

#### 4. 毒分子の犯行現場目撃に向けて ～合成化学と分光化学による追跡～

研究代表者 橘 和夫

##### [1] 研究の目標

細胞膜に結合している膜タンパク質の多くは、細胞外側からのメッセンジャー分子や他の細胞表層にある糖鎖との結合、神経や筋肉での膜電位、あるいは網膜での光といった刺激で活性化され、細胞内での酵素活性発現や無機イオン流入により細胞内での一連の生理変化をもたらす。またこの細胞内への情報増幅伝達が達成されると同時に、活性化された膜タンパク質はメッセンジャー分子との親和性低下などによる不活性化により静止状態に戻り、このため膜タンパク質の活性化状態は一過的であり、この状態に関する立体構造は推定の域を出るものはない。

そこで膜タンパク質の活性化状態に強い親和性を示すことで不活性化を受けない天然毒などの外因性分子を用いて、寿命を延ばした活性化状態での立体構造情報を取得解析できれば、これを静止状態での構造と比較することで膜タンパク質の活性化に関する構造的根拠が得られることになる。とは言えども膜タンパク質の立体構造解析は容易ではなく、アミノ酸配列に基づくコンピュータ・モデリングや膜表層に露出している親水性部の切断や修飾に基づく膜貫通部位の配向情報を除けば、直接観察による構造解析は演者の知る限りX線結晶解析による少数例のみである。

この大問題に対処すべく、膜タンパク質に親和性を持つ低分子に分光的な手掛り、即ち光反応性官能基（質量分析による反応部位検出）、ビオチン（アビジン-発光酵素連結体による特異的検出）、安定同位体（核磁気共鳴による原子間距離情報）、重原子（結晶解析での手掛り）、あるいは蛍光発色団と行った目印を有機合成化学的手段を用いて予め導入しておき、膜タンパク質との複合体の構造解析に用いようというのが演者らによるCRESTでの研究課題である。本講演ではこの目的達成に向け、特にタンパク質の膜貫通部位に結合してこれを活性化することが想定されているシガトキシンなどの梯子状ポリ環状エーテル系海産毒をプローブ分子として用い、これらと膜タンパク質との複合体に関する構造情報を得る目的で行なっている研究において、現時点で得られた結果のいくつかを紹介する。

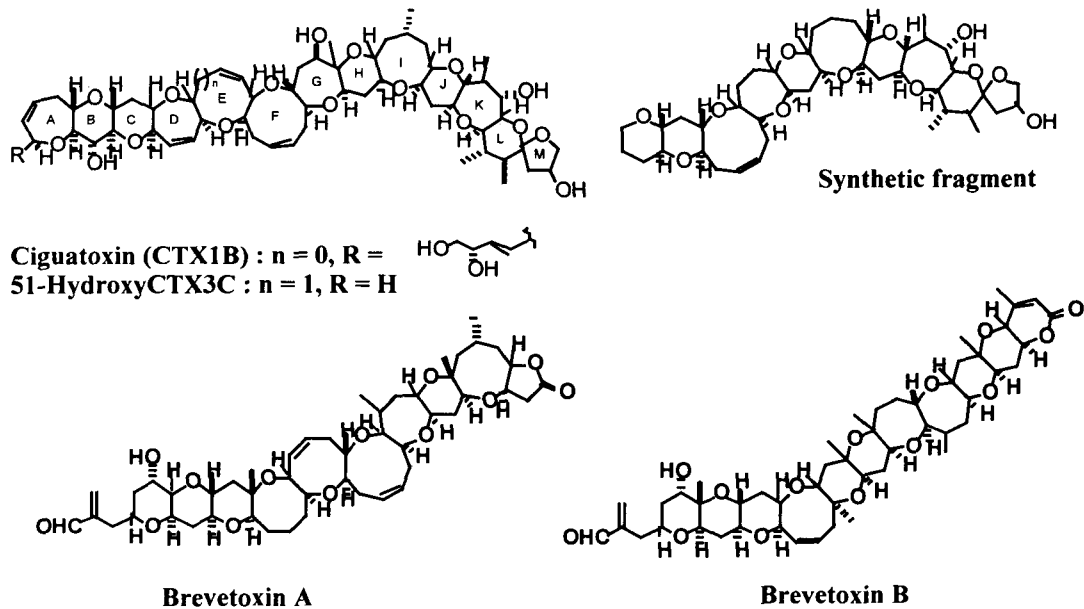
##### [2] 研究の内容

###### 1. シガトキシンと電位依存性Na<sup>+</sup>チャネル

サンゴ礁海域で一過的に頻発する食中毒シガテラの主要原因物質としてドクウツボの内臓より単離されたシガトキシンは、何らかのきっかけで大量増殖した底生渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* の生産する前駆体が食物連鎖により多岐の魚に移行し、これを摂食した中毒患者の神経細胞膜の電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルを活性化することで様々な神経障害をもたらす。この分子の化学構造は多くのエーテル環が梯子状に縮環して全体として棒状に伸びており（図）、その疎水性および概ね細胞膜厚に相当する分子長よりこのタンパク質の膜貫通部位に結合して活性化をもたらすことが想定されるが、その実験的根拠はまだない。

同様の化学構造を有する天然物に、赤潮により魚の大量斃死をもたらす浮遊性渦鞭毛藻

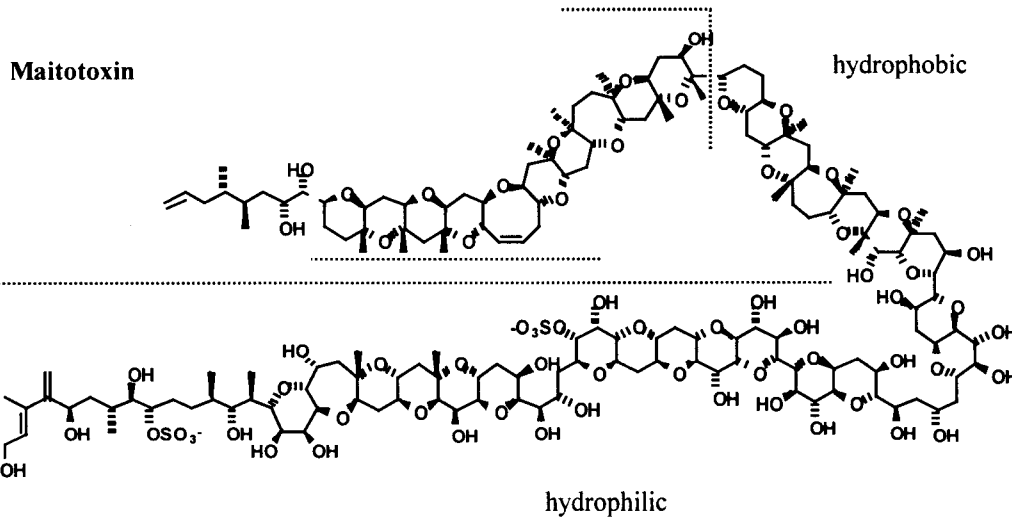
*Gymnodium breve* に由来するブレベトキシシン類がある。これらも同じチャネル分子上でシガトキシシンと同じ部位に結合するが、チャネル分子に対する結合親和性はシガトキシシン (CTX1B) の方が数 10 倍強く、結合した分子のチャネル活性化能もブレベトキシシンより強いと考えられる<sup>1)</sup>。この違いが化学構造のどこの違いに由来するかが分かれば、これら「梯子状ポリエーテル」によるチャネルタンパク質の分子認識様式に関する理解が一步先に進む筈である。しかしおそらくシガトキシシンの強い毒性に起因し毒化魚中の含量が極めて少ない(比較的高濃度にある内臓で ppb レベル) こと、シガテラ現象が一過性であること、および生産種鞭毛藻による培養生産が極めて遅いことより、天然物を用いた分子機構研究は現状では困難である。そこで演者の研究室では 8 年半前にシガトキシシンの全合成研究を開始した。しかし、これまでに合成されたうち最もシガトキシシンに近いと思われるもの(下図<sup>2,3)</sup>)でも、まだチャネル分子に結合しない。シガトキシシンとチャネルの強い結合能を考えると、合成した部分がチャネルとの分子認識に全く関与していないとは考えにくく、上述した分子長が不足するため細胞膜上でしかるべき位置取りができていないと考えている。



チャネルタンパク質への結合能が調べられている CTX1B に匹敵するマウス毒性を有することで現在合成標的として設定している 51-hydroxyCTX3C の全合成(別掲ポスター要旨参照)が達成されるまでの準備の一環として、細胞系を用いた活性試験との比較で分子認識の特異性を見ることを目的に、電気ウナギ発電器官より抽出したチャネル分子をリン脂質リポソームに再構成し、入手可能なブレベトキシシンを陽性対照とした結合能、チャネル活性化能の試験系構築を行なっている。また同じくブレベトキシシンに光反応性ジアジリンと特異検出のためのビオチンを同一分子内に持つ畑中らにより開発されたリガンド(後出)<sup>4)</sup>を共有結合させたものを用いた光親和性標識実験も進めており、得られた知見のいくつかを紹介する。

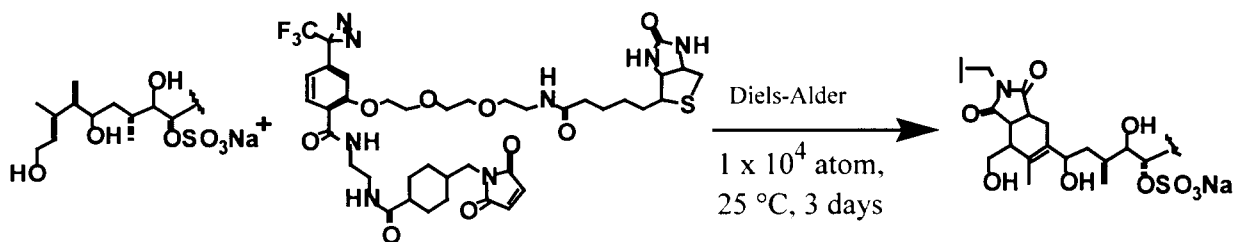
## 2. マイトトキシシンの作用標的分子

藻食魚のシガテラ毒の一つで *G. toxicus* により培養生産されるマイトトキシンは広範囲の動物細胞に nM 以下の濃度で  $\text{Ca}^{2+}$  流入を誘発し、これにより 1 mg で数 10 万匹のマウスを死に到らす毒性を持ち<sup>5)</sup>、これはボツリヌス細菌毒素など少数のタンパク毒を除くと最も強い急性毒性である。この強力な致死毒性はおそらく神経細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を契機とする自律神経系の破綻によると思われるが、その分子機構はまだ不明である。



演者の研究室でマイトトキシンの活性化される  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路の探索を行ってきた結果、これがリン脂質リポソームに対して  $\text{Ca}^{2+}$  流入を起こさず、赤血球ゴーストに対しては顕著な流入を起こしたことから、マイトトキシンの作用が細胞膜上にある膜タンパク質を介していることが示されている<sup>6)</sup>。一方、この分子の化学構造に目を転じると、硫酸エステル2カ所を含む親水性基を多く有する梯子状ポリエーテル2ユニットとブレベトキシシンによく似た疎水性2ユニットが非環状炭素鎖により繋がっている。そこでブレベトキシシン A および B 共存下でラット・グリオーマへの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を調べた結果、どちらもマイトトキシンの作用を阻害することが示された<sup>7)</sup>。この試験系での  $\text{Ca}^{2+}$  流入はフグ毒テトロドトキシシンにより阻害されないことは、ブレベトキシシンが  $\text{Na}^+$  チャネルではないマイトトキシシン標的タンパク質の静止状態を認識、結合していることを意味し、これら梯子状ポリ環状エーテルに共通する異なる膜タンパク質に対する認識機構の存在を示唆する。

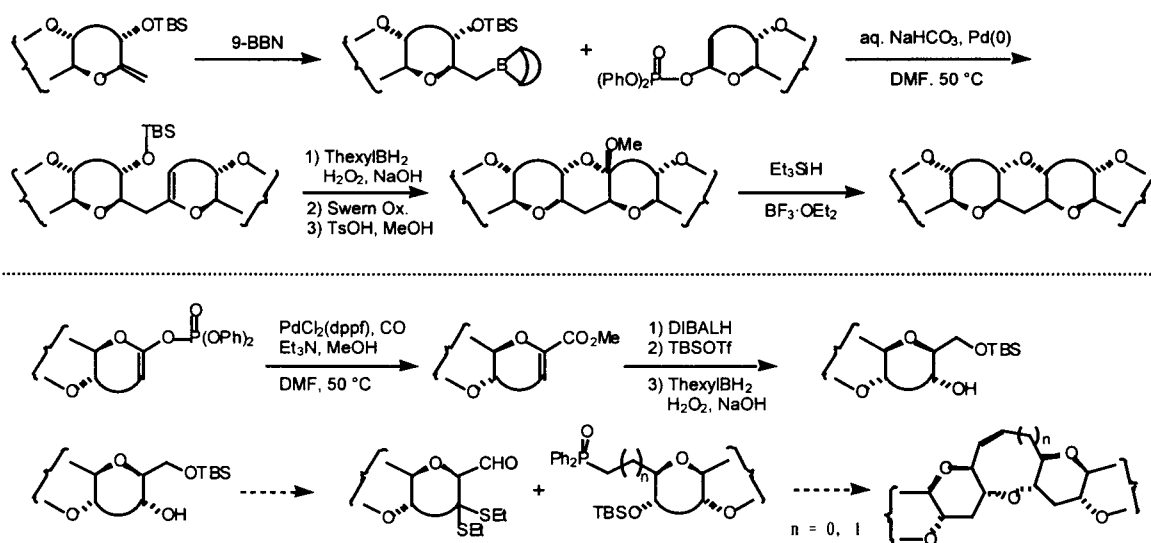
マイトトキシンを上記のビオチン含有リガンドを含む光反応性誘導体へと変換した後、赤血球存在下で光照射を行ない、二次元電気泳動で展開した後にアビジンに繋がったペルオキシダーゼで特異的に化学発光検出した結果、数個のスポットが検出された。この中にはブレベトキシシン共存下の光照射では検出されないものもあり、現在これらに的を絞って単離を試みている。



Synthesis of maitotoxin photoaffinity probe

### 3. 梯子状ポリ環状エーテルの収束的合成法

上に述べたポリ環状エーテルと膜タンパク質との親和性における一般性と特異性をさらに構造レベルで説明するには、しかるべくデザインされた一連のポリエーテル分子の合成が必要となる。ここで様々な環の員数からなるいくつかの共通構造フラグメントを自由自在に繋げることができれば、この組合せを変えることで必要分子長を持つ多様な分子が合成できる。これまでのシガトキシン合成研究の過程で、ラクトンに由来するエノールホスファートまたはトリフアートとメチリデン型エノールエーテルのヒドロホウ素化により調製されるアルキルボランとの鈴木クロスカップリング反応を基盤とする収束的環連結法<sup>8)</sup>と、同じくラクトン由来エノールホスファートの Pd(0) 触媒によるカルボニル化による $\alpha, \beta$ -不飽和エステル<sup>9)</sup>の合成法<sup>9)</sup>を見出した。これらはそれぞれ6員環、および7, 8員環を介したフラグメントの連結に有効と考えている。



#### 参考文献

1. M.-Y. Dechraoui, J. Naar, S. Pauillac, and A.-M. Legrasnd. Ciguatoxins and brevetoxins, neurotoxic polyether compounds active on sodium channels. *Toxicon* **37**, 125-143 (1998).
2. M. Inoue, M. Sasaki, and K. Tachibana. Synthetic studies on ciguatoxin: convergent strategy for the construction of the F-M ring framework. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 965-969 (1998).
3. M. Inoue, M. Sasaki, T. Noguchi, and K. Tachibana. A convergent synthesis of decacyclic ciguatoxin model containing the F-M ring framework. *J. Org. Chem.* **64**, 9416-9429 (1999).
4. Y. Hatanaka, M. Hashimoto, and Y. Kanaoka. A novel biotinylated heterobifunctional cross-linking reagent bearing an aromatic diazirine. *Bioorg. Med. Chem.* **2**, 1367-1373 (1994).
5. A. Yokoyama, M. Murata, Y. Oshima, T. Iwashita, and Y. Yasumoto. Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel agonist isolated from a marine dinoflagellate. *J. Biochem.* **104**, 184-187 (1988).
6. K. Konoki, M. Hashimoto, M. Murata, and K. Tachibana. Maitotoxin-induced calcium influx in erythrocyte ghosts and rat glioma C6 cells, and blockade by gangliosides and other membrane lipid. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 993-1001 (1999).
7. K. Konoki, M. Hashimoto, T. Nonomura, M. Sasaki, M. Murata, and K. Tachibana. Inhibition of maitotoxin-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat glioma C6 cells by brevetoxins and synthetic fragments of maitotoxin. *J. Neurochem.* **70**, 409-416 (1998).
8. M. Sasaki, H. Fuwa, M. Ishikawa, and K. Tachibana. A general method for convergent synthesis of polycyclic ethers based on Suzuki cross-coupling: concise synthesis of the ABCD ring system of ciguatoxin. *Org. Lett.* **1**, 1075-1077 (1999).
9. M. Sasaki, S. Honda, T. Noguchi, H. Takakura, and K. Tachibana. Palladium-catalyzed carbonylation of lactone-derived enol phosphates: stereoselective construction of functionalized cyclic ethers from lactones. *Synlett*, 838-840 (2000).