

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 9 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03278

研究課題名(和文)カリビアンシガトキシンの全合成と抗体作製及び高感度検出法開発への応用

研究課題名(英文)Studies toward the total synthesis of Caribbean ciguatera toxin for the development of a highly sensitive antibody-based immunoassay

研究代表者

佐々木 誠 (Sasaki, Makoto)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：80235267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：カリブ海で発生する食中毒シガテラの高感度微量検出法開発のための抗体作製を目的として、カリビアンシガトキシンの全合成研究を行った。カリビアンシガトキシンのM環の構築には既存の合成手法が適用できないため、全合成における最難関の課題の一つである。7員環ラク톤由来のエノールホスフェートのStille反応によるヒドロキシメチル基の導入、[3,3]-シグマトロピー転位を用いた α -ヒドロキシエキソエノールエーテルの構築を鍵工程としてLM環を合成した。さらに、鉄触媒によるヒドロシランを用いた還元的オレフィンクロスカップリング反応を適用することによりLMN環フラグメントの立体選択的合成を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、カリビアンシガトキシンのシガテラ食中毒が世界的に拡大しつつあり、その予防対策は急務の課題となっている。カリビアンシガトキシンは天然から極微量しか得られないため、毒判定のための純粋な標準サンプルの供給や微量検出法の開発のために、化学合成による物質供給が世界的に強く望まれている。本研究により、カリビアンシガトキシン合成における最難関課題の一つであるLMN環部の合成法が確立できた。これにより、分子右半分に相当するHIJKLMN環フラグメントの合成とそれを用いたモノクローナル抗体の作製への道が拓かれた。今後、カリビアンシガトキシンの微量検出法の開発に貢献する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Ciguatera is a naturally occurring seafood poisoning prevalent in tropical and subtropical regions of the Pacific Ocean, Indian Ocean, and Caribbean Sea with more than 20,000-60,000 victims and continues to be a serious worldwide public health concern. Caribbean ciguateras, the principal causative toxins for ciguatera around the Caribbean Sea areas, possess the most complicated structure among the ciguateras known to date. An efficient synthesis route to the LMN-ring fragment of Caribbean ciguatera toxin C-CTX-1 has been developed. The key feature of the synthesis includes hydrogen atom transfer based reductive olefin cross-coupling to access a sterically congested tetrasubstituted stereogenic center on the strained seven-membered M-ring with the pseudoaxially oriented 1,3-dimethyl structure. Further studies towards the synthesis of the right-hand HIJKLMN-ring fragment through convergent union of the HI- and KLMN-ring fragments based on Suzuki-Miyaura reaction are underway.

研究分野：天然物合成化学、有機化学

キーワード：カリビアンシガトキシン シガテラ中毒 効率的全合成 抗体作製 高感度微量検出法

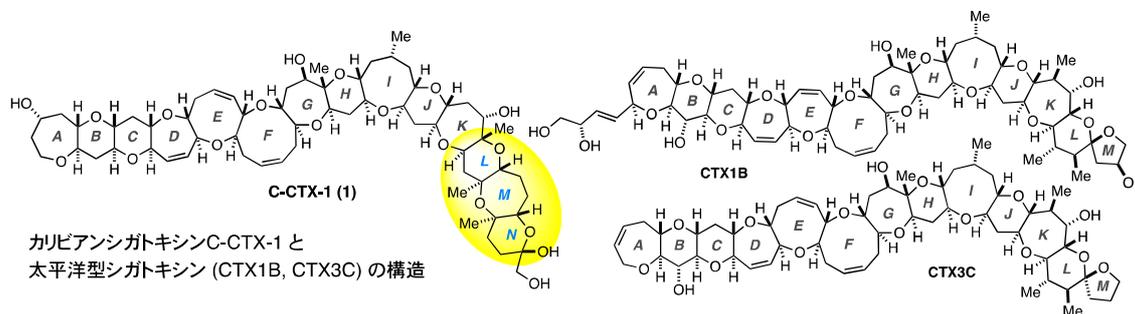
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シガテラは、熱帯・亜熱帯の珊瑚礁海域に生息する魚類の摂食によって起こる特異な食中毒であり、世界的に年間3~6万人の患者発生が推定され、急性自然毒食中毒としては世界最大規模である。原因毒のシガトキシン(CTX)には、基本骨格の異なる太平洋型、カリブ海型、インド洋型があり、海洋渦鞭毛藻により生産され、食物連鎖を介して多種の魚類に移行・蓄積する巨大ポリ環状エーテル天然物である。シガトキシンは、極めて微量で神経のナトリウムイオンチャンネルに作用し、強力な毒性(マウス致死毒性 0.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を発現する。しかし、魚に含まれる毒が非常に微量であり、魚の外見や味から毒魚を判別することは不可能である。さらに多数の食用魚が広範囲にわたって毒化することが中毒予防を極めて困難にしており、未だに治療法は存在しない。近年、世界各地の温帯地域でもシガテラ中毒が拡大・多発し、人類にとって大きな脅威となりつつあり、その撲滅は世界規模での緊急課題となっている。

太平洋型シガトキシン類については、平間らによる網羅的全合成、磯部らの全合成が報告され、また、平間・藤井・円谷らにより特異的認識抗体による免疫学的検出法が開発され、簡易市販キットの販売が開始された。

これに対し、カリビアンシガトキシン C-CTX-1 (1)は、米国大西洋やカリブ海域で発生するシガテラ中毒の主要原因毒であり、太平洋型 CTX 類と比べて、最大の分子量と最も複雑な構造を有する。特に、C-CTX-1 の分子右端に含まれる複雑な LMN 環構造は、太平洋型 CTX 類とは全く異なり、その効率的合成法の開発は未解決であり、学術的に極めて重要かつチャレンジングな合成標的と言える。近年、カリビアンシガトキシンによるシガテラ中毒が世界各地で頻発しており、その対策は急務である。しかし、太平洋型 CTX 類と同様に試料入手が極めて困難な極微量成分であり、毒判定のための標準サンプルの供給や微量検出法の開発という世界的な強い要請に応えるために、C-CTX-1 の効率的な化学合成法の確立は天然物合成化学が果たすべき最重要かつ喫緊な研究課題である。

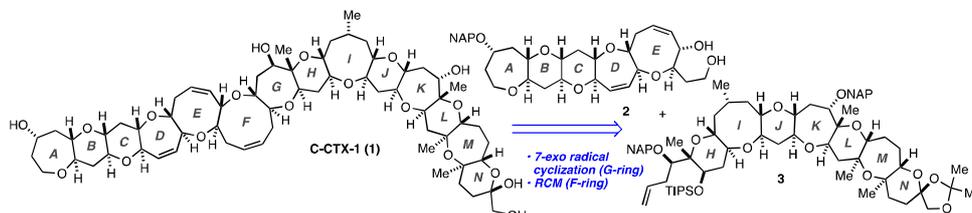


2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究代表者の研究成果の蓄積を踏まえ、シガトキシン合成研究の最後の最難関課題である C-CTX-1 の全合成を基盤とした特異的認識抗体の作製と微量検出法開発への応用に取り組み、地球規模の脅威となりつつあるシガテラ中毒の予防・撲滅に貢献することを目的とする。特に、C-CTX-1 の全合成における最難関課題である LMN 環の効率的合成法の開発と分子右端部 HIJKLMN 環フラグメントの合成法の確立に集中的に取り組み、C-CTX-1 の右側を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製へと展開する。

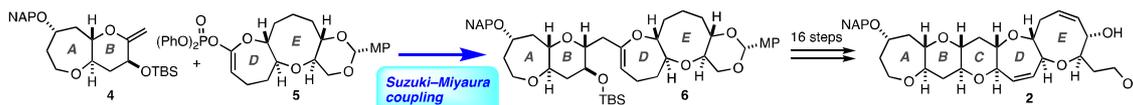
3. 研究の方法

C-CTX-1 (1) を分子中央部で逆合成切断し、左右フラグメント(ABCDE 環 2, HIJKLMN 環 3)を分子中央部 FG 環で連結することにより全合成する計画を立案した。両フラグメントの連結には、研究代表者が独自に開発し、平間らの太平洋型 CTX 類の全合成においてその有用性が実証された 7-*exo* ラジカル環化と閉環メタセシス (RCM) による FG 環構築法を採用する。



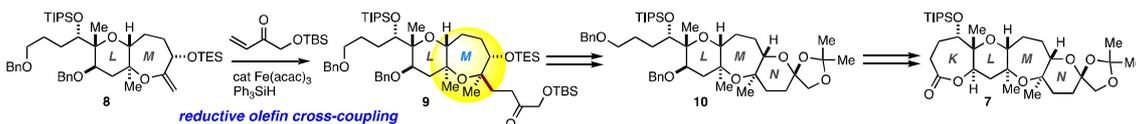
(1) ABCDE 環フラグメントの合成

ABCDE 環フラグメント 2 については、AB 環フラグメント 4 と DE 環フラグメント 5 を鈴木-宮浦反応により連結した後、C 環を閉環する収束的な合成戦略に基づいて合成する。



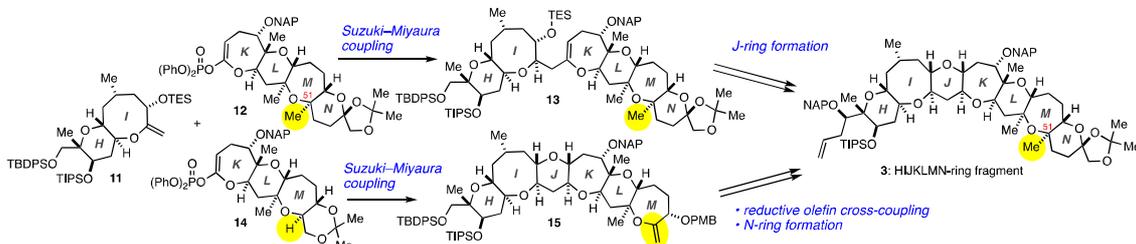
(2) KLMN 環フラグメントの合成

C-CTX-1のM環部は、7員環エーテル上に1,3-ジアキシャルの関係にある核間ジメチル基を持つために歪みの大きい構造となっており、その構築には既存のエーテル環構築法を用いた合成法が適用できず、C-CTX-1の全合成における最難関の課題の一つである。KLMN環フラグメント7を合成するにあたり、M環構築の短工程化を実現するための新たな合成戦略として、Baranらにより報告された鉄ヒドリド触媒によるヒドロシランを用いた還元的オレフィンクロスカップリング反応を適用することを計画した(8-9)。



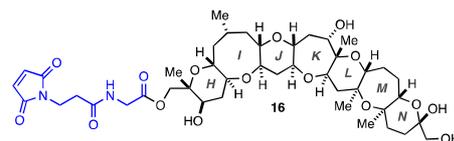
(3) HIJKLMN環フラグメントの合成

HI環エキソオレフィン11と、KLMN環ラクトン7から得られるエノールホスフェート12を鈴木-宮浦反応により連結し、化合物13を得る。さらに、J環を構築してHIJKLMN環フラグメント3を合成する。この合成ルートの成否の鍵を握るのは、核間ジメチル基を持つ歪んだM環の存在下でフラグメントカップリングが進行するかという点にある。これが困難であった場合には、化合物14を用いてフラグメント連結を行い、化合物15へと誘導した後に、還元的オレフィンカップリングによりC51位メチル基の導入とN環構築を行う合成ルートについて検討する。本反応は官能基許容性が高く、高度に官能基化された基質15への適用も十分可能と考えられる。



(4) C-CTX-1右端特異的モノクローナル抗体の作製と微量検出法の確立

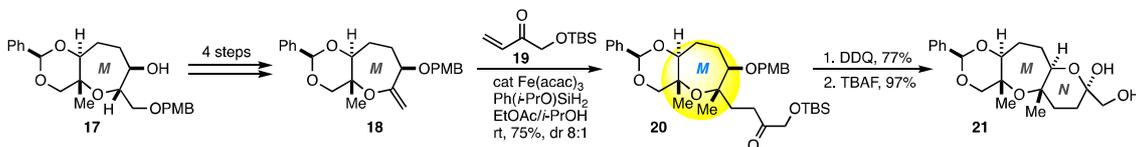
先行研究を参考にして合成ハプテンとしてHIJKLMN環からなる7環性化合物16を設計した。チオール修飾したタンパク質のマレイミドに対する共役付加を利用してタンパク質コンジュゲートを調製し、これを用いてC-CTX-1の右側部分構造を高い結合性で特異的に認識するモノクローナル抗体の獲得とC-CTX-1の高感度微量検出法の確立を目指す(研究協力者・藤井教授、円谷健教授との共同研究)。



4. 研究成果

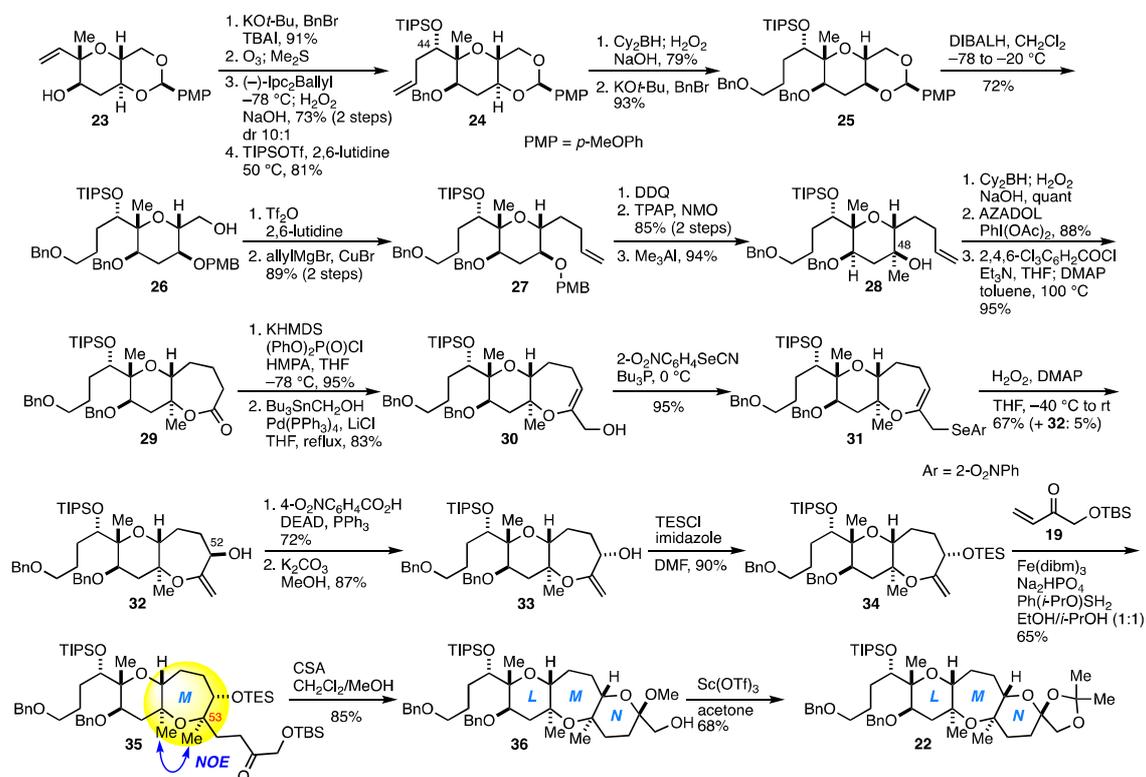
(1) LMN 環フラグメントの立体選択的合成

まず、モデル基質を用いてMN環の合成を検討した。2-デオキシ-D-リボースから11工程で得られるエキソオレフィン18に対して、ビニルケトン19との還元的オレフィンクロスカップリングを行ったところ、予想通り望みのジアステレオマー20を優先して得ることに成功した。さらに、脱保護を経てLM環モデル化合物21の合成に成功した。



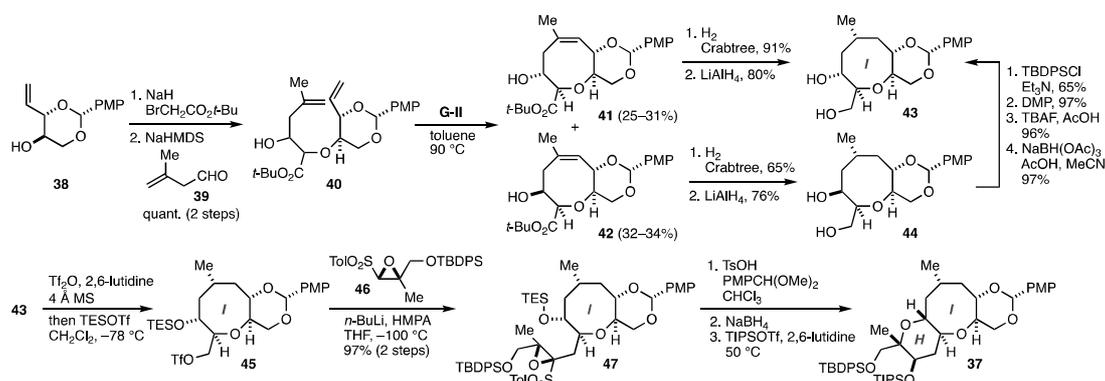
次に、還元的オレフィンクロスカップリングを実際の基質に適用し、LMN環フラグメント22の合成を行った。既知化合物23を出発物質とし、不斉アリル化によりC44位不斉中心を導入し、得られた24から3工程でアルコール26に導いた。炭素鎖を増炭した化合物27から第三級アルコール28に誘導し、山口ラクトン化を含む3工程で7員環ラクトン29を合成した。次いで、エノールホスフェートへと変換し、トリブチルスタニルメタノールとのStille反応によりヒドロキシメチル基を導入してアリルアルコール30を得た。さらに、アリルセレニド31の[2,3]-シグマトロピー転位により α -ヒドロキシエキソエノールエーテル32を合成した。C52位ヒドロキシ基を光延反応により立体反転し、得られたアルコール33をTES基で保護して鍵中間体34を合成した。鍵工程となる還元的オレフィンクロスカップリング反応について条件検討を行った結果、リン酸水素二ナトリウム存在下、Fe(III)触媒として嵩高いリガンドを有するFe(dibm)₃とPh(*i*-PrO)SiH₂を用いてエキソエノールエーテル34とビニルケトン19の反応を行ったところ、良好な収率で目的とする化合

物35を得ることに成功した。さらに、メタノール中酸処理することによりメチルアセタール36に導いた後、アセトン中Sc(OTf)₃で処理することによりLMN環フラグメント22の合成を達成した。



(2) HI 環フラグメントの合成

HI環フラグメント37に関して既知の方法を一部改良してより効率的な合成法を開発した。グルコースから3工程で得られるアルコール38をプロモ酢酸エステルでアルキル化し、得られたエステルのアニオンを不安定なアルデヒド39と縮合してジエン40に導いた。Grubbs第二世代触媒(G-II)を用いた閉環メタセシスにより2種の立体異性体41, 42を得た。化合物41に対してCrabtree触媒を用いた接触水素化と続くエステルの還元を行い、ジオール43を合成した。一方、化合物42に対して同様の2工程の還元を行ってジオール44へと誘導した後、さらに4工程の反応で第二級アルコールの立体反転を行ってジオール43へと導いた。ジオール43から既知の方法に従って、トリフラート45、エポキシスルホン47を経てHI環フラグメント37を合成した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Keisuke Sakurai, Makoto Sasaki, Haruhiko Fuwa, Total synthesis of enigmazole A, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, 57, 2018, 5143–5146
DOI: 10.1002/anie.201801561

Makoto Sasaki, Kotaro Iwasaki, Keisuke Arai, Studies towards the total synthesis of Caribbean ciguatoxin C-CTX-1: Synthesis of the LMN-ring fragment through reductive olefin cross-coupling, *Organic Letters*, 査読有, 20, 2018, 7163–7166
DOI: 10.1021/acs.orglett.8b03102

Kotaro Iwasaki, Satori Sasaki, Yusuke Kasai, Yuki Kawashima, Shohei Sasaki, Takanori Ito, Mari Yotsu-Yamashita, Makoto Sasaki, Total synthesis of polycavernosides A and B, two lethal toxins from red alga, *The Journal of Organic Chemistry*, 査読有, 82, 2017, 13204–13219.
DOI: 10.1021/acs.joc.7b02293

Eva Alonso, Andres C. Vieira, Ines Roderiguez, Rebeca Alvarino, Sandra Gegunde, Haruhiko Fuwa, Yuto Suga, Makoto Sasaki, Amparo Alfonso, Jose Manuel Cifuentes, Luis M. Botana, Tetracyclic truncated analogue of the marine toxin gambierol modifies NMDA, tau, and amyloid β expression in mice brains: Implications in AD pathology, *ACS Chemical Neuroscience*, 査読有, 8, 2017, 1358–1367.
DOI: 10.1021/acschemneuro.7b00012.

Haruhiko Fuwa, Makoto Sasaki, Exploiting ruthenium-catalyzed metathetic and non-metathetic reactions in total synthesis of marine oxacyclic natural products, *Bulletin Chemical Society of Japan*, 査読有, 89, 2016, 1403–1415.
DOI: 10.1246/bcsj.20160224.

Moemi Kanto, Sota Sato, Masashi Tsuda, Makoto Sasaki, Stereodivergent synthesis and configurational assignment of the C1–C15 segment of amphirionin-5, *The Journal of Organic Chemistry*, 査読有, 81, 2016, 9105–9121.
DOI: 10.1021/acs.joc.6b01700.

Yu Onodera, Kazuaki Hirota, Yuto Suga, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita, Makoto Sasaki, Diastereoselective ring-closing metathesis as a means to construct medium-sized cyclic ethers: Application to the synthesis of a photoactivatable gambierol derivative, *The Journal of Organic Chemistry*, 査読有, 81, 2016, 8234–8252.
DOI: 10.1021/as.joc.6b01302

Atsushi Toyoshima, Makoto Sasaki, Toward the total synthesis of smphidinolide N: Convergent synthesis of the C1–C13 segment, *Tetrahedron Letters*, 査読有, 57, 2016, 3532–3534.
DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.06.107.

Sachie Furumochi, Tatsuya Onoda, Yuko Cho, Haruhiko Fuwa, Makoto Sasaki, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi Konoki, Effect of carbon chain length in acyl coenzyme A on the efficiency of enzymatic transformation of okadaic acid to 7-O-acyl okadaic acid, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 26, 2016, 2992–2996.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.05.027.

Yuki Kawashima, Atsushi Toyoshima, Haruhiko Fuwa, Makoto Sasaki, Toward the total synthesis of amphidinolide N: Synthesis of the C8–C29 fragment, *Organic Letters*, 査読有, 18, 2016, 2232–2235.
DOI: 10.1021/acs.orglett.6b00871.

Haruhiko Fuwa, Naoya Yamagata, Yuta Okuaki, Yuta Ogata, Asami Saito, Makoto Sasaki, Total synthesis of complete stereostructure of a marine macrolide glycoside, (–)-lyngbyaloside B, *Chemistry A European Journal*, 査読有, 22, 2016, 6815–6829.
DOI: 10.1002/chem.201600341

Begona Espina, Eva Cagide, M. Carmen Louzao, Natalia Vilarino, Mercedes R. Vieytes, Yoshiyuki Takeda, Makoto Sasaki, Luis M. Botana, Cytotoxicity of goniodomin A and B in non contractile cells, *Toxicology Letters*, 査読有, 250, 2016, 10–20.
DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.04.001

[学会発表](計16件)

櫻井敬祐、佐々木 誠、不破春彦、エニグマゾールAの全合成研究、日本化学会第98春季年会、2018

川島悠岐、三好太朗、岩崎浩太郎、不破春彦、佐々木 誠、ゴニオドミンAの全合成研究、日本化学会第98春季年会、2018

佐々木 誠、海洋生物由来の生物機能大環状天然中分子の高効率全合成、科研費・新学術領域研究「反応集積化が導く中分子戦略：高次生物機能分子の創製」第5回成果報告会、2018

川島悠岐、三好太朗、岩崎浩太郎、不破春彦、佐々木 誠、ゴニオドミンAの全合成研究、第112回有機合成シンポジウム、2017

川島悠岐、三好太朗、岩崎浩太郎、不破春彦、佐々木 誠、ゴニオドミンAの全合成研究、第59回天然有機化合物討論会、2017

川島悠岐、三好太朗、岩崎浩太郎、不破春彦、佐々木 誠、ゴニオドミンAの全合成研究、第28回万有仙台シンポジウム、2017

岩崎浩太郎、荒井啓介、佐々木 誠、カリビアンシガトキシンの合成研究–MN環部の立体選択的合成法の開発–、日本薬学会第137年会、2017

櫻井敬祐、佐々木 誠、不破春彦、エニグマゾールAの合成研究、日本化学会第97春季年会、2017
坂本溪太、佐々木 誠、不破春彦、イリオモテオリド-2aの合成および構造研究、日本化学会第97春季年会、2017
齋藤真輝、三好太郎、岩崎浩太郎、佐々木 誠、ポルチミンの合成研究、日本化学会第97春季年会、2017
三好太郎、齋藤真輝、岩崎浩太郎、佐々木 誠、ポルチミンの合成研究、日本化学会第97春季年会、2017
柳翔太、佐々木 誠、不破春彦、ネオペルトリドのAMCA標識アナログの合成と機能評価、日本化学会第97春季年会、2017
柳翔太、佐々木 誠、不破春彦、ネオペルトリドの蛍光標識体の合成と機能解析、2016
小野寺悠、佐々木 誠、不破春彦、ガンビエロールの光感応性類縁体の合成と機能評価、2016
坂本溪太、佐々木 誠、不破春彦、イリオモテオリド-2aの全合成研究、第63回トキシシンポジウム、2016
柳翔太、野口拓真、川上雅人、佐々木 誠、不破春彦、丹羽伸介、杉本亜砂子、ネオペルトリド蛍光標識アナログの設計・合成・機能評価、日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会、2016

〔図書〕(計4件)

佐々木 誠、丸善出版、理科年表 2019、2018、17
不破春彦、佐々木 誠、化学同人、天然有機化合物の全合成 独創的なものづくりの反応と戦略、2017、145-151
佐々木 誠、丸善出版、理科年表 平成 30 年、2017、17
佐々木 誠、丸善出版、理科年表 平成 29 年、2016、17

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://sasaki-umehara-lab.moon.bindcloud.jp>

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岩崎 浩太郎

ローマ字氏名：Iwasaki Kotaro

研究協力者氏名：藤井 郁夫

ローマ字氏名：Fujii Ikuo

研究協力者氏名：円谷 健

ローマ字氏名：Tsumuraya Takeshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。