

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成19年度採択分

平成20年4月30日現在

研究課題名（和文）天然物有機合成を基盤とする抗体・受容体・新物質の
解析創製と新機能開拓

研究課題名（英文）Chemical Syntheses of Natural and Designed Molecules:
Innovative Research on Their New Functions, Antibodies
and Receptors

研究代表者

平間 正博（HIRAMA MASAHIRO）
東北大学・大学院理学研究科・教授



研究の概要：神経イオンチャンネルに作用するシガトキシン類の全合成法を開発する。全合成を基盤として、抗体作成・高感度検出法・抗体による中毒治療を検討し、人々の健康や魚類資源有効利用の社会的要請に応える。更に抗体分子認識・シガトキシンのNaチャンネルへの結合と、チャンネルの開閉機構原理を解明する。また、構造と活性の興味深いエンジン抗腫瘍性抗生物質を全合成し、構造と反応と生物活性の相関を解明して、新規抗がん剤を設計する。基礎科学と応用の両面における学際的新発見と新機能開拓を図る。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：シガテラ・シガトキシン・全合成・抗体・予防法・エンジン抗生物質

1. 研究開始当初の背景

- (1) 世界最大の海産物中毒シガテラの原因毒シガトキシン類の全合成は非常に困難であり、確実な検出法や治療法もなかった。天然試料の入手が困難であったので、関連する基礎研究も十分に行えなかった。
- (2) 不安定な9員環エンジン抗生物質の構造や全合成・作用機構の検討も遅れていた。

2. 研究の目的

- (1) シガトキシン類の普遍的全合成法を開発し、抗シガトキシン抗体作製法や中毒予防用シガトキシン検出法、毒性中和・中毒治療法を開発。更に、抗体-シガトキシン複合体の分子認識、イオンチャンネル結合分子の構造要件を明らかにし、シガトキシン類の電気生理学的特性、イオンチャンネル結合・活性化機構を解明する。
- (2) 9員環エンジン抗生物質を全合成し、構造確認・作用機構を解明し、新規薬剤を設計。

3. 研究の方法

- (1) 2環構築型収束的構築法を基本にしてシガトキシン類を全合成する。シガトキシン本体を用いず、無毒の左右2大セグメントA-E, H-M環部を抗原用ハプテンとする安全で認識部位特異的なマウス免疫モノクローナル抗体作製法を確立し、シガトキシンを左右から特異的に認識する高感度サンドイッチ

イムノアッセイ、及びその簡易キットを開発。抗体によるマウスのシガテラ中毒中和実験と、各マウス抗体のヒト化を進める。抗体-シガトキシン複合体X線結晶構造解析による分子認識解析。全合成中間体やF環構造を変化させた擬似シガトキシンを全合成し、チャンネルへの結合、細胞毒性、マウス毒性を調べる。合成擬似シガトキシンや化学修飾シガトキシン誘導体のチャンネルサブタイプやミュータントに対する電気生理特性試験解析。シガトキシンを膜タンパク質VSSCチャンネルに結合させ、極低温でクライオ電顕単粒子解析によりチャンネルへの結合・開構造を解明。

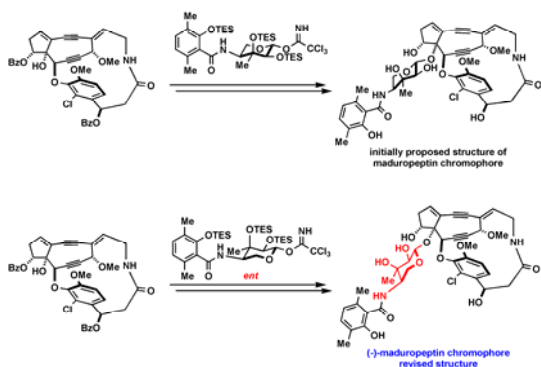
4. これまでの成果

- (1) カリブ海産シガトキシンC-CTXの左A-Eセグメントの合成とそれに結合するモノクローナル抗体4H5の作製に成功した。CTX1Bは、太平洋海域（沖縄を含む）におけるシガテラ中毒の最重要原因毒と推定される。5環性左A-Eセグメント（ハプテン）の確実な新合成法を開発し、新しいKLHコンジュゲート合成法によって合成した抗原をマウスに免疫したところ、長年の懸案であったCTX1B左半分認識抗体の作製について成功した。CTX3Cと51-hydroxyCTX3Cの数ミリグラムの全合成を達成し、学際的共同研究（電気生理学、膜タンパクVSSCチャンネルへの結合・開構造の電顕解析、沖縄シガテラ毒魚の毒成分

〔4. これまでの成果 (続き) 〕
 究明等) を展開中。電顕解析等に有用な 51-hydroxyCTX3C の B, M 環水酸基を選択的に化学修飾できる方法を開発し、それぞれに長さの異なるリンカーを経由してビオチンを結合させた数種の誘導体を合成した。興味深いことに、B 環に短いリンカーでビオチンを結合させると、シガトキシンに特有の電気生理学的活性化作用が消失した。M 環誘導体には大きな変化は観測されなかった。これは、AB 環側がチャンネル活性化作用の受容体に結合している可能性を示唆する重要な発見である。CTX3C は、チャンネルサブタイプの中でもラット脳や骨格筋神経より感覚神経 (Na_v1.8) に対する活性化作用が 10 倍も強いことが分かった。シガテラ症状の痛覚過敏と符合する。13 環性シガトキシンの中央部 F 環だけを変えた擬似シガトキシンを全合成した。F 環開環モデルも、8 員環擬似 51-hydroxyCTX3C も、天然物に比べ、チャンネルへの結合、細胞毒性、マウス毒性、電気生理活性化作用等いずれも極端に低下した。シガトキシンのチャンネルへの特異的作用には、F が 9 員環であることが極めて重要であることを立証した。CTX3C と 51-hydroxyCTX3C を 10 pg/mL 以下で検出できる簡易 ELISA キットを開発した。10C9 抗体 Fab と CTX3C-ABCDE 抗原複合体の X 線結晶構造解析に成功し、特異な縦長の結合構造を明らかにした。CTX3C でシガテラに罹患させたマウスに対し、抗 CTX3C 抗体 2 種を同時に与えると、中和作用が劇的に増強され中毒を防止できることを立証した。ヒトの中毒治療薬を目指し、マウス抗体をヒト化する検討に入った。

(2) 構造が複雑で不安定な抗腫瘍性エンジン(-)-maduropeptin クロモフォアの立体選択的全合成を達成した。文献構造の誤りも全合成によって訂正した。Kedarcidin や C-1027 クロモフォアグリコンの合成にも世界で初めて成功した。

Conclusion



5. 今後の計画

(1) 最重要な CTX1B の ABCDE ハプテンを大量合成する一方、ミリグラム単位の再全合成を

達成し、高感度で確実なサンドイッチ ELISA 検定法を確立する。C-CTX の全合成と抗体作製、全てのマウス抗体のヒト化を進める。合成 (擬似) シガトキシンや誘導體類の電気生理学的特性やチャンネルサブタイプミュータントへの作用特異性を明らかにし、結合部位を探索する。クライオ電顕解析も展開する。(2) (-)-Maduropeptin クロモフォアの DNA 切断特異性を調べ、天然物と比較して、分子全体の絶対配置決定と活性化機構を明らかにする。グリコシル化によって Kedarcidin や C-1027 クロモフォアの全合成を完成し、新機能を有する新規抗癌剤の設計に資する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

- 1) Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of Pacific Ciguatoxins. T. Tsumuraya, I. Fujii, and **M. Hirama**, *Toxicon*, in press (2009).
 - 2) Total Synthesis of Protected Aglycon of Kedarcidin Chromophore. K. Ogawa, Y. Koyama, I. Ohashi, I. Sato, and **M. Hirama**, *Angew. Chem. Int. Ed. (HIP)*, **48**, 1110-1113 (2009).
 - 3) Critical Importance of the 9-Membered F-Ring of Ciguatoxin for Potent Bioactivity: Total Synthesis and Biological Evaluation of F-Ring Modified Analogs. M. Inoue, N. Lee, K. Miyazaki, T. Usuki, S. Matsuoka, and **M. Hirama**, *Angew. Chem. Int. Ed. (VIP)*, **47**, 8611-8614 (2008).
 - 4) Secure Route to The Epoxybicyclo[7.3.0]dodecadienediylne Core of Kedarcidin Chromophore. K. Ogawa, Y. Koyama, I. Ohashi, I. Sato, and **M. Hirama**, *Chem. Commun.*, 6327-6329 (2008).
 - 5) Internal Amide-Triggered Cycloaromatization of Maduropeptin-Like Nine-Membered Eneidiene. Y. Norizuki, K. Komano, I. Sato, and **M. Hirama**, *Chem. Commun.*, 5372-5374 (2008).
 - 6) How Protein Recognizes Ladder-like Polycyclic Ethers: Interactions between Ciguatoxin (CTX3C) Fragments and Its Specific Antibody 10C9. M. Ui, Y. Tanaka, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Inoue, **M. Hirama**, and K. Tsumoto, *J. Biol. Chem.*, **283**, 19440-19447 (2008).
 - 7) Critical Contribution of Aromatic Rings to Specific Recognition of Polyether Rings: The Case of Ciguatoxin CTX3C-ABC and Its Specific Antibody 1C49. K. Tsumoto, A. Yokota, Y. Tanaka, M. Ui, T. Tsumuraya, I. Fujii, I. Kumagai, Y. Nagumo, H. Oguri, M. Inoue, and **M. Hirama**, *J. Biol. Chem.*, **283**, 12259-12266 (2008).
 - 8) Total Synthesis of the C-1027 Chromophore Core. Extremely Facile Eneidiene Formation via SmI₂-Mediated 1,2-Elimination. M. Inoue, I. Ohashi, T. Kawaguchi, and **M. Hirama**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 1777-1779 (2008).
 - 9) Synthesis of the Bicyclo[7.3.0]dodecadiene Core of the Maduropeptin Chromophore. K. Iso, M. Inoue, N. Kato, and **M. Hirama**, *Chem. Asian J.*, **3**, 447-453 (2008).
 - 10) Total Synthesis of the Maduropeptin Chromophore Aglycon. K. Komano, S. Shimamura, M. Inoue, and **M. Hirama**, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14184-14186 (2007).
 - 11) Synthesis of the Entire Carbon Framework of the Kedarcidin Chromophore Aglycon. F. Yoshimura, M. J. Lear, I. Ohashi, Y. Koyama, and **M. Hirama**, *Chem. Commun.*, 3057-3059 (2007).
 - 12) Synthesis of the LMN-Ring Fragment of Caribbean Ciguatoxin. K. Yoshikawa, M. Inoue, **M. Hirama**, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 2177-2180 (2007).
 - 13) Convergent Synthesis of the ABCDE-Ring Fragment of the Caribbean Ciguatoxin C-CTX-1. M. Inoue, F. Saito, M. Iwatsu, Y. Ishihara, **M. Hirama**, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 2171-2175 (2007)
- ホームページ
<http://www.ykbsc.chem.tohoku.ac.jp/index.html>