アミハナイグチ(Boletinus cavipes)および アミタケ(Suillus bovinus) からの BACE1 阻害活性物質の探索

BACE1 Inhibitory Constituents from the Fruiting Bodies of Boletinus cavipes and Suillus bovinus

令和 4 年度入学 山口 剛賢 (Yamaguchi, Takamasa)

我が国では超高齢社会の進行に伴い,認知症患者の増加が深刻な問題と なっている.認知症の原因疾患の約7割を占めているのが不可逆的な神経 変性疾患であるアルツハイマー型認知症 (AD)であり,その発症機序とし て広く支持されているのがアミロイドカスケード仮説である.この仮説は, アミロイドβ(Aβ) が脳内で蓄積,凝集し,神経細胞にダメージを与えると いうものである.現在,我が国で AD の治療薬として使用されている4種 類の薬剤はいずれも対症療法薬であり,根本的治療薬ではない.また,近 年根本的治療薬として承認されたヒトモノクローナル抗体製剤の lecanemab と donanemab は投与対象が限られ,医療費が高額であるなどの 問題点も多く,低分子の AD 根本的治療薬の開発は依然として急務である.

当研究室では、AD の根本的治療薬開発を目的として、アミロイドカス ケード仮説に基づき、Aβ産生の第一段階を担うβ-secretase (BACE1)の阻害 に着目し、キノコ抽出エキスのスクリーニングを行ってきた。キノコはシ キミ酸経路などが発達しており、他の菌類には見られない特徴的な構造を 有する二次代謝産物を生合成することから、新たな活性化合物を見出せる 可能性を秘めている。そこで、本研究では、キノコ子実体抽出エキスを試 料として BACE1 阻害物質の探索を行った。

<u>1. キノコ抽出エキスからの BACE1 阻害活性成分の探索 ¹⁾</u>

キノコ抽出エキスのランダムスクリーニングの結果, BACE1 阻害活性が 認められたアミハナイグチ (Boletinus cavipes) とアミタケ (Suillus bovinus) から活性成分の探索を行った. BACE1 阻害活性は BACE1 FRET Assay Kit, Red (Thermo Fisher Scientific, USA) により評価した. アミハナイ グチ (B. cavipes) の CHCl₃ 抽出エキスおよびアミタケ (S. bovinus) の CHCl₃抽出エキスについて、活性を指標に各種クロマトグラフィーを用い て分離,精製を行った.単離化合物の構造解析は,主に MS と各種 NMR デ ータを用いて行った.アミハナイグチからは 1-3 を単離し,それぞれがア ミハナイグチから単離報告のある化合物と推定された. 各種スペクトルデ ータを文献値と比較し たところ, それと一致し たことから, それぞれ ноос 2 1'-farnesyl mesaconate cavipetin (1).Α (2),3 boletinin J (3) と同定し Figure 1. Compounds 1–3 from B. Cavipes た (Figure 1).



Figure 2. Compounds 4 and 6 from S. bovinus

(4) と bovilactone-4,4 (6) と同定した (Figure 2). 5 と 7 は新規化合物であ

アミタケからは 4-7 を単離 した.4 と6はアミタケから 既に単離が報告されている 化合物と推定され,各種スペ クトルデータを文献値と比 較したところ,それらと一致 したことから boviquinone-4 ったことから以下のとおり構造解析を行った. **5** は ¹H- および ¹³C- NMR スペクトルデータが boviquinone-4 (4)と非常に類似していた.しかし, ¹³C-NMR スペクトルで観測されたシグナル数は分子式のおよそ半分であり,さ らに MS から **5** は **4** の質量を 2 倍したものに C₂H₂ 分を加えた構造である ことが明らかとなった.**5** の ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルを **4** と比べる と 2"位に帰属した $\delta_{\rm H}$ 1.56 (3H, d, J = 7.5 Hz) のメチルプロトンと $\delta_{\rm C}$ 16.5 の メチル炭素,および 1"位に帰属した $\delta_{\rm H}$ 4.37 (1H, q, J = 7.5 Hz) のメチンプ ロトンと $\delta_{\rm C}$ 26.6 のメチン炭素に由来するシグナルが新たに観測され,6位 は $\delta_{\rm C}$ 115.9 の四級炭素と帰属した.さらに,Figure 3 に示したような HMBC 相関が得られたことから,**5** は二量体構造を有すると決定した.**5** は新規 化合物であったため bisboviquinone-4 と命名した.



Figure 3. HMBC and ¹H-¹H COSY correlations of 5

7 の¹H および¹³C-NMR スペクトルデータのシグナルの内、半分は boviquinone-4 (4)のスペクトルと類似していたが約半分のシグナルは 4 と 一致せず、4 とは異なる構造が予想された.そこで、各種 2D スペクトルを 詳細に検討し、Figure 4 に示した相関が得られたことから、7 は図のような 構造であると決定した.7 は新規化合物であったことから、 bovipyranoquinone と命名した.



Figure 4. HMBC and ¹H-¹H COSY correlations of 7

2. BACE1 阻害活性

今回, アミハナイグチより単離した 1-3 およびアミタケから単離した 4-7 の BACE1 阻害活性を評価した. その結果, 1-6 は BACE1 阻害活性を示 し, それぞれの IC₅₀ 値は 23.7 μM, 1.6 μM, 22.8 μM, 21.2 μM, 17.8 μM, 1.0 μM であった. 7 は 100 μM の濃度でも活性を示さなかった (Figure 5).



Figure 5. BACE1 inhibitory activity of 1-7 and related compounds

3.構造活性相関の検討

構造活性相関を検討するため,活性を示した 1-6 の部分構造である geranylgeraniol, farnesol, mesaconic acid, および 2,5-dihydroxy-1,4benzoquinone について BACE1 阻害活性を評価したところ,いずれも 100 μ M の濃度でも活性を示さなかった (Figure 5). 1-3 において,テルペンユ ニットに mesaconic acid が 1 つ結合している 1 と 3 より, mesaconic acid が 2 つ結合した 2 の活性が強かったことから,テルペンユニットに結合した mesaconic acid の構造は活性に大きく寄与することが考えられた.また, 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone にテルペンユニットが結合した 4 と 5 にお いては boviquinone-4 (4) のジメチル化体とモノメチル化体が 100 μ M の濃 度でも BACE1 阻害活性を示さなかったことから,4 と 5 の有する 2,5dihydroxy-1,4-benzoquinoneの2つの水酸基の存在が活性に重要であると示 唆された.

<u>4. 阻害様式の検討</u>

1-6の阻害様式を Lineweaver-Burk plot および Dixon plot を用いて検討 したところ, 1-3 は不競合阻害, 4-6 は競合阻害で BACE1 阻害活性を示す

ことが明らかにな った.これらの化合 物はいずれも部分 構 造 と L T geranylgeraniol と同 じ構造を有してい るが, mesaconic acid が結合した 1- $3 \geq$, 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone が 結合した 4-6 で阻 害様式が異なる





害様式が異なる Figure 6. Lineweaver-Burk plots and Dixon plots of 2 (A) and 4 (B) ことは着目すべき点である (Figure 6).

<u>5.ドッキングシュミレーションによる検討</u>

BACE1 阻害活性を示した 1-6 のうち, 阻害様式が競合阻害を示した 4-6 について BACE1 とのドッキングモデルを Molecular Operating Environment (MOE) を用いて作成し, 化合物—BACE1 複合体の安定構造を推定した. ドッキングシミュレーションには, Protein Data Bank Japan から入手した 2amino-{(1*R*)-1-cyclohexyl-2-[(cyclohexylcarbonyl)amino]ethyl}-6-phenoxyquinazolin-3-ium とヒト BACE1 の複合体 (PDB ID: 2WJO) の X 線結晶構造 から得た BACE1 を用いた. ドッキングシミュレーションの結果, 4-6 はい ずれも同じリガンド結合ポケットに結合した (Figure 7). 計算によって得 られた 4-6 の化合物-BACE1 複合体の安定構造のドッキングスコアは, そ れぞれ-7.35, -9.68, および-10.55 であり, 6 が最も BACE1 との結合親和性 が高かった. これは, 実際に評価した 4-6 の BACE1 阻害活性の IC₅₀ の強 さの順と一致した.



Figure 7. Docking simulation of 4 (A) and 6 (B)

<u>結語</u>

根本的 AD 治療薬の探索を目指し,アミハナイグチおよびアミタケ CHCl₃抽出エキスから BACE1 阻害活性を指標に,新規化合物 2 種を含む 7 種類の化合物 (1-7) を単離し,その構造を明らかにした.1-6 は BACE1 阻 害活性を示したことから,構造活性相関を検討した.さらに,これら化合 物の阻害様式を検討した結果,構造によって阻害様式が異なったことは大 変興味深い.さらに,阻害様式が競合阻害であった 4-6 についてドッキン グシミュレーションを行い,化合物と BACE1 の結合親和性を検討した. これらの結果は,今後の低分子 AD 治療薬の開発におけるシード化合物の 探索に重要な視点を与えるものである.

参考文献

1) Yamaguchi T. et al., J. Nat. Med. (2024) in press