

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24245009

研究課題名(和文) 生物活性発現機構解明を目的としたマイトトキシンの合成研究

研究課題名(英文) Synthetic Studies of Maitotoxin to Elucidate Mode-of-Action

研究代表者

大石 徹(Oishi, Tohru)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90241520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイトトキシシン(MTX)は、渦鞭毛藻が生産する梯子状ポリエーテル化合物である。本研究では、化学合成したMTXの部分構造を用いた構造活性相関研究を行った。MTXによるCa²⁺流入活性をどれだけ阻害したか評価した結果、疎水性部分であるC'-F'環部、QRS環部は、それぞれIC₅₀値約50マイクロMで阻害活性を示した。また、七員環であるS環部を六員環に変えたQR(S)環部の約6倍低下した。一方、疎水性部分と親水性部分を併せ持つNOPQR(S)環部は、阻害活性を示さなかった。また、疎水性部分であるLMNO環部については、親水性部分に比べて阻害活性が大きく低下し、エナンチオマー間で有意な差はなかった。

研究成果の概要(英文)：Maitotoxin (MTX) is a marine toxin produced by the dinoflagellate. The structure-activity relationship of MTX was studied by using synthetic partial structures of MTX. MTX induced Ca²⁺ influx activity was inhibited by the hydrophobic part corresponding to the C'-F' and QRS ring, and the IC₅₀ values were estimated to be ca.50 microM, respectively. The inhibitory activity of the QR(S) ring in which the seven-membered S-ring was substituted with six-membered ring, was reduced in ca. six times. However, the NOPQR(S) ring possessing both hydrophobic and hydrophilic moiety was not active. The inhibitory activity of the LMNO ring corresponding to the hydrophilic moiety was less active than that of the hydrophobic part, and there was no significant difference between the enantiomers.

研究分野：有機合成化学

キーワード：マイトトキシシン 梯子状ポリエーテル 化学合成 カルシウムイオン流入活性 部分構造

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* が生産する梯子状ポリエーテル化合物であるマイトトキシシン(MTX, **1**)は、年間5万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り、二次代謝産物の中では最強の毒性(マウス腹腔内投与 $LD_{50} = 50 \text{ ng/kg}$)を有する。MTXは、32個のエーテル環と98個の不斉中心を有する分子量3422の巨大分子であり、極性官能基であるヒドロキシ基や硫酸エステルが多く存在する親水性部分(下半分)と、それ以外の疎水性部分(上半分)の大きく2つの部分に分けられる。MTXは強い溶血活性を示し、極微量で細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こすため³⁾、生理学的研究用試薬として広く用いられてきた。食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であるが、発見以来30年以上経過した現在でも未解明のままである。作用標的分子に関しても、 Ca^{2+} の流入を引き起こすことから、 Ca^{2+} チャネルなどの膜タンパク質であると推測されているに過ぎない。MTXに関する生物有機化学的な研究が立ち遅れている理由として、1)天然から得られるサンプルが極微量であること、2)巨大な分子であるために非特異的吸着が強く、標的タンパク質を特定できていないこと、が挙げられる。本申請者は、これまで化学合成したMTXの部分構造を用いた構造活性相関研究を行っており、MTXの疎水性部分を有する人工分子としてW-C'環部を設計・合成し、生物活性を評価した結果、MTXによって引き起こされる Ca^{2+} の流入活性を濃度依存的に阻害することを明らかにした($IC_{50} = 59 \mu\text{M}$)。

この結果は、以下の様に解釈される。すなわち、MTXが作用標的膜タンパク質と結合する場合、疎水性部分が膜に挿入し、膜貫通 α -ヘリックスと相互作用すると想定されるが、MTXの疎水性部を有する人工分子を添加したことによって競合的な結合が起こり、生物活性が阻害されたと考えられる。

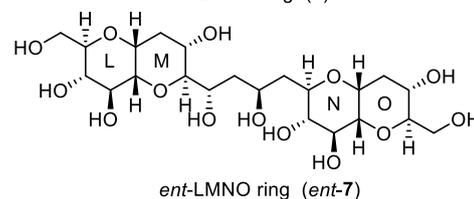
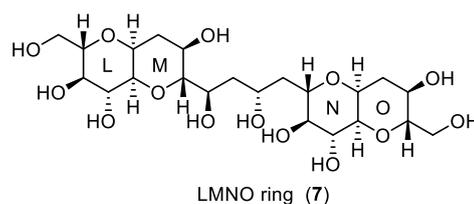
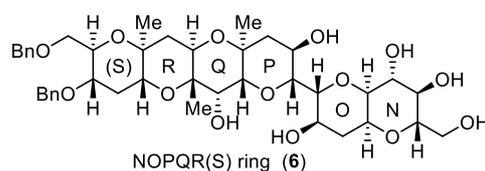
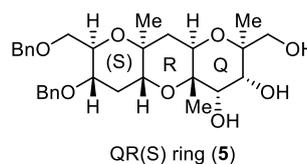
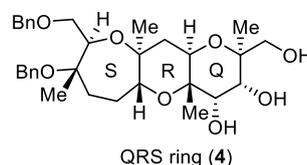
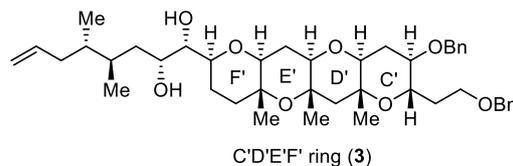
2. 研究の目的

本研究では、さらなる構造活性相関研究を目的として、MTXの部分構造を合成し、その生物活性を評価することにした。

3. 研究の方法

疎水性部分の中央部に相当するW-C'環部(**2**)の合成と生物活性の評価は既に完了しているので、まず、1)疎水性部分の両末端に相当するC'-F'環部(**3**)、およびにQRS環部(**4**)を設計した。また、エーテル環の大きさの影響を調べるため、S環部が六員環

であるQR(S)環部(**5**)も合成することにした。MTXの構造的長として、疎水性部分と親水性部分の両方が存在することが上げられる。そこで、2)疎水性部分と親水性部分を併せ持つNOPQR(S)環部(**6**)を設計した。さらに、3)親水性部分が生物活性に及ぼす影響を調べるために、親水性部分に相当するLMNO環部(**7**)を設計した。また、その生物活性が、標的タンパク質との特異的な相互作用か、あるいは非特異的な相互作用によるものかを調べるために、対応するエナンチオマー*ent*-LMNO環部(*ent*-**7**)も合成することにした。



4. 研究成果

1) C'D'E'F'環部の合成

E'環部 **8** からヨウ化サマリウムを用いた還元的環化反応によりD'環およびC'環を構築し、C'D'E'環部 **10** を合成した。側鎖部分であるヨードオレフィン **11** との鈴木-宮浦反応によりカップリング成績体 **12** を合成した。さらにPd(II)を用いた触媒的環化

反応により F'環部を立体選択的に構築することに成功した。続いてオレフィン **13** に対する Sharpless 不斉ジヒドロキシ化を経由して C'D'E'F'環部 **3** の合成に成功した。

2) QRS 環部および QR(S)環部の合成

S 環部に相当する Weinreb アミド **14** とフリルリチウム **15** とのカップリング反応を行い、得られたケトンに対して野依不斉水素移動反応によりフルフリルアルコール **16** を立体選択的に得た。Achmatowicz 反応、続くメチルアセタール化によってエノン **17** へと変換した後、ルイス酸存在下、ジメチル亜鉛を作用させると、ケトン存在下にメチルアセタールのみが反応し、立体選択的にメチル基を導入できることを見出した。さらに **18** をメチルアセタールに変換したのち、メチル化を行うことで R 環を構築した。オレフィン **19** に対し四酸化オスmium酸化を行うと立体選択的にジヒドロキシ化が進行し、三環性化合物 **20** を単一の生成物として得ることに成功した。さらに S 環部の環拡大反応により七員環エーテル QRS 環部(**4**)へと変換することに成功した。また、三環性化合物 **20** から QR(S)環部(**5**)も合成した。

3) NOPQR(S)環部の合成

フリルケトン **21** から野依不斉水素移動反応および Achmatowicz 反応を経由してピラノン **22** を合成した。アルデヒド **23** へと変換した後、野崎-檜山-岸反応によりビニルスルホキシド **24** へと誘導した。さらに TBAF を作用させると TBS 基の除去および分子内オキサ Michael 反応が連続して起こりスルホン **25** を与え、Pummerer 転位により LM 環部 **26** へと誘導した。また、化合物 **20** をアルキン **27** へと変換した後、アルデヒド **26** とのカップリング、続く酸化によりイノン **29** へと誘導した。1,4-還元によりケトン **30** を得た後、ヘミアセタールの脱水を経由して誘導したジヒドロピランに対してヒドロホウ素化を行い、NAP 基を除去することによって NOPQR(S)環部 **6** の合成に成功した。

4) LMNO 環部および ent-LMNO 環部の合成

アルデヒド **26** とメチルケトン **32** とのアルドール反応、続く 1,3-アンチ選択的な還元反応を経由して LMNO 環部 **7** を合成した。同様の手法を用いてアルデヒド *ent*-**26** とメチルケトン *ent*-**32** とから LMNO 環部のエナンチオマー *ent*-**81** を合成した⁷⁾。

5) 生物活性評価

合成した化合物、C'-F'環部(**3**)、QRS 環部(**4**)、QR(S)環部(**5**)、NOPQR(S)環部(**6**)、LMNO 環部(**7**)、および *ent*-LMNO 環部

(*ent*-**7**)について生物活性を評価した。すなわち、MTX によって引き起こされる細胞内への Ca²⁺流入活性をどれだけ阻害したか、IC₅₀ 値を測定した。疎水性部分に対応する C'-F'環部(**3**)、QRS 環部(**4**)は、それぞれ IC₅₀ = 59 μM, 44 μM で阻害活性を示すことが明らかとなった。また、七員環である S 環部を六員環に変えた QR(S)環部(**5**)の IC₅₀ 値は 240 μM に低下することが分かった。一方、疎水性部分と親水性部分を併せ持つ NOPQR(S)環部(**6**)は、阻害活性を示さないという興味深い結果が得られた。また、疎水性部分である LMNO 環部(**7**)、および *ent*-LMNO 環部(*ent*-**7**)については、親水性部分に比べて阻害活性が弱く、また、エナンチオマー間で有意な差は観測されなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Tuned Classical Thermal Aromatization Furnishing an Estrogenic Benzoacridine. Rintaro Koga, Tohru Oishi, Kohei Torikai *Synlett* **2015**, 26, 2801–2805.
2. 2-Naphthylmethoxymethyl as a Mildly Introducible and Oxidatively Removable Benzyloxymethyl-Type Protecting Group. Takuya Sato, Tohru Oishi, Kohei Torikai *Org. Lett.* **2015**, 17, 3110–3113.
3. Stereoselective Synthesis of the C1-C29 Part of Amphidinol 3. Takeshi Tsuruda, Makoto Ebine, Aya Umeda, Tohru Oishi *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 859–871.
4. Axial Hydrogen at C7 Position and Bumpy Tetracyclic Core Markedly Reduce Sterol's Affinity to Amphotericin B in Membrane. Yasuo Nakagawa, Yuichi Umegawa, Kenichi Nonomura, Naohiro Matsushita, Tetsuro Takano, Hiroshi Tsuchikawa, Shinya Hanashima, Tohru Oishi, Nobuaki Matsumori, Murata, Michio *Biochemistry* **2015**, 54, 303–312.
5. Synthesis and Biological Activity of the QRS Ring System of Maitotoxin. Hisaaki Onoue, Tomomi Baba, Keiichi Konoki, Kohei Torikai, Makoto Ebine, Tohru Oishi *Chem. Lett.* **2014**, 43, 1904–1906.
6. Synthesis and Biological Activity of the C'D'E'F' Ring System of Maitotoxin. Masahiro Kunitake, Takahiro Oshima, Makoto Ebine, Kohei Torikai, Keiichi Konoki, Michio Murata, Tohru Oishi *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 4948–4962.
7. Guest responsivity of a two-dimensional coordination polymer incorporating a cholesterol-based co-ligand. Kazuki Kajitani, Tomomi Koshiyama, Akihiro Hori, Ryo Ohtani, Akio Mishima, Kohei Torikai, Makoto Ebine, Tohru Oishi, Masaki Takata, Susumu Kitagawa, Masaaki Ohba *Dalton Trans.*

2013, 42, 15893–15897.

8. Synthesis and Structure Revision of the C43–C67 Part of Amphidinol 3. Makoto Ebine, Mitsunori Kanemoto, Yoshiyuki Manabe, Yosuke Konno, Ken Sakai, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, Tohru Oishi *Org. Lett.* **2013**, 15, 2846–2849.

9. A Novel Sperm-Activating and Attracting Factor from the Ascidian *Ascidia sydneiensis*. Nobuaki Matsumori, Yuki Hiradate, Hajime Shibata, Tohru Oishi, Shuichi Shimma, Michisato Toyoda, Fumiaki Hayashi, Manabu Yoshida, Michio Murata, Masaaki Morisawa *Org. Lett.* **2013**, 15, 294–297.

10. Confirmation of the Absolute Configuration at C45 of Amphidinol 3. Yoshiyuki Manabe, Makoto Ebine, Nobuaki Matsumori, Michio Murata, Tohru Oishi *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 2003–2006.

11. Comprehensive Molecular Motion Capture for Sphingomyelin by Site-Specific Deuterium Labeling. Nobuaki Matsumori, Tomokazu Yasuda, Hiroki Okazaki, Takashi Suzuki, Toshiyuki Yamaguchi, Hiroshi Tsuchikawa, Mototsugu Doi, Tohru Oishi, Michio Murata *Biochemistry* **2012**, 51, 8363–8370.

12. Artificial ladder-shaped polyethers that inhibit maitotoxin-induced Ca^{2+} influx in rat glioma C6 cells. Tohru Oishi, Keiichi Konoki, Rie Tamate, Kohei Torikai, Futoshi Hasegawa, Nobuaki Matsumori, Michio Murata *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 3619–3622.

13. NMR-based conformational analysis of sphingomyelin in bicelles. Toshiyuki Yamaguchi, Takashi Suzuki, Tomokazu Yasuda, Tohru Oishi, Nobuaki Matsumori, Michio Murata *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 270–278.

14. Head-to-Tail Interaction between Amphotericin B and Ergosterol Occurs in Hydrated Phospholipid Membrane. Yuichi Umegawa, Yasuo Nakagawa, Kazuaki Tahara, Hiroshi Tsuchikawa, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, Michio Murata *Biochemistry* **2012**, 51, 83–89.

15. Convergent method via α -cyano ethers: a powerful strategy for synthesizing ladder-shaped polyethers. Tohru Oishi *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2012**, 70, 1170–1177.

[学会発表] (計 12 件)

(国際学会)

1. Structure-Activity Relationship Studies of Maitotoxin Based on Chemical Synthesis of Partial Structures. Pacificchem 2015 Molecular Function of Natural Products: Advances towards Chemical Biology (#237), Tohru Oishi, December 16, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.

2. The Eighth International Symposium on Integrated Synthesis (ISIS-8), “Synthesis of

Ladder-shaped Polyethers by Using Microflow Reactors”, Tohru Oishi, November 29, 2013, Todaiji Temple Cultural Center, Nara, Japan.

3. 4 th International Fluorine Workshop, Tokyo "Synthesis of Fluorine Labeled Natural Products for Solid-State NMR Measurements" Tohru Oishi, April 13, 2013, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan.

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

(国内招待講演)

1. 大石 徹, 講演会「機能解明を志向した生物活性分子の設計・合成・評価」茨城大学理学部化学教室, 2015年11月26日

2. 大石 徹, 講演会「機能解明を志向した生物活性分子の設計・合成・評価」北海道大学理学部化学教室, 2015年6月29日

3. 大石 徹, 東北大学理学部有機セミナー (講演会) 「渦鞭毛藻が生産する生物活性天然物の化学合成・構造決定・機能解析」東北大学理学部化学教室, 2014年7月17日

4. 大石 徹, 第 25 回 若手研究者のためのセミナー 「機能解明を志向した生物活性分子の設計・合成・評価」九州大学馬出キャンパス・コラボステーション, 2013年8月24日

5. 大石 徹, 第 24 回 万有仙台シンポジウム 生命現象の理解と制御を目指す有機合成化学「機能解明を志向した生物活性分子の設計・合成・評価」仙台国際センター, 2013年6月29日

6. 大石 徹, 第 49 回化学関連支部合同九州大会 (有機合成化学協会九州山口支部推薦) 「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と合成」北九州国際会議場, 2012年6月30日

(国内学会)

1. 大石 徹, 平成 26 年度 ERATO 村田脂質活性構造プロジェクト研究報告会「膜結合分子アンフィジノール 3 の全合成研究」大阪大学吹田キャンパス内銀杏会館, 2015年3月17日

2. 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 24 年度第 1 回研究成果報告会「空間的反応集積化と多重反応を用いた超効率的天然物合成法の開発」大阪大学, 2012年11月12日

[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・大学院理学研究院・教授
研究者番号：9 0 2 4 1 5 2 0

(2) 研究分担者

此木 敬一 (KONOKI, Keiichi)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：4 0 2 9 2 8 2 5

鳥飼 浩平 (TORIKAI, Kohei)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：2 0 4 5 6 9 9 0

海老根 真琴 (EBINE, Makoto)
九州大学・大学院理学研究院・助教
研究者番号：7 0 5 4 5 5 7 4