

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658160

研究課題名(和文)糖脂質ハイブリッド分子を手掛りにしたキノコ子実体誘導物質に関する化学合成的究明

研究課題名(英文) Synthetic studies on the active substances for fruiting body induction using glycolipid model compounds having sugar-lipid hybrid structures

研究代表者

西村 健 (NISHIMURA, Takeshi)

独立行政法人森林総合研究所・木材改質研究領域・主任研究員

研究者番号：10353799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖に疎水性の置換基の結合したハイブリッド構造は、キノコ子実体形成に有効であると考えられる。そこで本研究では、化学合成の手法も駆使し、種々のグルコシルセラミドとグリセロ糖脂質アナログからなる候補化合物ライブラリーを構築した。ペーパーディスクを用いたヒラタゲに対する子実体誘導活性試験の結果、グリセロ糖脂質においては糖の数、アシル基側鎖の長さが、またグルコシルセラミドにおいてはアグリコンの構造の違いが活性に関与することが判明した。グリセロ糖脂質において10 $\mu$ g、グルコシルセラミドにおいて1 $\mu$ gの微量のディスクへの添加で、菌糸のアグリゲーションと原基を誘導する効果的な活性物質を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Sugar-lipid hybrid structures are expected to be effective for fruit body induction. Then, compounds library including glyceroglycolipid analogs and glucosylceramides with various designed structures were constructed based on chemical synthetic approach. From the fruiting assay against *Pleurotus ostreatus* by paper disc method, the structure-activity relationship depending on the numbers of glucose units, carbon numbers of acyl chains, and differences in aglycon structures were suggested. Finally, the chemical substances which stimulate hyphal aggregation and primordia formation at fairly low concentration (10 $\mu$ g/disk for a glyceroglycolipid analog, 1 $\mu$ g/disk for a glucosylceramid) were successfully found in the assessment of the minimum effective dose.

研究分野：木材化学

キーワード：子実体誘導物質 化学合成 構造活性相関 グルコシルセラミド グリセロ糖脂質

### 1. 研究開始当初の背景

キノコの子実体形成機構は未なお未解明の課題である。光、温度、栄養不足などの環境ストレスはキノコの子実体形成を促進することが知られている。自然界からホルモン様のシグナル分子は未だ単離されていないが、近年、脂肪酸のシヨ糖エステルやトリテルペン配糖体、3-O-アルキルグルコースによるヒラタケに対する子実体誘起効果（培地に添加）が、申請者らによって見出されている（引用文献、）。これらはいずれも化学合成によって得られた化合物であり、合成研究をさらにすすめ、構造-活性相関を明らかにすることで、より有効なキノコ形成試薬の開発が可能となると考えられる。

これらの物質によるキノコ形成メカニズムはいまだ分かっていないが、もし自然界に“true fruiting signal”が存在するとしたら、糖に脂肪酸やアルキル基等の疎水性の置換基が付加した共通構造を有する類縁物質である可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

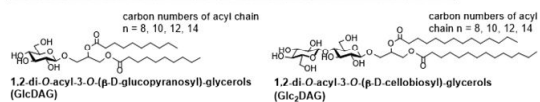
本研究では、以上の着想に基づき、構造のデザインされた、出来るだけ多くの候補化合物からなる糖脂質ハイブリッド分子のケミカルライブラリーを構築し、構造-活性相関の把握と絞り込みにより、ホルモン様の劇的なキノコ子実体形成能を持つ物質を見出すことを目的とする。具体的な候補物質としては、グリセロ糖脂質アナログとグルコシルセラミドを選定した。

### 3. 研究の方法

グリセロ糖脂質アナログは、可変アシル基部分（炭素数  $n$ : 8, 10, 12, 14）とグルコース又はセロピオースの糖部分を持つ 2 系統、すなわち 1,2-ジ-O-アシル-(3-O-β-D-グルコピラノシル)-グリセロール(GlcDAG)と 1,2-ジ-O-アシル-(3-O-β-D-セロピオシル)-グリセロール(Glc<sub>2</sub>DAG)をターゲットとし、化学合成によって調製した。グルコシルセラミド(GlcCer)については、疎水性部分のアグリコン構造の異なった、種々の植物、もしくはキノコ由来の純度の高い合成物が市販されており、このものを用いた(Nagara Science 社)これらの候補化合物を図 1 に示す。

キノコには、代表的な食用キノコでこれまで研究実績のあるヒラタケ(二核菌系)を選び、ペーパーディスク法によって子実体形成活性を評価した。予備的なスクリーニング試験において、各化合物 100 μg を染み込ませた 8mm 径濾紙を配置した MA 培地上で一定期間ヒラタケを培養し(暗室、25 °C で 10 日間培養の後、100 ルクス光照下、17 °C の条件下で培養)、ディスク周辺における菌糸の aggregation、キノコ原基及び子実体の発生の状況を観察した。活性の認められた化合物は、最少有効添加量を調べる試験に供した。

糖の数と疎水性部分(アシル基)の長さの異なるグリセロ糖脂質アナログ



疎水性部分(セラミド)の構造の異なるグルコシルセラミド

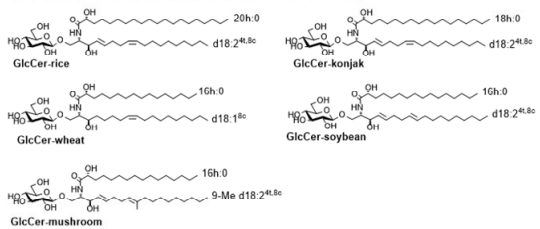
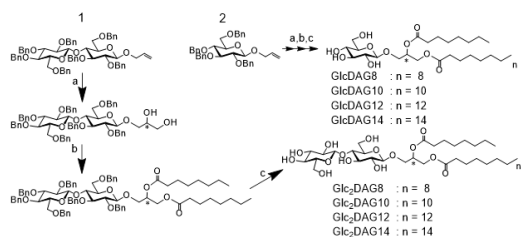


図 1 本研究で使用した糖脂質モデル化合物

### 4. 研究成果

#### (1) グリセロ糖脂質アナログの化学合成

1,2-ジ-O-アシル-(3-O-β-D-セロピオシル)-グリセロール(Glc<sub>2</sub>DAG)は、既知化合物であるアリル-β-D-セロピオシドのベンジル誘導体 1 を出発物質とし、OsO<sub>4</sub>酸化によるアリル基のジオールへの変換、酸クロライドを用いた各炭素数のアシル基の導入、接触還元による脱保護の 3 段階の反応により、いずれも良好な収率で得ることに成功した。1,2-ジ-O-アシル-(3-O-β-D-グルコピラノシル)-グリセロール(GlcDAG)は、既知化合物のアリル-β-D-グルコピラノシドのベンジル誘導体 2 を出発物質とし、同様の操作で調製した。合成スキームを図 2 に示す。



a) OsO<sub>4</sub> / NMMO / H<sub>2</sub>O / reflux / 90%, b) n-acyl chloride / Et<sub>3</sub>N / Ms4A / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / r.t. / 70 - 80%  
c) H<sub>2</sub> / palladium hydroxide on carbon / EtOH-AcOH (1 : 1) / r.t. / 80 - 90%

図 2 グリセロ糖脂質の合成スキーム

#### (2) 子実体誘導活性

ヒラタケに対する子実体誘導活性試験の結果を表 1 に示す。キノコ由来のグルコシルセラミドならびにグリセロ糖脂質アナログの GlcDAG14、Glc<sub>2</sub>DAG10 を染み込ませたディスク周辺において、光照射下での培養開始数日~10 日後には、複数の菌糸のアグリゲーションが観察され始め、その中のあるものは 20 日後には原基を形成した。また、GlcDAG10 も少し遅れてこれに続いた。一方、これ以外のグリセロ糖脂質や植物由来のグルコシルセラミド、試料を含まないコントロールディスクの周辺では菌糸のアグリゲーションや原基の発生は認められなかった。グルコシルセラミドにおいてはキノコ由来のものが有効

でセラミド部分の僅かな構造の違いが、またグリセロ糖脂質においては糖の数、アシル基側鎖の長さが活性に関与することが示唆された。

表1 子実体誘導活性試験結果

各試料のディスクへの添加量	100µg /disk		10µg /disk	1µg /disk
	20 days	28 days	20 days	20 days
GlcDAG8	-	-	-	-
GlcDAG10	-	+	-	-
GlcDAG12	-	-	-	-
GlcDAG14	+	+	-	-
Glc <sub>2</sub> DAG8	-	-	-	-
Glc <sub>2</sub> DAG10	+	+	+	-
Glc <sub>2</sub> DAG12	-	-	-	-
Glc <sub>2</sub> DAG14	-	-	-	-
GlcCer-rice	-	-	-	-
GlcCer-konjak	-	-	-	-
GlcCer-soybean	-	-	-	-
GlcCer-wheat	-	-	-	-
GlcCer-mushroom	+	+	+	+
Control	-	-	-	-

+ : 菌糸のアグリゲーション及び原基の発生を認める

- : 認めない

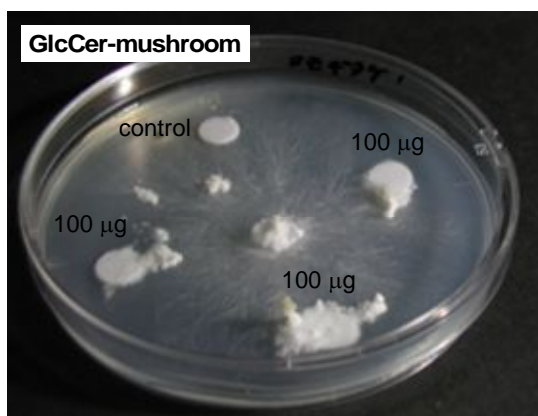
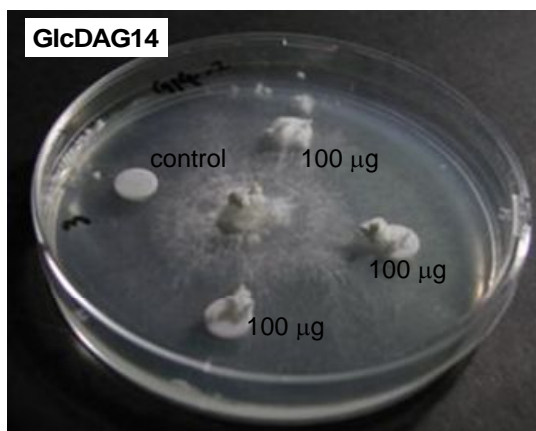


図3 菌糸のアグリゲーションと原基の形成

活性物質であることが判明した GlcDAG10、GlcDAG14、Glc<sub>2</sub>DAG10 ならびにキノコ由来のグルコシルセラミドについては、さらに活性

発現に必要な最小有効量を求める検定を行った結果、Glc<sub>2</sub>DAG10 において 10µg、キノコ由来のグルコシルセラミドにおいては 1µg という極少量のディスクへの添加によって活性が検出された。このグルコシルセラミドは、以前、川合らが報告しているスエヒロタケの子実体誘導物質（引用文献）と同一物質であった。

グルコシルセラミド及びグリセロ糖脂質は、菌界・植物界に広く存在し、生物学的意義を持った複合糖質であることが知られている。これらの物質を食用キノコのヒラタケ自身も実際に作りだしているか否かは不明であるが、キノコ形成に関与する真のシグナル分子を探索するためのキー化合物として極めて興味深い。

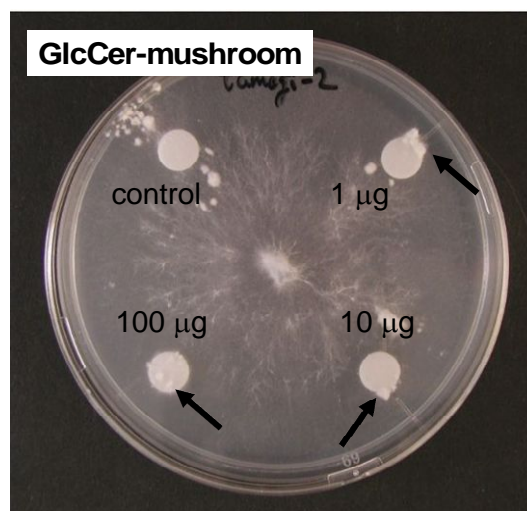


図4 菌糸のアグリゲーションと原基の形成（1 µg 添加ディスク周辺においても観察）

#### <引用文献>

Magae Y, Nishimura T, Ohara S, 3-O-Alkyl-D-glucose derivatives induce fruit bodies of *Pleurotus ostreatus*, *Mycological Research* 109, 2005, 374-376

Magae Y, Nishimura T, Ohara S, An active compound for fruiting body induction, *Current Chemical biology* 3, 2009, 231-237

Kawai G, Ikeda Y, Fruiting-inducing activity of cerebroside observed with *Schizophyllum commune*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 719, 1982, 612-618

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計6件）

Nishimura T, Magae Y, Ohara S, A glycoconjugate inducer for fruiting-body formation in *Pleurotus ostreatus* and the structure-activity relationship, Abstract of

Miebioforum2014、2014年11月19日、  
Nemunosato(Ise-Shima,Japan)

西村健、馬替由美、大原誠資、グルコシルセラミドとグリセロ糖脂質アナログに見出されたヒラタケ子実体の分化誘導活性、日本糖質学会年次大会、2014年8月11日、名古屋大学(愛知)

Nishimura T、Magae Y、Ohara S、Fruiting-inducing activity of glycolipids and their analogous compounds against *Pleurotus ostreatus*、Abstract of Internal Union of Microbiological Society Congresses、2014年7月29日、Palais des congrès de Montréal (Montreal, Canada)

西村健、馬替由美、大原誠資、グルコシルセラミドならびにグリセロ糖脂質アナログによるヒラタケ子実体の分化誘導活性、日本木材学会年次大会、2014年3月13日、愛媛大学(愛媛)

Nishimura T、Magae Y、Ohara S、Fruiting-inducing activity of glyco conjugate analogs having sugar-lipid hybrid structure、Abstract of European Carbohydrate Symposium、2013年7月8日、David International Hotel and Convention Center (Tel-Aviv, Israel)

Nishimura T、Ishihara M、Action of CBHI on the regio-specifically substituted *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside、Abstract of International Cellulose Conference、2012年10月10日、CHATERAISE Gateaux Kingdom (Sapporo, Japan)

[図書](計1件)

Nishimura T 他、ユニ出版、  
Lignocellulose Degradation and Biorefinery、2015、220-226

6. 研究組織

(1)研究代表者

西村 健 (NISHIMURA Takeshi)

独立行政法人森林総合研究所・木材改質研究領域・主任研究員

研究者番号：10353799