

研究課題別 事後評価結果

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. 研究内容および成果：

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(CTX)類について、一般性の高い全合成法の開発および中毒予防のための抗体調製を行った。また、取得した合成 CTX 類を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った。

以下、成果の要点をまとめる。

1) CTX 類の全合成と CTX 構造活性相関

アルコールの保護基をナフチルメチル基(NAP)に改変することによって全合成最終工程における保護基の除去の高収率化を達成した。また、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を開発し、CTX 類の左右二大セグメントの効率的合成法を確立すること、および全合成の収率を上げるためのサブフラグメント合成法等を改良することにより、全体で 13 工程を短縮した効率的な立体選択的 CTX3C 合成法を開発した。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、生理活性研究に十分な量(数 mg)の 51-HydroxyCTX3C の全合成に成功した。これに加え、太平洋地域におけるシガテラ中毒の原因毒の可能性が高い CTX1B の全合成も成功した。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応用可能であると考えられる。

次に、CTX 類の環構造が生理活性(毒性)にどのように影響するかを、合成中間体、副生成物や合成類似体(擬似シガトキシン)を用いて検討したところ、マウス毒性、細胞毒性、及び Na⁺チャネルへ強く結合するには中央部の F 環構造が 9 員環であることが不可欠と分かった。

2) 抗体調製と高感度定量イムノアッセイ法の開発

M 環に水酸基を有する CTX 類の中でマウス毒性の高い同族体(CTX3C、51-HydroxyCTX3C 等)に対する抗体の作製を目指し、M 環に水酸基を有する右側 HIJKLM(1B-HM)環部を合成し、ハプテンとしてマウスに免疫した結果、ポリエーテル海産毒(ブレベトキシン類等)とは交差反応を示さないモノクローナル抗体 8H4 を得ることが出来た。この抗体 8H4 と既に作製した CTX3C の ABCDE 環部認識抗体 10C9 を組み合わせる発色法サンドイッチイムノアッセイ法により、51-HydroxyCTX3C を高感度(2pg/mL)で検出することが出来、CTX 類の簡易検出キットの開発につながる成果を得た。

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

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・抽出処理してアッセイした。別途開発した「発光法」サンドイッチイムノアッセイ法により沖縄産

イッテンフェダイから CTX3C が一度検出されたが、その後、高感度化した発色法サンドイッチイムノアッセイ法により精査したところ、CTX3C は検出されなかった。また、LC/MS法によっても同様に CTX3C は検出されなかったので、発光法より発色法の信頼性が高いことが分かった。そして、LC/MS法により、合成標品との比較によって、イッテンフェダイやバラフェダイに CTX1B が含まれていることが判明した。

4) 抗体変異と X 線構造解析

抗体と CTX 類との複合体の X 線結晶構造解析と SPR 解析により、抗体が環状ポリエーテル分子を認識する機構を解析したところ、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 10C9 抗体は、ABCDE 抗原の A 環を下にして奥深く受け入れる縦長の巨大な抗原結合ポケットを有していることが分かった。

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可能となった。

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

合成 CTX3C を脳や心臓の細胞膜の電位依存性 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 は、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チャンネルを開き易くすること、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が分かった。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 CTX3C は、K⁺チャンネルには作用せず Na⁺チャンネルに特異的に作用することも分かった。

6) 電子顕微鏡による CTX と Na⁺チャンネル複合体構造の視覚化

電位依存性チャンネルの開閉(ゲーティング)構造を結晶化せずに視覚化出来る電子顕微鏡単粒子解析を試みた。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% が構造変化を起こした Na⁺チャンネルの画像であることを特定出来た。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

期間中の外部発表、特許等の実績を示す。

発表論文:(邦文) 19 件/(英文) 72 件

口頭発表:(国内) 214 件/(海外) 60 件

特許出願:(国内) 11 件/(海外) 3 件

世界に先駆けて CTX 類の全合成に成功したこと、有機合成化学的な新発見はもとより免疫学、神経科学の分野においても新たな展開を示したことは、特に天然物合成の研究を発展させていく上で重要な成果である。これらは、研究代表者が全合成に成功したフグ毒テトロドトキシンに続く、世界をリードする日本の海産毒研究として評価出来る。一方、農学・水産学の分野におけるシガ

テラ毒研究も進んでおり、今後これらの分野との連携による研究の一層の進展と、一般社会への貢献が期待される。ただし、チャンネル構造解析および沖縄近海の毒化した魚の検出においては、研究手法を含めて検討の余地を残しており、今後の成果報告に注目したい。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

生物活性を調べることが出来る十分な量(数mg)の CTX 類 (CTX3C、51-HydroxyCTX3C、CTX1B 等)の合成に成功し、種々の生理活性の解明が出来たこと、沖縄産イッテンフエダイが CTX1B を含むことを初めて証明したこと等、インパクトの高い成果を上げた。分子生化学、神経科学、水産学および衛生化学等の各分野との連携により、CTX 類の微量分析、Na⁺チャンネルの結合部位、同チャンネルを構成するタンパク質や脂質膜上のダイナミックな構造研究、および毒化した魚の簡易な識別法・予防法等、多様な基礎研究、応用研究への展開が期待出来る。また、天然物を越えるような活性を示す CTX のハイブリッドアナログ等、有機合成化学の分野においても成果が期待される。

4-3. その他特記事項(受賞)

期間中の主な受賞は次の通りである。

平間正博：日本化学会賞（平成 15 年 3 月）

大栗博毅：天然物化学談話会奨励賞（平成 14 年 3 月）

井上将行：第 1 回 Merck Banyu Lectureship Award(MBLA)（平成 16 年 11 月）

井上将行：日本化学会進歩賞（平成 17 年 3 月）

大栗博毅：日本化学会進歩賞（平成 18 年 3 月）