

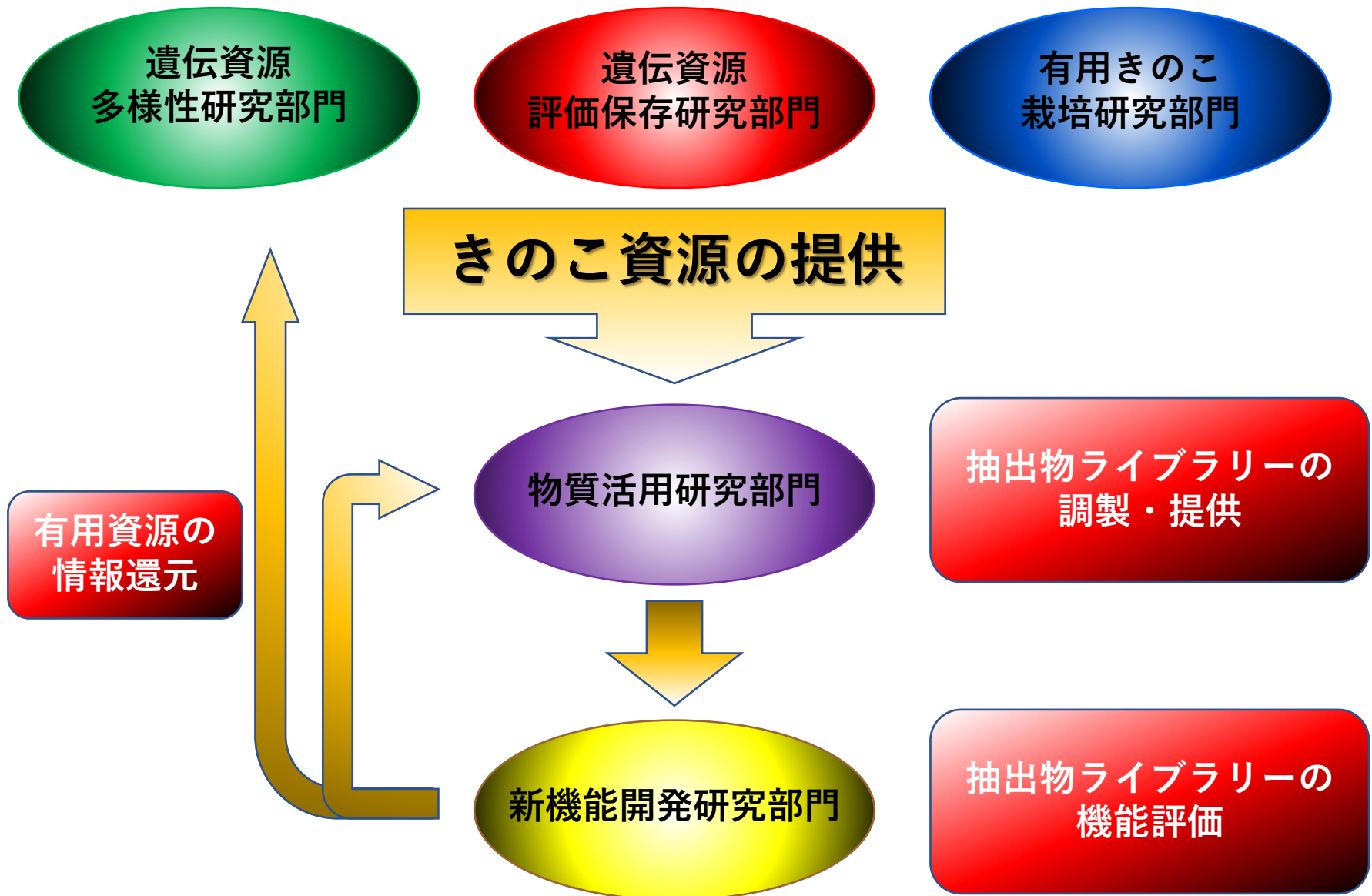
鳥取大学 新技術説明会
(令和5年3月7日)

ストロビルリンXによる 細胞増殖抑制作用

鳥取大学 農学部 共同獣医学科
菌類きのこ遺伝資源研究センター
新機能開発研究部門
准教授 高橋 賢次

菌類きのこ遺伝資源研究センター

きのこ由来生理活性物質の探索



菌類きのこ遺伝資源研究センター TUFC菌株コレクション



液体窒素気相タンク (-170°C)

- 保有株

9,097株のきのこ類菌株を
液体窒素で凍結保存

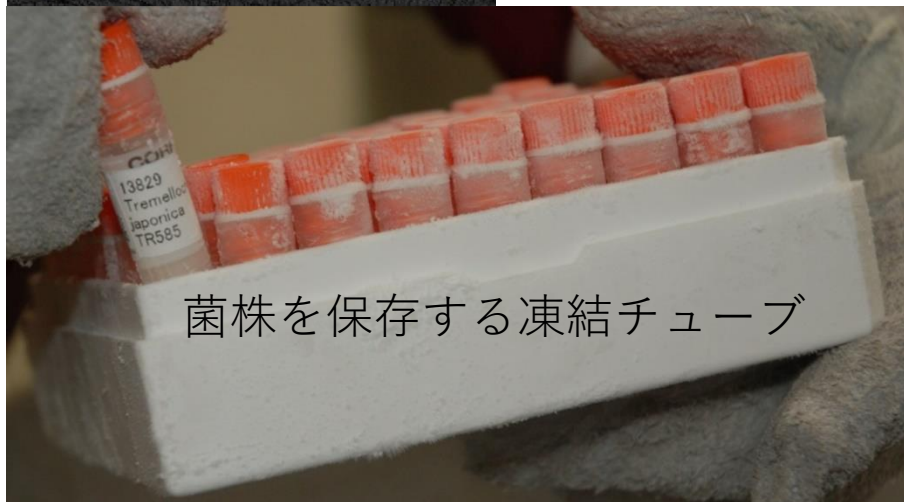
- DNAシーケンスによる同定確認実施
- 品質確認済みの菌株を公開・分譲
- 菌株データベースを公開



鳥取大学農学部附属
菌類きのこ遺伝資源研究センター
TUFC 菌株カタログ



<http://fungusdb.muses.tottori-u.ac.jp/>



菌株を保存する凍結チューブ



凍結標品の作製

きのこ抽出物ライブラリーの概要

1000種の菌株の中から属の異なる400株を選抜

菌糸体

液体培養物

培養ろ液抽出物

菌糸体抽出物

子実体

多様な菌類



子実体の発生

栽培子実体抽出物

天然子実体の採集

天然子実体抽出物



抽出物の作製(菌糸体の場合)

保存菌株

200 mL (500 mL フラスコ) x 10 / 1 系統

— 植菌

— 培養

液体培養物

培養室 2 ~ 3 ヶ月

— 菌糸体と培養液の分離 ろ過

菌体

— 凍結乾燥 凍結乾燥機

— 粉碎

— 有機溶媒抽出

— 遠心分離 遠心分離機

— 濃縮 遠心エバポレーター

ろ液

— 有機溶媒分配抽出

— 脱水

— 濃縮

抽出物

抽出物

100 mg / 1 系統 程度 フリーザー 集約して管理、データベースの整備



抽出物の作製(子実体の場合)

子実体

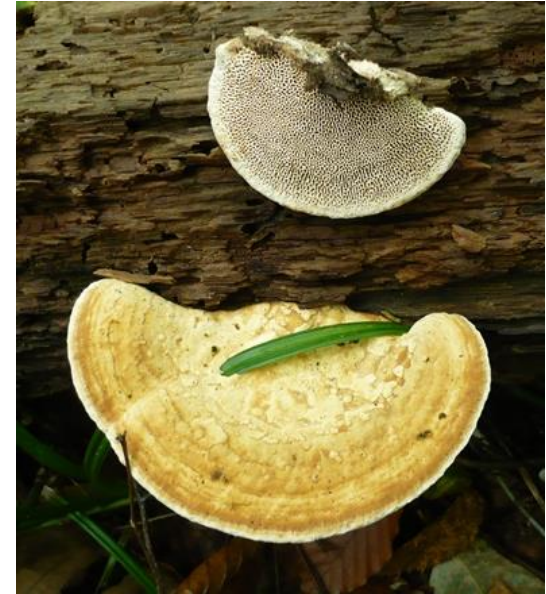
乾燥

粉碎

有機溶媒抽出

遠心分離 遠心分離機

濃縮 遠心エバポレーター



抽出物 100 mg / 1 系統 程度 フリーザー



集約して管理、データベースの整備

きのこ抽出物ライブラリーの利点

多様なきのこの抽出物

類似のライブラリーと比較して大規模、非食用きのこも含む。

効率の良いスクリーニング

培養、抽出、濃縮といった長い時間と大きな労力のかかるステップを回避して、ユニークなアッセイ系との橋渡しができる。

菌糸体、培養ろ液、子実体の抽出物が使用可能

培養条件によって生産される化合物が全く異なる。

大量培養や化合物の分画、精製が可能

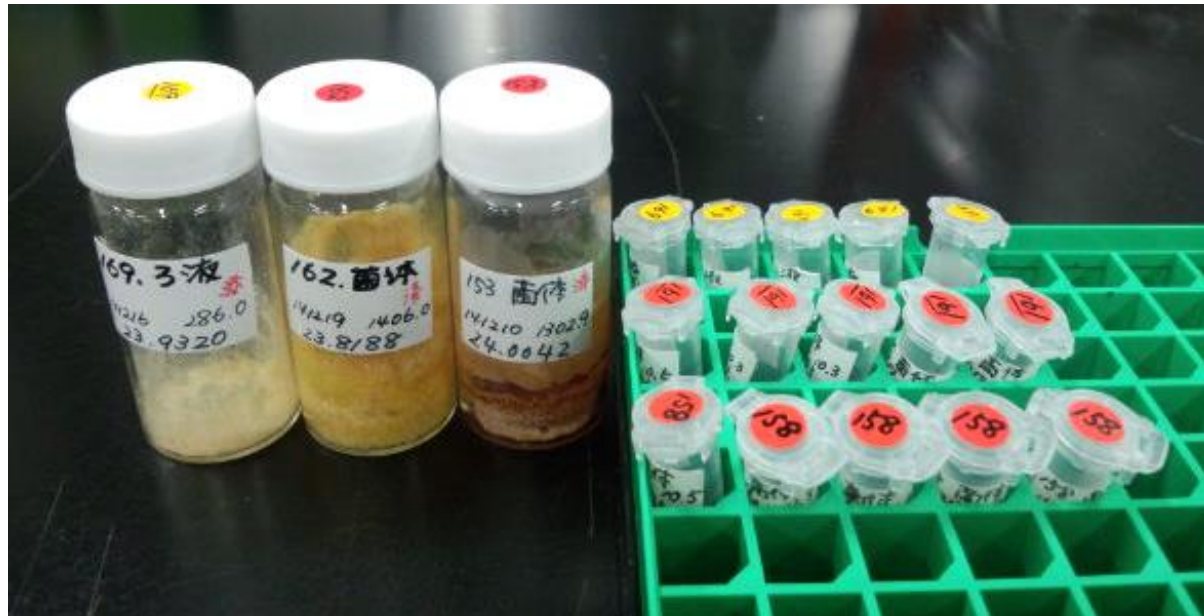
菌株、培養条件ははっきりしている。近縁種を調べることもできる。

きのこ抽出物ライブラリー進捗状況

2014年2月スタート

きのこセンターから分譲していただいた系統

抽出物作成終了 2, 173サンプル

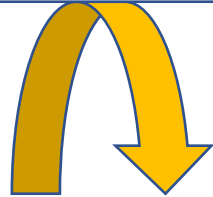


抽出物ライブラリーの細胞増殖抑制活性探索

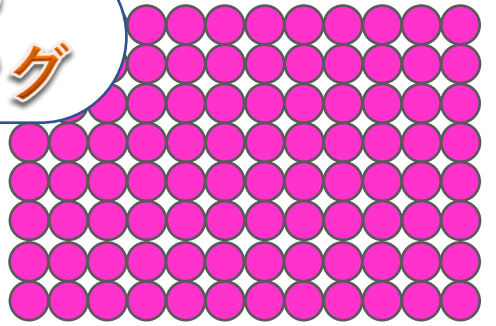
抽出物ライブラリー



有用菌株のスクリーニング



増殖活性測定 (WST法)



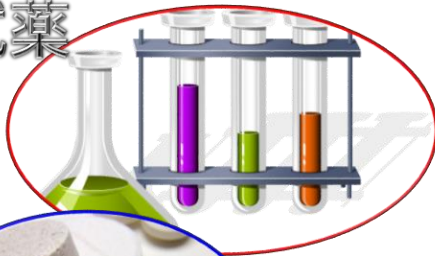
培養細胞

- HL60 – 白血病由来 (ヒト)
- A549 – 肺がん由来 (ヒト)
- G361 – 悪性黒色腫由来 (ヒト)
- NB1RGB – 正常皮膚由来 (ヒト)
- WI-38 – 正常肺由来 (ヒト)

増殖活性測定

- 抽出物適用 : 24 – 72 hrs
- 活性測定 : WST-8

試薬



医薬品

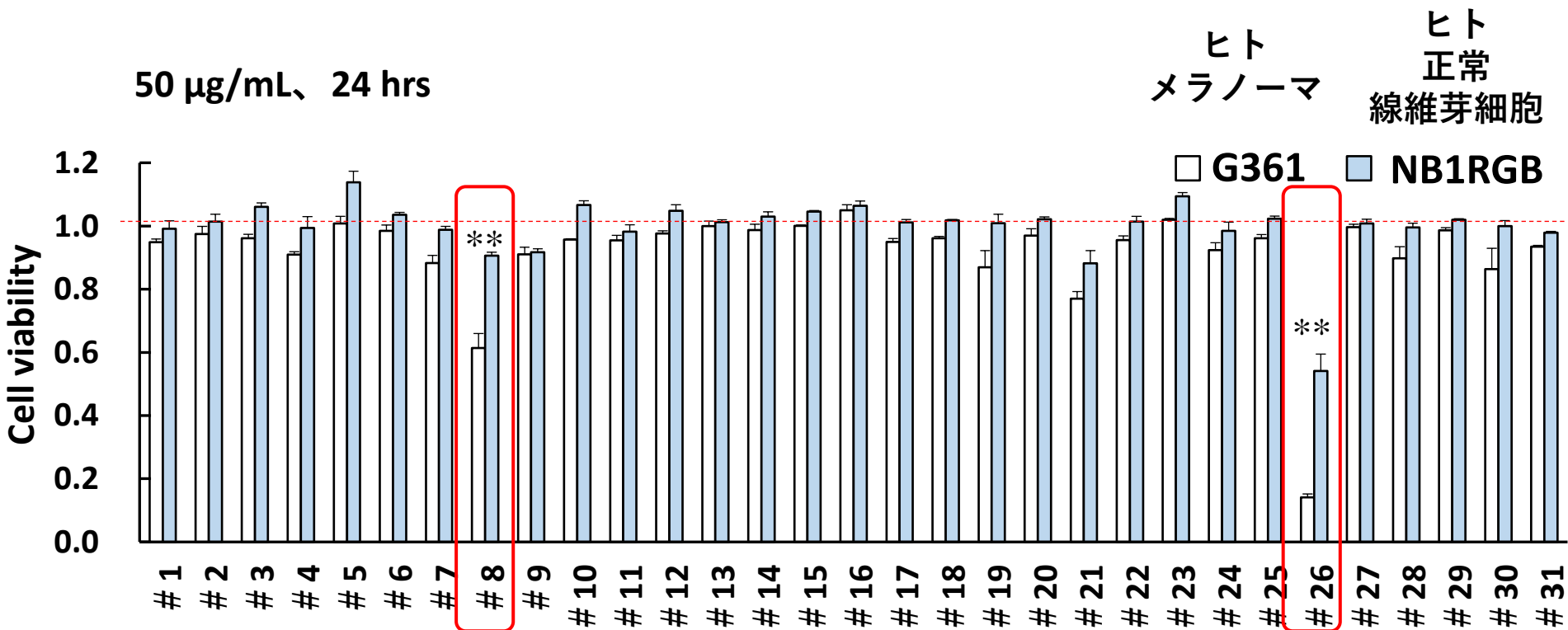


- 有用菌株と近縁種による比較検討
- 抽出物に含まれる有用物質の同定・機能解析

健康飲料



抽出物ライブラリー（菌糸体）の細胞増殖抑制活性探索



ヌメリツバタケモドキ

学名：Mucidula mucida var. venosolamellata

グループ（門）：担子菌門（basidiomycota）

科：タマバリタケ科（physalacriaceae）

属：ヌメリツバタケ属（mucidula）



特徴：子実体は白色で軟らかい。ひだはヌメリツバタケ（*Mucidula mucida*）と異なりしわがある。
可食きのこ。

ブナシメジ

学名：Hypsizygus marmoreus

グループ（門）：担子菌門
(basidiomycota)

科：シメジ科 (Lyophyllaceae)

属：シロタモギタケ属 (hypsizigus)

特徴：人工栽培され「シメジ」として販売されている
可食きのこ。



ホクト株式会社

ヌメリツバタケモドキ抽出物からの化合物の分離



ヌメリツバタケモドキ抽出物

Purification by silica gel chromatography
(acetone-hexane)

0% 10% 20% 30% 40% 50% 60% 70% 80% 90% 100% MeOH

Purification by silica gel chromatography
(ethyl acetate-hexane)

0%①~10%② 10%② 10%③ 20%① 20%② 20%③ 30%①~30%② 30%③~MeOH

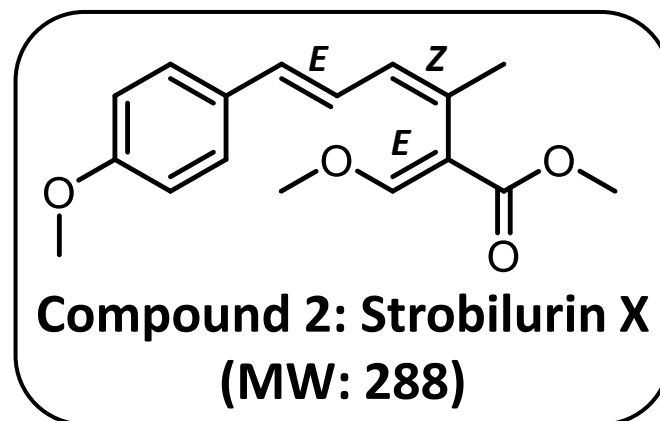
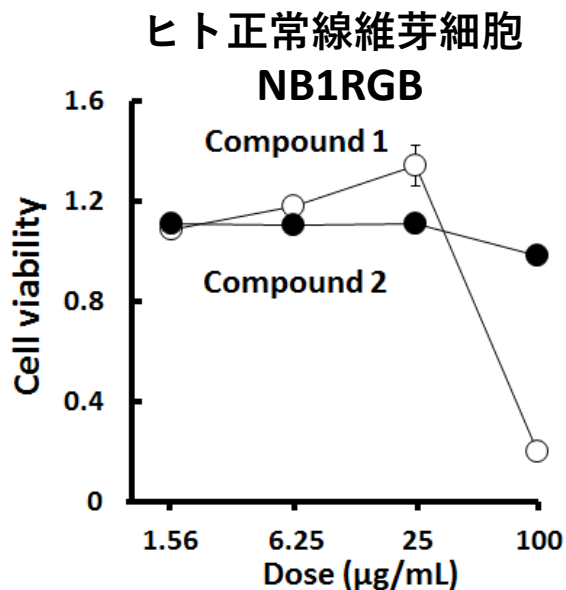
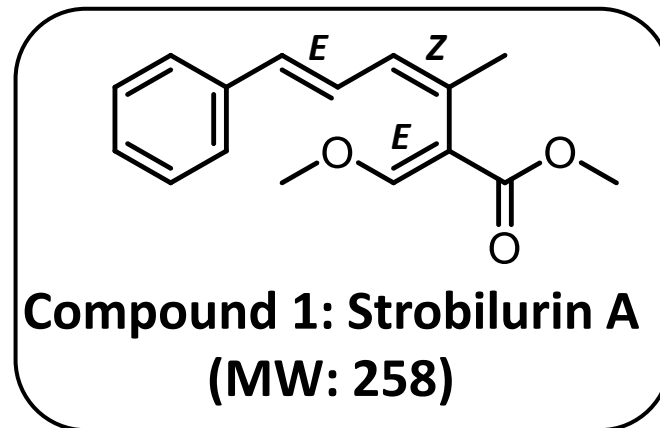
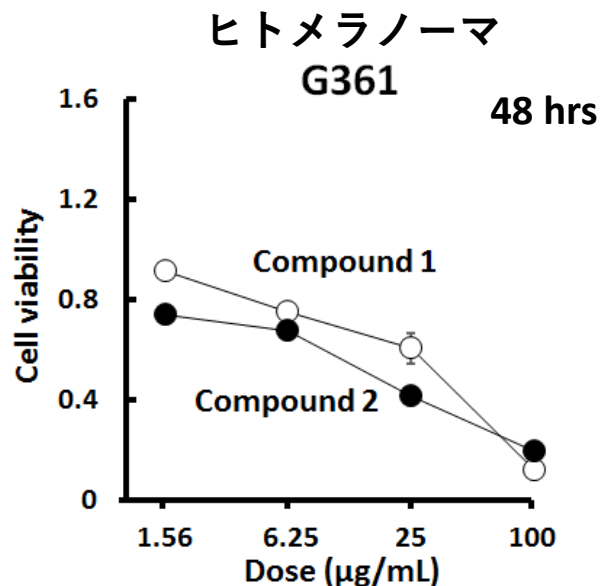
Fractionation by HPLC
(Acetonitrile-H₂O)

Fractionation by HPLC
(Acetonitrile-H₂O)

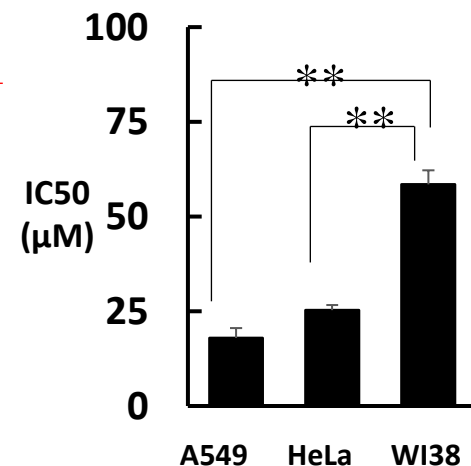
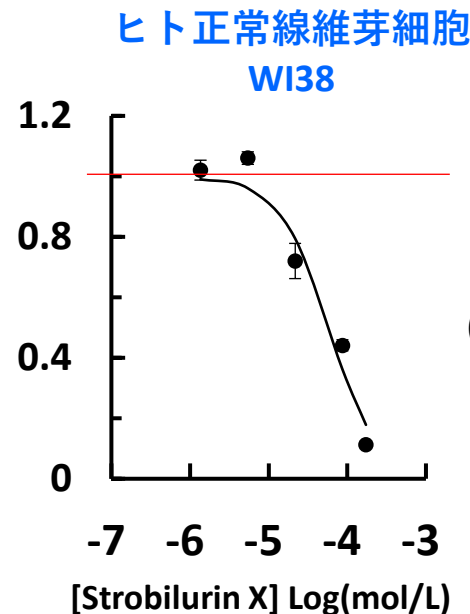
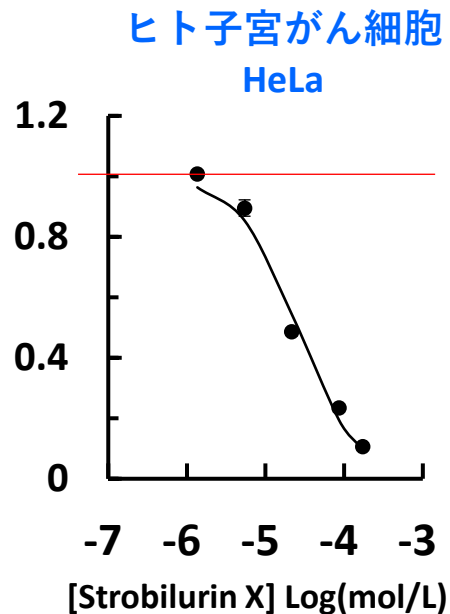
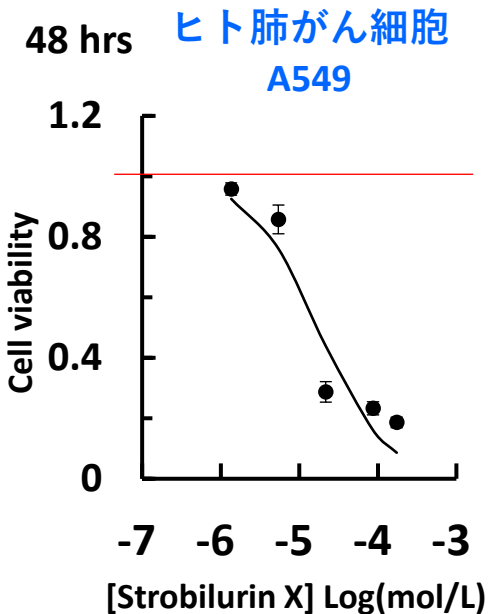
Compound 1

Compound 2

ヌメリツバタケモドキ由来化合物の細胞毒性

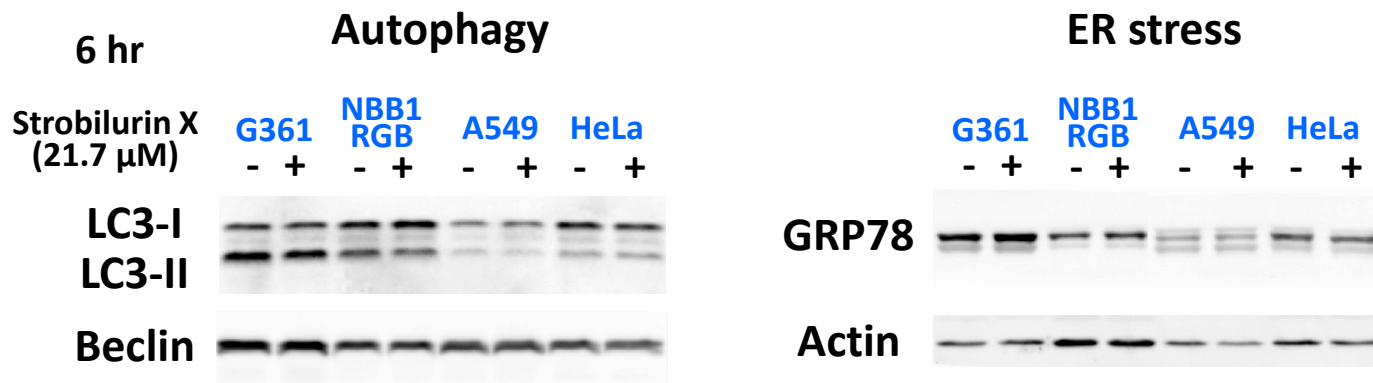
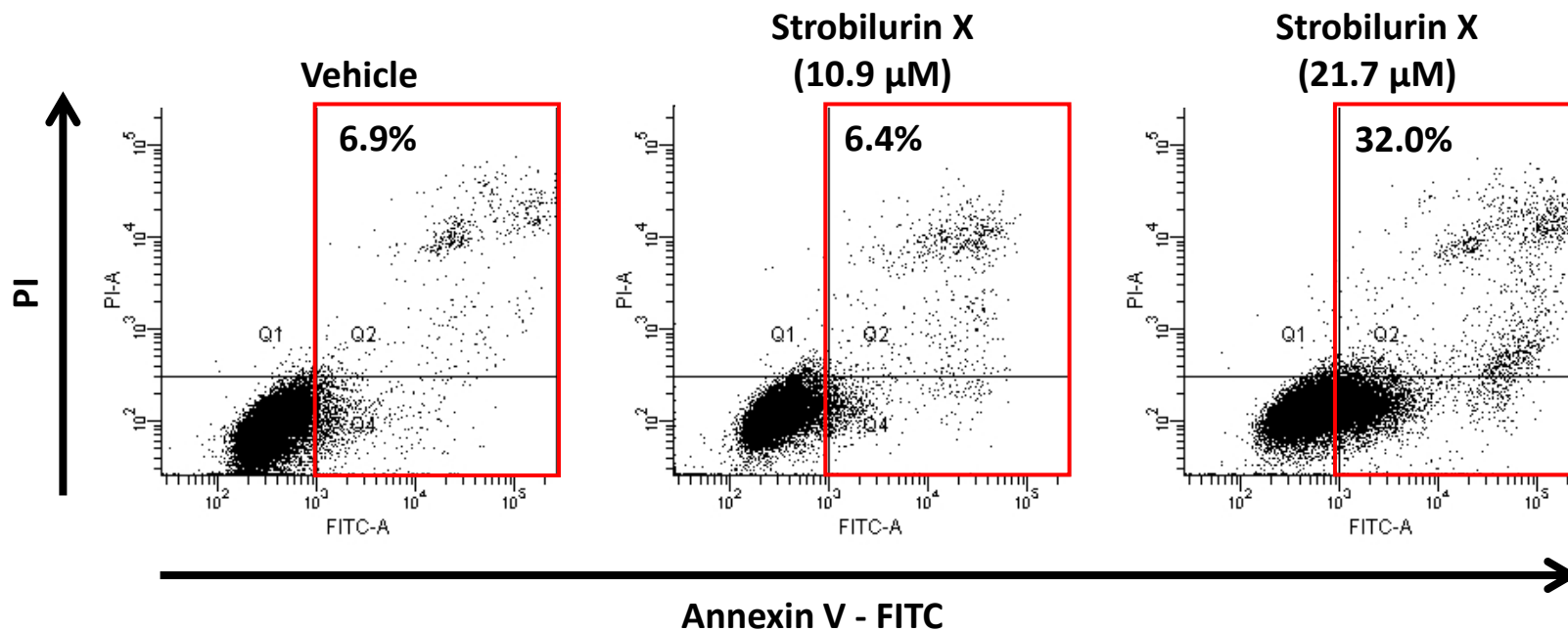


ストロビルリンXの細胞毒性



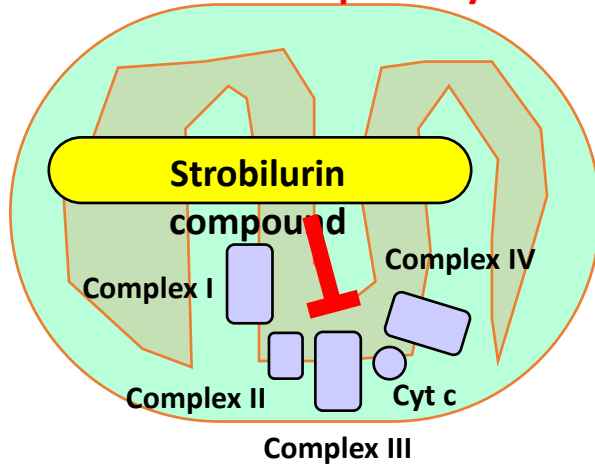
ストロビルリンXのアポトーシス誘発作用

ヒト肺がん細胞 (A549) - 24 hrs



ストロビルリンXの呼吸鎖抑制と細胞毒性の関係

Mitochondrial respiratory chain



Wood and Hollomon, Pest Manag Sci, 2003, 59: 499

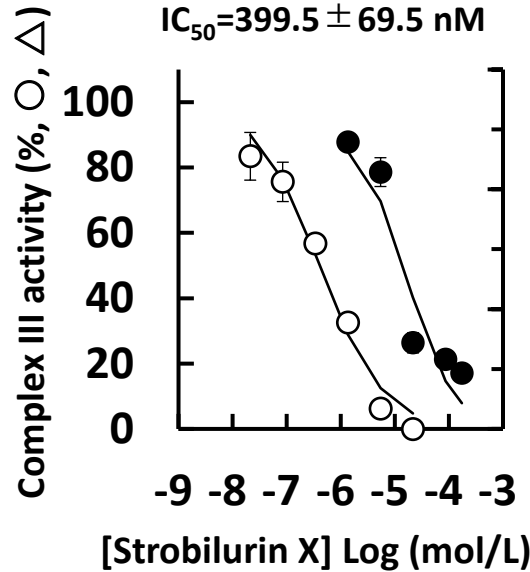
高い抗菌活性



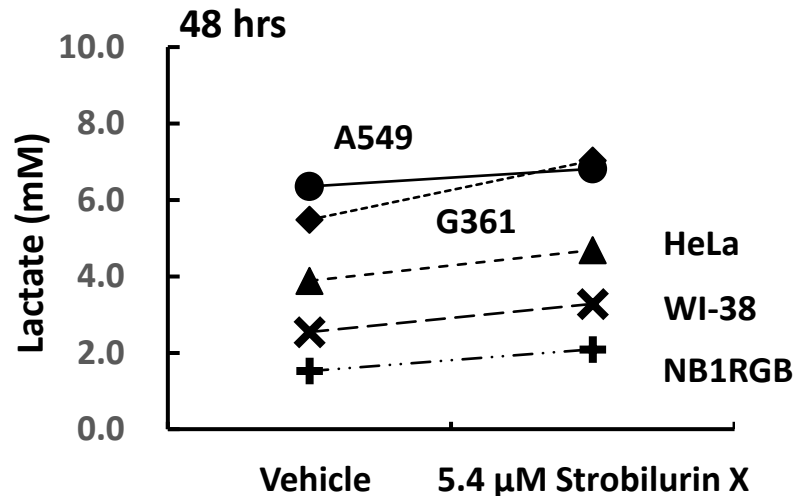
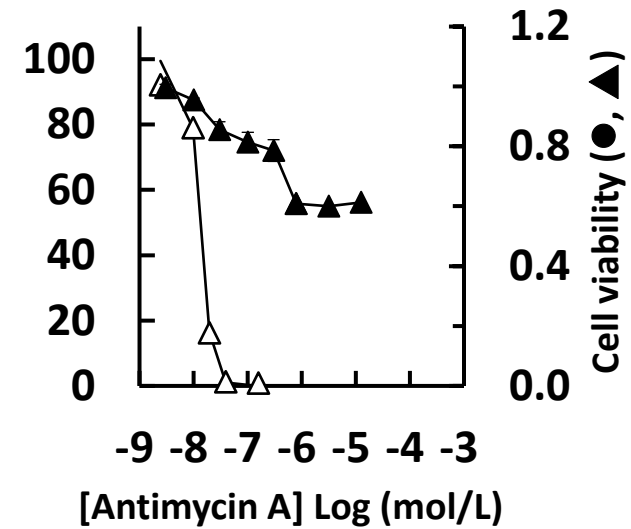
ストロビルリン系農薬

A549

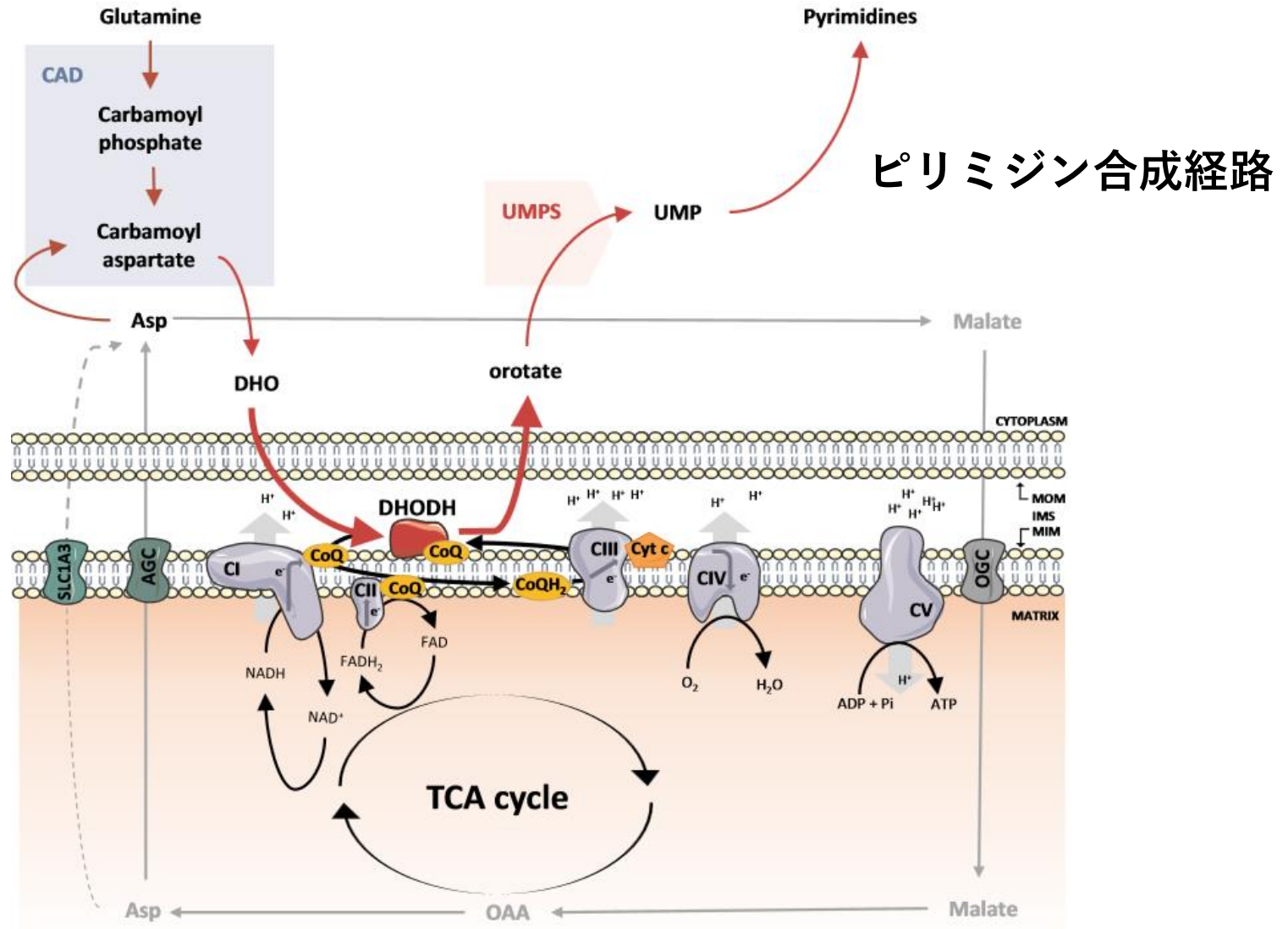
$IC_{50} = 399.5 \pm 69.5 \text{ nM}$



$IC_{50} = 13 \text{ nM}$

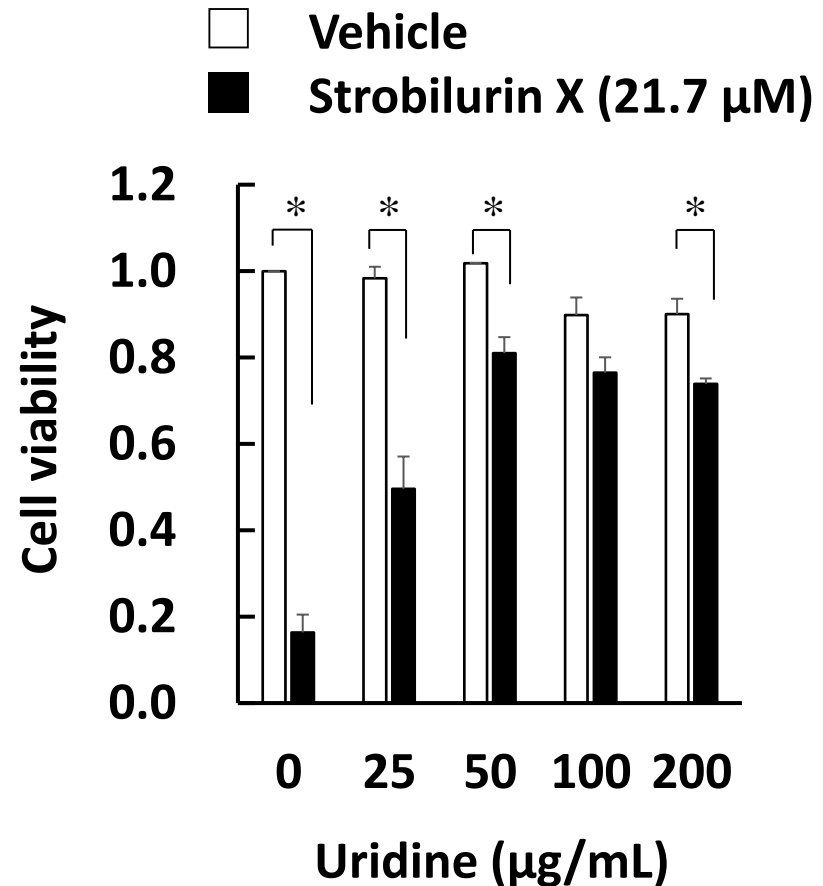
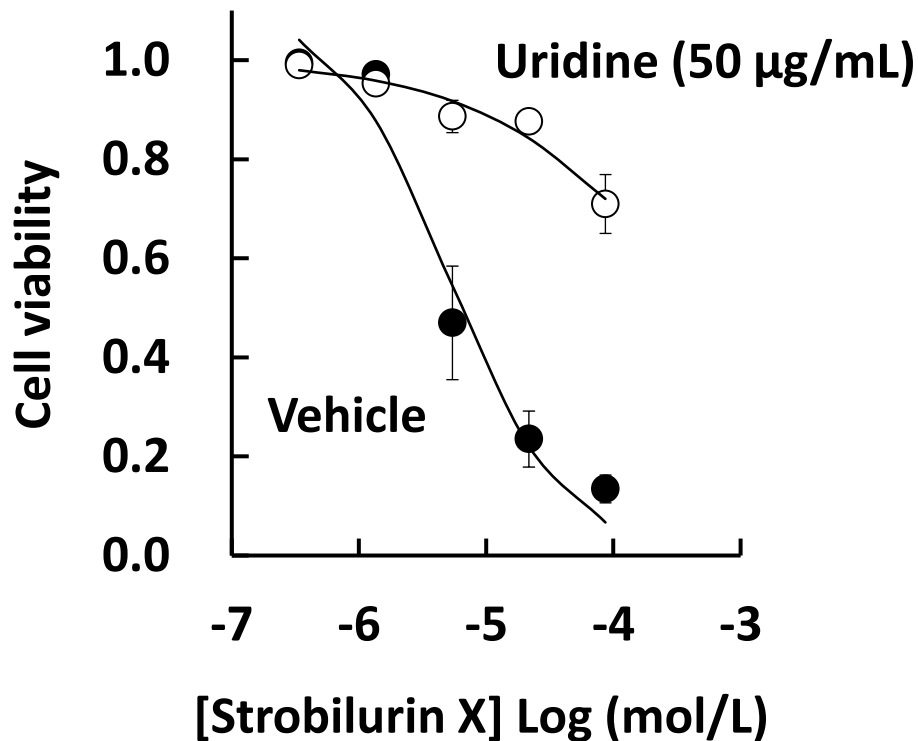


ストロビルリンXの呼吸鎖抑制と細胞毒性の関係

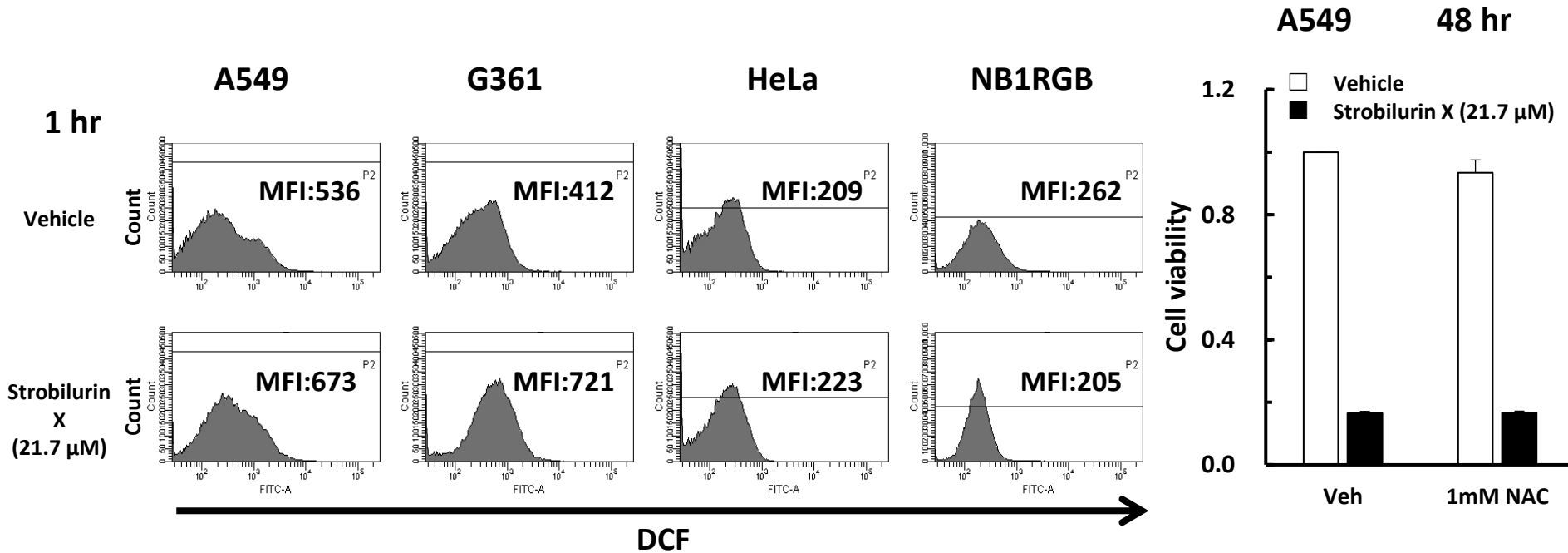


ストロビルリンX誘発細胞毒性に対するウリジンの効果

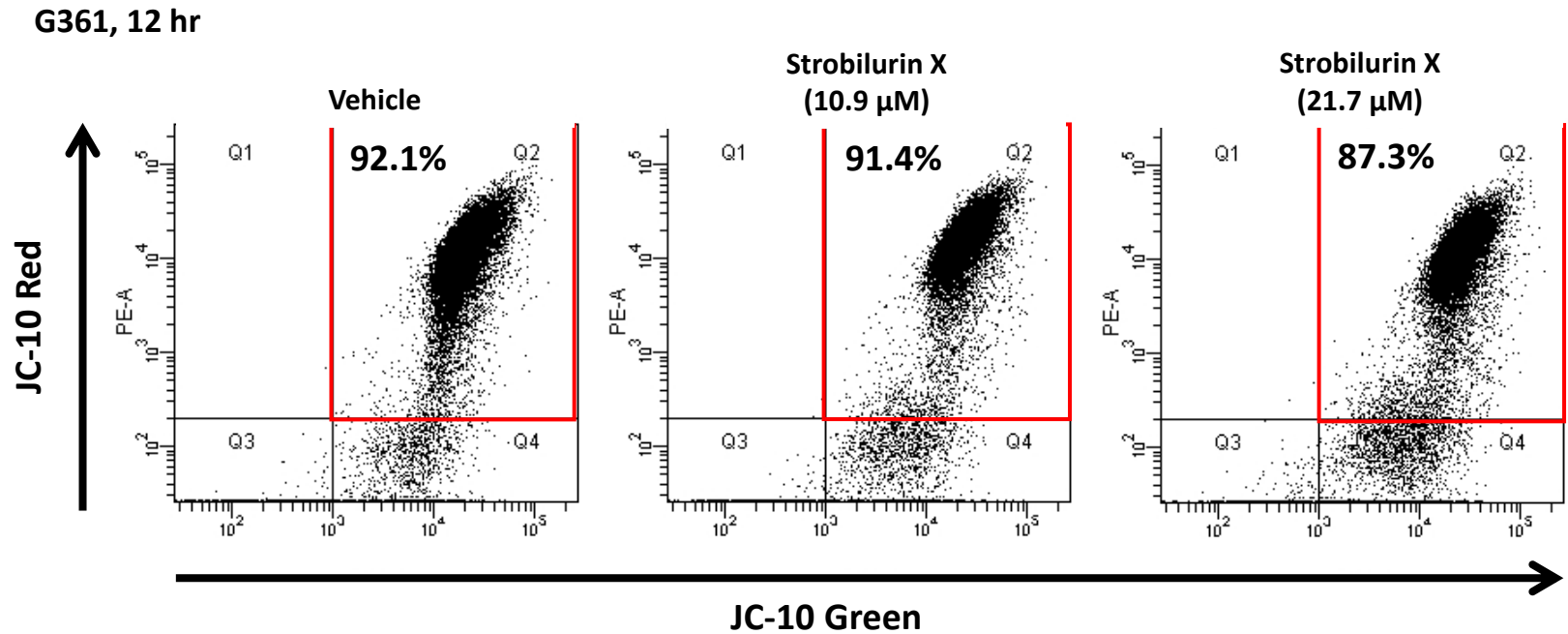
A549 48 hr



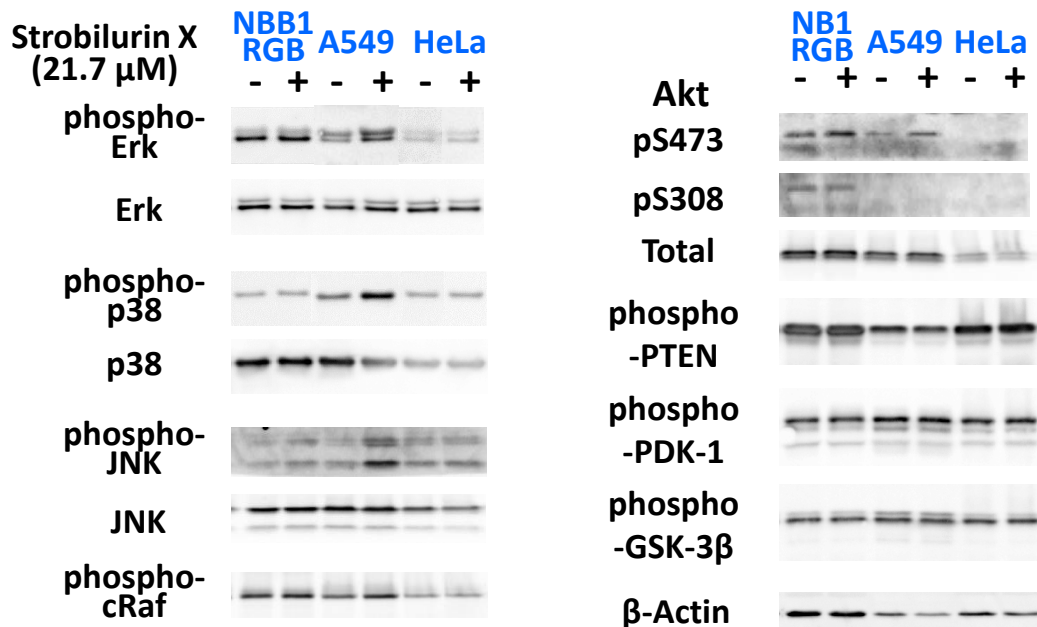
ストロビルリンXの活性酸素種生成能



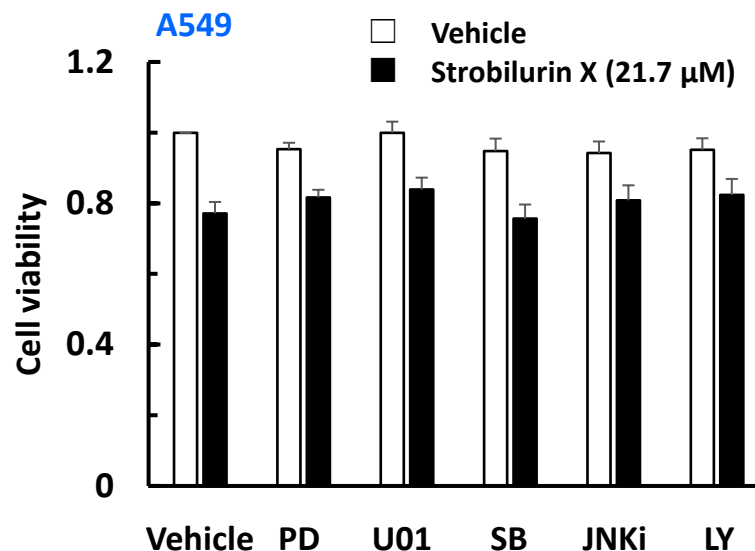
ストロビルリンXのミトコンドリア障害作用



細胞増殖関連分子に対するストロビルリンXの作用

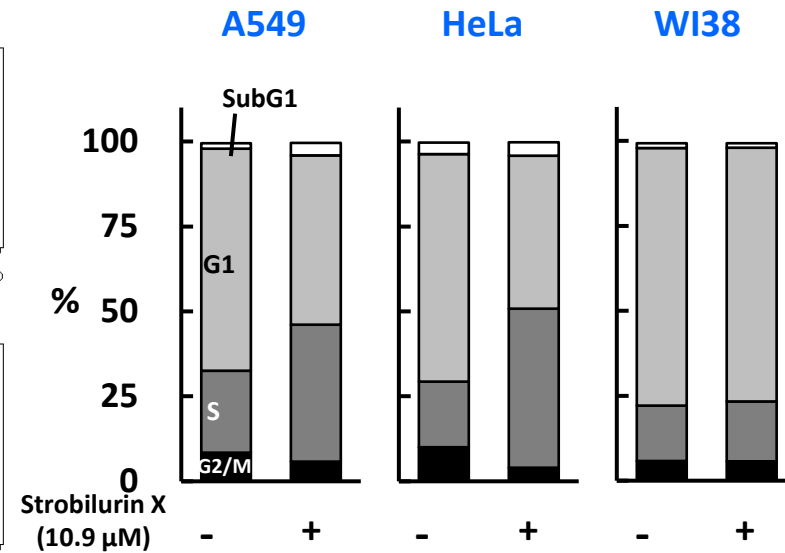
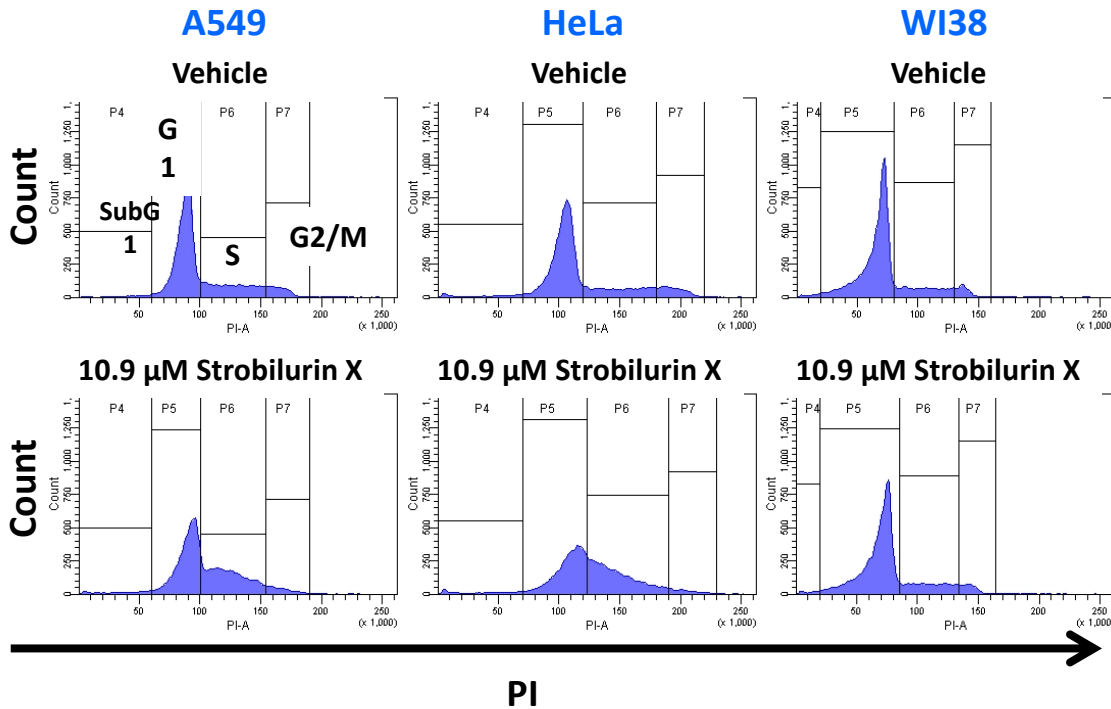


PD: PD98509 (10 μM), MEK inhibitor
U01: U0126 (10 μM), MEK inhibitor
SB: SB203580 (10 μM), p38 MAPK inhibitor
JNKi: JNK inhibitor (10 μM)
LY: LY294002 (10 μM), PI3K inhibitor



ストロビルリンXの細胞周期調節作用

24 hr



ストロビルリンXのタンパク質合成阻害作用

がん細胞

ヒト正常線維芽細胞

30 min

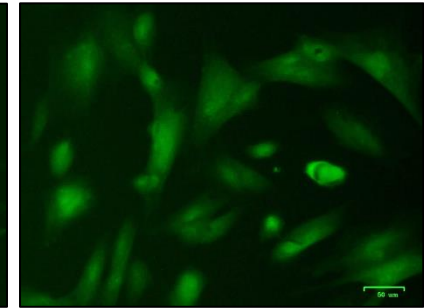
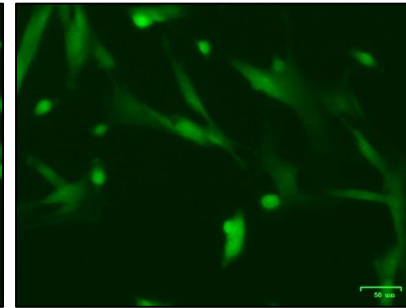
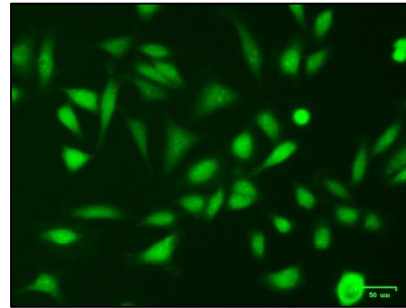
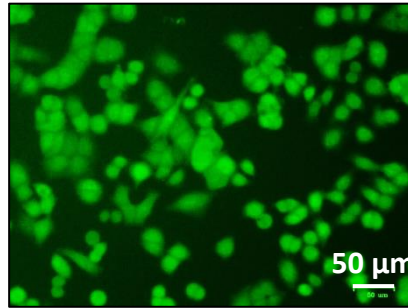
A549

HeLa

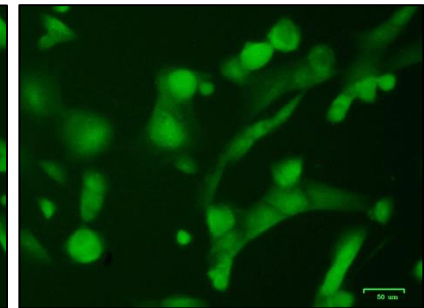
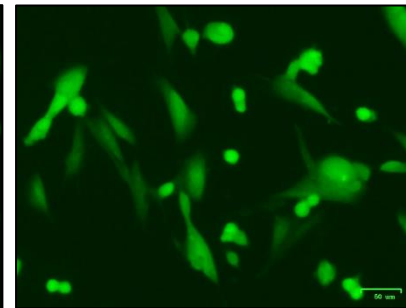
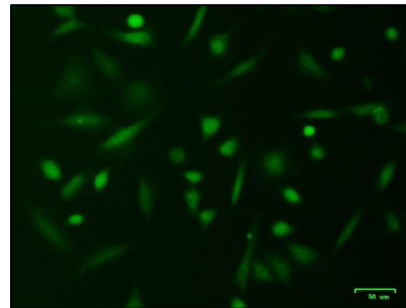
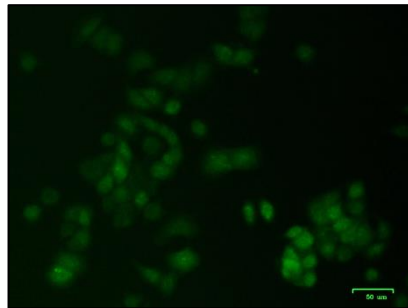
NB1RGB

WI38

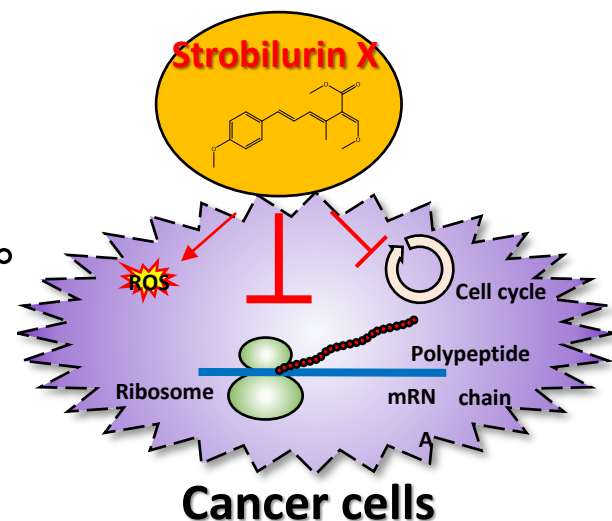
Vehicle



Strobilurin X
(21.7 μM)



- ・ヌメリツバタケモドキ菌糸体及び培養ろ液抽出物からストロビルリンXの単離に成功し、がん細胞に対して強力な細胞毒性作用があることを明らかにした（「癌細胞増殖抑制剤」特開2022-090502）。
- ・ストロビルリンXは、ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系complex IIIを阻害することで細胞毒性を引き起こしたが、それ以外のメカニズムによる細胞毒性の可能性を新たに発見した。
- ・ストロビルリンXは、活性酸素種の生成を誘発するものの、細胞株に依存し、細胞毒性作用との関連性は見られなかった。
- ・ストロビルリンXは、細胞増殖シグナル伝達経路への関与は見られなかった。
- ・ストロビルリンXは、細胞周期の停止を誘発した。
- ・ストロビルリンXは、タンパク質合成阻害作用を示した。
- ・ストロビルリンXを含むストロビルリン系化合物には新たな腫瘍細胞特異的な増殖阻害作用があることが明らかとなった。



本技術に関する知的財産権

- **発明の名称** : **癌細胞増殖抑制剤**
- **出願番号** : **特願2020-202938**
- **公開番号** : **特開2022-090502**
- **出願人** : **国立大学法人鳥取大学**
- **発明者** : **高橋賢次、石原亨、井上裕貴**

お問い合わせ先

**国立大学法人鳥取大学
研究推進機構**

T E L 0857 - 31 - 5546

F A X 0857 - 31 - 5571

e-mail sangakucd@ml.cjrd.tottori-u.ac.jp