

機関番号：12605

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310130

研究課題名 (和文) サキシトキシン類の合成を基盤としたサブタイプ選択的 Na チャネル阻害剤の創製研究

研究課題名 (英文) Synthetic studies on Subtype Selective Na-channel Inhibitors based upon Saxitoxins Synthesis

研究代表者

長澤 和夫 (NAGASAWA KAZUO)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10247223

研究成果の概要 (和文)：電位依存型 NaCh には 9 つのサブタイプが存在し、これらは各々が、痛覚、心拍、筋肉伸縮等の重要な生命活動と密接に関係している。本研究では電位依存型 NaCh の阻害剤である貝毒サキシトキシン (STX) 類縁化合物を、NaCh サブタイプ選択的ナリガンドとして開発するための基盤構築を目的とした。その結果、STX 類の一般的な合成法の開発に成功し、種々の STX 類縁体の合成に成功した。また合成研究過程で新規 STX 骨格 (FD-STX) を見だし、これをもとに FD-STX, FD-doSTX, FD-dcSTX の合成に成功した。得られた化合物の NaCh 阻害活性について評価した結果、今回合成した誘導体類はいずれも天然の STX に比べ 1/10～1/100 倍阻害活性が低下した。一方、サブタイプ選択性では、FD-dcSTX が、テトロドトキシン-抵抗型の Nav1.5 に対して、非可逆的に結合することを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：Voltage-gated sodium channels (NavCh) are transmembrane proteins that contribute to the control of membrane excitability and the propagation of action potentials along axons. To date, nine kinds of subtypes for NavCh were identified, and subtype selective small molecules are considered to be good candidate for NavCh related disease. In this context, development of NavCh-subtype selective ligand with saxitoxin (STX), a shellfish toxin, was examined based on the SAR studies of STX. In this project, general synthetic method for STX was developed, and varieties of STX derivatives were synthesized. Skeletal analog of STX that posses fused-type ring system, FD-STX, was also developed. Among the compounds synthesized, FD-dcSTX shows very unique inhibitory manner, i.e., it inhibits Nav1.5 (tetrodotoxin-resistant subtype) irreversibly.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2008 年度 | 5,800,000 | 1,740,000 | 7,540,000 |
| 2009 年度 | 4,300,000 | 1,290,000 | 5,590,000 |
| 2010 年度 | 4,100,000 | 1,230,000 | 5,330,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

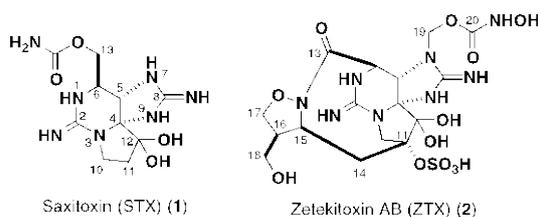
キーワード：サキシトキシン、Na チャネル、阻害剤、全合成、グアニジン

1. 研究開始当初の背景

Na チャネルは、神経細胞における活動電位の調節を担う膜タンパクであり、電位依

型とアミロライド依存型に大別される。近年、電位依存型 Na チャネルには多くのサブタイプが存在し、その存在比は細胞種によって異

なること、また単一のニューロンに複数種の Na チャネルが発現していることが明らかとなった (Goldin, L. A 等 *Neuron*, 2000)。これらは各々が、痛覚、心拍、筋肉伸縮等の様々な生命活動と密接に関係していることが見出されているが、それぞれの電流成分を区別するための特異的阻害剤 (リガンド) が存在しない。このため各サブタイプの機能は完全には解明されていない。またプロカインなどの電位依存型 Na チャネル阻害剤は、これまで経験的に局所麻酔や抗てんかん薬として使用されており、1980 年代にそれらの作用機序が明らかとなった。しかしながら、サブタイプ選択性に起因すると考えられる有効性や安全性に問題がある。



サキシトキシン (STX) (1) は 1962 年に Rapoport らにより二枚貝 *Saxidomus giganteus* から単離された海洋産グアニジンアルカロイドであり、ふぐ毒テトロドトキシン (TTX) と共に数少ない電位依存型 Na チャネルに対するリガンドである。STX (1) は TTX 同様、電位依存型 Na チャネルの孔 (ポア) に結合することで、強力な脱分極の阻害活性を示す。STX (1) にはこれまで約 30 の構造類縁化合物が単離されている。また最近、南米産の矢毒ガエル *Atelopus zeteki* の皮膚より、新規な STX 骨格を有する類縁体としてゼテキトキシン AB (ZTX) (2) が単離された。ZTX は、STX や TTX と異なり、心臓細胞を含むほぼ全細胞の Na チャネルに対して阻害活性を示し、かつ 1 より 600 倍以上強力な活性を示す (Yamashita, M. 等. *PNAS*, 2004)。STX 類縁体のいくつかは、骨格筋 Na チャネルに対する阻害活性が明らかとなっているが、サブタイプ選択性については不明である。これら STX 類の官能基や化合構造の差異により、細胞種を含めて阻害活性が大きく変化するという事実は、1 の基本構造をもとに様々な STX の構造展開を合成化学的に行い、それらの構造活性相関研究を詳細に検討することで、電位依存型 Na チャネルによる電流成分を区別するための、特異的阻害剤 (リガンド) の創製への可能性を示唆する。

STX 類は、グアニジン官能基が密集した複雑なスピロ骨格を有しており、化学的に合成するのが非常に難しい。これまでに多くの研究者がその化学合成に挑戦したが、研究開始当初は 1 について 3 例の全合成が報告されているのみであった (その後、我々の研究グル

ープを含め新たに 2 例報告された。)

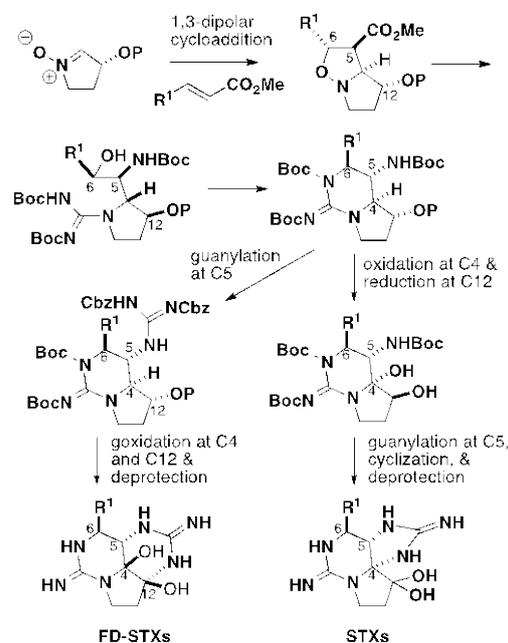
2. 研究の目的

本研究は、STX 骨格を有する化合物をもとに、Na チャネルのサブタイプを選択的に阻害するリガンドの創製基盤を構築することを目的とした。これをふまえ、(1) 多様な STX 類を合成するための一般合成法の確立と誘導体類の合成、(2) STX 合成誘導体の阻害活性評価を行い、サブタイプ選択性に着目した Na チャネル阻害活性と構造に関する知見を得る、ことを具体的な研究目標とした。

3. 研究の方法

(1) リガンドの合成について

STX 骨格の合成に関しては、既に関連した 1,3-双極子環化反応を基軸とする手法がある。これは、光学活性な環状ニトロソとオレフィンとの 1,3-双極子環化反応で立体選択的に得られるイソキサゾリジンを用いて、N-O 結合の還元、アミンに対するグアニジノ基の導入、環化、4位の酸化を行い、最後にスピログアニジン骨格を酸性条件化で構築する方法である。本合成手法では、用いるオレフィンを換えることで、6位に種々の官能基を導入できることが予想される。また、本合成法において、グアニジンの導入を先に行うと、STX 骨格と類似の新規 3 環性化合物 FD-STX 骨格 (筆者等が命名) も合成することができる (Scheme 1)。これらの反応を駆使することで、STX および FD-STX の構造展開を系統的に行った。



Scheme 1 Synthesis of STXs and FD-STXs

また STX の構造展開を行う過程で、STX 骨格を、グアニジン官能基が完全に保護された

形で合成する必要に直面した。そこで、3環性ビスグアニジン骨格合成法を新規に開発することとした（成果の項で詳述）。

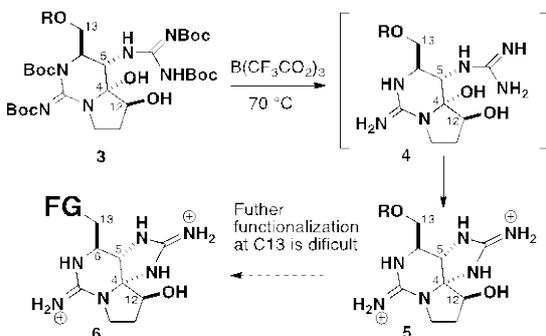
(2) リガンドのナトリウムチャンネル阻害活性評価について

活性評価は以下の2段階で行った。(I) 細胞系での阻害活性評価：神経芽細胞腫 Neuro2A（電位依存性ナトリウムチャンネル $Na_v1.2$ を主に発現）に、ベラトリジン（Naチャンネルを解放）とウアバイン（Na/K ATPase 阻害剤）を加えると細胞内の Na イオン濃度が過剰になり細胞生存率は低下するが、ここに Na チャンネル阻害剤（合成リガンド）を加えると、加えたリガンドの濃度に依存して生存率が上昇する。これによりリガンドの Na チャンネル阻害能を評価した。なお評価するリガンドは、いずれも MTT アッセイにより細胞毒性がないことを確認した。(II) 電気生理学的評価：HEK293 細胞に $Na_v1.2$, $Na_v1.4$ (TTX-感受性) および $Na_v1.5$ (TTX-抵抗性) チャンネル遺伝子をエフェクチン法によりそれぞれ導入し、これを一過性に発現させた細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法により、リガンドの Na チャンネル各サブタイプ ($Na_v1.2$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$) に対する阻害活性を評価した。

4. 研究成果

(1) STX 類の合成に関して

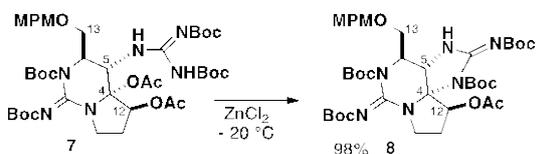
これまでに開発した STX 骨格の合成法 (Scheme 1 を参照) を基盤に、STX の 13 位カルバモイル基が“H”に置き換わった do-STX、また天然型の STX の合成に成功した。しかしながらこの手法を用いて、C13 位に対する更なる構造展開を試みたところ、非常に難しいことがわかった。即ち Scheme 1 では、化合物 **3** に対し、強酸条件下で反応を行うことで C4 位とで環化反応が進行し、STX 骨格が形成できる。しかしながらこの反応条件では、グアニジン官能基の保護基（この場合には Boc 基）が同時に脱保護される。なお、脱保護されない Cbz 基を Boc 基の代わりに用いると、環化反応は進行しない。



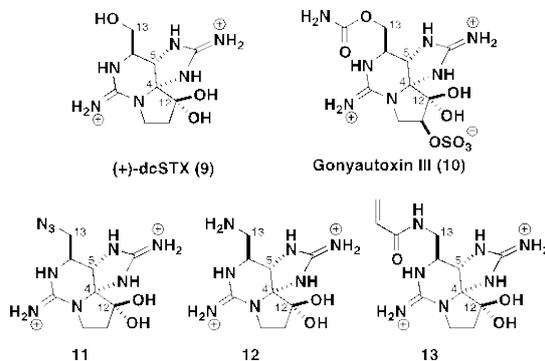
これはおそらく脱保護されることで、グアニ

ジン窒素の求核能が上がるためと考えられる。従って、この環化反応では、いずれにせよグアニジン上の保護基が脱保護される必要がある。しかしながら、ここで得られる脱保護された STX 骨格を有する **5** は、高極性化合物であり水溶性も高く、**5** に対する変換反応は非常に限られており、STX の C13 位に様々な官能基を導入するための中間体として不向きであることがわかった。

そこで新たに 3 環性ビスグアニジン骨格の構築法について検討することとした。その結果、4 位、12 位にアセテートを持つ化合物 **7** に対し、 -20 度下 $ZnCl_2$ を反応させたところ、速やかに環化反応が進行し、グアニジン上の保護基が脱保護されずに望む環化体 **8** が 98% の収率で得られてきた。

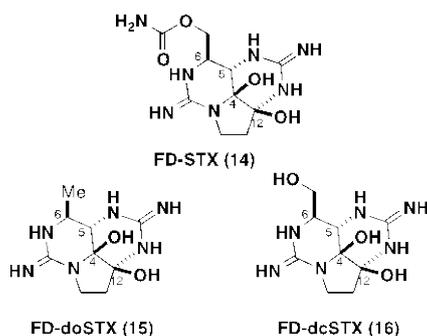


そこで化合物 **8** を鍵中間体として STX 類縁化合物の合成を検討した。その結果、天然類縁体 dc-STX (**9**)、Gonyautoxin-III (**10**) の合成にそれぞれ成功した。さらに、非天然型の STX 類縁体として、C13 位に窒素官能基を有する **11-13** の合成にも成功した。



(2) FD-STX 類の合成

STX の骨格構造異性体である FD-STX は、STX と環状構造が異なるものの、チャンネルタンパク質のポアと総合作用に重要なグアニジン官能基および C13 位官能基の空間的な配置が、STX と非常に酷似している。従って、サブタイプの選択性という観点からこれらの誘導体類は非常に興味を持たれる。そこで以下の 3 化合物 (FD-STX (**14**)、FD-doSTX (**15**)、FD-dcSTX (**16**)) の合成を計画し、Scheme 1 に示した合成経路により、それぞれの合成を行った。



(3) 合成リガンドの Na_vCh 阻害活性評価

合成した STX 誘導体について、FD-STX 誘導体 **14-16** に関して NaCh 阻害活性を評価した。なお評価は、細胞系およびパッチクランプ法にて評価を行った。

まず Neuro-2a を用いた細胞系で **14-16** の NaCh 阻害活性を評価した (Table 1)。このとき dc-STX をコントロール化合物として用いた (dc-STX は STX とほぼ同程度の阻害活性を示すことが知られている)。

Table 1 NaVCh -inhibitory activity of FD-STXs **14-16** in Neuro-2a cells

| Compounds | IC_{50} (mean \pm SD) |
|------------------------|----------------------------------|
| FD-STX (14) | $7.3 \pm 2.7 \mu\text{M}$ |
| FD-doSTX (15) | $> 500 \mu\text{M}$ |
| FD-dcSTX (16) | $15 \pm 5.4 \mu\text{M}$ |
| dc-STX | $82 \pm 17 \text{ nM}$ |

Table 1 の結果より、今回合成した FD-STX 類はいずれも dc-STX と比較して 100-1000 倍活性が弱くなることがわかった。また FD-doSTX (**15**) は、ほとんど NaCh 阻害活性が消失するという興味深い結果が得られた。

そこで次に、弱いながらも NaCh 阻害活性を示した化合物 **14**、**16** に関して、サブタイプ選択性をパッチクランプ法により評価した。今回は、サブタイプとして、 $\text{Na}_v1.2$ (テトロドトキシン感受性型) およびテトロドトキシン抵抗型である 1.5 (STX も同様に阻害活性を示さないサブタイプ) について評価した (Table 2)。

Table 2 Inhibitory activity of FD-STX (**14**) and FD-dcSTX (**16**) towards $\text{Na}_v1.4$ and $\text{Na}_v1.5$

| Compounds | IC_{50} ($\text{Na}_v1.4$) (mean \pm SD) | IC_{50} ($\text{Na}_v1.5$) (mean \pm SD) |
|------------------------|---|---|
| FD-STX (14) | $3.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$ | $118 \pm 8.1 \mu\text{M}$ |
| FD-dcSTX (16) | $16 \pm 8.6 \mu\text{M}$ | $182 \pm 16 \mu\text{M}$ |

Table 2 の結果より、化合物 **14**、**16** 共に、テトロドトキシン抵抗型の $\text{Na}_v1.5$ に対しては、STX 類と同様、大きく阻害活性が減弱するこ

とがわかった。一方、化合物 **16** は大変興味深いことに、 $\text{Na}_v1.5$ に対して非可逆的に結合することがわかった (Figure 1)。このメカニズムについて現在のところ知見は得られていないが、今後サブタイプ選択的ナリガンド創製へ向けたリガンドデザインの端緒となることが期待される。

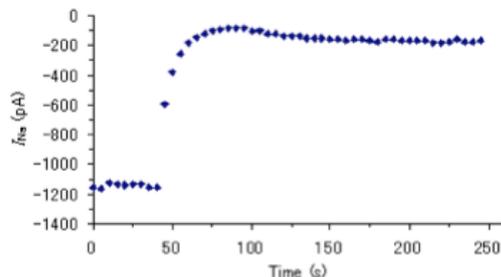


Figure 1. Time course of inhibitory activity by FD-dcSTX (**16**) and recovery following washout.

今後、STX 合成誘導体 **11-13** についても同様に詳細な阻害活性評価を行い、STX 構造と NaCh サブタイプとの阻害活性の相関に関する知見を得ていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ryoko Shinohara, Takafumi Akimoto, Osamu Iwamoto, Takatsugu Hirokawa, Mari Yotsu-Yamashita, Kaoru Yamaoka, Kazuo Nagasawa, "Synthesis of Skeletal Analogs of Saxitoxin Derivatives and Evaluation of their Inhibitory Activity on Sodium ion Channels $\text{NaV}1.4$ and $\text{NaV}1.5$ ", *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 12144-12152. (査読あり)
- ② Takuya Imaoka, Takafumi Akimoto, Osamu Iwamoto, Kazuo Nagasawa, "Total Synthesis of (+)-dibromophakellin and (+)-dibromophakellistatin", *Chem. Asian J.*, **2010**, *5*, 1810-1816. (査読あり)
- ③ Osamu Iwamoto, Kazuo Nagasawa, "Total Synthesis of (+)-Decarbamoylsaxitoxin and (+)-Gonyautoxin 3", *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 2150-2153. (査読あり)
- ④ Takuya Imaoka, Osamu Iwamoto, Kazuo Nagasawa, "Total Synthesis of (+)-Dibromophakellin and (+)-Phakellin", *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3799-3801. (査読あり)
- ⑤ Osamu Iwamoto, Ryoko Shinohara, Kazuo Nagasawa, "Total Synthesis of (-)- and (+)-Decarbamoyloxysaxitoxin and (+)-Saxitoxin" *Chem. Asian J.*, **2009**, *4*, 277-285. (査読あり)

〔学会発表〕(計20件)

- ① Kazuo Nagasawa (Invited) “Synthesis of Saxitoxins” ISCP27/ICOB7, 2011. July 10-14, Brisbane (Australia).
- ② 秋元隆史、篠原涼子、岩本理、長澤和夫「ナトリウムチャンネルサブタイプ選択的阻害を志向したサキトキシン誘導体類の合成研究」日本化学会第91春季年会、2011年3月26-29日、神奈川大学(神奈川)。
- ③ 秋元隆史、篠原涼子、今西静香、岩本理、長澤和夫「ナトリウムチャンネルサブタイプ選択的阻害を志向したサキトキシン誘導体類の合成研究」The 2nd Symposium on Chiral Science & Technology: Mesochemistry&Chemical Wisdom、2011年3月2日。早稲田大学(東京)。
- ④ Takafumi Akimoto, Osamu Iwamoto, Kazuo Nagasawa, “Synthetic Studies on Saxitoxin Analogs”, Pacificchem Congress 2010, 2010年12月15-19日、ハワイコンベンションセンター(米国ハワイ)。
- ⑤ Takuya Imaoka, Takafumi Akimoto, Osamu Iwamoto, Kazuo Nagasawa, “Total Synthesis of (+)-Dibromophakellin and Dibromophakellistatin”, Pacificchem Congress 2010, 2010年12月15-19日、ハワイコンベンションセンター(米国ハワイ)。
- ⑥ Kazuo Nagasawa (invited), “Synthesis of Saxitoxins”, Pacificchem Congress 2010, 2010年12月15-19日、ハワイコンベンションセンター(米国ハワイ)。
- ⑦ 秋元隆史、今岡拓哉、岩本理、長澤和夫「(+)-Dibromophakellistatinの全合成」日本化学会第90春季年会、2010年3月26日-29日、近畿大学(大阪)。
- ⑧ Kazuo Nagasawa (invited), “Synthesis of Saxitoxins”, Hiratamemorial Symposium, 2010年1月11日、名古屋大学(名古屋)。
- ⑨ 長澤和夫(招待講演)「グアニジンアルカロイドの全合成」有機合成化学協会千葉ミニシンポジウム、2009年12月5日、東邦大学(千葉)。
- ⑩ Takuya Imaoka, Osamu Iwamoto, Kazuo Nagasawa, “Total Synthesis of (+)-Dibromophakellin”, IKCOC-11, 2009年11月9-13日、Pihga Royal Hotel Kyoto(京都)。
- ⑪ Osamu Iwamoto, Ryoko Shinohara, Kiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita, Kazuo Nagasawa, “Total Synthesis of (+)-Decarbamoylsaxitoxin and (+)-Gonyautoxin 3 and Evaluation of Na⁺ Channel Inhibitory Activity of Saxitoxin Derivatives”, IKCOC-11, 2009年11月9-13日、Pihga Royal Hotel Kyoto(京都)。

- ⑫ 岩本理、篠原涼子、此木敬一、山下まり、長澤和夫「改良合成法を基盤とした(+)-デカルバモイルサキトキシンおよび(+)-ゴニオトキシン3の全合成」第51回天然有機化合物討論会、2009年10月7-9日、名古屋市公会堂(愛知)。
- ⑬ 岩本理、篠原涼子、此木敬一、山下まり、長澤和夫「新規五員環グアニジン部構築法に基づく(+)-ゴニオトキシン3の全合成」第26回有機合成セミナー、2009年9月16-18日、前橋市中央公民館(群馬)。
- ⑭ 今岡拓哉、岩本理、長澤和夫「Overman転移を鍵とするDibromophakellinの全合成」第26回有機合成セミナー、2009年9月16-18日、前橋市中央公民館(群馬)。
- ⑮ 今岡拓哉、岩本理、長澤和夫「Overman転移を鍵としたPhakellin類の合成研究」第95回有機合成シンポジウム、2009年6月10-11日、慶応大学薬学部(東京)。
- ⑯ 岩本理、篠原涼子、此木敬一、山下まり、長澤和夫「新規五員環構築法に基づく(+)-デカウバモイルサキトキシンの全合成およびサキトキシン類縁体のNa⁺チャンネル阻害活性評価」第89回日本化学会春季年会、2009年3月26-30日、日大舟橋(千葉)。
- ⑰ 岩本理、此木敬一、山下まり、長澤和夫「(+)-サキトキシンの全合成およびその誘導体のナトリウムチャンネル阻害活性評価」第50回天然有機化合物討論会、2008年9月30日-10月2日、福岡国際会議場(福岡)。
- ⑱ 岩本理、長澤和夫「サキトキシン類の合成研究」第93回有機合成シンポジウム、2008年6月12-13日、東京工業大学(東京)。

〔図書〕(計1件)

長澤和夫・下川淳・飯島有美「バツェラジン類の合成」、山村庄亮編「天然物化学：海洋生物編」、243-253。アイピーシー、2008年。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~nagasawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤 和夫 (NAGASAWA KAZUO)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10247223

(2) 研究分担者

山下 まり (YAMASHITA MARI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50192430