

## 平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

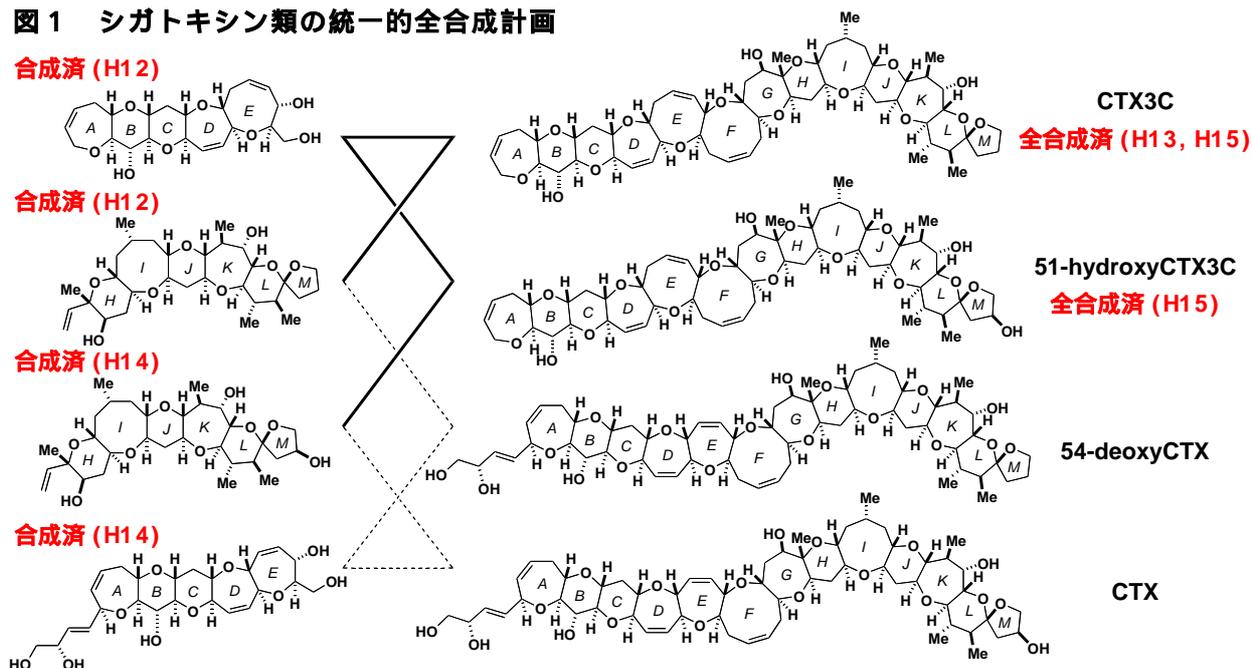
ふりがな		ひらま まさひろ					
研究代表者氏名		平間 正博		所属研究機関・部局・職		東北大学・大学院理学研究科・教授	
研究課題名	和文	シガトキシン類の全合成・抗体・作用原理の研究					
	英文	Total synthesis of ciguatoxins and studies on the antibodies and the mechanism of action					
研究経費 16年度以降は内約額 金額単位：千円	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計	
	18,000	17,000	17,000	17,000	17,000	86,000	
研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
平間 正博	東北大学・大学院理学研究科・教授		天然物化学	研究全般および総括			
井上 将行	東北大学・大学院理学研究科・助教授		天然物合成	全合成・モデル分子合成・活性試験・ハプテン合成・抗体調製・抗体遺伝子改変（平成15年度まで研究分担者）			
大栗 博毅	平成16年3月1日付にて北海道大学・大学院理学研究科・助教授に転出		天然物化学	ハプテン合成・抗体調製・抗体遺伝子改変			
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>珊瑚礁周辺の魚介類によって引き起こされるシガテラ中毒は、世界最大規模の自然毒食中毒であり、年間2万人以上の中毒患者が発生する。この中毒は症状が数ヶ月も続き、死亡する場合もある。原因毒のシガトキシン類は、分子長3nmの巨大分子であり、主なもので4種類の同族体が存在する。シガテラ毒魚は特定が困難で、シガトキシン類の微量検出法の開発が切望されてきた。この化合物の毒性は、ヒトの感覚・感情・思考・動作に関わる電位依存性Na<sup>+</sup>チャンネルに結合して発揮される。自然界のシガトキシン類は極微量成分なため天然物による詳細な研究の継続は不可能であった。</p> <p>申請者らは平成13年に、代表的シガトキシン類であるCTX3Cの全合成に世界で初めて成功した。下記のように本研究の目的は、我々の開発した合成技術・方法論・合成化合物を最大限利用し、CTX類全合成、シガテラ毒魚検定法開発、Na<sup>+</sup>チャンネル活性化原理解明を達成することである。これらは、天然物有機化学・生物有機科学分野の基礎研究として挑戦的で画期的である。</p> <p>シガトキシン類全合成：主なもので4種類あるシガトキシン類をすべて全合成する。</p> <p>シガテラ毒魚検定法開発：高感度抗体作製により、シガテラ中毒の完全予防を目指す。</p> <p>Na<sup>+</sup>チャンネル活性化原理解明：合成シガトキシン類やその誘導体を用いて毒性発現の原理を明らかにし、さらにチャンネルとの複合体の三次元構造解析により、チャンネルの開閉機構を直接視覚化する。</p>							

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

### シガトキシン類全合成

平成 13 年に達成した CTX3C 全合成は、効率性において問題があった。特に、二大フラグメントの縮合、最終段階の脱保護、全合成工程が 100 以上に及ぶことが、CTX3C の量的供給への課題であった。我々は、新規合成法の開発、合成ルートの短縮・効率化を遂行し、平成 15 年には圧倒的に簡便かつ信頼性の高い CTX3C の二世全合成法を開発した。同方法論により数 mg 以上の CTX3C 供給を可能にしたのみならず、最も毒性が強力とされる 51-hydroxyCTX3C の世界で初めての全合成に成功した(図 1)。また、CTX の二大フラグメントの合成も完了し、主要なシガトキシン同族体の統一かつ実践的な全合成は極近未来に達成できる。さらに、合成化合物の設計・供給により、以下に示す関連分野の共同研究を展開した。

図 1 シガトキシン類の統一的全合成計画



### シガテラ毒魚検定法研究

中毒の予防を目的とした検定法開発に向けて、合成ハプテンを用いてシガトキシン類認識抗体を合理的に作製する新手法を開発した。平成 14 年には、CTX3C の左右両端にそれぞれ特異的に結合する抗体を組み合わせ、CTX3C を高感度かつ特異的に検定可能なサンドイッチ免疫アッセイの確立に成功した(次項図 3 参照)。本法は、CTX3C を 1 ng/mL レベルで検出でき、アッセイとしての実用化も可能である。

### Na<sup>+</sup>チャンネル活性化原理研究

様々な CTX3C 全合成中間体の、マウス毒性と細胞毒性を評価した。その結果、FG 環部がない CTX3C 誘導体が、赤潮毒プレベトキシンと同程度の強力な細胞毒性を示すという極めて重要な知見が得られた。

また、合成 CTX3C を電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルに投与し、電気生理学的にチャンネル機能改変を解析した。その結果、CTX3C が Na<sup>+</sup>チャンネルの重要な機能である活性化過程と不活性化過程の両ゲート機構に相反する作用を示すいまままでにない特異な分子であることが明らかになってきた。

特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

研究代表者である平間は、前項の「これまでの研究経過」に述べた研究業績を含む研究により、平成15年度に日本化学会の最高の賞である化学会賞を受賞した。これまでの研究において得られた特記事項について以下に示す。

### 第二世代シガトキシン全合成法の開発

巨大天然物の化学合成による量的供給は、天然物合成化学に架せられた至上命題である。我々は最初のCTX3C全合成以降、シガトキシン類の真に効率的・実践的な全合成ルート開発を続けてきた。その結果、(1) 合成フラグメントの効率的調達、(2) 新しい保護基戦略による最終脱保護の収率向上、(3) 左右二大フラグメントの新規な縮合法の開発により、CTX3Cの第二世代全合成に成功した(図2)。本合成では、全体の効率・収率の向上のみならず、最長の直線的合成工程数を60段階から47段階へと短縮できた。合成工程数はこの大きさの分子としては圧倒的に少なく、関連分野へCTX3Cを供給し、目覚ましい成果を上げつつある。このように、我々は、**有機合成化学がサイエンスへ重要なインパクト**を与えられることを明確に示した。尚、井上は本研究を中心とした業績で第1回天然物化学談話会奨励賞を受賞した。

### サンドイッチイムノアッセイの開発

シガトキシン自体ではなく無毒な合成フラグメントを用いて、シガトキシン認識抗体を作製する手法を開発した。これにより、安全な抗体作製を可能にし、またシガトキシンの望む部位へ結合する抗体を調製できた。また、合成ハプテンの表面積が大きいほど、特異的な抗体が得られやすいことを明らかにした。さらに調製したCTX3Cの左右両端にそれぞれ特異的に結合する抗体を、サンドイッチイムノアッセイへと適用した(図3)。タンパク質のような生体高分子に対して抗体が両側から結合する例は知られているが、本研究のような例は初めてであり、**独創性の高い新規な方法論**である。この有機合成を基盤としたイムノアッセイは、シガトキシン同族体や他の毒物などの高感度検出に応用できる。大栗は本研究を中心とした業績で第2回天然物化学談話会奨励賞を受賞した。

### CTX3Cの電気生理学実験

今まで、シガトキシンによる電位依存性Na<sup>+</sup>チャネル機能改変の詳細な解析は、自然界から得られるサンプル量の少なさから不可能であった。我々の合成CTX3Cを用いた詳細な電気生理学実験により、CTX3Cがチャネルに特異な作用を示す分子であることが初めて明らかになった。我々の合成分子を利用して、神経科学における重要課題である**電位依存性チャネルの活性化・不活性化機構の解明へと発展**させることが出来る。

図2 CTX3C 第二世代全合成

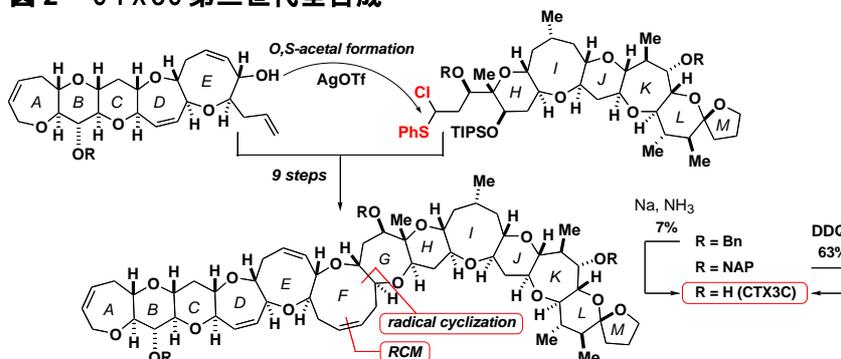
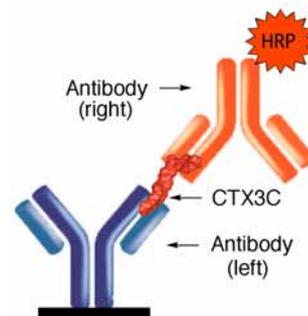


図3 サンドイッチイムノアッセイ



研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

1. M. Inoue, M. Hirama, Evolution of a Practical Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C. *Acc. Chem. Res.* submitted.
2. M. Inoue, K. Miyazaki, H. Uehara, M. Maruyama, and M. Hirama, First and Second Generation Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, in press.
3. M. Inoue, M. Hirama, Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C, a Causative Toxin of Ciguatera Seafood Poisoning. *Synlett*, **4**, 577-595 (2004).
4. K. Yamaoka, M. Inoue, H. Miyahara, K. Miyazaki, and M. Hirama, A Quantitative and Comparative Study of the Effects of a Synthetic Ciguatoxin CTX3C on the Kinetic Properties of Voltage-Dependent Sodium Channels. *Br. J. Pharmacol.*, in press.
5. Y. Nagumo, H. Oguri, K. Tsumoto, Y. Shindo, M. Hirama, T. Tsumuraya, I. Fujii, Y. Tomioka, M. Mizugaki, I. Kumagai, Phage-Display Selection of Antibodies to Left End of CTX3C Using Synthetic Fragments. *J. Immunol. Methods*, in press.
6. M. Inoue, S. Yamashita, A. Tatami, K. Miyazaki, and M. Hirama, A New Stereoselective Synthesis of Ciguatoxin Right Wing Fragments. *J. Org. Chem.*, **65**, 2797-2804 (2004).
7. G. Hirai, H. Oguri, M. Hayashi, K. Koyama, Y. Koizumi, S. M. Moharram, and M. Hirama, Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of Truncated Zoanthenol Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press.
8. M. Inoue, S. Yamashita, and M. Hirama, A New Synthesis of Key Intermediates for the Assembly of Polycyclic Ethers: Yb(OTf)<sub>3</sub>-Promoted Formation of O, S-Acetals from  $\alpha$ -Fluorosulfides and Alcohols. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 2053-2056 (2004).
9. S. Kobayashi, B. H. Alizadeh, S. Sasaki, H. Oguri, and M. Hirama, Synthesis of the Fully Functionalized ABCDE Ring Moiety of Ciguatoxin. *Org. Lett.*, **6**, 751-754 (2004).
10. I. Ohashi, M. J. Lear, F. Yoshimura, and M. Hirama, Use of Polystyrene-Supported DBU in the Synthesis and  $\alpha$ -Selective Glycosylation Study of the Unstable Schmidt Donor of L-Kedarsamine. *Org. Lett.*, **6**, 719-722 (2004).
11. N. Kato, S. Shimamura, S. Khan, F. Takeda, Y. Kikai, and M. Hirama, Convergent Approach to the Maduropeptin Chromophore: Aryl Ether Formation of (R)-3-Aryl-3-hydroxypropanamide and Cyclization of Macrolactam. *Tetrahedron*, **60**, 3161-3172 (2004).
12. T. Usuki, M. Inoue, M. Hirama, and T. Tanaka, Rational Design of a Supra C-1027: Kinetically Stabilized Analogue of the Antitumor Eneidyne Chromoprotein. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3022-3023 (2004).
13. M. Inoue, H. Zhai, H. Sakazaki, H. Furuyama, Y. Fukuyama, and M. Hirama, TMC-95A, a Reversible Proteasome Inhibitor, Induces Neurite Outgrowth in PC12 Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 663-665 (2004).
14. M. Inoue, T. Sato, and M. Hirama, Total Synthesis of Merrilactone A. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10772-10773 (2003).
15. M. Inoue, J. Wang, G. -X. Wang, Y. Ogasawara, and M. Hirama, Divergent Synthesis of the Tetracyclic Ethers of 6-X-7-6 Ring Systems. *Tetrahedron*, **59**, 5645-5659 (2003).
16. A. Tatami, M. Inoue, H. Uehara, and M. Hirama, A Concise Route to the Right Wing of Ciguatoxin. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 5229-5233 (2003).
17. H. Oguri, M. Hirama, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Maruyama, H. Uehara, and Y. Nagumo, Synthesis-Based Approach toward Direct Sandwich Immunoassay for Ciguatoxin CTX3C. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7608-7612 (2003).
18. J. Wang, S. Sakamoto, K. Kamata, A. Nitta, T. Noda, H. Oguri, and M. Hirama, Construction of the AG-ring Unit of Pinnatoxin A via Intramolecular Alkylation and Aza-Wittig Reaction. *Synlett*, 891-893 (2003).
19. M. Inoue, H. Sakazaki, H. Furuyama, and M. Hirama, Total Synthesis of TMC-95A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2654-2657 (2003).
20. M. Inoue, K. Nabatame, and M. Hirama, A Novel Route to 1, 8-Dihydroxynaphthalene-Derived Natural Products. Synthesis of ( $\pm$ )-CJ-12, 372. *Heterocycles*, **59**, 87-92 (2003).
21. M. Inoue, M. Hirama, M. Satake, K. Sugiyama, and T. Yasumoto, Inhibition of Brevetoxin Binding to the Voltage-gated Sodium Channel by Gambierol and Gambieric Acid-A. *Toxicon*, **41**(4), 469-474 (2003).
22. P. Das, T. Mita, M. J. Lear, and M. Hirama, Synthesis of <sup>13</sup>C-labelled, Bicyclic Mimetics of Natural Eneidyne. *Chem. Commun.*, 2642-2625 (2002).
23. M. Inoue, H. Uehara, M. Maruyama, and M. Hirama, Practical Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C by Improved Protective Group Strategy. *Org. Lett.*, **4**, 4551-4554 (2002).
24. T. Usuki, M. Inoue, K. Akiyama, and M. Hirama, Spin-trapping Study of DNA Cleavage Induced by Eneidyne C-1027 Chromophore. *Chemistry Lett.*, 1148-1149 (2002).
25. S. Nozaki, Y. Tomioka, T. Hishinuma, M. Inoue, Y. Nagumo, L. R. Tsuruta, K. Hayashi, T. Matsumoto, Y. Kato, S. Ishiwata, K. Itoh, T. Suzuki, M. Hirama, and M. Mizugaki, Design, Production, and Characterization of Recombinant Neocarzinostatin Apoprotein in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **131**, 729-738 (2002).
26. M. Inoue, G. X. Wang, J. Wang, and M. Hirama, Novel Assembly of Cyclic Ethers by Coupling  $\alpha$ -Chlorosulfides and Alcohols. *Org. Lett.*, **4**, 3439-3442 (2002).
27. H. Uehara, T. Oishi, M. Inoue, M. Shoji, Y. Nagumo, M. Kosaka, J.-Y. Le Brazidec, and M. Hirama, Convergent Synthesis of The HIJKLM Ring Fragment of Ciguatoxin CTX3C. *Tetrahedron*, **58**, 6493-6512 (2002).
28. G. Hirai, Y. Koizumi, S. M. Moharram, H. Oguri, and M. Hirama, Construction of the Benzylic Quaternary Carbon Center of Zoanthenol by Intramolecular Mizoroki-Heck Reaction of Enone. *Org. Lett.*, **4**, 1627-1630 (2002).
29. S. Kobayashi, P. Das, G. X. Wang, T. Mita, M. J. Lear, and M. Hirama, Diastereoselective Additions of Ethynyl Grignard Reagent to Erythrulose Derivatives. *Chemistry Lett.*, 300-301 (2002).