

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292057

研究課題名(和文)新規生合成中間体の構造に基づくテトロドトキシンとサキシトキシンの生合成経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of biosynthetic pathways towards tetrodotoxin and saxitoxin based on the structures of novel biosynthetic intermediates

研究代表者

山下 まり (Yamashita, Mari)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50192430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：テトロドトキシン(TTX)を有するイモリより、C10-C5が直接結合したTTX類縁体を発見し、TTXの生合成前駆体は、モノテルペンであると推定した。さらに二環性の微量の新規の環状グアニジン化合物を合計5種を、単離、構造決定し、構造からテトロドトキシン生合成経路を推定した。遺伝子よりサキシトキシン(STX)生合成経路が推定されたが、化学的に中間体の構造を十分に証明されてなかった。本研究では中間体 Int-A', Int-C'2, CyclicC' を化学合成して、LC/MSで有毒藍藻および渦鞭毛藻類中の存在を証明し、ラベル体取り込み実験でSTX群前駆体であることを明らかにし、シャント経路も解明した。

研究成果の概要(英文)：We reported the first C10-C5 directly bonded tetrodotoxin (TTX) analogues from newts, and proposed monoterpene origin of TTX. In this study, five novel bicyclic guanidine compounds related to TTX were isolated and their structures were determined. These structures strongly supported monoterpene origin of TTX.

Although biosynthetic genes corresponding to production of STX had been reported, chemical study of intermediates were not enough. In this study, Int-A', Int-C'2, and CyclicC' were chemically synthesized, and identified in toxin producing cyanobacterium and dinoflagellate using high resolution LC-MS/MS. In addition, incorporation experiments with ¹⁵N labeled these intermediates indicated that Int-A' and Int-C'2 are genuine precursors of STX analogues and Cyclic C' is a shunt compound. This is the first shunt pathway in STX biosynthesis ever found.

研究分野：天然物化学

キーワード：テトロドトキシン サキシトキシン 生合成 LC/MS 中間体 グアニジン

1. 研究開始当初の背景

フグ毒テトロドトキシン(TTX, **1**)と麻痺性貝毒サキシトキシン(STX, **2**)類は、代表的食中毒原因物質であり、強力で特異的な電位依存性 Na⁺チャネル阻害剤である。しかし、生合成機構については、TTXは未解明であり、STXは遺伝子から経路が推定されたが、化学的証明は乏しかった。我々は、これまでの予測を覆す C10-C5 が直接結合した TTX 類縁体をイモリから発見し、ガラニルアミンから環化反応を繰り返して TTX を生成する生合成経路を推定した。しかし、さらに他にも予想された前駆体が有毒生物に存在するのではないかと考えられた。また、STX の生合成経路の解明には、予測生合成中間体を合成して探索することが有効ではないかと考えた。

2. 研究の目的

TTX の生合成経路の解明では、新しい TTX 推定生合成経路を裏付ける中間体を、有毒生物中より探索し、単離、構造決定し、さらなる生合成経路の情報を得ることを目的とした。また、STX 生合成では、有毒藍藻や渦鞭毛藻より、遺伝子から予測された生合成中間体および、化学的に予想された中間体を化学合成し、推定生合成経路の証明と検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

TTX の生合成研究では、高分解能(HR)-LC/MSを用いて、TTX 関連物を TTX 含有生物から網羅的にスクリーニングを行った。その結果、イモリから新規 TTX 関連化合物存在が示唆された。イオン交換、逆相、親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)などの各種カラムを用いてそれらの化合物を単離した。得られた化合物は、それぞれ、ごく微量であったが各種 2D-NMR や NOESY1D で相対立体化学を含めて構造決定した。

STX の生合成研究では、Neilan らにより有毒藍藻の遺伝子から推定された、STX 生合成経路の初期段階の Int-A' (**8**)、Int-C' **2**(**9**)を L-オルニチンから化学合成した。また、その過程で、新規化合物の三環性の Cyclic-C' (**10**)も得た。これらの化合物が、実際に有毒藍藻 *Anabaena circinalis* (TA04) および渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* (Axat2)に存在するかどうかを HR-LC-MS/MS を用いて調べた。また、これらの化合物の安定同位体 [¹⁵N₂]ラベル体も合成し、*A. circinalis* の培養液に添加して、弱毒で TA04 株の主な STX 類縁体である C1(**11**)/C2(**12**)への取り込みを LC-MS/MS で調べた。

4. 研究成果

(1) TTX の生合成 (発表論文 2, 5, 6)

有毒のオキナワシリケンイモリ (*Cynops ensidauda popei*) とアカハライモリ (*C. pyrrhogaster*) より、新規環状グアニジノ化合物を 5 種単離し、それらを Cep-210 (**3**),

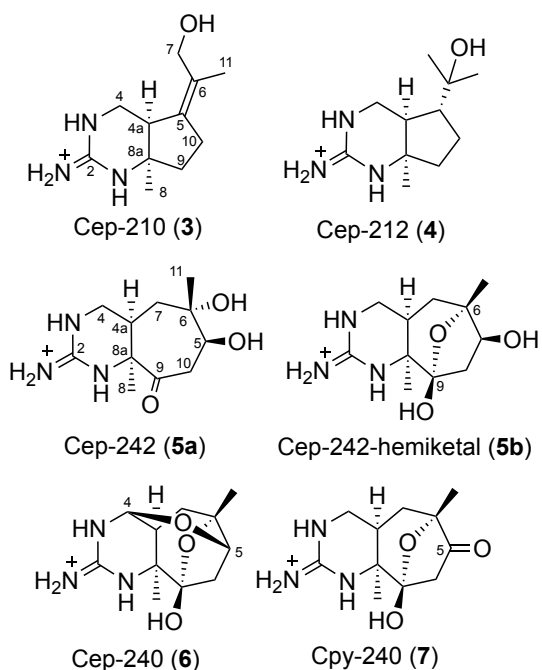


図 1 イモリから単離、構造決定した新規環状グアニジノ化合物 **3-7** の構造 (発表論文 2)

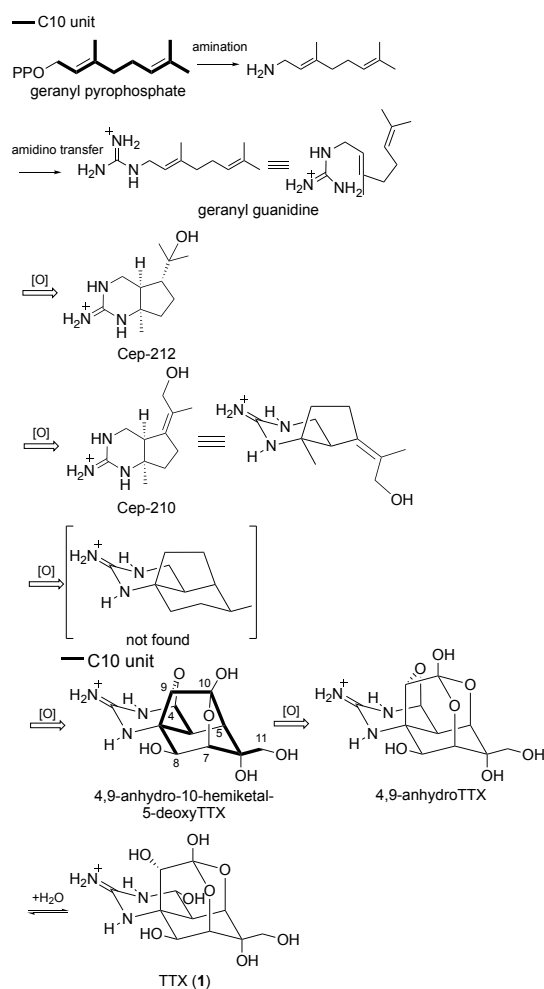


図 2 イモリから単離した新規環状グアニジノ化合物群の構造から推定した TTX 生合成経路

Cep-212 (4), Cep-242 (5), Cep-240 (6), Cpy-240 (7)とし、化学構造を図1のように決定した。**5a**と**5b**は平衡関係にある異性体である。これらの化合物の構造から、イモリの棲む陸上環境における TTX の生合成経路として図2のように推定した。(発表論文 2, 5)

また、フグからは、新規 TTX 類縁体として、6-deoxyTTX を単離、構造決定し、生理活性についても培養細胞を用いた方法で明らかにした(発表論文 6)。この類縁体の存在は、海洋環境において、TTX 生合成の後期に段階的な酸化反応を経て TTX が生合成されるとするこれまでの仮説を支持した。

(2) STX の生合成 (発表論文 1, 3, 4, 7)

STX 生合成中間体として予測された Int-A' (8)および Int-C' 2(9)の合成方法を確立し、LC-MS で有毒藍藻 *Anabaena circinalis* (TA04) や有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium tamarense* (Axat-2)に存在することを HR-LC-MS/MS で証明した。

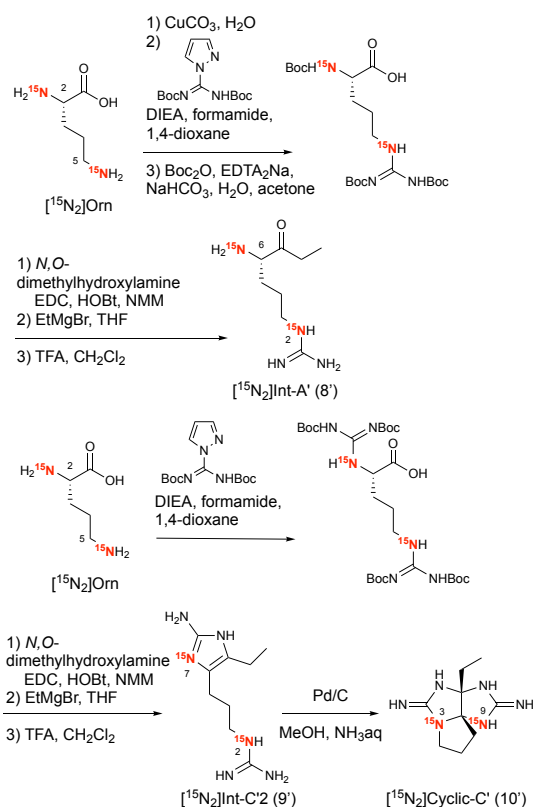
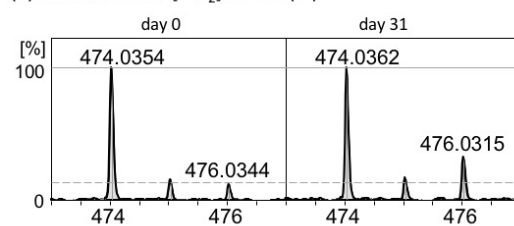
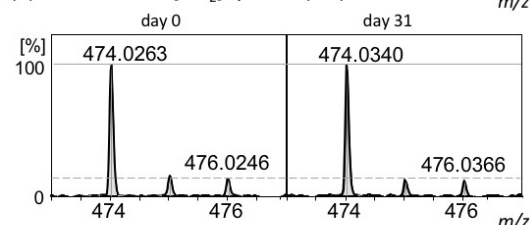


図3 8, 9, 10 の ^{15}N ラベル体の合成方法

(a) administered $^{15}\text{N}_2$ Int-C' 2 (9')



(b) administered $^{15}\text{N}_2$ Cyclic-C' (10')



(c) $^{15}\text{N}_2$ -labeled ratio of C2 (12')

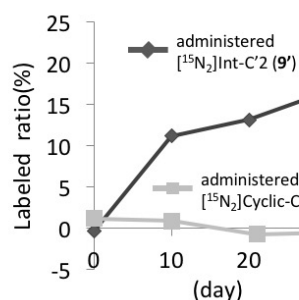
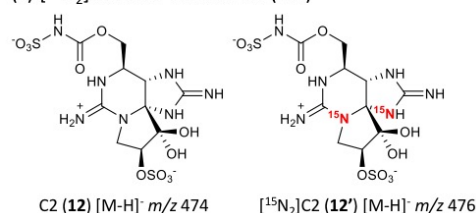


図4 $^{15}\text{N}_2$ Int-C' 2 (**9'**)および $^{15}\text{N}_2$ Cyclic-C' (**10'**)を *A. circinalis* (TA04)培養液に投与した場合の、C2 (**12**)のラベル化。(a) (b)C2 (**12**)のアイソトープパターン (c)C1/C2の構造とC2 (**12**)のラベル化率

また、その合成過程で、副産物として得られた三環性の Cyclic-C' (**10**)も、これらの有毒藍藻、渦鞭毛藻中を探索した結果、**10**も存在することが明らかになった。また、この**10**が化学的に**9**より生成する反応は Pd/C 存在下アルカリ条件での空气中酸化であった。

次に、合成した ^{15}N ラベル Int-A' (**8'**), Int-C' 2(**9'**), Cyclic-C' (**10'**) (図3)を *A. circinalis* (TA04)培養液に投与し、この藍藻の主要な麻痺性貝毒成分である、C1 (**11**)/C2 (**12**)がラベル化されるのかどうかを調べた。また、途中の変換反応も調べた。その結果、Int-A' (**8**)が完全に Int-C' 2(**9**)に変換されることが証明できた。また、ラベル化 Int-C' 2(**9'**)を繰り返し培地に投与した場合、ラベル化された C2 (**12'**)が LC-MS で検出された。一方、Cyclic-C' (**10'**)のラベル化体を投与しても、C2 (**12**)はラベル化されなかった。(図4)

このことから、Int-A' (8) および Int-C' 2 (9) は、確かに STX 類の生合成前駆体であることが完全に証明できた。一方、Cyclic-C' (10) は C2 (12) には変換されなかった。しかし、10 は 9 から生成することは示された。そのため、10 は過剰に生産された STX の前駆体 9 を減少するために、シャント化合物として細胞外に排出される物質と考えられた。シャント経路が存在することは、STX の生合成において初めて示唆された。これらの結果から示唆された STX 生合成経路を図 5 にまとめた。

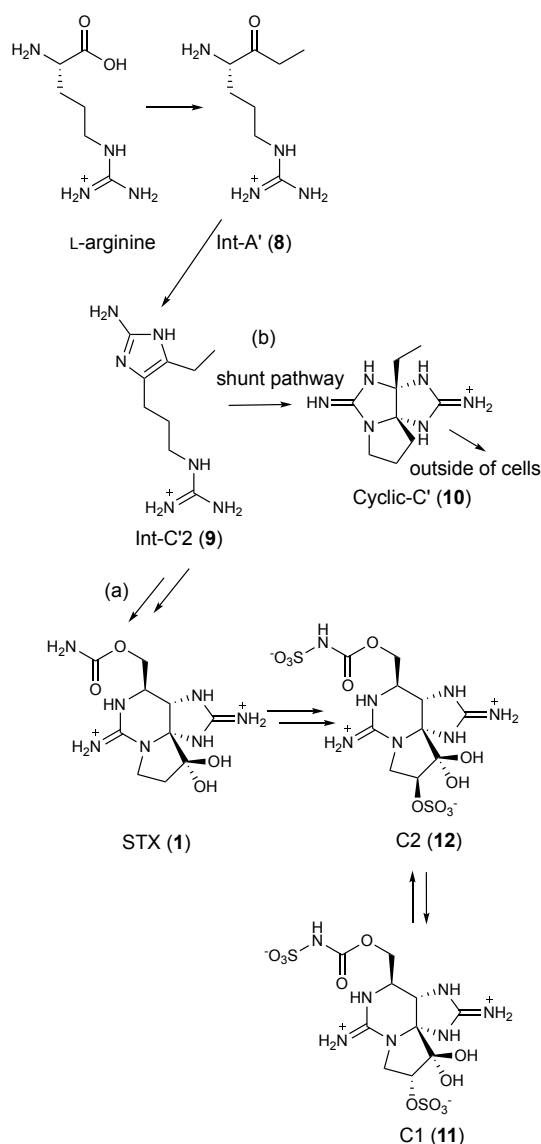


図 5 本研究で示唆された STX 生合成経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 30 件)

- ① Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Renpei Yoshioka, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima, and Mari Yotsu-Yamashita, Synthesis and identification of key biosynthetic intermediates for the formation of the tricyclic skeleton of saxitoxin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, 56, 5327-

5331. doi/10.1002/anie.201612461/ful 1 (査読有)

- ② Yuta Kudo, Takeshi Yasumoto, Dietrich Mebs, Yuko Cho, Keiichi Konoki, and Mari Yotsu-Yamashita, Cyclic Guanidine Compounds From Newts Support the Hypothesis that Tetrodotoxin is Derived From Monoterpene, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 8728-8731, 2016. DOI:10.1002/anie.201602971 (査読有)
- ③ Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita, Biosynthetic route towards saxitoxin and shunt pathway. *Scientific Reports*, 2016, 6:20340. DOI: 10.1038/srep20340 (査読有)
- ④ Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Kazuo Nagasawa, Yasukatsu Oshima, and Mari Yotsu-Yamashita, Synthesis of a tricyclic bisguanidine compound structurally related to saxitoxin and its identification in paralytic shellfish toxins-producing microorganisms, *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 7835-7840. DOI: 10.1002/chem.201500064 (査読有)
- ⑤ Yuta Kudo, Yoko Yamashita, Dietrich Mebs, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Takeshi Yasumoto, and Mari Yotsu-Yamashita, C5-C10 Directly bonded tetrodotoxin analogues: Possible biosynthetic precursors of tetrodotoxin from newts. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 14546-14549. doi: 10.1002/anie.201408913 (査読有)
- ⑥ Yuta Kudo, Julian Finn, Kohei Fukushima, Satsuki Sakugawa, Yuko Cho, Keiichi Konoki, and Mari Yotsu-Yamashita, 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 (査読有)
- ⑦ S. Tsuchiya, Y. Cho, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima and M. Yotsu-Yamashita, Synthesis and identification of proposed biosynthetic intermediates of saxitoxin in the cyanobacterium *Anabaena circinalis* (TA04) and the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Axat-2), *Org. Biomol. Chem.*, 2014, 12, 3016-3020. doi:10.1039/C4OB00071D (査読有)

[学会発表] (計 66 件)

- ① Mari Yotsu-Yamashita, Yuta Kudo, Shigeki Tsuchiya, Yuko Cho, and Keiichi Konoki, Oral. 8th US-Japan symposium 21st century innovations in Natural Products. November 15 2016, Sullivan Conference Center, University of Hawaii Cancer center, Honolulu, Hawaii, USA. Prediction of biosynthetic pathways of tetrodotoxin and saxitoxin on the basis of the structures of their intermediates, oral.
- ② Mari Yotsu-Yamashita, Yuta Kudo, Shigeki Tsuchiya, Kosuke Maeta, Yuko Cho, Keiichi Konoki, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Honolulu, Hawaii, USA December 20, 2015. Our recent studies of tetrodotoxin, saxitoxin and polycavernosides, oral.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ：
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bukka/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 まり (YAMASHITA, MARI)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50192430

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

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

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：40292825

長 由扶子 (CHO, YUKO)
東北大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：60323086

(4) 研究協力者

なし ()