

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310146

研究課題名(和文)シガトキシン同族体の網羅的合成とその基礎・応用研究

研究課題名(英文)TOTAL SYNTHESSES AND BASIC RESEARCHES OF CIGUATOXIN CONGENERS, AND THEIR APPLICATIONS

研究代表者

平間 正博(HIRAMA, MASAHIRO)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：10142077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：シガトキシン(CTX)は、海産物による世界最大の食中毒シガテラの原因物質である。太平洋海域において発生する中毒の重要な毒成分であるとされている54-deoxyCTX1Bの化学合成に、我々が開発した統一かつ収束的全合成法を用いて成功した。また、以前化学合成した、更に重要な成分であるCTX1Bを最精製し、¹³C-核磁気共鳴スペクトルの完全帰属を達成した。今後のシガテラ中毒原因毒の分析同定に寄与する成果である。

また、合成中間体を利用して作成した抗体を用いる免疫学的検定法(ELISA)を改良して、感度を0.1 pg/mLまで向上させた。中毒の予防に貢献する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Ciguatera poisoning is an important medical issue in the tropical and subtropical Pacific and Indian Ocean regions and in the tropical Caribbean. Ciguatoxins, the principal causative agents of ciguatera, are produced by an epiphytic dinoflagellate and transferred to fish through the aquatic food chain. We succeeded in total syntheses of important congeners of ciguatoxins (CTXs), and in this project have successfully synthesized 54-deoxyCTX1B through our unified convergent strategy. Moreover, synthetic CTX1B was purified and its ¹³C-NMR spectrum has been completely assigned. These accomplishments will contribute to the analysis and identification of the causative CTX congeners in ciguatera poisoning in the world.

Direct sandwich ELISA using anti-CTX monoclonal antibodies prepared by synthetic haptens has been significantly improved to the detection limit of 0.1 pg/mL. This ELISA detection will contribute to the prevention of ciguatera poisoning.

研究分野：複合新領域

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：シガトキシン 抗体 イムノアッセイ シガテラ 中毒予防 化学合成 全合成

1. 研究開始当初の背景

珊瑚礁周辺の魚介類によって引き起こされるシガテラ中毒は、世界最大規模の自然毒食中毒であり、年間5万人以上の中毒者が発生している。その原因毒シガトキシン類は、天然からは極微量しか得られず、30~34個の不斉炭素を持ち、しかも不飽和8,9員環エーテルを中心に13個のエーテル環が梯子状に連なった3ナノメートルの分子長を有する巨大分子である。本研究の第一目的は、下記のとおり実践的全合成法開発、抗体作製、毒魚検定イムノアッセイ法開発であり、天然物化学・生物有機科学・生物学・神経生理学分野の原理に関する基礎研究として挑戦的で画期的であるばかりではなく、人々の健康や魚類資源の有効利用の社会的要請にも応えるものである。

シガトキシン類の全合成・抗体研究は世界的に試みられているが、実用的全合成に成功しているのは平間グループのみであり、抗体関連研究も平間と研究協力者の藤井グループが世界で先導的な業績を上げている。申請者の平間は、2001年に代表的シガトキシンであるCTX3Cの全合成を完成した(*Science* **2001**, *294*, 1904)。この研究は、*Science* 誌の「Perspective」欄で“The Art of Total Synthesis”として紹介された。私達の合成計画の長所は、シガトキシン類が共通のFG環部を有すること、このFG環部の左右両フラグメントが少しずつ異なった構造を有することに注目して、左右のフラグメントを、FG二環を構築しながら収束的に連結(二環構築型ポリエーテル連結法)している点である。これによって、私達の合成法は、シガトキシン類に普遍的に応用でき、当該連結法に関してもその後、様々な合成工程の改良と短縮を実現して、クロロスルフィド/銀トリプレートを用いた第二世代連結・CTX3C全合成を開発した(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12013)。2005年には最も毒性の強い51-hydroxyCTX3Cを、そして2006年には肉食魚に多く含まれるCTX(CTX1B)の収束的全合成を相次いで達成した(*J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9352)。この論文は、*Nature*(**2006**, *442*, 226) 誌のHighlight欄で大きく取り上げられ、私達の二環構築型ポリエーテル連結法を基盤とする合成法が、シガトキシン類の実践的全合成法であることを証明できた。ごく最近、他グループによるシガトキシンの全合成が1例報告されたが、シガテラ中毒の発症には一度に数種のシガトキシンが関与していることが明らかにされつつあり、シガテラ予防・治療のためには網羅的な全合成が必要不可欠である。極微量のシガトキシン全合成を研究のゴールとしているグループが多い中、これまで学術的にも社会的要請に応える形でも有機的な共同研究を展開してきた我々のグループのみが、中毒地域拡大を続け、しかも、いまだに治療法のないシガテラ中毒問題に対して、効果的な対策の基礎を築ける

と考えている。

2. 研究の目的

合成工程の改良を進め、CTX1Bのミリグラム単位の合成を達成にする一方、沖縄に多いことが分かって来た54-deoxyCTX1Bほか、近年単離された太平洋産シガトキシンより構造が大きく複雑なカリブ海産シガトキシン類(C-CTX-1, C-CTX-2)の全合成を達成し、全シガトキシン類の検出に向けたハプテン合成、抗体調製を行う。本研究課題で克服すべき課題は以下の通りである。

(1) シガトキシン類の第三世代網羅的全合成
化学合成の標的として、今だ極めて挑戦的な構造を有するシガトキシン類の普遍的全合成法を確立する。ごく最近我々は、3種類のラジカル反応を鍵工程とする新規二環構築型ポリエーテル合成法を開発した。これらはいずれも中性条件下温和な反応温度でエーテル環が形成できる効果的な方法である。本研究では、いまだミリグラム単位の供給が実現できていない、太平洋産毒魚に最も含まれるCTX1Bおよび54-deoxyCTX1B、並びにカリブ海産シガトキシン(C-CTX)の全合成を中心に、真に実用的な第三世代全合成法を確立する。近年、シガテラ食中毒が世界各地の温帯地域で発生するようになり、世界中の研究者から毒素判定のためのシガトキシン標準サンプルの提供を求められている。今後ますます増えると予想されるこれらの要請に恒常的に応えることは非常に重要であり、シガトキシン同族体の実践的全合成法の確立は急務である。

(2) 抗体作製・毒魚検定イムノアッセイ法開発

既に我々は、毒自身を使わずに、無毒の5環性以上の合成フラグメントを抗原用ハプテンとして用いて、標的毒を認識できるモノクローナル抗体を作製する方法の開発に成功した(*J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7608; *Toxicon* **2006**, *48*, 287)。この方法で、CTX3Cと51-hydroxyCTX3Cに対する特異的モノクローナル抗体3種を調整して、10~100 pg/mL程度の感度で検出可能な発光および吸光サンドイッチイムノアッセイ(ELISA)法を開発した。更に、食中毒予防への迅速・簡易キット化への実用化を検討中である。未調整の抗体は、CTX1Bの左部分を認識する抗体と、カリブ海産C-CTXの右側を認識する抗体であった。前者については、従来成功していた合成ハプテン-タンパク質抗原を用いたマウス免疫法や、ファージディスプレイ法を用いた抗体作製では親和性の高い抗体の作製が困難であった。これはCTX1B左側特有のジヒドロキシブテニル側鎖の影響であると考えられたが、ごく最近、この問題を克服する抗原調製法を確立でき、ついにCTX1Bの左側を認識する抗体の作製に成功した。本研究では、

この方法を C-CTX の抗体作製へ発展させ、確実に毒素を識別できる検定法を実用化する。即ち、既存の抗体のシガトキシン検出能をより高感度化するため、ALP などの様々な発色法を検討し、最適条件を明らかにする。また、調製した抗体を用いてシガテラ中毒マウスの毒性中和実験を検討し、ヒト型抗体への発展を含めた抗体の治療薬としての新しい機能を開発する。また最近、LC/MS/MS など分析機器の進歩により、毒魚内のシガトキシン同族体の解析が可能になり、今まで重要視されていなかった 54-deoxyCTX1B や 2,3-dihydroxyCTX3C など相当量入っていることが明らかになった。CTX1B 以外にも含有量の多いものから優先的に全合成・抗体作製を完成させ、シガテラ対策に貢献する。

3. 研究の方法

研究目的を達成するため、次の手順で研究を展開する。

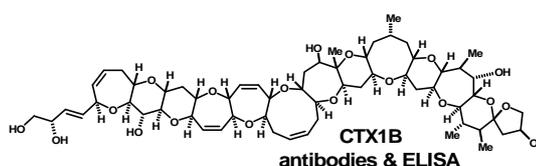
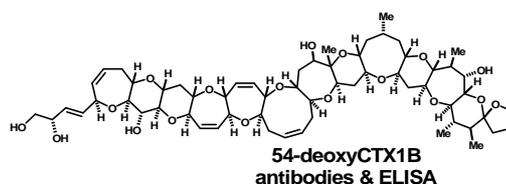
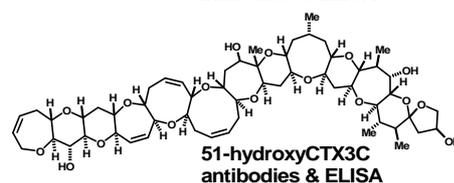
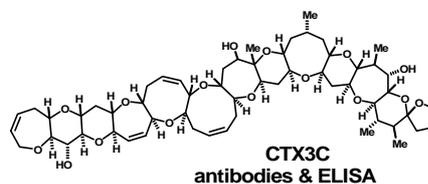
(1) まず、シガトキシン類の網羅的合成に向けて、第三世代の改良全合成法を完成させる。3 種類のラジカル反応を基盤とする二環構築型ポリエテル連結法を駆使して、特にシガトキシン CTX1B、54-deoxyCTX1B とカリブ海産シガトキシン C-CTX の数ミリグラム単位での標準サンプル供給を実現させる。

(2) 次に、最近開発した新抗原調製法を発展させ、未調製だった抗 C-CTX 抗体を始めとする全シガトキシン検出にむけた抗体作製・イムノアッセイ法を確立する。その後、高感度検出化および簡易検出キット化・シガテラ中毒マウスの毒性中和試験・ヒト化抗体作製を含めた抗体の治療薬としての新しい機能を開発し、いまだに治療法のないシガテラ中毒に対して貢献したいと考えている。

シガトキシン同族体合成はまだまだ挑戦的課題であり、新しい合成法の開発が必要であるが、これらは連携研究者の山下と実施する。抗体作製を始めとするシガテラ中毒対策は大阪府立大の連携研究者、藤井・円谷と共同で遂行する。

4. 研究成果

(1) CTX1B の全合成については、新規に開発した (Z)-ピニルスルホキシドへのラジカル付加反応を活用して、左側セグメントを 228 ミリグラム合成することに成功した。実践的な第三世代 CTX1B 全合成法を確立するため、この左側セグメントと右側セグメントとのカップリングを検討した。しかし、右側セグメント・フェニルスルフィドのクロル化が効率よく進行せず、カップリング収率が低迷した。生成した副生成物から、微量の水（湿気）が原因と考えられたので、モデル実験も含めて、さまざまに試薬の精製、フラスコ内雰囲気や化合



物の乾燥等を検討した。しかし、十分に改善されなかった。しかし、反応条件を変えて少量ずつ実験を繰り返した結果、最高26%の収率でカップリング生成物が得られた。さらに合成を進め、0.145mgのCTX1Bが全合成できた。以前全合成した試料と合わせて、¹H-NMRはもちろん、¹³C-NMRも世界で初めて測定することに成功した。

(2) 更に、太平洋海域で起こる中毒の重要な原因毒の一つである54-deoxyCTX1Bを約0.1ミリグラム全合成することに成功した。¹H-NMRの完全帰属も達成した。

以上合成したCTX1Bと54-deoxyCTX1Bは、世界中のシガテラ中毒の原因分析に役立つ貴重な標準試料となる。

(3) A環側鎖がジエンのCTX4Bの全合成と抗体調製を目指して、CTX1B左側セグメント側鎖の還元的オレフィン化を検討し、見事に成功した。それをハプテンとするタンパク質コンジュゲートの作成を検討中である。

(4) C-CTX全合成最大の課題であった核間ジメチル基を持ったM環の合成は大変困難であったが、光反応を利用することによって十分量の供給が可能になった。しかし、左右両側セグメントの合成は完成しなかった。

(5) また、合成中間体を利用して作成した抗体を用いる免疫学的検定法(ELISA)を、酵素としてALPを用いて改良し、重要なシガトキシン類、CTX3Cを始め、51-hydroxyCTX3C、CTX1B

、54-deoxyCTX1B等の検出感度を0.1 pg/mLまで向上させた。更にALP-蛍光法へと改良して、0.01 pg/mLの高感度でCTX類を検出することに成功した。

中毒の予防に貢献する重要な成果である。

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 13件)

円谷 健、藤井郁雄、平間正博、Preparation of Anti-Ciguatoxin Monoclonal Antibodies Using Synthetic Haptens: Sandwich ELISA Detection of Ciguatoxins、Journal of AOAC International、査読有、97巻、2014年、373-379

DOI: 10.5740/jaoacint.SGETsumuraya
吉野達也、山下修治、佐藤 格、林雄二郎、平間正博、Solvent-mediated Tuning of the Regioselectivity of Intramolecular Diaryl Ether Formation: Total Synthesis of (+)-Aspercyclide C、Chem. Lett. 査読有、43巻、2014年、349-351

DOI: 10.1246/cl.131045

山下修治、平間正博、コルチスタチンの全合成、有機合成化学協会誌、査読有、71巻、2013年、768-778

<http://www.ssocj.jp/>

Le Zhao、塚野千尋、Eunsang Kwon、竹本佳司、平間正博、Total Syntheses of Complandines A and B、Angew. Chem. Int. Ed.、査読有、52巻、2013年、1722-1725
DOI: 10.1002/anie.201208297

山下修治、氷室真史、林雄二郎、平間正博、Remote C-H Bond Functionalization of Androstane C-Ring: C12-Amination、Tetrahedron Lett. 査読有、54巻、2013年、1307-1308

DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.12.103

山下修治、須田直樹、林雄二郎、平間正博、Stereoselective Synthesis of Zoanthenol ABC-ring by Radical Strategy、Tetrahedron Lett. 査読有、54巻、2013年、1389-1391

DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.12.104

山下修治、成子朗人、林雄二郎、平間正博、Concise Synthesis of the Tetracyclic Framework of Azadiradione: Tandem Radical Cyclization Route、Chem. Lett. 査読有、42巻、2013年、220-221

DOI: 0.1246/cl.2013.220

原田修治、林 大輔、佐藤 格、平間正博、Copper (II) Catalyzed O-Arylation of Tertiary Alcohols with Arylbismuth (III) Reagents: A Convenient System for Aryl Transfer、Synlett、査読有、23巻、

2012年、405-408

DOI: 10.1055/s-0031-1290205

上田克明、佐藤 格、平間正博、The First Total Synthesis of Gravicyclole、Chem. Lett. 査読有、41巻、2012年、87-89

DOI: 10.1246/cl.2012.87

円谷 健、竹内勝俊、山下修治、平間正博、藤井郁雄、Development of Monoclonal Antibody Against the Left Wing of Ciguatoxin CTX1B: Thiol Strategy and Sandwich ELISA Detection、Toxicon、査読有、60巻、2012年、348-357

DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.04.347

吉野達也、佐藤 格、平間正博、Total Synthesis of Aspercyclides A and B via Intramolecular Oxidative Diaryl Ether Formation、Org. Lett. 査読有、14巻、2012年、4290-4292

DOI: 10.1021/ol3019727

與儀 健太郎、大城直雅、稲福康夫、平間正博、安元 健、Detailed LC-MS/MS Analysis of Ciguatoxins Revealing Distinct Regional and Species Characteristics in Fish and Causative Alga from the Pacific、Anal. Chem. 査読有、83巻、2011年、8886-8891

DOI: 10.1021/ac200799j

山下修治、上松亮平、平間正博、Stereoselective Synthesis of the Left Wing of Caribbean Ciguatoxin、Tetrahedron、査読有、67巻、2011年、6616-6626

DOI: 10.1016/j.tet.2011.05.080

[学会発表](計 34件)

平間正博、世界最大の海産物中毒と化学のインターフェイス、日本農芸化学会2013年度大会、2013年3月27日、仙台
平間正博、世界最大の海産物中毒と化学のインターフェイス、大阪府立大学有機化学研究会白鷹セミナー、2011年12月13日、堺

平間正博、天然物合成はシガテラを克服できるか、有機合成化学協会講習会、2011年11月17日、東京

平間正博、世界最大の海産物中毒と化学のインターフェイス、東京大学大学院薬学系研究がOrganic Syntheses講演会、2011年10月11日、東京

平間正博、シガテラ中毒への化学の挑戦：最近の進歩、理研シンポジウム第6回有機合成化学のフロンティア、2011年7月1日、和光

[図書](計 1件)

山下修治、平間正博、化学同人、「天然物合成で活躍した反応 実験のコツとポイント」、Ni 触媒を用いたクロスカップリング& Ireland-Claisen 転位、有機合成化学協会編、2011、46-47 & 108-109 ペ

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平間 正博 (MASAHIRO, HIRAMA)
東北大学・大学院理学研究科・名誉教授
研究者番号：10142077

(2) 連携研究者

藤井 郁雄 (IKUO, FUJII)
大阪府立大学・大学院理学系研究院・教授
研究者番号：70189984

円谷 健 (TAKESHI, TSUMURAYA)
大阪府立大学・大学院理学系研究院・准教授
研究者番号：00372855

山下 修治 (SHUJI, YAMASHITA)
東北大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：50419991