

きのこ由来の概日リズム調節物質

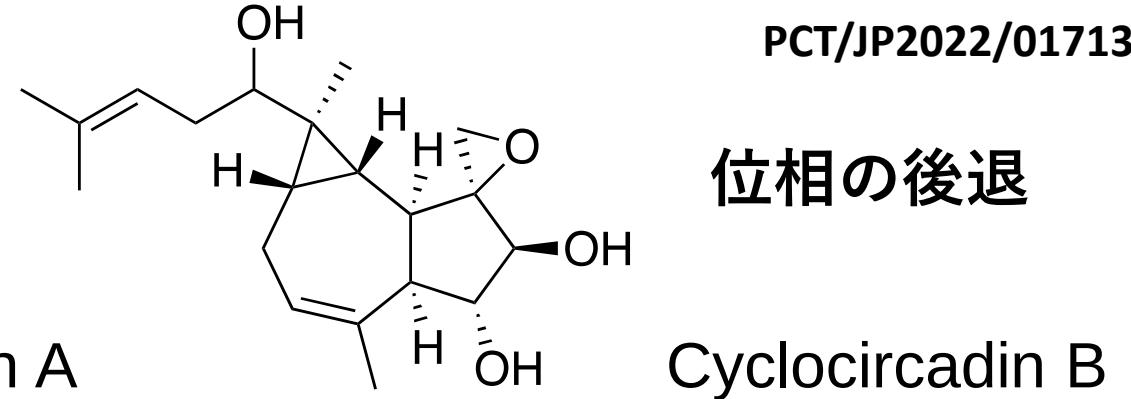
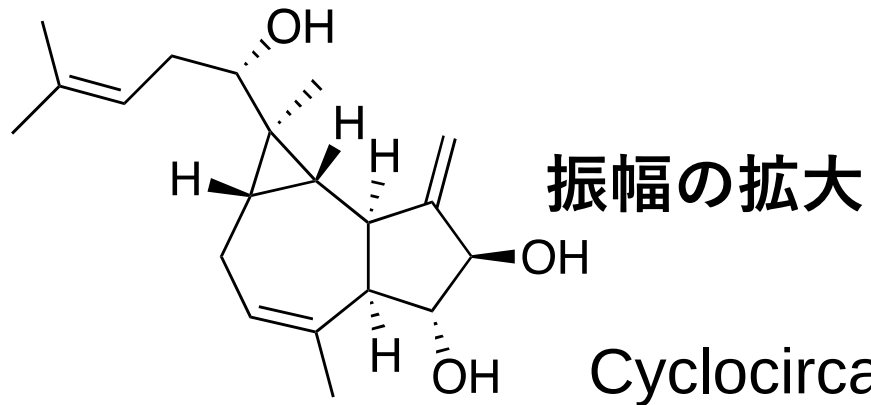


鳥取大学 農学部
石原 亨

まとめ

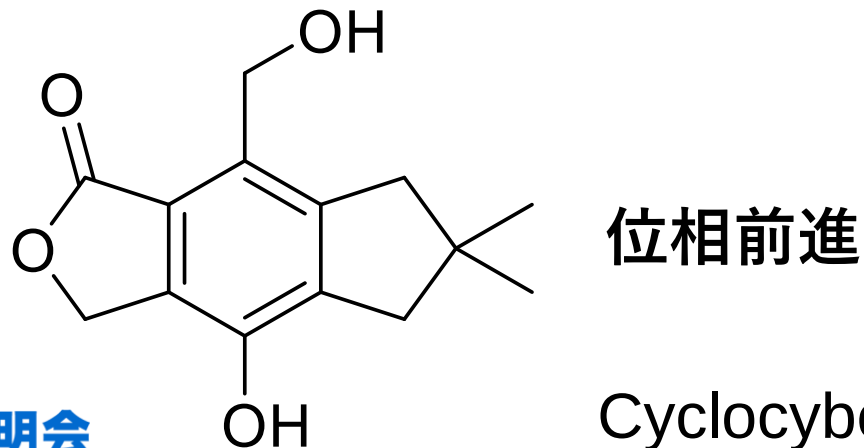
ツチナメコから単離した概日リズム調節活性物質

特願 2021-072719
PCT/JP2022/017131



ツチナメコ近縁種から単離した概日リズム調節活性物質

特願 2024-172086

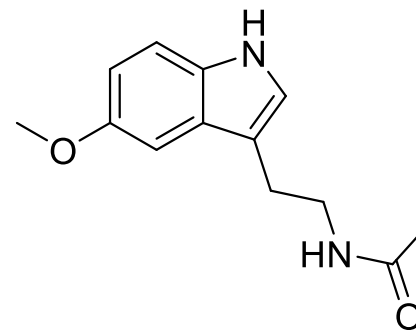


概日リズム（体内時計）とは

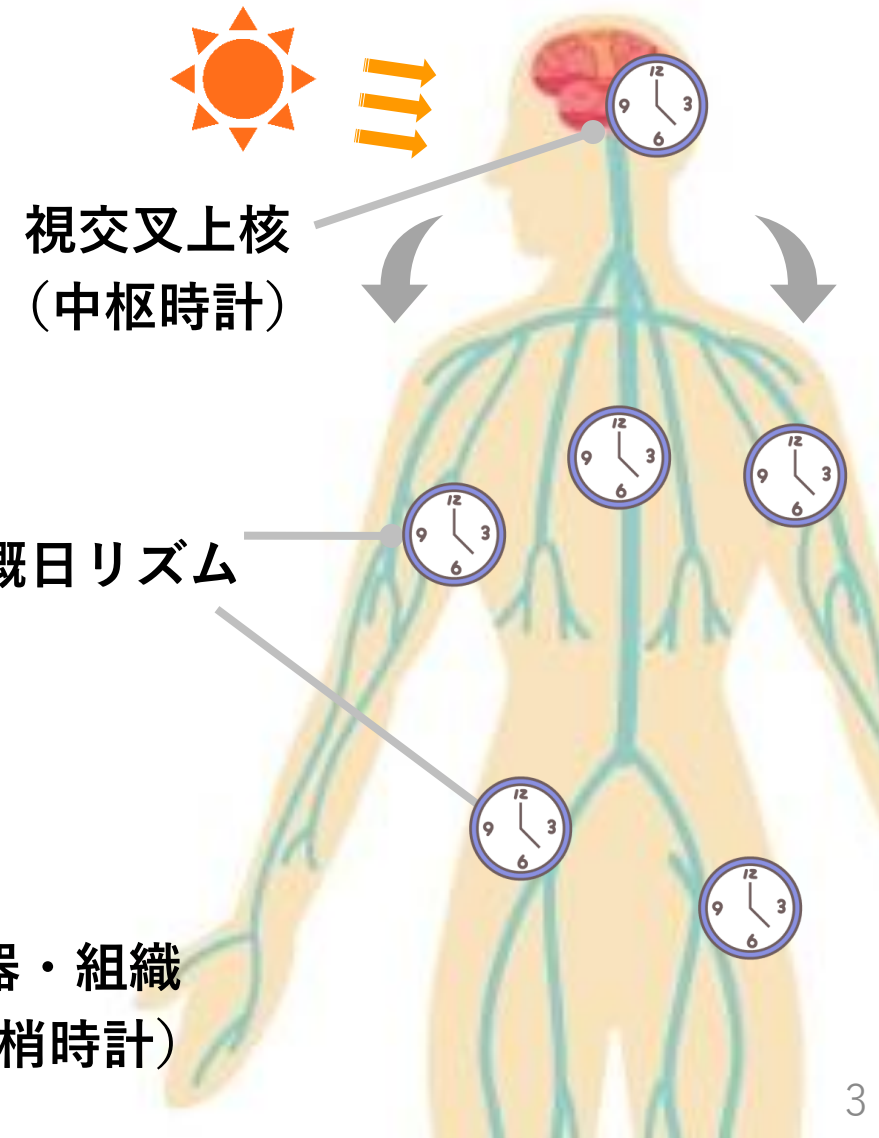
概日リズムとは、約24時間周期で代謝や生理機能を調整する生体システム

- 哺乳類では、睡眠・覚醒周期、ホルモン分泌、血圧、体温といった生理活動が調節される
- 生体内のあらゆる細胞で概日リズムは機能し、視交叉上核のシグナルで同調される
- 昼間時は視神経からの光刺激に同調し、夜間時は睡眠誘導ホルモンが作用する
- 細胞レベルでは、約10-20個の時計遺伝子により概日リズムが制御される

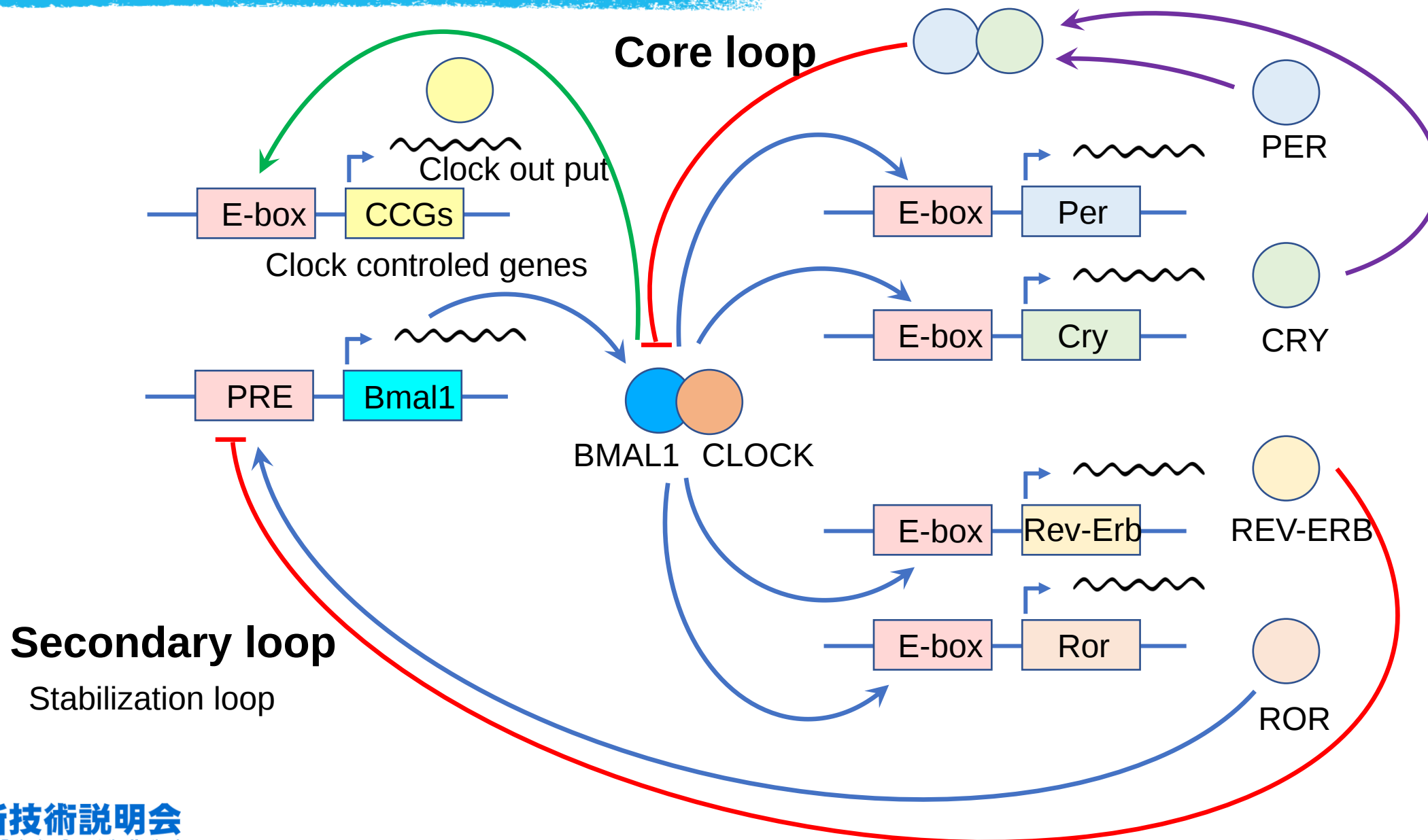
例) *Bmal1*, *Clock*, *Period*, *Cryptochrome*, *Rev-erb*, *Ror* など



メラトニン



時計遺伝子の発現制御

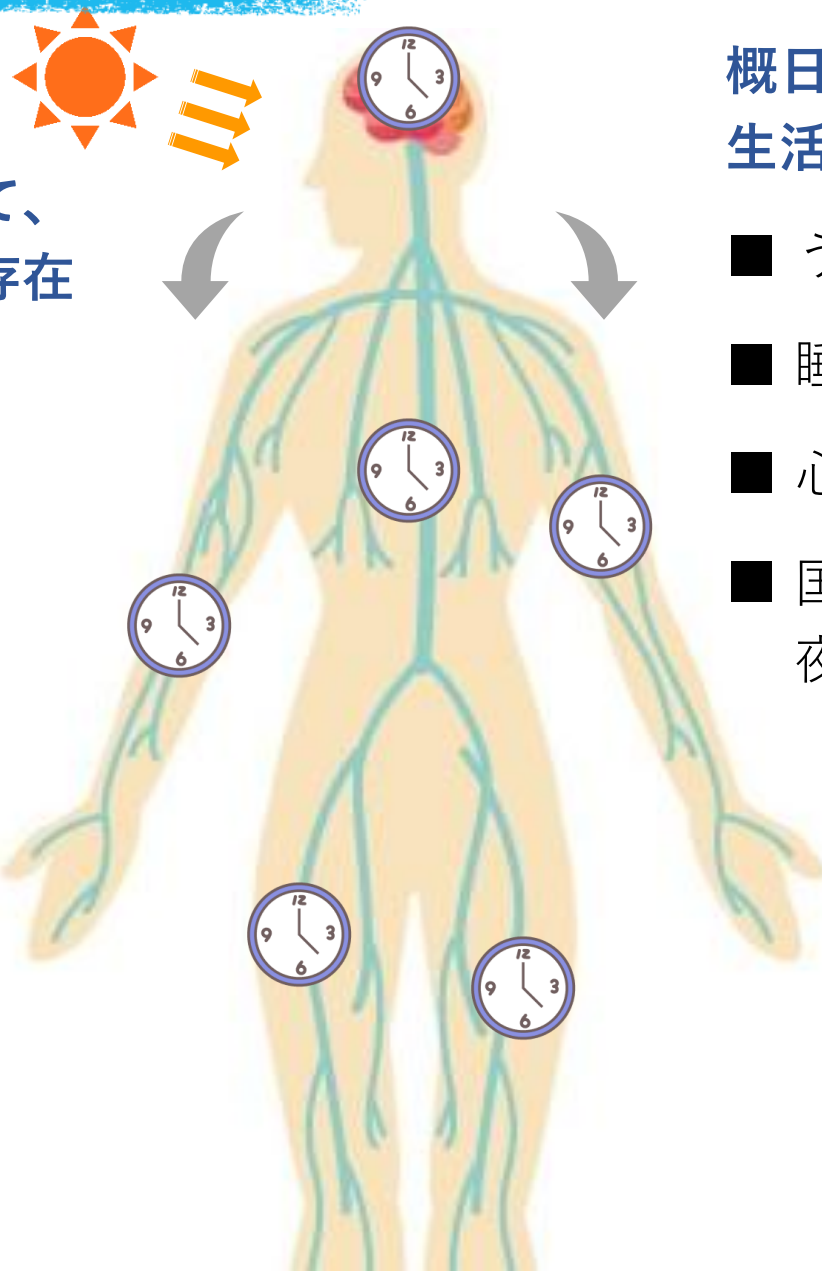


概日リズムと疾患

ライフスタイルの多様化によって、
概日リズムの乱れる場合が多く存在

- 国外移動
- 夜勤、交替制勤務
- 睡眠不足 など

時差ボケ・社会的時差ボケ、
眠れない、朝起きれない…



概日リズムの乱れは、
生活習慣病など様々な疾患と深く関係

- うつ病 Li et al. (2013)
- 睡眠障害 Ebisawa et al. (2013)
- 心血管障害 Vetter et al. (2016)
- 国際がん研究機関は、
夜勤労働を**発がんリスクあり**と指定

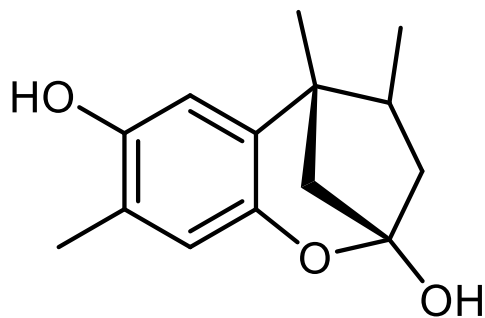
乱れた概日リズムの改善は
様々な疾患の予防に有効

きのこ由来の生理活性物質

きのこは、真菌類の一種。菌糸の集積により子実体を形成

様々な**新規物質**

サプリメントや医薬品・化粧品などに活用

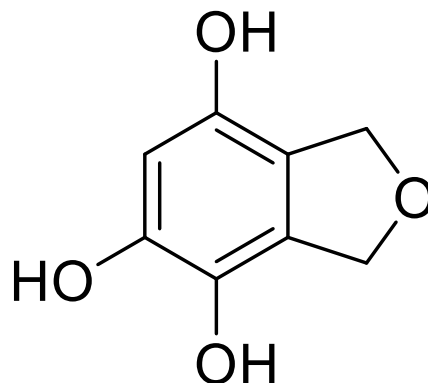


Hitoyopodin A

抗ガン作用

Otaka et al. (2018)

Coprinopsis cinerea
(ウシグソヒトヨタケ)

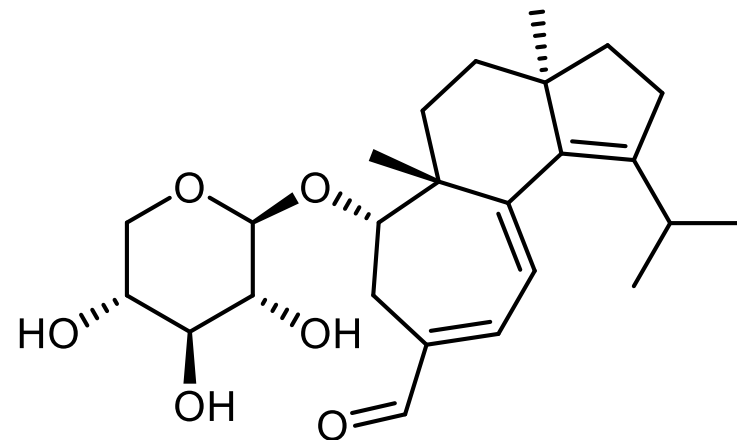


1,3-Dihydroisobenzofuran-4,5,7-triol

チロシナーゼ阻害

Ishihara et al. (2018)

Neolentinus lepideus
(マツオウジ)



Erinacine A

抗認知症効果

Kawagishi et al. (2021)

Hericium erinaceus
(ヤマブシタケ)

きのこ抽出物ライブラリー



Liquid culture



Cultivated fruiting body



Fruiting body from field

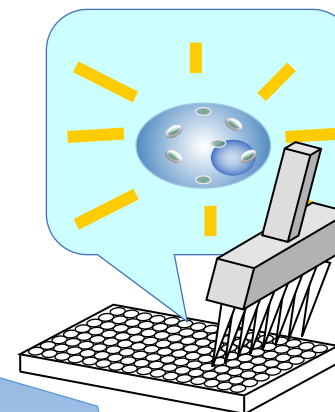
鳥取大学附属菌類きのこ遺伝資源研究センター



きのこ抽出物
ライブラリー



農薬・農業資材



医薬

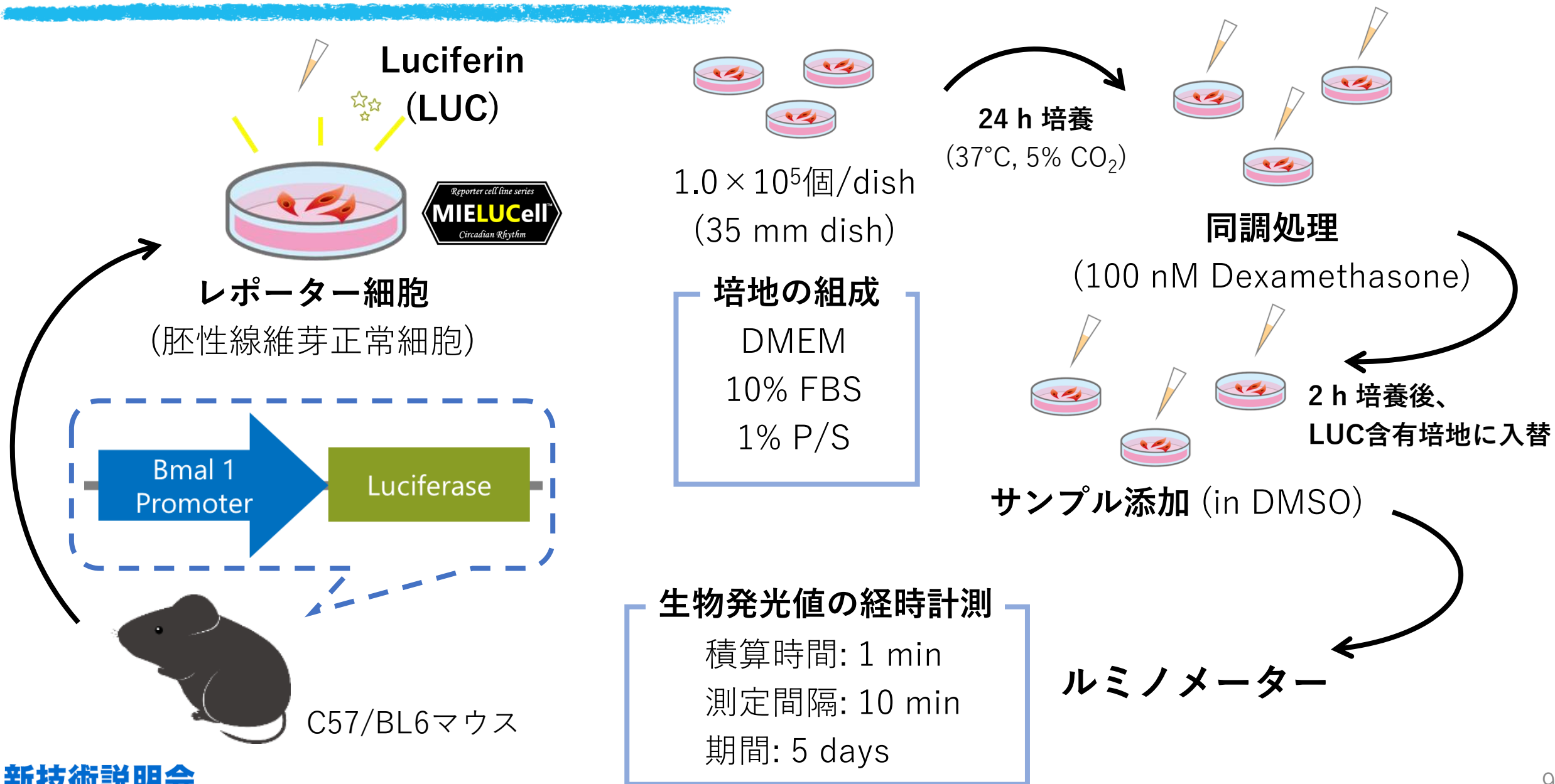


機能性食品・
化粧品

シクロサーカディン類の発見



概日リズムの測定方法



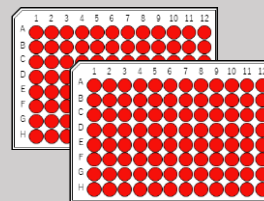
きのこ抽出物ライブラリーを用いたスクリーニング



菌類きのこ遺伝資源研究センターを活用した
きのこ抽出物ライブラリー由来のサンプル
1760 sample

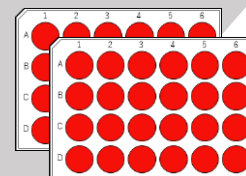
1st

...60 sample



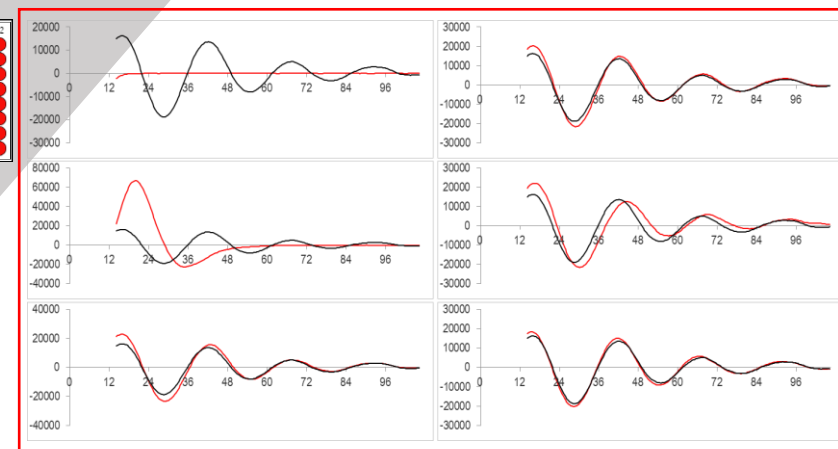
2nd

...37 sample



3rd

...9 sample



概日リズム変動の大きい食用きのこを選抜

ツチナメコ培養ろ液の分画

ツチナメコ (*Cyclocybe erebia* TUFC 32157)
培養ろ液抽出物450 mg

シリカゲルC.C.

Acetone-Hexane (20%-100% acetone)

40%アセトン Fr. 145.7 mg

ODS C.C.

H₂O-MeOH (20%-80% MeOH)

80%メタノール Fr.57.6 mg

HPLC with ODS column

80% ACN / 0.1% AcOH

化合物 2 化合物 1

Rt. 7 min

2.2 mg

Rt. 10 min

16.9 mg

ツチナメコ

Cyclocybe erebia TUFC 32157

オキナタケ科 フミヅキタケ属

可食きのこ

夏から秋にかけて庭先や道端各種の林
内地上に群生する。分布はほぼ世界的。

化合物1の構造解析

ESI-MS

Positive

m/z 341 $[M + Na]^+$

Negative

m/z 353 $[M + Cl]^-$

MW: 318

HR ESI-MS

Positive

m/z 341.2078

$C_{20}H_{30}O_3Na$ ($\Delta = -0.876$)

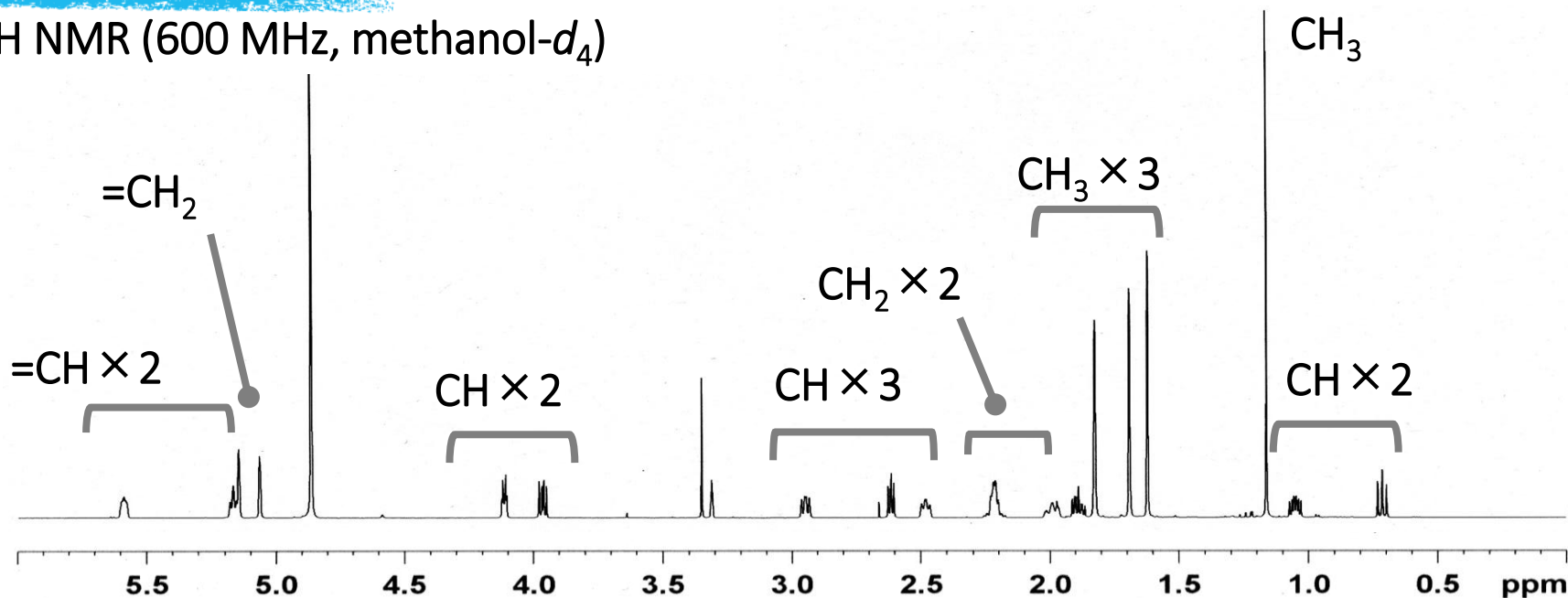
Negative

m/z 353.1890

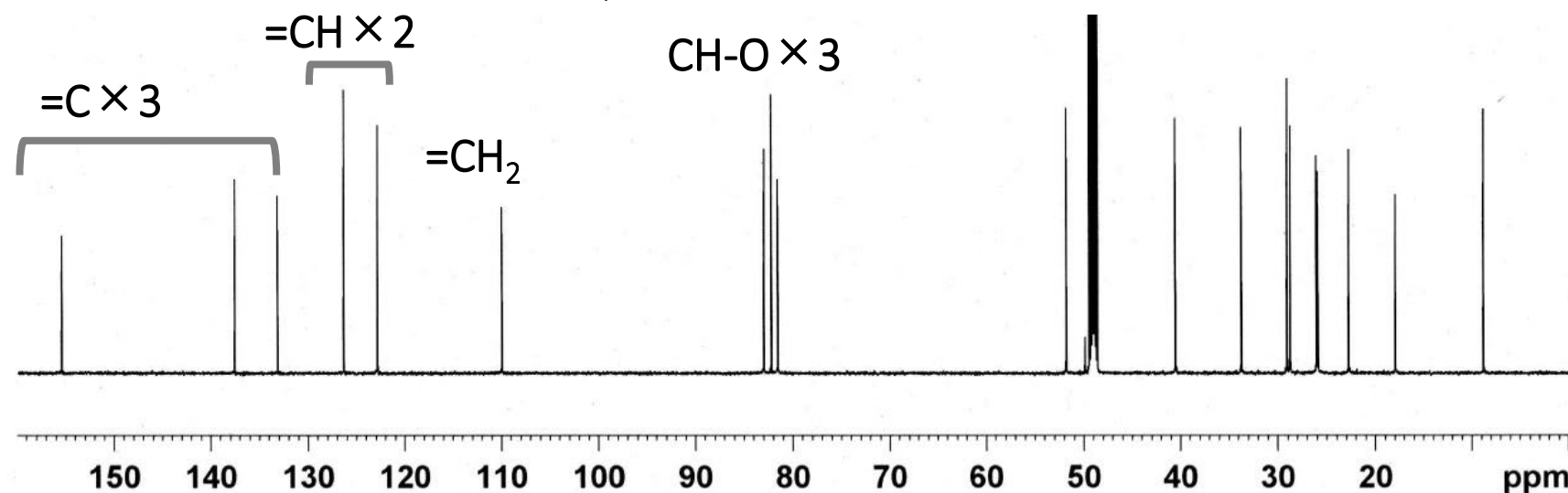
$C_{20}H_{30}O_3Cl$ ($\Delta = -1.181$)

$C_{20}H_{30}O_3$

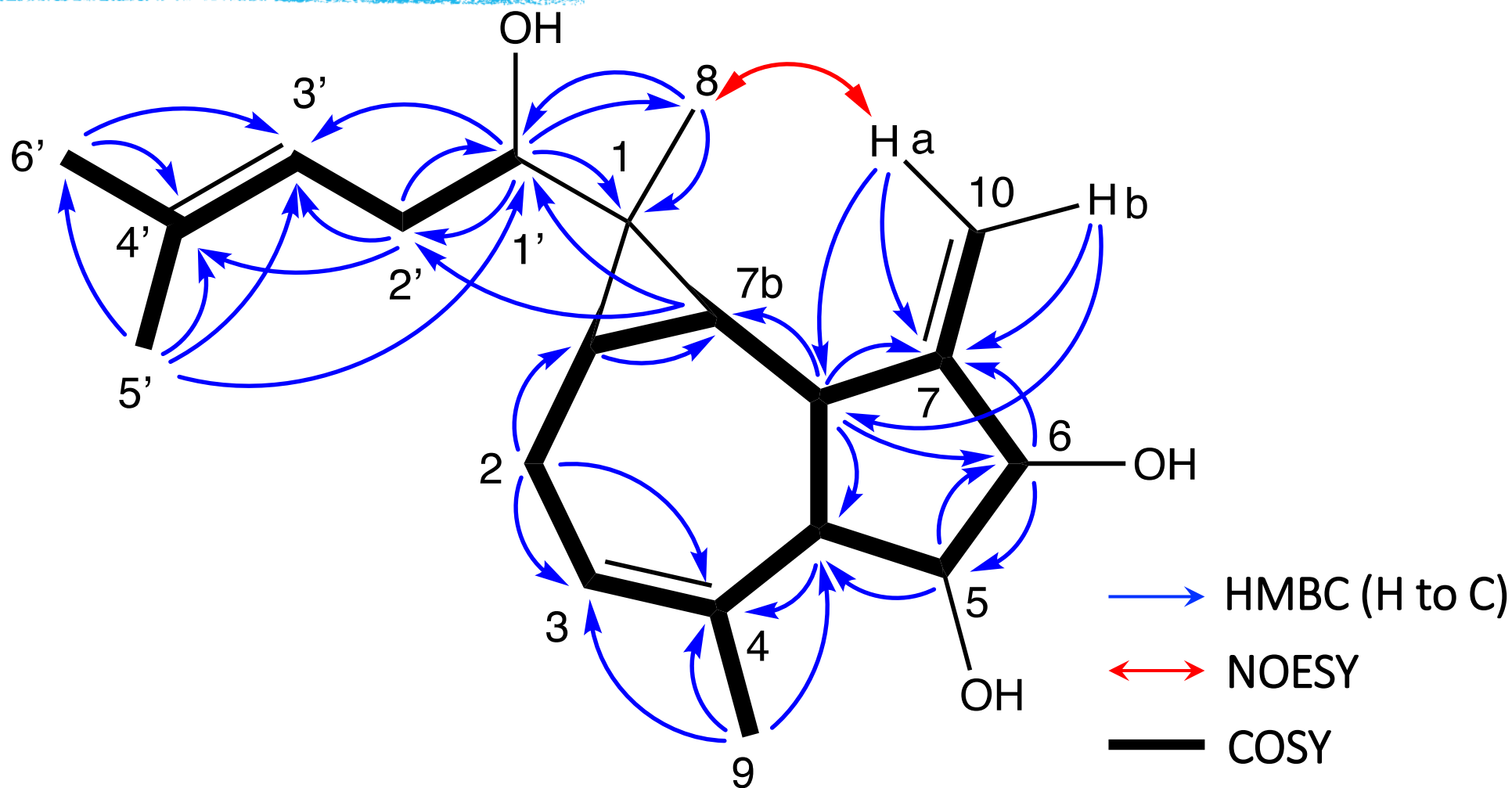
1H NMR (600 MHz, methanol- d_4)



^{13}C NMR (150 MHz, methanol- d_4)

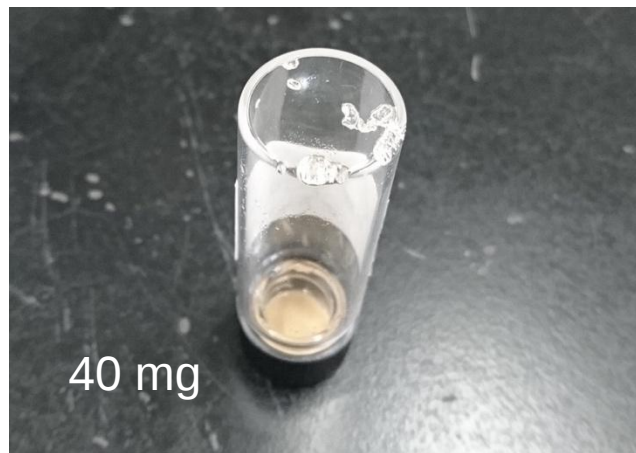


化合物1の構造解析 (2D NMR)



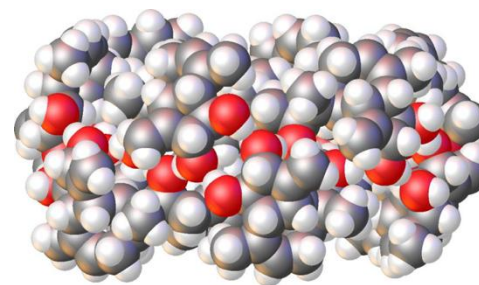
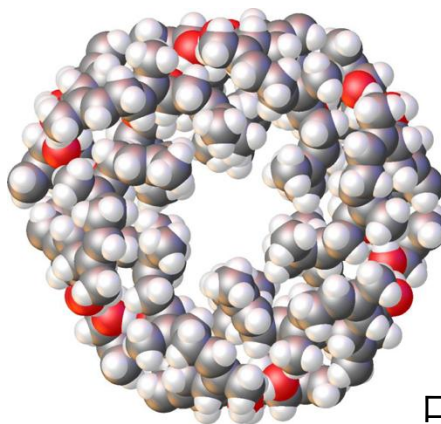
1-(1-Hydroxy-4-methylpent-3-en-1-yl)-1,4-dimethyl-7-methylene-1a,2,4a,5,6,7,7a,7b-octahydro-1H-cyclopropa[e]azulene-5,6-diol

シクロサーカディンA（化合物1）

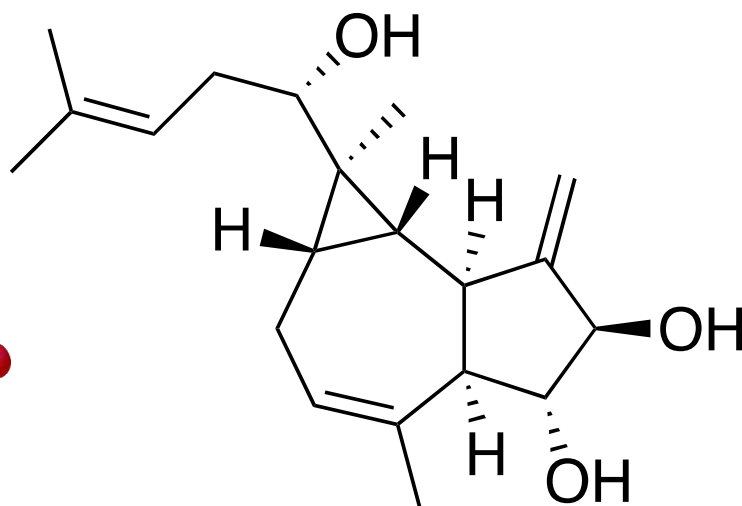
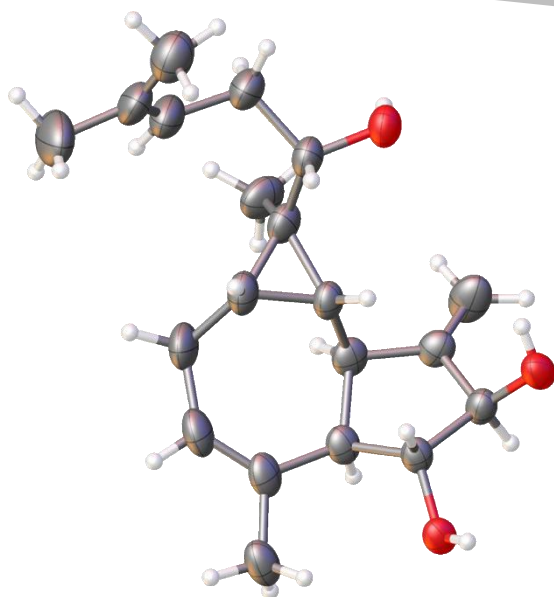


トルエンから再結晶

X線結晶構造解析



中空構造を持ったドーナツ型12量体



シクロサーカディン A

化合物2の構造解析

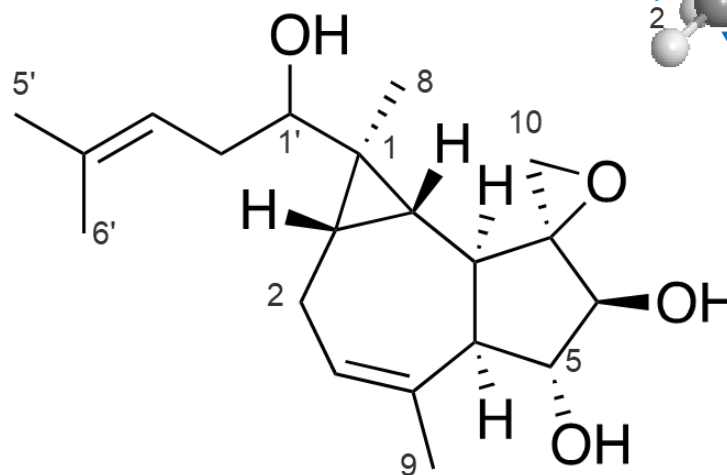
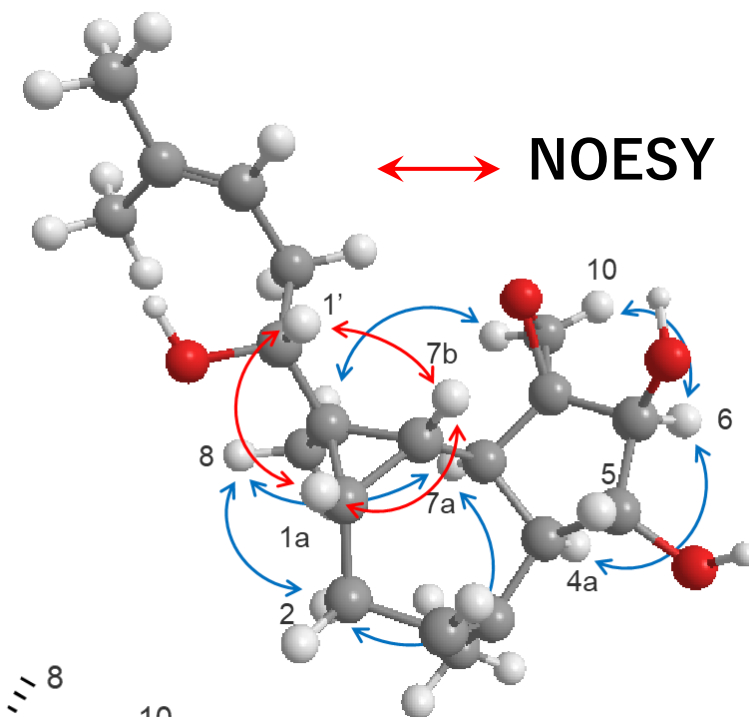
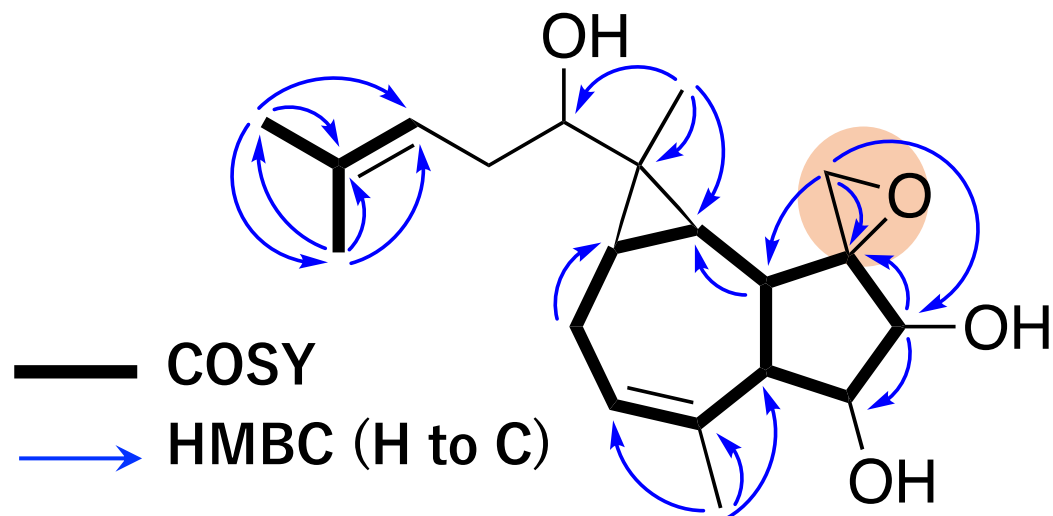
HR ESI-MS

Negative

m/z 369.1802 $[M + Cl]^-$

$C_{20}H_{30}O_4Cl$ ($\Delta = -3.1$ mDa) $\rightarrow$ **$C_{20}H_{30}O_4$** (CycA: $C_{20}H_{30}O_3$)

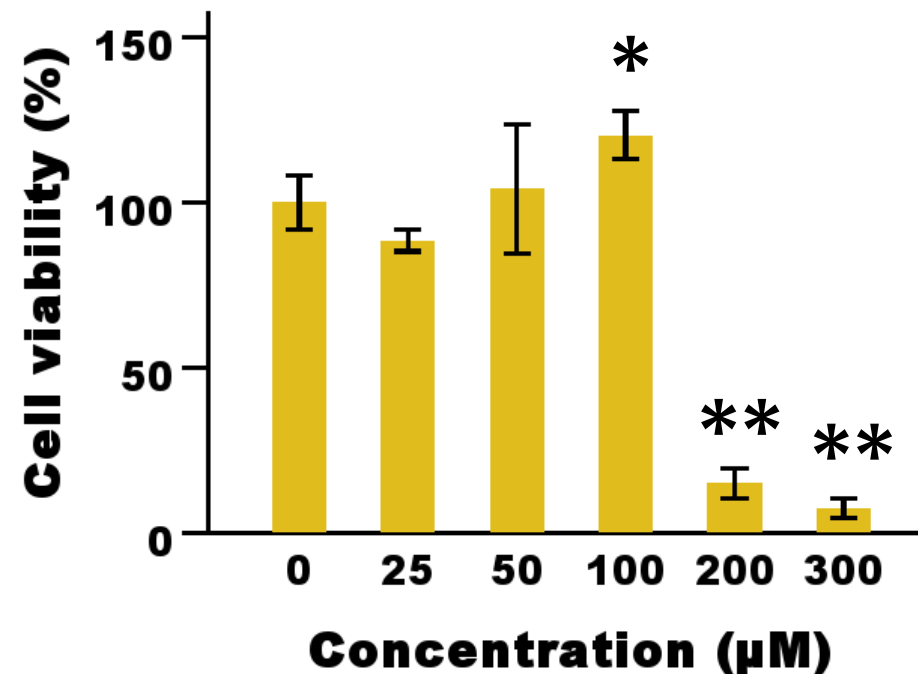
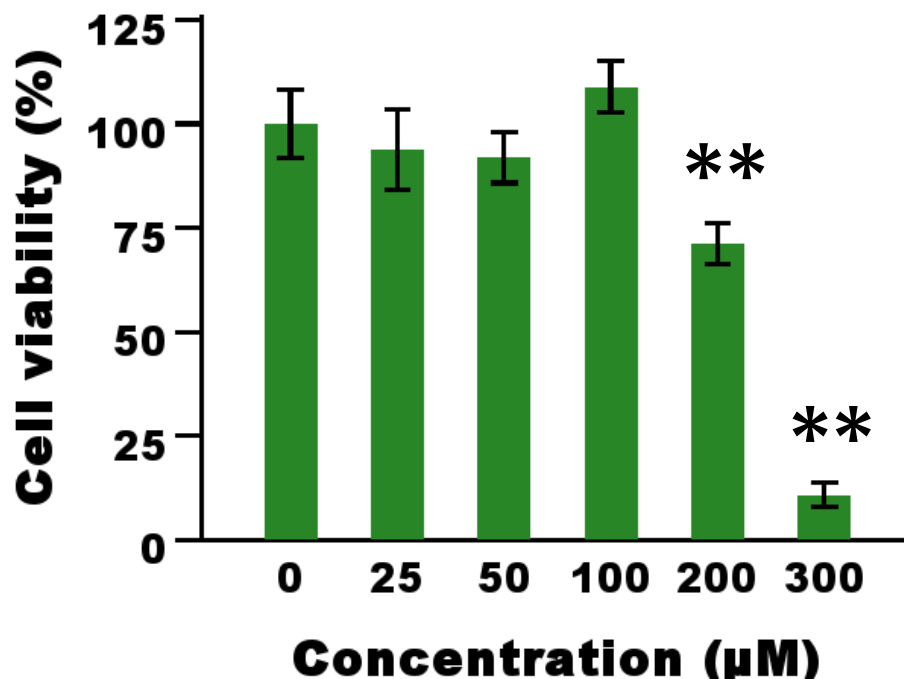
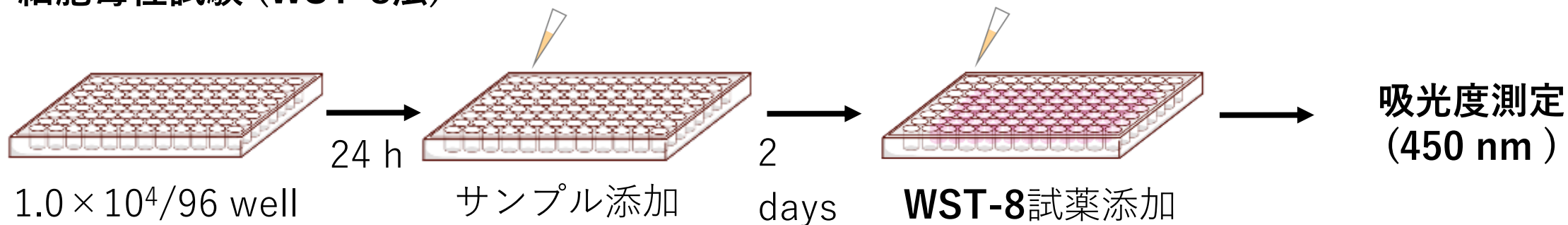
NMRおよび2D NMR



Cyclocircadin B (CycB)

レポーター細胞に対する細胞毒性

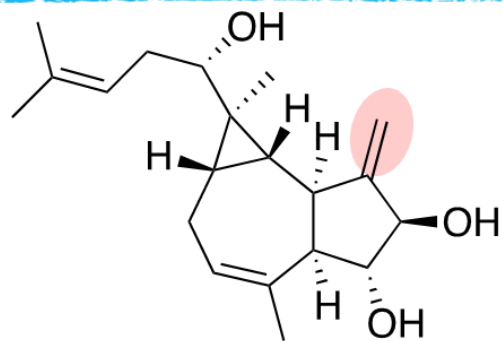
細胞毒性試験 (WST-8法)



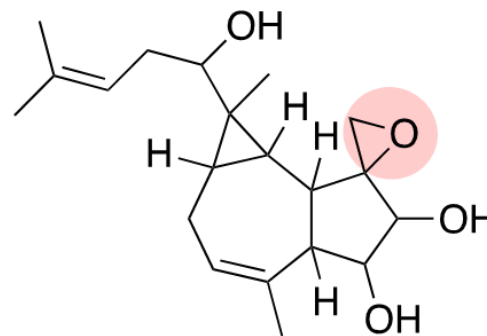
Means ± SE,
*P < 0.05,
**P < 0.01

CycAおよびBは100 μM以下の濃度で細胞毒性を示さなかった

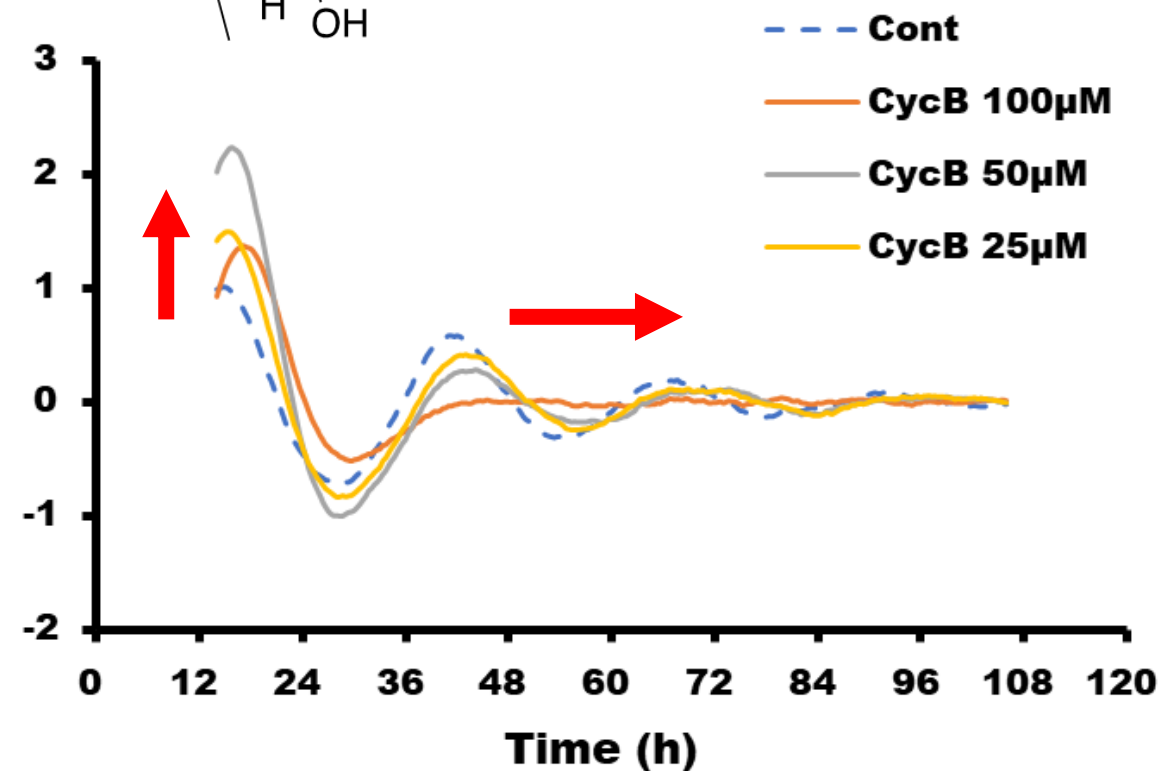
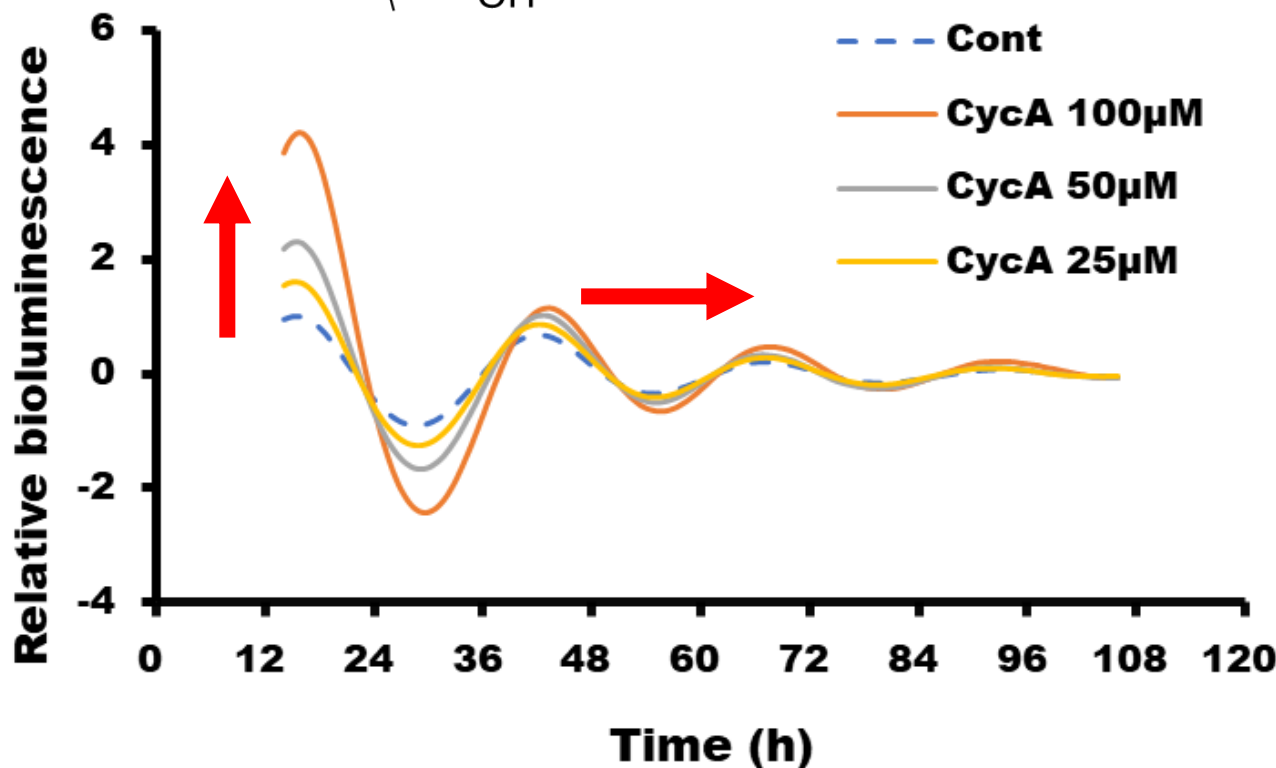
概日リズムに対する濃度依存的な影響



Cyclocircadin A

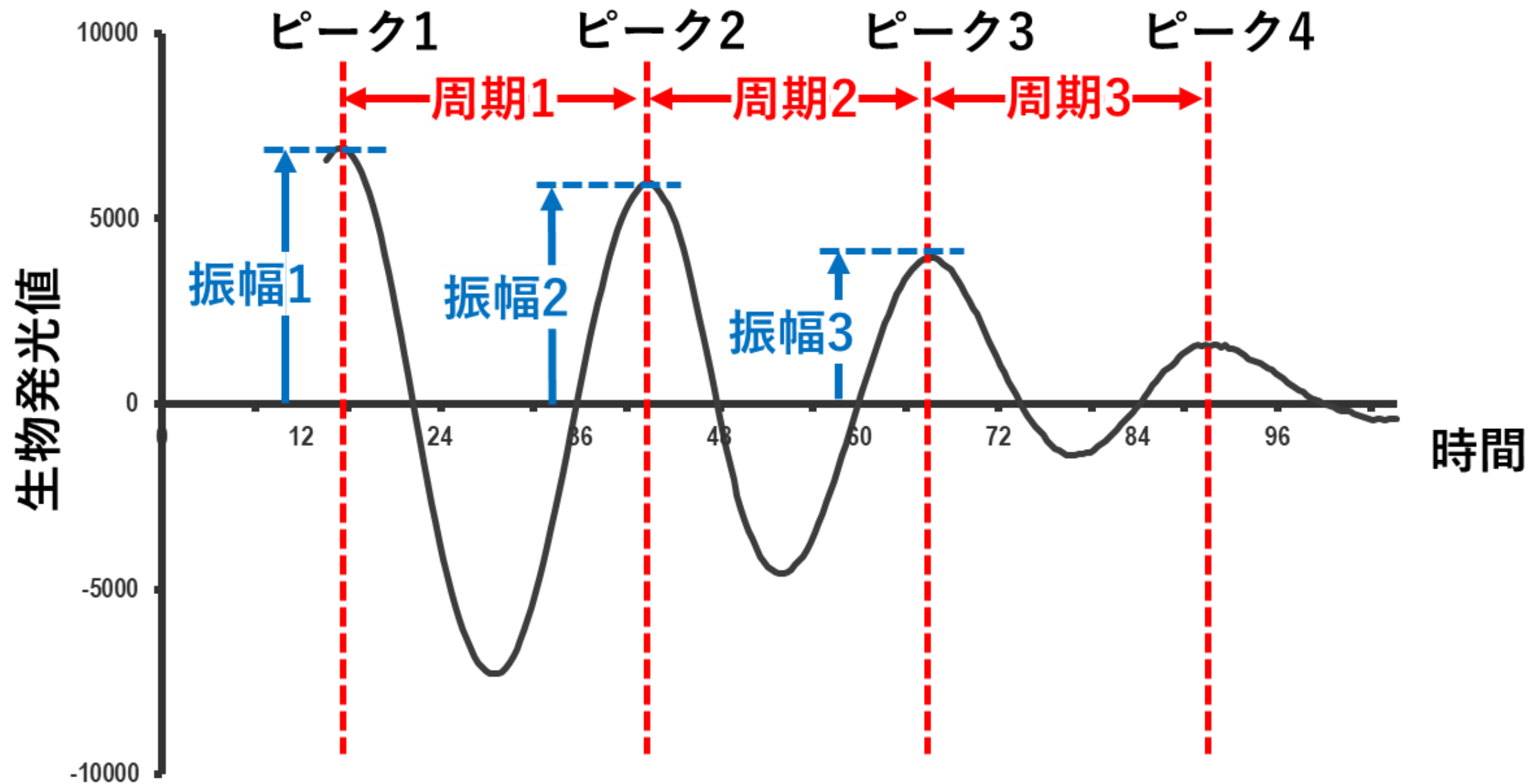


Cyclocircadin B

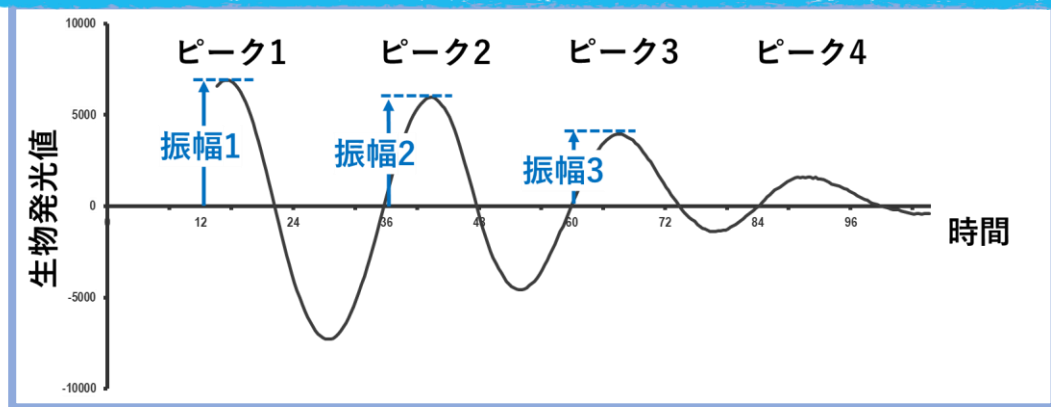


CycAおよびBはそれぞれ100 および 50 μM から概日リズムを変動させた

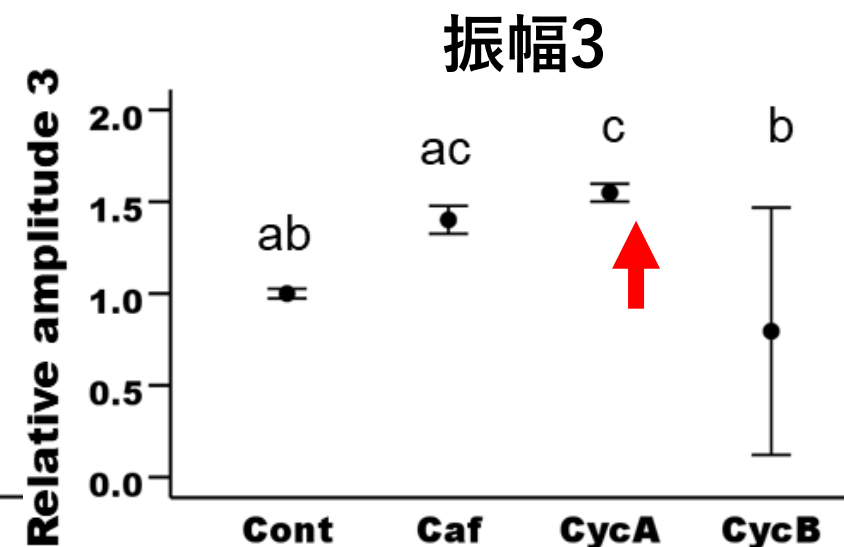
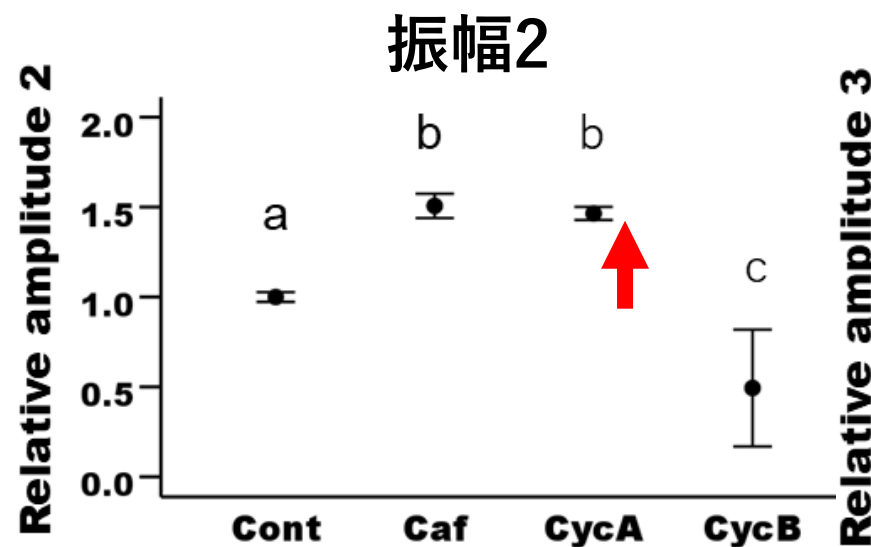
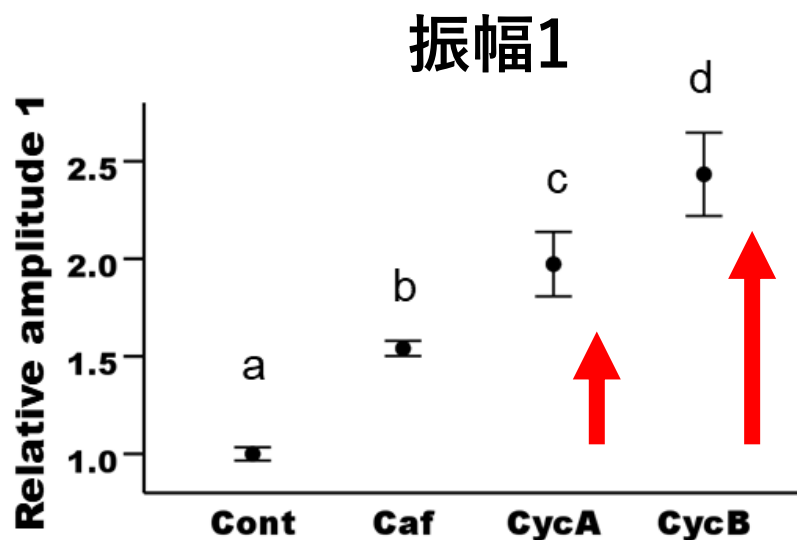
概日リズムの評価項目



CycAおよびBによる振幅への影響

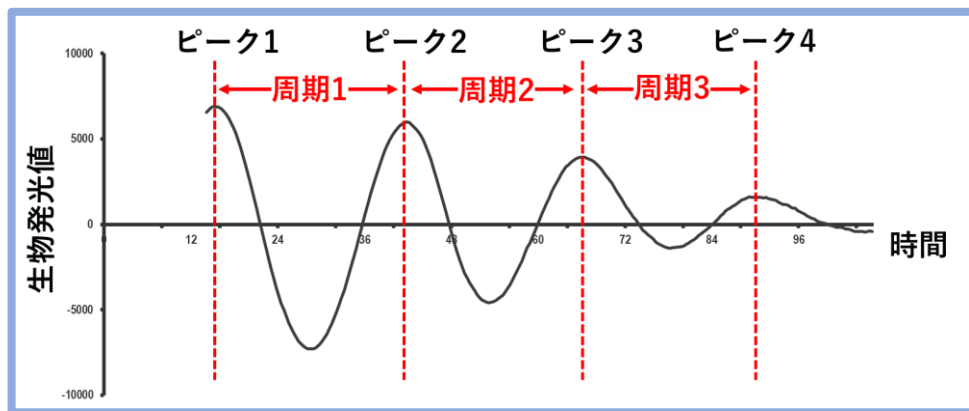


Means $\pm$ SE, $P < 0.05$ (Different letters)



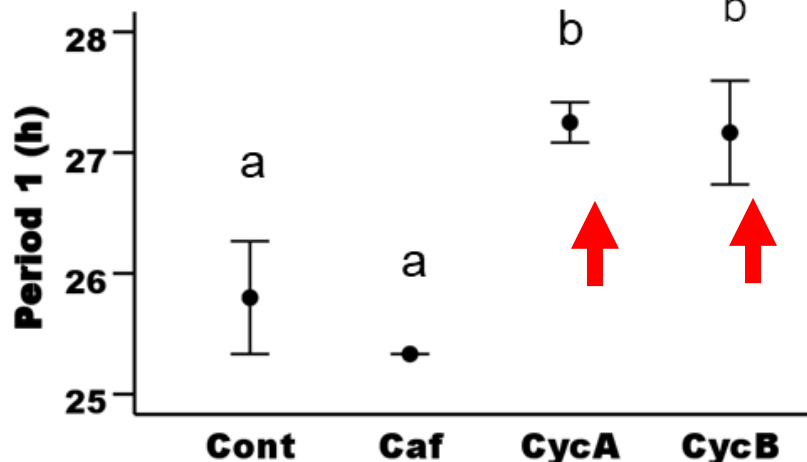
- CycAおよびBは概日リズムの振幅を有意に増大させた
- CycAは振幅に対して長期的に作用した

CycAおよびBによる周期への影響

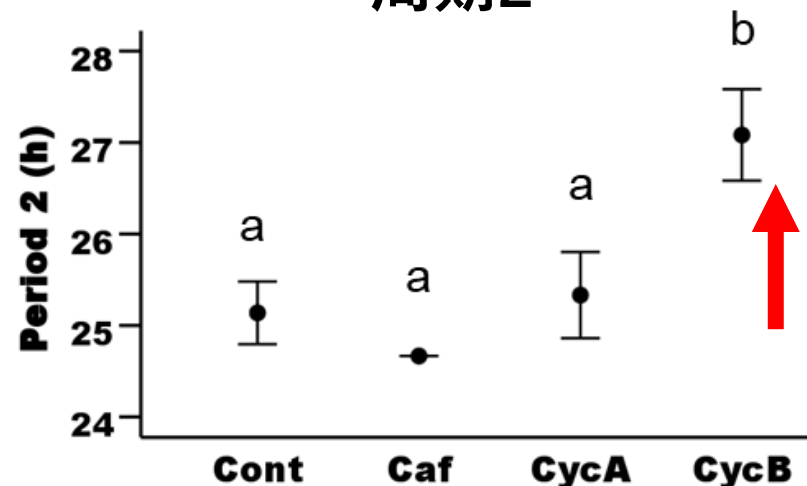


Means $\pm$ SE, $P < 0.05$ (Different letters)

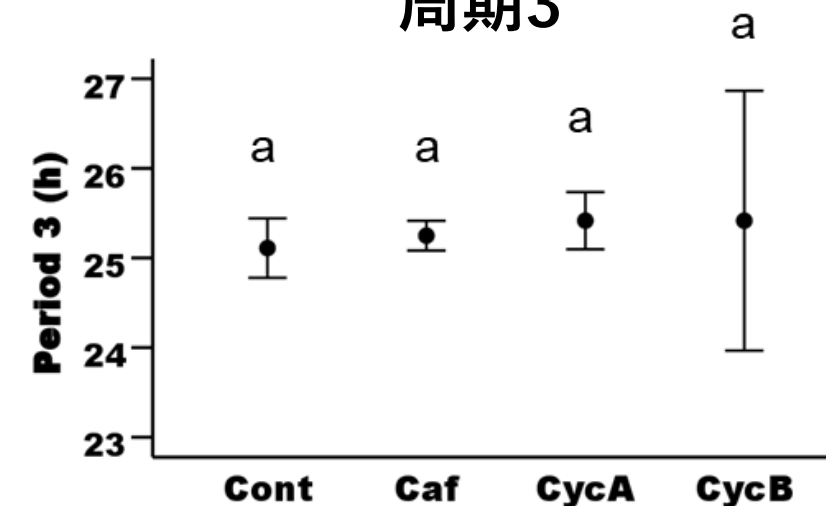
周期1



周期2

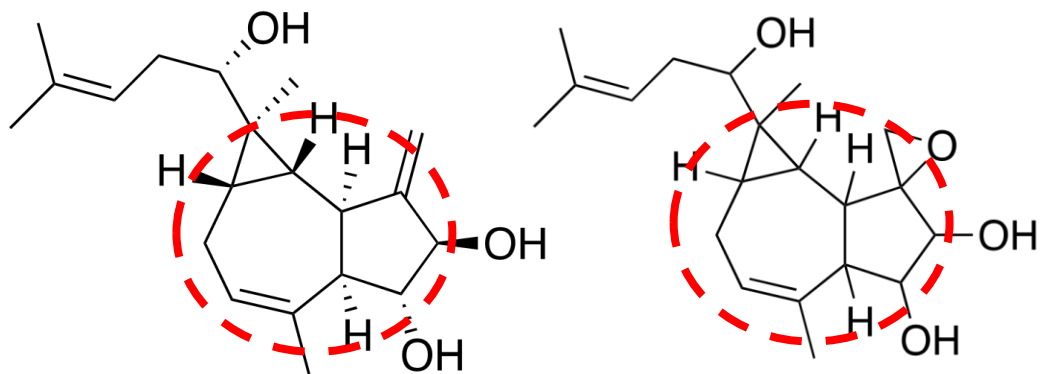


周期3

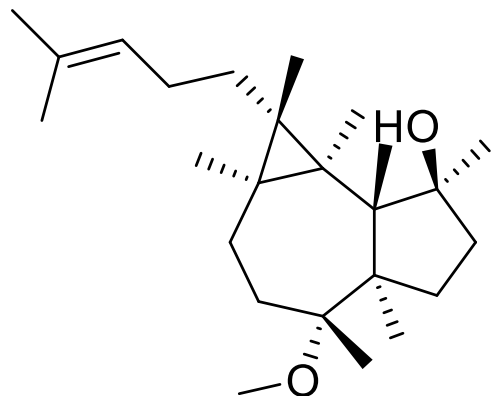


- CycAおよびBは概日リズムの周期を有意に延長させた
- CycBは周期に対して長期的に作用した

CycAおよびBの特徴



3, 7, 5員環を持つユニークなジテルペノイド



抗菌活性

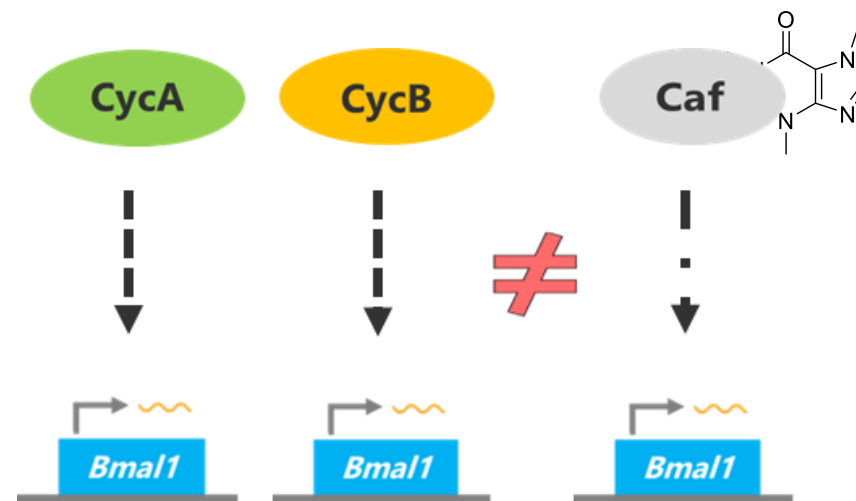
Gijsen et al. (1995)

抗真菌活性 など

Yan et al. (2021)

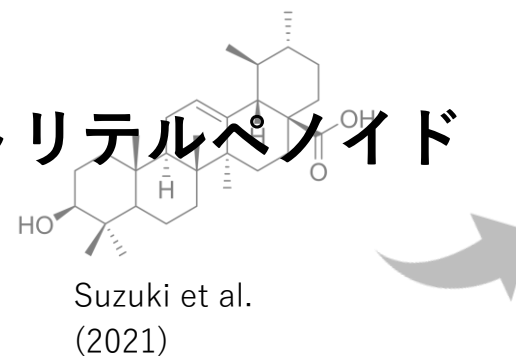
アロマデンドラン型化合物

防御物質として蓄積している可能性

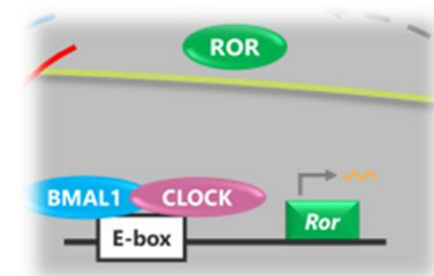


概日リズムへの異なる作用機序

トリテルペノイド



Suzuki et al.
(2021)



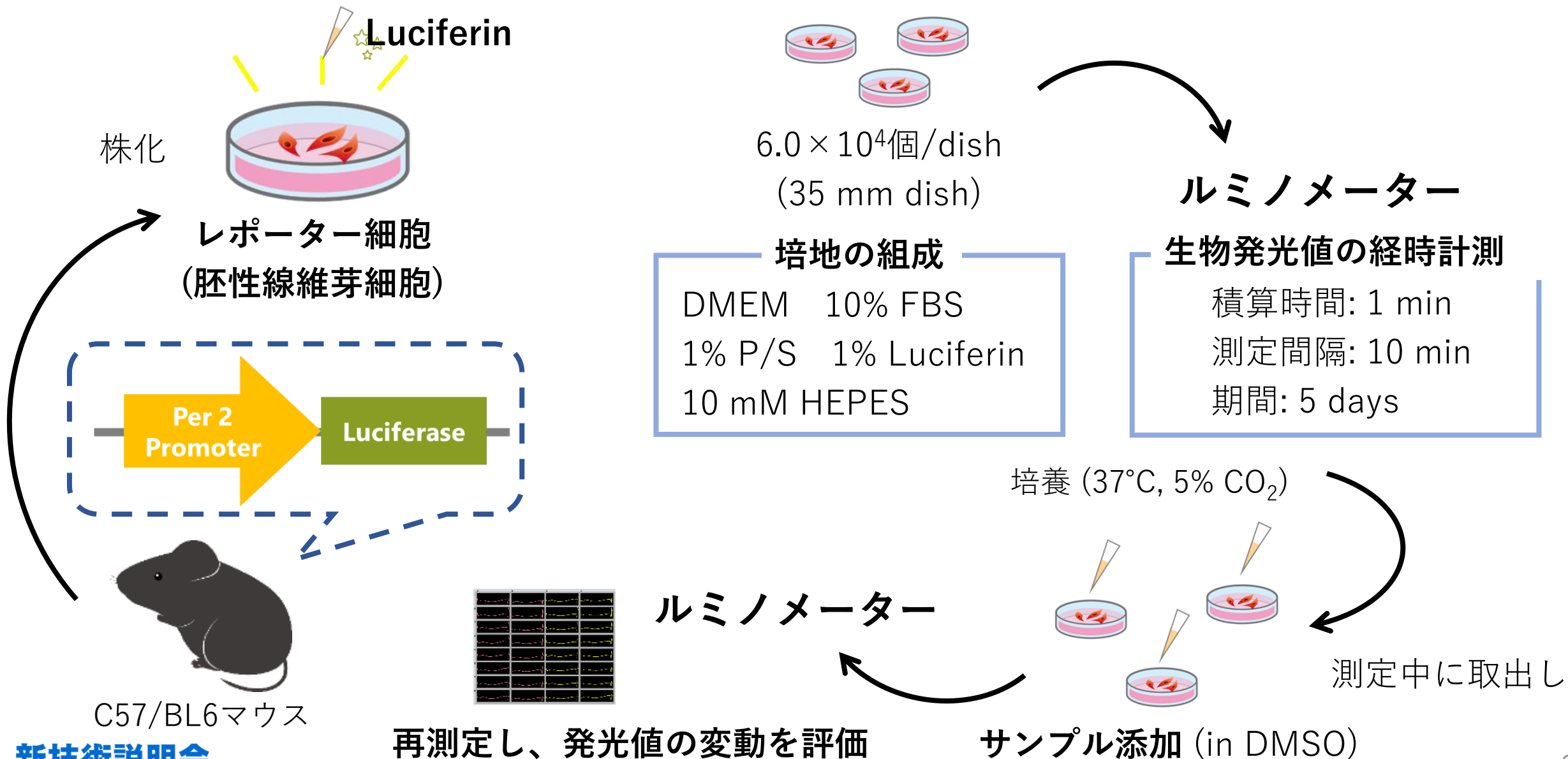
RORに直接結合

作用機序の解明が必要

シクロサイベリドの発見



概日リズムの測定方法（途中添加）



ツチナメコ近縁種からの化合物精製



培養ろ液を抽出

Cyclocybe cf. erebia (TUFC: 30219)

Cyclocybe cf. erebia (5 L, 103 days)

分配抽出

(Ethyl acetate/Water)

有機層 (2.75 g)

シリカゲル C.C.

Acetone in Hexane (0-100%)

40% ACT 画分 (1.39 g)

ODS C.C.

Methanol in Water (20-100%)

60% MeOH 画分 (372 mg)

HPLC (ODSカラム)

29-50% グラジエント

Acetonitrile in Water

化合物 3 (4.8 mg, Rt. 23.5 min)

化合物 3 の構造解析

ESI-MS

Positive

m/z 231 $[M - OH]^+$

m/z 249 $[M + H]^+$

Negative

m/z 247 $[M - H]^-$

MW: 248

HR ESI-MS

Positive

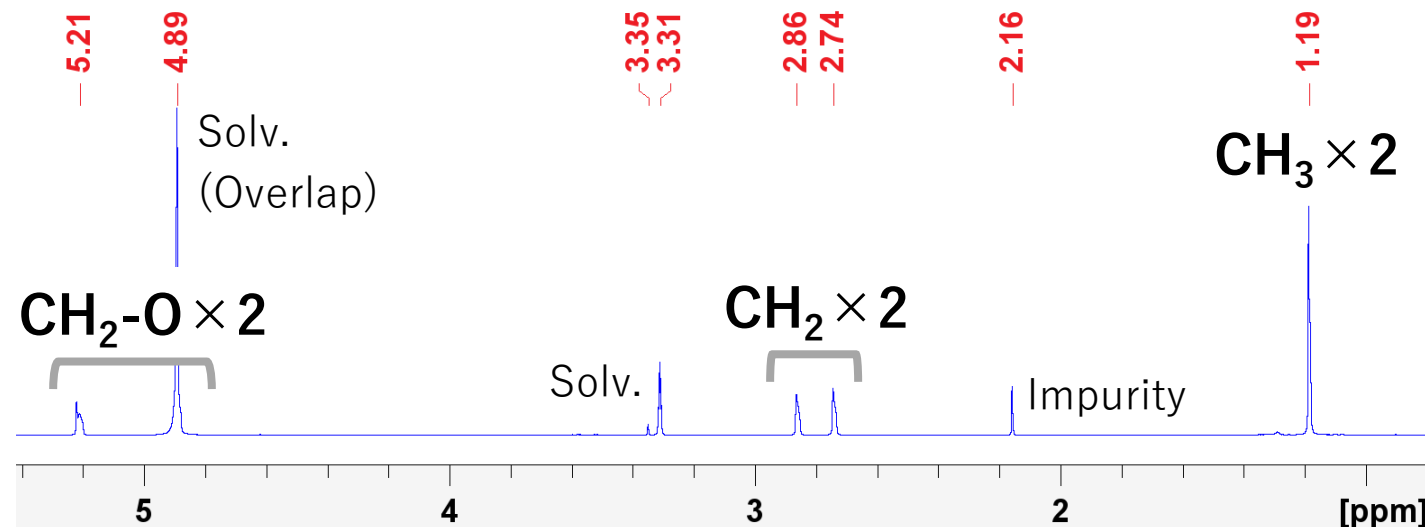
m/z 271.0952

$C_{14}H_{16}O_4Na$

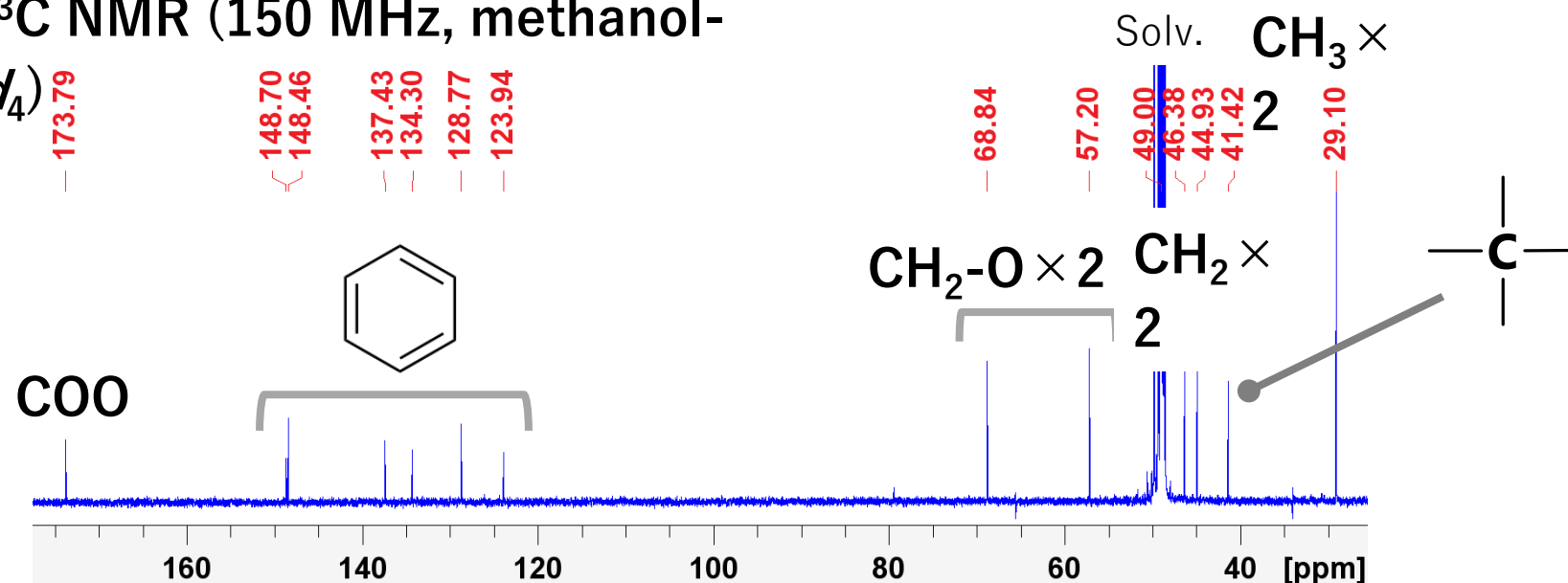
$\rightarrow \Delta = 0.006$

$C_{14}H_{16}O_4$

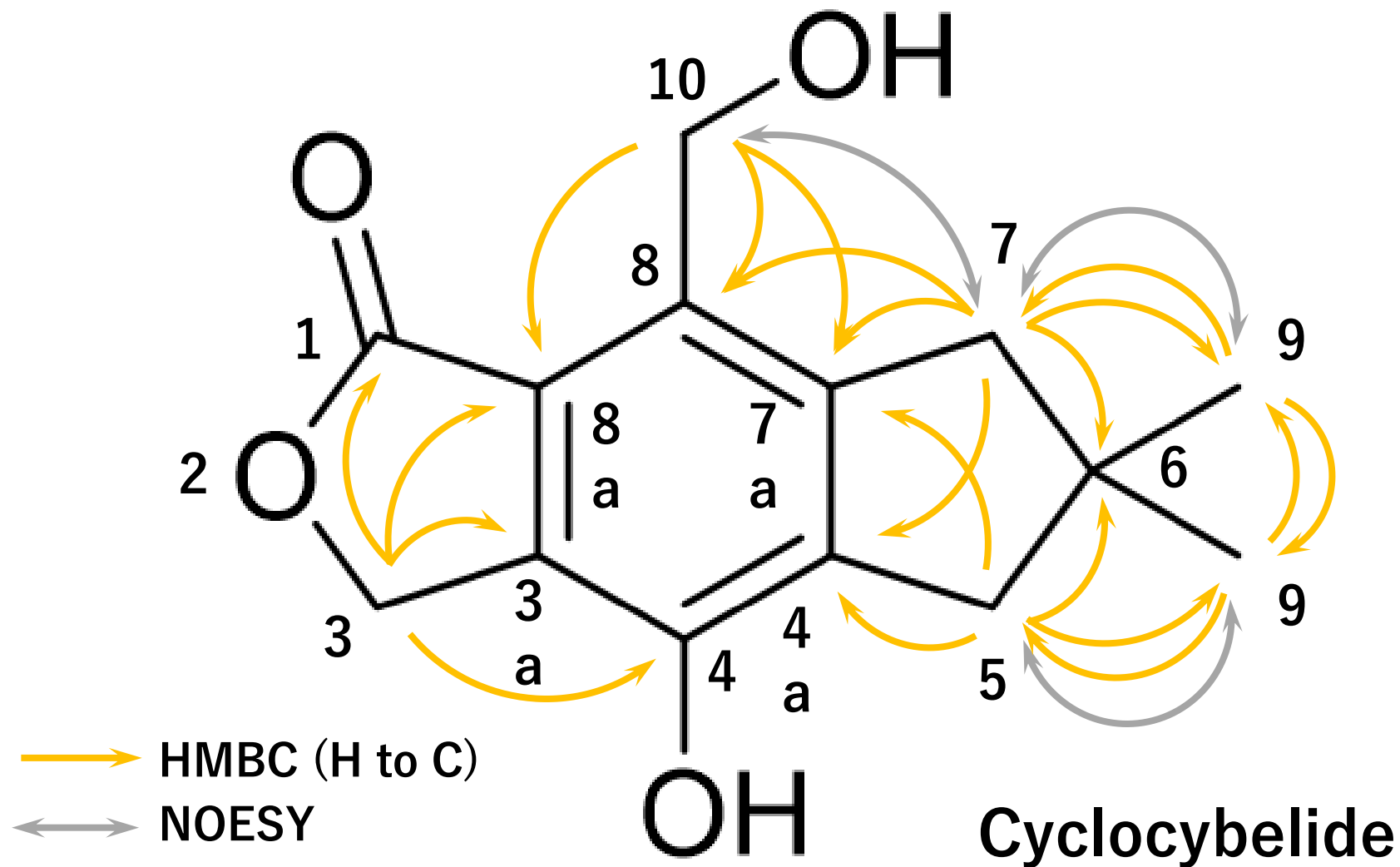
1H NMR (600 MHz, methanol- d_4)



^{13}C NMR (150 MHz, methanol- d_4)



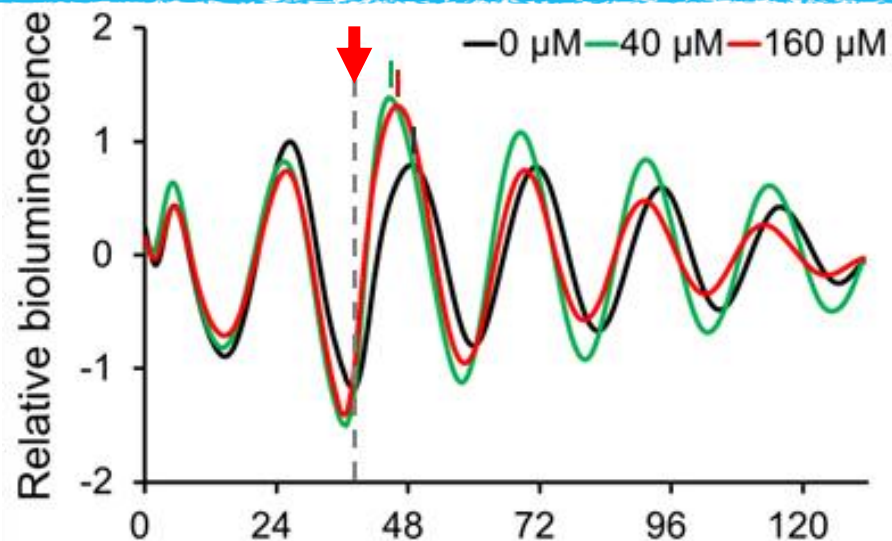
化合物 3 の構造解析 (2D NMR)



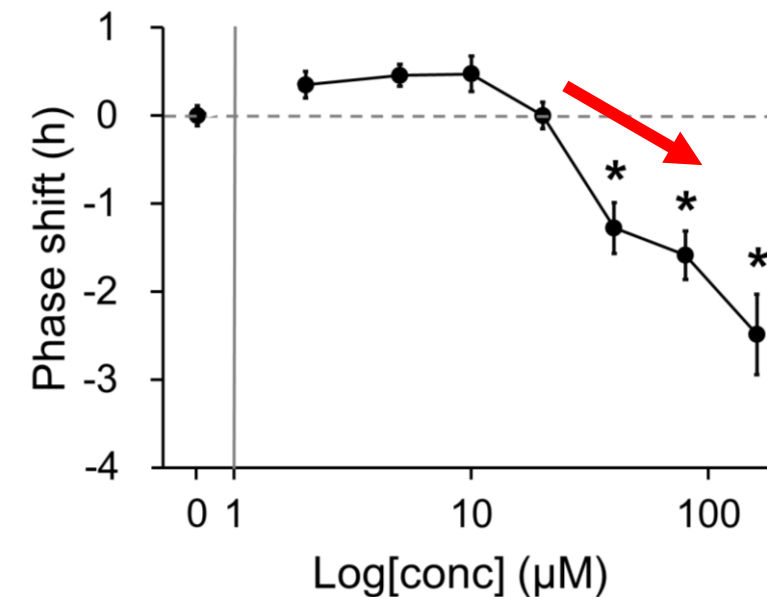
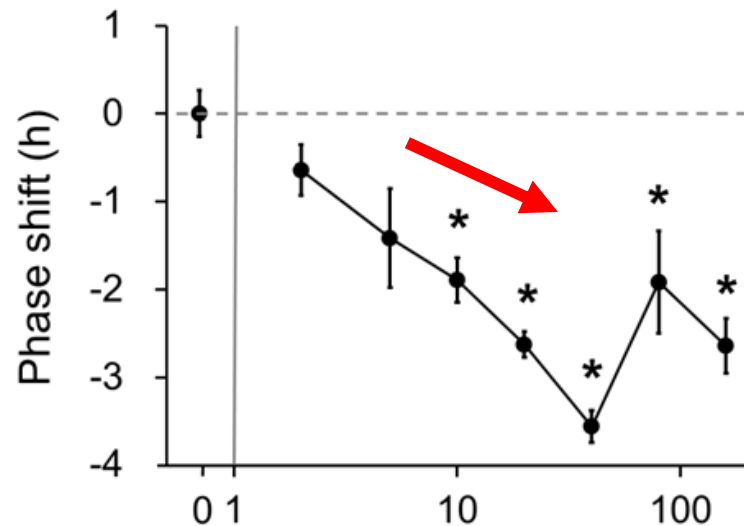
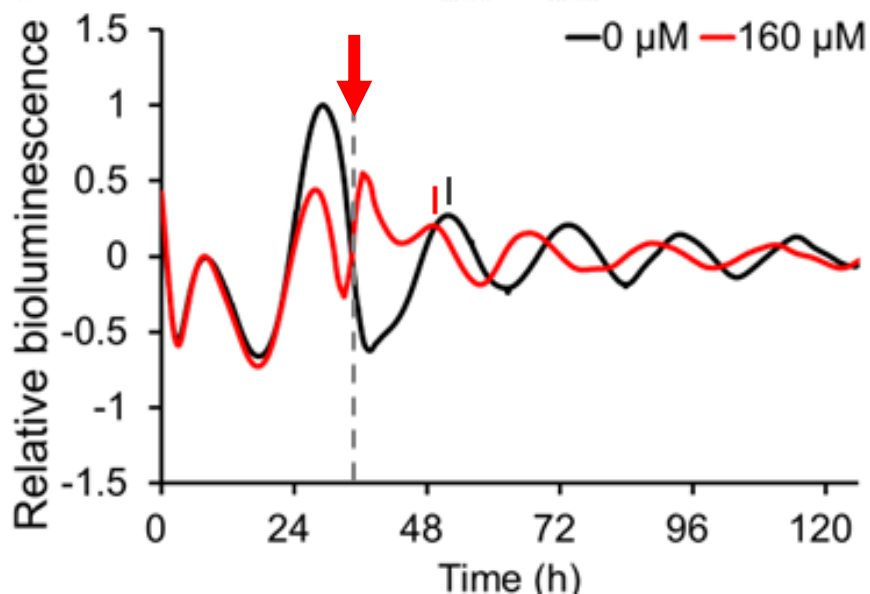
4-Hydroxy-8-(hydroxymethyl)-6,6-dimethyl-3,5,6,7-tetrahydro-1*H*-indeno[5,6-*c*]furan-1-one

Cyclocybelideの概日リズムの位相に対する影響

ボトム後添加



ピーク後添加



Mean $\pm$ SE
* $p < 0.05$
vs. 0 μM

Cyclocybelideの添加による振幅への影響

ボトム後添加

振幅1

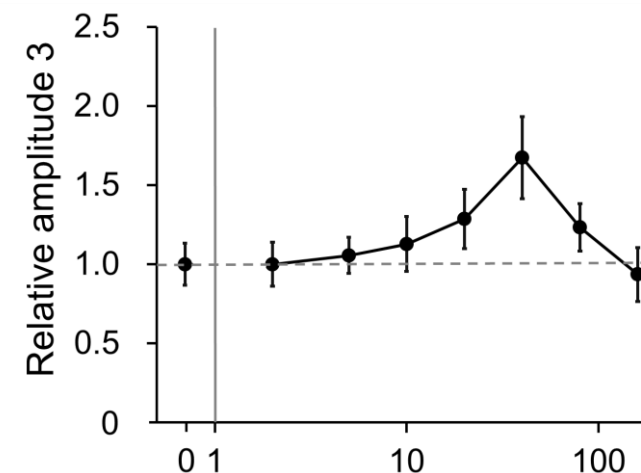
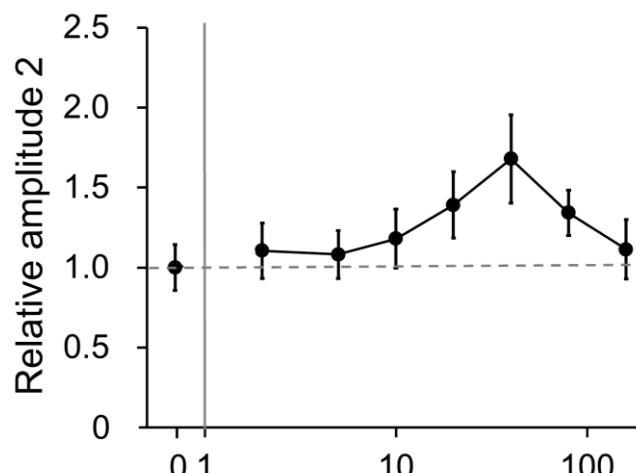
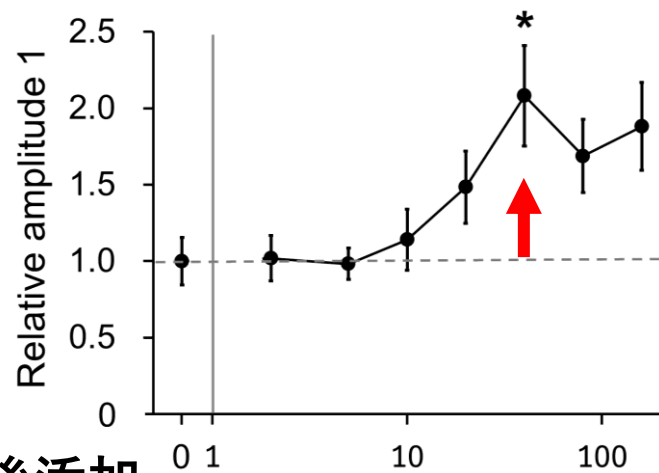
振幅2

振幅3

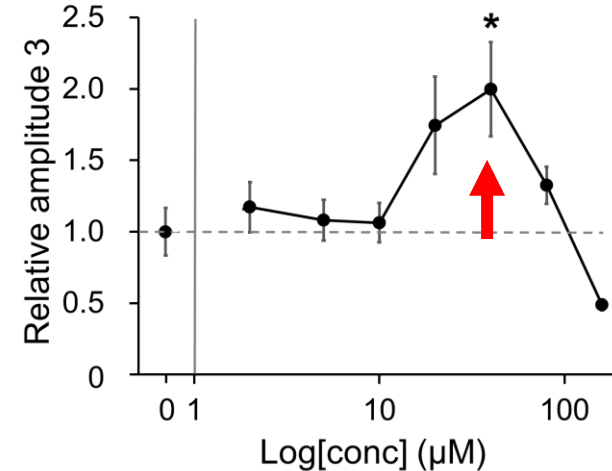
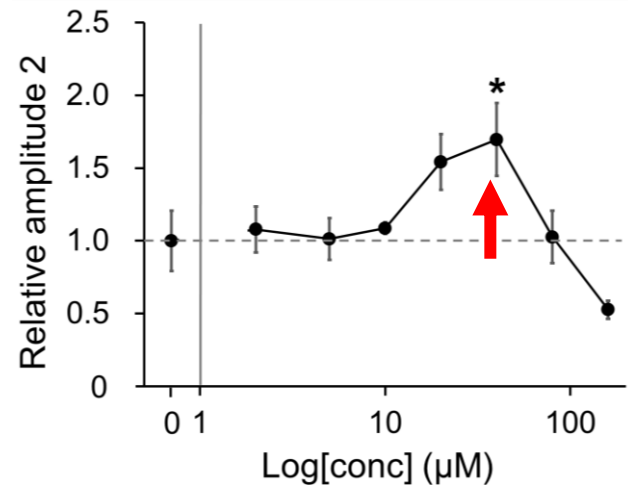
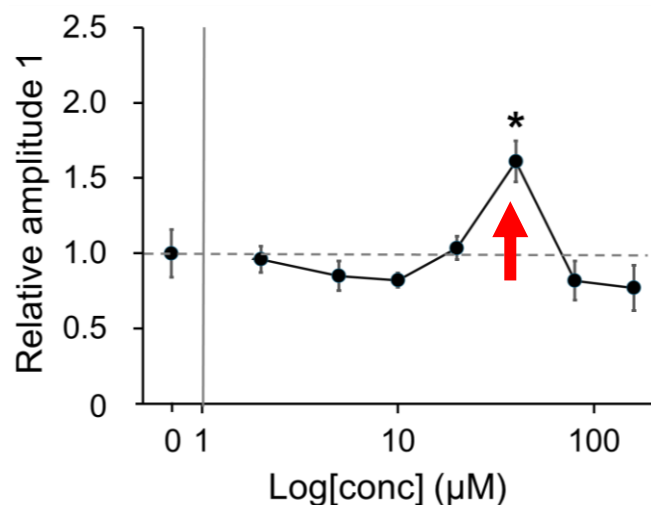
Mean $\pm$ SE

* $p < 0.05$

vs. 0 μM

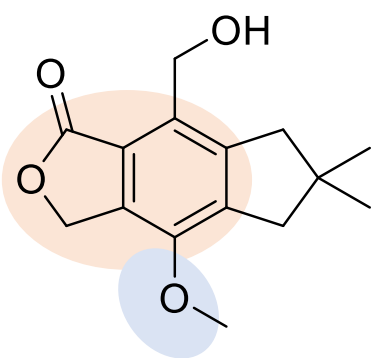
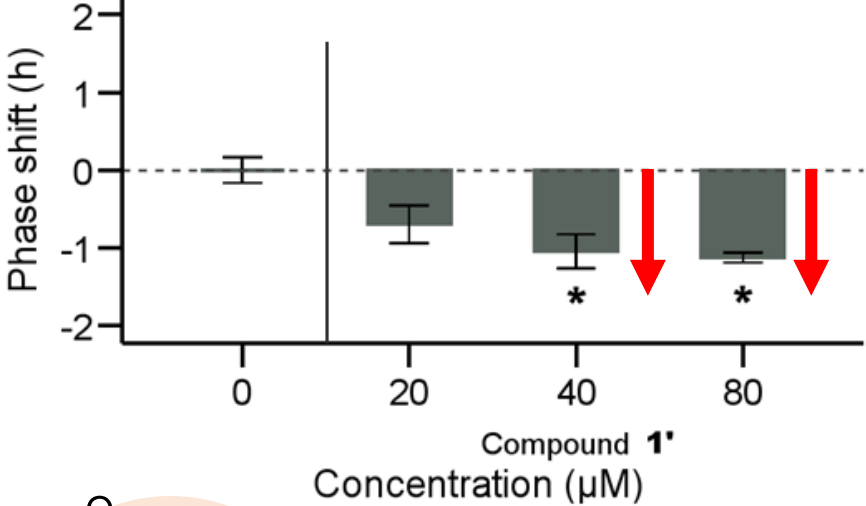
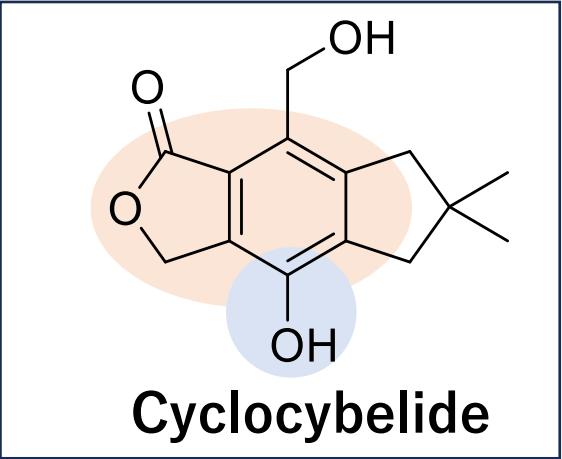


ピーク後添加

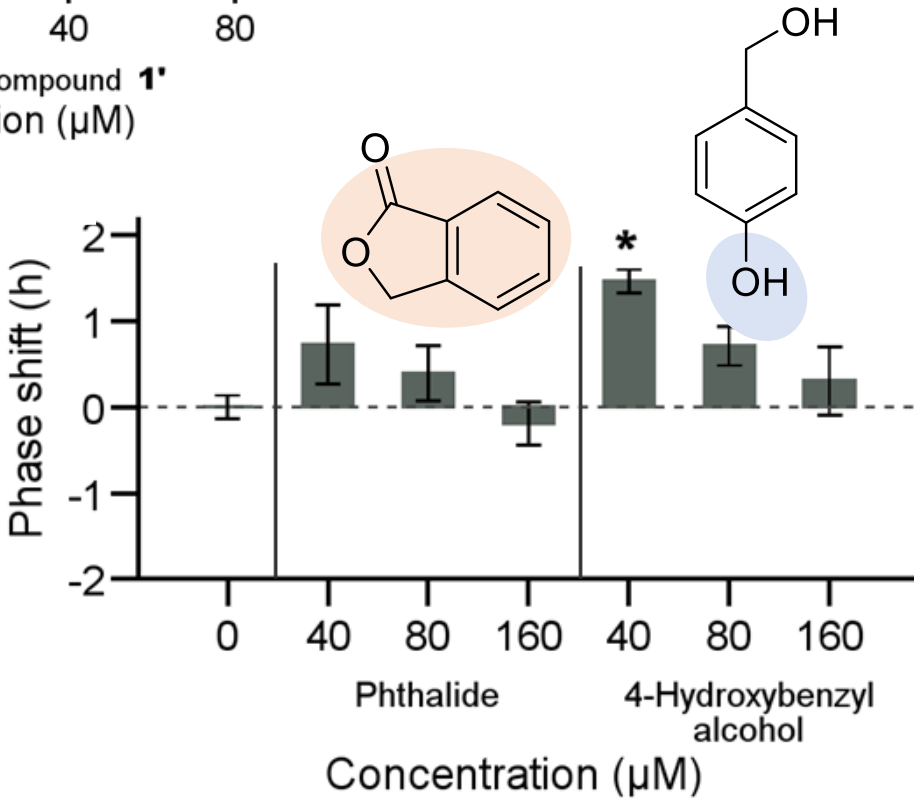
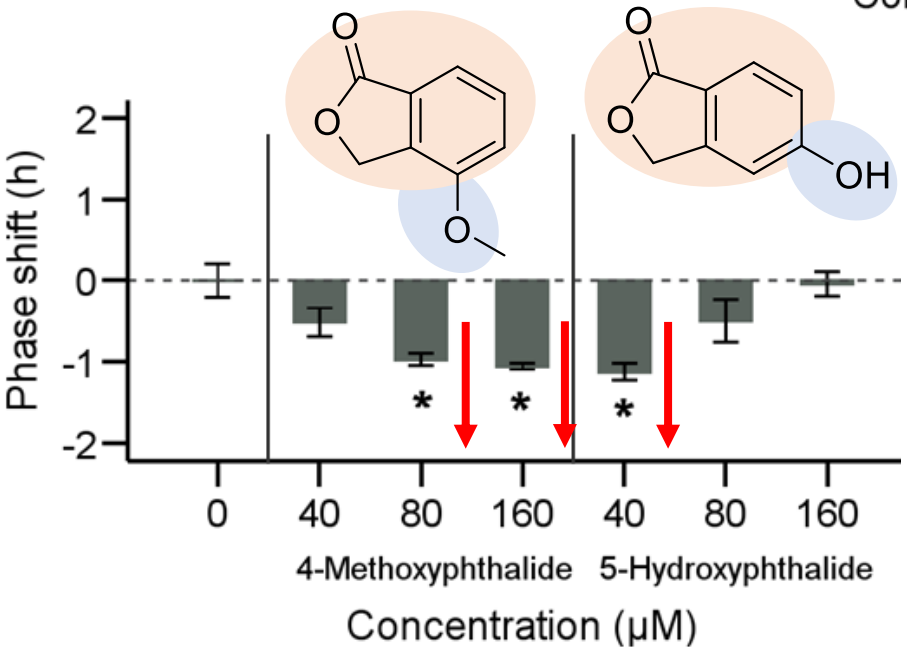


Cyclocybelideは添加タイミングに関わらず振幅を増大させた

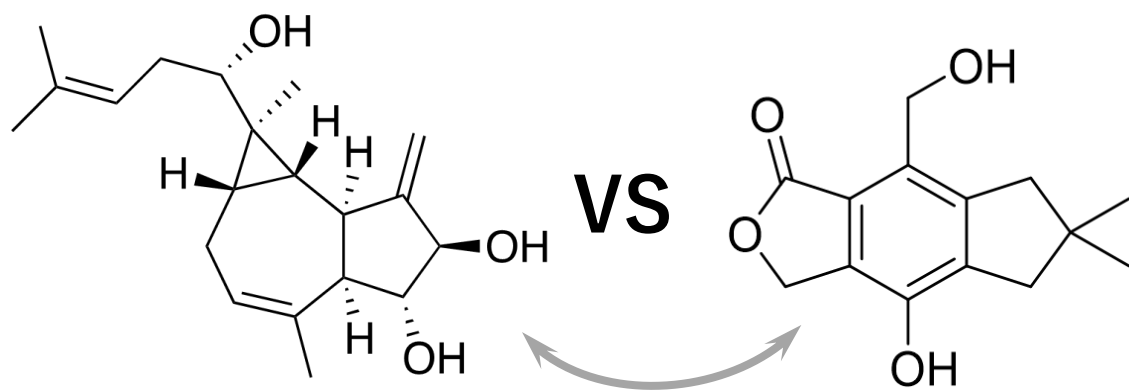
類似化合物の添加による概日リズムの位相に対する影響



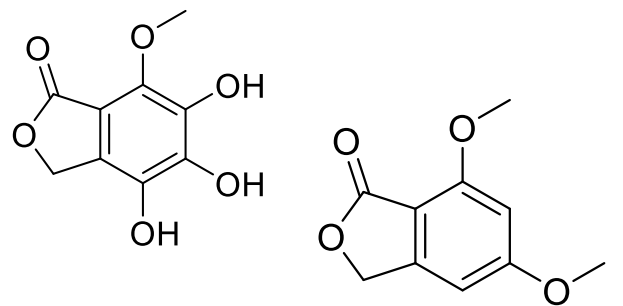
Mean ± SE
*P < 0.05
vs. 0 μM



Cyclocybelideの特徴



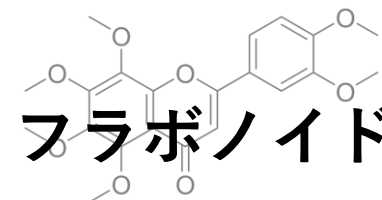
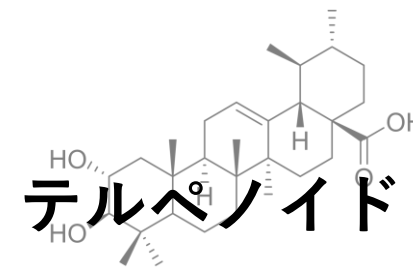
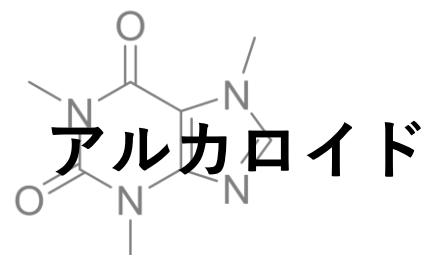
作用機序が異なる可能性



Yoshikawa et al. (2010)

抗酸化、抗菌、抗炎症…

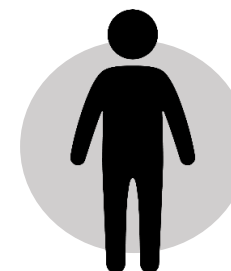
きのこの持つ生理活性物質の1つのグループ



位相前進物質の報告は少ない



Kudo et al. (2011)



概日リズム

遅らす…簡単 ○

早める…難しい △

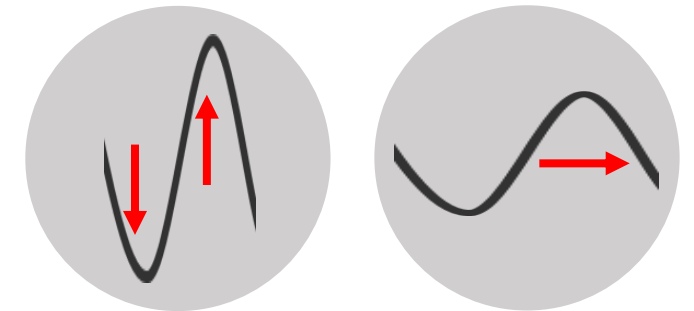
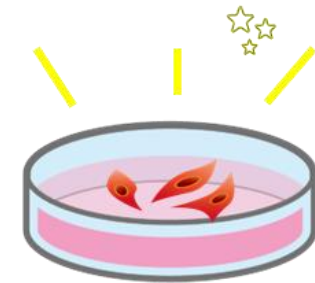
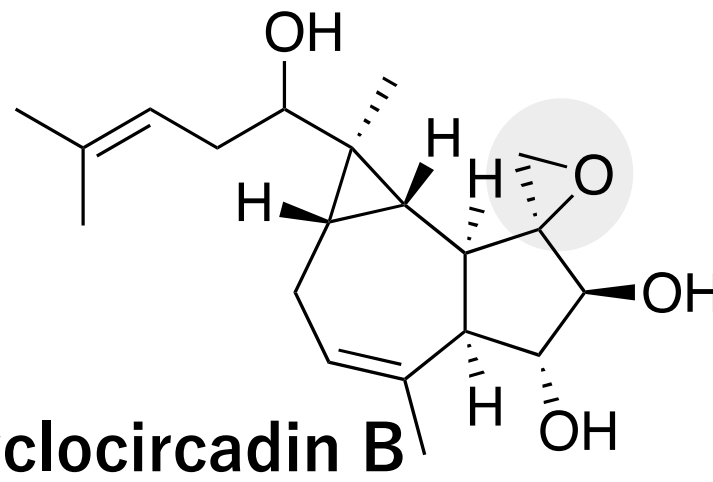
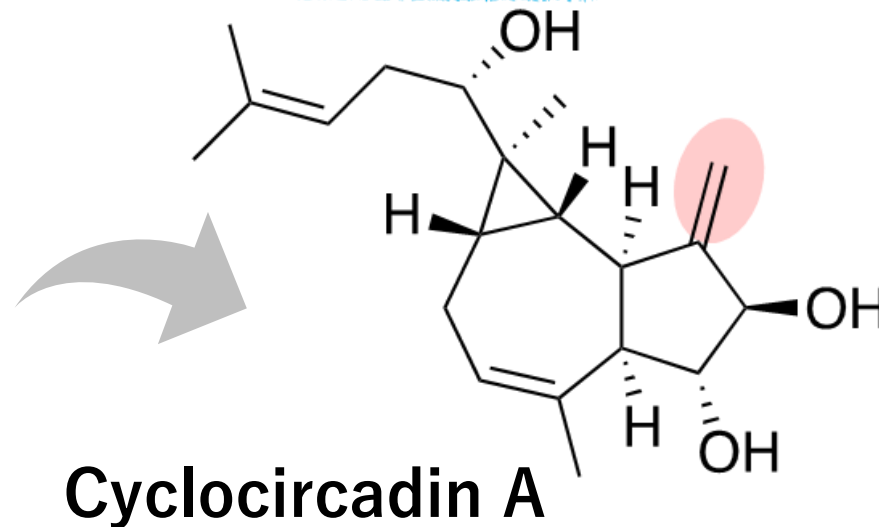


有用な位相前進物質

2種の新規ジテルペノイド



Cyclocybe erebia
(ツチナメコ)



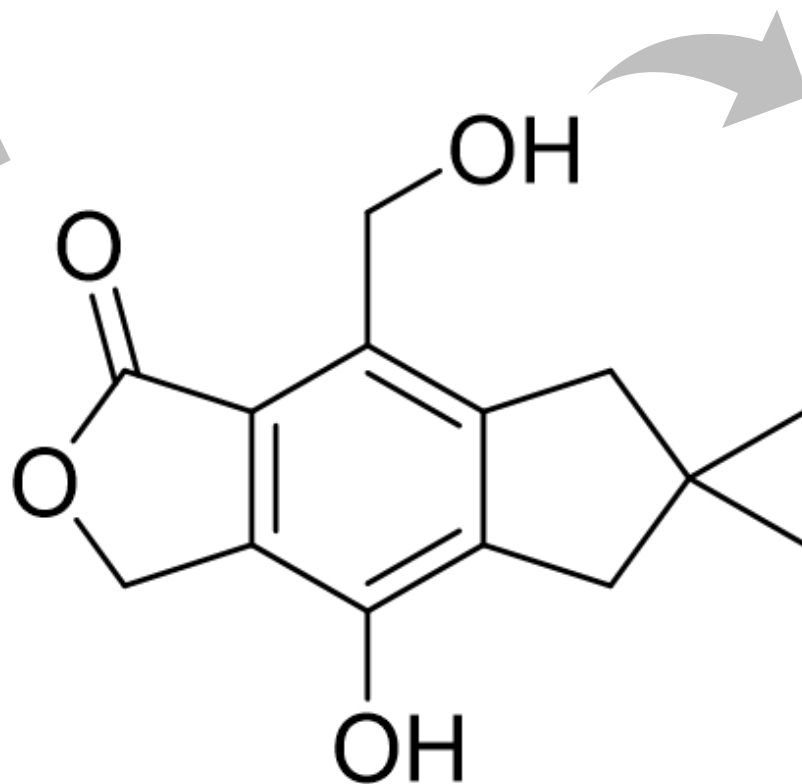
リズムの**振幅**・**周期**が変動

きのこから初めて概日リズムに作用する**2種の新規ジテルペノイド**を発見

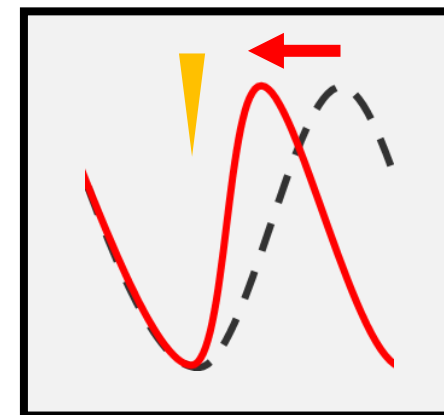
新規ラクトン化合物



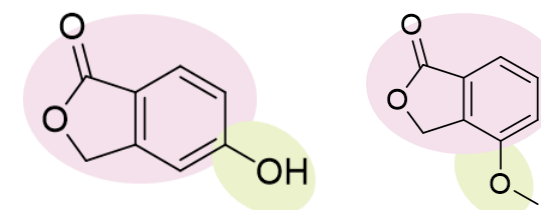
ツチナメコ近縁種



新規ラクトン化合物
Cyclocybelide



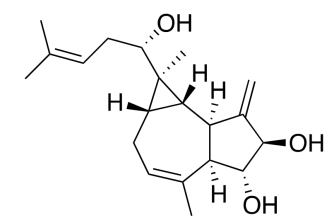
概日リズムの位相を**前進**



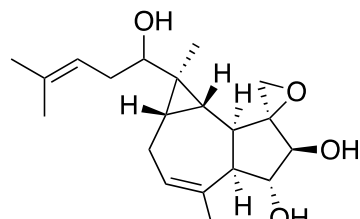
極性置換基を持つ
フタリド化合物に位相前進作用

近縁種から位相前進作用を有する**新規ラクトン化合物**を発見

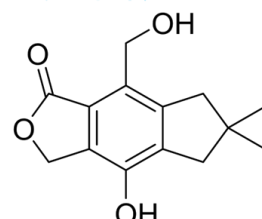
本研究で得られた意義・価値



Cyclocircadin A



Cyclocircadin B



Cyclocybelide

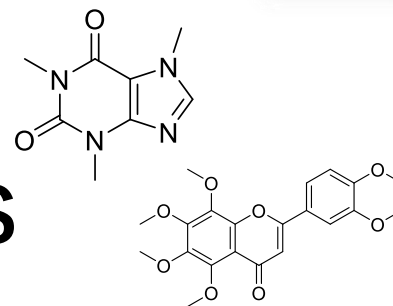


概日リズム調整物質の
応用範囲を広げる

食用きのこ

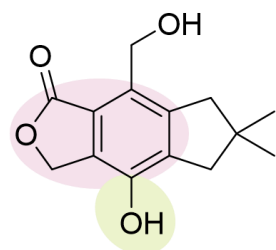
高い安全性

VS



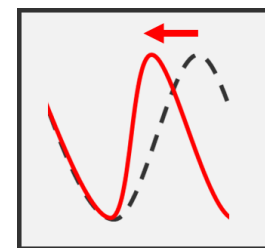
既存の調節物質

有用性が高い



構造が複雑でない

合成しやすい



位相の前進作用

貴重な調節物質

サプリメントや医薬品候補として大きな可能性がある

本研究技術に関する知的財産権

シクロサーカディン類

- ・ 発明の名称 : きのこと由来の概日リズム調整物質
- ・ 出願番号 : 特願2021-072719
- ・ 出願人 : 国立大学法人鳥取大学
- ・ 発明者 : 石原亨、一柳剛、西田直史

シクロシベリド

- ・ 発明の名称 : 概日リズム調節剤
- ・ 出願番号 : 特願2024-172086
- ・ 出願人 : 国立大学法人鳥取大学
- ・ 発明者 : 石原亨、小林雄晟

お問い合わせ先



国立大学法人鳥取大学
研究推進機構 研究戦略本部

T E L 0857 - 31 - 5546

F A X 0857 - 31 - 5571

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