤彰将, 崔宰熏, 鈴木智大, 平井浩文, 菅敏幸, 河岸洋和ら, コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) が産生するフェアリー化合物の生合成酵素遺伝子群の探索, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

18) 天内優子, 崔宰熏, 鈴木智大, 平井浩文, 河岸洋和ら, 冬虫夏草 *Cordyceps militaris* における 3'-amino-3'-deoxyadenosine の生合成経路の解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

19) 石岡達朗, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) 胞子由来の生体機能物質の探索, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

20) Irine Yunhafita MALYA, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, Isolation of Bioactive Compounds from *Leucopaxillus giganteus*, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

21) Fahrunnissa LISA, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, Isolation of Biologically Functional Compounds from *Tricholoma matsutake*, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

22) 上石優作, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, ナラタケ属が産生する生物活性物質に関する化学的研究, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年

23) 河岸洋和, フェアリーリングの謎を化学で解く, Visionary 農芸化学 100 シンポジウム天然物化学領域 第 1 回「生命現象に介在する天然物の化学」, 2017 年

24) 伊藤彰将, 崔宰熏, 平井浩文, 菅敏幸, 河岸洋和ら, コムラサキシメジが産生するフェアリー化合物の生合成研究, 日本きのこ学会第 21 回大会, 2017 年

25) 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, フェアリーリングにおけるシバとコムラサキシメジの共存に関する化学的研究, 日本きのこ学会第 21 回大会, 2017 年

26) 森拓未, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, ナラタケ属の産生する生理活性物質に関する化学的研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

27) 内田和輝, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) 培養液由来の生体機能物質の探索, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

28) Ridwan-Yanuar ARIF, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, Study on biologically functional compounds from the edible mushroom *Cortinarius caperatus*, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

29) 伊藤彰将, 崔宰熏, 平井浩文, 菅敏幸, 河岸洋和ら, コムラサキシメジ (*Lepista sordida*) におけるフェアリー化合物の生合成経路に関する研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

30) 松崎信生, 崔宰熏, 平井浩文, 菅敏幸, 河岸洋和ら, フェアリー化合物 ICA の代謝に関する化学的研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

31) 石岡達朗, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) 胞子由来の生体機能物質の探索, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

32) 呉静, 崔宰熏, 平井浩文, 河岸洋和ら, フェアリー化合物によるキノコ菌糸体の成長制御に関する研究, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

33) 鈴木智大, 崔宰熏, 河岸洋和ら, RNA-Seq を用いた冬虫夏草 (*Cordyceps militaris*) の感染過程における遺伝子の網羅的解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 菅 敏幸

ローマ字氏名: Kan Toshiyuki

所属研究機関名: 静岡県立大学

部局名: 薬学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 10221904

研究分担者氏名: 平井 浩文

ローマ字氏名: Hirai Hirofumi

所属研究機関名：静岡大学
部局名：農学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：70322138

研究分担者氏名：崔 宰熏
ローマ字氏名：Choi Jae-Hoon
所属研究機関名：静岡大学
部局名：農学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：40731633

研究分担者氏名：鈴木 智大
ローマ字氏名：Suzuki Tomohiro
所属研究機関名：宇都宮大学
部局名：バイオサイエンス教育研究センター
職名：准教授
研究者番号（8桁）：10649601

(2)研究協力者
研究協力者氏名：桑原 重文
ローマ字氏名：Kawahara Shigefumi

研究協力者氏名：西川 俊夫
ローマ字氏名：Nishikawa Toshio

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。