

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450135

研究課題名(和文)新規オートファジー誘導物質(+)-エポジムノラクタムの構造と機能

研究課題名(英文)Structure and function of the novel autophagy inducer, (+)-epogymnolactam

研究代表者

生方 信(Ubukata, Makoto)

北海道大学・農学研究院・特任教授

研究者番号：60168739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー誘導物質(+)-エポジムノラクタム(1)の構造と機能を明らかにすることを目的に、1の全合成を8工程で達成し、合成物が1と一致する物理化学的ならびに生物学的性質を示すことを確認した。次に、1の鏡像体(-)-Epo、脱エポキシ誘導体Deepoxy、鎖状型誘導体N,N-Dimethyl、環化型誘導体O-Methyl、側鎖炭素数6の誘導体C6、側鎖炭素数8の誘導体C8を新たに合成し、1および脂肪酸合成阻害剤Cerならびに1の合成中間体Amide 8を加え構造活性相関研究を行った。活性発現には、天然型配置のエポキシ基、ラクタム構造、側鎖の長さ、二重結合の有無が重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：To determine the structural requirement of (+)-epogymnolactam (1) for its autophagy-inducing activity, we first synthesized 1 in 8 steps. We next synthesized enantiomer of 1 ((-)-Epo), deepoxy derivative (Deepoxy), linear analog (N,N-Dimethyl), cyclic analog (O-Methyl), analog having C6 side chain (C6), analog having C8 side chain (C8). Structure-activity relationship in these compounds, synthetic intermediate (Amide 8), cerulean (Cer), and 1 indicated the importance of (2R,3S)-epoxy group, lactam structure, length of side chain, and presence or absence of double bond for their biological activities.

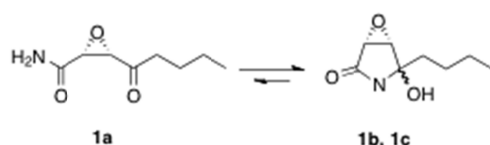
Cer inhibited autophagy in NIH 3T3 cells, and C6 and C8 analogs induced autophagy, whereas these two analogs inhibited the degradation of p62. These observations suggest that each molecular target for 1, Cer, and C6 or C8 should be different. The present study would contribute to the development of chemotherapeutic agents for the treatment of various incurable diseases.

研究分野：農学系創薬

キーワード：オートファジー エポジムノラクタム 全合成 構造活性相関 セルレニン

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、北海道で採取・分離した 37 菌株のキノコ培養菌糸体の酢酸エチル抽出物からメラノマ細胞に対する抗腫瘍物質の探索を行い、ヒルスタノール A を単離し、絶対配置の決定と生物学的性質を明らかにした。本化合物がオートファジー誘導活性を示すことに触発され、新たなオートファジー誘導活性物質の発見を目指し、新たに 27 菌株のキノコ培養菌糸体を用いたスクリーニングを行った。結果、モリノカレバタケ (*Gymnopus* sp.) の菌糸体培養物から新規オートファジー誘導物質 (+)-エポジムノラクタム (1) を単離構造決定することに成功した (図 1)。



鎖状型

環化型

図 1. (+)-エポジムノラクタム (1) の化学構造

オートファジーは、細胞内飢餓対応や細胞内に損傷を受けた細胞小器官や異常タンパク質が蓄積された際に発動される細胞内レスキューシステムとして知られている。さらに異常なタンパク質や細胞小器官が細胞内に蓄積することで、それに由来すると考えられる神経変性や腫瘍化を防ぐためにも重要であることが分かってきた。また、細胞内病原菌の除去という予想もしなかった機能も発見され、最近では、ついにオートファジー関連遺伝子 (ATG 遺伝子) に変異を持つヒト疾患 (乳がん、卵巣がん、大腸がん、クローン病、潰瘍性大腸炎、若年性パーキンソン病など) が見つかった。

我々は、1 の全合成と構造活性相関研究が、オートファジーを標的とした神経疾患などの難治性疾患治療薬の開発や、未だ謎が多いオートファジーの全容の解明に繋がると考え、本研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(+)-エポジムノラクタムの初の全合成を達成すること、(+)-エポジムノラクタムの構造とオートファジー誘導活性との相関研究を行うことにある。

### 3. 研究の方法

*cis*-2-Buten-1,4-diol を出発物質として、シャープレス不斉エポキシ化、ブチル基の導入、酸化反応、アンモノリシス、酸化反応を経た合成計画を立てた。当初、バッチ法以外にエピメリ化の防止や収率向上などで良い感触を得ていたフローケミストリーを組み込むことを計画していたが、スケールアップや汎用性を考慮して、先行していたバッチ法を採用した。全合成に使用した方法を応用し

て、鏡像体、脱エポキシ誘導体、鎖状型誘導体、環化型誘導体、側鎖誘導体をそれぞれ合成し、マウス胎児線維芽細胞 NIH3T3 に対するオートファジー活性を、オートファジーマーカーである LC3-II の増加、ならびにオートファゴソームの内部に取り込まれた p62 タンパク質の分解を、ウエスタンブロッティング法により定量することで評価した。

### 4. 研究成果

*cis*-2-Buten-1,4-diol を原料として、光学活性なエポキシアルコール 3 を得る合成法を検討したが、いずれも効率性ならびに、高い光学純度を持つ 3 を合成するためには難があった。そこで、まずモノベンジル体 2 のシャープレス不斉エポキシ化により得られる 89% ee の光学純度をもつエポキシアルコール 3 に対して、リパーゼを用いた速度論的光学分割を試み、混入する鏡像体を除去することにより光学純度の高いエポキシアルコール (+)-3 を得ることに成功した (図 2)。

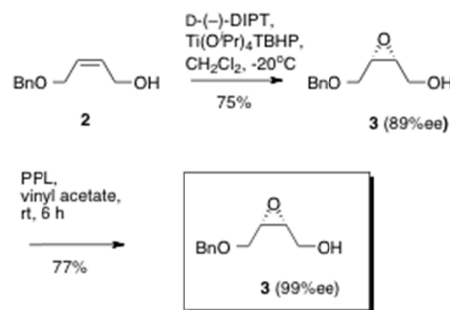


図 2. 光学活性エポキシアルコール 3 の合成

合成した 3 を TEMPO 酸化によりアルデヒド 4 とし、Grignard 反応によりブチル基を導入した。得られたエポキシアルコール 5 を Pd/C

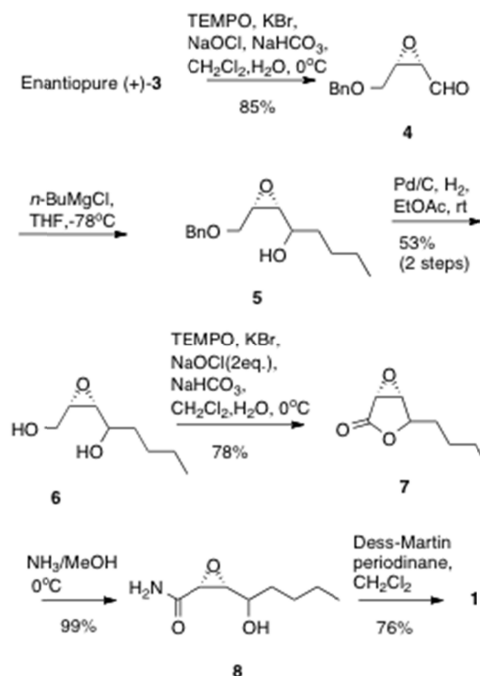


図 3. (+)-エポジムノラクタムの初の全合成

を触媒として加水素分解し、ジオール6を得た。ジオール6を2当量のNaOCl存在下TEMPO酸化することで、エポキシラクトン7を合成した。アンモノリシスによりアミドアルコール8、次いでDess-Martin酸化により所望の1の全合成に成功した(図3)。

合成した1は天然から得られた1と同様、図1に示したように、重メタノール中で鎖状型(1a)と2種類の環化型(1b, 1c)の互変異性体として存在することを確認し、詳細なNMR解析を行った。

活性面で興味深かった現象として、1はポジティブコントロールであるラパマイシン(Rap)と同様、オートファジーマーカーであるLC3-IのLC3-IIへの変換を誘導し、後期のオートファジーマーカーであるp62タンパク量を減少させる傾向を示したのに対し、側鎖の構造が異なり脂肪酸合成阻害剤として知られているセルレニン(Cer)は、LC3-IからLC3-IIへの変換をむしろ減少させ、p62タンパク質の量を増加させた。

1の持つエポキシ基の立体化学の意義、側鎖の長さの意義、飽和側鎖であることの意義、環化型と鎖状型のどちらが活性に関与しているかを明らかにすることを目標として、オートファジー誘導に必要な構造要求性を検討することとした。

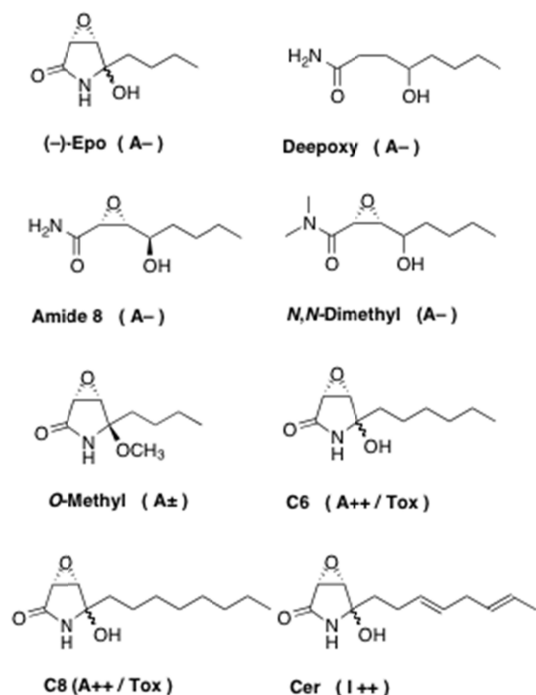


図4. エポジムノラクタムの構造活性相関  
(+)-Epo (1)のオートファジー誘導活性(A++)を基準、  
A-: 活性なし、A±: 微弱な活性、  
A++/Tox: 生細胞に活性有/高濃度で細胞毒性、  
I++: オートファジー阻害活性

この目標を達成するため、鏡像異性体である(-)-エポジムノラクタム((-)-Epo)、脱エポキシ誘導体である deepoxy analog

(Deepoxy)、鎖状型誘導体である *N,N*-dimethyl analog (*N,N*-Dimethyl)、環化型誘導体である *O*-methyl analog (*O*-Methyl)、側鎖炭素数6の誘導体 C6 analog (C6)、側鎖炭素数8の誘導体 C8 analog (C8)を新たに合成した。

得られた6種類の誘導体に加え、1およびCerならびに1の合成中間体であるAmide 8を加え、オートファジー誘導活性の評価を行い、図4に示す結果を得た。

結果として、以下のような結論と考察が導かれた。

- 1) 1の鏡像体である(-)-Epoと、脱エポキシ体であるDeepoxyはオートファジー誘導活性を示さなかった。このことは、1のエポキシ基の存在と天然型の絶対立体配置が必須であることを示している。
- 2) Deepoxy、Amide 8、*N,N*-Dimethylはいずれも溶液中で鎖状型を取り、オートファジー誘導活性を示さなかった。また、環化型しかとりえない*O*-Methylは、これらの鎖状型誘導体と比較するとわずかではあるがオートファジー誘導活性を示す傾向が見られた。

これらの結果は、1が環化体1bあるいは1cのうちどちらか一方、即ち、*O*-Methylとは側鎖付け根の立体化学が反対の環化型としてオートファジー誘導活性に寄与している可能性と、*O*-Methylと立体化学は同じだが、1の受容体に対し、遊離の水酸基がプロトン供与体として活性発現に寄与している二つの可能性があることを示唆している。

図1に示すように、1が溶液中で環化型を優勢な互変異性体としてとっていることと符合している。またCerが脂肪酸合成阻害の際に鎖状型を取り、恐らく脂肪酸基質中間体をミミックすることで阻害活性を発現すること(T. Ohno et al., *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 6, 387(1974))とは対照的に、1が環化型構造とCerにはないオートファジー誘導活性を持つことは興味深い。

ホスファチジルエタノールアミンは、LC3-IのLC3-IIへの変換に必須で、オートファゴソームの形成に物理化学的な環境を与える重要な分子と考えられており、1がこの分子をミミックしている可能性も捨てきれない。

- 3) 側鎖誘導体として、C6ならびにC8が細胞毒性を免れた細胞に対しオートファジー誘導を示した。

RégnacqらはCerによる脂肪酸合成阻害がオートファジー誘導阻害に繋がると結論づけており(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 477, 33 (2016))、我々の結果を支持している。

また、Morisakiらは、C8の脂肪酸合成阻害活性がCerと比較して低いことを報告している(*Eur. J. Biochem.*, 211,

111(1993))。

さらに、Songらは、過酸化水素水による酸化ストレスが網膜色素上皮細胞 RPE 中の P62 タンパク質のアップレギュレーションに繋がり、オートファジーを促進することを示した(*PLoS ONE*, **12**(2): e0171940 (2017))。

実際に、1 はオートファジーが誘導される条件では細胞毒性を示さず、p62 タンパク量を減少させる傾向を示したのに対し、C6 および C8 は p62 タンパク量を増加させる傾向にあり、かつ高濃度では細胞毒性が観察された。

この現象は明らかに 1 の細胞応答とも Cer の細胞応答とも異なっており、細胞への機能障害で誘起されるストレスにより、オートファジー誘導が引き起こされ、その後のオートファゴソームの形成と分解過程に阻害的な影響を与えている可能性も否定できない。従って、側鎖誘導体 C6 および C8 のオートファジー誘導活性は 1 が持つ本来のオートファジー誘導活性とは異なる様式で引き起こされたものと推定できる。

以上、我々は 1 の初の全合成と鏡像異性体を含む各種誘導体の合成に成功した。さらに、構造-活性相関研究により、オートファジー誘導活性には、1) 環状化したラクタム構造が必須であること、2) エポキシ基の存在と天然体の絶対立体配置がオートファジー誘導に必須であること、3) 側鎖の長さ及び二重結合の有無が活性発現に大きな影響を与えることを見いだした。

我々がオートファジー関連の論文(雑誌論文 1, 2, 4)を発表した後、大隅良典博士への 2016 年ノーベル生理学・医学賞の授賞が公表された。「オートファジーの仕組みの解明」への授与だが、オートファジーを標的とした有効な治療薬はまだ存在しない。また、詳しい作用機構の点で、不明な点も少なくない。今後、これらの研究が、実際に難治性疾患に対する有効な治療薬の開発に繋がる事を期待したい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. S. Mitsuhashi, C. Shindo, K. Shigetomi, T. Miyamoto, and M. Ubukata, (+)-Epogymnolactam, a novel autophagy inducer from mycelial culture of *Gymnopus* sp. *Phytochemistry*, **114**, 155-159 (2015).
2. Y. Okado, K. Shigetomi, and M. Ubukata, First total synthesis of (+)-epogymnolactam, a novel autophagy inducer. *Journal of Antibiotics*, **68**, 721-724 (2015).
3. M.N.I. Bhuiyan, R. Takai, S. Mitsuhashi, K. Shigetomi, Y. Tanaka, Y. Kamagata,

and M. Ubukata, Zincmethylpyrins and coproporphyrins, novel growth factors released by *Sphingopyxis* sp., enable laboratory cultivation of previously uncultured *Leucobacter* sp. through interspecies mutualism.

- Journal of Antibiotics*, **69**, 97-103 (2016).
4. D.J. Kliionsky and M. Ubukata et al., Guideline for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3<sup>rd</sup> edition). *Autophagy*, **12**, 1-222 (2016).
  5. K. Suganuma, A. E. Sarwono, S. Mitsuhashi, M. Jxkalski, T. Okada, M. Nthatisi, J. Yamagishi, M. Ubukata, and N. Inoue, Mycophenolic acid and its derivatives as potential chemotherapeutic agents targeting inosine monophosphate dehydrogenase in *Trypanosoma congolense*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**, 4391-4393 (2016).
  6. R. Takai, K. Shigetomi, Y. Kamagata, and M. Ubukata, Growth mechanism of uncultured actionobacterial strain *Leucobacter* sp. ASN212 by zinc coproporphyrin. *Heterocycles*, **95**, 145-151 (2017).
  7. M.N.I. Bhuiyan, S. Mitsuhashi, K. Shigetomi, and M. Ubukata, Quercetin inhibits advanced glycation end product formation via chelating metal ions, trapping methylglyoxal, and trapping reactive oxygen species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **81**, 882-890 (2017).
  8. A.E. Sarwono, K. Suganuma, S. Mitsuhashi, T. Okada, S.P. Musinguze, K. Shigetomi, N. Inoue, and M. Ubukata, Identification and characterization of guanosine 5'-monophosphate reductase of *Trypanosoma congolense* as a drug target. *Parasitology International*, in press.

[学会発表](計 13 件)

1. 生方 信、農学と生命有機化学、平成 26 年度市民公開・農学特別講演会、2014 年 9 月 26 日(札幌)
2. 岡戸祐治、重富顕吾、三橋進也、生方 信、*Gymnopus* sp. 由来の (+)-Epogymnolactam の全合成、平成 26 年度公益社団法人日本農芸化学会北海道・東北合同学術集会、2014 年 9 月 23 日(札幌)
3. 土井督史、三橋進也、川村 猛、児玉龍彦、鈴木貴大、叶 直樹、岩淵好治、生方 信、Hirstanol 類の作用機構解析、平成 26 年度日本木材学会北海道支部研究発表会、2014 年 11 月 12 日(札幌)
4. 岡戸祐治、重富顕吾、三橋進也、生方 信、

*Gymnopus* sp. 由来の (+)-Epogymnolactam の全合成、平成 26 年度日本木材学会北海道支部研究発表会、2014 年 11 月 12 日(札幌)

5. 上田一貴、岡戸祐治、重富顕吾、生方 信、(-)-Epogymnolactam の合成研究、日本木材学会北海道支部・平成 27 年度研究発表会、2015 年 11 月 13 日(旭川)
6. 生方 信、生物を化学の目で見る、札幌農学同窓会、2016 年 3 月 4 日(札幌)
7. 上田一貴、岡戸祐治、重富顕吾、生方 信、(+)-Epogymnolactam の全合成ならびにオートファジー誘導活性評価、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日(札幌)
8. 生方 信、特別講演 終末糖化産物 (AGEs) 阻害剤 -抽出成分と酸素のインパクト-、日本木材学会北海道支部、平成 28 年度研究発表会、2016 年 11 月 10 日(札幌)
9. 上田一貴、岡戸祐治、重富顕吾、生方 信、オートファジー誘導物質 (+)-epogymnolactam の類縁体合成および活性評価、日本木材学会北海道支部平成 28 年度研究発表会、2016 年 11 月 10 日(札幌)
10. 生方 信、小さな分子から生命が見える、特別講演、平成 28 年度 公益社団法人 日本農芸化学会 北海道支部第 2 回講演会、2016 年 11 月 23 日(札幌)
11. M Ubukata, Lessons from biologically active natural products - Discovery of new growth factors for previously uncultured *Leucobacter* sp., BIT's Annual Congress of International Drug discovery Science and Technology - South Korea 2016, June 29, Gyeonggi, South Korea (2016).
12. 生方 信、顕著な活性を有する生理活性物質の発見とその化学生物学的展開、生方信教授最終講義、2017 年 3 月 9 日(札幌)
13. 岡戸祐治、上田一貴、重富顕吾、生方 信、新規オートファジー誘導物質(+)-エポジムノラクタムの構造活性相関、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 19 日(京都)

〔図書〕(計 1 件)

1. 生方 信、顕著な活性を有する生理活性物質の発見とその化学生物学的展開、pp.1-5.平成 29 年度日本農学賞論文要旨、日本農学会、2017 年 3 月 16 日発行  
ISSN 0910-2477

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称：メイラード反応抑制剤、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物分解剤、およびメイラード反応抑制法

発明者：生方 信、松永龍一郎、三橋進也

権利者：国立大学法人 北海道大学

種類：特許

番号：第 5783612 号

出願年月日：平成 23 年 2 月 24 日

登録年月日：平成 27 年 7 月 31 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

生方 信 (Ubukata, Makoto)

北海道大学・農学研究院・特任教授

研究者番号：60168739

### (2) 研究分担者

重富顕吾 (Shigetomi, Kengo)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：20547202