

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23102015

研究課題名（和文）イオンチャネルの精密機能制御

研究課題名（英文）Control of ion-channel functions by analogues of natural toxins

研究代表者

西川 俊夫（Nishikawa, Toshio）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：90208158

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,300,000円

研究成果の概要（和文）：フグ毒テトロドトキシン(TTX)は、神経伝達系の要である電位依存性ナトリウムチャネルという膜タンパク（以下Na⁺チャネル）を強力に阻害するが、10種類あるNa⁺チャネルの分子種（サブタイプ）を区別できない。そこで、本研究では、TTXの十数種類のアナログを化学合成し、サブタイプ選択的に示すNa⁺チャネル阻害剤を創製する事を目的とした。しかし、僅かな構造の改変でも大幅な阻害活性の低下が見られ、期待したような選択性を示すアナログを見つける事はできていない。一方、海産天然物クランベシンBカルボン酸が、TTXに匹敵するNa⁺チャネルの強力な阻害活性を示す事を初めて見いだした。

研究成果の概要（英文）：Tetrodotoxin, a puffer fish toxin, inhibits voltage-gated sodium channel (VGSC), a key protein of neurotransmission, however, does not show subtype selectivity. Purpose of this research is to find a new subtype selective inhibitor of VGSCs, by synthesizing a dozen analogues of TTX. However, slight modification of TTX decreases the inhibitory activity of VGSC. On the other hand, we found that crambesin B carboxylic acid, a marine natural product, exhibits potent inhibition comparable to TTX for the first time.

研究分野：天然物合成

キーワード：テトロドトキシン サキシトキシン 阻害剤 電位依存性ナトリウムチャネル サブタイプ選択性

1. 研究開始当初の背景

フグ毒テトロドキシン (TTX) と麻痺性貝毒サキシトキシン (STX) は、神経伝達系の要である電位依存性ナトリウムチャネル (以下 Na^+ チャネル) を特異的に阻害することから、 Na^+ チャネルの構造・機能の研究で欠かすことのできないツール分子として広く利用されている。しかし近年 Na^+ チャネルには多くのサブタイプ (ほ乳類では $\text{Na}_v 1.1$ から $\text{Na}_v 1.9$ の 9 種類) が存在することが明らかになり、その機能解析のためにサブタイプを区別できる阻害剤が切望されている。

2. 研究の目的

本研究では、TTX と STX の化学合成と電気生理学的手法による阻害活性の評価系を駆使して、サブタイプ選択的 Na^+ チャネル阻害剤を単純化アナログで創製する事を目的として研究を展開してきた。

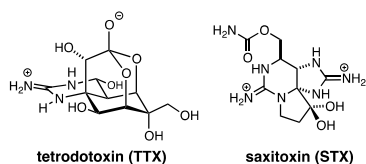


図 1. TTX と STX の構造

申請者らは、過去十数年間、様々な TTX アナログの供給を可能とする汎用合成法や STX 骨格の簡便な合成法を開発してきた。これらの化学合成法を駆使、更に改良し、多様なアナログを供給する。一方、活性評価は、 Na^+ チャネルの各サブタイプの阻害活性を精密に評価するため、パッチクランプによる活性評価系を立ち上げる。なお、TTX との構造類似性から海産天然物クランベシン B のカルボン酸部分が Na^+ チャネル阻害剤の候補化合物となりうると推定し、その合成、活性評価も実施する。構造活性相関を詳細に調べることで合理的分子設計の指針を構築し、構造を単純したアナログでのサブタイプ選択的な Na^+ チャネル阻害剤の創製を目指す。本研究で開発されるサブタイプ選択的な阻害剤は、 Na^+ チャネルの機能解析・制御の切り札となるだけでなく、 Na^+ チャネルを創薬標的とする医薬品開発の基盤となることが期待される。

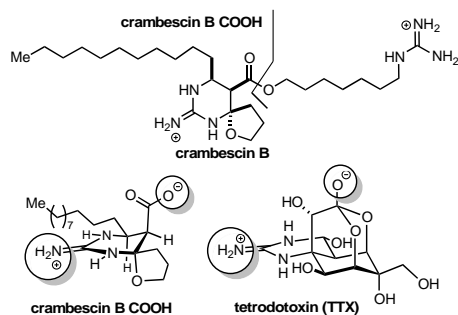


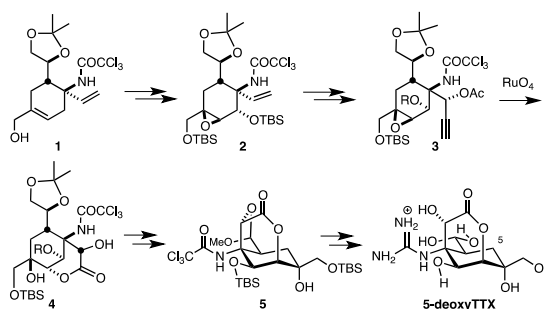
図 2. 海産天然物クランベシン B のカルボン酸と TTX の類似性

3. 研究の方法

TTX、STX とクランベシン B カルボン酸のアナログ分子は、すべて申請者らが独自開発した完全化学合成法によって供給し、阻害活性の評価は電気生理学的手法によって行う。

(1) 阻害剤の化学合成

TTX のアナログは、プロモレグルコセノンとイソプレノール誘導体の Diels-Alder 反応と Overman 転位反応を鍵反応として大量調製した汎用中間体 1 を利用する第三世代合成法を使って合成した。例として、スキーム 1 に 5-deoxyTTX の合成ルートの概略を示す。



スキーム 1. 5-deoxyTTX の化学合成の概略

STX は、既にカスケード型プロモ環化反応を使った簡便な骨格構築法を開発しているが、さらに多様な構造を創出できる新規合成法を開発する。クランベシン B カルボン酸は、上記カスケード型プロモ環化反応を活用した合成法を開発し、アナログを合成する計画である。

(2) 阻害活性の評価

培養細胞に Na^+ チャネルの各サブタイプを発現させホールセルパッチクランプ法によるサブタイプ阻害活性評価を整える。この評価系を使って、TTX アナログの阻害活性を調べる。なお、パッチクランプ実験には熟練した技術が必要であり、このアッセイ系の立ち上げには時間がかかると想定されるので、Neuro-2A 細胞を使った、ウワバイン (Na^+/K^+ -ATPase 阻害剤) とベラトリジン (Na^+ チャネルの開放剤) の細胞毒性の軽減を指標とするアッセイ系を併用する。この方法は、サブタイプ選択性は評価できないものの、TTX、STX のアナログの Na^+ チャネルの阻害活性の評価では、実績のあるものである。

これらの結果をもとに、サブタイプ選択性に関わる Na^+ チャネルタンパク質の立体構造要因を解析し、阻害剤との相互作用に関わる構造を抽出した TTX、STX、あるいはクランベシン B カルボン酸の単純化アナログを設計・合成し、天然が元来示さないサブタイプ選択性の高い阻害剤、すなわち超活性単純化アナログの実現を目指す。

4. 研究成果

(1) 阻害剤の化学合成：これまでに合成した TTX 類縁体の一部を図 3 に示す。これ以外にそれぞれ 4,9-anhydro 体も合成した。なお、今回合成した中のチリキトキシン (CHTX) は、中南米産ヤドクカエルから単離された最も構造の複雑な TTX アナログである。

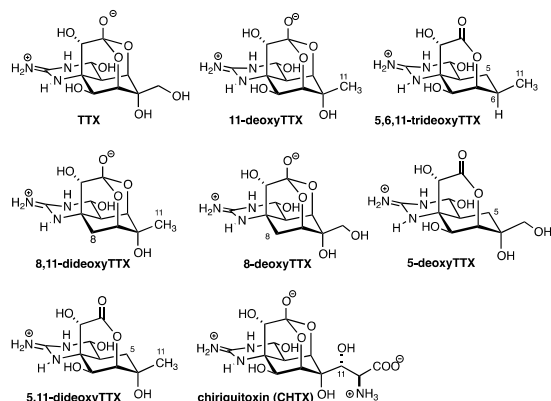
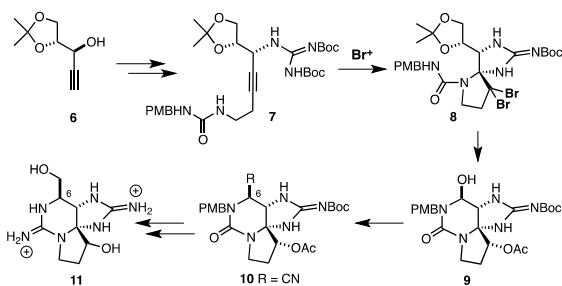


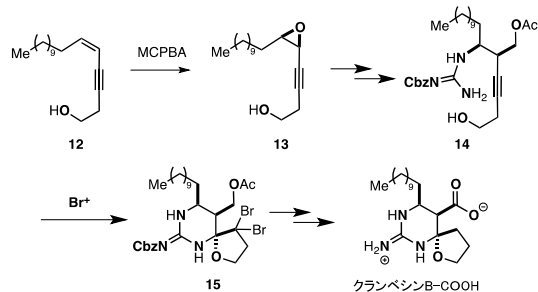
図 3. 完全化学合成した TTX アナログの一部

サキトキシン (STX) は、多様なアナログ合成が可能な新たな合成法の開発を目指し、下記のスキーム 2 に示すルートを開発した。この方法はアセチレン 7 のカスケード型プロモ環化反応を利用したもので、きわめて短工程で STX 骨格が合成できる。また、中間体 9 に対して、様々な求核剤の導入をすることができるため、C-6 位の様々な炭素置換基 (R) を導入したアナログが合成できる。



スキーム 2. STX 骨格の新合成法

克蘭ベシン B カルボン酸も 14 のカスケード型プロモ環化反応によって得られる 15 から合成ルートした (スキーム 3)。



スキーム 3. クランベシン B カルボン酸の合成法

本ルートで合成したラセミ体の克蘭ベシン B カルボン酸が、強力な Na⁺チャンネルの阻害活性を示したため、カスケード型プロモ環化反応の生成物 15 を利用して図 4 に示す数種類のアナログを合成し、構造活性相関を検討した。

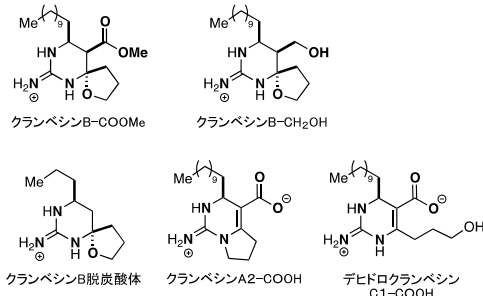


図 4. 完全化学合成した克蘭ベシン B カルボン酸アナログ

(2) 活性評価

合成した TTX アナログの Nueo-2A 細胞を使った活性評価 (EC₅₀) とパッチクランプによる Na⁺チャンネルの二つのサブタイプ (Na_v1.3, Na_v1.5) に対する阻害活性試験を評価した。TTX の僅かな構造を修飾しても、大幅な阻害活性の低下が見られ、TTX の構造は、Na⁺チャンネルの阻害剤としてきわめて完成度の高い (最適化) されたものである事が分かった。また、サブタイプ選択性については、現在さらに検討中だが、これまでに期待したような高い選択性を示すアナログを見つける事はできていない。一方、克蘭ベシン B カルボン酸は、ラセミ体で TTX に匹敵する強力な阻害活性が観測されたため、現在進行中のアナログ (図 4) の活性評価の結果が期待される。

(3) 国内外での成果の位置づけ

近年、Na⁺チャンネルは、様々な疾患の治療薬の有望な創薬標的として注目を浴びている。そのため、世界中の製薬企業でそのサブタイプ選択的な阻害剤の開発が行われている (総説: *ChemMedChem* 2012, 7, 1712-1740.)。そのほとんどが合成低分子であり、TTX, STX など天然低分子を利用したものはない。一方アカデミアでは、J. Du Bois (米国スタンフォード) や長澤和夫 (東京農工大) らが、STX の構造修飾によるサブタイプ選択的阻害剤の開発、利用研究を活発に進めている (総説: *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 2-27.)。本研究で主に対象とした TTX とその様々なアナログのサブタイプ選択性を系統的に調べた研究はほとんどなく、きわめてユニークなものと言える。

(4) 今後の課題・展望

本研究で克蘭ベシンカルボン酸が、強力

な Na⁺チャネル阻害活性剤であることを初めて見いだしたが、これは構造が簡単なため合成的展開が容易である。今後、多様なアナログ合成とパッチクランプ法による詳細な活性評価が必要だが、これを基盤とした新たな Na⁺チャネル阻害剤が開発されることが期待される。

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 52 件)

1. *Konoki, K., Suga, Y., Fuwa, H., Yotsu-Yamashita, M., *Sasaki, M. Evaluation of gambierol and its analogs for their inhibition of human K_v1.2 and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25, 514-518 (2015). (doi:10.1016/j.bmcl.2014.12.022)
2. Kimura, R., Sawayama, Y., Nakazaki, A., Miyamoto, K., Uchiyama, M., *Nishikawa, T. Unexpected Metal-Free Transformation of gem-Dibromomethylenes to Ketones under Acetylation Conditions. *Chem. Asian J.*, 10, 1035-1041 (2015) (doi: 10.1002/asia.201403277)
3. Nakazaki, A., Nakane, Y., Ishikawa, Y., *Nishikawa, T. Synthesis of 1,5-dioxaspiro [3.4] octane through bromocation-induced cascade cyclization. *Heterocycles*, 91, 1157-1163 (2015). (doi:10.3987/COM-15-13208)
4. Adachi, M., Torii, M., *Nishikawa, T. Stereocontrolled Synthesis of ABC-Tricycle of Solanoclepin A. *Synlett*, 965-969 (2015). (doi:10.1055/s-0034-1380399)
5. *Nicolaou, K. C., Heretsch, P., Nakamura, T., Rudo, A., Murata, M., Konoki, K. Synthesis and biological evaluation of QRSTUVWXYZA' domains of maitotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 16444-16451 (2014). (doi: 10.1021/ja509829e)
6. Kudo, Y., Finn, J., Fukushima, K., Sakugawa, S., Cho, Y., Konoki, K., *Yotsu-Yamashita, M. Isolation of 6-deoxytetrodotoxin from the pufferfish, takifugu pardalis, and a comparison of the effects of the C-6 and C-11 hydroxy groups of tetrodotoxin on its activity. *J. Nat. Prod.* 77, 1000-1004 (2014). (doi: 10.1021/np401097n)
7. Kudo, Y., Yamashita, Y., Mebs, D., Cho, Y., Konoki, K., Yasumoto, T., *Yotsu-Yamashita, M. C5-C10 Directly bonded tetrodotoxin analogues: Possible biosynthetic precursors of tetrodotoxin from newts. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 14546-14549 (2014). (doi: 10.1002/anie.201408913)
8. Adachi, M., Hashimoto, H., Sakakibara, R., Imazu, T., *Nishikawa, T. A New Deprotection Procedure of MTM Ether. *Synlett*, 2498-2502 (2014). (doi: 10.1055/s-0034-1379027)
9. Adachi, M., Imazu, T., Sakakibara, R., Satake, Y., Isobe, M., *Nishikawa, T. Total Synthesis of Chiriquitoxin, an Analogue of Tetrodotoxin Isolated from the Skin of a Dart Frog. *Chem. Eur. J.*, 20, 1247-1251 (2014). (doi: 10.1002/chem.201304110)
10. Nakazaki, A., Ishikawa, Y., Sawayama, Y., Yotsu-Yamashita, M., *Nishikawa, T. Synthesis of crambescic acid, a potent inhibitor of voltage-gated sodium channel. *Org. Biomol. Chem.*, 12, 53-56 (2014). (doi: 10.1039/c3ob42017e)
11. Yamada, H., Adachi, M., *Nishikawa, T. Stereocontrolled Synthesis of the Oxathiabicyclo[3.3.1]nonane Core Structure of Tagetitoxin. *Chem. Commun.*, 49, 11221-11223 (2013). (doi: 10.1039/C3CC46949B)
12. *Yotsu-Yamashita, M., Abe, Y., Kudo, Y., Ritson-Williams, R., Paul, V. J., Konoki, K., Cho, Y., Adachi, M., Imazu, T., Nishikawa, T., Isobe, M. First Identification of 5,11-Dideoxytetrodotoxin in Marine Animals, and Characterization of Major Fragment Ions of Tetrodotoxin and Its Analogs by High Resolution ESI-MS/MS. *Mar. Drugs*, 11, 2799-2813 (2013). (doi: 10.3390/md11082799)
13. Yamada, H., Adachi, M., Isobe, M., *Nishikawa, T. Stereocontrolled Total Synthesis of Polygalolide A. *Chem. Asian J.*, 8, 1428-1435 (2013). (doi: 10.1002/asia.201300362)
14. Adachi, M., Imazu, T., Isobe, M., *Nishikawa, T. An Improved Synthesis of (-)-5,11-Dideoxytetrodotoxin. *J. Org. Chem.*, 78, 1699-1705 (2013). (doi: 10.1021/jo302773f)
15. Kudo, Y., Yasumoto, T., Konoki, K., Cho, Y., *Yotsu-Yamashita, M. Isolation and Structural Determination of the First 8-epi-type Tetrodotoxin Analogs from the Newt, *Cynops ensicauda popei*, and Comparison of Tetrodotoxin Analogs Profiles of This Newt and the Puffer Fish, *Fugu poecilonotus*. *Mar. Drugs*, 10, 655-667 (2012). (doi:10.3390/md10030655)
16. Adachi, M., Higuchi, K., Thasana, N., Yamada, H., *Nishikawa, T. Stereocontrolled Synthesis of an Indole Moiety of Suspendole and Stereochemical Assignment of the Side Chain. *Org. Lett.*, 14, 114-117 (2012). (doi: 10.1021/ol202895u)
17. Sawayama, Y., *Nishikawa, T. A Synthetic

- Route to the Saxitoxin Skeleton: Synthesis of Decarbamoyl -Saxitoxinol, an Analogue of Saxitoxin Produced by the Cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 7176-7178 (2011). (doi: 10.1002/anie.201102494)
18. Adachi, M., Yamada, H., Isobe, M., *Nishikawa, T. Total Synthesis of Polygalolide A. *Org. Lett.*, 13, 6532-6535 (2011). (doi: 10.1021/ol2028256)
19. Sawayama, Y., *Nishikawa, T. Bromocyclization of Alkynyl Guanidine: A New Approach to the Synthesis of Cyclic Guanidines of Saxitoxin. *Synlett*, 651-654 (2011). (DOI: 10.1055/s-0030-1259546)
20. Sugino, K., Nakazaki, A., Isobe, M., *Nishikawa, T. Synthetic Study on Suspendole, an Indole Sesquiterpene Alkaloid: Stereocontrolled Synthesis of the Sesquiterpene Segment Bearing All Requisite Stereogenic Centers. *Synlett*, 647-650 (2011) (doi: 10.1055/s-0030-1259551)
21. *Nishikawa, T., Urabe, D., Adachi, M., Isobe, M. Multifunctionality of the *N*-Trichloroacetyl Group Developed in the Synthesis of Tetrodotoxin, a Puffer Fish Toxin. *Synlett*, 26, 1930-1939 (2015). (doi: 10.1055/s-0034-1380781).
22. *Nishikawa, T., Isobe, M. Synthesis of Tetrodotoxin, a Classic but Still Fascinating Natural Product. *Chem. Rec.*, 13, 286-302 (2013). (doi: 10.1002/tcr.201200025)

〔学会発表〕(計 151 件)

1. 西川俊夫: 含窒素生理活性天然物の合成イオンチャンネルを阻害する天然毒素とその類縁体の化学合成。新規素材探索研究会第 10 回セミナー (横浜) 2011.6.10.
2. 西川俊夫: テトロドトキシン類の化学合成とフグ毒の謎。『That's 応用生命科学』有機化学、分子生物学、食品科学の最新研究から見る応用生命科学のいま。日本農芸化学会中部支部第 161 回例会 (岐阜) 2011.6.18.
3. Masaatsu Adachi. Total Synthesis of Polygalolide A, Isolated from a Medicinal Plant. The 1st Nagoya Symposium on Green Synthesis & Catalysis (Nagoya, Japan). 2012.3.13.
4. 西川俊夫: イオンチャンネル阻害剤の創製を目指した海産天然毒の化学合成。シンポジウム 4SY09「天然物ケミカルバイオロジー」日本農芸化学会 2012 年度大会(京都)2012.3.25.
5. Toshio Nishikawa: Synthesis of Guanidine-Containing Natural Products. International Symposium on Natural Products

Chemistry and Chemical Biology 2012 (Hangzhou, China) 2012.11.23-2012.11.26.

6. Toshio Nishikawa, Masaatsu Adachi, Ryo Sakakibara, Shouta Tokoro, Takuya Imazu, Yoshiki Satake, Minoru Isobe : Synthetic Studies on Nitrogen-Containing Natural Products. Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (Bangsaen Beach, Thailand) 2013.1.23-2013.1.25.

7. 西川俊夫: 多環多官能性天然物の合成戦略。日本薬学会シンポジウム「新しい分子構築戦略—効率的な生物活性分子の合成に向けて—」日本薬学会第 133 年会 (横浜) 2013.3.28.

8. 西川俊夫: テトロドトキシンの全合成研究—フグ毒の謎を追って—。理研シンポジウム 未来に繋ぐ天然物合成化学 (大阪) 2013.5.31.

9. 安立昌篤: 多環式天然物の合成研究。天然物化学研究会「天然物化学の潮流を読む」(東京) 2013.10.18.

10. 西川俊夫: グアニジン天然物の合成研究。神戸薬科大学特別研究セミナー (神戸) 2014.3.12.

11. Toshio Nishikawa : Syntheses of Guanidine-Containing Natural products by Means of Cascade Bromocyclization. The International Startup Symposium of Cutting-Edge Organic Chemistry In Asia (III) (Hsinchu, Taiwan) 2014.4.19-2014.4.21.

12. 西川俊夫: 含グアニジン天然物の全合成研究—新規イオンチャンネル阻害剤の開発を目指して—。第 25 回記念万有仙台シンポジウム (仙台) 2014.6.14.

13. 西川俊夫: 含グアニジン天然物の全合成研究。平成 26 年度日本農芸化学会関西支部 京都府立大学 生命分子化学科・鴨叡会セミナー 有機化学・天然物化学セミナー (京都) 2014.9.25.

14. Toshio Nishikawa: Synthesis of Guanidine-containing Natural Products by Means of Cascade Bromocyclization. The international Symposium on Natural Products Chemistry and Chemical Biology 2014 (Hangzhou, China) 2014.11.22-2014.11.25.

15. Masaatsu Adachi: Total Synthesis of Chiriquitoxin, an Analogue of Tetrodotoxin Isolated from the Skin of a Dart Frog. 日本化学会第 95 春季年会: 日本化学会アジア国際シンポジウム (船橋) 2015.3.27.

16. Toshio Nishikawa : Biomimetic Synthesis of

Biologically Active Steroidal Natural Products. Kick-off Symposium on Advanced Research Network for Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (Tohoku University, Japan) 2015.8.25-2015.8.26.

17. Toshio Nishikawa: Syntheses of Biologically Active natural products by Means of Cascade Reactions. The 6th Japanese-Sino Symposium on Organic Chemistry for Young Scientists (Sendai, Japan) 2015.9.6-2015.9.9.

18. Toshio Nishikawa: Syntheses of Guanidine-containing Natural Products Aiming at development of Ion-channel Blockers. 10th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS2015) (JEJU, KOREA) 2015.10.18-2015.10.21.

19. Toshio Nishikawa, Yoshiki Nakane, Atsuo Nakazaki, Takuya Imazu, Shouta Tokoro, Ryo Sakakibara, Masaatsu Adachi, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita: Synthesis of biologically active steroid-derived compounds from an edible mushroom. Pacificchem 2015, (Honolulu, Hawaii, USA) 2015.12.15-2015.12.20.

〔図書〕(計8件)

1. *西川俊夫: カスケード型環化反応による天然物合成の効率化。特集 天然物の全合成、全合成の最先端研究 I、化学, 71, pp 40-43 (2016).
2. *西川俊夫: 官能基の保護。第2版有機合成ハンドブック。丸善出版株式会社, 315-319 (2015).
3. 大藪紀雄, *西川俊夫: Claisen 転位 (1) 「天然物合成で活躍した反応 実験のコツとポイント」 有機合成化学協会編、pp102-103. 化学同人 (2011)

〔その他〕

アウトリーチ活動:

1. 西川俊夫: 身の回りの化学物質を科学する。県立西尾高校特別講義 (西尾) 2013.8.2.
2. 西川俊夫: BS フジ、ガリレオ X 「毒と薬毒がささやく生命の謎」放送 2013.02.24, 9:30-10:00.
3. 西川俊夫: 模擬授業「分子のものづくりを目指して—天然物化学と有機合成—」愛知県立安城高等学校 2012.10.7.

ホームページ

研究室 HP : <http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~organic/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西川俊夫 (Nishikawa Toshio)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 90208158

(2)研究分担者

此木敬一 (Konoki Kei-ichi)

東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 40292825

(3)研究分担者

安立昌篤 (Adachi Masaatsu)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 80432251