

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02919

研究課題名(和文)カリブ海型シガトキシンの全合成と抗体作製、微量検出法開発への応用

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

研究代表者

佐々木 誠 (Makoto, Sasaki)

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：カリブ海型シガトキシン(C-CTX-1)は米国大西洋やカリブ海域におけるシガテラ食中毒の主要原因毒であり、毒検出のための高純度な標準サンプルの供給と微量検出法の開発が強く望まれている。C-CTX-1の右半球に相当するHIJKLMN環フラグメントの収束的合成を達成するとともに、左半球に相当するABCDE環フラグメントのグラムスケールでの効率的合成を達成した。また、JKLMN環フラグメントを含むハプテンを設計・合成し、タンパク質とのコンジュゲートを作成してモノクローナル抗体作製を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C-CTX-1によるシガテラ食中毒が欧州でも発生しており、その予防対策は急務の課題となっている。毒化した魚に含まれるC-CTX-1は超微量であるため、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、先端的な有機合成化学による化合物供給(全合成)が世界的に強く望まれている。C-CTX-1のABCDE環及びHIJKLMN環フラグメントの合成法を確立し、全合成の実現に向けて大きく前進した。また、JKLMN環フラグメントを合成ハプテンとしたモノクローナル抗体の作製への道が拓かれた。今後、C-CTX-1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)：Caribbean ciguatoxin (C-CTX-1) is the major causative toxin for ciguatera poisoning in the Caribbean Sea and the Northeast Atlantic areas. Convergent synthesis of the HIJKLMN-ring fragment of C-CTX-1 was achieved through a Suzuki-Miyaura coupling/thioacetalization and a late-stage reductive olefin coupling strategy. We also succeeded in an efficient and scalable synthesis of the ABCDE-ring fragment by employing an iterative use of oxidative lactonization and a Suzuki-Miyaura coupling. The synthetic hapten corresponding to theJKLMN-ring of C-CTX-1 was designed and synthesized, and was immunized to provide monoclonal antibodies that specifically recognize C-CTX-1. Further studies aimed at the total synthesis of C-CTX-1 and the development of antibody-based immunological detection methods are ongoing.

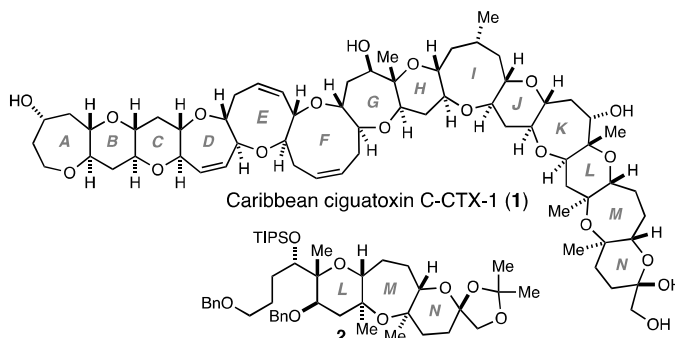
研究分野：天然物合成化学、有機合成化学

キーワード：カリブ海型シガトキシン シガテラ食中毒 全合成 抗体作製 微量検出法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シガテラは、熱帯・亜熱帯海域の魚類の摂取によって発生する世界最大規模の急性自然毒食中毒である。カリブ海型シガトキシン (C-CTX-1, **1**) は、米国大西洋やカリブ海域におけるシガテラ食中毒の主要原因毒であり、既知のシガトキシン類の中で最も巨大で複雑な構造を有するポリ環状エーテル天然物である。近年、C-CTX-1による食中毒が欧州でも発生しており、その予防対策は急務の課題となっている。しかし、魚に含まれる毒の量が超微量であり、純粋な標準試料の確保はほぼ不可能である。また、信頼性の高い微量検出法の開発を含めてC-CTX-1に関する研究は大きく立ち後れている。これまでに、C-CTX-1の全合成における最大の難関である核間ジメチル基をもつM環の立体選択的合成法を開発し、LMN環部**2**の合成を達成している。



### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者のポリ環状エーテル天然物の全合成研究で蓄積した経験と実績を踏まえて、シガトキシン全合成研究における最難関課題である C-CTX-1 の初の全合成を達成し、高純度な標準試料を供給するとともに、有機合成化学を基盤として C-CTX-1 を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、高感度な微量検出法の開発に繋げることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) C-CTX-1 の全合成

C-CTX-1 分子の左半球に相当する ABCDE 環フラグメント、及び右半球に相当する HIJKLMN 環フラグメントの効率的な合成法を確立する。これらのフラグメントをチオアセタールとして連結し、ラジカル環化による立体選択的な G 環の構築、閉環メタセシスによる F 環の構築を行って C-CTX-1 のポリ環状エーテル骨格を合成する。最後に、すべての保護基を除去し、C-CTX-1 の全合成を達成する。

#### (2) C-CTX-1 特異的モノクローナル抗体の作製

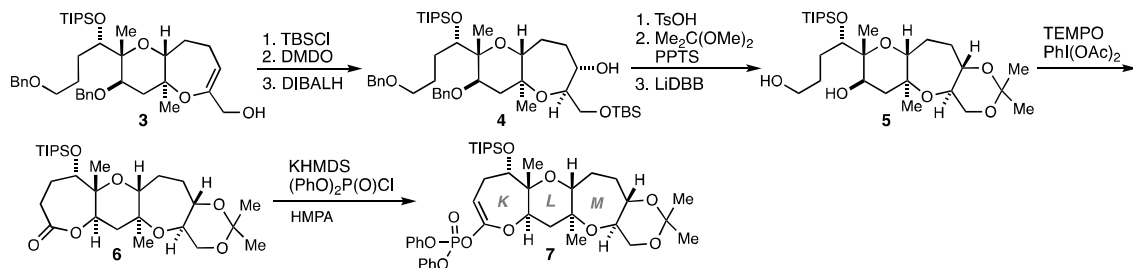
抗原抗体反応の接触面積を考慮して、C-CTX-1 特異的抗体の作製のために、5 環性の JKLMN 環フラグメントにリンカーを介してマレイミド基を導入したハプテンを設計・合成する。タンパク質と縮合し、マウスを免疫して、C-CTX-1 の右側部構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を獲得する。

### 4. 研究成果

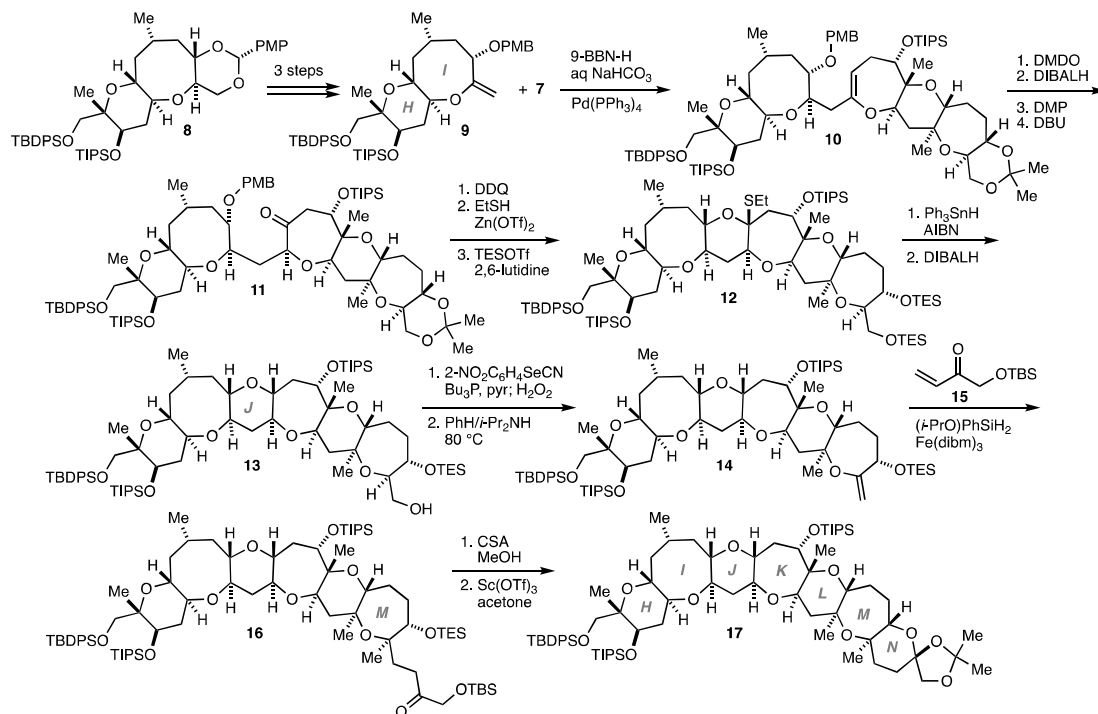
#### (1) HIJKLMN 環フラグメントの合成

アリルアルコール **3** を TBS エーテルとして保護した後、ジメチルジオキシラン (DMDO) によるエポキシ化と続く DIBALH 還元により望みの立体配置を有する **4** に導いた。次に、保護基

の変換を行ってジオール **5** に導いた。TEMPO/PhI(OAc)<sub>2</sub> を用いた酸化的ラクトン化により 7 員環ラクトン **6** を合成し、KLM 環エノールホスフェート **7** に変換した。



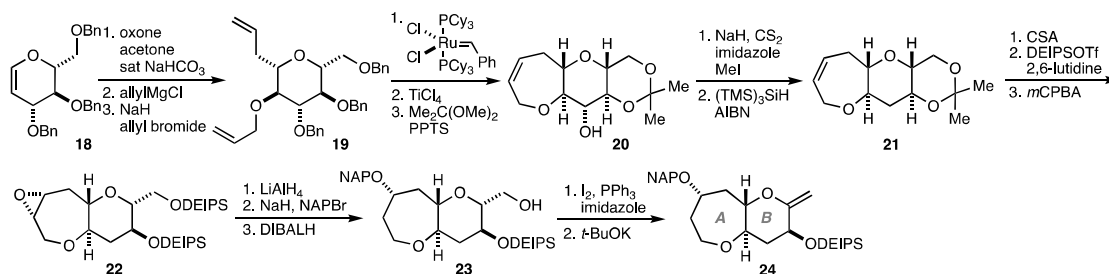
既知の化合物 **8** から 3 工程で得られる HI 環エキソエノールエーテル **9** を 9-BBN-H を用いてヒドロホウ素化し、エノールホスフェート **7** との鈴木-宮浦反応を行い、高収率でカップリング生成物 **10** を得た。エノールエーテル部分を DMDO 酸化/DIBALH 還元によりアルコールへと変換し、酸化と続く塩基処理による異性化を行い、望みの立体配置を有するケトン **11** へと導いた。PMB 基を酸化的に除去した後、EtSH/Zn(OTf)<sub>2</sub> で処理することによりチオアセタール化を行い、TES 基による保護を行って、化合物 **12** を得た。ラジカル還元により J 環を構築し、第一級アルコールの TES 基を DIBALH を用いて選択的に除去し、アルコール **13** に導いた。続いて、Grieco-Nishizawa 法によってエキソエノールエーテル **14** に変換し、エノン **15** との鉄ヒドリド水素原子移動を用いた還元的オレフィンカップリングを行うことにより、立体選択的に四置換炭素が構築されたケトン **16** を得ることに成功した。こうして得られたケトン **16** をメタノール中 CSA で処理して、TES 基と TBS 基の選択的な脱保護とメチルアセタール化を行い、最後にアセトン中 Sc(OTf)<sub>3</sub> で処理することによって HIJKLMN 環フラグメント **17** の合成を達成した。



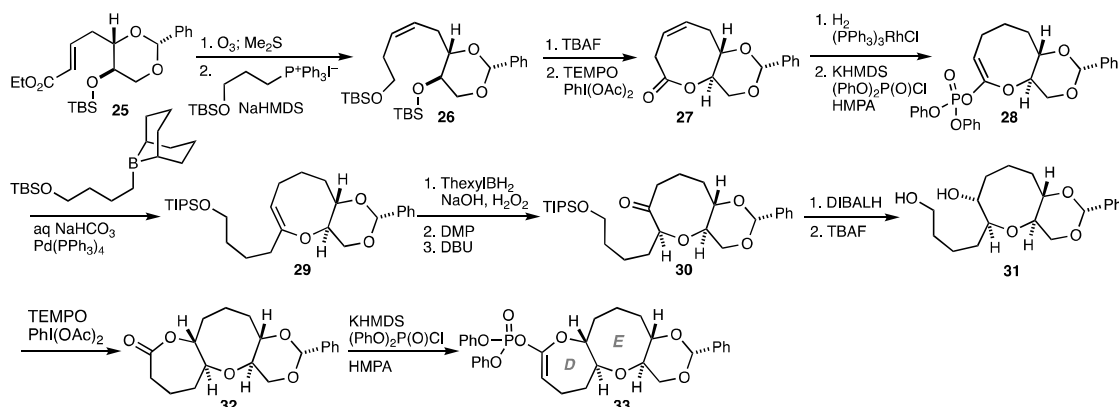
## (2) ABCDE 環フラグメントの合成

トリ-*O*-ベンジル-D-グルカール (**18**) を in situ で生成させた DMDO でエポキシ化し、アリル Grignard 試薬と反応させて立体選択的 *C*-グリコシル化を行い、生じたアルコールをアリル化してジエン **19** を高収率で合成した。閉環メタセシスにより 7 員環エーテルを構築し、脱ベンジル化とアセトニドによる保護を行ってアルコール **20** に導いた。Barton-McCombie 脱酸素化により **21** へと変換、保護基の変換を行った後、*m*CBPA によるエポキシ化を行ってエポキシド **22** を立体選択的に合成した。LiAlH<sub>4</sub> による位置選択的なエポキシドの還元、2-ナフチルメチル基による

保護、第一級アルコールの選択的脱保護を行い、アルコール **23** に導いた。ヨウ素化と塩基処理による脱離を行い、AB 環エキソエノールエーテル **24** を合成した。



共役エステル **25** に対してオゾン分解を行い、生じたアルデヒドに対して Wittig 反応を行い、*cis*-アルケン **26** を合成した。TBS 基を除去して得られるジオールに対して TEMPO/PhI(OAc)<sub>2</sub> を用いた酸化的ラクトン化を行い、8 員環ラクトン **27** を良好な収率で得た。二重結合を還元した後、エノールホスフェート **28** に導き、鈴木-宮浦反応により炭素鎖を伸張してエノールエーテル **29** へと変換した。テキシルボランを用いたヒドロホウ素化、酸化、塩基処理による異性化を行ってケトン **30** に導き、DIBALH による立体選択的なケトンの還元と TBS 基の脱保護を行ってジオール **31** に導いた。ジオール **31** の酸化的ラクトン化は高収率で進行し、得られた 7 員環ラクトン **32** を DE 環エノールホスフェート **33** に変換した

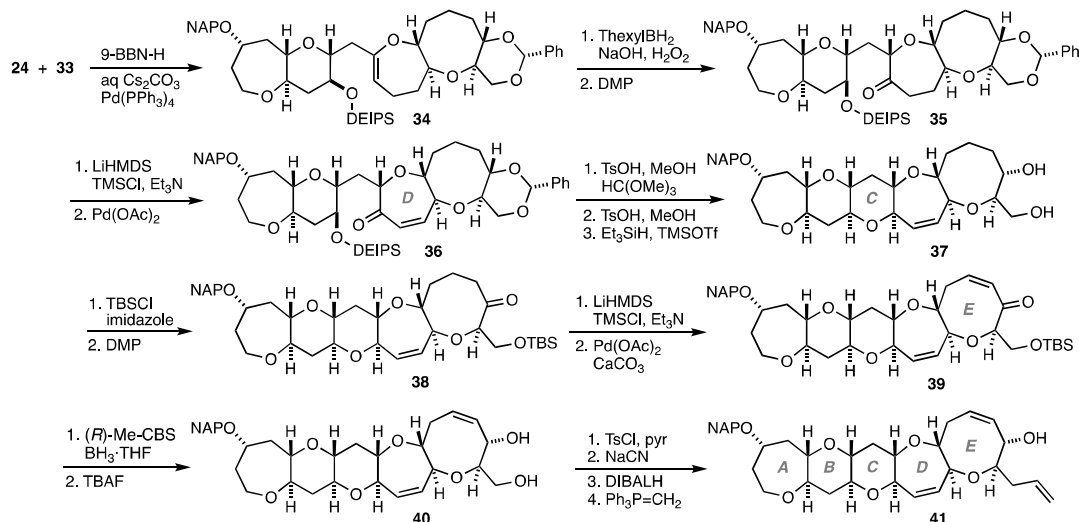


AB 環エキソエノールエーテル **24** から調製したアルキルボランと DE 環エノールホスフェート **33** の鈴木-宮浦反応は高収率で進行し、カップリング生成物 **34** を与えた。ヒドロホウ素化、酸化によりケトン **35** へと導き、三枝-伊藤酸化により D 環上の二重結合を導入してエノン **36** とした。エノン **36** に対してメタノール中オルトギ酸メチル存在下酸処理すると、ジエチルイソプロピルシリル (DEIPS) 基の脱保護とメチルアセタール化が一挙に進行し、続く還元的エーテル化により C 環を構築し、5 環性ジオール **37** を得ることができた。ジオール **37** の第一級アルコールを選択的にシリル化し、第二級アルコールを酸化してケトン **38** を得た。三枝-伊藤酸化により E 環上の二重結合を導入し、得られたエノン **39** のケトンを CBS 還元により立体選択的に還元し、TBS 基を除去してジオール **40** に誘導した。最後に、既知の 4 工程の変換で ABCDE 環フラグメント **41** の合成を達成した。この合成法により、グラムスケールでの ABCDE 環フラグメント **41** の供給が可能となった。

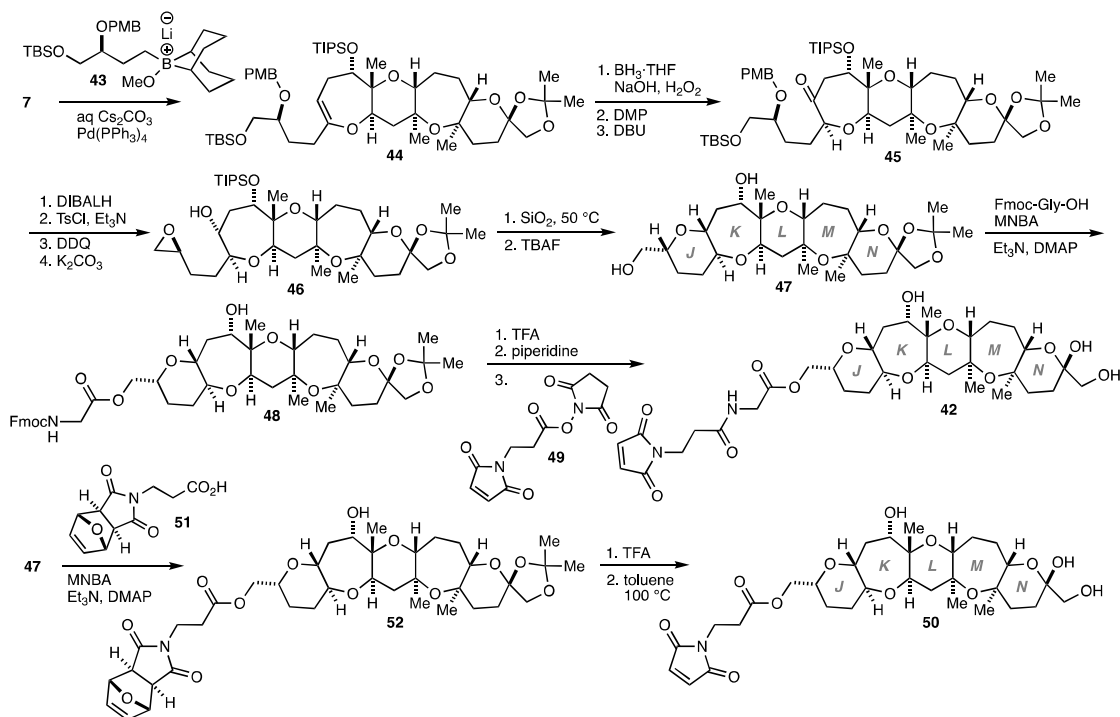
### (3)ハプテンの合成

C-CTX-1 の右端構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を獲得するために、ハプテンとして化合物 **42** を設計・合成した。KLMN 環エノールホスフェート **7** とアルキルボラート **43** の鈴木-宮浦反応により化合物 **44** を合成し、続く 3 工程に変換でケトン **45** に導いた。ケトン **45** を過剰の DIBALH で処理すると、ケトンの立体選択的還元と TBS 基の選択的脱保護が同時に起こり、得られたジオールの選択的なトシル化、PMB 基の除去、続く塩基処理によりエポキシアル

コール 46 へと誘導した。化合物 46 の 6-*exo* 環化は、トルエン中シリカゲルと加熱することにより高収率で進行し、脱シリル化して JKLMN 環フラグメント 47 を合成した。続いて、47 に Fmoc グリシンを縮合し、得られたエステル 48 のアセトニドと Fmoc 基を除去し、活性エステル 49 との縮合を行ってハプテン 42 を合成した。化合物 42 をキャリアタンパク質 KLH とコンジュゲートし、マウスを免役してモノクローナル抗体を作製した。しかし、ハプテン 42 と強い結合活性を示す抗体を得ることはできなかった。これは、ハプテン 42 のリンカー部に存在するアミド構



造が抗体と相互作用しているためと考えられる。そこで、リンカーが炭化水素鎖からなるハプテン 50 を新たに設計した。JKLMN 環フラグメント 47 にカルボン酸 51 を縮合し、アセトニドの脱保護と逆 Diels-Alder 反応によるマレイミド構造の再生を行って、ハプテン 50 を合成した。現在、50 を用いたモノクローナル抗体の作製を検討中である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Makoto Sasaki, Kotaro Iwasaki, Keisuke Arai	4. 巻 86
2. 論文標題 Synthesis and structural implication of the JKLMN-ring fragment of Caribbean ciguatoxin C-CTX-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 4580-4597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c03031	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 S. Raposo-Garcia, M. C. Louzao, H. Fuwa, M. Sasaki, C. Vale, L. M. Botana	4. 巻 160
2. 論文標題 Determination of the Toxicity Equivalency Factors for Ciguatoxins using Human Sodium Channels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 112812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2022.112812	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 該当する
1. 著者名 Makoto Sasaki, Kotaro Iwasaki, Keisuke Arai, Naoya Hamada, Atsushi Umehara	4. 巻 95
2. 論文標題 Convergent Synthesis of the HIJKLMN-Ring Fragment of Caribbean Ciguatoxin C-CTX-1 by a Late-Stage Reductive Olefin Coupling Approach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 819-824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20220070	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 Evelyne Benoit, Sebastien Schlumberger, Jordi Morgo, Makoto Sasaki, Haruhiko Fuwa, Roland Bournaud	4. 巻 14
2. 論文標題 Gambierol Blocks a K <sup>+</sup> Current Fraction without Affecting Catecholamine Release in Rat Fetal Adrenomedullary Cultured Chromaffin Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins14040254	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 該当する

1. 著者名 Makoto Sasaki, Miku Seida, Atsushi Umehara	4. 巻 88
2. 論文標題 Convergent and Scalable Synthesis of the ABCDE-Ring Fragment of Caribbean Ciguatoxin C-CTX-1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 403-418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c02414	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 Atsushi Umehara, Soma Shimizu, Makoto Sasaki	4. 巻 15
2. 論文標題 DMAPO/Boc20-Mediated One-Pot Direct N-Acylation of Less Nucleophilic N-Heterocycles with Carboxylic Acids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ChemCatChem	6. 最初と最後の頁 e202201596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cctc.202201596	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梅原 厚志、岩崎 浩太郎、荒井 啓介、佐々木 誠
2. 発表標題 カリブ海型シガトキシンの合成研究：KLMN環部フラグメントの合成
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤大亮、梅原厚志、佐々木 誠
2. 発表標題 ポルチミンのエナンチオ選択的な全合成研究
3. 学会等名 令和3年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤大亮, 梅原厚志, 佐々木 誠
2. 発表標題 ボルチミンの不斉全合成研究
3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsuko Sekido, Tomona Iizuka, Tomoyasu Aizawa, Makoto Sasaki, Haruhiko Fuwa, Mari Yamashita, Keiichi Konoki, Takeshi Yokoyama, Yoshikazu Tanaka
2. 発表標題 ヒト由来電位依存性カリウムイオンチャネルKV1.2/KV 2.1複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水颯真, 梅原厚志, 佐々木誠
2. 発表標題 DMAPO触媒とBoc20を用いるインドールとカルボン酸の高効率one-pot縮合反応の開発
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水颯真, 梅原厚志, 佐々木誠
2. 発表標題 DMAPO触媒とBoc20を用いる低反応性窒素求核剤とカルボン酸の高効率one-pot縮合反応の開発
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 諏訪朝也, 梅原厚志, 佐々木誠
2. 発表標題 イリジマシド類の全合成研究
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 誠
2. 発表標題 カリブ海型シガトキシンの全合成研究
3. 学会等名 有機化学研究会(白鷺セミナー)(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諏訪朝也, 梅原厚志, 佐々木 誠
2. 発表標題 イリジマシド類の全合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第134年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅原厚志, 志水颯真, 佐々木 誠
2. 発表標題 DMAPO触媒とBoc20を用いるインドールとカルボン酸の高効率one-pot縮合反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会第134年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅原厚志, 志水颯真, 佐々木 誠
2. 発表標題 DMAPO触媒とBoc20を用いる低反応性窒素求核剤とカルボン酸の高効率one-pot縮合反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会第134年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 佐々木 誠	4. 発行年 2020年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 1204
3. 書名 理科年表2021	

1. 著者名 佐々木 誠	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 1204
3. 書名 理科年表 2022	

1. 著者名 佐々木 誠	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 1208
3. 書名 理科年表2023	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Makoto Sasaki Lab.  
http://sasaki-umehara-lab.moon.bindcloud.jp

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 分担者	梅原 厚志  (Umehara Atsushi)  (40847018)	東北大学・生命科学研究科・助教   (11301)	

	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	円谷 健  (Tsumuraya Takeshi)		
研究 協力者	平間 正博  (Hirama Masahiro)		
研究 協力者	安元 健  (Yasumoto Takeshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------