

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651258

研究課題名(和文)テトロドトキシン抵抗性ナトリウムチャンネルに対する阻害剤開発

研究課題名(英文)Development of TTX-resistant voltage-gated sodium channel inhibitor

研究代表者

長澤 和夫 (Nagasawa, Kazuo)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10247223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性ナトリウムチャンネルは、テトロドトキシン依存型(TTX-s)と抵抗型(TTX-r)とに分類される。TTX-sに対するリガンドは、テトロドトキシン、サキシトキシン(STX)等が知られるが、TTX-rへの阻害活性を示すリガンドはない。本研究では、TTX-r型リガンドの創製を目的とした。

サブタイプ間での配列が顕著に異なる領域と相互作用するSTXのC13位に着目し、STX誘導体類として初めてC13位にグアニジン、ウレア、アセトアミド基が導入された各誘導体の合成を達成した。これらはTTX-rへの中程度の阻害活性を示すことがわかったが、TTX-sとの顕著な選択性はなかった。

研究成果の概要(英文)：Saxitoxin (STX) is a potent inhibitor of NavCh. NavChs play critical roles in the initiation and propagation of action potentials, and ten subtypes have been characterized. Since the roles of the subtypes are not well explored, development of NavCh ligands specifically targeting subtypes of NavChs is important. To address this issue, we performed SAR studies of STX to develop TTX-r subtype-selective NavCh modulators.

Thus, we synthesized C13-N-substituted STX derivatives, bearing guanidine, urea, and acetamide at C13 for the first time. These derivatives are of interest because STX has a carbamoyl group at C13, and guanidine, urea, and acetamide groups are similar in size, but different in electrostatic character. The NavCh-inhibitory activity of those new STXs was evaluated by patch-clamp method, and they showed moderate inhibitory activity against TTX-r subtype of Nav1.5. These results indicate the electrostatic character of the C13 is significant for NavCh-inhibitory activity.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：サキシトキシン ナトリウムチャンネル 阻害剤 ブタイプ選択性 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルをはじめとする膜タンパク質は重要な創薬標的であるにも関わらず、これまで研究が遅れている。これは、膜タンパク質への内在性リガンドが存在しないことに起因する。

電位依存性ナトリウムチャンネル (Na_vCh) Na_vCh は、痛覚・心拍・筋肉の収縮など、生命活動と密接に関連するイオンチャンネルで、これまでに 10 種のサブタイプ ($\text{Na}_v1.1 \sim \text{Na}_v1.9$ および Na_vX) が確認されている。これらは、フグ毒テトロドトキシン依存型チャンネル (TTX-s) とテトロドトキシン抵抗型チャンネル (TTX-r) とに分類される。TTX-s に対する強力な阻害剤は、テトロドトキシン (TTX) や貝毒サキシトキシン (STX) が知られる。一方、痛覚、心筋(心拍)活動に関連する TTX-r 型への阻害剤はほとんど知られていない。唯一、ペプチド性貝毒 μ -コノトキシンがその候補化合物として研究されているのみである。テトロドトキシン抵抗型ナトリウムチャンネル (TTX-r) に対する特異的阻害剤の開発が、痛覚、心筋(心拍)に関連する生命現象解明のためのツール、また当該関連疾患の薬剤として求められている。

2. 研究の目的

電位依存性ナトリウムチャンネルは現在 10 種のサブタイプが知られており、これらは痛覚・心拍・筋肉の収縮等、重要な生命活動に関連する。このサブタイプはテトロドトキシン依存型 (TTX-s) と抵抗型 (TTX-r) とに分類される。TTX-s を阻害するリガンドは、天然海産毒として知られるテトロドトキシン、サキシトキシンが存在するが、TTX-r に対するリガンドは未だ天然から発見されておらず、また化学合成による創製も困難を極めていいる。そこで本研究では、TTX-r のサブタイプに対するリガンドの創製を目指すこととした。即ち、我々がこれまで行ってきたサキシトキシン (STX) の全合成研究の成果と、これまで報告されている STX-チャンネルタンパク質のドッキングスタディの知見を基に、STX の構造展開を行い、TTX-r に対するリガンドの創製を目的とした。

3. 研究の方法

電位依存性ナトリウムチャンネル ($\text{Na}_v1.4$) への変異実験により、401 番目のアミノ酸残基が、サブタイプ間における STX への感受性に大きく関わっていることが明らかとなっている (V. P. Santarelli 等、*J. Biol. Chem.* **2007**, *16*, 8044.)。このアミノ酸残基 (401 番目) は、Zhorov らにより提唱されている STX と Na_vCh との結合モデルから、STX の C13 位近傍に位置することがわかる (B. S. Zhorov 等、*Biophys. J.* **2005**, *88*, 184.)。従って、STX の C13 位に着目した構造展開により、 Na_vCh サブタイプ間での感受性の異なるリガンドが創製できると考えた。本研究で

は C13 位に着目した構造展開を行う上で、特に当該アミノ酸近傍の静電ポテンシャルと空間的大さを考慮した構造展開を計画することとした。即ち、STX (1) の C13 位カルバモイル基が、グアニジン、ウレア、アセトアミド基にそれぞれ変換された誘導体 2 ~ 4 の合成を計画した (図 1)。一般に STX が有するカルバモイル基の pK_a は 23-24 であるのに対し、グアニジン基、ウレア基、アセトアミド基の pK_a は 13-14、26-27、34-35 である。これらの官能基をそれぞれもつ化合物 2 ~ 4 の静電ポテンシャルの計算結果からも、アセトアミド 4 は中性を示すのに対し、グアニジン 2 およびウレア 3 は正電荷をもつことが分かった (図 2)。

なお、合成を計画した化合物は、パッチクランプ法による Na_vCh 阻害活性を評価することを計画した。

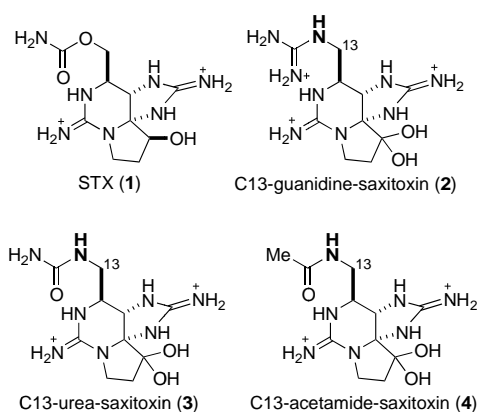


図 1 STX (1) の構造と合成を計画した誘導体 2-4 の構造。

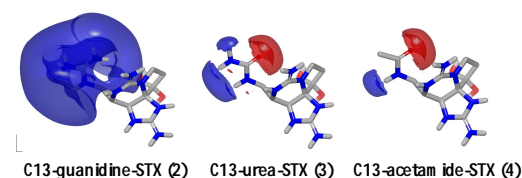
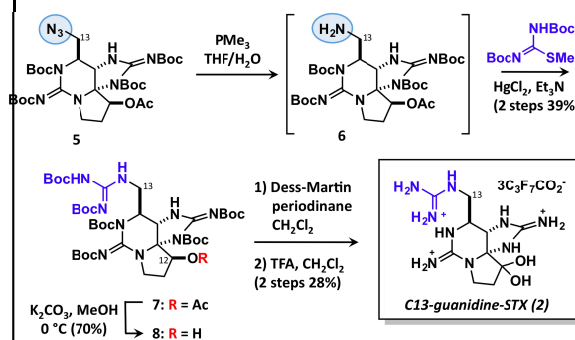


図 2 化合物 2-4 の静電ポテンシャル

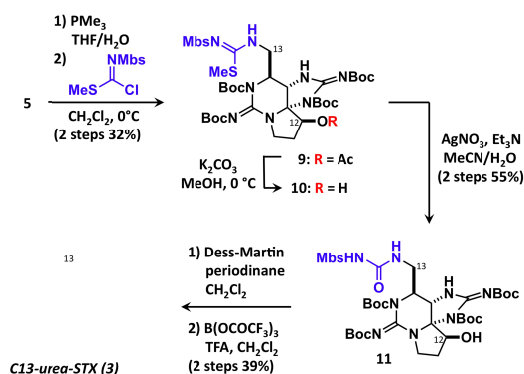
4. 研究成果

新規 STX 誘導体 2-4 を以下の通り合成した (Scheme 1-3)。



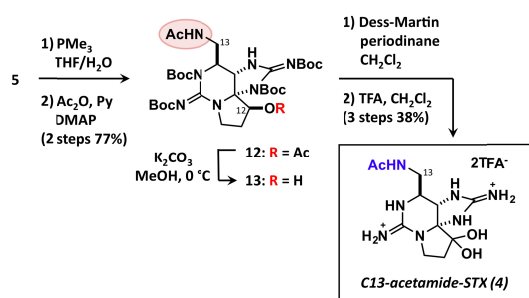
Scheme 1 C13-Guanidine-STX (2) の合成

我々が既に確立した3環性ビスグアニジン構築法を基盤に、アジド4を合成した。アジドを選択的に還元した後、シュードチオウレアを反応させC13位にグアニジンを導入することができた。12位の水酸基を酸化後、保護基を除去することで、目的とする2を得ることができた (Scheme 1)。



Scheme 2 C13-Urea STX-(3)の合成

次にアジド4より、3の合成を行った (Scheme 2)。アジドをアミンへ還元した後、クロロシュウドウレアを反応させることで、チオシュウドウレア8を得た。12位のアセチル基を脱保護後、硝酸銀を作用させることで、C13位にウレアを導入することができた。最後に12位の水酸基をケトンへ酸化し、Boc基とMbs基を脱保護することで3を得ることができた。



Scheme 3 C13-Acetamide-STX (4)の合成

アセトアミド4は、還元したアジド4のアミノ基をアセチル化し12とし、12位の酸化とBoc基の脱保護を行うことで得ることができた (Scheme 3)。

以上のとおり、目的とする新規サキトキシン誘導体2-4を得ることができたので、次にこれらの電位依存性ナトリウムチャネル阻害活性をパッチクランプ法にて評価することとした。TTX-s サブタイプチャネルとしてNa_v1.4を、またTTX-r サブタイプチャネルとしてNa_v1.5を用いて評価を行った。結果をTable 1、Table 2にそれぞれ示した。

Table 1 Inhibitory activity of STX derivatives 2-4 against Na_v1.4

Compounds	IC ₅₀ (Na _v 1.4)
C13-Guanidine-STX(2)	5.2 ± 1.3 μM
C13-Urea STX-(3)	2.0 ± 0.3 μM
C13-Acetamide-STX(4)	0.83 ± 0.29 μM
dc-STX (Control)	0.01 ± 0.006 μM

Table 2 Inhibitory activity of STX derivatives 2-4 against Na_v1.5

Compounds	IC ₅₀ (Na _v 1.5)
C13-Guanidine-STX(2)	124 ± 20 μM
C13-Urea STX-(3)	36 ± 9.3 μM
C13-Acetamide-STX(4)	0.83 ± 0.1 μM
dc-STX (Control)	0.94 ± 0.33 μM

Table 1 および 2 の結果より、今回合成したいずれの STX 誘導体 2-4 は、コントロール化合物である dc-STX STX とほぼ同様の Na_v Ch 阻害活性を示すと同様、TTX-s である Na_v1.4 に対して、TTX-r (Na_v1.5) より 20-30 倍、強力に阻害活性を示すことが分かった。また、TTX-s に対しては、dc-STX より、10-100 倍、阻害活性が現弱することが分かった。

即ち、今回 STX の C13 位について、立体的な大きさと静電ポテンシャルに着目した構造展開では、TTX-r 型への阻害剤の開発は達成できなかった。期待する活性を得ることが出来なかった理由は、今のところ明らかではない。今後より正確なりガンドとタンパクとの相互作用を理解するために、STX と Na_vCh の共結構造解析を行う必要がある。一方、本構造活性相関研究を通じ、STX への様々な部位への構造展開を可能とする、新たな合成基盤を構築することができた。特に、今回 STX の C13 に初めて窒素官能基を有する誘導体類の合成に成功した。当該合成法を基盤に更なる構造展開を行うことで、目的とする TTX-r 型への阻害活性を示すリガンドの創製を検討する。

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5件)

Makoto Iwata, Kyohei Kanoh, Takuya Imaoka, Kazuo Nagasawa, "Total Synthesis of (+)-Cylindradine A", *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 6991-6994. DOI:10.1039/C4CC00137K (査読あり)

Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasulatsu Oshima, Mari Yotsu-Yamashita, "Synthesis and identification of proposed biosynthetic intermediates of saxitoxin in the cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04) and the binoflagellate *Alexandrium tanarense* (Axat-2)", *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 3016-3020. DOI:

10.1039/C40B00071D (査読あり)

Takafumi Akimoto, Asako Masuda, Mari Yotsu-Yamashita, Takatsugu Hirokawa and Kazuo Nagasawa, "Synthesis of saxitoxin derivatives bearing guanidine and urea groups at C13 and evaluation of their inhibitory activity on voltage-gated sodium channel", *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 6642-6649. DOI: 10.1039/C30B41398 (査読あり)

Takuya Imaoka, Makoto Iwata, Takafumi Akimoto and Kazuo Nagasawa, "Synthetic Approaches to Tetracyclic Pyrrole Imidazole Marine Alkaloids", *Nat. Prod. Commun.*, **2013**, *8*, 961-964. (査読あり)

Osamu Iwamoto, Takafumi Akimoto, and Kazuo Nagasawa, "Synthesis of saxitoxins" *Pure Appl. Chem.*, **2012**, *84*, 1445-1453. DOI: 10.1351/PAC-CON-11-09-10(査読あり)

〔学会発表〕(計9件)

秋元隆史、西川徹、岩本理、越野広雪、長澤和夫「Synthetic Studies on Zetekitoxin AB」13th International Conference on the Chemistry of Antibiotics and other bioactive compounds (ICCA-13)、2013年9月24-27日、富士ビューホテル(山梨)。

秋元隆史、西川徹、岩本理、越野広雪、長澤和夫「ゼテキトキシン AB の合成研究」第55回天然有機化合物討論会、2013年9月18-20日、同志社大学寒梅館(京都)。

西川徹、秋元隆史、岩本理、越野広雪、長澤和夫「ゼテキトキシン AB の合成研究：C13位アミド構築の検討」日本化学会 第93回春季年会、2013年3月22-25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀)。

増田朝子、篠原涼子、秋元隆史、山下まり、長澤和夫「C13位N置換型サキシトキシン誘導体類の合成とNaVCh阻害活性評価」日本化学会 第93回春季年会、2013年3月22-25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀)。

秋元隆史、西川徹、岩本理、越野広雪、長澤和夫「ゼテキトキシン AB の合成研究：C11位側鎖イソキサゾリジン部の構築」日本化学会 第93回春季年会、2013年3月22-25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀)。

秋元隆史、岩本理、長澤和夫「Synthetic Studies on Zetekitoxin AB」IKCOC-12、2012年11月12-16日、Rihga Royal Hotel Kyoto (京都)。

増田朝子、篠原涼子、岩本理、秋元隆史、山下まり、長澤和夫「Synthesis of saxitoxin derivatives and evaluation of their NaCh inhibitory activity」The 11th International Symposium on Advanced Technology (ISAT-Special)、2012年10月30日、工学院大学八王子キャンパス(東京)。

秋元隆史、篠原涼子、岩本理、山下まり、山岡薫、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シトキシン誘導体類の合成研究」第53回天然有機化合物討論会、2012年9月27-29日、大阪国際ホール(大阪)。

秋元隆史、今西静香、岩本理、長澤和夫「ゼテキトキシン AB の合成研究」日本化学会 第92回春季年会、2012年3月25-28日、慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス(神奈川)。

〔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