

研究課題別中間評価結果

1. **研究課題名:** シガトキシン類全合成-抗体調製・食中毒予防と神経科学の新展開

2. **研究代表者:** 平間 正博 (東北大学 大学院理学研究科 教授)

3. **研究概要:**

海産物食中毒シガテラの原因毒シガトキシン類は、天然からは極微量しか得られない。本研究は、極めて複雑で巨大な構造を有するシガトキシン類の一般性の高い全合成法を開発するとともに、取得した合成シガトキシン類による中毒予防のための抗体調製や、バイオプローブとして用いて神経科学の基礎と応用の新展開を図る。

全合成は東北大平間グループ、抗体調製は大府大藤井グループ、神経科学に関する電気生理は広島大山岡グループ、チャンネル構造解明のための電顕は産総研佐藤グループ、蛋白X線構造は東大津本グループがそれぞれ担当し、共同的に研究を行っている。以下、成果の要点をまとめらる。

(1) シガトキシン類の全合成とCTX構造活性相関(平間グループ)

研究の対象となるシガトキシン類は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として13個のエーテル環が梯子状に連なった巨大分子である。

CREST 研究において、オレフィン閉環メタセシス反応を鍵反応として、3種類の二環構築型ポリエーテル連結法を考案し、2001年にCTX3Cの収束的全合成を世界で最初に達成した。ただ、この第一世代CTX3C全合成では諸研究に供給できる量をとることは困難であった。SORSTでは(1)アルコールの保護基をナフチルメチル基(NAP)に改変すること(特許出願)(2)左右二大セグメントを連結する際、クロロスルフィドとアルコールから銀塩を用いてO,S-アセタールを合成する温和で短工程のカップリング法(特許出願)(3)全合成の収束性を上げるためのサブフラグメントの合成法等の改良で、全体で13工程以上短縮した効率的な立体選択的CTX3C合成法を開発できた。(4)さらにG環部ラジカル環化反応の位置選択性を向上させる新たな合成手法を開発し、生理活性研究への供給に十分量(数mg)の51-HydroxyCTX3Cも全合成できた。

このような「二環構築型ポリエーテル連結」環状ポリエーテル合成法は同系統の他の海産毒等へも応用できると考えられる。

次にシガトキシン類の環構造が生理活性(毒性)にどのように影響するかを、各種中間体や副生成物を用い検討したところ、中央部の環構造(FG環部)を持たなくとも細胞毒性を持つものがあるが、Na⁺チャンネルへ強く結合するには中央部の環構造が不可欠ことが示唆された。

(2) 抗体調製と高感度定量イムノアッセイ法の開発(藤井グループ)

シガトキシン類の中でマウス毒性の高い同族体(CTX3C、51-HydroxyCTX3C等)は、M環に水酸基を有する。合成したM環にOH基を有する右側HIJKLM(1B-HM)環部をハプテンとしてマウスに免疫した結果、モノクローナル抗体8H4を得ることができた(特許出願)。この抗体はポリエーテ

ル海産毒(ブレベトキシン類など)とは交差反応を示さない。この抗体 8H4 と既に作製した CTX3C の ABCDE 環部認識抗体 10C9 を組み合わせるサンドイッチイムノアッセイ法により 51-HydroxyCTX3C を高感度(1ng/mL)で検出することができた。またサンドイッチイムノアッセイ法の改良で超高感度化(数 pg/mL)も達成した。シガトキシン類の簡易検出キットにつながる。(平間グループ・細胞科学研究所)

(3) サンドイッチイムノアッセイによる実際のシガテラ魚の検出(平間グループ)

(2)で開発したイムノアッセイ法の実用性を検証するため、沖縄近海産魚類の400個体以上を解体・抽出処理し(沖縄県衛生環境研)、アッセイしたところ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。いま現在抽出法の最適化と、他のシガトキシンの検出を急いでいる。

(4) 抗体変異とX線構造解析(津本グループ)

抗体とシガトキシン類との複合体のX線結晶構造解析と SPR 解析により、抗体が環状ポリマー分子を認識する機構を解析している。抗体の抗原結合部には、Tyr、Phe や Trp が多数存在し、これらの芳香族アミノ酸残基が縮環ポリエーテルの認識に重要な役割を担っていること、および、特に 191Tyrが抗原の結合速度を大きく促進する機能を有していることがわかった。これらの構造情報により、遺伝子改変による抗体の改良ができる。

(5) 電気生理学によるNa⁺チャンネル機能改変と結合部位の解明(山岡グループ)

合成CTX3Cを脳や心臓の電位依存性Na⁺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の投与により、Na⁺チャンネルの活性化過程の閾膜電位を約-30mV程度過分極側にシフトさせた(チャンネルを開き易くした)。また遅い不活性化過程(長い脱分極の影響)からの回復を著しく遅延させることも分かった。このようにCTX3CはNa⁺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双方のゲート機構に影響する分子であることを明らかにした。またアミノ酸変異導入法により、シガトキシンはイオンチャンネル孔に入り込むのではなく、外側からチャンネルに結合して作用するという重要な知見が得られた。

(6) 電子顕微鏡によるシガトキシンとNa⁺チャンネル複合体構造の視覚化(佐藤グループ)

電位依存性チャンネルの開閉(ゲイティング)構造解明を結晶化させずに視覚化できる電子顕微鏡単粒子解析を試みている。サンプルを瞬間凍結して、4Kの極超低温で電子顕微鏡撮影した画像の解析から全画像のうち約40%が構造変化を起したNa⁺チャンネルであることを特定できた。この開状態の結果と、既に決定した閉状態でのNa⁺チャンネルの構造との比較から、開閉機構を明らかにしつつある。

4. 中間評価結果

4 - 1 研究の進捗状況と今後の見込み

SORST での当初計画は以下の3点

シガトキシンの効率的な新合成法が確立したこと。

シガトキシン検出キットについて見通しが得られること。

毒性発現機構についての研究の進展が見られること。

で順調に推移している。とくに、シガトキシン CTX3C の全合成を行うにあたり、クロロスルフィドとアルコールから O,S-アセタールを生成するクロスカップリング法の開発などブレークスルーを見出し、全合成に成功して、その生理活性研究に十分な量を供給できるようになっている。この結果今まで学問的に未解明な神経生理学等への研究展開ができることとなり、波及効果も大きい。

4 - 2 研究成果の現状と今後の見込み

ポリエーテルの合成研究は世界中で多くのグループが関わっているが、多くは単なる合成研究に留まっている。これに比べ、平間グループの SORST での研究は、全合成の先鞭をつけたばかりでなく、大量取得(数 10mg)にまで及びまさに「力量ある有機合成」が達成された。この物質を利用して、また合成中間体を利用してさまざまなバイオケミストリーやフィールドワークへと総合展開している。神経毒の作用機構等については緒についたばかりであるが、今後科学的及び社会的インパクトの強い成果が期待できる。

4 - 3 総合的評価

30個以上の不斉炭素を有し、9員環骨格を中心とする13個のエーテル環が繋がった巨大分子であるシガトキシン CTX3C の全合成を行うにあたり、種々の合成法の開発を駆使したブレークスルーがあり、CTX 各種の全合成に成功して、その生理活性(神経毒)解明に十分な量を供給できるようになった。

またサンドイッチ型の抗体による検出法という成果をもとに実用的なシガテラ毒の防疫への道も開けつつある。ただし、これらの応用研究には新しい切り口の展開が必要である。後半2年間は研究の焦点を絞り、関係する研究者の総意を結集した新戦略に期待したい。