

シガトキシン類の全合成・抗体・作用原理の研究 Total synthesis of ciguatoxins and studies on the antibodies and the mechanism of action

平間 正博 (Masahiro Hirama)
東北大学・大学院理学研究科・教授



研究の概要 珊瑚礁周辺の魚介類によって引き起こされるシガテラ(神経)中毒は、世界最大規模の自然毒食中毒であり、年間5万人以上の中毒患者が発生している。魚から採取できるシガトキシンは極微量なので、毒魚の検出法開発や、作用機序等の研究も大変遅れていた。シガトキシンは、複雑な構造を有する巨大分子なので、人工合成が非常に困難である。シガトキシンの全合成、抗体作製、毒魚検定や予防治療法開発、更にイオンチャネル阻害機構解明に挑戦する。

研究分野/科研費の分科・細目/キーワード

有機合成化学・天然物合成化学・天然物化学/生物化学・生物有機科学/シガテラ中毒・シガトキシン・全合成・抗体・免疫アッセイ・予防治療・ナトリウムイオンチャネル

1. 研究開始当初の背景・動機

- (1) 魚類から採取される原因毒天然シガトキシンの量は極微量であったので、関連する研究の大きな障害になっていた。
- (2) シガトキシンの絶対構造を、1997年に決定することができた。
- (3) シガトキシンの化学構造は、非常に複雑かつ巨大であったので、化学合成の対象としても学術的に極めて意義深いものであった。
- (4) 全合成は、世界中で検討されていたが、2001年に我々が世界で初めてシガトキシン CTX3C の全合成に成功した。
- (5) シガトキシン類の普遍的合成法を開発して量的供給を可能にし、関連する学術基礎・応用研究を進展させたい。

2. 研究の目的

- (1) シガトキシン類を量的に供給できる実践的かつ普遍的全合成法を開発する。
- (2) 抗シガトキシンモノクローナル抗体を作製して、毒魚を検定できる高感度な免疫アッセイ法の開発(シガテラ中毒の予防)、更には治療を可能にする。
- (3) ナトリウムイオンチャネルに障害を起こす電気生理学研究、チャネルへの作用に必要なシガトキシン分子の構造要件と作用原理、結合三次元構造を明らかにする。

3. 研究の方法

シガトキシン類及び、そのバイオプローブの普遍的かつ実践的全合成法の開発によって、量的供給を可能にし、関連科学者と共同研究を進める。化学合成を迅速に進める為に必要な大型設備は既に装備されていたので、反応追跡用装置と合成に使用する消耗品と小型の備品のみ購入した。

4. 研究の主な成果

- シガトキシン類は、天然からは極微量しか得られず、30-34個の不斉炭素を持ち、しかも不飽和9員環エーテルを中心に13-14個のエーテル環が梯子状に連なった3nm以上の分子長を有する巨大分子である。私達は、「二環構築型ポリエーテル連結法」を考案し、化学合成が非常に困難なシガトキシン CTX3C の収束的全合成を2001年に世界で最初に達成した。この成果を更に発展させ、
- (1) 合成シガトキシンを諸研究に供給できる実用的な第二世代CTX3C合成法を開発した。
 - (2) 第二世代合成法によって最強の毒性をもつ51-HydroxyCTX3Cの数ミリグラムスケールの全合成、及び太平洋地域におけるシガテラ中毒の原因毒として最も可能性が高いとされるCTX1Bの全合成にも成功した。
 - (3) 大半のシガトキシン類に共通の右側半分の構造を有する全合成中間体をハブテンとして、51-HydroxyCTX3Cを特異的かつ高感度で認識するモノクローナル抗体 8H2の作製にも成功した。
 - (4) この抗体と既に作成済みのモノクローナル抗体 10C9とを組み合わせ、51-hydroxyCTX3C等をpg/mLで高感度・特異的に検出できるサンドイッチ免疫アッセイ(ELISA)法を確立した。更に実用的なキット化へと開発中である。
 - (5) 実際の中毒発生地域、沖縄近海産魚類の数百個体以上を解体・抽出処理した。それら試料について既に開発したCTX3Cサンドイッチ免疫アッセイを適用した結果、沖縄産イッテンフエダイがCTX3Cを含むことを初めて証明した。我々が開発して

[4. 研究の主な成果 (続き)]

きた**毒魚検定法が、実際のシガテラ魚に十分適用できる**ことがわかった。

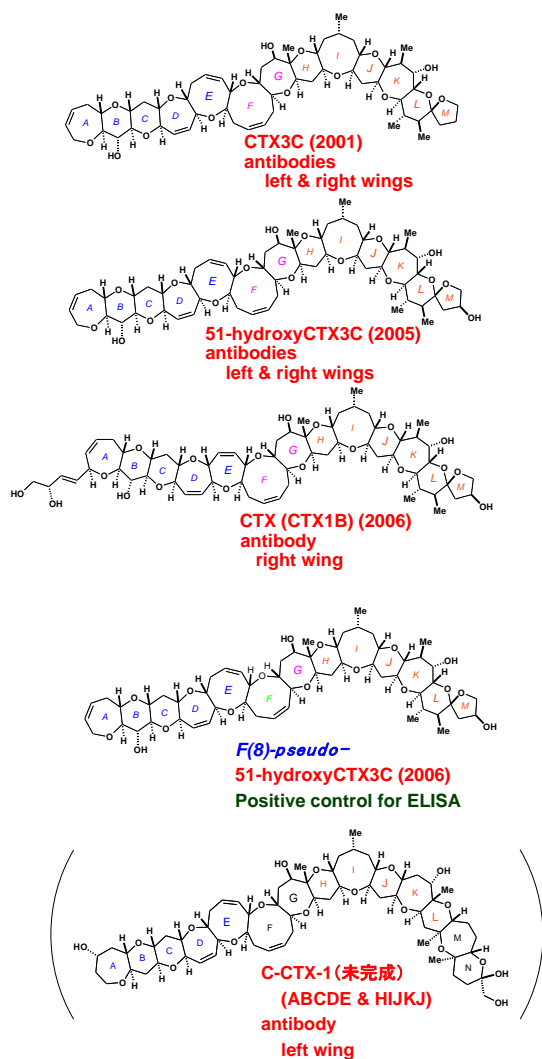
(6) これらの抗体はマウス体内のシガトキシンを中和できる、すなわち、**中毒したマウスの治療ができる**ことも明らかにした。これは、抗体のヒト型抗体化によって、ヒトの**中毒の治療や、ワクチン開発に繋がる**。

(7) **非常に興味深い構造活性相関研究**が進展した。化学合成によってF環を固定化した**8員環疑似シガトキシン**も、開環して回転可能な12環性シガトキシンも、**毒性が消滅**した。多少の立体配座の自由度を有する天然の9員環が重要構造要件である。

(8) CTX 類を抗体共存下に過酸化 (エポキシ化) すると位置選択性を完全に制御できることを明らかにした。

(9) **全合成したシガトキシン類やビオチンコンジュゲート**を用いた電子顕微鏡や電気生理学研究により、**電位依存性ナトリウムチャンネルへの結合部位や開閉 (ゲイティング) 機構**を明らかにしつつある。

全合成したシガトキシン類と作成済みの抗体



5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

(1) シガトキシン類の**全合成に成功した**のは世界中で未だに我々だけであり、**学術的評価が極めて高い**。天然からの供給が困難でシガテラ中毒が世界中で頻繁に起きている状況下、**国際分析協会** (AOAC International)からも標品としての合成シガトキシンが切望されている。

(2) シガトキシン検出キットとして世界で唯一市販されている Cigua-Check の信頼性に疑問が持たれているので、**我々が開発した合理的な抗体作製法**と、その抗体を用いた簡易型イムノアッセイキットは大いに期待されている。**環境衛生 (中毒予防・治療) と漁業資源確保の観点から国際的に評価が高い**。

(3) シガトキシン類は、ヒトの活動の全てに関わる**電位依存性 Na チャネルに作用する貴重なバイオプローブ**である。合成シガトキシンによる Na チャネルへの作用の電気生理学的解明や、電子顕微鏡による Na チャネルの開構造を解明中であり、今後の**神経科学や構造生物学に与えるインパクト**は計り知れない。

(4) 本研究は、全合成を基盤として関連科学技術との融合、他分野研究者との共同研究によって、学術的にも実用的にも世界的な先導的成果を挙げている。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Convergent Synthesis of the ABCDE-Ring Fragment of the Caribbean Ciguatera Toxin C-CTX-1. **M. Inoue**, F. Saito, M. Iwatsu, Y. Ishihara, **M. Hirama**, *Tetrahedron Lett.* **48**, 2171-2175 (2007).
2. Two Convergent Routes to the Left-Wing Fragment of Ciguatera Toxin CTX3C Using *O,S*-Acetals As Key Intermediates. **M. Inoue**, S. Yamashita, Y. Ishihara, **M. Hirama**, *Org. Lett.* **8**, 5805-5808 (2006).
3. Total Synthesis of Ciguatera Toxin and 51-HydroxyCTX3C. **M. Inoue**, K. Miyazaki, Y. Ishihara, A. Tatami, Y. Ohnuma, Y. Kawada, K. Komano, S. Yamashita, and **M. Hirama**, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 9352-9354 (2006).
4. Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of 51-HydroxyCTX3C. T. Tsumuraya, I. Fujii, **M. Inoue**, A. Tatami, K. Miyazaki, and **M. Hirama**, *Toxicol.* **48**, 287-294 (2006).
5. Total Synthesis of Ciguatera Toxin CTX3C: A Venture into the Problems of Ciguatera Seafood Poisoning. **M. Hirama**, *Chem. Rec.*, **5**, 240-250 (2005).
6. First and Second Generation Total Synthesis of Ciguatera Toxin CTX3C. **M. Inoue**, K. Miyazaki, H. Uehara, M. Maruyama, and **M. Hirama**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12013-12018 (2004).
7. Synthesis of the Fully Functionalized ABCDE Ring Moiety of Ciguatera Toxin. S. Kobayashi, B. H. Alizadeh, S. Sasaki, H. **Oguri**, and **M. Hirama**, *Org. Lett.*, **6**, 751-754 (2004).
8. Evolution of a Practical Total Synthesis of Ciguatera Toxin CTX3C. **M. Inoue**, **M. Hirama**, *Acc. Chem. Res.* **37**, 961-968 (2004).
9. Synthesis-Based Approach toward Direct Sandwich Immunoassay for Ciguatera Toxin CTX3C. H. **Oguri**, **M. Hirama**, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Maruyama, H. Uehara, and Y. Nagumo, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7608-7612 (2003).
10. Practical Total Synthesis of Ciguatera Toxin CTX3C by Improved Protective Group Strategy. **M. Inoue**, H. Uehara, M. Maruyama, and **M. Hirama**, *Org. Lett.*, **4**, 4551-4554 (2002).

<http://www.ykbsc.chem.tohoku.ac.jp/>