

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H05997・19K21141

研究課題名（和文）化学分析とメタゲノム解析に基づく、陸上におけるテトロドトキシンの起源と生合成

研究課題名（英文）Investigation of the origin and biosynthesis of the terrestrial tetrodotoxin based on the chemical and metagenome analyses

研究代表者

工藤 雄大 (Kudo, Yuta)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：60824662

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：テトロドトキシン（TTX）の生合成経路の知見を得るために、新たなTTX関連化合物を探索した。有毒イモリから新規TTX類縁体としてTTXの8位エピマー（8-epiTTX）と新規環状グアニジン化合物Cep-226Aなどを発見した。いずれもこれまで推測してきた生合成経路を支持する化学構造を有しており、陸上におけるTTXの生合成経路、シャント経路についてより知見を深めることができた。また、培養細胞を用いて8-epiTTXと他のTTX類縁体の電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性を評価し、エクアトリアル配置の8位ヒドロキシ基が生理活性に大きく寄与することを先行研究と一致する形で示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テトロドトキシン（TTX）は、強力な毒性と複雑な分子構造を持ち、海洋と陸上の様々な生物に分布する興味深い神経毒であり、食中毒原因物質として重要である。長年研究対象となる一方で、自然界でどのようにTTXが生産されるか（生合成経路）は未解明であり、その解明には学術的・社会的な意義がある。本研究では有毒イモリより新規化合物を複数発見し、陸上におけるTTXの生合成経路への知見を深めることができた。新規化合物の生理活性試験により、TTXと電位依存性ナトリウムチャンネルとの相互作用について理解を深めることができた。

研究成果の概要（英文）： We performed the screening of new TTX-related compounds to collect information regarding the biosynthetic pathway of TTX. As the result, a new TTX analogue, 8-epimer of TTX (8-epiTTX), and new cyclic guanidino compounds (Cep-226A and more) were discovered from toxic newts. The structures of these compounds supported the proposed biosynthetic pathway of TTX, and provided further insights into the biosynthetic and shunt pathway of TTX in terrestrial organisms. In addition, the voltage-gated sodium ion channels (Nav) blocking activities of 8-epiTTX and other TTX analogues were evaluated by a cell-based assay. The results indicated that the equatorial C-8 hydroxy group in TTX is important for its interaction with the voltage-gated sodium ion channels. This finding is consistent with the previous study regarding the contribution of the equatorial hydroxy group at C-8 to the activity.

研究分野：天然物生命化学

キーワード：テトロドトキシン 生合成 構造解析 LC-MS イモリ 電位依存性ナトリウムチャンネル 生理活性 グアニジン

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

テトロドトキシン (TTX) はフグや巻貝などの海洋生物、陸上のイモリやカエルに含まれ、電位依存性ナトリウムイオンチャネル (Nav) を阻害する神経毒である。フグや巻貝を喫食したことによるテトロドトキシン (TTX) の食中毒事例は世界中で報告され、近年ではカキなどの二枚貝から低濃度ではあるが TTX が検出されたことから、食中毒原因物質として極めて重要な化合物といえる^[1,2]。代表的な自然毒として長年研究対象となっている一方で、TTX の生合成は未だ解明されていない。他に類を見ない複雑な化学構造を持つことから TTX の生合成経路の予測は困難であり、生合成経路における出発物質、関連する遺伝子・酵素も同定されていない。食中毒原因物質として、また強力な活性と特異な構造を有する天然有機化合物として TTX の生合成経路の解明は重要な課題である。研究代表者は有毒イモリから TTX の推定生合成中間体を探索することで、陸上における TTX の生合成経路を推測してきた^[3,4]。また、卵から人工飼育をしたイモリが自身で TTX を生産しないこと、経口投与した TTX を身体に蓄えることから、イモリの毒が外因性であることを示し^[5,6]、有毒イモリ生息地に真の TTX の生産者がいると推測した。

2. 研究の目的

有毒イモリの毒が外因性と考えると、有毒イモリの生息地には TTX の真の生産者が存在するはずである。また、イモリが経口投与された TTX を蓄えることから食物連鎖による生物濃縮の可能性もあり、毒の蓄積に関与する媒介者の存在も考えられた。そこで、イモリの餌となりうる微小生物、および有毒イモリやその生息地の微生物を分析することで TTX の起源の追及を目指した。また、これまで天然に存在する TTX の類縁体や推定生合成関連化合物の構造解析することで、生合成経路の知見を得てきた^[3,4,7-9]。継続して有毒生物から TTX に関連する新規化合物を探索し、その構造を解析することとした。新規化合物の構造を基として TTX の生合成経路を推測することを目的とした。同時に、得られた新規成分の生理活性を評価し、TTX の構造活性相関研究の一助とすることを目的の一つとした。

有毒イモリの生息地に TTX を生産する微生物が存在すると考えた。そこで、有毒イモリ生息地の環境サンプルから DNA を得て、メタゲノムから TTX の生合成遺伝子を同定することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 有毒イモリ生息地における TTX 含有生物の探索

TTX を保持する有毒イモリの生息地からイモリの餌となりうる生物を定期的に採集した。また、有毒イモリの表面、環境サンプルより微生物の単離培養を行った。それぞれ、TTX の抽出操作を行ったのち、TTX 分析用の蛍光 HPLC、LC-MS、培養細胞を用いた生理活性試験に供して、TTX の有無を分析した。

(2) 新規生合成関連化合物の探索、構造解析、活性評価

有毒イモリの粗精製物を高分解能 LC-MS/MS に供し、分子式とフラグメンテーションパターンを指標として、グアニジノ基を有する新規 TTX 生合成関連化合物を探索した。新規化合物を各種クロマトグラフィーにて精製し、NMR で構造を解析した。NOESY 1D で相対立体化学を推定した。新規化合物の構造を基に生合成経路を考察した。また、得られた新規成分をマウス神経芽細胞腫 Neuro-2a を用いた Nav 阻害活性試験に供し、既知成分の活性と比較した。

(3) 有毒イモリ生息地の微生物ゲノムの抽出と解析

有毒イモリ生息地から土壌および水産物を採集した。環境サンプルより DNA を抽出し、電気泳動によるサイズ選択を行った。得られた DNA を insert DNA として Fosmid vector に組み込み、Fosmid ライブラリーの作成を試みた。望む insert DNA を有するクローン (ポジティブクローン) をライブラリーから選択するための縮重プライマーを設計し、スクリーニングへの運用が可能か試験した。

4. 研究成果

(1) 有毒イモリ生息地における TTX 含有生物の探索

有毒イモリ生息地域から微小生物を定期的に採集し分析した。また環境中の微生物を純化培養し、その抽出物を分析に供した。しかし、どの生物・微生物からも TTX は検出されなかった。イモリの餌となる微小生物は TTX を高濃度に保持しない可能性が考えられたが、対象となりうる生物が膨大な数であることが、定期的なサンプリングで示され、更なる追及が必要と考えられた。一方、細胞試験で活性を示す成分を複数得たが、各種解析により TTX ではない未知成分だと推測された。

(2) 新規生合成関連化合物の探索、構造解析、活性評価

オキナワシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*) の粗抽出物を LC-MS/MS に供したところ、新規成分と思しきピークが複数検出された。各化合物を活性炭カラム、陽イオン交換カラム、逆相カラム、HILIC カラムを用いて精製し、NMR で構造解析した。結果、新規 TTX 類縁体 8-*epi*TTX であると判明した (図 1)^[10]。TTX の 6-*epi*体 (6-*epi*TTX (3)) や今回得られた 8-*epi*体

は有毒イモリにのみ含まれる類縁体だが、これらは以前報告した推定生合成中間体 Cep-210, Cep-212 のような二環性化合物から、三環が構築される際に生ずると推測される (図2)^[10]。生理活性試験では、8-*epi*TTX (2) は TTX (1) の約 1/60 の EC₅₀ 値 (半数効果濃度) を示し、エクアトリアル配置の 8 位ヒドロキシ基が生理活性に大きく寄与することが示された (図3)^[10]。8 位ヒドロキシ基に関連する先行研究、結合モデルを支持する結果となった。

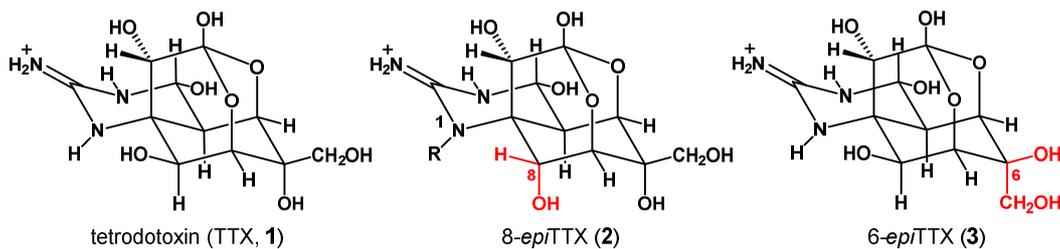


図1 .テトロドトキシン (TTX, 1) と新規 TTX 類縁体 8-*epi*TTX (2) と既知類縁体 6-*epi*TTX (3) の構造^[10]

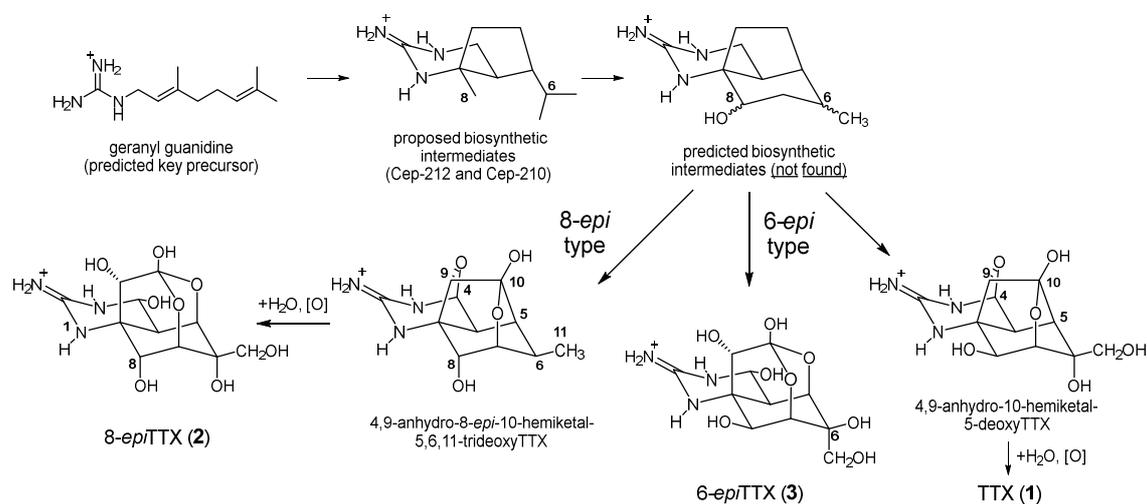


図2 .陸上における TTX および 6-*epi*mer, 8-*epi*mer 体の推定生合成経路^[10]

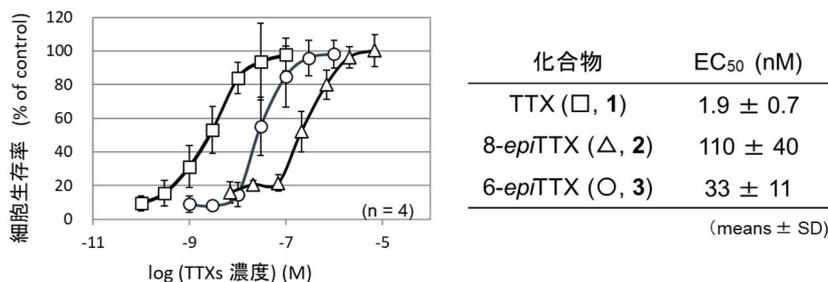


図3 . TTX (1) とその類縁体 (2, 3) の電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性^[10]

また、新規環状グアニジノ化合物 Cep-226A (4), Cep-228 (5) を発見した^[10]。からいずれも含グアニジン 6 員環と 7 員環が *cis* 型に縮環した二環性化合物と推定された。これまで有毒イモリから得られてきた成分 (Cep-242, Cep-240, Cpy-240) と同様、モノテルペン骨格を有しており、TTX のシャント生成物だと考えられた。これまで重要な中間体と想定してきた geranyl guanidine から生成すると考えられ、シャント経路における初期の化合物と推測された (図4)。なお、C-5 の酸化は無毒イモリに Cep-242 を投与した際に確認されており^[6]、類似の非特異的な酸化により、5 から 4 が生成する可能性が考えられた。

TTX に関連する新規化合物を有毒イモリから得ることで、陸上における TTX の生合成経路とシャント経路に関する知見が深まった。

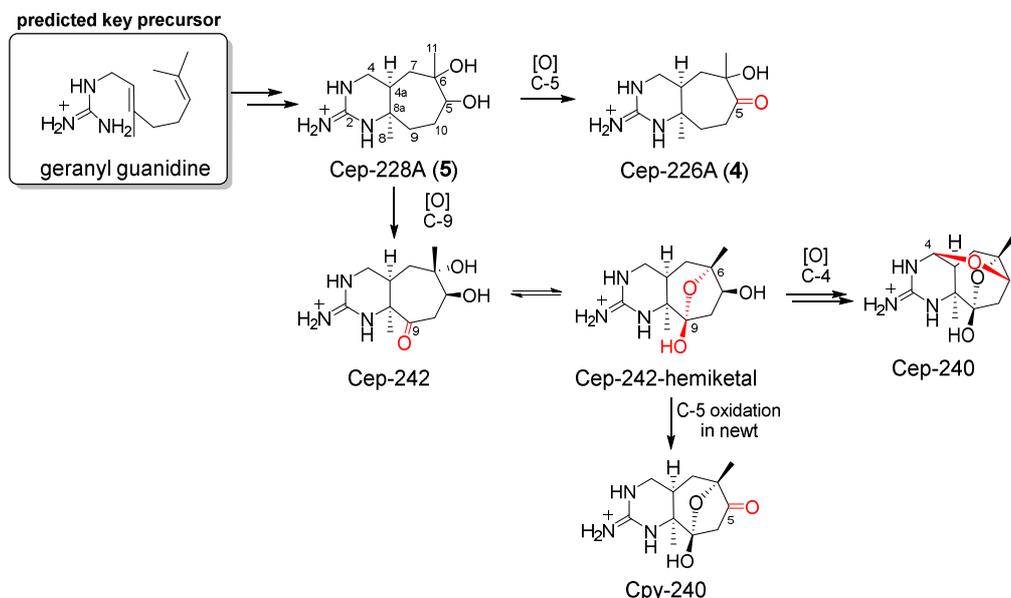


図4 . 環状グアニジノ化合物の推定生成経路

(3) 有毒イモリ生息地の微生物ゲノムの解析

有毒イモリ生息地の土壌および水泥から断片化を抑えながら環境 DNA を抽出した。サイズ選択した環境 DNA を insert として Fosmid ライブラリーの作成を試みた。詳細な解析を実施するためにはライブラリーサイズの拡張を行う必要があると考えられ、生合成への関与が考えられる遺伝子の探索は進行中である。設計した縮重プライマーを用いた PCR によって、環境 DNA から目的とする酵素の遺伝子が検出できることを確認した。ポジティブクローンのスクリーニング方法の構築は進展したといえ、今後の環境 DNA の解析に役立つ。

< 引用文献 >

- [1] A. D. Turner, A. Powell, A. Schofield, D. N. Lees, C. Baker-Austin, *Eurosurveillance* **2015**, *20*, pii21011.
- [2] S. Numano, Y. Kudo, Y. Cho, K. Konoki, M. Yotsu-Yamashita, *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 653.
- [3] Y. Kudo, Y. Yamashita, D. Mebs, Y. Cho, K. Konoki, T. Yasumoto, M. Yotsu-Yamashita, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 14546–14549.
- [4] Y. Kudo, T. Yasumoto, D. Mebs, Y. Cho, K. Konoki, M. Yotsu-Yamashita, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 8728–8731.
- [5] Y. Kudo, C. Chiba, K. Konoki, Y. Cho, M. Yotsu-Yamashita, *Toxicon* **2015**, *101*, 101–105.
- [6] Y. Kudo, C. Chiba, K. Konoki, Y. Cho, M. Yotsu-Yamashita, *Toxicon* **2017**, *137*, 78–82.
- [7] M. Yotsu-Yamashita, Y. Abe, Y. Kudo, R. Ritson-Williams, V. J. Paul, K. Konoki, Y. Cho, M. Adachi, T. Imazu, T. Nishikawa, M. Isobe, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799–2813.
- [8] N. Ueyama, K. Sugimoto, Y. Kudo, K. I. Onodera, Y. Cho, K. Konoki, T. Nishikawa, M. Yotsu-Yamashita, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 7250–7258.
- [9] M. Adachi, T. Miyasaka, Y. Kudo, K. Sugimoto, M. Yotsu-Yamashita, T. Nishikawa, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 780–784.
- [10] Y. Kudo, M. Yotsu-Yamashita, *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 1656–1663.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaatsu Adachi, Tadachika Miyasaka, Yuta Kudo, Keita Sugimoto, Mari Yotsu-Yamashita, and Toshio Nishikawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Total syntheses and determination of absolute configurations of Cep-212 and Cep-210, predicted biosynthetic intermediates of tetrodotoxin isolated from toxic newt	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 780 ~ 784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.8b04043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kudo Yuta, Yotsu-Yamashita Mari	4. 巻 82
2. 論文標題 Isolation and Biological Activity of 8-Epitetrodotoxin and the Structure of a Possible Biosynthetic Shunt Product of Tetrodotoxin, Cep-226A, from the Newt <i>Cynops ensicauda popei</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1656 ~ 1663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.9b00178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Numano Satoshi, Kudo Yuta, Cho Yuko, Konoki Keiichi, Yotsu-Yamashita Mari	4. 巻 17
2. 論文標題 Temporal Variation of the Profile and Concentrations of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin in the Scallop, <i>Patinopecten yessoensis</i> , Cultured in a Bay of East Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 653 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md17120653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 工藤 雄大, ハニフィン チャールス, 小瀧 裕一, 山下 まり
2. 発表標題 有毒イモリより得られたN-hydroxy型テロドトキシン類縁体の構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮坂 忠親, 安立 昌篤, 工藤 雄大, 杉本 敬太, 山下 まり, 西川 俊夫
2. 発表標題 テトロドトキシンの推定生合成中間体の全合成と絶対立体配置の決定
3. 学会等名 第61回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kudo Yuta, Yotsu-Yamashita Mari
2. 発表標題 Identification of new analogs and putative biosynthetic intermediates of tetrodotoxin aimed at elucidating its biosynthetic pathway and structure activity relationship
3. 学会等名 60 th American Society of Pharmacognosy Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤 雄大
2. 発表標題 陸上におけるテトロドトキシンの起源と生合成経路の研究
3. 学会等名 第14回化学生態学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤 雄大, 山下 まり
2. 発表標題 陸上由来のテトロドトキシン新規類縁体、生合成関連化合物の構造と生理活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本 敬太、工藤 雄大、宮坂 忠親、安立 昌篤、長 由扶子、此木 敬一、千葉 親文、西川 俊夫、山下 まり
2. 発表標題 テトロドトキシン推定生成中間体のテトロドトキシン含有生物への投与
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮坂 忠親、安立 昌篤、工藤 雄大、杉本 敬太、山下 まり、西川 俊夫
2. 発表標題 テトロドトキシンの推定生成中間体の全合成と絶対立体配置の決定
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>工藤雄大 助教『Journal of Natural Products』誌に論文掲載 https://www.fris.tohoku.ac.jp/feature/topics/detail---id-614.html 東北大学大学院農学研究科天然物生命化学分野ホームページ http://www.agri.tohoku.ac.jp/bukka/index-j.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山下 まり (Yamashita Mari) (50192430)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	