

氏名(本籍)	むら 村      た 田      かず 和      や 也
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 6 3 8 号
学位授与年月日	平 成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科食糧化学専攻 (博士課程)
学位論文題目	新規神経性貝毒の構造と毒性及びその化学変換による有用 試薬の創出
論文審査委員	(主 査) 教 授 大 島 泰 克 教 授 大 類 洋 教 授 須 山 享 三

# 論文内容要旨

## 緒言

アメリカでは渦鞭毛藻 *Gymnodinium breve* による赤潮が発生して魚類大量斃死を招き、大きな問題となっている。*G. breve* は強力な魚毒活性を有する brevetoxin (BTX) (Fig. 1) を生産する。*G. breve* の赤潮にさらされた貝類が毒化しておこる食中毒を神経性貝毒と呼び、これまでアメリカで 2 回発生した報告がある。原因毒は *G. breve* との関連から BTX 誘導体と考えられていたが、化学的な証明はされていなかった。本研究では、1993 年にニュージーランドで発生した神経性貝毒 の原因毒成分で、モエギイガイ中に発見された高極性成分 brevetoxin B2 (BTXB2) の精製と構造決定を行った。(第一章)

BTXB2 は新規 BTX 誘導体であり、BTX との比較からその生物活性に興味を持たれた。そこで、マウス毒性試験、魚毒性試験、ナトリウムチャンネル特異的細胞毒性試験、競合的レセプター結合試験について検討した。(第二章)

BTXB2 はナトリウムチャンネル結合活性を有し、さらに分子中にアミノ基およびカルボキシル基を有していることを明らかにした。この特徴を活かし、有用な試薬を化学変換によって創出し、その有効性を検討した (第三章、第四章)。

## 第一章 神経性貝毒 brevetoxin B2 の精製と化学構造決定

### 1. 精製

Coromandel 半島 (Fig. 2) で採取されたモエギイガイ (*Perna canaliculus*) 中腸腺約 30 kg を試料に用いた。マウス毒性を指標に、各種溶媒分画、液体クロマトグラフィーによって精製し、約 29 mg の BTXB2 を単離した (Fig. 3)。

## 2. brevetoxin B2 の化学的性状

BTXB2 は ninhydrin 陽性で第一アミンが存在した。元素分析により N 原子は一つと決定した。微量蛍光 X 線スペクトルからは S 原子が存在し、高分解能マススペクトル ( $[M+H]^+$   $m/z$  1034.5171  $\Delta$ +2.4 mmu) より、分子式  $C_{53}H_{79}O_{17}NS$  と決定した。FT-IR ( $1736\text{ cm}^{-1}$ ,  $1602.9\text{ cm}^{-1}$ ,  $1381.1\text{ cm}^{-1}$ ) から lactone,  $\alpha$ -aminocarbonyl, sulfoxide が存在し、sulfoxide はヨウ化水素酸による呈色反応に陽性であることから確認した。210 nm 以降に UV 吸収極大は無く、CD スペクトルでは、227 nm ( $\Delta\epsilon$  -1.97), 256 nm ( $\Delta\epsilon$  +1.98) にコットンが観測され、BTXB<sup>2)</sup>と一致した。旋光度は  $[\alpha]_D^{20}$  = +19.714 ( $c$  = 0.583, MeCN/H<sub>2</sub>O 1/1) が得られた。

## 3. BTXB2 の構造解析

BTXB2 の <sup>1</sup>H NMR スペクトルは、BTXB のものと類似していたが、H42 と H50 のシグナルが観測されなかった (Fig. 4)。各種二次元 NMR スペクトルの解析から、BTXB2 は、A 環から K 環まで、BTXB と同じポリエーテル環骨格を持つことを明らかにした。BTXB2 側鎖由来のシグナルは複数に分裂していたので (Fig. 5)、帰属が不正確になる可能性があったが、推定を行った (Fig. 6)。

側鎖構造を確認するために、始めに、*dl*-S-methyl-L-cysteine sulfoxide を調製して、BTXB2 と <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトルを比較した。その結果、BTXB2 の H1'-H2' と *dl*-S-methyl-L-cysteine sulfoxide の  $\beta$  メチレン、 $\alpha$  メチンのシグナルは良い一致を示し、BTXB2 は SOCH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH 構造を有すると決定した (Fig. 7)。また、sulfoxide は *dl* 体混合物であると決定した。この結果から、シグナルが分裂するのは *dl*-sulfoxide が原因と判明したので、BTXB2 の還元的脱硫反応を行った。BTXB2 を Raney Ni で脱硫したところ、BTX 誘導体の PbTx-9 と alanine が得られた。これにより推定した構造が正しかったことを確認した (Fig. 8)。さらに、

CID MS/MS スペクトル<sup>3)</sup>では、sulfoxide の結合が解裂したプロダクトイオンが、BTXB2, *N*-acetylBTXB2 の両者で観測され、側鎖の平面構造を決定した (Fig. 9)。また、ポリエーテル環骨格由来のプロダクトイオンも観測され、分子全体を通して BTXB2 の平面構造を確認することができた。

BTXB2 の立体構造については、エーテル環骨格部分は、NOESY, CD スペクトルから BTXB と同じ絶対立体配置であると決定した。H35 と H40 の間に相関が観測されたことから H40 は  $\beta$  配置であった。側鎖の C41 は PbTx-9 の Me50 シグナルが2つに分裂して観測されたので *RS* 体混合物 (Fig. 10)、C2' は alanine の TBMB カルボン酸<sup>4)</sup>誘導体の HPLC 分析により *s* 体 (Fig. 11)と決定した。

以上の結果から BTXB2 の構造を決定した (Fig. 12)

#### 4. 考察

BTXB2 はこれまで他の貝には顕著な量では確認されていないことから、モエギイガイ特有の代謝経路で代謝されたものと考えられた。

## 第二章 BTXB2 の生物活性

BTXB2 のマウス最小致死毒性は約 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。BTXB2 を投与したマウスは呼吸困難の症状が特徴的で、致死時間は 1 時間以内であった。同じモエギイガイ中に含まれていた BTXB4<sup>5)</sup>の 6 時間とは対照的で、これはマウス体内での標的器官への到達時間が違うためと考えられた。

BTX との比較から BTXB2 にも魚毒活性が保持されているか興味を持たれた。BTXB2 はアカヒレ (*Tanichthys albonubes*) に対して、100 nM で毒性を示さなかった。BTXB3<sup>6)</sup>, BTXB4<sup>5)</sup>にも同じ濃度で魚毒活性は認められなかったため、解離

性の官能基により鰓からの吸収が妨げられたと考えられた。

BTX はナトリウムチャンネルに特異的に結合して、活性化する。BTXB2 の活性化作用をナトリウムチャンネル特異的細胞毒性試験<sup>7)</sup>によって検討した。試験の結果、PbTx-3 と BTXB2 の 50 % 成育阻害濃度  $IC_{50}$  は、それぞれ 7.6 nM, 42.4 nM であった (Fig. 13)。BTXB2 は PbTx-3 の約 1/6 の活性であったが、高いチャンネル活性化作用を有することが明らかとなった。

競合的レセプター結合試験を行い、ナトリウムチャンネル結合活性を検討した。試験の結果、50 % 結合阻害濃度  $ED_{50}$  は PbTx-3, BTXB2 それぞれ、7.0 nM, 34.8 nM が得られた (Fig. 14)。BTXB2 は PbTx-3 の約 1/5 の活性を示し、細胞毒性試験の結果とほぼ一致した。これより、チャンネル結合には脂質二重膜への親和性が重要であることが示唆された。

### 第三章 BTXB2 化学発光誘導体の調製と競合的レセプター結合試験への応用

高感度検出可能な化学発光誘導体を BTXB2 から調製した。さらに、この誘導体を結合試験に適用し、シガテラや神経性貝毒の微量検出・定量法への応用を検討した。

#### 1. BTXB2 化学発光誘導体の調製

200  $\mu$ g (190 nmol) の BTXB2 に、Acridinium- $I^{\text{®}}$ を反応させ 59  $\mu$ g (42 nmol) の化学発光誘導体 (Acridinium-BTXB2, ABTX) を得た (収率 22 %) (Fig. 15)。ABTX は、CID FAB MS/MS スペクトルで目的の構造であることを確認した。

## 2. 化学発光誘導体の競合的レセプター結合試験への応用の検討

ABTX の結合試験適用への必要条件である検出感度とナトリウムチャンネル結合活性について検討した。

化学発光測定条件の検討<sup>8)</sup>を行ったところ、pH=5 中で 0.5 N NaOH (0.15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の発光試薬を用いたときに発光強度が大きくなり、至適条件となった。ABTX の検出感度は 1.4 amol であり、これは [42-<sup>3</sup>H]PbTx-3 に匹敵する感度であった。

結合試験から、結合親和性定数  $K_i$  は、PbTx-3; 2.3 nM、ABTX; 0.95 nM が得られた (Fig. 16)。ABTX は [42-<sup>3</sup>H]PbTx-3 よりも活性が約 3 倍高く、結合試験適用へ十分な結合活性を有していた。

ABTX を用いた結合試験の条件設定のために、ラット脳シナプトソームに対する飽和実験を行った。その結果、ABTX の解離定数  $K_D$ ; 0.84 nM 最大結合レセプター数  $B_{max}$ ; 6.76 pmol toxin/mg protein が得られた (Fig. 17)。 $K_D$  は [42-<sup>3</sup>H]PbTx-3 の約 1/3、また  $B_{max}$  はほぼ同じ値を得た。

## 3. 化学発光誘導体を用いた結合試験による brevetoxin B2, ciguatoxin-3C の検出

飽和試験の結果を元に条件設定を行い、ABTX を用いて結合試験を行ったところ、CTX3C (Fig. 18) および BTXB2 の  $K_i$  はそれぞれ、195 pM、88.7 nM となった (Fig. 19)。これらの結果から、CTX3C, BTXB2 の微量定量が可能であることが判明した。

## 4. 実試料からのブレベトキシン、シガトキシンの検出

3 種類のシガテラ魚、ナンヨウブダイ、スジアラ、マダラハタの筋肉を、予備精製した後、CTX3C を添加して結合試験に供した。神経性貝毒の場合も、貝中

腸腺を予備精製し、最も食中毒への関与の高い BTXB4 を加えて試料を調製した。

結合試験による定量の結果、CTX3C の場合は不純物による影響で測定値が理論値を常に 1.5 倍上回った (Fig. 20)。しかし、マウス毒性試験と比較しても、これを上回る感度および同等の精度で検出定量が可能であった。神経性貝毒については、規制値 20 MU/100 g の試料は、理論値と約 10 % 程度の差で定量することが出来たが、これより低毒性の試料は不純物の影響を受け、定量することは出来なかった。

#### 第四章 brevetoxin B2 フォトアフィニティーラベルリガンドの調製

BTX のナトリウムチャンネル結合サイトであるサイト 5 の同定を目指し、BTXB2 からフォトアフィニティーリガンドの調製を行った。フォトアフィニティー置換基としては、トリフルオロメチルアジリノベンゾイル (TDBA)<sup>9)</sup> 基を用い、トレーサーとしてビオチンを導入した。

##### 1. フォトアフィニティーラベルリガンドの調製

BTXB2 1.3 mg (1.3  $\mu$ mol) に TDBA-OSu さらに 5-(biotinamide)-pentylamine を導入したところ、150  $\mu$ g (0.096  $\mu$ mol) の誘導体 (TDBA-biotin-BTXB2, TBBTX) が得られた (収率 7 %) (Fig. 21)。<sup>1</sup>H NMR スペクトルと ESI-MS スペクトルによりその構造を確認した (Fig. 22)。

##### 2. フォトアフィニティーリガンドの有効性

TBBTX のフォトアフィニティーリガンドとしての有効性を、検出感度とナトリウムチャンネル結合活性について検討した。

TBBTXの検出法としてストレプトアビジンを用いたELISA試験<sup>10)</sup>を用いて検出感度を検討した。その結果、ビオチンとTBBTXのHRP-biotin 50%結合阻害濃度ED<sub>50</sub>はそれぞれ0.059 nM, 0.50 nMとなった (Fig. 23)。これにより、TBBTXの微量検出が可能であることが明らかとなった。

また、結合試験から、PbTx-3, TBBTXはそれぞれED<sub>50</sub>; 7.0 nM, 6.3 nMが得られた (Fig. 24)。TBBTXはPbTx-3と同等の結合活性を有し、高いフォトアフィニティーラベル化効率が期待できることを明らかにした。

## 総括

1. 神経性貝毒成分BTXB2の構造を、NMRを中心とする各種分光学的手法と還元的脱硫反応により、PbTx-3にcysteine sulfoxideが結合した新規BTX類縁体であること決定した。
2. BTXB2はナトリウムチャンネル結合活性を有していることを明らかにした。また、BTXB2がBTXに特徴的な強力な魚毒活性を有していないことを明らかにした。
3. BTXB2から高感度検出のための化学発光誘導体を調製し、結合試験への応用を可能にした。この方法を用いたCTX, BTXの実試料からの検出を検討したところ、感度、精度共に優れた方法であることを明らかにした。
4. BTXB2からフォトアフィニティーリガンドの調製を行い、これが、検出感度、ナトリウムチャンネル結合能共に優れたリガンドであることを明らかにした。



## 参考文献

1. Bates, M.; Baker, M.; Wilson, N.; Lane, L.; Handford, A., *Marine Toxins and New Zealand Shellfish* (Proceedings of a workshop on research issues), The Royal Society of New Zealand, 35-40 (1993)
2. Lin, Y-Y.; Risk, M.; Ray, S. M.; Engen, D. V.; Clardy, J.; Golik, J.; James, J. C.; Nakanishi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6773-6775 (1981)
3. 直木秀夫、東北大学博士論文「海洋天然有機化合物のマススペクトルを主とする分光学的手法による構造解析」、pp27-44
4. Nishida, Y.; Ohru, H.; Meguro, H., *Tetrahedron Letters*, **30** (39), 5277-5280 (1989)
5. Morohashi, A.; Satake, M.; Naoki, H.; Kaspar, H. F.; Oshima, Y.; Yasumoto, T., *Natural Toxins*, **7**, 45-48 (1999)
6. Morohashi, A.; Satake, M.; Murata, K.; Naoki, H.; Kaspar, H. F.; Yasumoto, T., *Tetrahedron Letters*, **36** (49), 8995-8998 (1995)
7. Yasumoto, T.; Fukui, M.; Sasaki, K.; Sugiyama, K., *Journal of AOAC International*, **78** (2), 574-582 (1995)
8. Weeks, I.; Beheshti, I.; McCapra, F.; Campbell, A. K.; Woodhead, J. S., *Clinical Chemistry*, **29** (8), 1474-1479 (1983)
9. Hatanaka, Y.; Nakayama, H.; Kanaoka, Y., *Reviews on Heteroatom Chemistry*, Shigeru Oae, Atsuyoshi Ohno and Tadashi Okuyama, eds., **14**, pp213-243 (1996)
10. Bayer, E. A.; Ben-Hur, H.; Wilcher, M., *Analytical Biochemistry*, **154**, 367-370(1986)

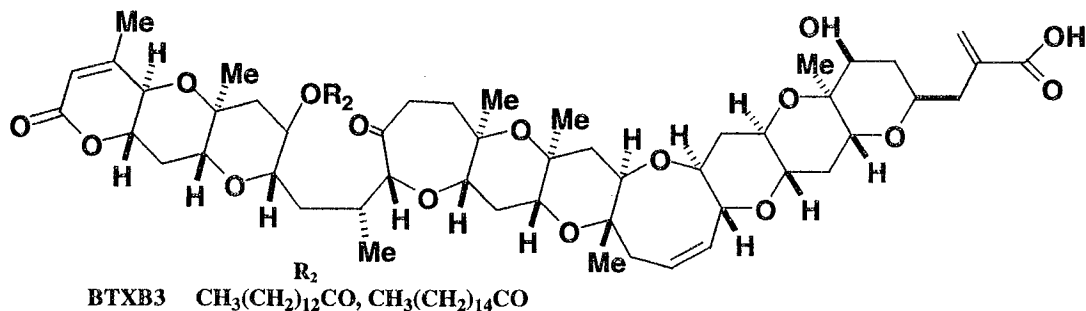
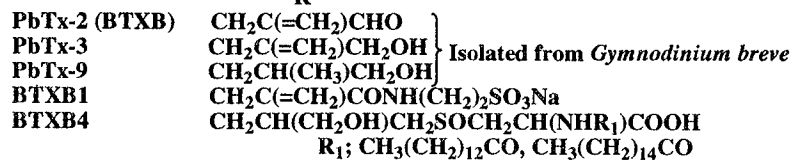
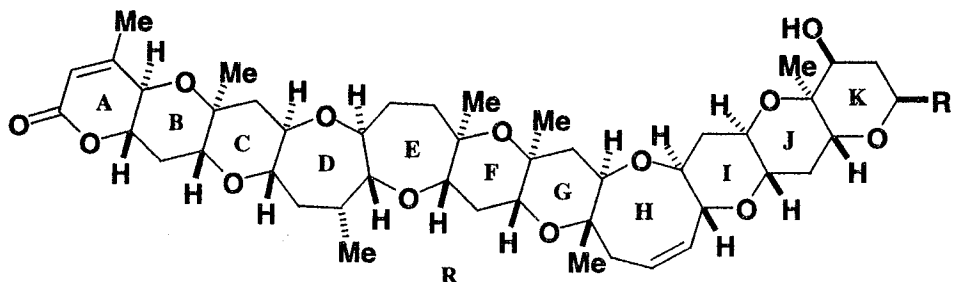


Fig. 1 Structures of brevetoxins

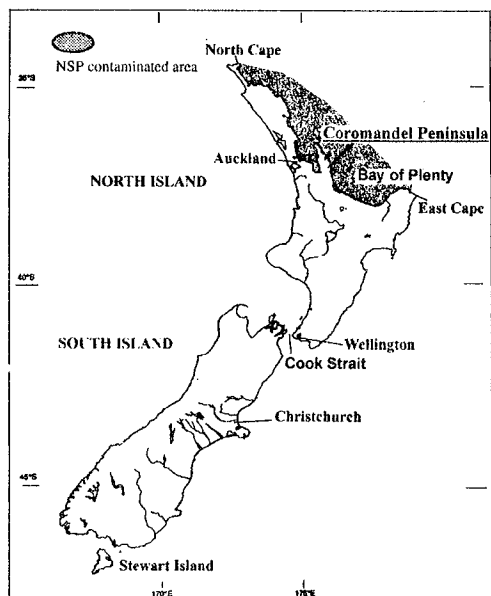


Fig. 2 NSP contaminated area in New Zealand (1992-1995)

Hepatopancreas of greenshell mussels (*Perna canaliculus*) collected at Coromandel peninsula in Jan. 6, 1993; 30 kg

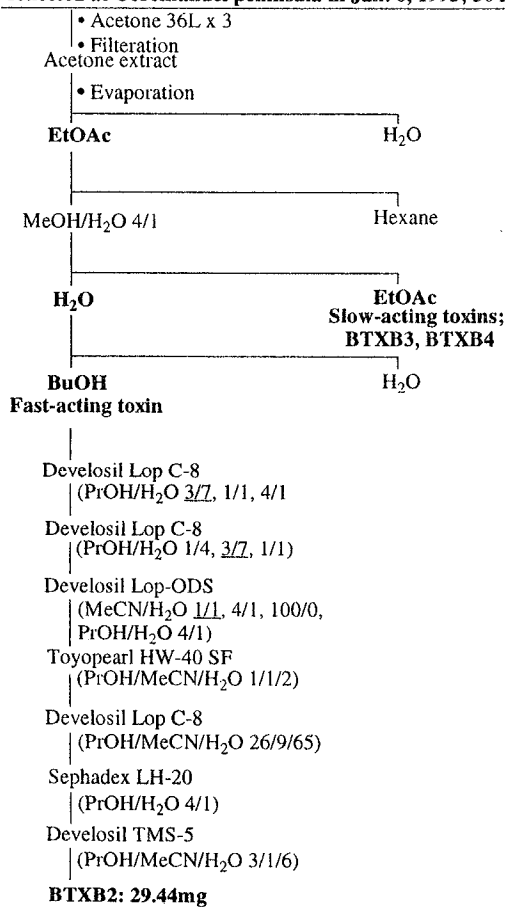


Fig. 3 Purification of BTXB2

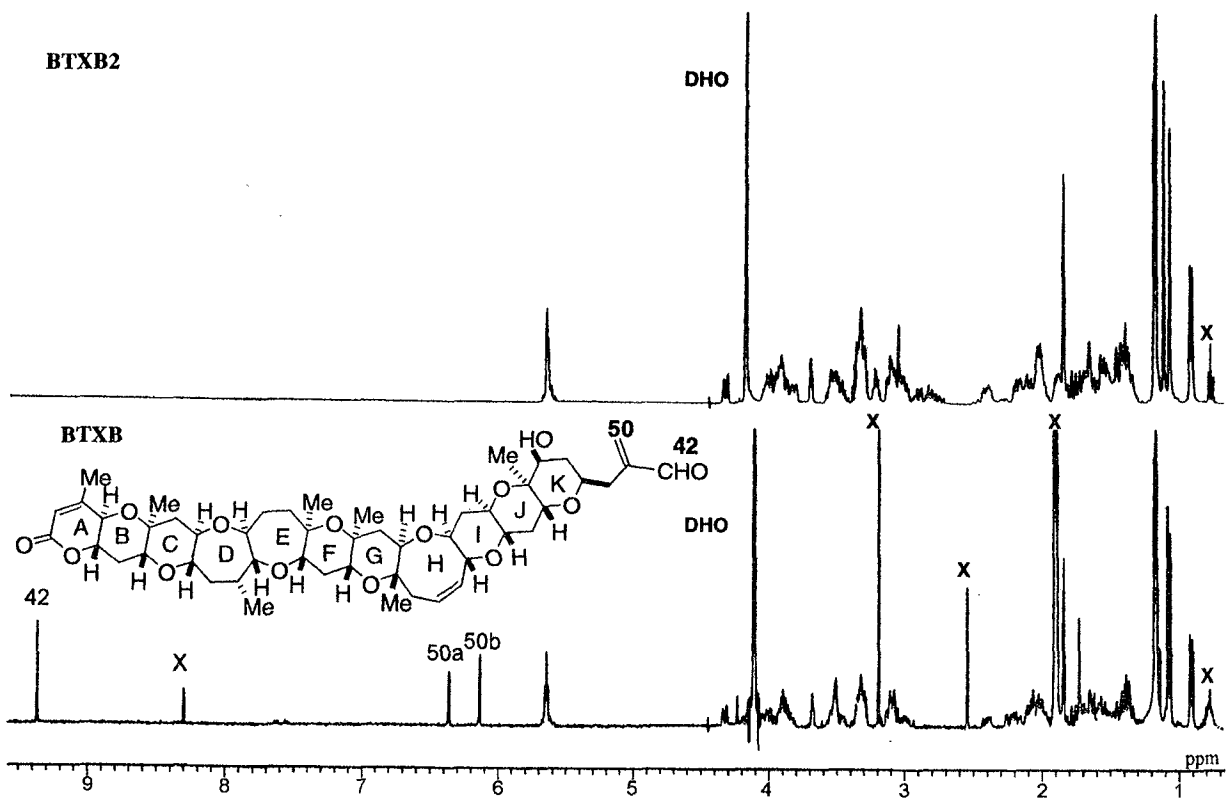


Fig. 4  $^1\text{H}$  NMR spectra of BTXB2 and BTXB ( $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$  1/1, 400 MHz)

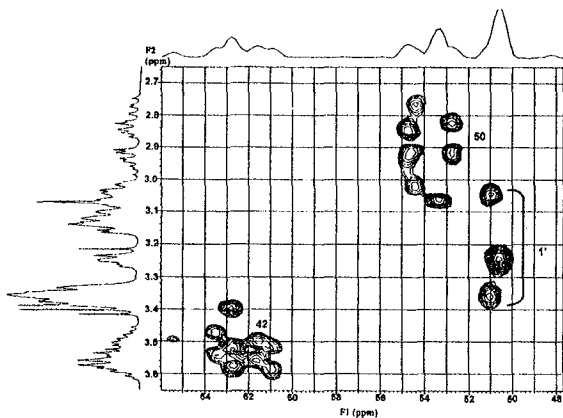


Fig. 5 HSQC spectrum of BTXB2

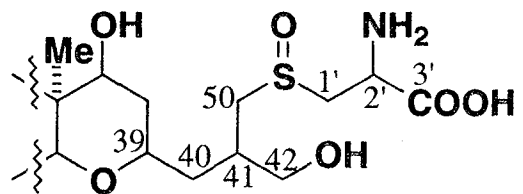


Fig. 6 Probable structure of BTXB2 (C39 to C42, C50 and C1' to C3')

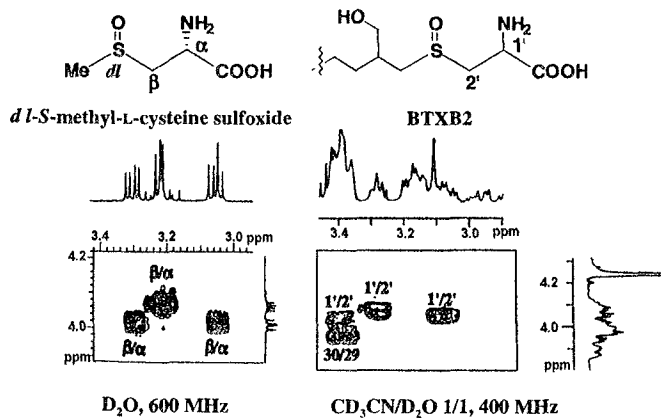


Fig. 7 Comparison of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectra of *dl*-S-methyl-L-cysteine sulfoxide and BTXB2

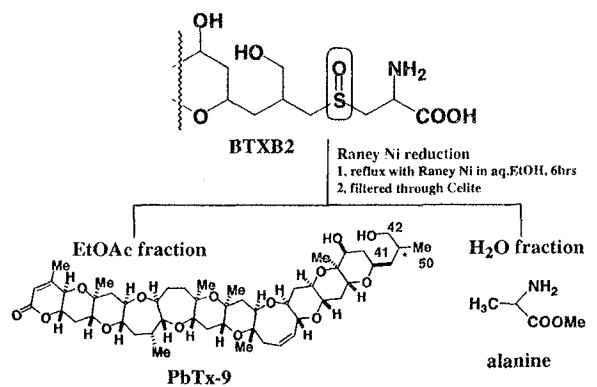


Fig. 8 Reductive desulfurization of BTXB2

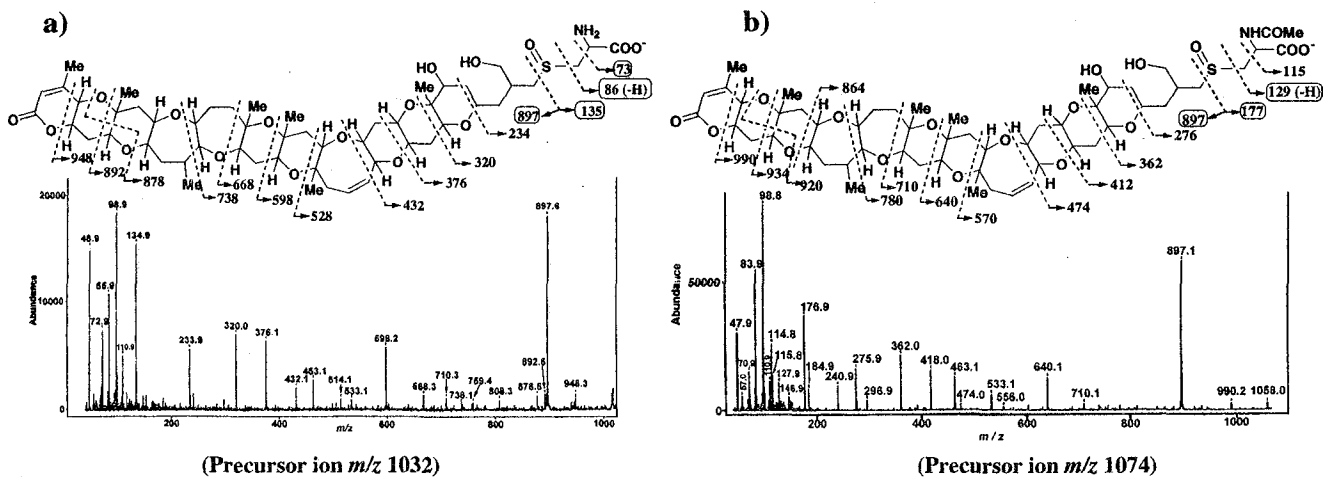


Fig. 9 CID FAB MS/MS spectrum of BTXB2 (a) and *N*-acetylBTXB2 (b) (negative mode, 2,2'-dithiodiethanol as a matrix)

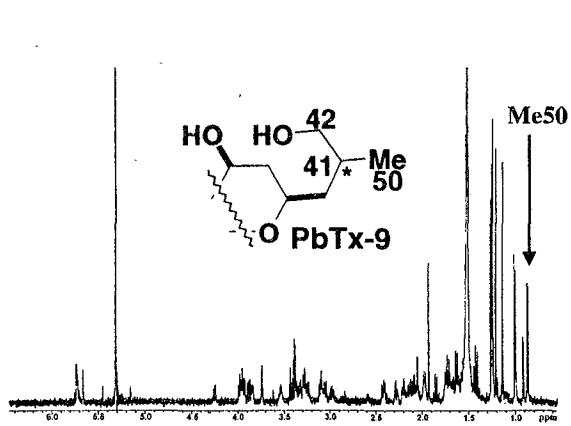


Fig. 10  $^1\text{H}$  NMR spectrum of PbTx-9 obtained from BTXB2 (600 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )

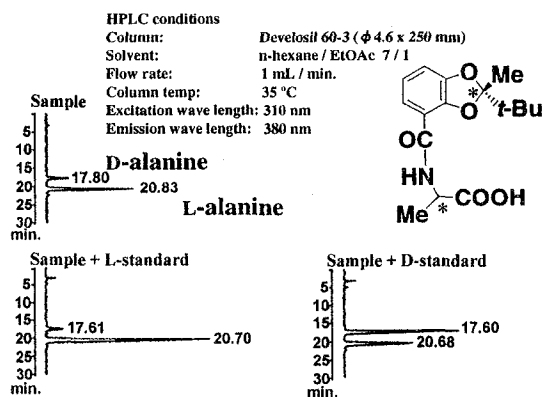


Fig. 11 Determination of the stereochemistry of alanine obtained from BTXB2

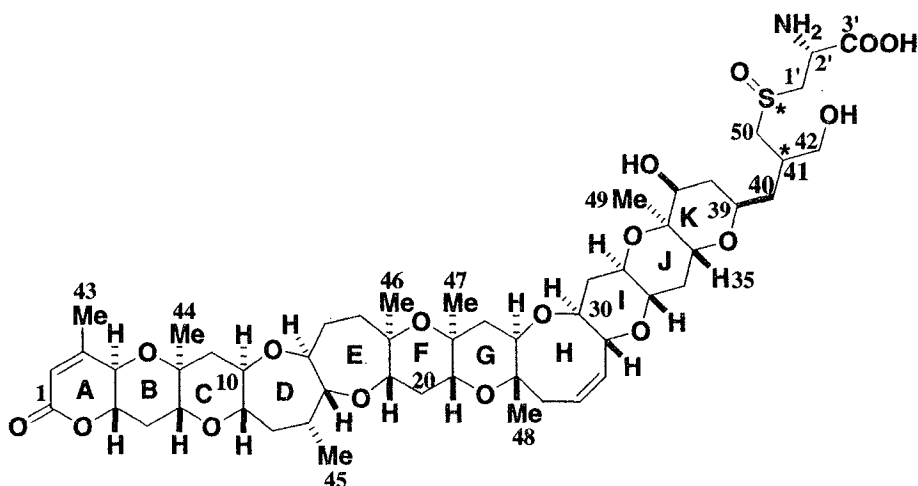


Fig. 12 Structure of BTXB2

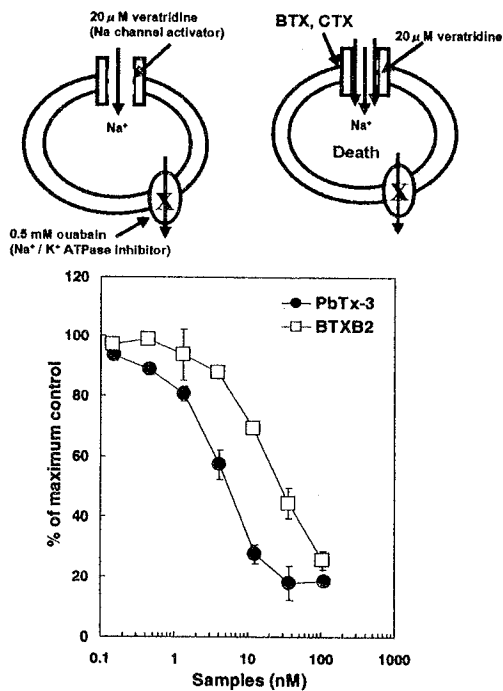


Fig. 13 Cytotoxic assay for PbTx-3 and BTXB2 against neuroblastoma cells

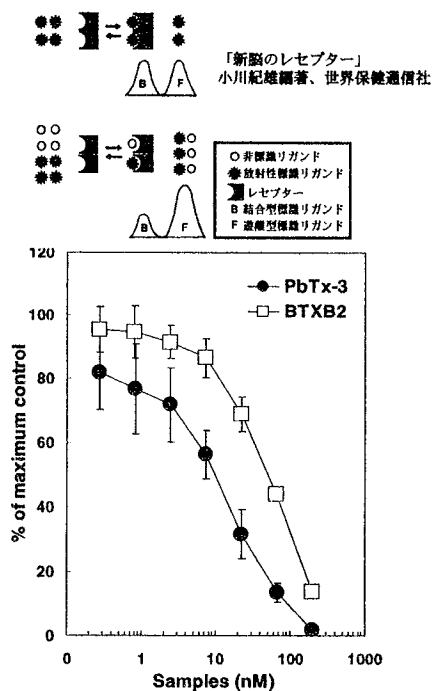


Fig. 14 Competitive binding assay between <sup>3</sup>H-PbTx-3 and PbTx-3 or BTXB2 against rat brain synaptosome

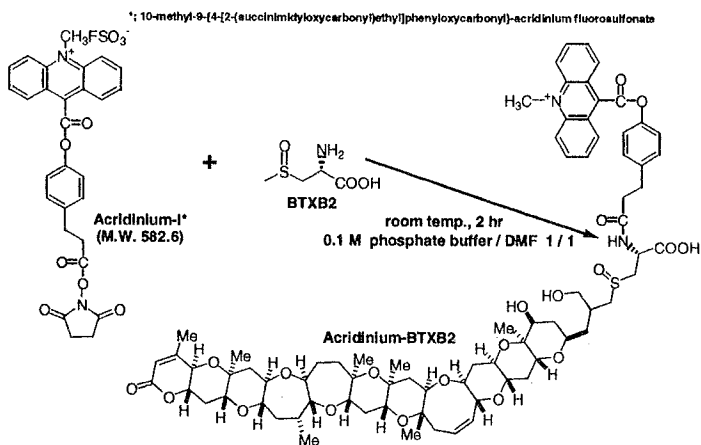


Fig. 15 Preparation of chemiluminescent derivative of BTXB2

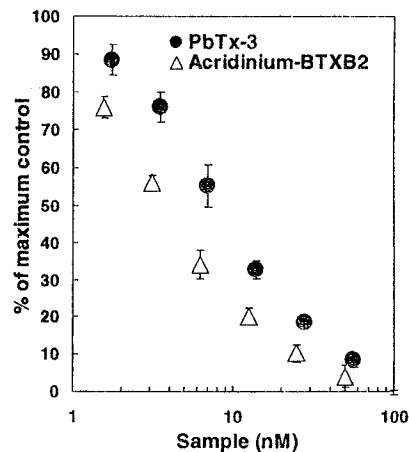


Fig. 16 Competitive binding assay between <sup>3</sup>H-PbTx-3 and PbTx-3 or Acridinium-BTXB2 against rat brain synaptosome

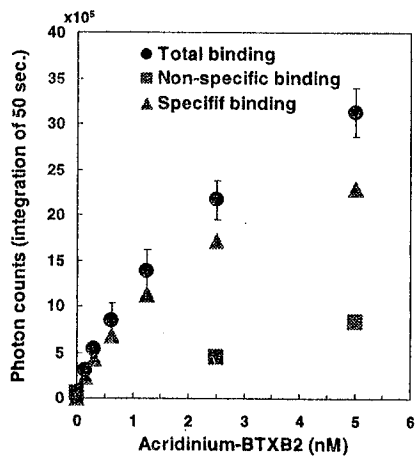


Fig. 17 Saturation experiment for ABTX

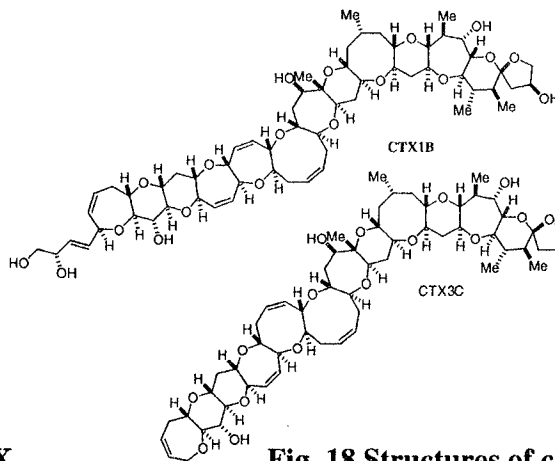


Fig. 18 Structures of ciguatoxins

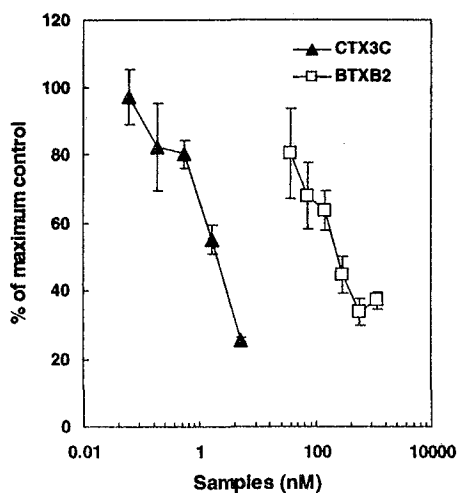


Fig. 19 Competitive binding assay between Acridinium-BTXB2 and CTX3C or BTXB2 against rat brain synaptosome

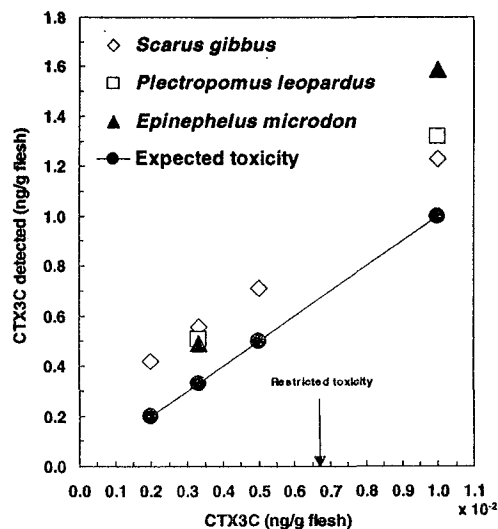


Fig. 20 Detection of CTX3C from fish samples

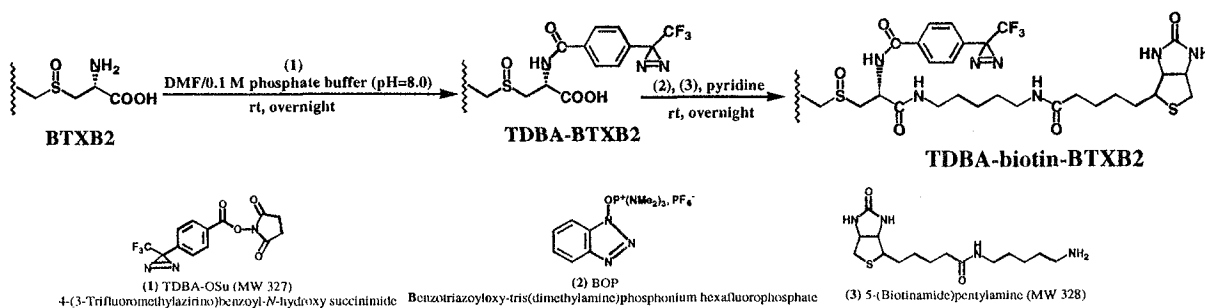


Fig. 21 Preparation of TDBA-biotin-BTXB2 (TBBTX)

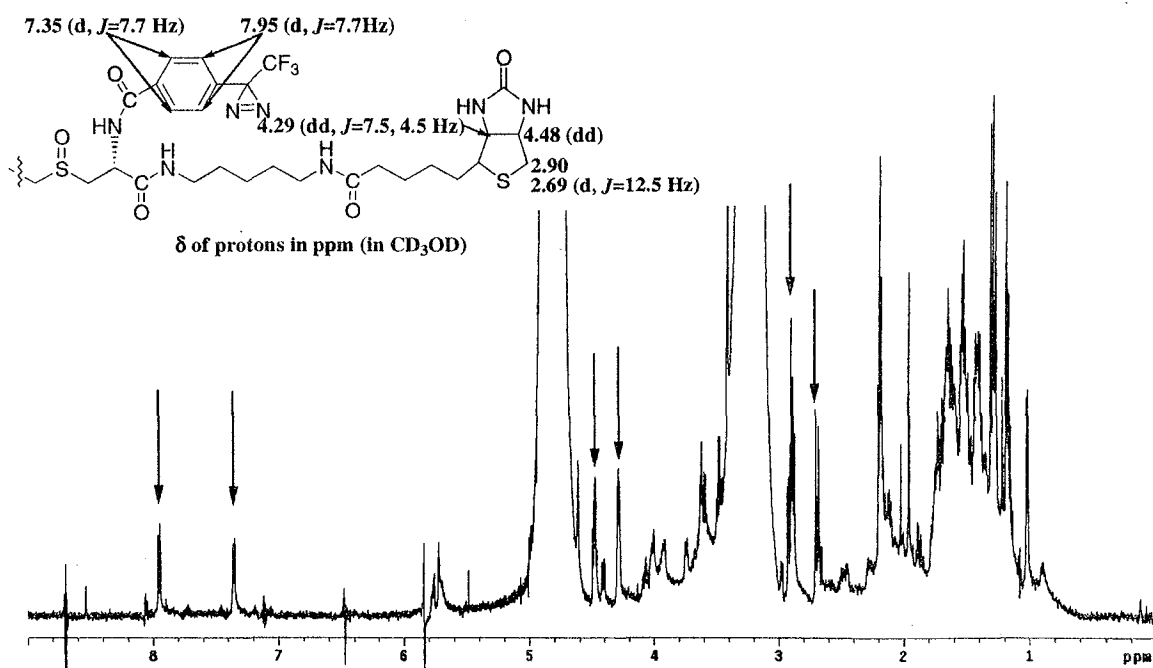
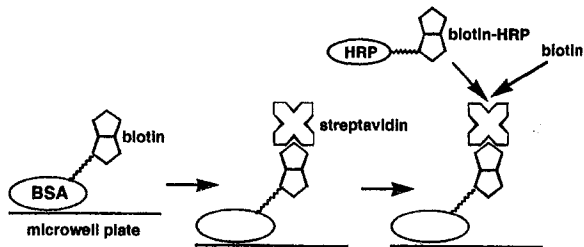
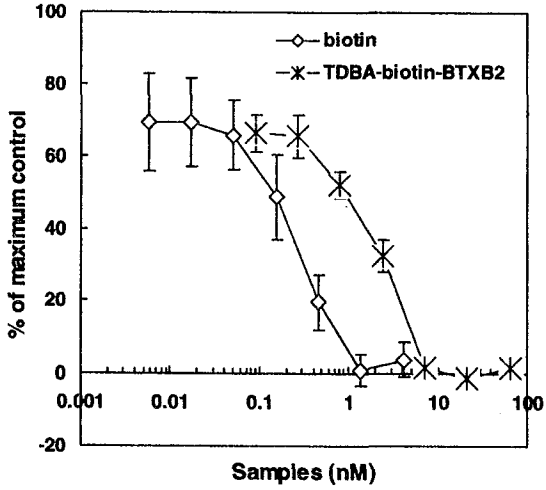


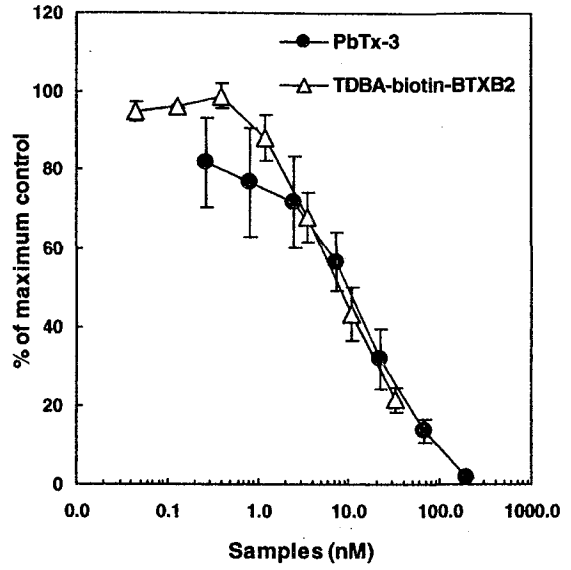
Fig. 22 <sup>1</sup>H NMR spectrum of TDBA-biotin-BTXB2 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)



E. A. Bayer et al., *Analytical Biochemistry*, 154, 367-370 (1986)



**Fig. 23** Enzyme immunoassay for biotin and TDBA-biotin-BTXB2



**Fig. 24** Competitive binding assay for PbTx-3 and TDBA-biotin-BTXB2

## 論文審査結果要旨

海洋生物毒は食中毒や魚介類の斃死を引き起こして社会的に重大な危害を及ぼす。また、特異な生理作用を有することから、様々な生命現象を分子レベルで解析する上で有用な試薬となるものが多い。しかし、その多くは分子量も大きくかつ複雑な構造を有し、その構造解析は極めて困難である。

本研究では、ニュージーランドで発生した二枚貝による神経性の食中毒の原因毒を単離し、NMRを中心とする各種分光学的手法を駆使してその化学構造を解明し、プレベトキシン-3にシステインスルホキシドが結合した新規プレベトキシン類縁体であることを明らかにした。また、その生物活性を調査して、ナトリウムチャンネル結合活性を有することを明らかにすることによって、ヒトの食中毒にプレベトキシン類が関与する直接的証拠を世界で初めて明らかにした。さらに、精密な化学変換によって高感度な検出を可能とする化学発光誘導体を調製することにより、プレベトキシン類のみでなく、精密な試験法が待望されているシガトキシンを含めた結合試験への応用を試み、感度、精度共に優れた方法を開発した。さらに、この成分にフォトアフィニティーリガンドと検出用のビオチンを結合させることによって検出感度、ナトリウムチャンネル結合能共に優れた化合物の合成に成功し、神経の刺激伝導機構など今後の薬理、生理学研究に強力な武器を提供することとなった。

本研究で対象とした化合物は食中毒の原因として公衆衛生や水産業に与える影響が大きい重要な化合物であることから、その構造が明らかにされた意義は大きい。また、単に構造を明らかにするだけでなく、そこで得られた生物活性を含む情報をもとに、精密化学変換を使って全く新しい研究資材を設計・創出する研究の方向性は極めて独創的である。

以上のように、村田和也による本研究の成果は、独創性に富むばかりでなく、本分野の将来の研究に大きく貢献するものであることから、審査員一同は、これを博士(農学)の学位を授与するに値するものと判定した。