

学位論文（博士）

真菌二次代謝物の産生に影響を与える漢方薬
およびその構成生薬に関する研究

2018年3月

星薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻

薬化学

井上 信宏

目 次

略号一覧	1
序 論	2
本 論	10
第 1 章 菌類二次代謝物産生能に影響を与える漢方薬の探索	10
第 1 節 漢方薬添加 PDB 培地を用いたスクリーニング	11
第 2 節 漢方薬添加 CDY 培地を用いたスクリーニング	14
小括	17
第 2 章 真武湯が誘導する菌類二次代謝物に関する検討	19
第 1 節 真武湯が誘導する菌類二次代謝物の探索	20
第 2 節 新規 xanthone 誘導体 24-hydroxyshamixanthone の構造解析	23
第 3 節 真武湯に含有される emericellin 類誘導因子の探索	27
第 4 節 真武湯構成生薬の菌類二次代謝物誘導性の検討	32
小括	34
第 3 章 芍薬甘草湯が誘導する菌類二次代謝物に関する検討	36
第 1 節 芍薬甘草湯およびその構成生薬が誘導する菌類二次代謝物	37
第 2 節 シャクヤクエキスの <i>E. nidulans</i> に対する ST 産生誘導の一般性	38
第 3 節 <i>A. flavus</i> の sterigmatocystin、aflatoxin B ₁ および B ₂ 産生能について	41
第 4 節 各生薬エキスの <i>E. nidulans</i> に対する sterigmatocystin 誘導性	42
小括	44
結 論	45

実験の部	49
化合物の NMR チャート	60
謝辞	64
参考文献	65
論文リスト	70

略号一覧

本論文においては、以下の略号を使用する。

AF	Aflatoxin
CDY	Czapek-dox yeast broth
DAD	Diode array detector
DNAMT	DNA methyltransferase
^1H - ^1H COSY	^1H - ^1H Correlation spectroscopy
HDAC	Histone deacetylase
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HR-ESI-MS	High resolution electrospray ionization mass spectrometry
J	Coupling constant
m/z	Mass-to-charge ration
NOESY	Nuclear Overhauser and exchange spectroscopy
ODS	Octadecylsilyl
PDB	Potato dextrose broth
ST	Sterigmatocystin
t_R	Retention time
VEGF	Vascular endothelial growth factor

序 論

真菌類は様々な物質を代謝する分解者と、有機化合物を産生する生産者としての特徴を併せ持つ、真核生物に属する微生物である。分解者としては主に植物の分解を担っており、植物の木質成分であるリグニンや多糖類の代謝分解能を持つ。また一部の菌は動物性素材の分解能を示し、ケラチンを初めとしたタンパク質を分解しアミノ酸を産生する。このような分解過程で得られた物質は真菌類の生育に用いられるが、その過程で二次代謝物の産生が行われるため、“第 2 の生産者”とも呼ばれている。

真菌類の産生する二次代謝物は 10,000 から 23,000 種類存在すると言われており¹⁾、その探索研究は 100 年以上前から始められている。最も古い真菌類からの生理活性物質の探索例としては、1877 年に Stahlschmidt が担子菌 *Hapalopilus nidulans* から抗真菌活性物質 polyporic acid を単離した報告がある²⁾。菌類二次代謝物の系統的な探索は、1922 年に Harold Raistrick が 200 種類以上の化合物を単離したことが始まりとされている^{3,4)}。その後も真菌類の二次代謝物研究は続き、1929 年には Fleming により *Penicillium* 属菌から β -lactum 系抗菌薬 penicillin G の単離が行われた (Fig. A)⁵⁾。また 1939 年に Oxford らにより *P. griseofulvum* から発見された抗真菌薬 griseofulvin⁶⁾ や、1976 年に Ruegger らにより *Tolypocladium polysporum* から単離された免疫抑制薬 cyclosporin A⁷⁾、1986 年に春山らにより *P. citrinum* から単離された脂質異常症治療薬 mevastatin⁸⁾ などが報告されている。

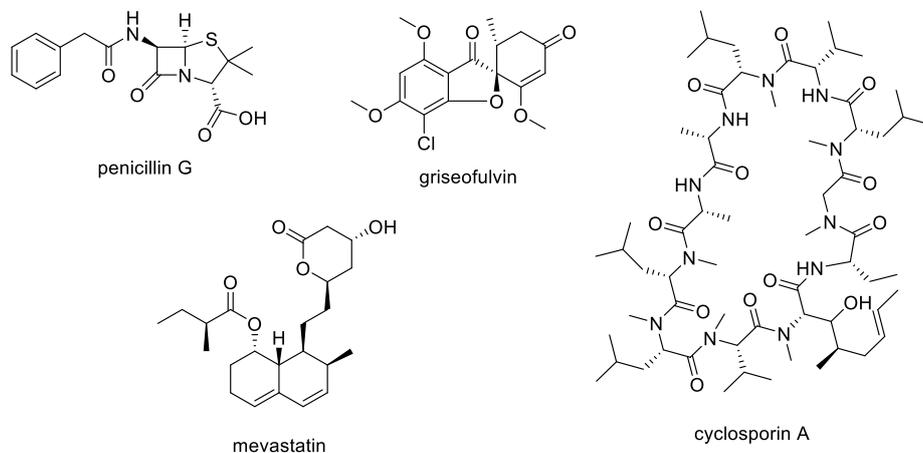


Fig. A 真菌類より得られた医薬品の構造

真菌は医薬品になりうる有用な二次代謝物を作り出す一方で、ヒトにとって有害な物質も作り出しており、それらは総称してカビ毒（マイコトキシン）と呼ばれている (Fig. B)。最も古く有名なマイコトキシンは、麦角菌 *Claviceps purpurea* が産生する手足の壊疽などを引き起こす ergotamine や lysergic acid などの麦角アルカロイドである。中世ヨーロッパでは麦角菌に感染したライ麦を使ったパンによる中毒が、たびたび発生していたことが知られている⁹⁾。日本国内でマイコトキシンが注目されるようになったのは、1953年に起こった黄変米事件である¹⁰⁾。*P. citreo-viride* や *P. citrinum* などの *Penicillium* 属菌が原因菌であり、神経毒である citreoviridin や腎毒性を持つ citrinin を産生する¹¹⁾。さらに、マイコトキシンの危険性が世界的に最も認知された事故が、1960年にイギリスで発生した七面鳥 X 病である¹²⁾。*Aspergillus flavus* の産生する aflatoxin 類は、今日では天然物で最も発がん性の強い物質として知られている。現在マイコトキシンは数百種類が知られており¹³⁾、他にも、*P. patulum* が産生し腎機能障害を起こす patulin や、*Fusarium graminearum* が産生し嘔気などの急性毒性を持つ deoxynivalenol、*F. graminearum* が産生し女性ホルモン様作用を持つ zearalenone など、多くのマイコトキシンが報告されている。

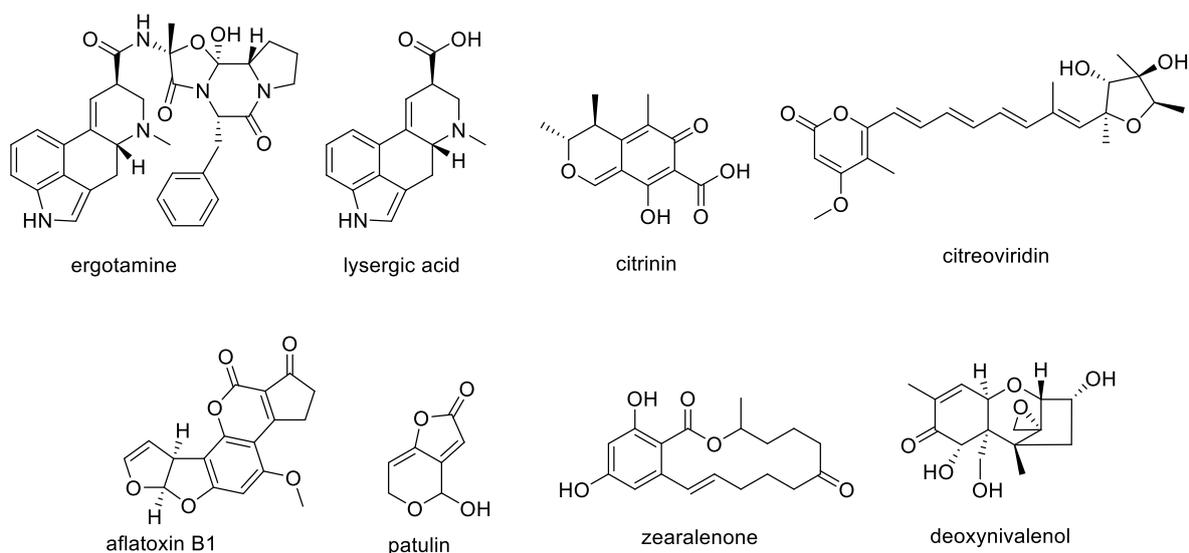


Fig. B マイコトキシンの構造

マイコトキシンを含め、真菌類の二次代謝物はその生合成から分類されており、そのうち最大のグループは酢酸-マロン酸経路で生合成されるポリケタイドとされている。ポリケタイドに分類される化合物は、様々な機能を持つドメインがクラスター化された *polyketide synthase* により、主にマロニル CoA を出発原料とし、アセチルCoA を伸長材料にして炭素鎖が形成され、さらに酸化やエステル化、環化などの修飾を受け合成される。これらの *polyketide synthase* は、一般的にクラスターの上流部分に存在する転写制御因子によってその発現が制御されている。このような転写制御因子の発現は、生物周辺の環境によって応答するグローバルレギュレーターにより制御されることが知られており、CirD¹⁴⁾ や HdaA¹⁵⁾ などが報告されている。その中でも特に LaeA に関しては研究が進んでおり、*A. nidulans* における *sterigmatocystin* (ST) 産生に関与する転写制御因子 AflR の発現を亢進し、ST の産生を促進するほか¹⁶⁾、lovastatin や penicillin などの産生制御にも関与すると考えられている¹⁷⁾。

しかし上記のような、生合成に関連する酵素は常に発現しているわけではなく、生合成酵素がコードされた遺伝子の多くは通常休眠状態にあることが知られている。例えば *A. niger* ATCC 1015 株では、全ゲノム解析の結果、生合成遺伝子数から推定される生合成可能な二次代謝物数と比べて、単離された化合物数はその 3 割にも満たず、残りの 7 割は未発見の状態であることが明らかになった¹⁸⁾。また他の全ゲノム解析済み真菌である *A. nidulans* や *Arthroderma benhamiae* においても、多くの生合成遺伝子は休眠状態にあると言われている¹⁹⁾。近年このような休眠遺伝子を賦活化することで、真菌の持つ潜在的な物質生産能力を引き出し、新たな化合物の獲得、あるいは既知有用化合物の大量生産を目的とした研究が広く行われている。

真菌からの化合物を獲得する方法は、微生物が培養条件 (培地組成、pH など) に応じて代謝物を変化させる性質を利用した方法がある。培地組成の変更では、2010 年に Pimenta らによって報告された citrinalin A および B は、海生糸状菌 *P. citrinum* を海水培地からさらに塩濃度を高めた組成に変更して培養することで産生された²⁰⁾ (Fig. C)。また Huang らによって報告され

た細胞毒性のある naphthopyrone 二量体である rubasperone 類は、*A. tubingensis* を potato dextrose broth (PDB) 培地から米培地に変更して培養することで産生された²¹⁾。これらの産生物の変化は、培地成分がグローバルレギュレーターに何らかの作用を与えた結果、発生していると考えられており、炭素源は CreA^{22),23)} が、窒素源は AreA²⁴⁾ がそれぞれ応答して二次代謝クラスターを制御していることが明らかになっている。pH の影響では、1993 年に Espeso らによって報告された *A. nidulans* の penicillin の大幅な産生増加は、酸性ではなく中性域で起こることが確認された²⁵⁾。現在では pH による二次代謝の変化は PacC の応答により制御されていることが知られている²⁶⁾。Shu らは、*P. brevicompactum* の免疫抑制物質 mycophenolic acid の産生量が 900 ルクスの青色光照射によって 1.6 倍に増加することを報告した²⁷⁾。菌類の光に対する応答は、LaeA が担っているとされている²⁸⁾。

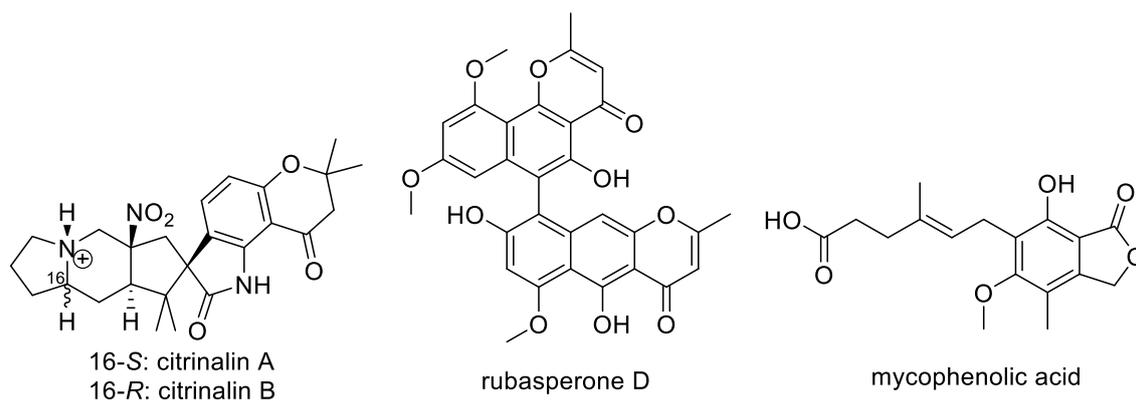


Fig. C 培地条件の変更で産生された化合物の構造

他の微生物との共培養も、新たな化合物を得る方法の一つとして利用される。2011 年に野中らが報告した secopenicillide C は、*P. pinophilum* と子囊菌 *Trichoderma harzianum* を共培養することで産生された (Fig. D)²⁹⁾。2013 年には Kęnig らが *A. fumigatus* を放線菌 *Streptomyces rapamycinicus* と共培養させ、fumicycline A および B の単離を報告した³⁰⁾。Fumicycline 類は、*S. rapamycinicus* が物理的に接触することで転写制御因子 FccR が発現し、生合成されることが明らかにされている。

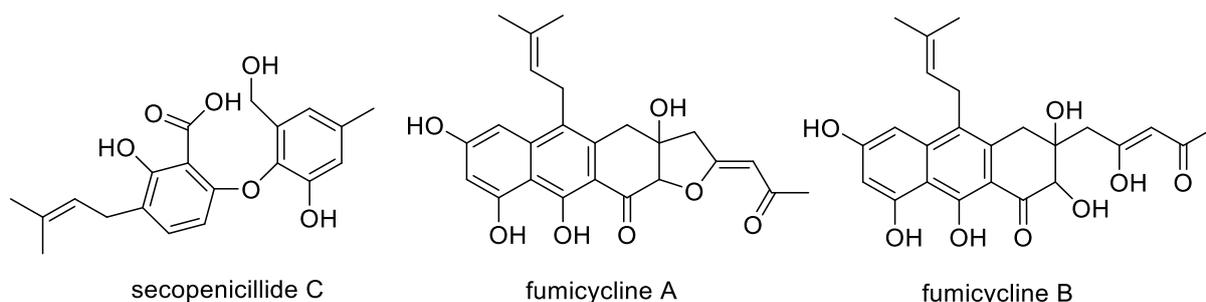


Fig. D 共培養より得られた化合物の構造

以上のように、培養条件の変更による有用物質の産生は、遺伝子発現の変化により発生している。そのため、より直接的に遺伝子発現を制御する遺伝子工学によって新規化合物の取得を行った例もある。Bergmann らは *A. nidulans* を用いて、二次代謝物生合成遺伝子クラスターの制御タンパクと推定される ApdR の過剰発現株を作製し、ハイブリッド型ポリケタイド aspyridone A および B の単離を報告した (Fig. E)³¹⁾。また Chiang らは、同じく *A. nidulans* を用いて、遺伝子クラスター上流に位置するプロモーター遺伝子をアルコールにより強力に誘導されるプロモーター遺伝子 *alcA* に組換えることで、非還元型ポリケタイド asperfuranone の単離に成功した³²⁾。

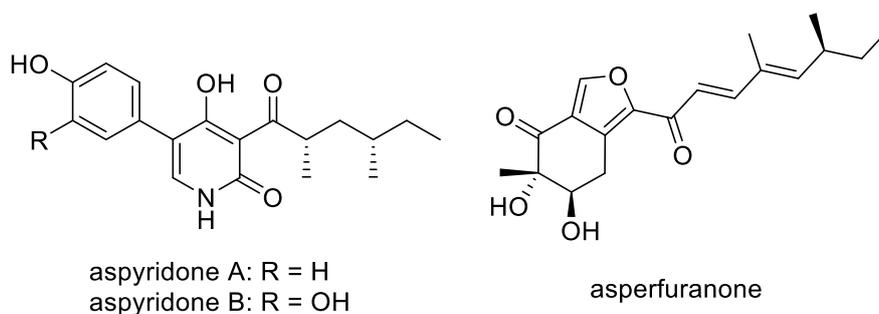


Fig. E 遺伝子工学により得られた化合物の構造

また近年、遺伝子組換えを行わずに、真核生物に特有のヒストンのメチル化やアセチル化を制御するエピジェネティクスを利用した方法により新規化合物を得る研究が行われている。これらの研究では、エピジェネティクスを制御する化学物質である DNA methyltransferase (DNAMT) inhibitor や、histone deacetylase (HDAC) inhibitor などの酵素阻害剤を培地に添加する方

法で行われ、Cichewicz によってケミカルエピジェネティクスと呼称されている (Fig. F) ³³⁾。

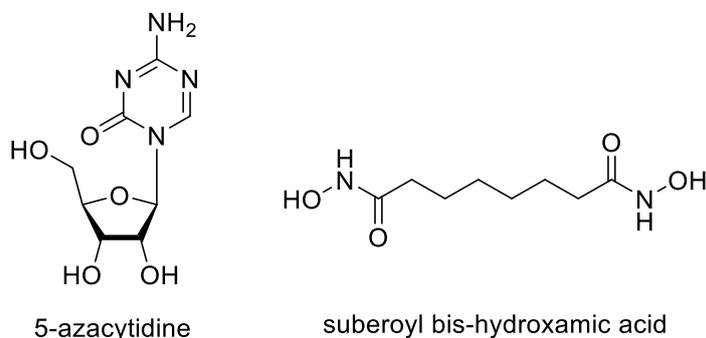


Fig. F エピジェネティクスを制御する化合物の構造

Williams らは 2008 年に、*Cladosporium cladosporioides* に対して DNAMT inhibitor である 5-azacytidine を作用させ、糖化ポリケタイドである lunalide A および B の単離を報告した (Fig. G) ³⁴⁾。浅井らは 2013 年に、*Chaetomium indicum* に対して HDAC inhibitor である suberoyl bis-hydroxamic acid を作用させることで、スピロラクトンである spiroindicumide A の単離を報告した ³⁵⁾。

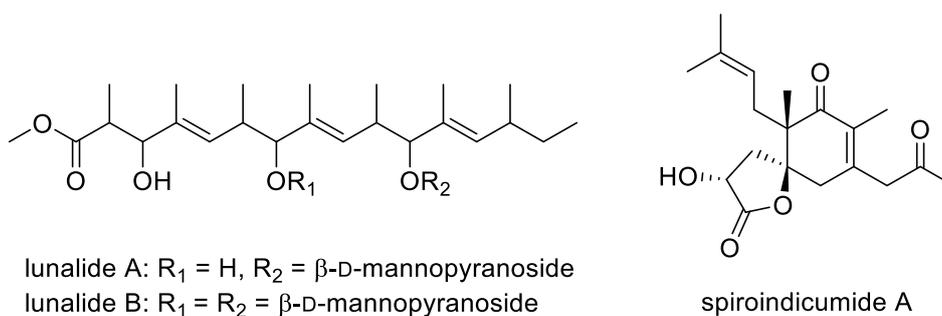


Fig. G エピジェネティクスにより得られた化合物の構造

また植物等の天然素材を添加する報告もある。例えば Zain はオリーブオイルが *A. flavus* や *P. expansum* などの二次代謝物産生能を変化させることを ³⁶⁾、Qarawi らはマオウ属植物 *Ephedra alata* のエタノール抽出物が *A. flavus* の脂質代謝を減少させること ³⁷⁾ を報告した。また筆者を含む研究グ

ループは、生薬ゴボウシ *Arctium lappa* L. の熱水抽出エキスが *A. fumigatus* の細胞毒性物質 tryptacidin の産生を誘導させることを報告した³⁸⁾。さらに生薬の中には酵素阻害作用を持つものの他³⁶⁻³⁹⁾、一般的な植物にも含まれるフラボノイドである luteolin⁴³⁾、pomiferin⁴⁴⁾、apigenin⁴⁵⁾ が上記した HDAC 阻害作用を持つことも知られている。

以上のように、菌類の二次代謝物を産生させるために様々な手法が検討され、多くの新規化合物の発見、また有用物質の生産強化に繋がってきた。筆者はこれらの中でも、非常に簡便な操作で行える化学物質の添加に着目した。中でも添加する化学物質として、様々な化合物を含有する漢方薬を菌類の培養に添加することにより有用物質が得られるのではないかと考えた。

漢方薬を添加物として真菌二次代謝物を変化させたという報告はこれまでにない。また漢方薬は、動植物および鉱物を原料とする生薬が複数組み合わせられて一つの処方とされ、非常に多くの成分から成り立つ化合物の総体である。さらに、生薬の組み合わせにより医薬品としての効能が変わることから、真菌においてもそれぞれの漢方薬で異なる作用を示すことが予想された。上記の事実を鑑みると、生薬よりさらに多くの成分を含む漢方薬も、真菌類の二次代謝物産生能の変化を引き起こすことが可能と考えられた。このような理由から、筆者は漢方薬の添加によって真菌の二次代謝物産生能を変化させ、従来の方法では得られない二次代謝物を獲得することを考えた。そこで本研究論文では、真菌の二次代謝物産生能へ影響を与える漢方薬やその構成生薬を明らかにすることを目的とし研究を行った。

本研究には、2005 年に全ゲノム解析が完了し糸状菌の中でモデル生物として最も良く研究されている、*Emericella nidulans* IFM60678 株⁴⁶⁾ を用いた。*E. nidulans* が産生する二次代謝物として、麦芽エキス培地では emerin⁴⁷⁾ や asperlin および 3-carboxy-2,4-diphenyl-but-2-enoic anhydride⁴⁸⁾ などが、0.05% 塩化カリウム添加 Czapek-Dox 培地では nidulin⁴⁹⁾ が、コムギ培地では cordycepin⁵⁰⁾ が、YG 培地では diorcinol⁵¹⁾ などが報告されている。

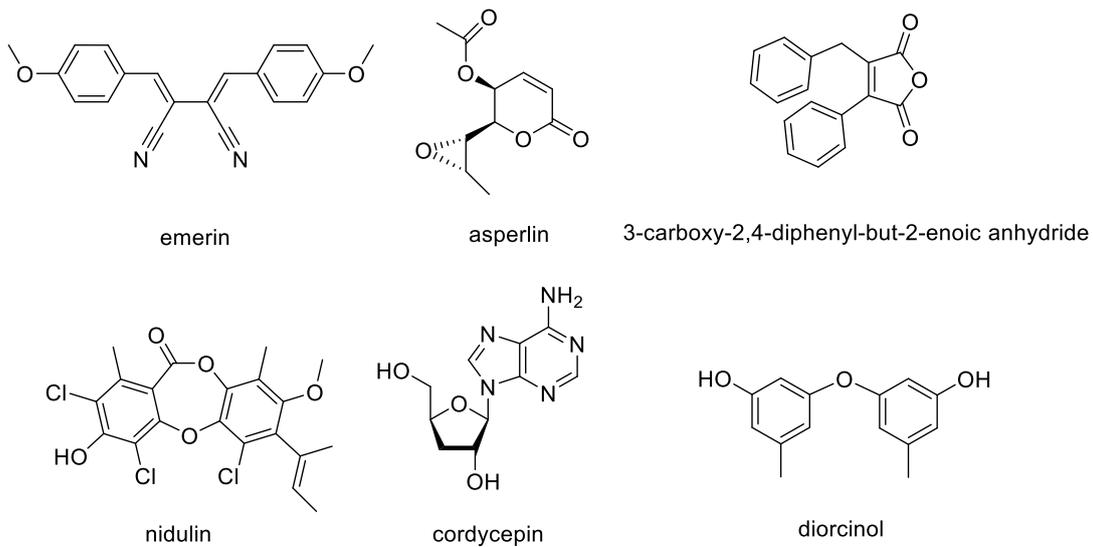


Fig. H *E. nidulans* が産生する二次代謝物の構造

本論文の第 1 章では *E. nidulans* の二次代謝物産生能に影響を与える漢方薬の探索を目的としたスクリーニングについて、第 2 章では真武湯の添加により得られた 24-hydroxyshamixanthone の単離と構造解析、および真武湯に含まれる誘導因子の探索について、第 3 章ではシャクヤクエキスが誘導する二次代謝物 sterigmatocystin に関連する各生薬エキスの誘導性について述べる。

本 論

第 1 章 菌類二次代謝物産生能に影響を与える漢方薬の探索

本章では、漢方薬が菌類の二次代謝物産生に与える影響について検討するため、菌類を漢方薬添加培地で培養し、産生される物質を観測した。試験菌として *E. nidulans* IFM60678 株を用いた。漢方薬は、規格化が十分に行われていることから、日本薬局方第 16 改正収載品から選択した (Table 1-1)。培地は、真菌の培養に代表的なものとして、天然素材を主な原料とした PDB と無機塩類を中心とした Czapek-Dox yeast broth (CDY) を用いた。

各種漢方薬を添加した培地で試験菌を 30°C、7 日間培養した。培養後凍結乾燥し、CH₃OH で抽出して得られた培養エキスを HPLC で成分分析した。次に得られた HPLC クロマトグラムをコントロール（漢方薬無添加培養）と比較し、漢方薬添加培養時に新たに産生されるピークを観測した。第 1 節では漢方薬添加 PDB 培地を用いたスクリーニングについて、第 2 節では漢方薬添加 CDY 培地を用いたスクリーニングについて述べる。

Table 1-1 本研究で使用した漢方薬一覧

漢方薬	漢方薬
a: 葛根湯	o: 麻黄湯
b: 葛根湯加川芎辛夷	p: 麦門冬湯
c: 乙字湯	q: 真武湯
d: 八味地黄丸	r: 苓桂朮甘湯
e: 大柴胡湯	s 補中益気湯
f: 小柴胡湯	t: 六君子湯
g: 柴胡桂枝湯	u: 釣藤散
h: 半夏瀉心湯	v: 十全大補湯
i: 黄連解毒湯	w: 芍薬甘草湯
j: 半夏厚朴湯	x: 柴朴湯
k: 小青竜湯	y: 大建中湯
l: 当帰芍薬散	z: 牛車腎気丸
m: 加味逍遥散	aa: 柴苓湯
n: 桂枝茯苓丸	

第 1 節 漢方薬添加 PDB 培地を用いたスクリーニング

まず、適切な漢方薬の添加濃度を決定するため、27 処方の漢方薬を、0.4、2 および 10% の濃度になるように調製した PDB 培地を用い、*E. nidulans* IFM60678 株の培養を、30°C で 7 日間行った。0.4-10% の濃度範囲では、*E. nidulans* の生産物質の変化は共通していたことから、漢方薬添加濃度は最も低い 0.4% とした。なお、培養期間中すべての漢方薬添加培地で良好な菌の生育が確認された。

次に、二次代謝物産生能に影響を与える漢方薬を探索するため、漢方薬添加により得た *E. nidulans* の培養エキスと、コントロール（無添加培養）で得た培養エキスの変化を DAD-HPLC で分析した（測定波長 UV 200-400nm）。HPLC クロマトグラムを比較した結果、UV 300 nm で、葛根湯、大柴胡湯、柴胡桂枝湯、半夏瀉心湯、小青竜湯、当帰芍薬散、麻黄湯、麦門冬湯、真武湯、苓桂朮甘湯、補中益気湯、六君子湯、釣藤散、十全大補湯、芍薬甘草湯、柴朴湯、大建中湯、牛車腎気丸および柴苓湯の 19 処方において、共通に観測されるピーク (**2**: $t_R = 25.6$ 、**3**: $t_R = 25.8$ 、**4**: $t_R = 26.3$ min) が顕著に観測された (Fig. 1-1)。これらのうち **2** は HPLC における保持時間および UV スペクトルを標品と比較することによって、*emericellin* であると同定した。また **2** の極大 UV 吸収波長 300 nm における検出限界は 1 $\mu\text{g/mL}$ で、コントロールでは **2** は検出限界以下であった。さらに **3** および **4** は共通して、240、270、300 および 390 nm 付近に UV 極大吸収を有していたことから、類縁物質であることが推測された (Fig. 1-2)

以上の結果から、上記した 19 処方の漢方薬は、*E. nidulans* IFM60678 株に対してコントロールでは産生されない **2-4** の産生を誘導する作用を持つことが観測された。特に真武湯を添加して培養した場合に **2-4** の産生量が最も多く観測された。したがって、真武湯を用いて新たに産生誘導された代謝物の単離と同定、およびその誘導因子の探索を行うこととした。

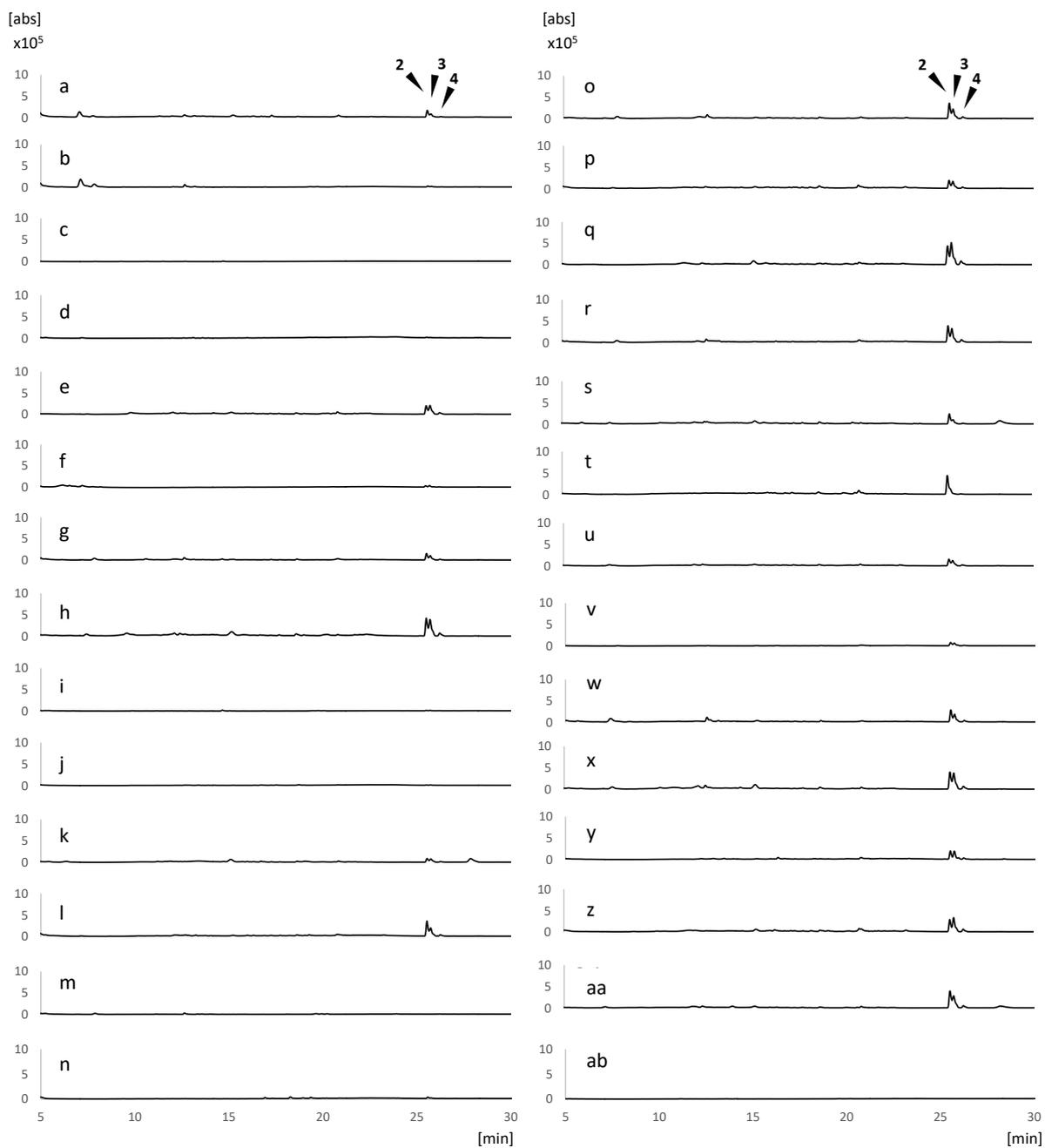


Fig. 1-1 漢方薬添加 PDB 培地で培養し得られたエキスのクロマトグラム
 検出波長は UV 300 nm とした。2: $t_R = 16.5$, 3: 25.8, 4: 26.3 min. コントロールは培地のみで培養して得た培養エキスとした。2 の検出限界: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. a: 葛根湯、b: 葛根湯加川芎辛夷、c: 乙字湯、d: 八味地黄丸、e: 大柴胡湯、f: 小柴胡湯、g: 柴胡桂枝湯、h: 半夏瀉心湯、i: 黄連解毒湯、j: 半夏厚朴湯、k: 小青竜湯、l: 当帰芍薬散、m: 加味逍遥散、n: 桂枝茯苓丸、o: 麻黄湯、p: 麦門冬湯、q: 真武湯、r: 苓桂朮甘湯、s: 補中益气湯、t: 六君子湯、u: 釣藤散、v: 十全大補湯、w: 芍薬甘草湯、x: 柴朴湯、y: 大建中湯、z: 牛車腎気丸、aa: 柴苓湯、ab: コントロール

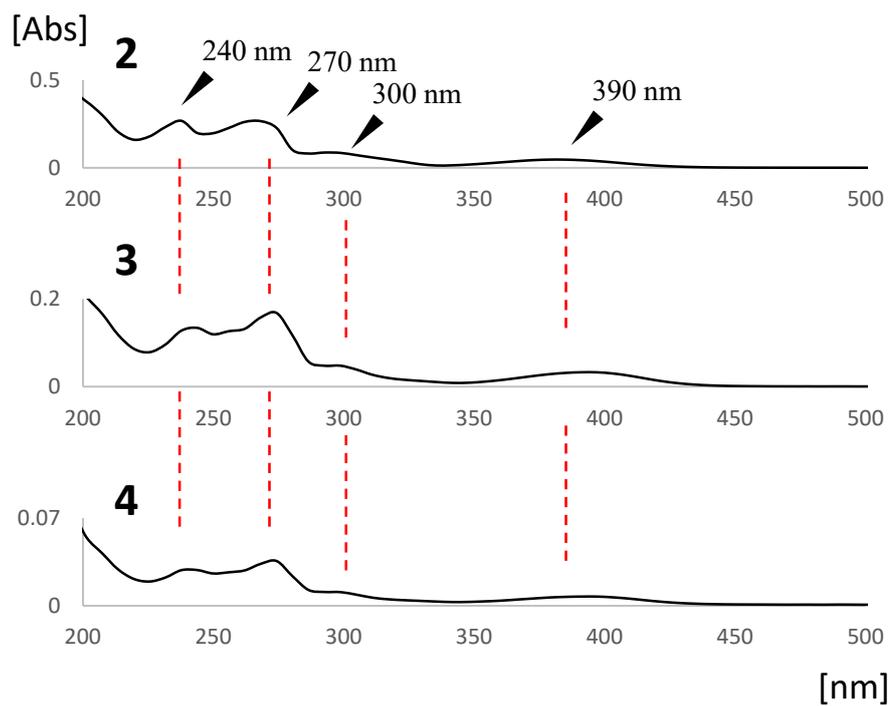


Fig. 1-2 化合物 2-4 の UV 吸収スペクトル

第 2 節 漢方薬添加 CDY 培地を用いたスクリーニング

本節では、菌類二次代謝物産生能に影響を与える漢方薬を探索するため、PDB と同じく真菌の培養に汎用される CDY 培地に 0.4% の濃度で各種漢方薬を添加して、*E. nidulans* IFM60678 株の培養を行った。添加培養で得た培養エキスおよびコントロールを DAD-HPLC で成分分析し、両者の HPLC クロマトグラムの変化について比較した（測定波長 UV 200-400 nm）。その結果、UV 324 nm において、葛根湯加川芎辛夷、乙字湯、八味地黄丸、小柴胡湯、柴胡桂枝湯、半夏厚朴湯、当帰芍薬散、加味逍遥散、真武湯、補中益气湯、釣藤散、十全大補湯および芍薬甘草湯の 13 処方でも共通に観測されるピーク (7: $t_R = 16.5$ min) が顕著に観測された (Fig. 1-3)。化合物 7 は HPLC における保持時間および UV スペクトルを標品と比較することによって、sterigmatocystin (ST) であると同定した (Fig. 1-4)。また ST の極大 UV 吸収波長 324 nm における検出限界は 10 ng/mL で、コントロールでは ST は検出限界以下であった。さらに各漢方薬が誘導する *E. nidulans* IFM60678 株の ST 産生量を定量分析した。その結果、7 の産生量が特に多くなる漢方薬は、乙字湯 (23.2 $\mu\text{g/mL}$)、八味地黄丸 (26.5 $\mu\text{g/mL}$) および芍薬甘草湯 (23.5 $\mu\text{g/mL}$) であることが示された (Table 1-2)。

そこで、これらの漢方薬の中で、ST の顕著な産生が誘導され、最も単純な処方である芍薬甘草湯を用いた添加培養を行い、構成生薬の持つ ST 誘導能の詳細を検討することとした。

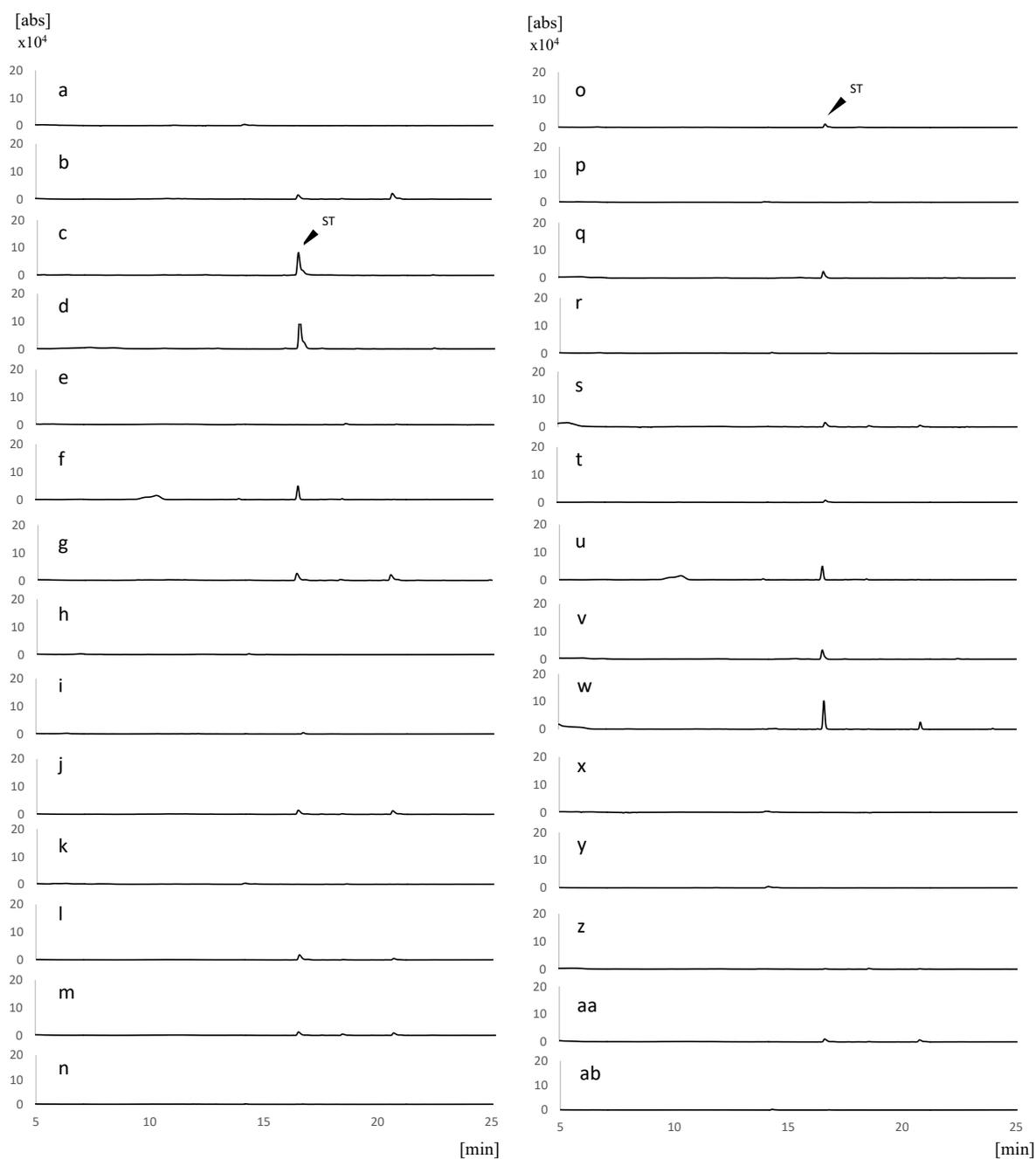
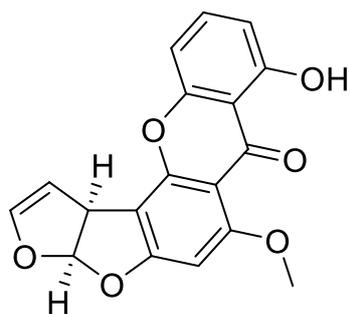


Fig. 1-3 漢方薬添加 CDY 培地で培養し得られたエキスのクロマトグラム
 検出波長は UV 324 nm とした。コントロールは培地のみで培養して得た培養エキスと
 した。ST: $t_R = 16.5$ min. ST の検出限界: 10 ng/mL. a: 葛根湯、b: 葛根湯加川芎辛夷、c:
 乙字湯、d: 八味地黄丸、e: 大柴胡湯、f: 小柴胡湯、g: 柴胡桂枝湯、h: 半夏瀉心湯、
 i: 黄連解毒湯、j: 半夏厚朴湯、k: 小青竜湯、l: 当帰芍薬散、m: 加味逍遥散、n: 桂枝
 茯苓丸、o: 麻黄湯、p: 麦門冬湯、q: 真武湯、r: 苓桂朮甘湯、s: 補中益气湯、t: 六君
 子湯、u: 釣藤散、v: 十全大補湯、w: 芍薬甘草湯、x: 柴朴湯、y: 大建中湯、z: 牛車腎
 気丸、aa: 柴苓湯、ab: コントロール



sterigmatocystin (7; ST)

Fig. 1-4 sterigmatocystin の構造

Table. 1-2 各種漢方薬添加培養により産生された sterigmatocystin の定量値
 検出波長は UV 324 nm とした。値は標準偏差 (SD, N = 4) とともに、培地 1 mL あたりの ST 産生量を示す。n. d.: not detected. tr.: trace.

Kampo medicine	Sterigmatocystin μg/ mL ± SD
Bakumondo-to	n. d.
Cho-to-san	11.2 ± 0.5
Daiken-chu-to	n. d.
Dai-saiko-to	n. d.
Gosha-jinki-gan	n. d.
Hachimi-jio-gan	26.5 ± 1.7
Hange-kouboku-to	1.0 ± 0.2
Hange-shashin-to	n. d.
Hochu-ekki-to	1.4 ± 0.2
Juzen-taiho-to	5.4 ± 0.7
Kakkon-to-ka-senkyu-shini	1.2 ± 0.2
Kakkon-to	n. d.
Kami-shoyo-san	0.8 ± 0.1
Keishi-bukuryo-gan	n. d.
Mao-to	tr.
Otsuji-to	23.2 ± 7.8
Ouren-gedoku-to	tr.
Rikkunshi-to	tr.
Ryokei-jutsukan-to	n. d.
Saiboku-to	n. d.
Saiko-keishi-to	2.1 ± 0.6
Sairei-to	tr.
Shakuyaku-kanzo-to	23.5 ± 2.2
Shimbu-to	2.7 ± 0.8
Sho-saiko-to	13.7 ± 3.0
Sho-seiryu-to	n. d.
Touki-shakuyaku-san	6.3 ± 0.3
Control	n. d.

小括

E. nidulans IFM60678 株の二次代謝物産生能に影響を与える漢方薬を探索するため、日本薬局方第 16 改正に記載された 27 処方について添加培養実験を行った。最初に、最適な添加濃度を決定するため、0.4、2、10% の濃度で添加培養を行った。その結果、最低濃度でも真菌二次代謝物に変化が観測されたことから、本実験では漢方薬を 0.4% 添加した培地で培養を行うこととした。

次に菌類の二次代謝物産生に影響を与える漢方薬を探索するため、PDB 培地に漢方薬を添加して *E. nidulans* IFM60678 を培養した。培養エキスの DAD-HPLC の結果から、UV 300 nm において、葛根湯、大柴胡湯、柴胡桂枝湯、半夏瀉心湯、小青竜湯、当帰芍薬散、麻黄湯、麦門冬湯、真武湯、苓桂朮甘湯、補中益気湯、六君子湯、釣藤散、十全大補湯、芍薬甘草湯、柴朴湯、大建中湯、牛車腎気丸および柴苓湯の 19 処方の漢方薬で共通した新たに産生されるピーク (2: $t_R = 25.6$ 、3: $t_R = 25.8$ 、4: $t_R = 26.3$ min) を観測した。特に、真武湯添加培養時に、最も多い 2-4 産生量を示した。2 は HPLC 保持時間および UV 吸収スペクトルの標品との比較から emericellin であると同定した。2 の産生量はコントロールでは検出限界以下であった。また 2-4 の UV スペクトルはいずれも、240、270、300 および 390 nm 付近に共通の極大吸収を有していたことから、類縁物質であることが推測された。

次に CDY 培地に漢方薬を添加して *E. nidulans* IFM60678 を培養した。培養エキスの DAD-HPLC の結果から、UV 324 nm において、葛根湯加川芎辛夷、乙字湯、八味地黄丸、小柴胡湯、柴胡桂枝湯、半夏厚朴湯、当帰芍薬散、加味逍遥散、真武湯、補中益気湯、釣藤散、十全大補湯および芍薬甘草湯の 13 処方共通して新たに産生されたピーク (7: $t_R = 16.5$ min) を確認した。また 7 の産生量が特に多くなる漢方薬は、八味地黄丸、芍薬甘草湯、乙字湯であることが示された。化合物 7 は HPLC の保持時間および UV 吸収スペクトルの標品との比較から ST であると同定した。ST の産生量はコントロールでは検出限界以下であった。また ST は *A. versicolor* や *A. flavus*、

A. nidulans などにより産生されるマイコトキシンで、aflatoxin 類の生合成中間体でもある。

PDB 培地に添加して **2-4** の産生を、また CDY 培地に添加して **7** の産生を誘導したそれぞれの漢方薬は、*E. nidulans* IFM60678 株に対して共通の化合物を産生誘導したことから、何らかの共通性があると推測した。しかしながら、真菌二次代謝能に影響を与えたこれらの漢方薬の構成生薬や使用部位、適応症などについて比較検討したが、共通性は見いだせなかった。

以上の実験から、漢方薬は *E. nidulans* IFM60678 株の二次代謝物産生に影響をあたえることが確認された。そのため、第 2 章では **2** の産生量が最も多かった真武湯をモデルに、新たに産生された化合物の単離と構造解析、および真武湯中に含まれる **2** の誘導因子の探索について、また第 3 章では特に強い ST の産生誘導能を示した芍薬甘草湯をモデルに、その構成生薬と ST 誘導能の関係について、また各生薬における ST の誘導性について検討することとした。

第 2 章 真武湯が誘導する菌類二次代謝物に関する検討

第 1 章第 1 節の結果から、漢方薬 20 処方を添加した PDB 培地で *E. nidulans* IFM60678 株を培養すると、コントロールでは確認されない **2-4** が産生されることが明らかとなった。それらの産生量は真武湯添加培養で最も多く産生された。

そこで本章では新たに産生された **2-4** の構造決定を目的に、真武湯添加培養を行い、培養エキスの分離精製を行った。その過程で、**2-4** に類似した UV 吸収スペクトルを有する **1**、**5** および **6** が観測されたことから、これらのピークの単離と構造決定もあわせて行った (Fig. 2-1)。また、これらの化合物を誘導させた因子について着目し、**2** の産生を指標にした真武湯由来の誘導因子の探索と、構成生薬の誘導性について検討を行った。

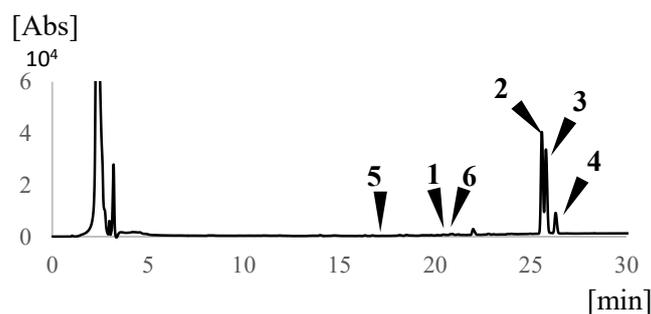


Fig. 2-1 真武湯添加培養により新たに産生されたピーク
検出波長は UV 300 nm とした。

第 1 節 真武湯が誘導する菌類二次代謝物の探索

化合物 **2-4** を分離するため、真武湯 0.4% を添加した PDB 培地 13 L で *E. nidulans* の培養を行った。培養後自然ろ過により菌体と培養ろ液に分離し、得られた菌体を凍結乾燥後、CH₃OH で抽出した。CH₃OH 抽出物を濃縮乾固後、水と AcOEt で分配し、得られた有機層をさらに CH₃CN と hexane で分配した。得られた CH₃CN 層を sephadex LH-20 を用いたオープンカラムクロマトグラフィーで 11 画分に分離した。次に各画分を ODS カラムを用いた分取 HPLC で順次精製した。その結果、Fr. 2 から 3 つのピーク **2-4** ($t_R = 25.6, 25.8, 26.3$ min) と、類似した UV スペクトルを有する 3 つのピーク **1** ($t_R = 21.6$ min) および **5** ($t_R = 18.6$ min) を、Fr. 6 から **6** ($t_R = 21.9$ min) を単離した (Chart. 2-1)。化合物 **2-6** は、ESI-MS および ¹H-NMR スペクトルデータの文献値との比較から、それぞれ既知化合物 emericellin (**2**)⁵²⁾、shamixanthone (**3**)⁵³⁾、epishamixanthone (**4**)⁵⁴⁾、pre-shamixanthone (**5**)⁵⁵⁾、variecoxanthone A (**6**)⁵⁶⁾ と同定した (Fig. 2-2)。化合物 **1** は新規化合物であったので、より詳細な解析を試みた。

Emericella nidulans IFM 60678

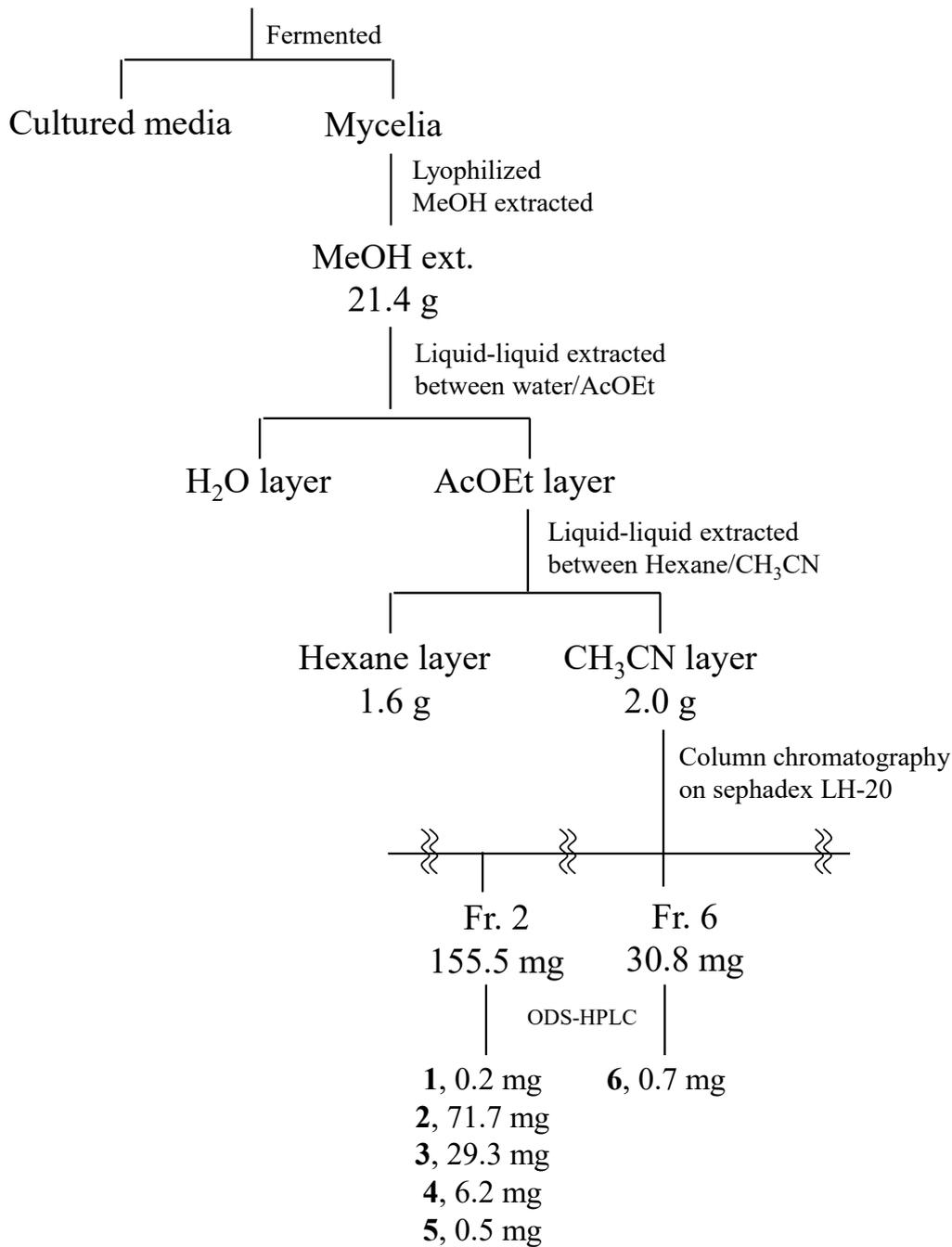
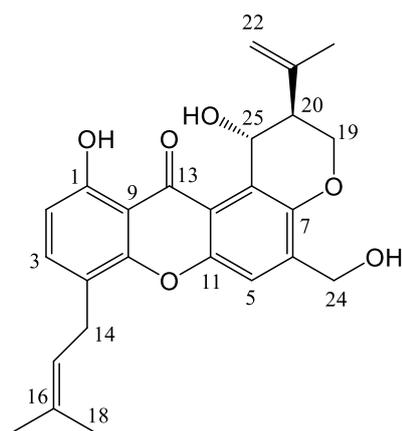
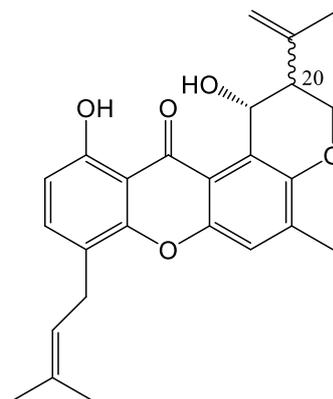


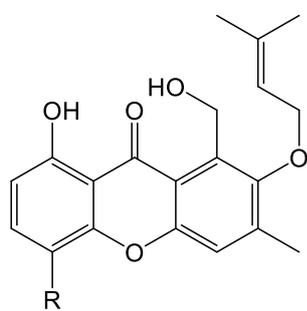
Chart 2-1 真菌二次代謝物分離フローチャート



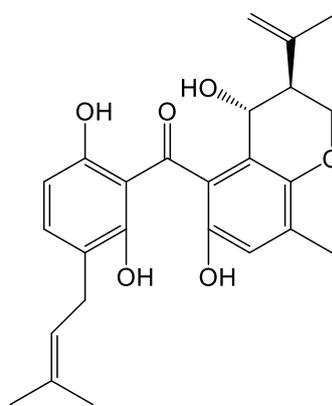
24-hydroxyshamixanthone (1)



shamixanthone (3): 20-*S*
epishamixanthone (4): 20-*R*



emicellin (2): R=isopentenyl
variecoxanthone A (6): R=H



pre-shamixanthone (5)

Fig. 2-2 真武湯添加培養により得られた *E. nidulans* 二次代謝物の構造

第 2 節 新規 xanthone 誘導体 24-hydroxyshamixanthone の構造解析

化合物 **1** は黄色非晶系物質として得られ、分子式は HR-ESI-MS スペクトルより $C_{25}H_{26}O_6$ と決定した。 1H -NMR スペクトルの測定により、3 つのシングレットメチル水素 (δ_H 1.75, 1.79 および 1.84)、3 つの芳香族性水素 [δ_H 6.75 (d, $J=8.3$ Hz), 7.46 (d, $J=8.3$ Hz), および 7.57 (s)]、1 組のエキシメチレン [δ_H 4.56 (s) および 4.81 (s)] を含む 4 つのメチレン水素、3 つのメチン水素 [δ_H 2.76 (m, $J=2.9$ Hz), 5.31 (t, $J=7.4$ Hz) および 5.42 (dd, $J=3.9, 1.9$ Hz)] を観測した。また、 δ_H 12.50 (s) と δ_H 5.05 (d, $J=3.9$ Hz) の二つの水素は重水添加により消失した。 ^{13}C -NMR スペクトルの測定により、3 つの sp^3 メチル炭素、3 つの sp^3 メチレン炭素、2 つの sp^3 メチン炭素、17 個の sp^2 炭素を観測した。以上の結果から、本物質は shamixanthone (**3**) と類似した構造を持つと推定されたため、**1** と **3** の 1H - および ^{13}C -NMR データを比較したところ、**3** の 24 位のメチル基 (δ_H 2.36, s) の消失と **1** のオキシメチレン基 (δ_H 4.81 および δ_C 60.9) の出現を除き非常によく一致した (Table 2-1)。以上の結果から、**1** を **3** の 24-ヒドロキシ体と推定し、二次元 NMR スペクトルの詳細な解析を行った。

Table 2-1 24-hydroxyshamixanthone (1) および shamixanthone (3) の NMR データ

position	24-hydroxy shamixanthone (1)		shamixanthone (3)	
	δ_C^a	δ_H^b (J in Hz)	δ_C^a	δ_H^b (J in Hz)
1	159.7		159.7	
2	109.9	6.75 (d, 8.3)	109.8	6.74 (d, 8.4)
3	136.8	7.46 (d, 8.3)	136.6	7.44 (d, 8.4)
4	109.3		109.2	
5	116.5	7.57 (s)	119.4	7.30 (s)
6	139.8		138.4	
7	148.4		149.4	
8	117.9		120.9	
9	119.1		118.9	
10	152.9		152.8	
11	152.6		152.3	
12	117.6		116.7	
13	184.5		184.5	
14	27.5	3.51 (d, 7.4) 3.50 (d, 7.4)	27.5	3.49 (d, 7.3) 3.43 (d, 7.3)
15	121.6	5.31 (t, 7.4)	121.7	5.30 (t, 7.3)
16	133.4		133.3	
17	25.8	1.75 (s)	25.8	1.75 (s)
18	17.9	1.79 (s)	17.9	1.79 (s)
19 α	64.6	4.37 (dd, 2.9, 11.5)	64.6	4.34 (dd, 2.9, 11.5)
19 β		4.43 (dd, 1.9, 11.5)		4.41 (dd, 1.9, 11.5)
20	44.8	2.76 (m, 2.9)	44.9	2.73 (m, 2.9)
21	142.3		142.6	
22a	112.4	4.56 (s)	112.3	4.58 (s)
22b		4.81 (s)		4.80 (s)
23	22.5	1.84 (s)	22.6	1.85 (s)
24	60.9	4.81 (s)	17.5	2.36 (s)
25	62.9	5.42 (dd, 3.9, 1.9)	63.2	5.41 (dd, 3.9, 1.9)
1-OH		12.50 (s)		12.60 (s)
25-OH		5.05 (d, 3.9)		5.06 (d, 3.9)

(CDCl₃, ^a150 MHz for ¹³C-NMR, ^b600 MHz for ¹H-NMR)

^1H - ^1H COSY スペクトルから 2 位および 3 位の芳香族水素間の相関が観測された。また、HMBC スペクトルより、2 位の水素から 1、4 および 9 位の炭素への、3 位の水素から 10 位の炭素への相関が観測されたことから、1 位および 10 位に酸素原子が隣接したベンゼン環を有すると推定した。また、5 位の水素から 7、11、12 および 13 位の炭素への相関、および 24 位のメチレン基から 5、6、および 7 位の炭素への相関から 6 位にヒドロキシメチル基、7 位および 11 位に酸素原子、13 位にカルボニル基が隣接したベンゼン環の存在が示唆された。以上の解析結果、および UV 390 nm に極大吸収が認められることから、本物質はキサントン骨格を持つと推定した。さらに、 ^1H - ^1H COSY スペクトルにおける 19、20 および 25 位の水素間の相関、および 19 位の水素から 7 位の炭素 への HMBC 相関から、19 位に酸素が隣接した環構造を有すると推定した。さらに 22 位の水素から 20 および 23 位の炭素への、20 位の水素から 21 位の炭素への相関から、20 位にイソプロペニル基が結合していると推定した。また、 ^1H - ^1H COSY スペクトルから 14 および 15 位の水素間の相関、および HMBC スペクトルから、17 および 18 位の水素から 15 および 16 位の炭素への、14 位の水素から 4 位の炭素への相関が観測された。このことから、イソペンテニル基が 4 位に結合していると推定した。(Fig. 2-3a)。以上の事から、**1** の平面構造は **3** もしくは **4** の 24-ヒドロキシ体であることが明らかとなった。また、**3** または **4** の分子式より酸素原子が 1 つ増えていることもその構造を支持した。

本物質は 20 位と 25 位に立体化学を持つ。これらの相対関係を決定するため、shamixanthone (**3**) およびその 20 位立体異性体である epishamixanthone (**4**) の 20 位および 25 位のカップリング定数の比較を試みた。しかし、**1** の 25 位の水素原子は 25 位のヒドロキシ基ともカップリングしており、明確な値が読み取れなかった。そこでヒドロキシ基シグナルを消去するため、重水を添加し **1**、**3** および **4** の ^1H -NMR スペクトル測定を行った。その結果、**1** の 25 位の化学シフトおよび 20-25 位間のカップリング定数は **3** のものと一致した {25-H [**1**: δ_{H} 5.42 (d, 1.9), **3**: δ_{H} 5.41 (d, 1.9),

4: δ_H 5.49 (d, 3.4)]}. さらに NOESY スペクトルの解析から、19 β -H と 25-H、19 α -H と 20-H 間に相関が観測された (Fig. 2-3b)。以上の結果から、**1** は **3** と同じ相対立体配置をもつことが示された。

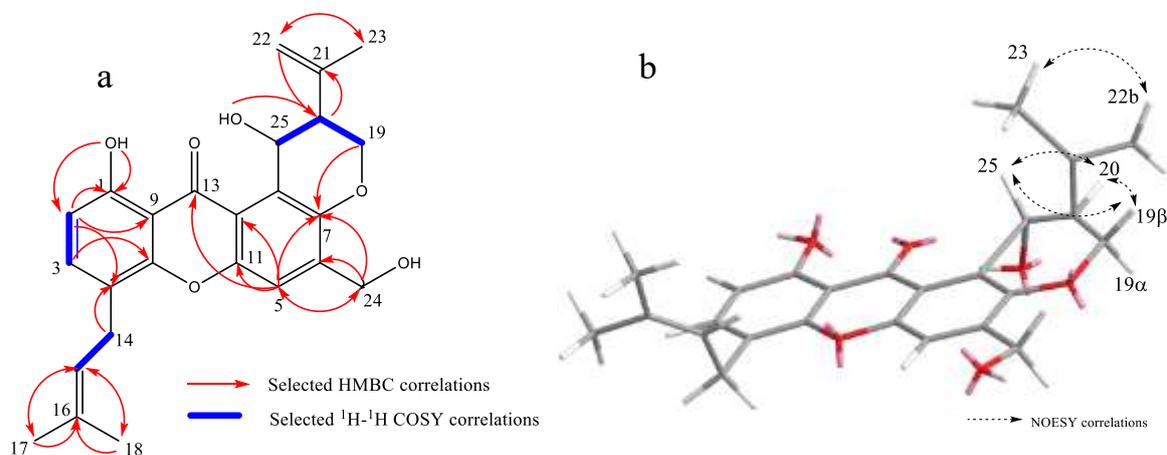


Fig. 2-3 24-Hydroxyshamixanthone (**1**) の 2D-NMR 相関

a: ^1H - ^{13}C HMBC correlation. b: NOESY correlation.

化合物 **2-5** は全て同一の生合成経路で合成されており⁵⁷⁾、今回得られた **1** も同一の経路で生合成されたと予想される。そのため、**1** の絶対配置は **3** と同じく (20*S*, 25*R*) であると推測している。

第3節 真武湯に含有される emericellin 類誘導因子の探索

これまでの実験から、真武湯添加培養によって emericellin 類産生が誘導されることが明らかとなった。このことから、真武湯は *E. nidulans* IFM60678 株の emericellin 類の産生誘導能を有していると推測された。そこで、2-4 のうち最も生産量の多い emericellin (2) の産生量を指標にして、真武湯中の emericellin 類誘導因子の探索を行うこととした。

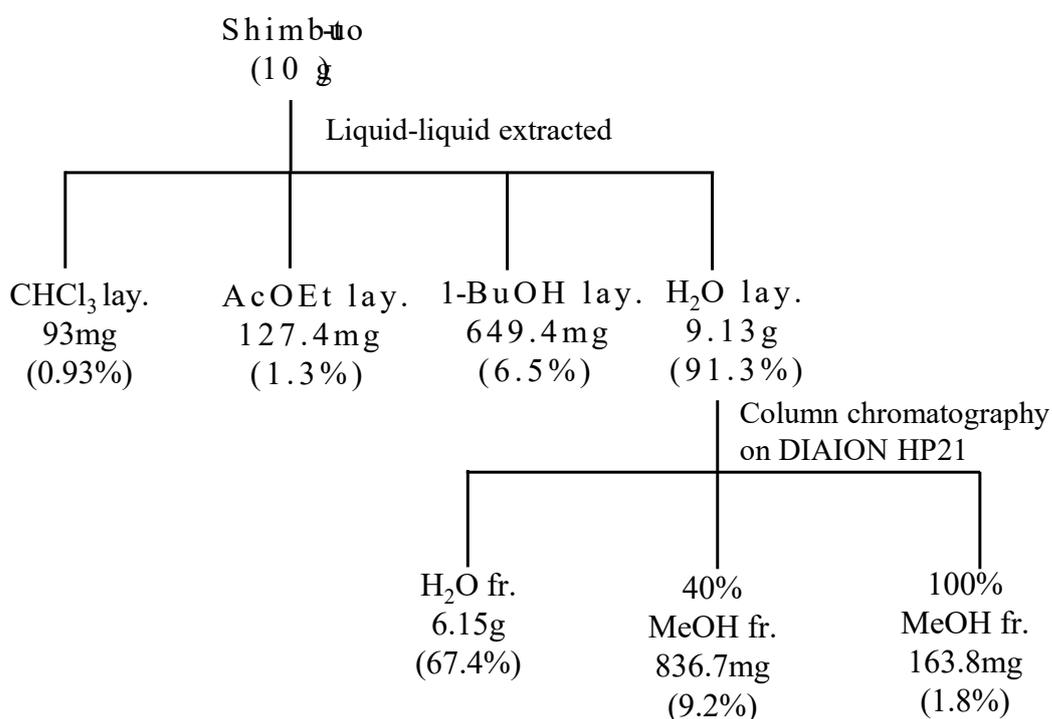


Chart 2-2 真武湯成分分離フローチャート

Chart 2-2 に示した手順により、生薬より熱水抽出した真武湯粉末を液液分配により chloroform 層、AcOEt 層、1-butanol 層、水層に分離した。得られた各層の 2 産生誘導能を検討した。各画分を、得られた割合を乗じた量を PDB 培地に添加し、*E. nidulans* IFM60678 株を 3 日間培養した。培養後凍結乾燥し、得られた培養エキスを HPLC で分析し、2 の産生量を観測した。添加培養による評価を行った結果、水層にのみ誘導能が認められ

た (Fig. 2-4)。水層は元の真武湯エキスと同等の **2** 産生量を示さなかった。この事象については、4 つの画分に分離した結果、産生誘導因子が分散したことにより起こった可能性が考えられた。

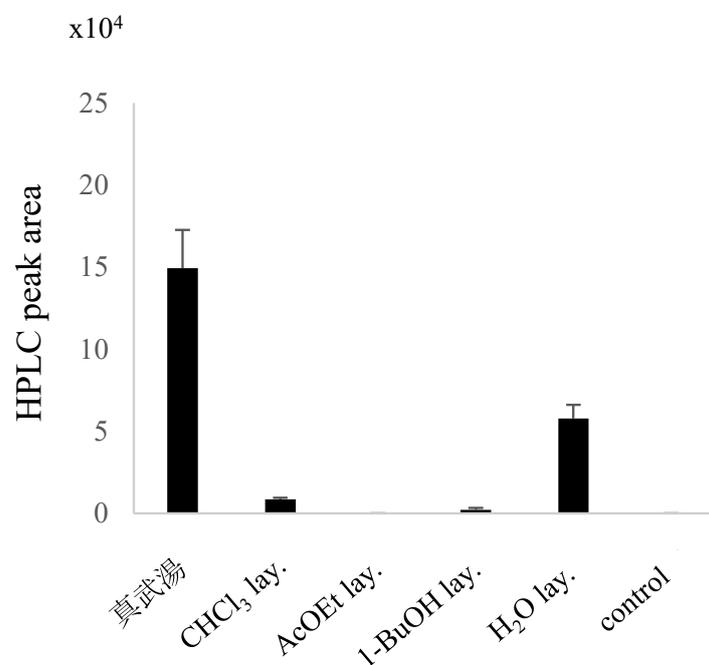


Fig. 2-4 真武湯液液分配で得られた画分の emericellin (**2**) 誘導性

続いてこの活性が認められた水層を合成樹脂 DIAION HP21 を担体に用いたカラムクロマトグラフィーで、水溶出画分、40% CH₃OH 溶出画分、100% CH₃OH 溶出画分に分離した。各画分の *E. nidulans* に対する **2** 誘導能を検討したところ、水溶出画分に活性が認められた (Fig. 2-5)。

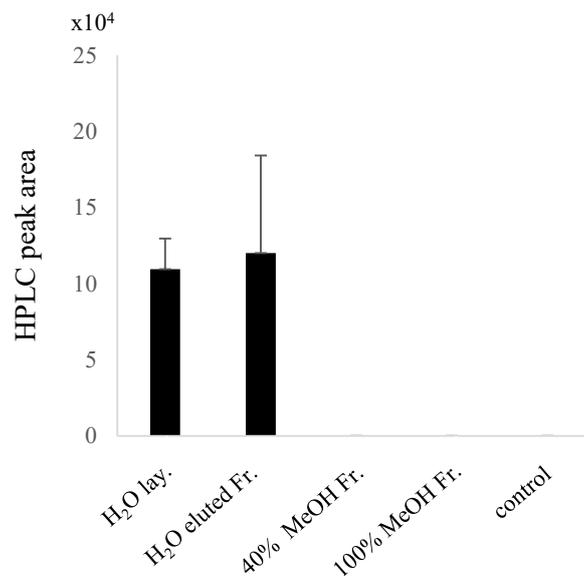


Fig. 2-5 真武湯水層の DIAION HP21 で得られた画分の emericellin (2) 誘導性

次に、この水溶出画分にどのような系統の物質が含有されるかを検討するため、¹H-NMR スペクトルを測定した。NMR スペクトルからは、3-4 ppm のシグナルと、アノマー水素とみられる 5.2 ppm 付近のシグナルを検出したことから、糖類が主成分として含まれることが示唆された (Fig. 2-6)。

そこで含有される糖類を特定するために、糖分析でよく用いられる親水性相互作用を利用したカラムである、アミノプロピルシリカゲルカラムを用いた HPLC 分析を行った。その結果、主構成糖として fructose、glucose および sucrose が検出された (Fig. 2-7)。

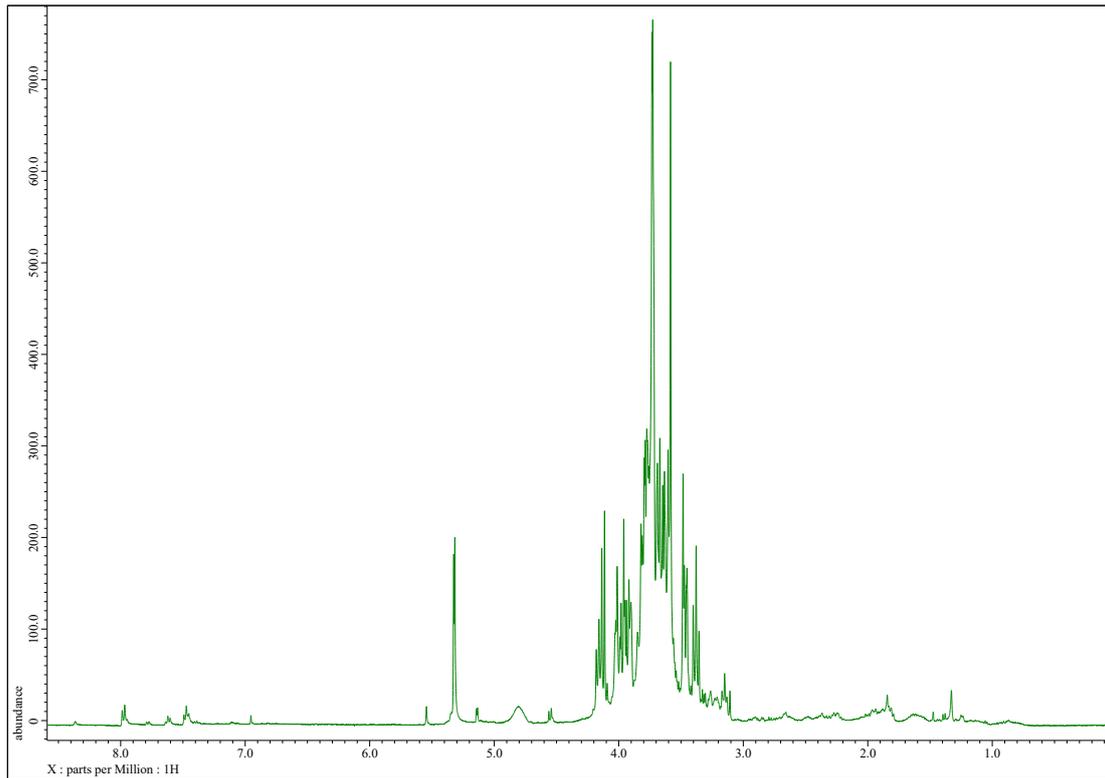


Fig. 2-6 真武湯水溶出画分の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
(D_2O , 400 MHz)

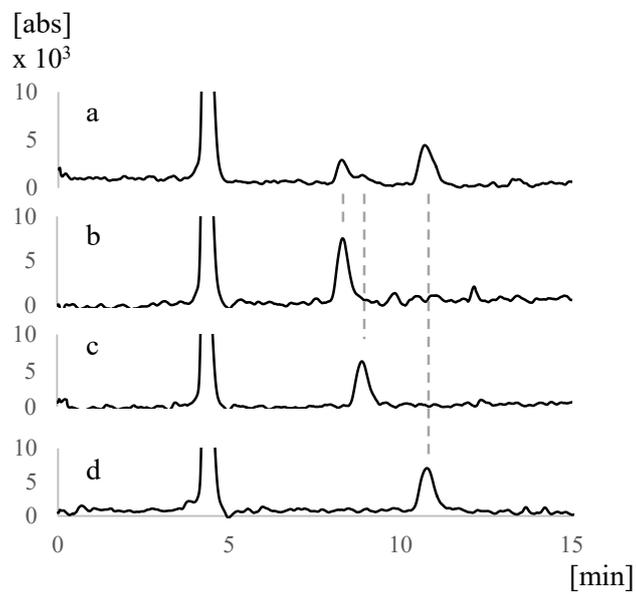


Fig. 2-7 真武湯水溶出画分のアミノカラムによる HPLC 分析
カラムは Inertsil NH_2 (GL science) を、検出器は RI detector を用いた。a: H_2O eluted fraction, b: fructose c: glucose d: sucrose

そのため、これらの糖が **2** 産生に関与していると考え、これらの糖の **2** 誘導能について 0.5、1、5、10 mM の濃度で検討したところ、5 および 10 mM の glucose を添加した場合にのみ濃度依存的な **2** の産生が確認された (Fig. 2-8)。

以上の結果から、真武湯中の xanthone 類誘導因子の一つとして、glucose が示唆された。

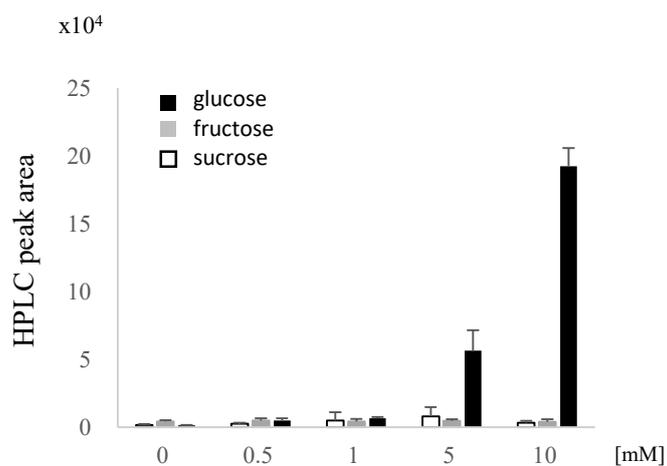


Fig. 2-8 水溶出画分の主成分として得られた糖類の emericellin (**2**) 誘導性

第 4 節 真武湯構成生薬の菌類二次代謝物誘導性の検討

これまでの研究から、真武湯に *E. nidulans* IFM60678 株における **2** の産生誘導能があることが確認された。真武湯はブシ、ブクリョウ、ソウジュツ、ショウキョウ、シャクヤクの 5 つの生薬で構成されているため、これらの生薬のいずれかが **2** の産生誘導に関与している可能性が考えられた。そこで、どの構成生薬が **2** の産生誘導能を有するかを確認するため、各生薬の **2** 誘導能の評価を行った。各生薬を熱水抽出して得られた生薬エキスを PDB 培地に添加して、*E. nidulans* を培養した結果、ブクリョウにのみ **2** の産生が確認された (Fig. 2-9)。したがって、真武湯の構成生薬中のブクリョウが

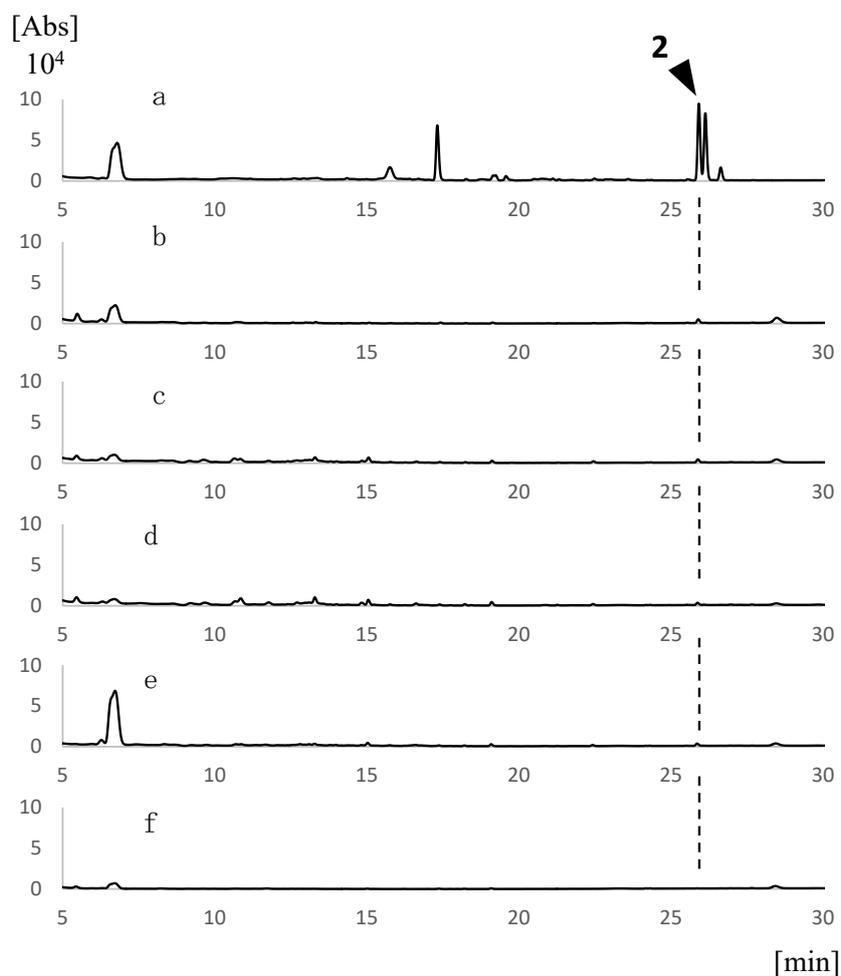


Fig. 2-9 真武湯構成生薬添加により得られる培養エキスクロマトグラム
カラムは ODS カラム, a: ブクリョウ、b: ブシ、c: ソウジュツ、d: シャクヤク、e: ショウキョウ、f: コントロール

その機能を有している可能性が示唆された。

また第3節の結果から、真武湯に含まれる誘導因子の一つとして、**glucose**の可能性が示唆された。そこでブクリョウの誘導因子が **glucose** である可能性を検討するため、HPLC を用いて各生薬の糖分析を行った。その結果、ブクリョウが特に多い **glucose** 含量を示し、ソウジュツとショウキョウにもわずかに含まれることが確認された (Fig. 2-10)。これらの結果から、真武湯の**2** 誘導因子の一つがグルコースであり、その由来は構成生薬の一つであるがブクリョウであることを示唆された。

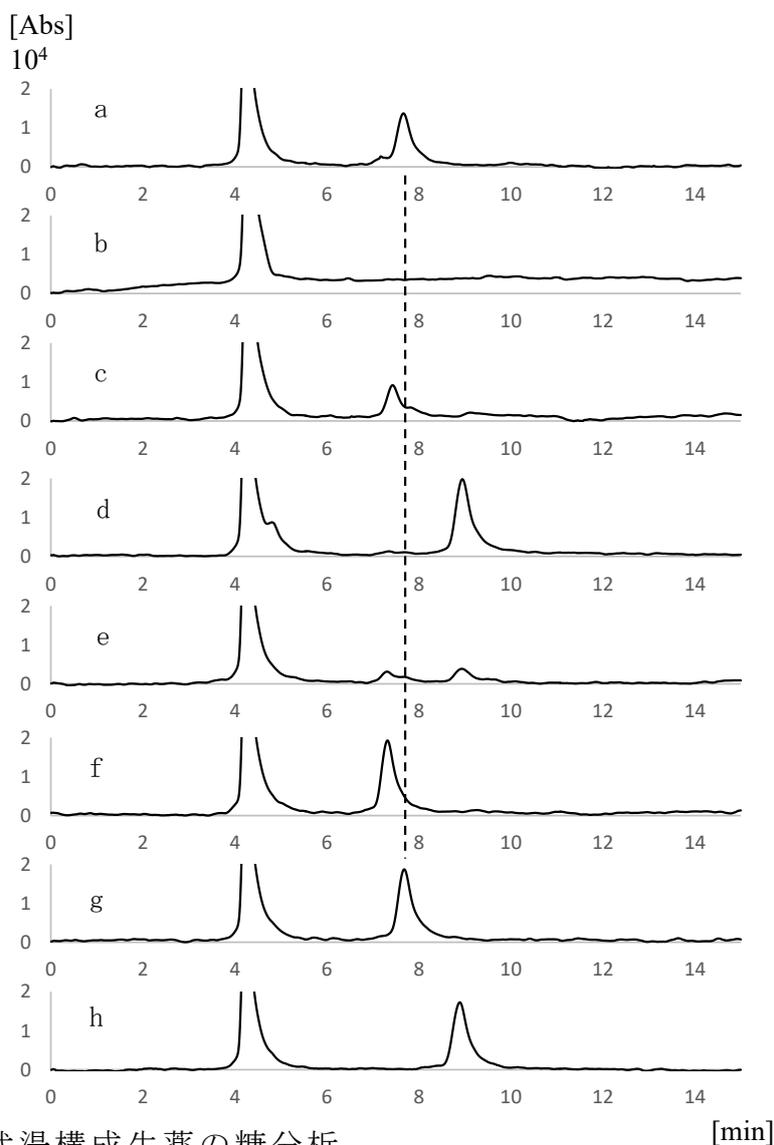


Fig. 2-10 真武湯構成生薬の糖分析

HPLC condition: column: Inertsil NH₂ (GL science), monitored by RI detector, a: ブクリョウ、b: ブシ、c: ソウジュツ、d: シャクヤク、e: ショウキョウ、f: Fructose、g: Glucose、h: Sucrose

小括

真武湯添加培地により *E. nidulans* IFM60678 株を培養した際に、コントロールでは産生されない emericellin 類 **2-4** の生成が観測されたことから、その単離と同定を行った。その過程で、**2-4** に類似した UV 吸収スペクトルを有する **1**、**5** および **6** が観測されたことから、これらのピークの単離と構造決定もあわせて行った。

真武湯添加培養により得られた培養エキスを常法により分離・精製した結果、**2-6** はそれぞれ emericellin (**2**)、shamixanthone (**3**)、epishamixanthone (**4**)、pre-shamixanthone (**5**)、および variecoxanthone A (**6**) と同定した。また、**1** は新規化合物で、その構造は主に MS および NMR スペクトルの解析から、**3** の 24 位のメチル基がヒドロキシメチル基に酸化された 24-hydroxyshamixanthone であると決定した。

次に真武湯に含まれると予想された emericellin 類誘導因子の探索を行った。真武湯エキスからの活性成分の分離は、分離して得た各画分の添加培養による **2** の産生を指標に行った。真武湯熱水抽出エキスを各有機溶媒と液液分配した結果、活性画分として水層を得た。次に水層をカラムクロマトグラフィーで分離し、活性画分として水溶出画分を得た。得られた水溶出画分の ¹H-NMR 測定の結果、糖類が主成分であることが確認された。そこで含有される糖類を同定するため、アミノカラムによる糖分析を行い、fluctose、glucose、sucrose が主に含まれる糖類と決定した。次にこれらの糖類が **2** の産生誘導能を有すると考え、糖の添加培養による **2** の誘導能の検討を行った。その結果 glucose を添加した場合に濃度依存的な **2** の産生が認められた。また、真武湯はブシ、ブクリョウ、ソウジュツ、ショウキョウ、シャクヤクで構成されていることから、これらの生薬に **2** の誘導能を有するものがあると考えた。構成生薬の添加培養の結果、ブクリョウのみが **2** の誘導能を示した。さらに真武湯で示唆された誘導因子である glucose がブクリョウに含まれると予想されたため、各生薬の糖分析を行った結果、ブクリョウにのみ主構成糖として glucose が観測された。したが

って、真武湯中に含まれる emericellin 類誘導因子の一つとしてブクリョウ由来の glucose の可能性が示唆された。

しかし今回用いた培地中には glucose が含まれているにもかかわらず、コントロールでは emericellin は産生されなかった。したがって、glucose 添加で emericellin の産生は誘導されたけれども、glucose がシグナル因子として作用したのか、emicellin の生合成原料として作用したのかは、今回の結果からは言い切れない。この現象を明らかにするため、今後さらなる検討実験が必要であると考えている。

また、第 1 章で emericellin 類が誘導された漢方薬 19 処方のうち、ブクリョウを構成生薬として含むものは 9 処方のみだった。そのため、他の生薬にも 2 の産生誘導因子としての glucose を豊富に含むものが存在するのではないかと考え、その調査を行った。その結果、glucose が多く含有されている生薬として、タイソウ⁵⁸⁾ やバクモンドウ⁵⁹⁾ が報告されていた。また、生薬エキスの糖分析の結果、チンピ、ボタンピ、ショウキョウにも glucose が含まれることが明らかとなった。これら 6 種の生薬が emericellin 類を産生する漢方薬に含まれているかを確認したところ、19 処方中 15 処方 (79%) でいずれかが含まれていた。以上の事から、emicellin 類が産生される大部分の漢方薬に関しては、glucose を含む生薬が処方されており、それらが 2 の産生誘導に関与している可能性が示唆された。

第 3 章 芍薬甘草湯が誘導する菌類二次代謝物に関する検討

第 1 章第 2 節では、漢方薬 13 処方をそれぞれ添加した CDY 培地で *E. nidulans* IFM60678 株を培養すると sterigmatocystin (7, ST) が産生し、特に八味地黄丸、芍薬甘草湯および乙字湯を添加培養したときに ST の顕著な産生が観測された。

本章では、この 3 処方のうち構成生薬が最も単純である芍薬甘草湯をモデルに、各構成生薬について *E. nidulans* IFM60678 株の ST 産生誘導能を検討した。さらに、ST 産生誘導が *E. nidulans* において共通した性質か確認するため、試験菌株の数を増やして、非 ST 産生 *E. nidulans* 菌株に対する作用を確認した。また *E. nidulans* と同様の ST 生合成経路を有する *A. flavus* 30 株に対しても添加培養実験を行い、本作用に対する種特異性について検討した。

第 1 節 芍薬甘草湯およびその構成生薬が誘導する菌類二次代謝物

まず ST 産生誘導能を確認するため、芍薬甘草湯の構成生薬であるシャクヤクとカンゾウについて添加培養を行った。シャクヤクおよびカンゾウをそれぞれ熱水抽出し、得られた抽出エキスを添加した培地で *E. nidulans* IFM60678 株を培養し、各生薬の ST の誘導能を HPLC 分析で評価した。その結果、シャクヤクエキスを添加した場合のみ ST の産生が確認された (Fig. 3-1)。

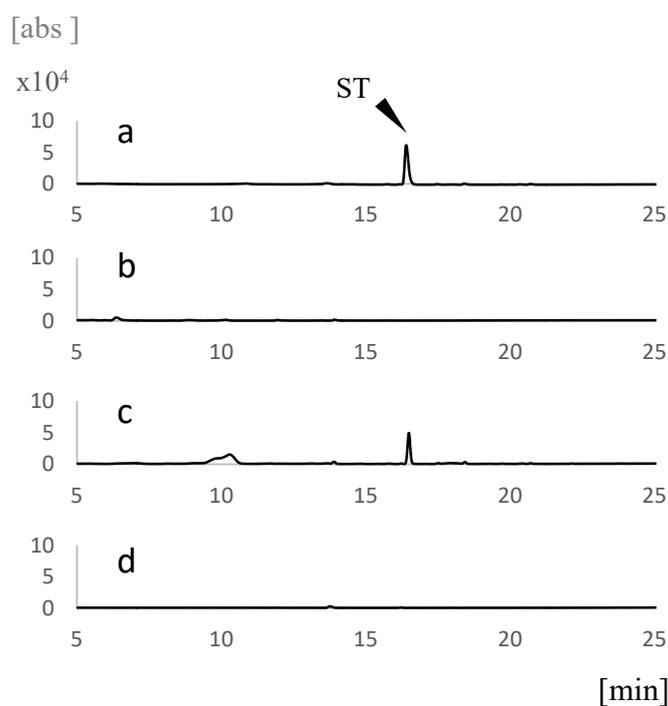


Fig. 3-1 各種抽出物を添加した培地で *E. nidulans* を培養して得た培養エキスのクロマトグラム

検出波長は UV 324 nm とした。 a: シャクヤク、b: カンゾウ、c: 芍薬甘草湯、d: コントロール、コントロールは培地のみで培養して得た培養エキスとした

第 2 節 シャクヤクエキスの *E. nidulans* に対する ST 産生誘導の一般性

第 1 節の結果から、シャクヤクエキスは *E. nidulans* IFM60678 株の ST 産生を誘導することが明らかとなった。次に、本現象が *E. nidulans* に共通した性質か検討するため、試験菌 *E. nidulans* 38 株 (変種含む) に対して同様の実験を行った。

まず ST を産生しない株を選抜するため、*E. nidulans* 38 株をシャクヤクエキス無添加培地 (コントロール) で培養した。その結果、26 株の ST 非産生株を得た (Table 3-1)。次にこれらの株についてシャクヤクエキス添加培地で培養した結果、21 株 (78%) で ST の産生が誘導された (Table 3-2)。ST の定量結果から、その産生量は最大で 18.5 µg/mL (IFM41395 株)、最小で 1.2 µg/mL (IFM42028 株)、全株の平均値は 7.2 µg/mL となることが確認され、産生量には株によって差が存在することも明らかとなった。以上の結果から、*E. nidulans* では strain が異なる菌株であってもシャクヤクが ST 産生を誘導すると示唆された。

Table 3-1 *E. nidulans* 38 菌株に対するシャクヤクエキスの ST 産生誘導能
 検出波長は UV 324 nm とした。値は標準偏差 (SD, N = 4) とともに、培地 1 mL あたりの ST 産生量を示す。n. d.: not detected.

Fungi	Strain	Source	Sterigmatocystin µg / mL ± SD
<i>Emericella nidulans</i>	IFM5369	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM40838	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM41094	unknown	7.7 ± 0.7
<i>Emericella nidulans</i>	IFM41395	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM41396	patient	n. d.
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>lata</i>	IFM42011	sterigmatocystin	4.9 ± 0.5
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>acristata</i>	IFM42016	exposed fabric	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM42018	subramanian	n. d.
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>dentata</i>	IFM42028	finger nail of man	n. d.
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>acristata</i>	IFM42030	soil	n. d.
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>dentata</i>	IFM42044	herbal drug	1.2 ± 0.4
<i>Emericella nidulans</i>	IFM42319	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM46997	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM46999	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47000	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47001	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47002	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47003	river sediment	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47004	soil	5.7 ± 1.2
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47005	soil	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47006	paddy field soil	1.0 ± 0.2
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47793	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM51356	Bronchial lavage fluid	16.4 ± 1.2
<i>Emericella nidulans</i>	IFM52249	soil	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM52250	soil	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM54308	soil	12.7 ± 0.7
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM56365	oral	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM57839	unknown	n. d.
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM57842	soil	6.2 ± 1.3
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM59750	air sampling	n. d.
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>echinulata</i>	IFM61956	sputum	0.8 ± 0.1
<i>Emericella nidulans</i>	IFM62671	Bronchial lavage fluid	n. d.
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM63297	Bronchial lavage fluid	4.3 ± 1.0
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>echinulata</i>	IFM64750	Bronchial lavage fluid	21.6 ± 1.1
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC4342	kaoliangchui yeast cake	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC5719	unknown	3.6 ± 0.7
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC6398	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC6577	unknown	n. d.

Table 3-2 選抜した *E. nidulans* 24 菌株に対するシャクヤクエキスの ST 産生誘導能

検出波長は UV 324 nm とした。値は標準偏差 (SD, N = 4) とともに、培地 1 mL あたりの ST 産生量を示す。n. d.: not detected. a: non ST-producing strain in control.

Fungi ^a	Strain	Source	Sterigmatocystin µg / mL ± SD
<i>Emericella nidulans</i>	IFM5369	unknown	5.3 ± 0.4
<i>Emericella nidulans</i>	IFM40838	unknown	4.2 ± 0.4
<i>Emericella nidulans</i>	IFM41395	unknown	18.5 ± 1.9
<i>Emericella nidulans</i>	IFM41396	patient	n. d.
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>acristata</i>	IFM42016	exposed fabric	3.7 ± 1.2
<i>Emericella nidulans</i>	IFM42018	subramanian	n. d.
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>dentata</i>	IFM42028	finger nail of man	1.2 ± 0.2
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>acristata</i>	IFM42030	soil	1.7 ± 0.4
<i>Emericella nidulans</i>	IFM42319	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM46997	unknown	18.4 ± 0.8
<i>Emericella nidulans</i>	IFM46999	unknown	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47000	unknown	9.1 ± 1.8
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47001	unknown	8.5 ± 1.2
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47002	unknown	3.4 ± 0.2
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47003	river sediment	4.0 ± 0.2
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47005	soil	1.6 ± 1.1
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47793	unknown	2.1 ± 0.1
<i>Emericella nidulans</i>	IFM52249	soil	1.7 ± 0.7
<i>Emericella nidulans</i>	IFM52250	soil	5.9 ± 1.5
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM56365	oral	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM57839	unknown	15.6 ± 1.0
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM59750	air sampling	n. d.
<i>Emericella nidulans</i>	IFM62671	Bronchial lavage fluid	8.1 ± 0.4
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC4342	kaoliangchiu yeast cake	15.0 ± 1.2
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC6398	unknown	6.4 ± 0.3
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC6577	unknown	8.7 ± 0.6

第3節 *A. flavus* の sterigmatocystin、aflatoxin B₁ および B₂ 産生能について

第2節から、シヤクヤクは ST の生合成を誘導する作用を持つことが明らかとなった。筆者は、ST と同様の生合成経路⁶⁰⁾を有する aflatoxins も、シヤクヤクにより産生が誘導されるのではないかと考えた。そこで、aflatoxin (AF) 類の生産菌である *A. flavus* を用いて、シヤクヤクエキスの ST、AFB₁ および B₂ 誘導性を検討した。*A. flavus* は ST を中間体として AFs を生合成し、また産生される AF は AFB₁ および B₂ の 2 種類存在するため、3 化合物の検出を行った。第3節と同様にして、*A. flavus* 30 株から AF および ST をどちらも産生しない株 22 株を選抜した。次にこれらの株についてシヤクヤク添加培地で培養したところ、全ての株で ST、AFB₁ および AFB₂ の産生は認められなかった (Table 3-3)。また生合成中間体である ST の産生も見られなかった。したがって、シヤクヤクには *A. flavus* に対して ST および AFs の産生誘導能を示さない可能性が示唆された。

Table 3-3 選抜した *A. flavus* 22 菌株に対するシヤクヤクエキスの AFB₁ および B₂ 産生誘導能

検出波長は UV 360 nm とした。値は標準偏差 (SD, N = 4) とともに、培地 1 mL あたりの ST 産生量を示す。n. d.: not detected. a: non AFs-producing strain in control.

Fungi ^a	Strain	Source	Sterigmatocystin µg/mL	Aflatoxin B ₁ µg/mL	Aflatoxin B ₂ µg/mL
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM56856	sputum	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM57535	sputum	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58417	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58418	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58691	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58735	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM59517	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM59542	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM59584	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM59894	abdominal drain	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM60519	sputum	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM60655	sputum	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61527	corpse	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61850	corpse	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61879	head	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61916	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM62240	corpse	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM62519	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM63356	corn	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM63449	inner nail plate	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM63453	unknown	n. d.	n. d.	n. d.
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM64754	scrotum skin	n. d.	n. d.	n. d.

第 4 節 各生薬エキスの *E. nidulans* に対する sterigmatocystin 誘導性

前節から、芍薬甘草湯の構成生薬であるシャクヤクが、*E. nidulans* に対する ST 誘導能を有することが明らかとなった。したがって、シャクヤクを有する 7 処方に関しては、シャクヤクが ST 産生を誘導していると考えられた。一方で、シャクヤクを構成生薬として持たないにも関わらず、ST 産生を誘導した漢方薬も存在している（柴朴湯、乙字湯、八味地黄丸、小柴胡湯、補中益気湯および釣藤散）。このことは、シャクヤク以外にも ST 産生を誘導する生薬が存在することを示唆する。そこで本節では他の各種生薬エキスが *E. nidulans* の ST 産生誘導能を有しているかどうかを検討した。生薬はこれらの漢方薬を構成する生薬を用いた。

22 種の生薬をそれぞれ添加した培地で *E. nidulans* IFM 60678 株を培養した結果、コウボク、シンイ、オウレン、オウバクは今回用いた濃度では菌の生育抑制を示した。それら以外の 11 種 (50%) の生薬で ST の産生が確認された。最も産生量が多かったのはタクシャを用いた場合で 46.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最も少なかったのはチクセツニンジンで 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、平均では 15.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となった (Table 3-4)。シャクヤク (24.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) より強く ST を誘導した生薬は、タクシャ (46.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、トウキ (44.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、サイコ (29.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、ハンゲ (27.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった。以上の事から、シャクヤク以外の生薬においても *E. nidulans* に対して ST の産生を誘導する機能を有する可能性が示唆された。上記したシャクヤクを含まずに ST の産生を誘導する漢方薬のうち最も ST の産生を誘導した、八味地黄丸はタクシャが、乙字湯はサイコおよびトウキが含まれていることから、ST が誘導されたと考えられる。

Table 3-4 各種生薬エキスの *E. nidulans* に対する ST 産生誘導能

検出波長は UV 324 nm とした。値は標準偏差 (SD, N = 4) とともに、培地 1 mL あたりの ST 産生量を示す。n. d.: not detected. n.g.: not grew.

生薬名	基原	Sterigmatocystin μg/mL ± SD
オウゴン	<i>Scutellaria baicalensis</i>	n. d.
オウバク	<i>Phellodendron amurense</i>	n. g.
オウレン	<i>Coptis japonica</i>	n. g.
キジツ	<i>Citrus aurantium</i>	n. d.
ケイヒ	<i>Cinnamomum cassia</i>	n. d.
コウボク	<i>Magnolia obovata</i>	n. g.
サイコ	<i>Bupleurum falcatum</i>	29.4 ± 9.4
ジオウ	<i>Rehmannia glutinosa</i>	2.4 ± 0.4
ショウキョウ	<i>Zingiber officinale</i>	2.1 ± 0.4
シンイ	<i>Magnolia kobus</i>	n. g.
ソウジュツ	<i>Atractylodes lancea</i>	3.4 ± 0.5
ソヨウ	<i>Perilla frutescens</i>	9.6 ± 0.8
タイソウ	<i>Zizyphus jujuba</i>	n. d.
タクシャ	<i>Alisma orientale</i>	46.8 ± 3.7
チクセツニンジン	<i>Panax japonicus</i>	1.2 ± 0.8
チンピ	<i>Citrus unshiu</i>	n. d.
トウキ	<i>Angelica acutiloba</i>	44.5 ± 5.9
ハンゲ	<i>Pinellia ternata</i>	27.3 ± 11.6
ブクリョウ	<i>Wolfiporia cocos</i>	4.2 ± 0.4
ブシ	<i>Aconitum carmichaeli</i>	2.4 ± 0.2
ボタンピ	<i>Paeonia suffruticosa</i>	n. d.
マオウ	<i>Ephedra sinica</i>	n. d.

小括

芍薬甘草湯添加培地で *E. nidulans* IFM60678 株を培養した際、コントロールでは検出されなかった ST の産生が確認されたことから、その構成生薬であるシャクヤクおよびカンゾウエキスの ST 誘導能を検討するため、それぞれの添加培養を行った。本現象が、*E. nidulans* に共通した性質か検討するため、その結果、シャクヤクがその機能を有することが明らかとなった。そこで複数の非 ST 産生 *E. nidulans* 26 菌株を用いてシャクヤクの ST 誘導能を確認したところ、78% の株で産生が認められたことから、*E. nidulans* のシャクヤクによる ST 誘導量の上昇は一般性を持つことが示唆された。

一方、ST 誘導する漢方薬の中にはシャクヤクが構成生薬として含まれていないものが存在することから、シャクヤク以外にも ST の産生を誘導する生薬が存在すると考えられた。そこで、他の 22 種の生薬を用いて添加培養したところ、11 種で ST 誘導能が確認された。これらの漢方薬の構成生薬には、11 種の生薬のいずれかが含まれていることから、ST の産生が誘導されたと考えられた。

さらに、同様の経路で生合成される AF 類を産生する *A. flavus* についても ST および AFs の生産性を検討したが、シャクヤクは ST および AF 類を誘導しなかった。したがって、シャクヤクは *E. nidulans* に対して特異的な作用を持つ可能性が示唆された。

結 論

本研究では、糸状菌 *Emericella nidulans* を用い、漢方薬が真菌二次代謝物産生能に影響を与えるか検討した。

まず、真菌二次代謝産生能に影響を与える漢方薬を探索する目的で、日本薬局方第 16 改正収載漢方薬を PDB 培地に添加し *E. nidulans* IFM60678 株を培養した。その結果、真武湯を含む 19 処方の漢方薬によってコントロールでは生産されない **emer icellin (2)**、**shamixanthone (3)**、および **epishamixanthone (4)** の産生が誘導された。また、これらの化合物の同定の過程で新規 xanthone 誘導體 **24-hydroxyshamixanthone (1)** を単離同定した。

次に、真武湯中に含まれると予想された **emer icellin** 類誘導因子の探索を行うため、生薬より熱水抽出した真武湯エキスを常法により分離した。その結果、糖類を主成分とする水溶性画分に **emer icellin** 産生誘導能が確認された。そこでアミノカラムによる糖分析を行い、**glucose**、**sucrose** および **fructose** で構成されることが明らかにされた。また含有される糖類のうち **glucose** を添加して培養した場合に、濃度依存的な **emer icellin** 産生が確認された。さらに、真武湯を構成する生薬であるブクリョウにも同様に **emer icellin** 産生誘導能が認められ、HPLC 分析によりその主成分も **glucose** であることが明らかとなった。したがってこれらの結果から、真武湯に含まれる産生誘導因子のひとつとして **glucose** の可能性が示唆された。

Glucose は栄養素として機能するのが一般的であり、今回得られた結果もその可能性が考えられる。一方で **glucose** は細胞へのシグナル伝達因子として機能する場合もある。例えば、*Pseudomonas chlororaphis* は **glucose** によって抗真菌物質 **phenazine** の産生を亢進させること⁶¹⁾、逆に *A. terreus* の **lovastatin** 産生や⁶²⁾、*Penicillium chrysogenum* の **penicillin** 産生は **glucose** 存在下で抑制されることが報告されている⁶³⁾。また、酵母菌 *Candida albicans* では、**glucose** 依存性の **cAMP** 産生を介し、PKA 系と MAP キナーゼ系が働くことで発芽管の誘導が促進されることが知られている⁶⁴⁾。以上の報告例から、本研究で得られた *E. nidulans* に対する **glucose**

の作用は、シグナル伝達因子として機能した可能性も考えられた。さらに真菌類以外でも同様のシグナル伝達システムが発見されている。中でも大腸菌の glucose 効果⁶⁵⁾は非常に有名である。Glucose が大腸菌の糖リン酸転移系のセンサーに結合し、さらに cAMP の遊離抑制が引き起こされることで、glucose 以外の糖代謝を抑制するシステムである。ヒトにおいては、歯肉線維芽細胞が糖尿病を模した高 glucose 状態に曝されると VEGF 産生量が増加し、炎症を惹起する可能性がある⁶⁶⁾と報告がある⁶⁶⁾。このように種を超えた応答系であることも、glucose がシグナル伝達因子であることを支持している。しかしながら真武湯中の glucose 含有量は、実験で 2 の産生が誘導された添加量よりも少ないため、他に協奏的に作用する物質が含まれ、真武湯としての機能を発現している可能性も考えられた。

また、emericellin 類の生合成遺伝子クラスターは 2011 年に Sanchez らが報告しており⁶⁷⁾、その後の研究によりこのクラスターは、ヒストンアセチル化酵素 EsaA によりポジティブ制御され⁶⁸⁾、ロイシンジッパーを活性部位に持つ転写調節因子 NapA によりネガティブ制御されることが明らかとなっている⁶⁹⁾。今回の実験からはどの点に作用したかを結論付けることが難しいが、emericellin 類の産生が誘導されたことは、真武湯がこれらの生合成酵素や転写制御因子に作用した可能性が推測された。

さらに、CDY 培地を用いて真菌二次代謝産生能に影響を与える漢方薬の探索実験を行った結果、芍薬甘草湯を含む 13 処方の漢方薬によって ST の産生誘導が確認された。また、特に ST の産生量が多かった芍薬甘草湯の構成生薬であるシャクヤクとカンゾウの添加培養を行った結果、シャクヤクエキスを添加した場合のみ ST の産生が確認された。したがって次にシャクヤクによる ST の産生誘導が一般的な現象であるかを調査するため、複数の ST 非産生 *E. nidulans* 26 株に対して添加培養を行った結果、78% の株で ST の産生が誘導された。以上のことから、シャクヤクは異なる菌株であっても ST の産生を誘導すると考えられた。

また、ST を中間体として相同遺伝子で生合成される AFs を合成する *A. flavus* に対して同様の実験を行った結果、ST および AFs の産生は確認され

なかった。これら 2 菌種に対するシャクヤクの作用の違いは、酵素への結合率や作用物質の膜透過性の違いなどが考えられたが、今回の実験では結論付けることはできなかった。

一方で、ST を誘導する漢方薬の中には、シャクヤクが構成生薬として含まれていないものもあることから、シャクヤク以外にも ST の産生を誘導する機能を有する生薬が存在すると考えられた。そこでシャクヤク以外の生薬についても *E. nidulans* に対する ST 誘導性を確認した結果、22 種のうち 11 種で ST 産生が確認されたことから、これらの生薬により ST の産生が誘導されたと考えられた。また、シャクヤクが構成生薬として含まれているにも関わらず、ST を誘導しない漢方薬も 4 種存在していた（小青竜湯、桂枝茯苓丸、葛根湯、大柴胡湯）。漢方薬は、同じ生薬が使われている場合でも、処方により各生薬の抽出率が異なることが知られている。特に pH の影響は顕著であり、小青竜湯の pH 低下によりカンゾウの成分が減少した例や⁷⁰⁾、ブシのアコニチン系アルカロイドは、処方に依存した pH の低下により加水分解が抑制される例が報告されている⁷¹⁾。その原因の一つとして有機酸が考えられており、ゴミシやサンシュユといった果実生薬に多く含まれているとされている。上記の 4 処方のうち、小青竜湯、葛根湯、大柴胡湯に果実生薬としてそれぞれゴミシ、タイソウ、キジツが含まれていることから、これらの影響により ST 誘導成分が十分に抽出されなかった可能性が考えられた。

以上の実験から、実験室条件では ST を産生しない無毒な *E. nidulans* が生薬に付着することによって毒性物質を産するようになる可能性が示唆されたため、生薬の管理に注意が必要であると考えられる。

漢方薬の添加培養実験を行ったところ、培地種の違いによって誘導される二次代謝物が異なる結果を得た。微生物が培地の違いによって産生する化合物を変化させることはよく知られているが、なぜ培地によって特定の種類の代謝物が産生されるかについては明確にはわかっていない。しかし、これらの二次代謝物は培地のみで培養した場合には観測されなかったことから、代謝物は漢方薬により誘導されるが、培地の種類も産生される物質の性質を決

定する重要な要素であると考えている。

また私は当初、様々な物質が含まれる漢方薬を利用すれば、個別の漢方薬に応じて多様な二次代謝物が産生されると考えていた。しかし実際に研究を行ってみると、どの漢方薬を添加して *E. nidulans* IFM60678 株を培養しても同じ系統の二次代謝物しか産生されないという結果を得た。本研究では1菌種のみを試験であるため、その詳細は検討する必要があるが、この結果はすなわち、漢方薬を構成する生薬が個々に有する二次成分が作用しているのではなく、ほとんどの生薬が持つ共通した成分が真菌の二次代謝物産生能を変化させている可能性を示唆している。

以上の事から、漢方薬を用いた本研究手法は、真菌の新たな二次代謝物を取得する方法の一つとして有用であることが示された。また本研究方法は、培地に漢方薬を添加するだけという非常に簡便な手法であるため、*E. nidulans* 以外の真菌や、放線菌などの他の微生物に対して拡大して本手法を適用することが容易であり、幅広い二次代謝物の創製が期待できるものと考えている。

実験の部

装置

旋光度は日本分光 DIP-1000 型デジタル旋光度計で測定した。UV スペクトルは 日立 U-3210 型分光光度計で測定した。ESI-MS は日本電子 JMS-T100LP 型質量分析計で測定した。¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルは Bruker Biospin K. K. Bruker AVANCE-400 型 (¹H: 400.13 MHz, ¹³C: 100.61 MHz) 核磁気共鳴装置あるいは日本電子 ECA II-600 型 (¹H: 600.17 MHz; ¹³C: 150.91 MHz) 核磁気共鳴装置を用いて測定し、基準物質としてテトラメチルシランを用いた。なお、結合定数は Hz で表示し、singlet、doublet、triplet、quartet、multiplet ならびに broad はそれぞれ s、d、t、q、m および br と略記した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は各抽出物の分析用として島津製作所 Prominence システム (LC-20AD, SIL-20A, SPD-M20A, CTO-20A, CBM-20A, DGU-20A) を使い、カラムオープン内に関東化学 Mightysil RP-18 GP II (5 μm, 3.0 × 250 mm) を装着した。また分取用として島津製作所 LC-20AT prominence 型ポンプを、検出器として島津製作所 SPD-20A 型 UV 検出器を用い、日本分光 CO-965 型カラムオープン内に GL Science Inc. Inertsustain C18 (5 μm, 10 × 250 mm) を装着した。オープンカラムクロマトグラフィーは真菌抽出物用として 3.5 × 80 cm の、漢方薬抽出物用として 7.8 × 65 cm のガラスカラムを用いた。糖分析は日本分光 Intelligent HPLC システム (PU-1580, CO-1560, HG-1580, DG-1580) および示差屈折率検出器として日本分光 RI-930 型 RI 検出器を用い、カラムオープン内に GL Science Inc. Inertsil NH₂ (5 μm, 10 × 250 mm) を装着した。菌の培養には TAITEC BR-300LF 型振とう培養機または SANYO MIR-153 型培養機を用いて行った。

菌株

Emericella nidulans 35 株 (Table A) および *Aspergillus flavus* 30 株 (Table B) は千葉大学医真菌研究センターよりご供与いただいた。また *Emericella nidulans* 4 株 (NBRC4342、5719、6398 および 6577) は独立行政法人 製品

評価技術基盤機構より購入した。

Table A List of *E. nidulans* strains used in this study.

Fugni	strain number	source	origin
<i>Emericella nidulans</i>	IFM5369	unknown	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	IFM40838	unknown	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM41094	unknown	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	IFM41395	unknown	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	IFM41396	patient	Japan
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>lata</i>	IFM42011	sterigmatocystin	unknown
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>acristata</i>	IFM42016	exposed fabric	USA
<i>Emericella nidulans</i>	IFM42018	subramanian	unknown
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>dentata</i>	IFM42028	finger nail of man	India
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>acristata</i>	IFM42030	soil	Nepal
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>dentata</i>	IFM42044	herbal drug	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	IFM42319	unknown	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	IFM46997	unknown	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM46999	unknown	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47000	unknown	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47001	unknown	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47002	unknown	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47003	river sediment	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47004	soil	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47005	soil	Korea
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47006	paddy field soil	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM47793	unknown	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	IFM51356	Bronchial lavage fluid	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM52249	soil	Brazil
<i>Emericella nidulans</i>	IFM52250	soil	Brazil
<i>Emericella nidulans</i>	IFM54308	soil	Japan
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM56365	oral	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM57839	unknown	Belgium
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM57842	soil	USA
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM59750	air sampling	Japan
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM60678	unknown	unknown
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>echinulata</i>	IFM61956	sputum	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	IFM62671	Bronchial lavage fluid	Japan
<i>Aspergillus nidulans</i>	IFM63297	Bronchial lavage fluid	Japan
<i>Emericella nidulans</i> var. <i>echinulata</i>	IFM64750	Bronchial lavage fluid	Japan
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC4342	kaoliangchui yeast cake	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC5719	unknown	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC6398	unknown	unknown
<i>Emericella nidulans</i>	NBRC6577	unknown	unknown

Table B List of *A. flavus* strains used in this study.

Fungi	Strain	source	origin
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM56856	sputum	USA
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM57595	compost	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM57535	sputum	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58033	Bronchial lavage fluid	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58417	unknown	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58418	unknown	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58691	unknown	unknown
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM58735	unknown	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM59542	unknown	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM59517	unknown	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM59584	unknown	Vietnam
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM59894	abdominal drain	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM60519	sputum	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM60655	sputum	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM60677	peanut cotyledons	USA
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61526	corpse	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61527	corpse	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61849	corpse	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61850	corpse	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61854	corpse	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61879	head	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM61916	unknown	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM62240	corpse	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM62519	unknown	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM63356	corn	Kenya
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM63366	corn	Kenya
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM63370	corn	Kenya
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM63449	inner nail plate	Japan
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM63453	unknown	Philippines
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM64754	scrotum skin	Japan

第 1 章に関する実験

培地組成

Emericella nidulans IFM 60678 株の培養には、potato dextrose broth (PDB) 培地 (Difco) (potato extract 4 g、glucose 20 g、purified water 1 L) もしくは Czapek-Dox broth (Difco) (sucrose 30 g、sodium nitrate 3 g、dipotassium phosphate 1 g、magnesium sulfate 0.5 g、potassium chloride 0.5 g、ferrous sulfate 0.01 g、purified water 1 L)に 0.5% yeast extract (Difco) (CDY) を加えたものを用いた。

漢方薬添加培地の作成

株式会社ツムラより購入した漢方薬 40、200、1000 mg をそれぞれ遠心管に分注した PDB もしくは CDY 10 mL に溶解させ、5 分間 10000 rpm で遠心分離を行った。その上清を三角フラスコに移し高圧蒸気滅菌後、漢方薬添加培地とした。

培養

種菌として、potato dextrose agar 平板培地上に生育した *E. nidulans* の分生子 5 mm 平方を白金耳で釣菌し、ガラスビーズを入れた 5 mL の滅菌精製水に懸濁後、ボルテックスミキサーで十分に懸濁したものを使用した。PDB 培地を用いた実験では、培養容器として 50 mL 三角フラスコを用い、種菌を 100 μ L 接種した。それを 7 日間、30°C、150 rpm の速度で振とう培養した。CDY 培地を用いた実験では、培養容器として 24 well plate (TPP 社製) を用い、10 mL の培地に 100 μ L の種菌を接種後、各 well に 2 mL ずつ分注した。Plate には通気性のある breathable film (Axygen 社製) を貼り、7 日間、30°C で静置培養した。

培養液の抽出

PDB培地を用いた実験では培養後自然ろ過で分離した菌体を、CDY 培地

を用いた実験では培養後の 24 well plate を、それぞれ凍結乾燥した。乾燥後 2 mL の CH₃OH を加えて 20 分間超音波抽出し、綿栓を用いた自然ろ過を行った後、溶媒を乾固させ培養エキスとした。

DAD-HPLC による培養エキスの分析

培養エキスを 1 mL の 95% CH₃OH に溶解し、10,000 rpm で 5 分間遠心分離した上清 10 μL を分析試料として用いた。DAD-HPLC の分析条件として、移動相には水および CH₃CN を用い、30% CH₃CN (0 min) -100% CH₃CN (17 min) -100% CH₃CN (30 min) のグラジエントモードで測定した。カラムは ODS カラムを使用し、温度を 40°C、流速を 0.5 mL/min に設定した。

ST の定量

標準液は、1 mg の sterigmatocystin (Sigma-Aldrich 社製) に、10 mL CH₃CN を加え 100 μg/mL の濃度に希釈した液を作成した。この標準液から CH₃CN を用いて段階希釈し、70、50、10、7、5、1 および 0.1 μg/mL の希釈系列を作成した。各希釈液の 10 μL を DAD-HPLC で分析し、UV 324 nm のピーク面積を計算した。HPLC 条件は上記の分析法に準じた。得られたそれぞれの面積値を用いて線形近似法で検量線を作成した。近似式は $y = 65748 x$ で、 R^2 値は 0.9998 であった。

第 2 章に関する実験

真武湯の抽出

日本薬局方に規定されたエキス剤の製法および処方に準じた。すなわち真武湯構成生薬であるシャクヤク (22.5 g)、ショウキョウ (11.25 g)、ブシ (3.75 g)、ブクリョウ (30 g)、ソウジュツ (22.5 g) (刻み、ウチダ和漢薬社製) を精製水 1 L とともに文火楽々 (象印社製) で 50 分間還流熱水抽出し、4 重のガーゼでろ過したものを凍結乾燥させ、真武湯粉末 (19.3 g) とした。

真武湯を添加した大量培養

真武湯 0.4% を添加した PDB 培地 13 L を 100 mL ずつ 500 mL 三角フラスコに分注し、シリコン栓をして高圧蒸気滅菌した。室温まで冷後 *E. nidulans* IFM60678 株を植菌し、30°C、150rpm の回転速度で 5 日間振とう培養した。培養後、自然ろ過で得られた菌体を精製水で洗浄し凍結乾燥した。乾燥菌体 (184 g) は CH₃OH で 12 時間の静置抽出を行い、ろ過後溶媒留去し培養エキス (21.4 g) とした。

真菌二次代謝物の単離および構造決定

培養エキスを精製水 500 mL に懸濁し、500 mL の AcOEt で 2 回液液分配した。AcOEt 層をエバポレーターで濃縮乾固し、hexane 300 mL を加え CH₃CN 300 mL で 2 回液液分配した。得られた CH₃CN 層を濃縮乾固し、2.0 g のエキスを得た。CH₃CN 層を sephadex LH-20 (100 g) を担体としたオープンカラムクロマトグラフィーに供し、S1 から S11 の 11 画分に粗分離した。温度は室温、移動相は hexane : chloroform = 1 : 4、chloroform : acetone = 3 : 2、chloroform : acetone = 1 : 4 および acetone をそれぞれ 200 mL ずつ、CH₃OH を 1 L 用いた。移動相は 100 mL ずつ三角フラスコに分取し各画分とし、CH₃OH は 100 mL を 2 画分分取したのち、以降をまとめてひとつの画分とした。次に画分 S2 (155.5 mg) を逆相 HPLC (移動相 : 70% CH₃CN)

で分離し、24-hydroxyshamixanthone (**1**: 0.2 mg) および variecoxanthone A (**5**: 0.5 mg) を得た。さらに画分 S2 を逆相 HPLC (移動相: 100% CH₃CN) で分離し、emicellin (**2**: 71.7 mg)、shamixanthone (**3**: 29.3 mg)、epishamixanthone (**4**: 6.2 mg) を得た。画分 S6 (30.8 mg) も同様にして逆相 HPLC (移動相: 70% CH₃CN) で分離し、pre-shamixanthone (**6**: 0.7 mg) を得た。いずれの HPLC 条件も、カラム温度は 40°C、流速は 2 mL/min とした。

24-Hydroxyshamixanthone (**1**)

Yellow amorphous powder, HR-ESI-MS: obs. 445.1605 (calcd. 445.1627 for C₂₅H₂₆O₆Na), UV (CH₃OH) λ_{max} nm (log ε): 205 (4.24), 242 (4.07), 274 (4.09), 299 (3.55), 390 (3.37), [α]_D: -20.0 (c = 0.07, CH₃OH), ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) data are summarized in Table 1. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃ with D₂O) δ: 7.57 (1H, s, 5-H), 7.46 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, 3-H), 6.74 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, 2-H), 5.41 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, 25-H), 5.31 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, 15-H), 4.80 (2H, s, 24-H), 4.80 (1H, s, 22-H_b), 4.56 (1H, s, 22-H_a), 4.43 (1H, dd, *J* = 1.9, 10.6 Hz, 19-H_α), 4.37 (1H, dd, *J* = 2.9, 10.6 Hz, 19-H_β), 3.52 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, 14-H), 3.50 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, 14-H), 2.75 (1H, m, 2.9 Hz, 20-H), 1.84 (3H, s, 23-H), 1.79 (3H, s, 18-H), 1.75 (3H, s, 17-H).

Emicellin (**2**)

Yellow crystal powder, HR-ESI-MS: obs. 431.18238 (calcd. 431.18344 for C₂₅H₂₈O₅Na), ¹H-NMR data (600 MHz, CDCl₃) δ: 12.45 (1H, s, 1-OH), 7.37 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, 3-H), 7.24 (1H, s, 5-H), 6.67 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, 2-H), 5.57 (1H, t, *J* = 7.1 Hz, 25-OH), 4.40 (2H, d, *J* = 7.1 Hz, 25-H), 5.30 (1H, t, *J* = 7.1 Hz, 15-H), 5.15 (1H, t, *J* = 7.1 Hz, 20-H), 4.40 (2H, d, *J* = 7.1, 19-H), 3.43 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, 14-H), 2.42 (3H, s, 24-H), 1.77 (3H, s, 17-H), 1.75 (3H, s, 18-H), 1.71 (3H, s, 22-H), 1.68 (3H, s, 23-H).

Shamixanthone (**3**)

Yellow crystal powder, HR-ESI-MS: obs. 429.16871 (calcd. 429.16779 for $C_{25}H_{26}O_5Na$), 1H -NMR data (600 MHz, $CDCl_3$ with D_2O) δ : 7.44 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, 3-H), 7.30 (1H, s, 5-H), 6.74 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, 2-H), 5.40 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, 25-H), 5.31 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, 15-H), 4.80 (1H, s, 22- H_b), 4.59 (1H, s, 22- H_a), 4.41 (1H, dd, $J = 1.9, 10.6$ Hz, 19- H_α), 4.34 (1H, dd, $J = 2.9, 10.6$ Hz, 19- H_β), 3.51 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, 14-H), 3.49 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, 14-H), 2.74 (1H, m, $J = 2.9$ Hz, 20-H), 2.36 (3H, s, 24-H) 1.85 (3H, s, 23-H), 1.79 (3H, s, 18-H), 1.75 (3H, s, 17-H).

Epishamixanthone (4)

Yellow crystal powder, HR-ESI-MS: obs. 429.16884 (calcd. 429.16779 for $C_{25}H_{26}O_5Na$), 1H -NMR data (600 MHz, $CDCl_3$ with D_2O) δ : 7.44 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, 3-H), 7.30 (1H, s, 5-H), 6.74 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, 2-H), 5.49 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, 25-H), 5.32 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, 15-H), 5.06 (1H, s, 22- H_b), 4.78 (1H, s, 22- H_a), 4.34 (1H, dd, $J = 11.6, 10.6$ Hz, 19- H_α), 4.47 (1H, dd, $J = 2.9, 10.6$ Hz, 19- H_β), 3.51 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, 14-H), 2.55 (1H, dd, $J = 11.6, 2.9, 2.9$ Hz, 20-H), 2.38 (3H, s, 24-H) 1.99 (3H, s, 23-H), 1.79 (3H, s, 18-H), 1.76 (3H, s, 17-H).

Pre-shamixanthone (5)

Yellow amorphous powder, ESI-MS: obs. 447 $[M + Na]^+$, 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.02 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.45 (1H, s), 6.07 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 5.23 (1H, t, $J = 7.3$ Hz), 4.77 (1H, s), 4.68 (1H, s), 4.58 (1H, d, $J = 5.1$ Hz), 4.13 (1H, dd, $J = 3.0, 11.1$ Hz), 4.06 (1H, dd, $J = 5.8, 11.1$ Hz), 3.10 (2H, d, $J = 7.1$ Hz), 2.30 (1H, m), 2.01 (3H, s), 1.69 (3H, s), 1.66 (3H, s), 1.63 (3H, s).

Variecoxanthone A (6)

Yellow amorphous powder, ESI-MS: obs. 378 $[M + Na]^+$, 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 12.67 (1H, s, 1-OH), δ 7.60 (1H, t, $J=8.4$ Hz), 7.31 (1H, s), 6.90 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 6.80 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 5.62 (1H, t, $J=7.6$ Hz), 5.09 (2H, s), 4.45 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 2.47 (3H, s), 1.82 (3H, s), 1.73 (3H, s)

真武湯成分の探索

真武湯粉末 10 g に水 200 mL を加え、等量の CHCl_3 で 2 回液液分配した。続いて同様に AcOEt、1-butanol で分配し、水層を除く各層はエバポレーターで濃縮乾固し、水層は凍結乾燥した。次に水層 (9.13 g) を DIAION HP21 (2 L) を担体としたオープンカラムクロマトグラフィーに供した。移動相は、水、40% CH_3OH および 100% CH_3OH をそれぞれ順次 2 L 用い、水溶出画分 (6.15 g)、40% CH_3OH 溶出画分 (836.7 mg)、100% CH_3OH 溶出画分 (163.8 mg) を得た。

水溶出画分の糖分析

真武湯の DIAION HP21 分離で得られた水溶出画分を 1 mg とり、50% CH_3CN 1 mL で溶解し、5 分間、10,000 rpm で遠心分離した上清を分析試料とした。HPLC 分析条件として、移動相は 71% CH_3CN を用いたアイソクラティックモードで測定した。カラムはアミノカラムを用い、カラム温度を 35°C、流速を 4.0 mL/min に設定し、試料は 30 μL 注入した。標準品の glucose、sucrose、fructose (和光純薬工業社製) も同様に、それぞれ 1 mg とり、50% CH_3CN 1 mL で溶解し、5 分間、10,000 rpm で遠心分離した上清を分析試料とした。

Emericellin (2) 誘導活性の評価

種菌は第 1 章の方法と同じように作成した。Emericellin (2) 産生誘導能を評価する真武湯の各画分あるいは糖を添加した PDB 10 mL を三角フラスコに入れ高圧蒸気滅菌した。室温まで冷後、種菌を 100 μL 接種し、24-well plate に 1 サンプルにつき 4 well で 2 mL ずつ分注した。Plate には通気性のある breathable film を貼り、37°C で 3 日間培養した。Chloroform 層、AcOEt 層、1-Butanol 層、水層はそれぞれ 0.004、0.005、0.026、0.37% 添加し、水溶出画分、40% CH_3OH 溶出画分、100% CH_3OH 溶出画分はそれぞれ 0.25、0.034、0.007% 添加した。糖の添加量は、0.5、1、

5、10 mM とした。培養液は凍結乾燥し、2 mL の CH₃OH で 20 分間の超音波抽出を行った後、綿栓ろ過した。抽出物は溶媒乾固後、第 1 章で行った HPLC 分析を行い、得られたクロマトグラムのピーク面積 ($t_R = 25.6$ min; **2**) により添加物の活性を評価した。数値は平均値 \pm 標準偏差で表した。

第 3 章に関する実験

生薬エキスの抽出

各生薬 (刻み、ウチダ和漢薬社製) 90 g に対し精製水 900 mL を加え、50 分間 100°C で還流熱水抽出したものを 4 重にしたガーゼでろ過し、ろ液を凍結乾燥させ生薬エキスの粉末とした。

生薬添加培地の作成

各生薬エキス粉末 24 mg を 20mL 三角フラスコにとった CDY 10 mL に溶解させ高圧蒸気滅菌後、生薬添加培地とした。培養、抽出および分析方法は第 1 章の 24-well plate を用いた方法に準じた。

化合物の NMR チャート

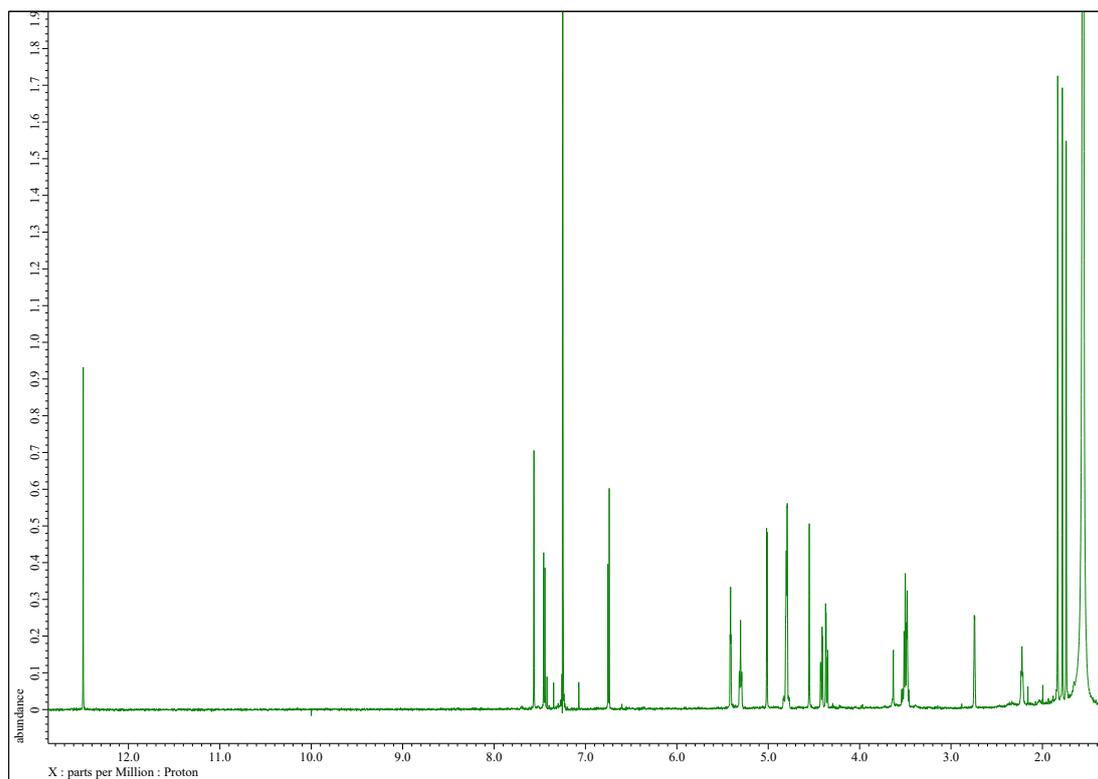


Chart A ¹H-NMR of 24-hydroxyshamixanthone

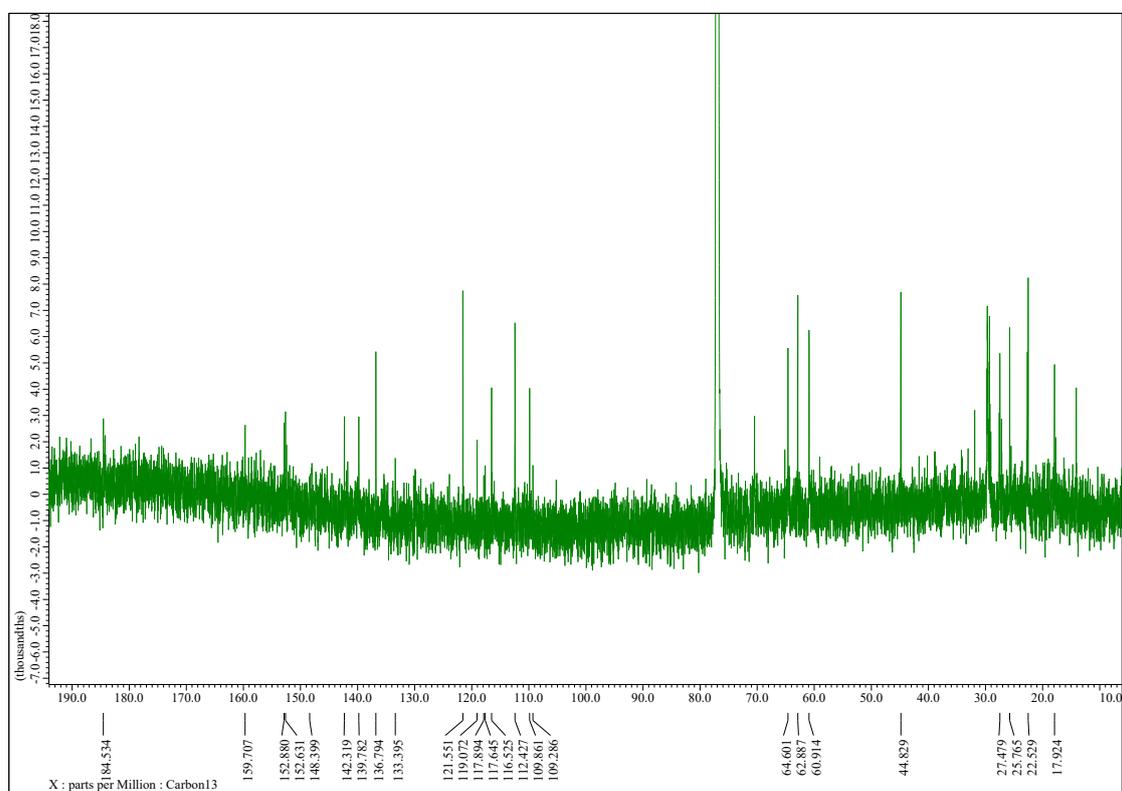


Chart B ¹³C-NMR of 24-hydroxyshamixanthone

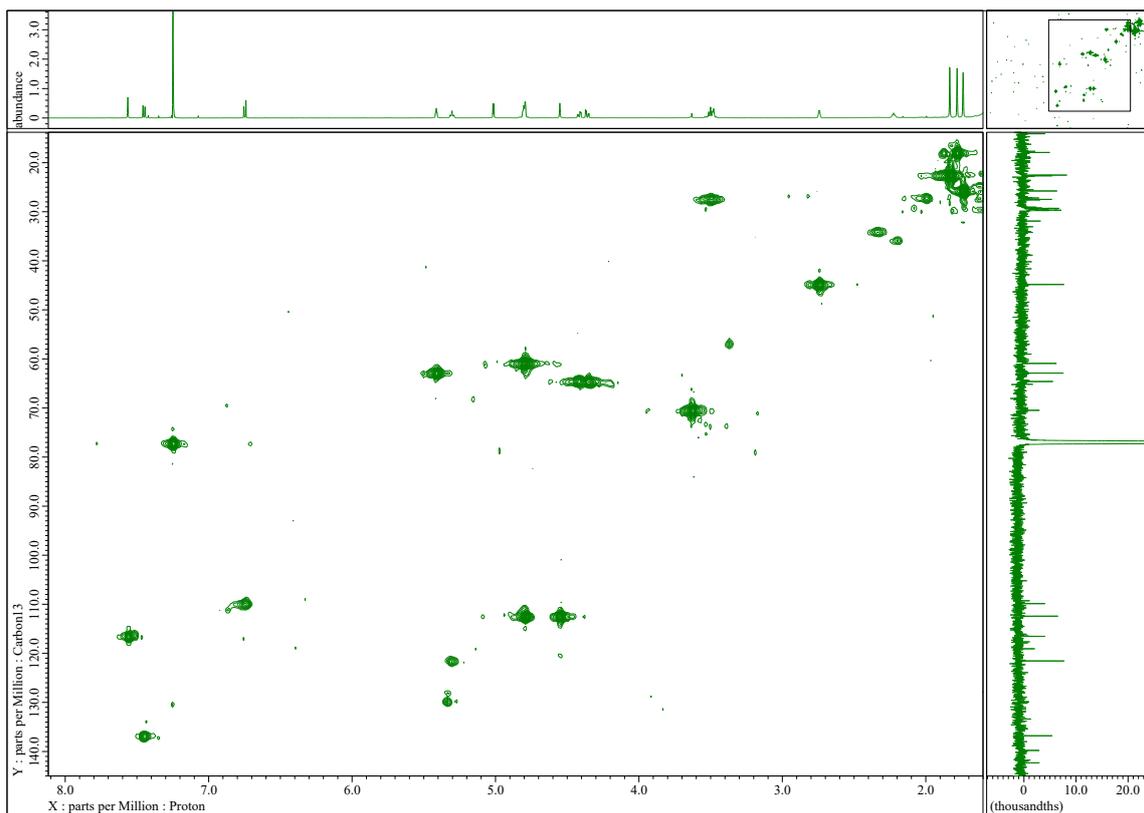


Chart C HMQC of 24-hydroxyshamixanthone

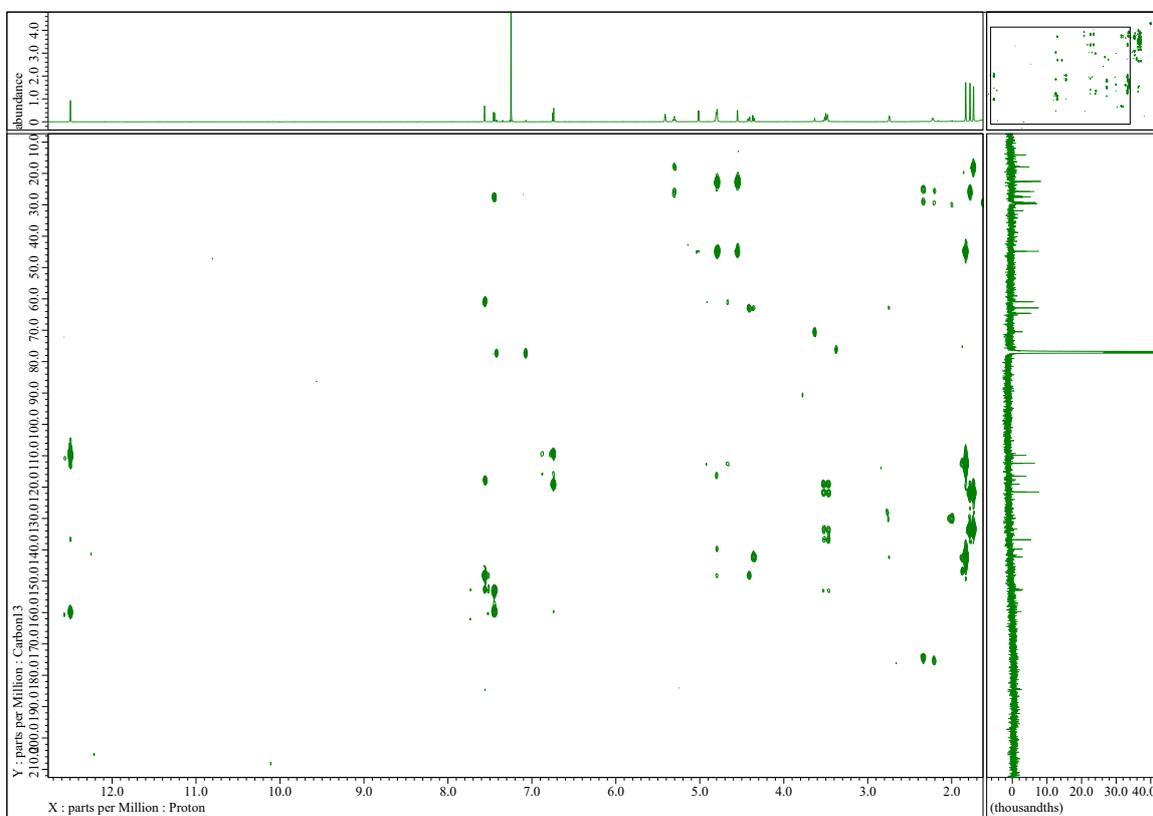


Chart D HMBC of 24-hydroxyshamixanthone

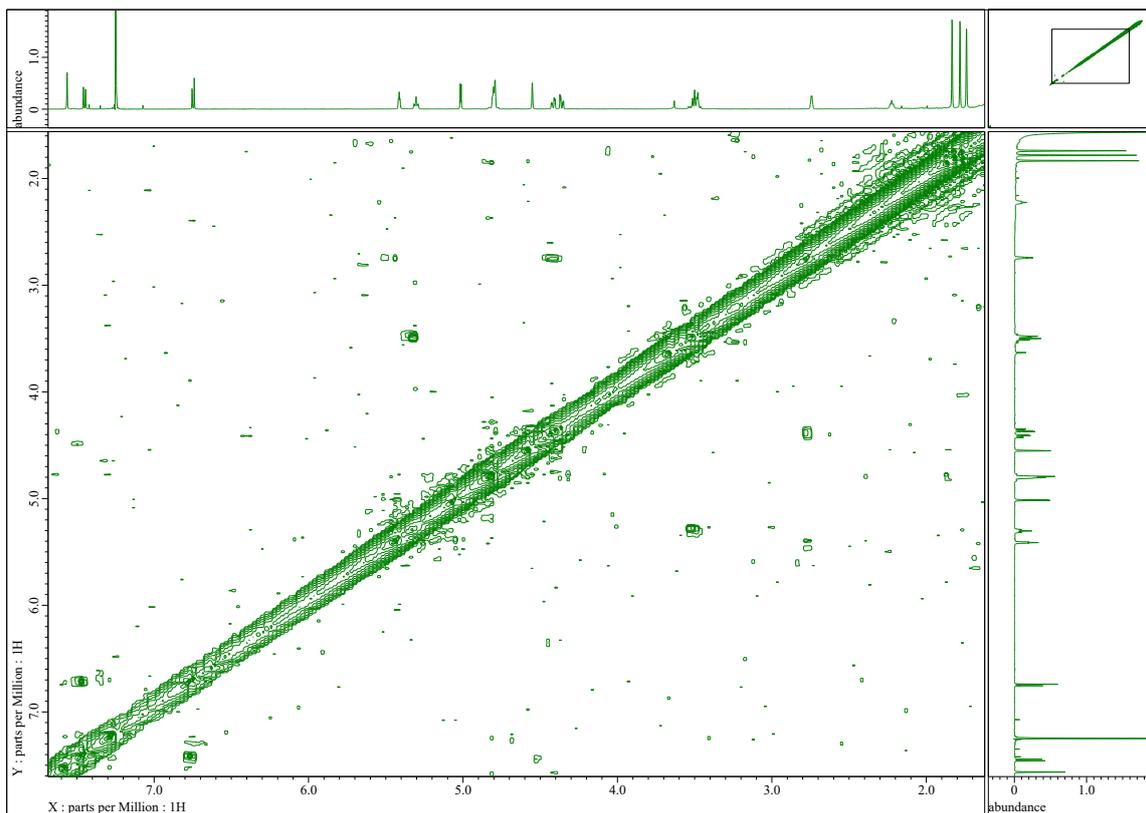


Chart E ^1H - ^1H COSY of 24-hydroxyshamixanthone

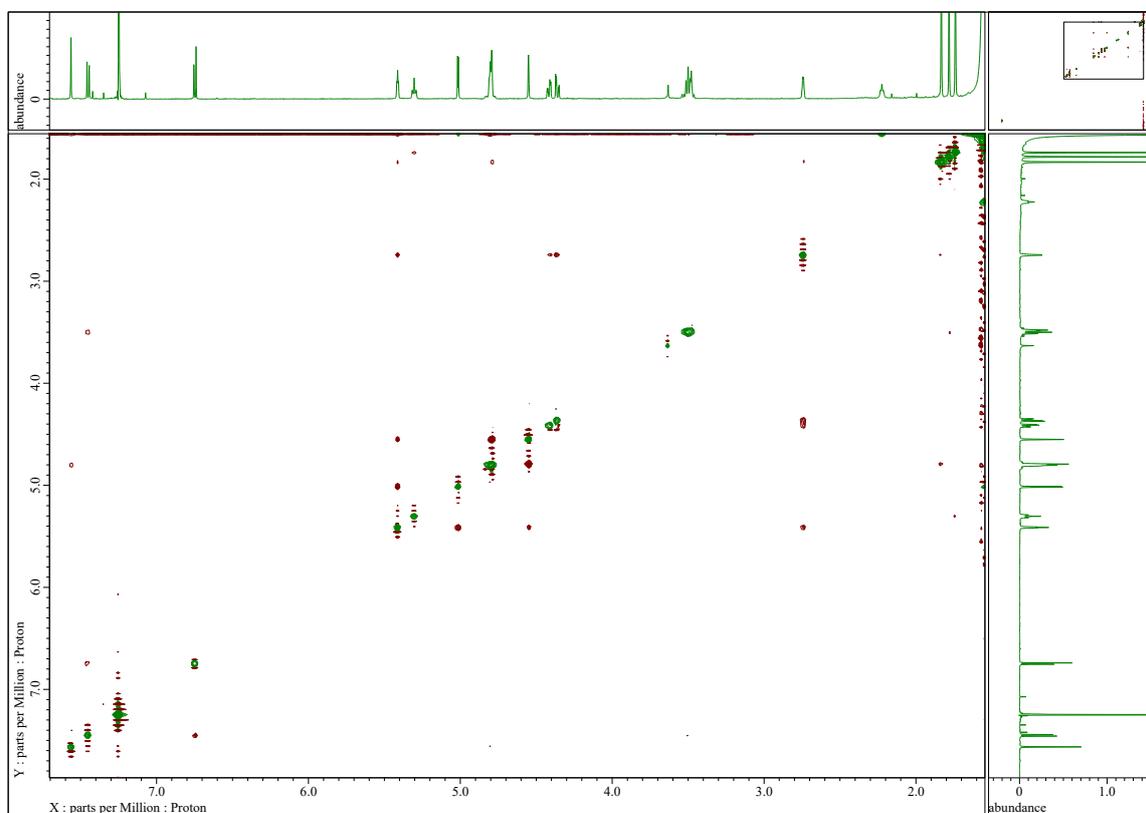


Chart F NOESY of 24-hydroxyshamixanthone

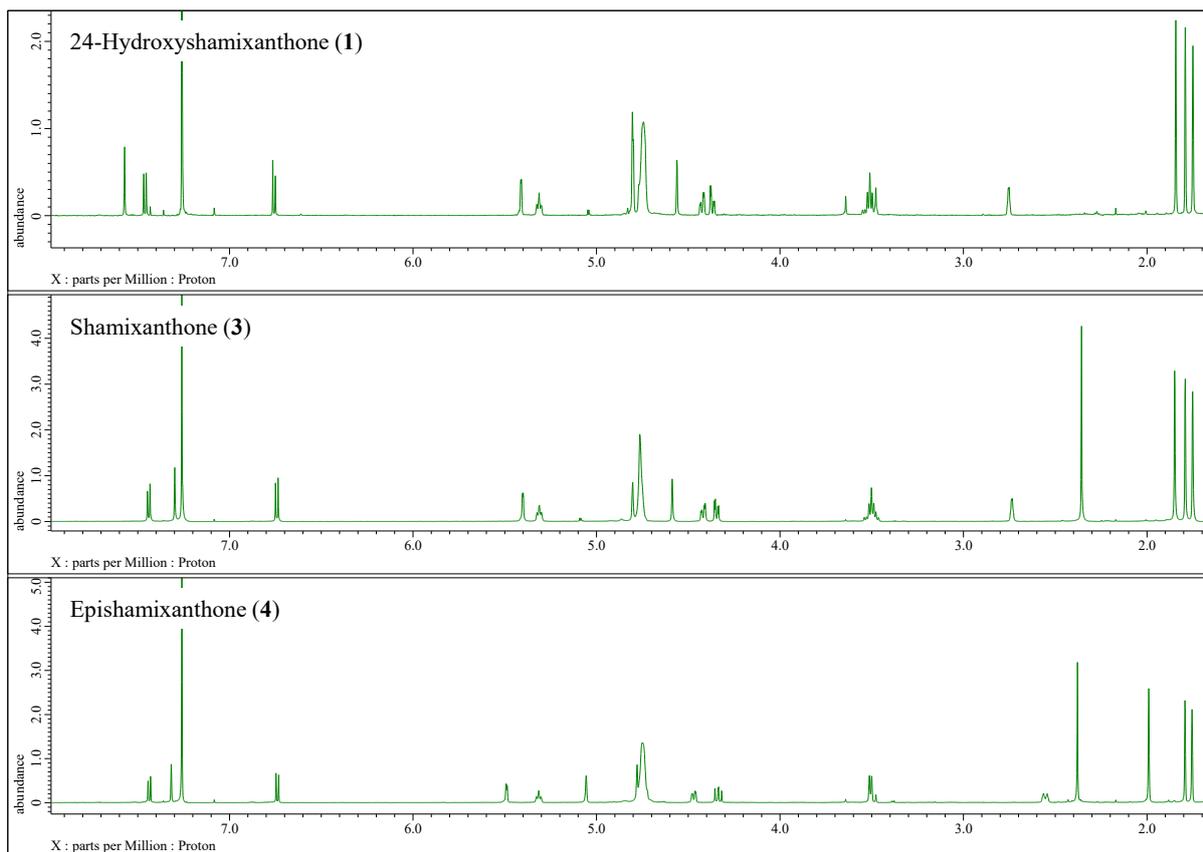


Chart G ¹H-NMR spectre in CDCl₃ with D₂O

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬ懇切なるご指導・ご助言を賜りました星薬科大学薬化学教室 細江智夫教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、終始有益なるご助言、多くの菌株を御恵与頂きました千葉大学真菌医学研究センター 微生物資源分野 バイオリソース管理室 矢口貴志准教授に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究に協力され適切なるご助言・ご討論してくださいました若菜大悟助教、武田尚助教、石川和樹博士をはじめとする星薬科大学薬化学教室の皆様心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Bérday, J. *J Antibiot (Tokyo)*, **58**, 1–26 (2005).
- 2) Stahlschmidt, C. *Justus Liebigs Ann Chem*, **187**, 177–197 (1877).
- 3) Raistrick, H. *Proc R Soc London*, **136**, 481–508 (1950).
- 4) Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W. *Nat Rev Microbiol*, **3**, 937–947 (2005).
- 5) Alexander Fleming. *Br J Exp Pathol*, **10**, 226–236 (1929).
- 6) Oxford, A.E., Raistrick, H., Simonart, P. *Biochem J*, **33**, 240–2488 (1939).
- 7) Rügger, A., Kuhn, M., Lichti, H., Loosli, H. -R, Huguenin, R., Quiquerez, C., von Wartburg, A. *Helv Chim Acta*, **59**, 1075–1092 (1976).
- 8) Haruyama, H., Kuwano, H., Kinoshita, T., Terahara, A., Nishigaki, T., Tamura, C., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1459–1467 (1986).
- 9) CAST. *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Task force report no. 139.* (2003).
- 10) 角田広. 食糧研報, **8**, 41–68 (1953).
- 11) 酒井文徳. 日本薬理学雑誌, **51**, 431–442 (1955).
- 12) Terao, K. *Research reports Yamawaki Gakuen Jr Coll*, **35**, 37–61 (1997).
- 13) 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男. 食品安全性セミナー5 マイコトキシン. (中央法規出版, 2002).
- 14) Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N, Strauss, J. *Mol Microbiol*, **76**, 1376–1386 (2010).
- 15) Shwab, E.K., Jin, W.B., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., Keller, N.P. *Eukaryot Cell*, **6**, 1656–1664 (2007).
- 16) Bok, J.W., Noordermeer, D., Kale, S.P., Keller, N.P. *Mol Microbiol*, **61**, 1636–1645 (2006).
- 17) Miyake, T., Uchitomi, K., Zhang, M.-Y., Kono, I., Nozaki, N., Sammoto, H., Inagaki, K. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 1154–9 (2006).
- 18) Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Joyner, P.M., Cichewicz, R.H. *Org Biomol*

- Chem*, **7**, 435–438 (2009).
- 19) Brakhage, A.A. *Nat Rev Microbiol*, **11**, 21–32 (2013).
 - 20) Pimenta, E.F., Vita-Marques, A.M., Tininis, A., Seleglim, M.H.R., Sette, L.D., Veloso, K., Ferreira, A.G., Williams, D.E., Patrick, B.O., Dalisay, D.S., Andersen, R.J., Berlinck, R.G.S. *J.Nat.Prod.*, **73**, 1821–1832 (2010).
 - 21) Huang, H.-B., Feng, X.-J., Liu, L., Chen, B., Lu, Y.-J., Ma, L., She, Z.-G., Lin, Y.-C. *Planta Med*, **76**, 1888–1891 (2010).
 - 22) Jekosch, K., Kück, U. *Appl Microbiol Biotechnol*, **54**, 556–563 (2000).
 - 23) Janus, D., Hortschansky, P., Kück, U. *Curr Genet*, **53**, 35–48 (2008).
 - 24) Tudzynski, B. *Front Microbiol*, **5**, 1–15 (2014).
 - 25) Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst, H.N., Peñalva, M.A. *EMBO J*, **12**, 3947–56 (1993).
 - 26) Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., Arst, H.N. *EMBO J*, **14**, 779–90 (1995).
 - 27) Shu, C.H., Peng, J.C., Tsai, C.C. *Enzyme Microb Technol*, **46**, 466–471 (2010).
 - 28) Jain, S., Keller, N. *Fungal Biol Rev*, **27**, 51–59 (2013).
 - 29) Nonaka, K., Abe, T., Iwatsuki, M., Mori, M., Yamamoto, T., Shiomi, K., Mura, S., Masuma, R. *J Antibiot (Tokyo)*, **64**, 769–77491 (2011).
 - 30) König, C.C., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Nietzsche, S., Brakhage, A.A., Hertweck, C. *ChemBioChem*, **14**, 938–942 (2013).
 - 31) Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A.A., Hertweck, C. *Nat Chem Biol*, **3**, 213–217 (2007).
 - 32) Chiang, Y., Szewczyk, E., Davidson, A.D., Keller, N., Berl, R., Wang, C.C.C. *J Am Chem Soc*, **131**, 2965–2970 (2009).
 - 33) Cichewicz, R.H. *Nat Prod Rep*, **27**, 11–22 (2010).
 - 34) Williams, R.B., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Lee, A.E., Cichewicz, R.H. *Org Biomol Chem*, **6**, 1895–1897 (2008).
 - 35) Asai, T., Yamamoto, T., Shirata, N., Taniguchi, T., Monde, K., Fujii, I.,

- Gomi, K., Oshima, Y. *Org Lett*, **15**, 3346–3349 (2013).
- 36) Nikaido, T., Ohomoto, T., Kuge, T., Ikeda, K. *Yakugaku Zasshi*, **110**, 498–503 (1990).
- 37) Nikaido, T., Kuge, T., Kimura, T., Matsumoto, H., Ohmoto, T. *Yakugaku Zasshi*, **110**, 969–973 (1990).
- 38) Hatano, T., Fukuda, T., Liu, Y., Noro, T., Okuda, T. *Yakugaku Zasshi*, **111**, 311–321 (1991).
- 39) Matsuda, M., Kanita, R., Saito, Y., Yamashita, A. *Nat Med*, **50**, 204–211 (1996).
- 40) Attoub, S., Hassan, A.H., Vanhoecke, B., Iratni, R., Takahashi, T., Gaben, A.M., Bracke, M., Awad, S., John, A., Kamalboor, H.A., Al Sultan, M.A., Arafat, K., Gespach, C., Petroianu, G. *Eur J Pharmacol*, **651**, 18–25 (2011).
- 41) Son, I.H., Chung, I.M., Lee, S.I., Yang, H.D., Moon, H.I. *Bioorganic Med Chem Lett*, **17**, 4753–4755 (2007).
- 42) Kim, J., Park, K.S., Lee, C., Chong, Y. *Bull Korean Chem Soc*, **28**, 2527–2530 (2007).
- 43) Zain, M.E. *Aust J Basic Appl Sci*, **3**, 4274–4280 (2009).
- 44) AL-Qarawi, A., ABD_Allah, E., HASHEM, A. *Bangladesh J Bot*, **42**, 45–49 (2013).
- 45) 岸田智史, 若菜大悟, 武田尚, 矢口貴志, 細江智夫. 日本生薬学会第62回年会 講演要旨集, (2015).
- 46) Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., et al. *Nature*, **438**, 1105–1115 (2005).
- 47) Ishida, M., Hamasaki, T., Hatsuda, Y. *Agric Biol Chem*, **39**, 2181–2184 (1975).
- 48) Hamasaki, T., Nakajima, H., Yokota, T., Kimura, Y. *Agric Biol Chem*, **47**, 891–892 (1983).

- 49) Dean, F.M., Roberts, J.C., Alexander, R. *J Chem Soc*, **0**, 1432–1439 (1954).
- 50) KODAMA, K., KUSAKABE, H., MACHIDA, H., MIDORIKAWA, Y., SHIBUYA, S., KUNINAKA, A., YOSHINO, H. *Agric Biol Chem*, **43**, 2375–2377 (1979).
- 51) Butnick, N.Z., Kurtz, M.B., Champe, S.P. *J Bacteriol*, **160**, 541–545 (1984).
- 52) Ishida, M., Hamasaki, T., Hatsuda, Y., Fukuyama, K., Tsukihara, T., Katusbe, Y. *Agric Biol Chem*, **39**, 291–292 (1975).
- 53) Kuldip, K.C., Christopher F., John, S.E.H., Thomas, J.S., Kenneth, Y. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, **0**, 1584–1593 (1974).
- 54) Ishida, M., Hamasaki, T., Hatsuda, Y., Fukuyama, K., Tsukihara, T., Katusbe, Y. *Agric Biol Chem*, **40**, 1051–1052 (1976).
- 55) Sarkar, A., Funk, A.N., Scherlach, K., Horn, F., Schroeckh, V., Chankhamjon, P., Westermann, M., Roth, M., Brakhage, A.A., Hertweck, C., Horn, U. *J Biotechnol*, **160**, 64–71 (2012).
- 56) Kuldip, K. C, John, S. E. H, Thomas, J. S, Kenneth, Y. *J chem soc perkin Trans 1*, 543–548 (1975).
- 57) Sanchez, J.F., Entwistle, R., Hung, J.-H., Yaegashi, J., Jain, S., Chiang, Y.-M., Wang, C.C.C., Oakley, B.R. *J Am Chem Soc*, **133**, 4010–7 (2011).
- 58) Solé, M., Rius, N., Francia, A., Lorén, J.G. *Lett. appl. microbiol.*, **25**, 81–84 (1994).
- 59) 友田正司, 朝倉初江, 飯田昭子. *Shoyakugaku Zasshi*, **23**, 45–48 (1969).
- 60) 友田正司, 加藤祥子. 共立薬科大学研究年報, **11**, 6–9 (1966).
- 61) Yu, J., Chang, P., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G. a, Linz, J.E., Woloshuk, C.P., Bennett, W., Bennett, J.W. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 1253–1262 (2004).
- 62) Park, J.Y., Oh, S.A., Anderson, A.J., Neiswender, J., Kim, J.C., Kim, Y.C. *Lett Appl Microbiol*, **52**, 532–537 (2011).
- 63) Hajjaj, H., Niederberger, P., Duboc, P. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 2596–2602 (2001).

- 64) Gutiérrez, S., Marcos, A.T., Casqueiro, J., Kosalková, K., Fernández, F.J., Velasco, J., Martín, J.F. *Microbiology*, **145**, 317–324 (1999).
- 65) Cho, T. *Nihon Saikingaku Zasshi*, **64**, 331–337 (2009)..
- 66) 木全恵子, 饗場弘二. 蛋白質 核酸 酵素, **45**, 559–569 (2000).
- 67) Omori, K., Naruishi, K., Nishimura, F., Yamada-Naruishi, H., Takashiba, S. *J Biol Chem*, **279**, 6643–6649 (2004).
- 68) Sanchez, J.F., Entwistle, R., Hung, J.H., Yaegashi, J., Jain, S., Chiang, Y.M., Wang, C.C.C., Oakley, B.R. *J Am Chem Soc*, **133**, 4010–4017 (2011).
- 69) Soukup, A.A., Chiang, Y.M., Bok, J.W., Reyes-Dominguez, Y., Oakley, B.R., Wang, C.C.C., Strauss, J., Keller, N.P. *Mol Microbiol*, **86**, 314–330 (2012).
- 70) Yin, W.-B., Reinke, A.W., Szilágyi, M., Emri, T., Chiang, Y.-M., Keating, A.E., Pócsi, I., Wang, C.C.C., Keller, N.P. *Microbiology*, **159**, 77–88 (2013).
- 71) Okamura, N., Miki, H., Orii, H., Masaoka, Y., Yamashita, S., Kobayashi, H., Yagi, A. *J Pharm Biomed Anal*, **19**, 603–612 (1999).
- 72) Taki, M., Nakajima, K., Sasaki, H., Komatsu, Y., Okada, M., Itoh, T., Nagasaka, K., Kita, T., Shibahara, N., Terasawa, K. *Nat Med*, **52**, 434–439 (1998).

論文リスト

本論文は、以下の発表論文から構成されている。

第 1 章および第 2 章

Nobuhiro Inoue, Daigo Wakana, Hisashi Takeda, Takashi Yaguchi, Tomoo Hosoe, Production of an emericellin and its analogues as fungal biological responses for Shimbu-to extract., *J. Nat. Med.*, **72**(1), 357-363 (2018)

第 1 章および第 3 章

Nobuhiro Inoue, Daigo Wakana, Hisashi Takeda, Takashi Yaguchi, Tomoo Hosoe, Effect of Shakuyaku-kanzo-to for production of sterigmatocystin in *Emericella nidulans.*, *JSM Mycotoxins*, **68**(1), 1-7 (2018)