戦略的創造研究推進事業 発展研究(SORST)

研究終了報告書

研究課題「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」

> 研究期間: 平成14年11月 1日~ 平成20年 3月31日

研究代表者氏名 平 間 正 博 (東北大学大学院理学研究科、教授)

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. 研究実施の概要

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。その原因 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して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」=[X+2+Y]を考案し、2001年にCREST研究 においてシガトキシンCTX3Cの収束的全合成を世界で最初に達成した。しかし、 当時の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110以上に及ぶことが、CTX3Cの 量的供給への課題であった。本SORST研究では、新規合成法を開発しながら合 成ルートを短縮・効率化し、より簡便かつ信頼性の高い第二世代全合成法を開 発する。そして、シガトキシン類の一般性の高い全合成法の開発を基盤にして、 共同研究によって中毒予防・治療のための抗体調製や、合成シガトキシン類を 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ることを目的 とした。以下に重要な研究成果概要を箇条書きにまとめた。

(1)合成シガトキシンを諸研究に供給できる実践的な第二世代 CTX3C(数ミ リグラム)合成法を開発し、合成 CTX3C を用いて関連する学際的研究を進展さ せた。即ち、①セグメントの効率的調達、②NAP 基による新保護基戦略、③左 右二大セグメントの新規縮合法開発等によって、全体の効率・収率を向上させ、 最長の直線的合成工程数を 60 段階段階から 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かなり少なくなった。

(2) 第二世代合成法によって、最強の毒性をもつ 51-HydroxyCTX3C を世界で 初めて全合成(数ミリグラムスケール)することに成功した。

(3) 合成した 51-HydroxyCTX3C に加えて、学際的共同研究のために必要な B 環とM環の水酸基にビオチン等をコンジュゲートした種々のバイオプローブの 合成を検討できるようになり、問題であった M 環コンジュゲート作成法も見出 した。

(4)更に、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 CTX (CTX1B)の全合成を達成した。

(5) アシルラジカルのラジカル受容体としてエノールエーテルを用いた新し いラジカル反応を活用した、シガトキシン類左半分セグメント(ABCDE 環部) の新効率的合成法を開発した。 (6) 最近発見されたカリブ海産シガトキシン C-CTX は、太平洋産 CTX より複 雑な構造を有する。その ABCDE 環部と HIJKL 環部の合成に成功した。左半分に 対する抗体の作成にも成功した。

(7) CTX1B と 51-HydroxyCTX3C 等、毒性の強い重要なシガトキシン類に共通 の右側半分(HIJKLM 環部)を有する全合成中間体をハプテンとして、CTX1B と 51-hydroxyCTX3C 等の右半分を特異的かつ高感度で認識するモノクローナル抗 体 8H2 の作製に成功した。従って、我々が開発した5環性以上のハプテンと KLH コンジュゲートを抗原としてマウス免疫する方法が、毒本体を用いないで抗シ ガトキシンモノクローナル抗体を作る合理的で普遍性の高い方法であることが 証明された。

(8) 抗体 8H2 と既に作成済みのモノクローナル抗体 10C9 (CTX3C の左半分 (ABCDE 環部)を認識する)を組み合わせて、51-hydroxyCTX3C 等を 2 pg/mL で高感度・特異的に検出できる発色法サンドイッチイッチイムノアッセイ (ELISA) 法を確立した。

(9)一方、CTX3Cを左右から認識するモノクローナル抗体10C9と3D11を用いた 発色法、並びに発光法サンドイッチイムノアッセイ(ELISA)を開発改良し,CTX3C を高感度(<10 pg/mL)で検出できるようになった。

(10)そこで、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上記CTX3C発色法サンドイッチイムノアッセ イを適用した結果、マウス毒性を示すシガテラ魚、沖縄産イッテンフエダイの 中に、CTX3Cを含むものが検出されたが、その後の検討では、CTX3Cを含むもの は再検出されなかった。

(11) CTX3C および、51-hydroxyCTX3C 等を pg/mL で高感度・特異的に検出で きる発色型サンドイッチイムノアッセイ(ELISA)を、漁場や市場で実用的に使 用できる簡便迅速高感度検出キットへと開発中である。

(12) CTX3C の抗体 3D11 や 10C9 は、CTX3C で中毒したマウス体内のシガトキ シンを中和できること、即ち中毒したマウスの治療ができることを明らかにし た。更に、抗体を単独で用いるより、2種の抗体を混合して使うと中和力が劇 的に増強された。

(13) 抗シガトキシン抗体とハプテンとの複合体の X 線結晶構造解析も進展 した。近日中に、抗体・シガトキシン・抗体- サンドイッチ複合体の構造と分 子認識を明らかにできると期待される。

(14)構造活性相関研究も進展した。F環を8員環にして回転や配座変換を 不可能にした疑似シガトキシン 51-hydroxyCTX3C を合成したところ、細胞毒性 やマウス毒性が実質的に消失した。F環を開環して回転可能な12環性疑似シ ガトキシンにしても同様であった。F環を10員環にすると細胞毒性、マウス 毒性は残ったが、活性は大きく低下した。シガトキシンの毒性発現には、F環 が多少の立体配座的自由度を有する9員環であることが必須構造要件であるこ とが判明した。

(15) CTX3C を電位依存性 Na⁺チャネルに投与し、電気生理学的にチャネル機 能改変を解析した。その結果、CTX3C がナトリウムチャ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でに ない特異な分子であることが明らかになった。更に、CTX3C は、マウス味覚細 胞のカリウムチャネルには作用せず、ナトリウムチャネルに特異的に作用する 興味深い分子であることも判明した(イタリア・モデナ大学 Bigiani, Ghiaroni 教授との共同研究)。

(16) CTX3C と電位依存性ナトリウムチャネルの結合構造をクライオ電顕に よって解析中であり、チャネルの開構造について重要な知見が得られつつある。

以上、当該研究を1989年に開始してから12年後の2001年になって CTX3Cの世界最初の全合成に成功し、現在は、学際的研究のバイオプローブとし ても活用できるシガトキシン類の量産や疑似・修飾シガトキシン類の合成がで きるようになった。今後は、電位依存性ナトリウムイオンチャネルとの相互作 用や、チャネルへの結合部位、及びチャネル開閉(ゲイティング)機構・原理 について研究を深めたい。電子顕微鏡解析や電気生理学研究が新たな展開を見 せているので、近日中に神経科学や構造生物学に大きなインパクトを与える原 理発見に迫れるのではないかと期待している。

グループ毎の研究成果概要

"化学合成・分子設計(平間グループ)"

シガトキシン新規合成法の開発、合成ルートの短縮・効率化を遂行し、圧倒 的に簡便かつ信頼性の高い第二世代全合成法を開発した。すなわち、最長の直 線的合成工程数を2001年当時の60段階から47段階へと劇的に短縮できた。こ れによりCTX3C(数ミリグラム)を用いて関連する学際的研究を進展させた。 また、新規縮環ポリエーテル合成法を開発し、CTX3C、51-HydroxyCTX3C、CTX1B の左右両セグメント合成、および太平洋産CTXより複雑な構造を有するカリブ 海産シガトキシン C-CTXのABCDE 環部合成とHIJKLM 環部の部分合成に成功 した。

確立した第二世代全合成法を応用し、最強の毒性をもつ 51-HydroxyCTX3C を 世界で初めて全合成(数ミリグラム)することにも成功した。そして、学際的 共同研究のために必要な B 環と M 環の水酸基にビオチン等をコンジュゲートし た種々のバイオプローブの合成を検討できるようになった。更に、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 (Ciguatoxin)の全合成を達成した。

また、F環を8、10員環にした13環性擬似シガトキシンおよび開環して回転 可能な12環性擬似シガトキシンを合成し、それぞれの活性を評価することで、 シガトキシンの毒性発現には、F環が多少の配座的自由度を有する9員環である ことが必須構造要件であることを明らかにした。さらに CTX3C の抗体 3D11 や 10C9 は、CTX3C で中毒したマウス体内のシガトキシンを中和できること、即ち 中毒したマウスの治療ができることが分かった。

"抗体調製(藤井グループ)"

戦略的基礎研究推進事業(CREST)で開発した、毒の部分構造に対する抗体 を合理的かつ安全に調製する新手法とサンドイッチイムノアッセイ法を他のシ ガトキシン類に適用することを検討した。

CTX3C 右側認識抗体の最適化と A 環にジヒドロキシブテニル基を有する CTX1B 左側認識抗体調製は、新たに 6 環性のハプテンを用いたり、ファージ抗 体法などを試みたりしたが、満足のいく結果は得られず検討の余地を残した。 しかし、シガトキシン類の中でも重要な 51-HydroxyCTX3C、CTX1B を認識する 右側認識抗体 8H4 を作製することができた。ハプテンから得られた 8H4 は毒本 体である 51-HydroxyCTX3C そのものに対しても高い親和性 (K_d = 75 nM) を有 しており、十分シガトキシンを認識することがわかった。さらに、以前作製し た CTX3C 左側認識抗体である 10C9 を組み合わせることにより、 51-HydroxyCTX3C の分子両端を抗体で捕捉するサンドイッチイムノアッセイ法 を確立した。また、カリブ海産シガトキシン C-CTX 左側認識抗体も 5 種類の有 用な候補を得た。中でも 4H5 (K_d = 3.0 nM) は C-CTX 含有中毒魚の抽出液を用 いた ELISA 実験から、C-CTX そのものとの結合を示唆する結果が得られた。

一方、細胞化学研究所の佐藤威博士との共同研究によって、これらイムノア ッセイ法を垂直フロー型簡易検出キットへと発展させ、51-HydroxyCTX3Cを約 15分で10pg/mLの高感度で簡便に検出できるキット開発に成功した。

これら抗体とキットについては、米国企業との間でライセンシングが検討中 である。

"チャネル構造解析(佐藤グループ)"

電気うなぎの発電器官から精製した Na チャンネルを、He ステージ電子顕微 鏡を用いて薄いバッファー層に凍った状態でタンパク質粒子を閉じ込め、その 投影像を無染色で撮影すると、その構造はベル型であり、内部のイオン透過機 械は高い密度であり、固く閉ざされていることが過去の研究で明らかにできた。 そこで、この精製Na チャンネルが平間グループで合成された CTX3C によって、 どのような 3 次元構造変化を起こして開状態に移行するかに取り組んだ。

開状態への移行を誘発する毒 veratridine の濃度が 5 μ M の状態で、1 μ M の CTX3C を加えると Na チャンネルの半数弱が膨張し、内部に空間ができる構造 をとることを見出した。この状態でさらに 30 分程度放置すると、さらに様々な 構造バリエーションが生じることも判明した。そこで毒を加えて数分以内に急 速凍結させ、分解能のでる 4 K の極超低温電子顕微鏡で Na channel と CTX・ veratridine との複合体をクライオ電子顕微鏡撮影し、厳選された 4 万枚程の電子 顕微鏡像を用いて、構造解析を検討した。その際、異なった構造が混ざった投 影像から、3次元を再構成できるプログラムを開発しながら、3次元再構成に取 り組み、重要な新知見が得られつつある。

"抗体遺伝子(津本グループ)"

シガトキシンの検出薬あるいは中毒診断・治療薬の開発に繋がる認識素子の 分子基盤確立を目指し、抗体によるシガトキシン認識機構について立体構造に 基づいた分子・原子レベルでの解明に取り組んだ。

CTX3C 左側に対して強く結合する 1C49 および 10C9 についてそれぞれ複合体 とのX線結晶構造解析を行った。その結果、1C49 は CTX3C-ABC を完全に埋ま る形で結合する横長の窪みを有しており、Tyr、Trp、Phe などの芳香性アミノ酸 による多数の van der Waals 相互作用、疎水性相互作用が共同的に機能している ことがわかった。10C9 は 1C49 とは異なる縦長の巨大な抗原結合ポケットを有 しており、二種の抗原はどちらも A 環を下にして縦に突き刺さるように結合す ることが明らかになった。10C9 は CTX3C-ABCD と ABCDE の両方とも認識で きるが、二種の抗原認識で最も顕著な差が見られたのは抗原抗体複合体の熱安 定性であり、抗体単独の場合に比べて CTX3C-ABCDE との複合体では非常に高 い熱安定性が得られた。また、CTX3C-ABCD 結合に伴って Fab には著しい構造 変化が誘起されることで安定化が十分得られないことも考察できた。以上のこ とから、10C9Fab と E 環との相互作用が抗原認識に大きく影響することが示唆 された。

"電気生理(山岡グループ)"

シガトキシンは Na チャネルのサイト5 に結合するとされているが、その結合 の詳細は不明のままである。そこで、平間グループによって合成されたシガト キシンおよびその類似物質の機能を電気生理学的実験によって定量,評価する ことまた,分子生物学的手段をもちい Na チャネル分子の改変を併用することに よって、シガトキシンの結合部位の予測をすることを目標とした.

過去の研究からシガトキシンは、Na チャネルのピーク電流の抑制、活性化・ 不活性化電位の過分極側への移動、静止電位付近での持続的内向き電流発生が 知られていた。本研究で新たに、Na チャネルに電位を与えてからピーク電流に 達するまでの時間の短縮,不活性化から回復する時間経過が CTX3C 投与によっ て著しく遅くなることがわかった。これらは各種 Na チャネル (Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5) に対し同程度の効果を呈することも確認できた。さらに、感覚神経選択 的に発現する Na チャネルサブタイプの Nav1.8 に対し,静止電位付近で持続的電 流を発生させる作用が他の Na チャネル(Nav1.2, Nav1.4)よりも 10 倍も強いことが わかった. このことはシガトキシンにより発症するシガテラの症状である痛覚 過敏,異痛症をよく説明するとともに Nav1.8 が痛み感覚経路に重要な役割を果 たすことを示している。

"中毒魚検定(平間・沖縄グループ)"

ELISA 法によるシガトキシン類検出の実証性を確認するため、シガテラ毒含 有魚の収集、シガトキシン類抽出および前処理法の検討、LC/MS 法によるシガ トキシン検出、CTX-ELISA の評価に取り組んだ。

CTXs-ELISA の実証性を評価するために、沖縄沿岸産の有毒魚肉抽出物試料および、沖縄県内で発生した食中毒試料について、51-HydroxyCTX3C-ELISA による分析を実施した。しかし、いずれの試料からも 51-HydroxyCTX3C は検出されなかった。

沖縄産有毒魚における CTX3C シリーズの存在を確認するために、LC/MS で分 析を行ったところ、CTX1B のピークは確認されたが、51-hydroxyCTX3C および、 CTX3C のピークは検出されなかった。その結果、沖縄地域で発生するシガテラ 食中毒の主要毒素は CTX1B であり、CTX3C 系列の毒素は、中毒に関与してい ない可能性が示唆された。以前、イッテンフエダイから ELISA により CTX3C が検出された事実との矛盾は未解決である。

3. 研究構想

基本構想

本来無毒の魚類が毒化して起こる食中毒シガテラは、熱帯・亜熱帯で広く発 生し、現在も数百万人がその危機にさらされ、患者数は年間 5 万人を超えると 報告されている。シガテラ中毒では、知覚異常、倦怠感、関節痛などが数カ月 も続き、症状がひどい場合は死亡する。この食中毒の原因毒として単離された シガトキシン(CTX)類は、約 30 個の不斉炭素、13 個の縮環エーテルを持つ分 子長 3 nm の巨大分子である。CTX 類は生産微細藻類から、食物連鎖を通じて多 種の魚類(400 種類以上)に蓄積する。毒魚は、見た目、味、においなどでは特 定できず、CTX 類の高感度で簡便な微量検出法の開発が切望されている。この 化合物の毒性は、我々の感覚・感情・思考・動作に関わる電位依存性 Na+チャ ネルに結合して発揮される。自然界の CTX 類は極微量成分であり、天然物によ る詳細な研究の継続は不可能であった。

我々は 2001 年に、代表的 CTX 類である CTX3C の全合成に世界で初めて成功 し(Science 2001, 294, 1904)、CTX 研究最大の問題点であった試料供給を克服 した。その際、我々が開発した画期的な分子構築法を用い、現在までに合成さ れた縮環ポリエーテルの中で最も複雑な CTX3C を、最も短工程で合成した。ま た、有機合成化学の柔軟性を最大限に活用し、無毒の CTX3C 部分構造を利用し て、抗 CTX3C 特異的抗体の作製に成功した。

本 SORST 研究では、我々の開発した合成技術・方法論を駆使し、CTX 類の構造を化学的に自在に調達することで、CTX 類全合成、イオンチャネル活性化原理解明、CTX 類微量検出・治療法開発、イオンチャネル複合体の三次元構造の解明を目的とした。

当初の研究体制として、シガトキシンの化学合成・分子設計(平間グループ)、

モノクローナル抗体調製・サンドイッチ ELISA 開発(藤井グループ)、活性評価 (佐竹グループ)、Na+イオンチャネル三次元構造解析(佐藤グループ)、蛋白工 学による抗体の機能改変(津本グループ)を設けた。

<u>研究計画と新展開</u>

CTX 類は主なもので4種類以上あり、そのすべての全合成を計画した。その際、すでに確立していた合成法と新反応を組み合わせて合成ルートの短縮・効率化を図った。また、合成したシガトキシンおよび合成中間体を利用して、構造活性相関を行い、毒性発現に必要な構造要件の解明を計画した。CTX 微量検出法の開発に関しては、CREST にて確立した5環性以上のハプテンを利用した安全、簡便かつ合理的なモノクローナル抗体調整法をさらに発展させ、20種以上知られているシガトキシン類に対する抗体ライブラリーの確立を目指した。また、シガトキシンと抗体の複合体のX線結晶構造解析により、分子認識を原子レベルで解析し、抗体の機能向上・新たな認識素子の開発も目指した。神経科学の分野で最も基本で、一番注目を集めている Na+イオンチャネルの開閉構造の三次元解析は、シガトキシン - Na+チャネル複合体の極超低温下での電子顕微鏡撮影で可視化できると考えた。

研究の進展に伴い、あらたに電気生理学による Na+チャネル機能改変と結合 部位の解明のため、広島国際大の山岡グループにも研究に参画してもらった。 さらに、簡便・高感度シガトキシン検出キットの開発のため、(株)細胞科学研 究所の佐藤威氏の強力な支援を得た。また、沖縄県衛生環境研究所の大城グル ープにも参画してもらい、実際にシガテラ中毒が発生している沖縄県近海産の 魚類の実地検査を行った。

以上の研究は、化学・生物学・神経科学の基礎研究として挑戦的で画期的で あるばかりでなく、人々の健康や魚類資源の有効利用の社会的要請にも応える ものである。

4. 研究実施内容

4.1 "化学合成・分子設計(平間グループ)"

実施の内容

(1) 合成シガトキシンを諸研究に供給できる実践的な第二世代 CTX3C(数ミリグラム) 合成法を開発し、合成 CTX3C, 51-HydroxyCTX3C を用いて関連する 学際的研究を進展させた。

まず、最終段階である保護基の除去において NAP 基を用いることで、再現よ く CTX3C が得られることを見出した。NAP 基は最終反応以外では極めて安定で あり、非常に有効な保護基であった。また、エポキシアセタールの立体選択的 還元反応を鍵とする右セグメントの効率的調達法を開発した(Scheme 1)。従来 法では、IJKLM 環部に対して H 環部を導入していたが、あらかじめ HI 環部を 合成した後に LM 環部と連結することにした。森らが開発したエポキシスルホ ン2を用いて、HI 環部 3を5 工程で合成した。3と LM 環部 4を連結し、次い でJ 環部を構築して6を得た。以前、6への立体選択的水和反応が問題となって いたが、6から誘導したエポキシド7に対する還元反応で望む8が単一の立体異 性体で得られることを見出した。8からK 環部の合成を経て CTX3C 右セグメン ト9の合成を完了した。さらに、同様の戦略により、M 環部に水酸基を有する CTX1B 右セグメント12 の合成も達成した。



Scheme 1. Improvement of the synthesis of the right wings of ciguatoxins.

左右両セグメントの効率的合成法が確立できたので、左右二大セグメントの 新規縮合法開発を行った(Scheme 2)。2001年に達成した CTX3C の全合成にお いて、巨大な部分構造の連結・チオフェニル基の導入にルイス酸性の強い Sc(OTf)3・TMSOTf を用いていた。しかし、シガトキシン類には CTX1B などの 酸性に不安定な同族体が多く存在し、より温和な条件での連結反応が切望され ていた。そこで、クロロスルフィドの銀塩による活性化を利用した O.S-アセタ ール直接合成法を開発した。スルフィド14にNCSを作用させるとα-クロロスル フィド15が効率よく得られた。15を二級アルコールの13とともに AgOTf で処 理したところ O.S-アセタール 16 が良好な収率で得られることを見出した。16 から誘導したメチルアクリレート 17 に対してラジカル反応を行ったところ、 7-exo で環化が進行し、18 を合成できた。また、17 のメチル基をペンタフルオ ロフェニル基に変えた19に対して反応を行うと、より効率的にG環部が構築で きた。18 及び 20 から既知の方法で EFGH 環部 21 及び 22 を合成した。この第二 世代全合成の開発により、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い。



Scheme 2. Direct O,S-acetal formation from chlorosulfides and alcohols.

(2) 第二世代合成法によって、最強の毒性をもつ 51-HydroxyCTX3C を世界で 初めて全合成することに成功した (Scheme 3)。51-HydroxyCTX3C は分子の末端 である B 環部と M 環部にそれぞれ水酸基を有しており、シガトキシンを用いた 分子プローブの基礎骨格として最適である。我々はすでに 51-HydroxyCTX3C を 数ミリグラム単位で全合成しており、シガトキシンを用いる生体関連分野の研 究が飛躍的に進展した。具体的には、B 環と M 環 (51 位)の水酸基にビオチン 等をコンジュゲートした種々のバイオプローブの合成を達成し、学際的共同研 究を発展させた。



Scheme 3. Total synthesis of 51-HydroxyCTX3C.

(3)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 Ciguatoxin (CTX1B)の全合成を達成した(Scheme 4)。CTX1B は E 環部分が CTX3C、51-HydroxyCTX3C とは異なり7員環であり、A 環部に酸性・塩基性・酸化条件に不安定なビスアリルエーテル構造を有しており、シガトキシン類の中でも最も合成が困難な分子である。

我々が開発した直接的 O,S-アセタール合成は、温和かつ強力な分子連結法で あるため、化学的に不安定な CTX1B の左右両フラグメント 28、24 においても 問題なく適用でき、29 を良好な収率で得た。更に、ペンタフルオロフェニル基 を用いたラジカル反応は、CTX1B でも極めて有効であり、G 環エーテルを優先 的に構築できた。NAP 基を利用した新保護基戦略も効果的で、不安定な A 環部 側鎖を保持したまま 6 つの水酸基を脱保護でき、CTX1B の全合成を完了した。 最も合成困難な CTX1B が合成できたことで、我々のシガトキシン網羅的全合成 法の一般性を証明できた。



Scheme 4. Total synthesis of ciguatoxin (CTX1B).

(4) アシルラジカルを用いた新しいラジカル反応を活用し、シガトキシン類 左半分セグメント(ABCDE 環部)の新効率的合成法を開発した(Scheme 5)。 第二世代全合成法により、シガトキシン類が共通して有している FG 環部の合成 法は確立できた。かえって部分構造をいかに効率的に合成するかが求められる までになった。そこで、全合成の終盤で利用した O,S-アセタール連結反応の有 効性に着目し、O,S-アセタールを鍵中間体とする新規縮環ポリエーテル合成法を 検討した。具体的にはオレフィンに対するアシルラジカルの付加反応を利用す ることとした。

まず、8 員環である E 環部の合成を行った。D-ブドウ糖を原料として Evans らの報告を参考にアシルラジカル環化反応を用いて7員環ケトン36を単一の立 体で合成し、その後環拡大反応を用いて、8 員環 E 環 37 を選択的に合成した。 オレフィンメタセシスを用いる従来法を、収率・立体選択性・工程数ともに上 回ることができた。 既知のAB環部から容易に誘導できるクロロスルフィド38と37を連結させる と、期待通りO,S-アセタールが高収率で合成できた。39からエノールエーテル 40へと変換したのちに、ラジカル反応を行うと、セレノエステルから生じたア シルラジカルがエノールエーテルへ付加反応を起こし、7員環ケトン41を単一 の立体異性体で与えた。41から数工程を経てCTX3C 左セグメント23を合成し



Scheme 5. Acyl radical strategy to construct left wing of CTX3C.

た。

(5) 最近発見されたカリブ海産シガトキシン C-CTX は、太平洋産 CTX より 複雑な分子構造を有する。その ABCDE 環部と HIJKL 環部、および LMN 環部の



Scheme 6. Convergent synthesis of left wing of caribbean ciguatoxin (C-CTX).

合成に成功した (Scheme 6 and 7)。新規縮環ポリエーテル合成法であるアシルラジカル戦略は C-CTX の合成にも有効であり、左セグメント 49 の合成を短工程で完了することができた。さらに、左半分 (ABCDE 環部) に対する抗体の作成にも成功した。

同様に、右セグメントである HIJKLMN 環部のうち、HIJKL 環部と LMN 環部 の合成をすでに完了している。右セグメントの合成および C-CTX の全合成も射 程圏内といえる。



Scheme 7. Synthesis of LMN- and HIJKL-ring of C-CTX.

(6)シガトキシンには、分子中央の9員環F環の配座変換に由来する2つの 安定な配座異性体が存在しており、毒性発現には配座変換可能な柔軟構造が重 要ではないかと提唱されていたが、実験的証拠はなかった。そこで我々は、確 立した全合成ルートを応用し、各種構造活性相関研究へ展開した(Table 1)。ま ず、F環を8員環にして配座変換が不可能な疑似シガトキシン51-HydroxyCTX3C を合成したところ、細胞毒性やマウス毒性が殆ど消失した。また、F環を開環し て回転可能な12環性擬似シガトキシン(flexible analog)にしても同様であった。 10員環F環シガトキシンでも大きく毒性が低下した。これらの結果から、シガ トキシンの毒性発現には、F環が多少の配座的自由度を有する9員環であること が必須構造要件であることが判明した。



(7) CTX3C の抗体 3D11 や 10C9 は、CTX3C で中毒したマウス体内のシガトキシ ンを中和できること、即ち中毒したマウスの治療ができることを明らかにした。 更に、抗体を単独で用いるより、2種の抗体を混合して使うと中和力が劇的に 増強されることも見出した。

マウス抗体をヒト型抗体へ改変すれば、ヒトの中毒治療にも利用できると期 待される。

得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

我々は既に、代表的なシガトキシン類である、CTX3C、51-HydroxyCTX3C、 CTX (CTX1B)の全合成を達成した。遷移金属触媒や有機分子触媒など、多種多様な反応が可能になった現在においても、シガトキシン全合成を達成したのは 平間グループのみであり、他グループを圧倒的に凌駕している。世界最大規模 で毎年起こり続けるシガテラ中毒には、地域ごとに異なるシガトキシンが含有 しているため、シガテラ中毒の予防・治療のためには普遍的全合成法の開発と 抗体作製が必須である。本発展研究(SORST)で開発した技術を引き続き発展 させ、シガテラの治療を実現させたい。

また、シガトキシンを分子ツールとした Na+イオンチャネルの電気生理学的、 分子構造学研究はようやく軌道に乗り始めた。特に、シガトキシン - Na+イオン チャネル複合体の単粒子構造解析が世界に与えるインパクトは大きいと期待し ている。今後も研究をさらに発展させ、天然物化学・生物有機化学・生物学・ 神経生理学分野の基礎研究としてばかりでなく、人々の健康や魚類資源の有効 利用の社会的要請に答えていきたい。



<u>実施の内容</u>

(1) CTX3C 右側認識抗体の最適化



これまでに CTX3C の左右 両端を認識する抗体、10C9 お よび 3D11 を得ることに成功し、 これらの抗体を組み合わせる ことにより、CTX3C を高感度 で検出するサンドイッチ ELISA 法を開発することに成 功している。しかしながら、 CTX3C の右端を認識する抗体 3D11 の CTX3C に対する結合 は $K_d = 0.122 \mu$ M であり、抗

体の認識としてはまだまだ弱いと言わざるを得ない。CTX3C 右端特異的モノク ローナル抗体の結合性を向上させることにより、さらにサンドイッチ ELISA に おける感度を高めることが出来るものと期待される。そこで、新たに6環性(H 環~M環)であるハプテン HM(1)を設計し、これを免疫することにより、CTX3C 右端特異的モノクローナル抗体を作製することを検討した。HM-KLH(2)をマウ スに4回免疫し、電気細胞融合法によりミエローマ細胞と融合を行った。



HM-BSA(3)に結合するクローンを選択し、定法に従いクローニングを行い、その結果、4H11(IgG_{2a}κ)、11C11(IgG₁κ)、15F11(IgG₁κ)、18D9(IgG₁κ)、20E12(IgG₁κ)の5個のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。得られたハイブリドーマそれぞれについて大量培養を行い、培養上清から抗マウス IgG アフィニティークロマトグラフィーにより抗体を精製した。

これら5種のモノクローナル抗体の結合特異性を検討する目的で、5種のモノ クローナル抗体について合成ハプテンに対する解離定数(K_d)を求めた。予想通り、 5種のモノクローナル抗体は免疫に用いた4に対して K_d が59.7 nMから2.4 μ M と強い結合を示した。そこで、4に対してもっとも強い結合を示した抗体4H11 についてさらに詳細を検討した。4H11 はシガトキシン CTX3C そのものに結合 し、その K_d = 372 nM であった。この結合力は、これまでに獲得に成功している 3D11 と比べて若干結合力が劣っていた。これまでに、シガトキシン右側認識抗体を3 種作製しているが、それらはいずれも、数 100 nM 程度の解離定数を示し (次項参照)、左側認識抗体(K_d = 2.8 nM)と比べるかなり弱いと言わざるを得ない。 これは、ハプテンと天然物の安定な立体構造が異なることが原因かもしれない。

(2) M 環に OH 基を有するシガトキシン右側認識抗体の調製



太平洋型シガトキシンには主にA環およびM環の構造の異なる4種類の類縁 体が存在し、シガテラ中毒の予防のためには、これら4種のシガトキシンを網 羅的に検出できるシステムが必要である。そこで、M環にOH基を有するシガ トキシン類 (CTX, 51-OH-CTX3C)に対する抗体の作製を目的として、M環に OH基を有する1B-HMを用いて抗体を作製した。1B-HM-KLH(5)をマウスに免 疫したところ8H4,8B9,7C9の3種類のIgGを得ることが出来た。この中でハプ テン1B-HM(6)に対して最も強い結合性(K_d = 48 nM)を示した8H4について詳細 を検討した。8H4はハプテン(1B-HM)および51-OH-CTX3Cそのものに対しても 高い親和性を示した(K_d = 75 nM)。また、8H4はM環に水酸基を持たないシガト キシン CTX3Cには弱い親和性(K_d = 3.2 μ M)しか示さず、他のポリエーテル海産 毒(ブレベトキシン類、オカダ酸、マイトトキシン)とほとんど交差反応を示さな

かった。このように,M環部に水酸基 を有するハプテンを用いることにより、 M環部に水酸基を有するシガトキシン 類(51-OH-CTX3C、CTX1B)を特異性高 く認識する抗体を作製することができ た。

今回作製した 8H4 とこれまでに作製 している抗体 10C9 を組み合わせるこ とにより、51-OH-CTX3C の分子両端を 抗体で捕捉するサンドイッチイムノア ッセイ法を検討した。ELISA プレート 上に固定化した 10C9 と酵素標識(西洋 わさびペルオキシターゼ) した 8H4 を 組み合わることにより 51-OH-CTX3C を高感度(0.1 ng/mL)で検出することが できた(図 1)。本手法は簡便な操作で、



図1サンドイッチイムノアッセイによる 51-OH-CTX3Cの検出

かつ特異的にシガトキシン 51-OH-CTX3C を検出するサンドイッチイムノアッ セイ法である。

(3) A 環にジヒドロキシブテニル基を有するシガトキシン左側を認識する抗体の 調製

次に、A 環にジヒドロキシブテニル基を有するシガトキシン CTX1B の左端部 に対する抗体の作製を検討した。まず、CTX1B の A 環~D 環からなる 1B-AD を用いて抗体の作製を検討した。1B-AD-KLH (7)を Balb/c マウスに 4 回免疫し、 電気細胞融合法により細胞融合を行った。1B-AD-BSA(8)を用いて、結合するク ローンを選択し、定法に従いクローニングを 2 回行いモノクローナル抗体を確 立した。得られた抗体のサブクラスはいずれも IgM であり、またその結合選択 性を ELISA 法により検討したが、選択性はいずれも低いものであった。そこで、 Balb/c とは異なる抗体ライブラリーを持つことが期待される自己免疫疾患マウ ス Mrl/Ipr マウス用いて、1B-AD-KLH (7)の免疫を行ったが、得られてきた抗体 はいずれも IgM であり、またその結合選択性は低かった。



1B-AD-KLH (7) X = KLH 1B-AD-BSA (8) X = BSA

上記に示した通常の免疫法に加えて、ファージライブラリー法を用いて、シ ガトキシン抗体の取得も試みた。1B-AD-KLH (7)を4回免疫したマウスの脾臓を 摘出し、RT-PCR 法により抗体遺伝子を増幅した。抗体のH鎖およびL鎖を順次 ファージミドベクターpComb3 ヘクローニングし、大腸菌へ導入した。ヘルパー ファージを感染させることによりファージ粒子を作製した後、これを 1B-AD-BSA(8)を用いてバイオパンニングを行った。この操作を数回繰り返して、 得られたクローンの合成ハプテンに対する結合力をファージ ELISA 法により調 べたが、1B-AD に強く結合するクローンは全く得られなかった。

さらに、naive なファージ1本鎖抗体(scFv)ライブラリー(Tomlinson Library)を 用いてこれを 1B-AD-BSA(8)に対して選択を行った。その結果, 1B-AD-BSA(8) に対して結合するファージの濃縮が観測され、ファージ ELISA の結果から、 J5-115 を初めとしていくつかのクローンを選択した。J5-115 について1本鎖抗体 を発現し、精製したものについて SPR 法を用いて結合性を検討した。 1B-AD-BSA(8)を固定化したセンサーチップを用いた場合, $K_d = 4$ mM の結合が 観測され、また、BSA を固定化したセンサーチップを用いた場合には結合がほ とんど観測されなかった。しかしながら、J5-115 は太平洋型シガトキシン CTX3C の部分構造ハプテン HM-BSA(3)を固定化したセンサーチップを用いた場合にも 1B-AD-BSA(8)の場合と同等の結合が観測された。同様の挙動は、他の1本鎖抗 体についても観測され、選択性が低いことが判明した。



カリブ海域におけるシガテラ食中毒の主要原因毒素であるカリブ海型シガト キシン C-CTX-1 を認識する抗体の作製を開始した。C-CTX-1 の A 環~E 環から なる合成ハプテン C-CTX-AE を用いて抗体の調製を検討した。C-CTX-AE-KLH (9)を A/J マウスおよび Balb/c マウスにそれぞれ 3 回免疫し、3 回目の免疫から約 1 週間後に採血し、血中抗体価を ELISA 法により測定した。その結果、十分抗 体価が上昇していることが判明したので、最も抗体価が上昇したマウスに最終 免疫を行い、電気細胞融合法を用いてマウスミエローマ細胞との細胞融合を行 った。



C-CTX-AE-BSA(10)を用いた ELISA 法により陽性クローンを選択し、定法に従 いクローニングを2回行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。 得られたモノクローナル抗体について、大量培養後、アフィニティークロマト グラフィーにより精製した。その結果、A/Jの免疫から1B3,2A6,4H5の3種類 のモノクローナル抗体、Balb/cから7A10,9F8の2種類のモノクローナル抗体を 得ることができた。次に、これら得られたモノクローナル抗体について様々な 合成ハプテンを用いて解離定数(Kd)を測定し、基質認識について調べた。いずれ の抗体も免疫に用いたハプテン C-CTX-AE(11)に強く結合した (K_d, 1D3:8.3 nM, 2A6: 9.3 nM, 4H5: 3.0 nM, 7A10:40 nM, 9F8: 72 nM)が、太平洋型シガトキシンの 部分構造化合物 1B-HM, 3C-HM, 3C-AE には全く結合が観測されなかった。従っ て、これらの抗体はいずれも高い選択性を有していることが判明した。現時点 では、純粋な C-CTX-1 が入手できていないため、LC-MS の分析により C-CTX-1 を含んでいることが判明している魚抽出液を用いて、4H5 について ELISA の阻 害実験を行った(図2)。その結果、もっとも高い濃度で、約70%の阻害がかかる ことがわかった。従って、抗体 4H5 は C-CTX-1 と結合することが推定される。 今後、純粋な C-CTX-1 を入手でき次第確認する。



図 2 抗体 4H5 の C-CTX-1 含有魚 抽出液による競合 ELISA 実験

<u>得られた研究成果の状況及び今後期待される効果</u>

我々は、合成した種々のポリエーテルと抗体との相互作用の解析から、シガ トキシン本体に結合する抗体を得るためには、ハプテンの疎水的な分子表面積 が 400 Å²以上必要であると推測し、実際に 5~6 環性の合成した部分構造をハプ テンとして、毒素本体の標的部位に結合する抗体を合理的に作製する新しい手 法を確立することができた。特に、本手法を用いることにより、新たに M 環に OH 基を有するシガトキシン類(CTX1B および 51-OH-CTX3C)を認識する抗体お よびカリブ海型シガトキシン C-CTX-1 左側認識抗体を作製することに成功した。 これらの抗体は、高い特異性を示し、他の海洋毒(ブレベトキシンなど)には 公差反応性を示さないことが明らかとなった。このように、シガトキシンを強 く認識する抗体の獲得に成功しているのは現在のところ、我々のみであり、世 界的にも各方面から非常に注目を集めている。

従来の薬物や毒素などの低分子抗原の検定において、ラベル化した抗原との 競争阻害が多く用いられてきた。しかしながら、これらの手法は擬陽性判定の リスクが高く、また、感度が不十分であることが多い。さらに,抗原が貴重な 場合、ラベル化抗原の作製も大きな問題となる。シガトキシン類は分子長3ナ ノメートルにおよぶ巨大分子であることに着目し、シガトキシンの両端を特異 的に認識する2種類の抗体を用いることで、シガトキシンを同時に補足し、サ ンドイッチイムノアッセイによるシガトキシンの検出が可能であると考えた。 実際にこれまでに CTX3C および 51-OH-CTX3C を簡便、確実、かつ特異的に検 出するサンドイッチイムノアッセイ法を確立することができた。今後、検定キ ット化の実用化が期待される。

さらに、本研究により確立することができた2つの主な技術

- (1) 合成ハプテンを用いた標的部位に特異的な抗体の調製法 および
- (2) これらの抗体を組み合わせたサンドイッチイムノアッセイ法
- は、他の海産毒をはじめとする、低分子毒素にも応用が可能であると考えてい る。

21

4.3 "中毒魚検定(平間・沖縄グループ)"

実施の内容

ELISA 法によるシガトキシン類検出の実証性を確認するため、以下の1~3のテーマを設定し、取り組んだ。

- 1 シガテラ毒含有魚の収集
- 2 シガトキシン類抽出および前処理法の検討
- 3 LC/MS 法によるシガトキシン検出
- 4 CTX-ELISA の評価

1 シガテラ毒含有魚の収集

(1) 毒魚の収集

CTX3C-ELISA および、51-HydroxyCTX3C-ELISA 法は、それぞれ精製度の高い CTX3C お よび 51-HydroxyCTX3C に対し、高感度かつ選択に検出することが可能であることが示され た。本法を天然魚に適用した際の実証性を評価するために、いわゆるシガテラ毒魚を採集 し、バリデーション用試料として用意する必要がある。そのため、沖縄県内の漁業協同組 合に協力を依頼し、沖縄近海産のバラフエダイ Lutjanus bohar、イッテンフエダイ L. monostigma、バラハタ Variola louti 等を購入した。購入した魚試料は-20 ℃で冷凍保存し、 順次、流水中で解凍後、解体処理を行い、筋肉、肝臓、生殖巣、その他内臓、あらに分別 し、使用するまで-20 ℃で保管した(表1)。

魚種名	モデル化*	SORST	合計
イッテンフエダイ	216	19	235
バラハタ	8	45	53
アカマダラハタ	2	23	25
バラフエダイ	78	106	184
オジロバラハタ	3	45	48
クロホシフエダイ	89	5	94
ゴマフエダイ	28	7	35
その他	8	4	12
計	432	254	686

表1 シガトキシン検出法評価用に収集した天然魚試料

*: JST独創モデル化事業にて実施

(2) 毒性の確認

天然魚の毒性を確認するため、マウス毒性試験法によるシガテラ毒の分析を実施した。 方法は食品衛生検査指針理化学編掲載の方法に準じ、120gの筋肉を使用し、抽出物は最終的に1%Tween 60添加生理食塩水で3mlのエマルジョンに調製し、試験用液とした(図1)。 試験用液 1 ml を ddY 系マウス(オス、17~20 g)に腹腔投与後 24 時間観察し、2 尾以上が 死亡した試料を有毒試料とした。試験用液 1 ml は魚肉 40 gに相当し、陽性試料は 0.025 MU/g 以上の毒を含むことになる。シガテラ毒の 1 MU は ddY 系マウス(オス、20 g)を 24 時



間で死亡させる量と定義されている。

図1 魚肉抽出物の調製法

毒性試験を実施した 619 試料中、108 試料(17.6%)が有毒試料であった(表2)。有毒 率が 10%以上であったのは、代表的シガテラ毒魚として認識されているイッテンフエダイ、 バラフエダイ、バラハタ、アカマダラハタで、特にイッテンフエダイの有毒率は 32.3%に およんだ(表2)。一方、クロホシフエダイとオジロバラハタの有毒率は約3%で、ゴマフ エダイは全て無毒であった(表2)。

表2 天然魚試料のシガテラ毒性(マウス法)

魚種名	実施数	陽性数	陽性率
イッテンフエダイ	226	73	32.3%
バラハタ	50	7	14.0%
アカマダラハタ	24	5	20.8%
バラフエダイ	168	20	11.9%
オジロバラハタ	36	1	2.8%
クロホシフエダイ	74	2	2.7%
ゴマフエダイ	35	0	0.0%
その他	6	0	0.0%
計	619	108	17.4%

JST 独創モデル化事業で実施したものを含む。

魚種毎の体長-体重相関図に毒性を記したものを図 2~7 に示した。バラフエダイは成長 に従い有毒率が上昇する傾向が見られ、4 kg 以上では 37.7%、7 kg 以上では 61.1%であり、 4 kg 未満の有毒個体はなかった(図 2)。



図2 バラフエダイの標準体長-体重相関と毒性



図3 アカマダラハタの標準体長-体重相関と毒性



図4 イッテンフエダイの標準体長-体重相関と毒性







図6 バラハタの標準体長-体重相関と毒性



図7 オジロバラハタの標準体長-体重相関と毒性

(3) 毒性の定量

マウス毒性試験で有毒と判定されたものについては、定量試験を実施した。試験用液を 前述のとおり調製し、毒性に応じて1%Tween 60 生理食塩水で適宜希釈を行い、マウスに 腹腔投与し、マウスが2 尾以上死亡した最小濃度を試料の毒性とした。

最も毒性が強かったのはイッテンフエダイで、0.2 MU/g 以上の毒性をもつ試料が1/3 程度含まれていた。

		毒	カ(MU	/g)		
魚種	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	計
イッテンフエダイ	4	7	8	6	4	29
バラフエダイ	9	6	5			20
アカマダラハタ	4	1				5
バラハタ	5	2				7
計	22	16	13	6	4	61

表3	マウス毒性試験による定量結果(毒力別の試料数)

2 前処理法の検討

CTX3C-ELISA は、純粋な合成品やそれをマグロあるいはサンマに添加したものについて は、高感度で検出が可能であるが、バラフエダイやイッテンフエダイ等に添加した際に、 脂質等が妨害する事が確認された。そのため、妨害物質を除去するために、シリカゲルカ ートリッジカラムとクロロホルム/メタノール系の固相抽出で前処理を行うことにより、 良好な結果が得られることが確認されている(図 8, JST 独創モデル化事業)。抽出等の処 理を考える場合、水を含む系で処理を行う方が簡略化につながること、クロロホルムの有 害性や、結果の再現性を考慮し、逆相系の固相抽出について検討を行った。



図8 Sep-Pak plus Silica による前処理法の添加回収試験結果 抽出物(魚肉 20g 相当量)に 51-hydroxyCTX3C 500pg を添加し、CHCl₃ 20ml に溶解した。 これを、CHCl₃ でコンディショニングしたカートリッジカラムに通し、CHCl₃ 5ml で洗浄後、 CHCl₃ / MeOH(97:3) 5ml で溶出させた。

(1) カートリッジカラムの検討

カートリッジカラムは乾燥による回収率の変動が少ないポリマー系とし、逆相系の OASIS HLB (Waters) と陰イオン交換系の OASIS MAX について、それぞれあるいは両方 の組合せについて検討を行った。充填剤 60 mg のカートリッジを使用した場合、いずれの フラクションからも 51-HydroxyCTX3C は検出されなかった。夾雑物の影響も考えられたた め、各フラクションに 51-HydroxyCTX3C を添加し、測定を行ったところ、検出されるもの の回収率が低く、夾雑物の影響が考えられた。そのため、魚肉抽出物量を減らし、検討を 行った上で、最適条件を設定することとした。

MAX の場合、51-HydroxyCTX3C はカラムへ吸着せず、酸性物質の除去には適している ものの、中性あるいは塩基性物質は排除されず、単独使用の前処理では不充分であった。 HLB の場合、水/有機溶媒系による処理で検出がされたが、回収率は 50%程度と検討を要した。HLB と MAX を組みあわせた場合、回収率が 60%程度まで向上したため、これを基に溶媒系の検討を行うこととした。

(2) 溶媒系の検討

HLB による前処理の際、水/メタノール系では良好な結果が得られず、MAX を組みあ わせることにより、回収率の改善がみられたため、酸性物質による妨害が多いと考え、塩 基性の溶媒系を用いることとした。抽出物の溶媒と吸着後のカラム洗浄液は1%アンモニア 含有のメタノール/水系、溶出液は水/有機溶媒系について、検討を行った結果、以下に 示す最適な条件を設定することが出来た(図 9、10)。



図9 OASIS HLB(200mg)による前処理法の添加回収試験結果
 抽出物(魚肉 20g 相当量)に51-hydroxyCTX3C 500pgを添加し、70%MeOH(1%NH3含有)
 20mlに溶解した。これを、MeOH、水でコンディショニングしたカートリッジカラムに通し、80%
 MeOH(1%1%NH3含有)3mlで洗浄後、70%アセトニトリル 2ml で溶出させた。



図 10 固相抽出法による ELISA 用試験液の調製

カートリッジカラムは OASIS HLB (200 mg)をあらかじめメタノール 2 ml、蒸留水 2 ml でコンディショニングをした。魚肉抽出物を 70%メタノール (1%アンモニア含有) 20 ml に溶解させ、カートリッジカラムに通し CTXs を吸着させる。80%メタノール (1%アンモ ニア含有) 3 ml で洗浄し、70%アセトニトリル 2 ml で溶出させた。

3 LC/MS によるシガトキシン類検出法

マウス毒性試験法は選択性に乏しく、例えば遊離脂肪酸等の影響をうけ、毒性を課題評価する可能性がある。そのため、機器分析によるシガトキシン類の分析が必要である。シガトキシン類は特異的紫外線吸収を持たず、魚肉中に極微量しか含まれないため、LC/MSによる分析法を検討した。予備試験で51-HydroxyCTX3Cの検出が可能であることを確認し(図11)、分析カラム、移動相等の検討を行った。



図11 LC/MS 法による 51-hydroxyCTX3C 分析のクロマトグラム(予備試験) カラム: ZORBZX Eclipse XDB-C18 5um 2.1x150、移動相:0.1%ギ酸/アセトニトリル (3:7)、流 速:0.2ml/min.、注入量:5ul、SIM モード(m/z 1061.5: [M+Na]+)

(1)分析カラムの比較

分析カラムの比較検討を行うために、表4に示す7種のカラムについて図11の条件下で ピーク形状等の検討を行った。このうち、CTX1B、51-HydroxyCTX3C、CTX3C標準品の測 定において感度の良かったZORBAX Eclipse XDB-C18, Cadenza CD-C18, CAPCELL PAK C18 UG120の3つのカラムについて、魚肉抽出物にCTX1Bを10 ng/ml添加し、それぞれのクロ マトグラムを比較した。ZORBAX は魚肉試料のピーク面積が標準品よりも大幅に上回って おり、夾雑物のピークと重なっている可能性が示唆された。CAPCELL PAK と Cadenza では Cadenza の方が、分離能がよく CTX1B を検出できた(図12)。

表4 LC/MS 分析で比較検討した分析力

ZORBAX Eclipse XDB-C18	2.1 x 150mm, 5μm
Cadenza CD-C18	2.0 x 150mm, 3 μ m
Inertsil ODS-P	2.1 x 150mm, 5 μ m
CAPCELL PAK C18 UG120	1.5 x 250mm, 5 μ m
Develosil RPAQUEOUS-AR-3	2.0 x 150mm, 3 μ m (C30)
ZORBAX 300Extend-C18	2.1 x 150mm, 3.5μm, 300Å
ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHT	2.1 x 50mm, 1.8 μ m



図12 LC/MS 用分析カラムの比較

(2)移動相の検討

当初、CTX1B標準品の測定において 10 ng/ml 程度の濃度を確認できたが、アセトニトリル をメタノールに変更することで検出感度の向上がみられ (図 13)、1 ng/ml 程度まで検出する ことができた (S/N 3.2)。 また、ギ酸を含まない方が検出感度の向上がみられ (1ng/mL、 S/N 4.8)、51-HydroxyCTX3C、CTX3C においても同様の結果が得られた (図 14)。一方、魚 肉抽出物の場合、夾雑マトリックスの影響のためかギ酸を加えた方がピーク強度が向上す ることが判明した(図 15)。なお、ギ酸の濃度は、0.1%の場合が最も良く、濃度を上げるとピ ークが小さくなり、濃度を下げると一定のピーク強度を得ることができなかった.



図 13 LC/MS 分析における移動相の比較(CTX1B 10ng/mL) 上:0.1% formic acid / MeCN(4:6)、下:0.1% formic acid / MeOH(15:85)



図 14 LC/MS 分析におけるギ酸添加によるピーク形状への影響 上:0.1% formic acid / MeOH(15:85)、下:H₂O / MeOH(15:85)





(3)前処理の検討

魚肉抽出物試料は OASIS HLB による固相抽出を行い、ELISA では夾雑物の影響を受ける ことなく、分析をおこなう事が出来た。しかし、LC/MS 分析においては夾雑物のピークが 多く、分析を妨害していた。これらの妨害物質は、シリカゲルに対する吸着が強いことが 予備試験で確認されていたため、シリカゲル系の順相カートリッジカラムによる前処理を 試みた。試料を CHCl3:MeOH (9:1) に溶解しシリカゲルカラムカートリッジカラム(InertSep Si) に通し、夾雑物をカラムに吸着させることで,妨害物質を簡単に除去することができた. (図 16)。



最適化された LC/MS 分析の条件は以下に示したとおりである。この条件下で魚肉サンプ ルに CTX1B, 51-HydroxyCTX3C, CTX3C を各 10 ng/mL 添加し,これを Si 処理後, LC/MS 分 析で確認し、検出できることを確認した(図 17)。なお、標準品 1 ng/ml を分析した際の S/N は CTX1B 3.2、51-OH-CTX3C 20.1、CTX3C 4.0 である。

```
装置: Agilent 1100 LC/MSD SL (Agilent technologies)
カラム: Cadenza CD-C (3 \mu m, 2x150 mm)
移動相: 0.1% ギ酸/メタノール (15:85)
流速: 0.2 mL/min
注入量: 5 \muL
カラム温度: 40 °C
イオン化: API-ES
イオンモード: SIM Positive
フラグメンター電圧: 110 V
ネブライザーガス: 20 psi
キャピラリー電圧: 4,000 V
ドライガス: 350°C, 10 L/min
モニターイオン: 0-7.5 min: m/z 1133.5 [CTX1B + Na]<sup>+</sup>,
7.5-15 min: m/z 1061.5 [51-hydroxyCTX3C + Na]<sup>+</sup>,
15-35 min: m/z 1045.5 [CTX3C + Na]<sup>+</sup>
```



4 CTXs-ELISA の評価

CTXs-ELISA の実証性を評価するために、沖縄沿岸産の有毒魚肉抽出物試料および、沖縄 県内で発生した食中毒試料について、51-HydroxyCTX3C-ELISA による分析を実施した。し かし、いずれの試料からも 51-HydroxyCTX3C は検出されなかった(図 18)。



図 18 沖縄産有毒魚(左)および、51-hydroxyCTX3C 標準品の ELISA による分析結果

沖縄産有毒魚における CTX3C シリーズの存在を確認するために、LC/MS で分析を行ったところ、CTX1B のピークは確認されたが、51-HydroxyCTX3C および、CTX3C のピークは検出されなかった(図 19)。その結果、沖縄地域で発生するシガテラ食中毒の主要毒素はCTX1B であり、CTX3C 系列の毒素は、中毒に関与していない可能性が示唆された。

LC/MS 分析による CTX1B のピーク面積と、マウス毒性試験による毒性との間には、あ る程度の相関がみられるものの、大きなばらつきがあった(図 20、表 5)。この要因として は幾つかの理由が考えられ、今後の検討を要するが、現時点で推定される要因について以 下に例示する。

① LC/MS 分析を行っていない CTXs や未知毒物質による毒性

② 遊離脂肪酸等の影響による毒性

③ マトリックス効果による LC/MS 分析上のイオン化抑制または促進



図 19 沖縄産有毒魚の LC/MS 分析結果


図 20 LC/MS 分析における CTX1B のピーク面積(積分値)とマウス毒性の相関

表5	マウス毒性試験によ	:る定量値とLC/M	S分析による	CTX1B の積分	↑値比の比較
----	-----------	------------	--------	-----------	--------

-

試料名	魚種	マウス	LC-MS
03-cig-336	イッテンフエダイ	0.4	70.4
食中毒(H15中部)	バラハタ	0.4	41.4
03-cig-191	イッテンフエダイ	0.4	41.1
03-cig-200	イッテンフエダイ	0.4	59.0
03-cig-183	イッテンフエダイ	0.2	17.7
食中毒(0氏)	バラフエダイ	0.2	15.7
03-cig-198	イッテンフエダイ	0.2	45.9
食中毒(H15中部)	イッテンフエダイ	0.2	32.0
食中毒(H16宮古)	バラハタ	0.2	3.1
03-cig-216	イッテンフエダイ	0.2	22.4
食中毒(O氏)	アカマダラハタ	0.1	13.8
03-cig-357	バラフエダイ	0.1	6.1
05-cig-096	バラフエダイ	0.1	18.2
03-cig-240	イッテンフエダイ	0.1	16.7
05-cig-023	バラフエダイ	0.1	3.0
05-cig-095	バラフエダイ	0.1	3.3
05-cig-018	バラフエダイ	0.1	11.5
03-cig-129	イッテンフエダイ	0.1	25.6
03-cig-208	イッテンフエダイ	0.1	24.0
食中毒(H17南部)	バラハタ	0.1	13.4
食中毒(H18中央)	バラフエダイ	0.1	22.2
食中毒(H19中部)	アズキハタ	0.1	5.4
03-cig-220	イッテンフエダイ	0.1	11.3
04-cig-004	バラフエダイ	0.05	17.5
03-cig-150	バラハタ	0.05	11.9
05-cig-074	バラフエダイ	0.05	0.0
03-cig-095	バラフエダイ	0.05	6.1
06-cig-016	バラハタ	0.05	4.5
食中毒(H18中部)	バラハタ	0.05	3.1
03-cig-048	イッテンフエダイ	0.05	0.0
03-cig-046	イッテンフエダイ	0.05	6.2
03-cig-051	イッテンフエダイ	0.05	10.5
03-cig-080	イッテンフエダイ	0.05	2.1
03-cig-083	バラフエダイ	0.05	9.5
03-cig-105	イッテンフエダイ	0.05	9.4
03-cig-164	イッテンフエダイ	0.05	16.6
03-cig-199	イッテンフエダイ	0.05	13.1
03-cig-153	バラフエダイ	0.025	2.7
04-cig-065	アカマダラハタ	0.025	0.0
05-cig-011	バラハタ	0.025	3.4
03-cig-149	バラフエダイ	0.025	7.4
04-cig-005	バラフエダイ	0.025	5.8
03-cig-007	クロホシフエダイ	0.025	2.7
03-cig-081	バラフエダイ	0.025	2.7
03-cig-104	イッテンフエダイ	0.025	6.7
03-cig-178	クロホシフエダイ	0.025	3.5
	不明	0.025	5.1

現在ハワイで製造販売されている Cigua-Check について、マウス毒性試験との比較を行ったが、相関は認められなかった(表 6、7)。

試料名	魚種	体重(kg)	MU/mg	シカ・チェック	ロット
03-cig-336	イッテンフエダイ	1.9	0.4	+-	1-1/24
03-cig-191	イッテンフエダイ	1.8	0.4	+	1-1/24
03-cig-291	イッテンフエダイ	1.6	0.4	+	<u>(2</u>)-1/25
03-cig-200	イッテンフエダイ	1.4	0.4	+	<u>(2</u>)-1/25
食中毒(0氏)	バラフエダイ	-	0.2	-	1-1/24
食中毒H15中部	バラハタ	-	0.2	-	1-1/24
食中毒H15中部	イッテンフエダイ	-	0.2	-	1-1/24
03-cig-357	バラフエダイ	10.0	0.1	++	<u>(2</u>)-1/25
05-cig-096	バラフエダイ	7.6	0.1	-	1-1/24
05-cig-023	バラフエダイ	7.0	0.1	-	1-1/24
食中毒H18中央	バラフエ	-	0.1	+	1-1/24
食中毒H16宮古	バラハタ	-	0.1	+	1-1/24
食中毒H17南部	バラハタ	-	0.1	+	1-1/24
食中毒H19中央	アズキハタ	-	0.1	-	1-1/24
食中毒(0氏)	アカマダラハタ	-	0.1	-	1-1/24
食中毒H18中部	バラハタ	-	0.05	+	1-1/24
03-cig-150	バラハタ	3.5	0.05	+	1-1/24
06-cig-016	バラハタ	3.3	0.05	+	<u>(2</u> -1/25
06-cig-036	バラフエダイ	10.2	0.025	+- ++	1/22-21/25
03-cig-149	バラフエダイ	7.2	0.025	+-	1-1/24
04-cig-005	バラフエダイ	6.2	0.025	+	1-1/24
05-cig-016	バラフエダイ	5.6	0.025	++	<u>(2</u>)–1/25
03-cig-153	バラフエダイ	5.3	0.025	+++	<u>(2</u>)–1/25
06-cig-017	バラハタ	3.4	0.025	+	<u>(2</u>)–1/25
06-cig-006	バラハタ	2.8	0.025	-	<u>(2</u>)–1/25
05-cig-011	バラハタ	2.4	0.025	-	1-1/24
04-cig-036	バラハタ	2.0	0.025	+	1-1/22
07-cig-011	バラハタ	1.7	0.025	++	<u>(2</u>)-1/25
03-cig-250	イッテンフエダイ	2.1	0.025	+	<u>(2</u>)–1/25
03-cig-293	イッテンフエダイ	1.4	0.025	+	<u>(2</u>)–1/25
03-cig-276	イッテンフエダイ	1.3	0.025	+	<u>(2</u>)-1/25
06-cig-009	アカマダラハタ	14.9	0.025	-	1-1/24
05-cig-108	アカマダラハタ	14.0	0.025	+	<u>(2</u>)-1/25
07-cig-004	アカマダラハタ	13.6	0.025	+	<u>(2</u>)-1/25
04-cig-068	アカマダラハタ	13.3	0.025	+	(1)-1/24

表6 シガテラ有毒魚試料の Cigua-Check テストの結果

+++:Positive control より濃い、++:Positive control と同じ、+:Positive control より薄いが明らか に着色、+-:色がついているような気がする、-: 色がついていない

試料名	魚種	体重(g)	MU/mg	シカ゛チェック	ロット
06-cig-018	バラフエダイ	8.1	-	+	<u>2</u> -1/25
06-cig-023	バラフエダイ	7.7	-	+	(2) -1/25
05-cig-039	バラフエダイ	6.8	-	+	<u>(2</u>)-1/25
06-cig-022	バラフエダイ	6.1	-	+	<u>(2</u>)-1/25
06-cig-024	バラフエダイ	5.4	-	-•+	1/22•21/25
06-cig-029	バラフエダイ	3.7	-	+-	<u>(2</u>)-1/25
06-cig-035	バラフエダイ	2.2	-	+	<u>(2</u>)-1/25
06-cig-019	バラフエダイ	2.2	-	+	<u>(2</u>)-1/25
05-cig-020	バラフエダイ	2	_	+	<u>(2</u>)-1/25
06-cig-033	バラフエダイ	1.5	-	+	<u>(2</u>)-1/25
06-cig-038	バラハタ	2	-	-	3-1/25
05-cig-071	バラハタ	1.9	-	+-	3-1/25
06-cig-004	バラハタ	1.2	-	+-	3-1/25
06-cig-012	バラハタ	1.1	-	+-	3-1/25
07-cig-010	バラハタ	1.1	-	-	1-1/22
05-cig-028	バラハタ	0.9	-	+-	3-1/25
05-cig-005	イッテンフエダイ	2.1	-	-	3-1/25
03-cig-363	イッテンフエダイ	1.7	-	++	<u>2</u> -1/25
03-cig-223	イッテンフエダイ	1.4	-	+	<u>2</u> -1/25
05-cig-045	イッテンフエダイ	1.3	-	+-	3-1/25
03-cig-243	イッテンフエダイ	0.8	-	+	<u>2</u> -1/25

表7 シガテラ無毒試料の Cigua-Check テストの結果

得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

マウス毒性および LC/MS 分析の結果から、沖縄近海産のシガテラ食中毒の主要原因物質 は CTX1B の可能性が高いことが判明した。したがって、CTX1B 検出が可能な ELISA キッ トの作製が必須条件である。抗 CTX1B 抗体の調製が強く望まれる。

また、LC./MS による CTX1B の分析値ではマウス毒性を説明できないことが示された。 今後、CTX2A 等、他の類縁化合物の分析についても検討を行う必要があると思われる。ま た、LC/MS 法についても、マトリックス効果などの影響についても検討を要する。

本事業を通じて収集、保管されているシガテラ毒含有天然魚試料は、将来、シガテラ毒 の新分析法開発において、北西太平洋域を代表する貴重な天然試料として位置づけられる であろう。

4.4 "チャネル構造解析(佐藤グループ)"

実施の内容

車を運転している時でも、スポーツをしている時でも、目から入っている情報に対して数ミリ秒単位の反応を頻繁に行っている。それを可能にしているのが、神経細胞に存在する電圧感受性 Na チャンネルである。神経細胞は細長い袋状の形をしており、Na チャンネルはその細胞膜中に組み込まれて存在する。細胞を取り囲む細胞膜は通常イオンなどの親水的な物質を通さない。それに対してチャンネルは親水的な物質を通す働きがある。例えば Na イオンチャンネルは電荷を帯びた特定の Na イオンのみを通す。そして急激に一種類の Na イオンのみを通すことで細胞膜の興奮状態を引き起こす。一般に電圧感受性イオンチャンネルは隣接したイオンチャンネルが開くと、流れる電流を感じて自分自身も開く性質がある。そのことで次から次へと細長い神経細胞上において刺激を伝達する。これが、人間の神経での情報伝達である。その速度が十分に早いため、痛みや感覚はあっという間に脳に伝わり、さらにそこからの素早い反応が可能になる。

電圧感受性イオンチャンネルが持つ隣が開くと自分自身が開くという機構は、 実際には近くのチャンネルでの正イオン流入による膜の内外の電位差変化、即 ち電圧を感受することにより行われる。この時の開く速度は100μ秒程度と極め て速い。脊椎動物の Na チャンネルは分子量 300 k Da の膜蛋白質であり、神経情 報の伝導、増幅を担う。同時に多くの種類の神経毒や、麻酔薬の標的の一つで もある。このチャンネルの活動を止めることが、我々の神経での情報処理を止 める一番の近道だからである。そのためチャンネルの電圧感受機構は研究の焦 点となっており、バクテリア K チャンネルを用いてイオン透過機構を解明して ノーベル賞を受賞した R. MacKinnon を始めとして、多くの研究者が取り組んで いる。しかし、一般に電圧感受性チャンネルは柔らかく、容易には結晶をつく らない。そのため、従来の3次元結晶を用いた X 線結晶解析によるアプローチ には、柔らかい分子の3次元的なパッキングも伴い、限界があると思われる。 そこで、Na チャンネルを電気うなぎの発電器官から免疫吸着クロマトグラフィ ーによって精製し、He ステージ電子顕微鏡を用いて薄いバッファー層に凍った 状態でタンパク質粒子を閉じ込め、その投影像を無染色で撮影した。その結果、 構造は均一であった。画像から3次元再構成したところ、その構造はベル型で あり、内部のイオン透過機械は高い密度であり、固く閉ざされていた。

そこでこの精製Naチャンネルが平間グループで合成されたCTX3Cによって、 どのような3次元構造変化を起こして開状態に移行するかに取り組んだ。最初 の問題は、CTX3Cを加えただけでは開状態は極めて少数であることであった。 そこで、負染色によるNaチャンネル電子顕微鏡像を見ながら、どのような条件 ならば開構造が増えるかを探った。開状態への移行を誘発する毒veratridineを用 いたところ、その濃度が5 μMの状態で、1μMのCTX3Cを加えるとNaチャンネ ルの約半数弱が膨張し、内部に空間ができる構造をとった。この状態でさらに 30分程度放置すると、さらに様々な構造バリエーションが生じることも判明 した。そこで毒を加えて数分以内に急速凍結させ、分解能のでる4Kの極超低温 電子顕微鏡でNa channelとCTX・veratridineとの複合体をクライオ電子顕微鏡撮影 し、厳選された4万枚程の電子顕微鏡像を用いて、構造解析中である。異なっ た構造が混ざった投影像から、3次元を再構成できるプログラムを開発しなが らの3次元再構成に取り組んでいる。 実験に用いるNaチャンネルはアマゾンから空輸した電気うなぎを用いて精製 した。我々のNaチャンネルは神経細胞上に局所的に分布する。それは跳躍伝導 を実現するためで、神経の機能としては優れたものをつくりだしているが、精 製のスタートとしては極めて少ない。そこで下記の様にアマゾンから空輸した 電気ウナギの発電器官を用いて精製した(図1)。60 cm程の電気ウナギ発電器 官には、1-2 mg程度のNaチャンネルが存在する。



Purification of Voltate-sensitive Sodium Channel from Electrophorus electricus

図 1

精製polyclonal抗体を用いたaffinityカラムから高塩濃度で溶出したのが、図 2:左下である。その青の矢印で示した溶出ピークを用いて、ゲルろ過を行い (図2上)、ピークのフラクションを用いて以下の実験を行った。



図2

次に精製Na⁺チャンネルの構造変化を電子顕微鏡によって視覚化することで、 シガトキシンなどの結合による大まかな構造変化を調べた。酢酸ウラニルによ る負染色法は、分解能や染色ノイズの問題に関してはクライオ法に劣るが、画 像の重ね合わせ無しに、大まかな情報を迅速に得ることができる(図3)。



様々な条件でCTXIIIc ・veratridineと結合させ、像を観察した。その結果5マイクロMのveratridine存在下では、CTXは1microM以上の濃度でNaチャンネルの粒子径を拡大しているのが観察された。Naチャンネルの約半数弱が膨張した。この膨張した状態では内部に複雑な空間が新たに発生してきている(図4)。

負染色による閉開構造の比較



CTX 1uM, Veratridine $5 \,\mu$ M

Control

この状態でさらに30分程度放置すると、膨張Naチャンネル粒子にさらに 様々な構造バリエーションが生じることも判明した。そこで毒を加えて数分以 内に急速凍結させ、分解能のでる4Kの極超低温電子顕微鏡でNa チャンネルと CTX・veratridineとの複合体を撮影した。異なった構造が混ざった投影像から、 3次元を再構成できるプログラムとしては、全く新規にGrowing Neural Gas Networkを改良して開発した(図5)。このプログラムを3次元再構成プログラ ムに組み合わせて改良を続け、現在も構造解析中である。



図 5 Growing Neural Gas Network による画像分類。異なった構造が、右上に突き出て分類される。

得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

電圧感受性 Na チャンネル開状態の 3 次元構造決定は現在 2 月末時点で、未だ 完了していない。しかしその解析は現在、着実に収束へと近づきつつある。本 研究のために開発した情報学ツールは非常に強力であり、タンパク質研究のみ ならず、画像処理技術にも多大な貢献が期待できる。

4.5 "抗体遺伝子(津本グループ)"

実施の内容

(1)抗シガトキシン抗体 1C49 Fv の抗原認識機構の解明

大量調製系が確立できた1C49Fvについて抗原CTX3C-ABCとの複合体の結晶 化を行った。ハンギングドロップ蒸気拡散法により良好な結晶を得ることがで き、分子置換法を用いたX線結晶構造解析によって分解能2.3Åで立体構造解明 に成功した。1C49Fv-CTX3C-ABC 複合体の結晶構造から、1C49 は超可変領域 CDR によって横長の窪みを形成し、その中に抗原が完全に埋没するという結合 様式が明らかとなった(Fig.1)。抗原結合部位には極性残基が少ないことから水素 結合や静電的相互作用の寄与が小さく、疎水性残基による多数の van der Waals 相互作用、疎水性相互作用によって抗原認識が達成されていることが示唆され た。



Fig. 11C49Fv-CTX3C-ABC夜合体の全体構造

抗原抗体相互作用についての詳細な知見を得るため、表面プラズモン共鳴法 を用いた速度論的解析を行った。1C49Fv と CTX3C-ABC の結合は、室温 25℃に おいて解離定数 1.15×10^9 という高い親和性を持っており、速い結合速度(k_{on} ; $1.24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)と遅い解離速度(k_{off} ; $1.08 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)という典型的な抗原抗体相互 作用の速度論的性質を有していた。また、 Δ H は-31.2 kJ/mol であり、エンタル ピー駆動型の相互作用であることも示された。

結晶構造から抗原と直接結合していると考えられる残基を特定し、それぞれ9 種類のAla変異体を調製した。抗原結合部位には特にTyr、Trp、Pheなどの芳香 族アミノ酸が多く存在していた。野生型1C49Fvと同様に表面プラズモン共鳴法 による速度論的解析を試みたところ、残基レベルでの抗原認識への寄与程度と 相互作用の特性を詳細に記述することができた。抗原結合ポケットの側面およ び下部に存在する残基の変異により解離速度の増大が認められたことから、 CTX3C-ABC 認識には、結合ポケット界面の水分子を含めた形状相補性が重要で あることが示された。また、特に抗原末端の官能基メトキシメチルエーテルへ の相互作用の有無が親和性に大きく寄与していることが明らかとなり、メトキ シメチルエーテル自体の抗原性が高いこともわかった。

変異体解析の結果、特に親和性が著しく低下した残基 L-Y91 をホットスポットとし、親和性創出機構の更なる詳細な解明を試みた。L-Y91 は抗原の A 環に対して CH-π相互作用あるいはπ-π相互作用、さらに van der Waals 相互作用を形成していると考えられる。Phe および Trp への変異では、解離速度が促進されるものの結合速度には顕著な影響はなく、親和性の大きな減少は観察されなかった。したがって、抗原認識には 91 番残基の芳香族性が重要であり、π電子系を介した相互作用の存在の可能性が非常に高いと考えられる。また、Leu およびVal への変異では結合速度に著しい低下が見られる一方、解離速度には顕著な影響は見られず、これらの残基の疎水的雰囲気が抗原の解離抑制に寄与していることが示唆された。

立体構造に基づいた変異体解析から、CTX3C-ABC 認識についての親和性・特 異性創出機構を詳細に論じることができ、抗原抗体間形状相補性の重要性と 「lock-and-key」型の結合様式が明らかとなった。

(2)抗シガトキシン抗体 10C9Fab の分子認識

分子置換法を用いた X 線結晶構造解析により、10C9Fab 単独、10C9Fab と CTX3C-ABCD 複合体、および 10C9Fab と CTX3C-ABCDE 複合体の各々の立体 構造を明らかにした。分解能は、それぞれ 2.6 Å、2.4 Å、2.3 Å であった。抗原 不在下において、10C9 Fab は VH と VL の界面で構成される穴状の大きく深い抗 原結合ポケットを有しており、その深さはおよそ 11 Å にも及ぶことがわかった。 ポケット内部には、L-Trp91、H-Trp47、H-Trp103 のような疎水性残基によって 形成される疎水場が用意されており、抗原が安定して存在できると推測される。 また、内部には水分子が二個程度しか含まれていないことも示され、抗原結合 に伴う水の出入りはほとんど無いことも明らかとなった。さらに、ポケット内 部表面には L-His34、H-His35A、H-Asn58、L-Arg46、L-Gln89 などの極性残基も 多く存在することも 10C9 の主な特徴の一つである。

抗原抗体複合体の結晶構造から、CTX3C-ABCD および CTX3C-ABCDE はどち らも抗原結合ポケットに対し A 環を下部に向けて縦に突き刺さる状態で結合し (Fig.2)、抗原抗体間には複数の水素結合とそれ以上に多数の van der Waals 相互作 用が機能していることが示された。抗原認識前後の 10C9Fab の立体構造を比較 すると、いずれの抗原においても結合に伴って抗体可変領域に回転運動が生じ ていることが示唆され、その程度は CTX3C-ABCD で特に顕著であった。また、 温度因子の比較から、特に H 鎖の CDR 領域は抗原結合によって構造が安定化す る一方で、定常領域は CTX3C-ABCDE 結合によって安定化、逆に CTX3C-ABCD 結合によっては不安定化する傾向が認められた。このことは、示差走査型熱量 測定結果では CTX3C-ABCD が結合することによる顕著な熱安定化が確認でき なかった一方、CTX3C-ABCDE の結合によっては 10℃程度もの著しい熱安定化



Fig.2 (a)10C9Fab-CTX3C-ABCD複合体、(b)10C9Fab-CTX3C-ABCDE複合体の全体構造 が観察されたことと相関していると考えられる(Fig.3)。この一因として、10C9Fab と E 環との相互作用に起因する水素結合ネットワークの有無が考えられ、抗原 抗体間の相補性の重要性が示唆された。さらに、等温滴定型熱量測定の結果、 結合定数は CTX3C-ABCD、CTX3C-ABCDE がそれぞれ 5.4×10⁶ M⁻¹、9.0×10⁷ M⁻¹ であり、いずれもエンタルピー駆動型の結合様式であること、CTX3C-ABCDE の結合によるエンタルピー的寄与がより大きいことが確認できた。これらの構 造学的、熱力学的解析によって、10C9Fab の抗原認識には抗原を取り込むための 巨大なポケットと抗原抗体間の相補性、さらに可変領域の穏やかな回転運動を 必要とする特徴的な認識機構を解明した。10C9Fab は抗原抗体相互作用のわずか な差異によって複合体全体の構造安定性を変化させ、抗原の厳密な認識を達成 することが明らかとなった。



Fig.3 示差走查型熱量測定結果

得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

シガトキシンのサンドイッチ型検出法に関する立体構造学的観点からの論証 および情報基盤構築を目指し、二種の抗体 1C49 と 10C9 についてシガトキシン の部分構造を持つ化合物 CTX3C-ABC、ABCD、ABCDE との相互作用解析を行 った結果、それぞれの抗原の長さに応じた特徴的な認識機構を明らかにするこ とができた。特に、10C9 は鎖状抗原認識に有利な認識場を有しており、 CTX3C-ABCDEへの認識機構を論じることで全長 CTX3Cに対する結合様式を推 察することが可能となった。つまり、10C9 を用いたサンドイッチ型 CTX3C 検 出法において、実際に 10C9 が認識しているのは CTX3C の ABCD 環部分と E 環 の一部であり、特に E 環部位との結合が親和性を大きく左右する可能性が実験 結果から示された。したがって、その周辺のエピトープ部位を改変させること でCTX3Cへの更なる親和性の向上と高感度検出および治療薬への展開が期待で きる。

10C9 が持つ抗原認識場は、溶媒から抗原を隔離できる程の巨大なポケットであることが明らかとなった。その形状を保ったまま内部表面の特性を改変させることで、CTX3C 以外の鎖状分子に対する新たな認識能を持たせることができる可能性がある。今後、この 10C9 の抗原認識場を基盤とした新たな分子認識系構築の展開が期待される。

本研究は、将来的にシガトキシンをはじめとする種々の環状ポリエーテル海 洋毒素の検出・予防、さらに種々の鎖状分子認識抗体薬の創製に向けた情報基 盤構築への足がかりとなる。 4.6 "電気生理(山岡グループ)"

<u>実施の内容</u>

(1) 全合成された CTX3C の Na チャネルに対する機能の評価

パッチクランプによる膜電位固定の様子を図1に示した。黒がCTX3Cなし、赤 がCTX3Cあり(1μM)の時の電流である。比較的低い電位から大きな電流が流れ 始めているのが特徴。電流のピークと電圧の関係を図示すると右のようになる。 活性化する電位が過分極側に移動しているのが特徴。 これは1つの活性化の促 進作用といえるが、 電流記録3を見るとピークに達するまでの時間が速くなっ ている。CTX3Cはこのような作用があることも新たにわかった。



図1 多彩なシガトキシンの作用

(2) CTX3CのNa チャネルの相互作用における責任分子の探索



図2CTX3Cによるピーク電流の抑制

ピーク電流の大きさが time to peak が短くなると ともに小さくなっている のが wild type(左)である。 このブロック作用が D2S6 の電位センサーの 電荷を中性化 (R663Q, 右)すると消失する。



図 3 D2S4 選択的な CTX ブロック抑制の解除

S4 の電荷を中性化するとブロック作用が消失するのは D2S4 に限っていた。 この部位が特別 CTX3C と相互作用をする部位である可能性が高い(図 3, R663Q ~K672Q)。

(3) CTX3C と Na チャネル結合のサブタイプ特性

これまでのテストを行った Na チャネルの種類(Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5)については、-100 mV~-80 mV 付近で Na 電流が 100pA 程度の大きさで持続的に出現すること は無かった。図4の如く Nav1.8 の方が著しく大きい電流を流すことがわかった。



図4 静止 Na コンダクタンスの出現: 左 Nav1.4 <<右 Nav1.8



図 5 Nav1.8 の CTX3C 高感受性責任部位

Nav1.8 の分子のどの部分が Nav1.4 と異なり CTX3C によって大きい静止 Na コ ンダクタンス(静止電位あたりに持続的な電流を流すもとになる Na チャネルの 開口)が生ずるのであろうか?

図5左図のようにNa チャネルは6回膜貫通セグメントで構成する4つのドメ インがつながって構成されている。ドメイン前半部分(D1D2)と後半部分(D3D4) がそれぞれ互いに異なる分子同士で結合された状態を図の SS/MM および MM/SS として示している(M は Nav1.4 由来、S は Nav1.8 由来)。静止コンダク タンスの大きさを細胞の大きさや、チャネルの発現量などに左右されないよう、 最大 Na コンダクタンスに対する静止 Na コンダクタンスの割合の比で示した. Nav1.8 と SS/MM の2つのコンストラクトが他の10 倍の静止 Na コンダクタンス を CTX3C によって生じている。すなわち Nav1.8 分子の D1、D2 のいずれかがこ の静止コンダクタンスを大きく上昇させる原因となっている。

(4) シガトキシン類が Na チャネルの機能を修飾するその分子機構

おそらく D2 と CTX の関係は重要であろうと思われるが、 具体的な CTX と Na チャネルの相互作用は明らかではない。 図 6 は最新の情報を取り入れた Shaker K チャネルの開閉機構モデルを示している(Pathak *et al.*, 2007)。この図に 示されている3つの脂溶性アミノ酸 V302、I304、S308(紺色の部分)が電位セン サードメインからの情報を S5(茶色い部分)に伝えることによって実際のゲート の動きにつながると考えられている。



図 6 電位センサーとゲートの動きの関係, Pathak らを改変 図注赤の構造はチオスルホン化した CTX を表す. CTX が脂溶性のアミノ酸に作用し閉 状態を不安定化すると Open の状態に移行しやすくなると考えている.

得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

シガトキシンおよびブレベトキシンを含めてこれらのサイト 5 トキシンが TTX-resistant(TTX-R)な Na チャネルである Na_v1.8 に強く作用するという、Na チ ャネルのサブタイプ別に特異性があるという報告をしたのは今回が初めてであ ろう。ただし Strachan らは TTX-R Na チャネルと TTX-sensitive(TTX-S) Na チャ ネルに対して P-CTX-1(CTX1B)が異なった作用をすることを報告している (Strachan *et al.*, 1999)。彼らの報告では TTX-S が P-CTX-1(CTX1B)によって静止 電位付近で持続的な電流を生じている。ところが TTX-R の方は不活性化からの 回復が速くなっている。これらは我々の今回の研究と対照的で、我々の場合 TTX-R が持続的電流を生じ、不活性化からの回復は TTX-R、TTX-S いずれも遅 くなっている。このような一見矛盾する結果であるが、P-CTX-1(CTX1B)と CTX3C の構造の違いや、TTX-S チャネルの種類の違いなどに起因しているのか もしれない。それらを今後よく検討してみたいと考える。

シガトキシンが Na_v1.8 に特異的に作用することで、シガトキシンを用いて痛みの研究に貢献出来る可能性が出てきた。痛みについては、神経因性疼痛など神経障害後に組織が治癒しても痛みが続く病的状態が知られており、これらの病態を抱えて苦痛から逃れられない人は多い。近い将来にはシガトキシンの研究が痛み緩和への治療に役立つことを期待したい。

Na チャネルの3次元構造とそのゲートの開閉機構については、もっぱら K チャネルの結晶構造解析によって出てきたデータから類推することが多かった。 なぜなら Na チャネルの結晶を作ることはその分子量が4倍以上になるので現実 的には不可能だからである。ただし今回の研究から Na チャネルの D2 がシガト キシンと相互作用する可能性が出てきた。また Na チャネルの D2 は他のドメイ ンと比べて K チャネルに似通ったところが多い。前章 4)で掲げた Pathak らの K チャネルゲート機構モデルはそのままシガトキシンの Na チャネル結合モデルへ と改変したが、<u>新展開から生まれた目標</u>の中で述べたように Cysteine を使った Na チャネル構造プローブとして、シガトキシンを使うことが出来るのではない かと考えている。今後これらの方法が是非成功して、驚くような Na チャネルゲ ート機構が世の中に提案できる日が近いことを願っている。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本件究課題の位置付け・インパクト

シガテラ中毒の原因毒シガトキシンの構造は、第2次世界大戦時から検討されて来たが、構造決定はようやく1989年に東北大学の安元健教授とタヒチのルイマラルデ研究所の協力によって達成された。ウツボ940尾(4トン)を10年かけて採取し単離されたシガトキシンCTX1Bの量は、0.35 mgであった。シガトキシンは食物連鎖によって魚類に蓄積され、生産者は渦鞭毛藻であることも明らかにされたが、この渦鞭毛藻の培養によるシガトキシン類の生産は容易ではないことも判明した。シガトキシンは電位依存性Naチャネルに作用することが明らかにされた。しかし、更なる医学生理学研究や予防・治療法開発研究等のためにシガトキシンの供給が世界的に切望されたが、天然物の量は余りに少なかった。そこで、研究代表者の平間は、1989年から安元教授との協力体制を維持しながら全合成によるシガトキシン類の供給と抗体開発を決意した。しかし、当時の合成レベルでは全合成は不可能とさえ思われた。しかし、11 環性の赤潮毒ブレベトキシンの全合成がNicolaouによって1995年に達成されるに至り

(12 年を要した)、13 環性シガトキシンの全合成も挑戦可能な合成標的と見な されるようになり全合成に関心を持つ研究者が世界的に急増した。平間は、1997 年には安元教授と協力してシガトキシン類の絶対配置の決定に成功し(*J. Am. Chem. Soc.* 1997)分子レベル研究の基礎を確立した。そして、更に 2001年には CTX3C の世界初の全合成を完成し日本の天然物合成の実力を世界に示した

(Science, 2001)。この全合成は、現代天然物合成のランドマークとして国際的 に非常に高く評価された。その後、抗体開発(J. Am. Chem. Soc. 2003)や、合成 CTX3Cを用いた詳細な電気生理学研究にも成功し、先導的な役割を果たしてい る。その後も国内外の多くのグループが全合成研究を続けているが、他に成功 した例はない。 3 nm に達する 13,14 環性ポリエーテルの収束的全合成法の開発は、現代有機 合成化学のランドマークとして重要であるばかりではない。本全合成研究は、 科学的・社会的に更にインパクトの高い学際的・総合的科学や抗体による予防 治療に関する研究の出発点である。天然からの入手が困難なシガトキシン関連 研究は、全合成による人工供給やハプテン等の合理的設計によってのみ可能で ある。実際に平間の 2001 年の CTX3C 全合成の成功以来、国内外の電気生理学 研究者や国際分析協会(AOAC International)、WHO 関係者や香港保健所等から のサンプル請求が引きをきらない状況である。

また、イオンチャネルの開構造の単粒子解析も、ノーベル賞受賞者の MacKinnon との競争になっている。しかし、シガトキシンを利用する着想は独 創的であり、早く画期的な成果を出したい。既に開発に成功した抗シガトキシ ン抗体を用いた高感度イムノアッセイへの応用も着実に進展しており、抗体の ライセンシングも外国企業との間で進行中である。現在米国から市販されてい る信頼性の低い検出キット Cigua-Check に代わる簡易キットの開発や治療法開 拓も間近い。本研究は、学術研究として独創的で画期的であるばかりでなく、 人々の健康や魚類資源の有効利用の社会的要請にも応えるものである。

6. 研究実施体制

(1)体制

	平間グループ
	東北大学大学院理学研究科 化学専攻 有機分析化学研究室 化学合成・分子設計を担当
研究代表者	藤井グループ 大阪府立大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 生体分子科学分野
	加体調製を担当 佐藤グループ
	産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 構造生理研究グループ チャネル構造解析を担当
	津本グループ
	東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 生命分子解析学分野 抗体遺伝子を担当
	山岡グループ
	広島国際大学 保健医療学部 理学療法学科 電気生理を担当

(2)メンバー表

①平間グルー	プ			
氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
平間 正博	東北大学 大学院理学研究科	教授	研究総括 化学合成・分子設計	H14.11~H20.3
		助手		H14.11~H15.6
	東北大学 大学院理学研究科	講師		H15.7~H16.3
开上 将行		助教授		H16.4~H19.3
	東京大学 大学院薬学系研究科	教授		H19.4~H20.3
十一十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十十	東北大学 大学院理学研究科	助手	小学 公式 - 八字訊記	H14.11~H16.2
八禾 臣叙	北海道大学 大学院理学研究科	准教授	化子白成・刀丁酸訂	H16.2~H20.3
佐藤格	東北大学 大学院理学研究科	准教授	同上	H19.7~H20.3
Martin J. Lear	東北大学 大学院理学研究科	助手	同上	H14.11~ H16.12
	台 同上	大学院生	同上	H14.11~H16.3
小林正宿		助手		H16.4~H17.3
山下 依冯	東北大学	大学院生		H17.4~H17.8
	大学院理学研究科	助教	H]	H17.9~H20.3
佐竹 真幸	東北大学大学院 生命科学研究科	助教授	生理活性試験	H16.3~H16.9
大城 直雅	沖縄県衛生環境 研究所	研究員	シガテラ毒魚調達・ 処理	H16.4~H20.3
Babak Heidary Alizadeh	東北大学 大学院理学研究科	JST 研究員	同上	H14.11~H16.7
與儀 健太郎	沖縄県衛生環境 研究所	研究 補助員	同上	H16.4~H20.3
安里 周子	沖縄県衛生環境 研究所	研究 補助員	同上	H16.4~H20.3
佐藤 晃子	東北大学 大学院理学研究科	研究 補助員		H14.11~H20.3
三田 隆	同上	大学院生	化学合成・分子設計	H14.11~H15.3
加藤 信樹	同上	同上	同上	同上
菊地司	同上	同上	同上	同上
坂本 聡	同上	同上	同上	同上

丸山 潤美	同上	同上	同上	H14.11~H15.3
王	同上	同上	同上	同上
小笠原徳丈	同上	同上	同上	H14.11~H16.3
佐々木信也	同上	同上	同上	同上
佐々木健雄	同上	同上	同上	同上
多々見篤	同上	同上	同上	同上
臼杵 豊展	同上	同上	同上	H14.11~H17.3
小山 靖人	同上	同上	同上	同上
青天目一行	同上	同上	同上	同上
古山英知	同上	同上	同上	同上
阪崎 隼人	同上	同上	同上	H15.4~H18.3
佐藤隆章	同上	同上	同上	同上
島村 賢	同上	同上	同上	同上
大橋 功	同上	同上	同上	H16.4~H19.3
宮崎 圭輔	同上	同上	同上	同上
吉川 圭太	同上	同上	同上	同上
川田祐也	同上	同上	同上	H17.4~H20.3
田名部 真太郎	同上	同上	同上	同上
李羅榮	同上	同上	同上	同上
齋藤 史人	同上	同上	同上	H18.4~H20.3
菅野 尚基	同上	同上	同上	同上
萩原 幸司	同上	同上	同上	同上
石原 祐樹	同上	同上	同上	H19.1~H20.3

岩津 理史	同上	同上	同上	H19.1~H20.3
小川 幸希	同上	同上	同上	同上
駒野 和雄	同上	同上	同上	同上
磯 健太郎	同上	同上	同上	同上
大倉健	同上	同上	同上	同上
粕谷 智史	同上	同上	同上	同上
川口 照子	同上	同上	同上	同上
志田貴宏	同上	同上	同上	同上
篠原 直樹	同上	同上	同上	同上
外崎 桂樹	同上	同上	同上	同上
北嶌一樹	同上	同上	同上	同上
竹内 勝俊	同上	同上	同上	同上
多田 真大	同上	同上	同上	同上
端野壮	同上	同上	同上	同上
溝口 友紀	同上	同上	同上	同上
成子 朗人	同上	学部生	同上	同上
法月 祐太朗	同上	同上	同上	同上
原田麻未	同上	同上	同上	同上
氷室 真史	同上	同上	同上	同上
平井 啓一朗	同上	同上	同上	同上
森田 浩行	同上	同上	同上	同上

②藤井グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
	生物分子工学研究所	主席 研究員	エノクローナル対体	H14.11~ H15.8.
藤井 郁雄	大阪府立大学 先端科学研究所	教授	作製・サンドイッチ ELISA 法関税	H15.10~H17.3
	大阪府立大学 大学院理学系研究科	教授		H17.4~H20.3
	生物分子工学研究所	主任 研究員	エリカロナール技体	H14.11~ H15.8.
円谷健	大阪府立大学 先端科学研究所	助手	作製・サンドイッチ	H15.10~H17.3
	大阪府立大学 大学院理学系研究科	准教授	ELISA (A) m H	H17.4~H20.3
永井 敦子	大阪府立大学 大学院理学系研究科	教授		H17.4~H20.3
北川 大輔	大阪府立大学 大学院理学系研究科	助手		H17.4~H19.3
銭谷 康志	大阪府立大学 大学院農学生命科学研究科	大学院生	同上	H14.11~H15.3
松居明子	同上	大学院生	同上	H14.11~H16.3
石川 立洋	大阪府立大学 大学院農学生命科学研究科	十学院生	司 L	H16.4~H18.3
但川 大任	大阪府立大学 大学院理学系研究科	八子阮土	tH]	H18.4~H20.3

③佐藤グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
佐藤 主税	産業技術総合研究所	グループ リーダー	Na ⁺ チャネル 三次元構造解析	H14.11~H20.3
小椋俊彦	同上	ポスドク	同上	同上
三尾 和弘	同上	ポスドク	同上	H14.11~H17.3

④津本グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
	東北大学 大学院工学研究科	助教授	蛋白質工学によろ	H14.11~ H17.3
津本 浩平	東京大学 大学院新領域創成 科学研究科	准教授	抗体の機能改変	H17.4~H20.3
田中良和	東京大学 大学院新領域創成 科学研究科	研究員	同上	H18.4.~H20.3
横田 亜紀子	東北大学 大学院工学研究科	大学院生	同上	H14.11~ H17.3
宇井 美穂子	東京大学 大学院新領域創成 科学研究科	大学院生	同上	H18.4.~H20.3

⑤佐竹グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
佐竹 真幸	東北大学 大学院生命科学研究科	助教授	チャネル結合 実験・毒性試験	H14.11~H16.3

⑥山岡グループ

氏名	所属	役職 研究項目		参加時期
山岡 薫	広島大学 大学院医歯薬学総合研究科	助教授	電气化理	H15.4~H18.3
	広島国際大学 保健医療学部理学療法学科	教授	电风生理	H18.4~H20.3
焼廣 益秀	広島国際大学 保健医療学部臨床工学科	教授	同上	H18.4~H19.3
木下 英司	同上	助手同上		H15.4~H16.3
前島 洋	広島大学 医学部保健学科	助手	同上	H15.4~H17.3
宮原 秀満	広島大学 医学部医学科	技官	同上	H15.4~H18.3
近藤 千恵	広島大学 大学院医歯薬学総合研究科	研究	同上	H16.6~H20.3
	広島国際大学 保健医療学部理学療法学科	補助員		H18.4~H20.3

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H15.7.4	平間チーム キックオフ会議	東北大学大 学院理学研 究科	25 名	チーム内各グループの研 究者による研究打合せ
H16.7.2	平間チーム 研究打合せ	東北大学大 学院理学研 究科	25 名	チーム内各グループの研 究者による研究打合せ
H17.5.20	平間チーム 研究打合せ	東北大学大 学院理学研 究科	26 名	チーム内各グループの研 究者による研究打合せ
H19.3.9	平成 18 年度ミニシン ポジウム「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:シガテ ラ毒研究の最前線」	沖縄県衛生 環境研究所	50 名	

8. 発展研究による主な研究成果

(1)論文発表(英文論文 72 件 邦文論文 19 件)

- Convergent Synthesis of the ABCDE Ring System of Ciguatoxin CTX3C. M. Maruyama, M. Inoue, T. Oishi, H. Oguri, Y. Ogasawara, Y. Shindo, and M. Hirama, *Tetrahedron, Symposia in Print*, 58, 1835-1851 (2002).
- 2. Diastereoselective Additions of Ethynyl Grignard Reagent to Erythrulose Derivatives. S. Kobayashi, P. Das, G. X. Wang, T. Mita, M. J. Lear, and M. Hirama, *Chemistry Lett.*, 300-301 (2002).
- 3. Construction of the Benzylic Quaternary Carbon Center of Zoanthenol by Intramolecular Mizoroki-Heck Reaction of Enone. G. Hirai, Y. Koizumi, S. M. Moharram, H. Oguri, and M. Hirama, *Org. Lett.*, **4**, 1627-1630 (2002).
- 4. Convergent Synthesis of The HIJKLM Ring Fragment of Ciguatoxin CTX3C. H. Uehara, T. Oishi, M. Inoue, M. Shoji, Y. Nagumo, M. Kosaka, J.-Y. Le Brazidec, and M. Hirama, *Tetrahedron*, **58**, 6493-6512 (2002).
- 5. Novel Assembly of Cyclic Ethers by Couplingα-Chlorosulfides and Alcohols. M. Inoue, G. X. Wang, J. Wang, and M. Hirama, *Org. Lett.*, **4**, 3439-3442 (2002).
- Design, Production, and Characterization of Recombinant Neocarzinostatin Apoprotein in *Escherichia coli*. 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, *J. Biochem.* 131, 729-738 (2002).
- 7. Spin-trapping Study of DNA Cleavage Induced by Enediyne C-1027 Chromophore. T. Usuki, M. Inoue, K. Akiyama, and M. Hirama, *Chemistry Lett.*, 1148-1149 (2002).
- Practical Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C by Improved Protective Group Strategy. M. Inoue, H. Uehara, M. Maruyama, and M. Hirama, *Org. Lett.*, 4, 4551-4554 (2002).
- Synthesis of ¹³C-labelled, Bicyclic Mimetics of Natural Enediynes. P. Das, T. Mita, M. J. Lear, and M. Hirama, *Chem. Commun.*, 2642-2625 (2002).
- A Model Synthetic Study Directed for the Synthesis of the C12 at C-Ring of Norzoanthamine Alkaloid. S. M. Moharram, H. Oguri, and M. Hirama, *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.*, **40**(3), 275-279 (2002).
- Coupling of A-C Ring Moieties of Zoanthenol Alkaloid Based on Suzuki-Miyaura Coupling Reaction. S. M. Moharram, H. Oguri, and M. Hirama, *Egypt. J. Pharm. Sci.*, 44, 177-193 (2003).
- Inhibition of Brevetoxin Binding to the Voltage-gated Sodium Channel by Gambierol and Gambieric Acid-A. M. Inoue, M. Hirama, M. Satake, K. Sugiyama, and T. Yasumoto, *Toxicon*, **41**(4), 469-474 (2003).
- A Novel Route to 1, 8-Dihydroxynaphthalene-Derived Natural Products. Synthesis of (±)-CJ-12, 372. M. Inoue, K. Nabatame, and M. Hirama, *Heterocycles*, 59, 87-92 (2003).

- 14. Total Synthesis of TMC-95A. M. Inoue, H. Sakazaki, H. Furuyama, and M. Hirama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2654-2657 (2003).
- Construction of the AG-ring Unit of Pinnatoxin A via Intramolecular Alkylation and Aza-Wittig Reaction. J. Wang, S. Sakamoto, K. Kamata, A. Nitta, T. Noda, H. Oguri, and M. Hirama, *Synlett*, 891-893 (2003).
- 16. Characterization of 11-Dehydro-Thromboxane B₂ Recombinant Antibody Obtained by Phage Display Technology. L.-R. Thuruta, Y. Tomioka, T. Hishinuma, Y. Kato, K. Itoh, T. Suzuki, H. Oguri, M. Hirama, J. Goto, and M. Mizugaki, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68, 273-284 (2003).
- Synthesis-Based Approach toward Direct Sandwich Immunoassay for Ciguatoxin CTX3C. H. Oguri, M. Hirama, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Maruyama, H. Uehara, and Y. Nagumo, J. Am. Chem. Soc., 125, 7608-7612 (2003).
- 18. A Concise Route to the Right Wing of Ciguatoxin. A. Tatami, M. Inoue, H. Uehara, and M. Hirama, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 5229-5233 (2003).
- Divergent Synthesis of the Tetracyclic Ethers of 6-X-7-6 Ring Systems. M. Inoue, J. Wang, G. –X. Wang, Y. Ogasawara, and M. Hirama, *Tetrahedron*, 59, 5645-5659 (2003).
- 20. Total Synthesis of Merrilactone A. M. Inoue, T. Sato, and M. Hirama, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10772-10773 (2003).
- Glycoglycerolipid from the Membranes of Acholeplasma laidlawii Binds to Human Immunodeficiency Virus-1(HIV-1) and Accelerates Its Entry into Cells. T. Shimizu, S. Arai, H. Imai, T. Oishi, M. Hirama, A. Koito, Y. Kida, K. Kuwano, *Current Microbiology*, 48, 182-188 (2004).
- 22. TMC-95A, a Reversible Proteasome Inhibitor, Induces Neurite Outgrowth in PC12 Cells. M. Inoue, H. Zhai, H. Sakazaki, H. Furuyama, Y. Fukuyama, and M. Hirama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 663-665 (2004).
- Rational Design of a Supra C-1027: Kinetically Stabilized Analogue of the Antitumor Enediyne Chromoprotein. T. Usuki, M. Inoue, M. Hirama, and T. Tanaka, J. Am. Chem. Soc., 126, 3022-3023 (2004).
- Convergent Approach to the Maduropeptin Chromophore: Aryl Ether Formation of (R)-3-Aryl-3-hydroxypropanamide and Cyclization of Macrolactam. N. Kato, S. Shimamura, S. Khan, F. Takeda, Y. Kikai, and M. Hirama, *Tetrahedron*, 60, 3161-3172 (2004).
- 25. Use of Polystyrene-Supported DBU in the Synthesis andα-Selective Glycosylation Study of the Unstable Schmidt Donor of L-Kedarosamine. I. Ohashi, M. J. Lear, F. Yoshimura, and M. Hirama, *Org. Lett.*, **6**, 719-722 (2004).
- Synthesis of the Fully Functionalized ABCDE Ring Moiety of Ciguatoxin. S. Kobayashi, B. H. Alizadeh, S. Sasaki, H. Oguri, and M. Hirama, *Org. Lett.*, 6, 751-754 (2004).
- 27. A New Synthesis of Key Intermediates for the Assembly of Polycyclic Ethers:

Yb(OTf)₃-Promoted Formation of O, S-Acetals fromα-Fluorosulfides and Alcohols. M. Inoue, S. Yamashita, and M. Hirama, *Tetrahedron Lett.*, **45**, 2053-2056 (2004).

- 28. Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of Truncated Zoanthenol Analogues.G. Hirai, H. Oguri, M. Hayashi, K. Koyama, Y. Koizumi, S. M. Moharram, and M. Hirama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 2647-2651 (2004).
- A New Stereoselective Synthesis of Ciguatoxin Right Wing Fragments. M. Inoue, S. Yamashita, A. Tatami, K. Miyazaki, and M. Hirama, *J. Org. Chem.*, 69, 2797-2804 (2004).
- Phage-Display Selection of Antibodies to the Left End of CTX3C Using Synthetic Fragments. Y. Nagumo, H. Oguri, K. Tsumoto, Y. Shindo, M. Hirama, T. Tsumuraya, I. Fujii, Y. Tomioka, M. Mizugaki, I. Kumagai, J. Immunol. Methods, 289, 137-146 (2004).
- A Quantitative and Comparative Study of the Effects of a Synthetic Ciguatoxin CTX3C on the Kinetic Properties of Voltage-Dependent Sodium Channels. K. Yamaoka, M. Inoue, H. Miyahara, K. Miyazaki, and M. Hirama, *Br. J. Pharmacol.*, 142, 879-889 (2004).
- 32.) First and Second Generation Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C. M. Inoue, K. Miyazaki, H. Uehara, M. Maruyama, and M. Hirama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12013-12018 (2004).
- 33. Spin-Trapping of ¹³C-Labeled p-Benzynes, Generated via the Masamune-Bergman Cyclization of Bicyclic Nine-Membered Enediynes. T. Usuki, T. Mita, M. J. Lear, P. Das, F. Yoshimura, M. Inoue, M. Hirama, K. Akiyama, and S. Tero-Kubota. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 5249-5253 (2004).
- Synthesis of the Fully Functionalized Nine-Membered Diyne Core of the C-1027 Chromophore. M. Inoue, T. Kikuchi, and M. Hirama, *Tetrahedron Lett.* 45, 6439-6442 (2004).
- Stereocontrolled Synthesis of the ABCDE Ring Moiety of Ciguatoxin CTX3C. S. Kobayashi, Y. Takahashi, K. Komano, B. H. Alizadeh, Y. Kawada, T. Oishi, S. Tanaka, Y. Ogasawara, S. Sasaki, and M. Hirama, *Tetrahedron*, **60**, 8375-8396 (2004).
- 36. Synthesis of the Bicyclic [7.3.0] Enediyne System of the Maduropeptin Chromophore: Remarkable Atropisomerism of Ansamacrolactam and Isomerization of the C4-C13 Double Bond. N. Kato, S. Shimamura, Y. Kikai, and M. Hirama, *Synlett*, 2107-2110 (2004).
- Synthesis of the Bicyclo[7.3.0]dodecatrienediyne Core of the C-1027 Chromophore. M. Inoue, S. Hatano, M. Kodama, T. Sasaki, T. Kikuchi, and M. Hirama, Org. Lett., 6, 3833-3836 (2004).
- 38. Synthesis of the C-1027 Chromophore Framework through Atropselective Macrolactonization. M. Inoue, T. Sasaki, S. Hatano, and M. Hirama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 6500-6505 (2004).

- A Formal Total Synthesis of (+)-Pinnatoxin A. S. Sakamoto, H. Sakazaki, K. Hagiwara, K. Kamada, K. Ishii, T. Noda, M. Inoue, and M. Hirama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 6505-6510 (2004).
- 40. A quantitative and comparative study of the effects of a synthetic ciguatoxin CTX3C on the kinetic properties of voltage-dependent sodium channels. Yamaoka, K., et al., *Br J Pharmacol*, **142**(5): p. 879-89 (2004).
- 41. Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C, a Causative Toxin of Ciguatera Seafood Poisoning. M. Inoue, M. Hirama, *Synlett*, **4**, 577-595 (2004).
- 42. Evolution of a Practical Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C. M. Inoue, M. Hirama, *Acc. Chem. Res.* **37**, 961-968 (2004).
- 43. Efficient Construction of the Kedarcidin Chromophore Ansamacrolide. Y. Koyama, M. J. Lear, F. Yoshimura, I. Ohashi, T. Mashimo, and M. Hirama, *Org. Lett.*, **6**, 267-270 (2005).
- 44. Design and Synthesis of a trans-Fused Polycyclic Ether Skeleton as an α-Helix Mimetic Scaffold. H. Oguri, A. Oomura, S. Tanabe, and M. Hirama, *Tetrahedron Lett.*, 46, 2179-2183 (2005).
- 45. ESR Studies on DNA Cleavage Induced by Enedyne C-1027 Chromophore. T. Usuki, M. Inoue, K. Akiyama, and M. Hirama, *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 5218-5224 (2005).
- 46.) Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C: A Venture into the Problems of Ciguatera Seafood Poisoning. M. Hirama, *Chem. Rec.*, **5**, 240-250 (2005).
- 47. Formal Total Synthesis of Neocarzinostatin Chromophore. S. Kobayashi, M. Hori, G. X. Wang, and M. Hirama, *J. Org. Chem.*, **71**, 636-644 (2006).
- Antitumor Enedyne Chromoprotein C-1027. Mechanistic Investigation of the Chromophore-Mediated Self-Decomposition Pathway. M. Inoue, T. Usuki, N. Lee, M. Hirama, T.Tanaka, F. Hosoi, S. Ohie, and T. Otani. J. Am. Chem. Soc., 128, 7896-7903 (2006).
- 49. Asymmetric Total Synthesis of (-)-Merrilactone A: Use of Bulky Protective Group as Long-Range Stereocontrolling Element. M. Inoue, T. Sato, and M. Hirama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**. 4843-4848 (2006).
- 50. Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of 51-HydroxyCTX3C. T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Inoue, A. Tatami, K. Miyazaki, and M. Hirama, *Toxicon*, **48**, 287-294 (2006).
- 51. Structural Factors Governing Stereoselective Heck Reaction for the Construction of the Oxindole Portion of TMC-95A. M. Inoue, T. Takahashi, H. Furuyama, and M. Hirama, *Synlett*, 3037-3040 (2006).
- 52. Synthesis and Evaluation of α -Helix Mimetics Based on a trans-Fused Polycyclic Ether: Sequence-Selective Binding to Aspartate Pairs in α -Helical Peptides. H. Oguri, S. Tanabe, A. Ohmura, M. Umetsu, and M. Hirama, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 5801-5805 (2006)
- 53. Effect of Ciguatoxin 3C on Voltage-Gated Na⁺ and K⁺Currents in Mouse Taste

Cells. V. Ghiaroni, H. Fuwa, M. Inoue, M. Sasaki, K. Miyazaki, M. Hirama, T. Yasumoto, G. P. Rossini, G. Scalera and A. Bigiani, *Chem. Senses* **31**, 673-680 (2006).

- Total Synthesis of Ciguatoxin 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).
- 55. Direct Observation of ESR Spectra of Bicyclic Nine-Membered Enediynes at Ambient Temperature. M. Hirama, K. Akiyama, P. Das, T. Mita, M. J. Lear, K. Iida, I. Sato, F. Yoshimura, T. Usuki, and S. Tero-Kubota, *Heterocycles*, 69, 83-89 (2006).
- 56. Convergent Assembly of Polycyclic Ethers via Acyl Radical Addition to Unactivated Enol Ether. M. Inoue, Y. Ishihara, S. Yamashita, M. Hirama, *Org. Lett.* **8**, 5801-5804 (2006).
- 57. Two Convergent Routes to the Left-Wing Fragment of Ciguatoxin CTX3C Using *O*,*S*-Acetals As Key Intermediates. M. Inoue, S. Yamashita, Y. Ishihara, M. Hirama, *Org. Lett.* **8**, 5805-5808 (2006).
- Na+ channel pharmacology and molecular mechanisms of gating. Yamaoka, K.,
 S.M. Vogel, and I. Seyama, *Curr Pharm Des*, **12**(4): p. 429-42 (2006).
- 59. 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).
- Synthesis of the LMN-Ring Fragment of Caribbean Ciguatoxin. K. Yoshikawa, M. Inoue, M. Hirama, *Tetrahedron Lett.* 48, 2177-2180 (2007).
- 61. A Concise Route to Two Distinct E-Ring Structures of Ciguatoxins. M. Inoue, M. Iwatsu, S, Yamashita, M. Hirama, *Heterocycles*, **72**, 327-338 (2007).
- Total Synthesis and Bioactivity of an Unnatural Enantiomer of Merrilactone A: Development of an Enantioselective Desymmetrization Strategy. M. Inoue, N. Lee, S. Kasuya, T. Sato, M. Hirama, M. Moriyama, and Y. Fukuyama, *J. Org. Chem.*, **72**, 3065-3075 (2007).
- 63. 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).
- 64. Total Synthesis of the Maduropeptin Chromophore Aglycon. K. Komano, S. Shimamura, M. Inoue, and M. Hirama, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14184-14186 (2007).
- 65. Synthesis of the Bicyclo[7.3.0]dodecadiyne Core of the Maduropeptin Chromophore. K. Iso, M. Inoue, N. Kato, and M. Hirama, *Chem. Asian J.*, **3**, 447-453 (2008).
- 66. Total Synthesis of the C-1027 Chromophore Core. Extremely Facile Enediyne Formation via SmI₂-Mediated 1,2-Elimination. M. Inoue, I. Ohasi, T. Kawaguchi, and M. Hirama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 1777-1779 (2008).

- 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.*, in press.
- 68. How Protein Recognizes Ladder-like Polycyclic Ethers: Interactions between Ciguatoxin (CTX3C) Fragments and Its Specific antibody 10C9. Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Masayuki Inoue, Masahiro Hirama, and Kouhei Tsumoto, submitted for publication.
- Enantioselective Synthesis of the Fully Functionalized ABC-Ring of Zoanthenol.
 N. Sugano, Y. Koizumi, G. Hirai, H. Oguri, S. Kobayashi, S. Yamashita, and M. Hirama, *Chem. Asian J.*, in press.
- Synthetic Ciguatoxin CTX3C Selectively Activates Nav1.8 Sensory Neuron Specific Sodium Channels Expressed in ND7-23 Cells. K. Yamaoka, M. Inoue, K. Miyazaki, M. Hirama, C. Kondo, E. Kinoshita, and I. Seyama, submitted for publication.
- 71. Detection of CTX3C from fish extracts by sandwich immunoassay, Takeshi Tsumuraya, Takeshi Sato, Naomasa Oshiro, Ikuo Fujii, Masahiro Hirama, manuscript in prerararion.
- 72. Production of anti-Caribbean Cigautoxin Antibodies by Immunization of a Synthetic Hapten, Takeshi Tsumuraya, Yuichiro Saito, Ikuo Fujii, Masayuki Inoue, Masahiro Hirama, manuscript in prerararion.
- 73. シガトキシン全合成への道のり、平間正博、大石 徹、現代化学、No.373、 55-62 (2002).
- 74. おいしい科学、平間正博へのインタビュー記事(土方正志)「フグ毒の 100 倍!? こわ~い食中毒」、*TRIGGER*, (03), 65-68 (2002).
- 75. フグ毒よりコワーイ食中毒シガテラ-毒素の全合成から予防へ、平間正博、 化学と教育、50(6),443-445 (2002).
- 76. 毒素 CTX3C の化学合成から予防へ-世界最大規模の海産物食中毒シガ テラ、平間正博、大石 徹、化学と工業、55 (7), 786-789 (2002).
- 77. Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C. M. Hirama, T. Oishi, 有機合成化学協会創立60周年記念出版 "My Favorite Organic Synthesis" p. 26-27 (2002).
- 78. 食中毒(シガテラ中毒)の原因毒シガトキシン CTX3C の化学合成、平間正博、*Medical Science Digest*, **28** (9), 398-399 (2002).
- 79. 最近の学界の話題—食中毒シガテラ毒素の全合成、平間正博、青葉理学振興会報告、第3号 (2003).
- 80. Venture into the Problems of Ciguatera Seafood Poisoning. M. Hirama, *CREST Highlight*, Vol. 3, "Frontiers in Bioconjugate Chemistry" p. 6-8 (2002).
- 81. シガトキシンの全合成と抗体、平間正博、CREST"単一分子・原子レベル の反応制御"領域ニュースレター、第7号、p. 20-22 (2003).

- 82. 海洋天然物の全合成、平間正博、21 世紀の化学の潮流を探る報告書 No. 16 「海洋天然物化学-化合物ライブラリーとしての評価」、日本化学会、p. 21-26 (2003).
- 83. 海洋天然物の全合成、平間正博、先端化学シリーズV「海洋天然物・錯体・コンビナトリアル・全合成」日本化学会編、丸善、p. 16-19 (2003).
- 84. 「全合成」の現状と今後の展望、平間正博、21 世紀の化学の潮流を探る 報告書 No. 23「全合成-天然物から超タンパク質まで」、日本化学会、p.1 (2003)
- 85. 全合成の現状と今後の展望、平間正博、先端化学シリーズV「海洋天然物・錯体・コンビナトリアル・全合成」日本化学会編、丸善、p. 239-240 (2003).
- 9員環エンジイン抗生物質 N1999-A2 の全合成:絶対配置と DNA 切断、 小林正治、平間正博、有機合成化学協会誌、62, 184-193 (2004).
- 87. シガトキシン全合成、平間正博、Aoba Scientia, No.3, 2-3 (2004).
- 88. 私が化学者になった理由「好奇心とたくさんの出会い」、平間正博、化学,
 61 (6), 11 (2006).
- 89. キュバン, FK506, シガトキシンの全合成、平間正博、井上将行、大学院 講義有機化学Ⅱ 有機合成化学・生物有機化学、野依良治ほか編、東京 化学同人、第2版、印刷中
- 90. 有機合成から自然原理の発見へ、平間正博、「化学者たちの感動の瞬間– 興奮に満ちた 50 の研究物語」、有機合成化学協会編、化学同人、p.206-209 (2006).
- 91. 高反応性エンジイン系抗腫瘍性物質の機能と合成、井上将行、平間正博、 ファルマシア、印刷中 (2008)

(2)口頭発表

①学会

国内 214 件, 海外 60 件

(3)特許出願(SORST 研究の成果に関わる特許(出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	11
海外出願	3
計	14

(4) その他特記事項

① 受賞

- 大栗 博毅 (東北大学大学院理学研究科・助手)、平成 14 年度天然物化学談話会奨励賞受賞 (Young Scientist's Research Awards in Natural Product Chemistry)、「合成抗原を用いた抗シガトキシン抗体の調製とサンドイッチ イムノアッセイ」
- 2. 坂本 聡(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程3年)、第 44回天然有機化合物討論会奨励賞、「ピンナトキシンAの全合成研究」
- 小林 正治(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程3年)、 平成14年度青葉理学振興会賞
- 4. 小林 正治(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程3年)、 日本化学会第83春季年会学生講演賞、「シガトキシンABCDE 環部の合成」
- 5. 佐藤 隆章(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程前期課程2年)、 東北大学総長賞
- 6. 平間 正博(東北大学大学院理学研究科・教授)、平成 15 年度 日本化学会賞、「シガトキシン類の全合成を中心とした生理活性天然物の化学的研究」、平成 16 年3月
- 7. 小山 靖人(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程3年)、日本 化学会第84春季年会学生講演賞、「ケダルシジンクロモフォアの全合成研究 (2)」、平成16年3月
- 4. 井上 将行(東北大学大学院理学研究科・助教授)、第 1 回 Merck Banyu Lectureship Award (MBLA)、「神経細胞に作用する天然有機化合物の全合成」、 平成 16 年 11 月
- 9. 井上 将行(東北大学大学院理学研究科・助教授)、平成 16 年度第 54 回日本化 学会進歩賞、「神経細胞に特異的に作用する複雑な天然有機化合物の全合成」、 平成 17 年 3 月
- 10. 志田 貴宏(東北大学理学部化学科・3年)、青葉理学振興会奨励賞、平成17年3月
- 11. 佐藤 隆章(東北大学大学院博士課程後期課程3年)、東北大学大学院理学 研究科化学専攻賞、平成18年3月
- 12. 島村 賢(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程3年)、日本化学会第86春季年会学生講演賞、「マデュロペプチンクロモフォアの全合成研究」平成18年3月
- 13. 李 羅榮 (東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程2年)第17 回仙台シンポジウム Best Poster 賞、平成18年6月
- 14. 李 羅榮 (東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程2年)、第

21回有機合成化学若手研究者の仙台セミナー賞、「シガトキシンの構造活性 相関と毒性中和」、平成18年12月

- 15. 李 羅榮(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程2年) 東 北大学理学研究科大学院 GP・21 世紀 COE 合同 Advanced Science Symposium by Young Brains : Oral Presentation Award、平成19年2月17日
- 16. 李 羅榮(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程2年)、日本化学会第87春季年会学生講演賞、「SAR Study and Toxicity Neutralization of Ciguatoxin」、平成19年3月
- 17. 井上 将行(東京大学大学院薬学系研究科・教授)、Novartis Chemistry Lectureship 2008/2009、平成 19 年 10 月

②異動・昇格など

- 大栗博毅助手(東北大学大学院理学研究科)、北海道大学大学院理学研究科・ 助教授として異動(平成16年3月)
- 2. Martin J. Lear 助手(東北大学大学院理学研究科)、シンガポール大学・准教 授として異動(平成17年1月)
- 3. 藤井郁雄教授(大阪府立大学先端科学研究所)、大阪府立大学大学院理学系 研究科・教授として異動(平成17年4月)
- 円谷健助手(大阪府立大学先端科学研究所)、大阪府立大学大学院理学系研 究科・准教授として異動(平成17年4月)
- 5. 津本浩平助教授(東北大学大学院工学研究科)、東京大学大学院新領域創成 科学研究科・准教授として異動(平成17年4月)
- 6. 小林正治助手(東北大学大学院理学研究科)、大阪府立大学大学院理学系研 究科・助教として異動(平成17年4月)
- 山下修治(東北大学大学院理学研究科・大学院博士課程後期課程1年)、東 北大学大学院理学研究科・助教に昇格(平成17年9月)
- 4. 山岡薫助教授(広島大学大学院医歯薬学総合研究科)、広島国際大学保健医療学部臨床工学科・教授として異動(平成18年4月)
- 井上将行助教授(東北大学大学院理学研究科)、東京大学大学院薬学系研究 科・教授として異動(平成19年4月)
- 10. 田中良和研究員(東京大学大学院新領域創成科学研究科)、北海道大学創成 科学共同研究機構・助教として異動(平成 20 年 1 月)
- 9. 結び

研究目標の全体的な達成度は、非常に高いと自己評価している。たとえば、 本研究で開発できたシガトキシン類の第二世代全合成法の威力はすばらしく、 目標とした大部分のシガトキシン類・擬似シガトキシン類の全合成を世界で最 初に達成した。しかし、CTX1Bの合成量は、まだ 0.1 mg 以下であり、数ミリグ ラムの全合成を達成するためには、特に A 環側鎖を有する左半分セグメントの 効率的で選択的な合成法に課題が残っている。カリビアン C-CTX の全合成も、 未完成であり、特にM環を含む右半分セグメントの効率的合成法開発が課題で ある。

抗体についても、全合成中間体を用いた合理的な抗シガトキシン抗体作成法 を開発できた。シガテラ中毒予防・治療のためにも、今後は、CTX1Bの左半分 を認識する抗体を作らなければならない。従来のハプテンーKLHコンジュゲ ート合成法に問題があった可能性が高いことが分かって来たので、間もなく解 決できると考えている。

共同研究も非常に機能的に展開することができた。合成シガトキシン類を使 用した電気生理学的解析(山岡グループ)や、合成ハプテンーKLHコンジュ ゲートによる抗体作製と基本的イムノアッセイ法(ELISA)開発(藤井グループ)、 抗体一合成シガトキシン(部分構造)複合体のX線結晶構造解析(津本グルー プ)、合成シガトキシンと電位依存性ナトリウムチャネルの開構造単粒子解析 (佐藤主税グループ)、藤井グループが開発したシガトキシン類のイムノアッセ イ法の高感度化と簡便キット化・抗体大量生産(共同研究:細胞化学研究所、 佐藤威博士)、沖縄のシガテラ中毒魚の収集と評価(平間グループの大城他・沖 縄衛生環境研究所)など、非常に優れた共同研究成果が得られた。研究者間で も専門外の事柄について教えあうことが度々あり、随分と勉強になった。SORST 終了後も、更に共同研究を進め発展させていくことになっており、このような 共同研究体制を作れるきっかけを作っていただいた SORST プロジェクトに心か

ら感謝したい。

また、各グループで、他の研究費では雇用しにくい研究員や研究補助員を雇用することができて、非常に研究遂行上の力になった。この点も SORST プロジェクトの代えがたい良い点である。

前節「特記事項」でも記したように、プロジェクト全体で、教授、准教授等 への若手職員の8名の栄転に加え、8名以上の大学院博士課程修了者がアカデ ミックポスト(国内外における博士研究員を経た場合も多い)を獲得したほか、 企業などで多数活躍している。SORST プロジェクトと SORST 研究統括の中井 武先生及び田村技術参事のご支援に改めて御礼を申し上げる。 First and Second Generation Total Synthesis of Ciguatoxin CTX3C. M. Inoue, K. Miyazaki, H. Uehara, M. Maruyama, and M. Hirama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12013-12018 (2004).

著作権保護のため、非表示にしています。(科学技術振興機構)
Total Synthesis of Ciguatoxin 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).

Chemistry World

平成 18 年度 SORST ミニシンポジウム

「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:シガテラ毒最前線」

琉球放送(テレビ)で放映、沖縄、平成19年3月9日



















2006年12月26日 秋保温泉

