

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21350028

研究課題名（和文） マイトトキシンの疎水性部分の合成と作用標的分子の解明

研究課題名（英文） Synthetic studies of the hydrophobic part of maitotoxin for elucidating its target proteins

研究代表者

大石 徹 (OISHI TOHRU)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：90241520

研究成果の概要（和文）：

マイトトキシン（MTX）は強力な生物活性を発現する巨大な梯子状ポリエーテルであり、天然から微量しか得られないため活性発現機構や作用標的分子は未解明である。我々は、MTXが生物活性を発現する際に全構造が必須なのではなく、重要な部分構造が存在するという仮説を提唱し、MTXの生物活性を阻害する人工分子の創成を目的として研究を行った。MTXの疎水性部分に相当する天然物の部分構造、および人工梯子状ポリエーテルを設計・合成して生物活性を評価した結果、溶血活性および細胞内へのCa²⁺流入活性において、それぞれこれまで報告されている中で最も強い阻害剤になることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Maitotoxin (MTX) is a gigantic ladder-shaped polyether which possesses potent biological activities. Its target proteins and mode-of-action at the molecular level remain unknown due to the short supply of materials from natural sources. Based on our hypothesis that whole structure of MTX is not necessary to elicit the biological activities, we developed antagonists that inhibit the biological activities induced by MTX. We designed and synthesized a partial MTX structure corresponding to the hydrophobic portion (W-C'), and an artificial ladder-shaped polyether (ALP) possessing heptacyclic ring systems. We have found that W-C' inhibited MTX-induced hemolytic activity, whereas the ALP inhibited MTX-induced Ca²⁺ influx in rat glioma C6 cells, respectively, with most potent inhibitory activities that have ever been reported.

交付決定額

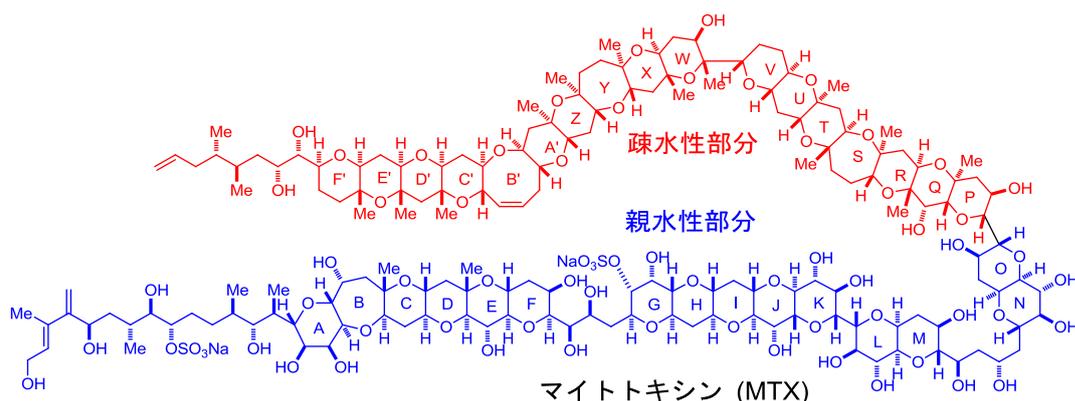
(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・有機化学

キーワード：マイトトキシンの疎水性部分・作用標的分子・ポリエーテル・化学合成・分子プローブ



1. 研究開始当初の背景

マイトトキシシ (MTX) は、熱帯・亜熱帯海域で年間2万人以上の中毒患者が発生する世界最大規模の魚介類による食中毒シガテラの原因物質のひとつである。MTXは、渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* が産生する梯子状ポリエーテル天然物であり、いわゆる二次代謝産物と称される天然有機化合物の中で最大の分子量 (M.W. 3422) および最強の毒性 (マウス腹腔内投与 $LD_{50} = 50 \text{ ng/kg}$) を有する。MTXの構造決定は困難を極めたが、NMRを駆使した結果、村田・安元らにより遂に相対配置が決定された (1993年)。また、部分構造の化学合成と組み合わせることで、村田・橘グループおよび岸グループによりそれぞれ独立に全立体配置が決定された (1996年)。最近、JK環部の立体化学に関する議論が起こったが、Nicolaouらの合成研究により提出構造が正しいことが証明された。MTXは、強い溶血活性を示すほか、極微量で細胞内の Ca^{2+} イオンの濃度を上昇させることが知られており、生理学的研究用試薬として広く用いられてきた。しかしながら、発見以来20年以上経過した現在でも、MTXの生体内での作用標的分子や活性発現機構は明らかになっておらず、中毒の予防や治療法の開発を行う上でも分子レベルでの活性発現機構の解明が重要視されている。また、類似した梯子状ポリエーテルであるブレベトキシシ (赤潮毒の原因物質) は、膜蛋白質である電位依存性ナトリウムチャンネルに特異的に結合してチャンネルを開口することが知られており、神経生理学などの研究用ツールとして重要な役割を果たしてきた。しかしながら、MTXの作用標的分子に関しては、非選択的カチオンチャンネルが作用標的分子であると考えられているに過ぎない。分子レベルで作用機構を解明するためには、作用標的分子を同定することが重要であるが、MTXにおいては研究が立ち遅れている現状にある。その主な理由は、(1) 天然か

ら得られる生理活性物質が極微量であること、(2) 多数の官能基を有するため、所望の位置での特異的標識化が困難であること、(3) 非常に巨大な分子であるため、 ^3H で放射性同位体標識した誘導体を用いた場合、非特異的吸着が強すぎるため蛋白質を特定できなかったことなどが挙げられる。

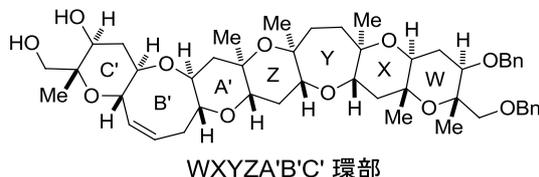
2. 研究の目的

本研究では、マイトトキシシの疎水性部分を合成し作用標的分子の解明することを目的とし、以下のような方法でこれまでの問題点を解決する計画である。(1)、(2)に関しては、有機合成化学的手法による供給が解決法になる。梯子状ポリエーテルの全合成研究は日本で盛んに行われており、実際に多くの全合成が達成され、世界水準から見ても最先端を走っている分野である。しかしながら、分子量が千を超える分子を化学合成することは現在でも容易ではなく、従来の方法論を遥かに凌駕する高効率的合成法の開発が必要である。(3)に関しては、分子全体を用いるのではなく部分構造を調製し、これを光親和性標識化した分子プローブを用いれば非特異的吸着を軽減することで作用標的蛋白質の同定が可能になると期待される。MTXは、親水性部分 (A-O環部) と疎水性部分 (P-F'部分) の大きく2つに分けるが、ブレベトキシシなど他の梯子状ポリエーテルに類似した疎水性部分が作用標的蛋白質と相互作用している可能性が高いと考えられる。もし合成した疎水性部分がMTXの活性を競合的に阻害すれば、作用標的蛋白質と競争的に結合している可能性が高い。この疎水性部分を光親和性プローブへと誘導すれば作用標的蛋白質を同定できると考えられる。

3. 研究の方法

MTXの疎水性部分は他の梯子状ポリエーテルと類似しており、またMTXの活性がブレベトキシシ類によって阻害されること

が知られている。我々は、MTX の疎水性部分が作用標的分子（おそらく膜蛋白質）との相互作用に深く関わっていると予想し、この部分構造を用いれば MTX の阻害剤を創製できるのではないかと考えた。プレベトキシシン B の構造に類似している XYZA'B'C' 環部に着目した。

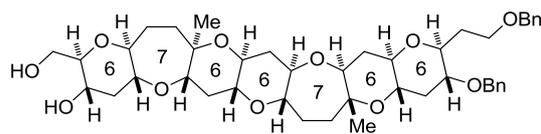


4. 研究成果

我々は独自に開発した α -シアノエーテルを経由する二環構築型収束的合成法を用いて WXYZA'B'C' 環部セグメントを効率的に合成した。このセグメントを溶血活性に基づいて評価した結果、10 nM の MTX によって誘導される溶血活性を 100% とした時、濃度依存的に MTX の溶血活性を阻害し 10 μ M の WXYZA'B'C' 環部によって約 80% の阻害が観測された。なお、同濃度のプレベトキシシン B は阻害活性を示さなかった。以上の結果は MTX に対する特異的な阻害剤創製の可能性を示唆しており、作用標的分子の解明に向けて大きな前進である。

一方、 Ca^{2+} 流入活性に関しては WXYZA'B'C' 環部阻害活性を示さなかった。この結果から、 Ca^{2+} 流入活性には他の疎水性部分が関与している可能性が高いことが示唆された。最近、カルシウム ATP アーゼがマイトトキシシンの作用標的タンパク質のひとつではないかと報告されている。そこで WXYZA'B'C' 環部の活性を評価した結果、MTX とは異なりカルシウムポンプに対して活性を示さないことが明らかとなった。

また我々は、人工梯子状ポリエーテル・モデル分子を種々合成し、膜蛋白質との相互作用を評価した結果、ポリエーテル部分が七環程度で膜貫通 α -ヘリックスの疎水性部分の長さ（約 25 Å）と一致している場合（Hydrophobic Matching）に最も高い親和性が高くなることを見出している。この人工梯子状ポリエーテルを用いて活性を評価した結果、これまで報告されている中で最も強い阻害剤になることを偶然に発見した。すなわち、1 nM の MTX によって誘導される溶血活性を 100% とした時、濃度依存的に MTX の溶血活性を阻害し 10 μ M の人工梯子状ポリエーテルによって約 80% の阻害が観測された。この人工分子は MTX の疎水性部分である R-X 環部に類似していることが示唆された。



人工梯子状ポリエーテル

以上の結果から、MTX には溶血活性に関与している部分と、 Ca^{2+} 流入活性に関与している部分が別々のモチーフとして存在することが示唆され、部分構造を適切にデザインすることによって、それぞれの生物活性を阻害する人工分子を作り分けることが出来ると期待される。

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 16 件）

1. Design and Synthesis of Sphingomyelin-Cholesterol Conjugates and Their Formation of Ordered Membranes. Nobuaki Matsumori, Norio Tanada, Kohei Nozu, Hiroki Okazaki, Tohru Oishi, Michio Murata *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8568-8575. (査読有)
2. Conformations of Spermine in Adenosine Triphosphate Complex: The Structural Basis for Weak Bimolecular Interactions of Major Cellular Electrolytes. Keisuke Maruyoshi, Toshiyuki Yamaguchi, Tetsuo Demura, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, and Michio Murata *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4788 -4795. (査読有)
3. Structural Reevaluation of Amphidinol 3, a Potent Antifungal Compound from Dinoflagellate. Respati T. Swasono, Mitsunori Kanemoto, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, Michio Murata *Heterocycles* **2011**, *82*, 1359-1369. (査読有)
4. Synthesis of 6-F-ergosterol and its influence on membrane-permeabilization of amphotericin B and amphidinol 3. Yusuke Kasai, Nobuaki Matsumori, Hiroyuki Ueno, Kenichi Nonomura, Shinya Yano, Murata Michio, Tohru Oishi *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1437-1442. (査読有)
5. Detection of Rap1A as a yessotoxin binding protein from blood cell membranes. Satoru Ujihara, Tohru Oishi, Ryota Mouri, Rie Tamate, Keiichi Konoki, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, Yasukatsu Oshima, Naoyuki Sugiyama, Masaru Tomita, Yasushi Ishihama *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6443-6446. (査読有)

6. Sterol Effect on Interaction between Amphidinol 3 and Liposomal Membrane as Evidenced by Surface Plasmon Resonance. Respati Swasono, Ryota Mouri, Nagy Morsy, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, Michio Murata *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2215-2218. (査読有)

7. Second-Generation Synthesis of Endogenous Sperm-Activating and Attracting Factor (SAAF) Isolated from the Ascidian *Ciona intestinalis*. Tohru Oishi, Kouichiro Ootou, Hajime Shibata, Michio Murata *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2600-2602. (査読有)

8. Reductive Etherification under Microfluidic Conditions: Application to Practical Synthesis of the FGHIJ-Ring System of Yessotoxin. Tohru Oishi, Tomoyoshi Imaizumi, Michio Murata *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 108-109. (査読有)

9. Stereoselective Synthesis of the C31-C40/C43-C52 Unit of Amphidinol 3. Mitsunori Kanemoto, Michio Murata, Tohru Oishi *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8810-8813. (査読有)

10. Direct Interaction between Amphotericin B and Ergosterol in Lipid Bilayers As Revealed by ²H NMR Spectroscopy. Nobuaki Matsumori, Kazuaki Tahara, Hiroko Yamamoto, Atsushi Morooka, Mototsugu Doi, Tohru Oishi, Michio Murata *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11855-11860. (査読有)

11. Ion Channel Complex of Antibiotics as Viewed by NMR. Michio Murata, Yusuke Kasai, Yuichi Umegawa, Naohiro Matsushita, Hiroshi Tsuchikawa, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 1123-1129. (査読有)

12. Surface Plasmon Resonance-Based Detection of Ladder-Shaped Polyethers by Inhibition Detection Method. Ryota Mouri, Tohru Oishi, Kohei Torikai, Satoru Ujihara, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, Yasukatsu Oshima *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2824-2828. (査読有)

13. Maitotoxin-Photoactive Probe Binds to Membrane Proteins in Blood Cells. Keiichi Konoki, Masaki Hashimoto, Kaori Honda, Kazuo Tachibana, Rie Tamate, Futoshi Hasegawa, Tohru Oishi, Michio Murata *Heterocycles* **2009**, *79*, 1007-1017. (査読有)

14. Conformational Change of Spermidine upon Interaction with Adenosine Triphosphate in Aqueous Solution. Keisuke Maruyoshi, Kaori Nonaka, Takeshi Sagane, Tetsuo Demura, Toshiyuki Yamaguchi, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, Michio Murata *Chem.*

Eur. J. **2009**, *15*, 1618-1626. (査読有)

15. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Fluorinated Analogues of Salicylhalamide. Yoshinori Sugimoto, Keiichi Konoki, Michio Murata, Masafumi Matsushita, Hiroshi Kanazawa, Tohru Oishi *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 798-806. (査読有)

16. Synthesis of 25-¹³C-Amphotericin B Methyl Ester: A Molecular Probe for Solid-state NMR Measurements. Naohiro Matsushita, Yukiko Matsuo, Hiroshi Tsuchikawa, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, Tohru Oishi *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 114-115. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

1. Tohru Oishi, Mona Symposium: Natural Products and Medicinal Chemistry (招待講演), "Synthesis and Biology of Ladder-shaped Polyethers Isolated from Marine Dinoflagellate for Exploring Biological Functions" January 3-6, 2012, University of West Indies, Mona, Kingston, Jamaica

2. 大石 徹, 有機合成夏季セミナー「明日の有機合成化学」(招待講演), 「膜タンパク質との相互作用解明を志向した梯子状ポリエーテルの合成研究」, 大阪科学技術センター, 大阪, 2011年9月6日

3. Tohru Oishi, The Uehara Memorial Foundation Symposium 2011 Chembiomolecular Science: at the Frontier of Chemistry and Biology (招待講演), "An Approach Based on Organic Synthesis toward Identification of Target Proteins of Maitotoxin", July 6-8, 2011, Hyatt Regency Tokyo, Tokyo, Japan

4. 大石 徹, 高知大学「IMT&統合的バイオイメージング合同シンポジウム」(招待講演), 「細胞膜に作用する生理活性天然物の合成化学的アプローチによる構造決定」, 高知大学, 朝倉キャンパス, 高知, 2011年7月2日

5. Tohru Oishi, The Sixth Korea-Japan Young Scientists Meeting on Natural Products Chemistry and Bioorganic Chemistry (一般講演), "Synthetic Approach toward Structure Confirmation of Amphidinol 3" (Short Presentation and Poster) June 23-25, 2011, Seoul National University, Seoul, Korea

6. 大石 徹, 新学術領域 反応集積化の合成化学 革新的手法の開発と有機物質創成への展開 第3回若手シンポジウム (九州地区) (招待講演), 「梯子状ポリエーテルのフローマイクロ合成」, 九州大学先導物質化学研究所, 2011年2月5日

7. 大石 徹, 新学術領域 反応集積化の合成化学 革新的手法の開発と有機物質創成への

展開平成22年度 第2回成果報告会(招待講演),「梯子状ポリエーテル天然物のマイクロフロー合成」,早稲田大学,2011年1月30日

8. Tohru Oishi, Pacificchem 2010(招待講演), "Synthesis and Biology of Ladder-shaped Polyethers Isolated from Marine Dinoflagellate for Exploring Biological Functions", December 17, 2010, Hilton Hawaiian Village, Hawaii, USA

9. 大石 徹, フローマイクロ合成研究会第46回研究会(招待講演),「マイクロフローリアクターを用いた梯子状ポリエーテル天然物合成の効率化」,大阪科学技術センター,大阪,2010年6月11日

10. Tohru Oishi, Gordon Research Conference Marine Natural Products(招待講演), "Synthesis and Biology of Ladder-shaped Polyethers Isolated from Dinoflagellates", February 28, 2010, Ventura Beach Marriott, Ventura, CA, USA

11. Tohru Oishi, Synthetic Studies of Yessotoxin and Maitotoxin, The 11th International KYOTO Conference of New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-11)(一般講演), Kyoto Japan, November 11, 2009.

[図書](計2件)

1. ソレル 有機化学 Thomas N. Sorrell 著
東京化学同人村田道雄・石橋正巳・木越英夫・佐々木誠 監訳

大石 徹, 第五章 化学反応と機構 pp109-142 翻訳 2009年11月25日

2. 大石 徹・鳥飼浩平・長谷川太志「膜タンパク質との相互作用解明を志向した梯子状ポリエーテルの設計・合成・活性評価」有機合成化学協会誌, 67 巻, 12 号, 2009 年, p1250-1260.

[その他]

ホームページ等

<http://www.scc.kyushu-u.ac.jp/Seibutsuyuki/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 徹 (OISHI TOHRU)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号: 90241520