

12. テトロドトキシン抵抗型 NavCh 阻害剤の創製研究

長澤 和夫

東京農工大学 大学院工学研究院 生命工学専攻 生命有機化学分野

Key words : サキシトキシン, ゼテキトキシン AB, 電位依存性ナトリウムチャンネル, テトロドトキシン抵抗型

緒言

電位依存性ナトリウムチャンネル (NavCh) は、心筋、骨格筋、中枢神経などの興奮性細胞に発現する膜タンパクであり、生命活動における活動電位の発生・伝播に関与している。NavCh の天然リガンドとして、フグ毒テトロドトキシン (TTX) が知られている。NavCh はこれまでに9つのサブタイプ (Nav1.1~ Nav1.9) が見出されているが、これらは TTX に対する感受性の違いから、TTX 感受性型 (TTX-s) と TTX 抵抗型 (TTX-r) に大別される。TTX-r (Nav1.5、Nav1.8、Nav1.9) は、心筋、痛覚に関与することから、これらを選択的に阻害する化合物の創製は、抗不整脈、抗疼痛等の薬剤開発につながる。貝毒サキシトキシン (STX) は、TTX と同様、NavCh に対する数少ないリガンドである。STX も TTX と同様、TTX-s に対して阻害活性を示すが、TTX-r には阻害活性を示さない。STX はこれまで数多くの類縁体が単離されているが、その一つである、矢毒ガエルから単離されたゼテキトキシン AB (ZTX) は、STX の基本構造を有しながら、TTX-r を含む NavCh のいずれのサブタイプにも阻害活性を示す¹⁾。従って STX の骨格をもとに適切な構造展開を行うことで、TTX-r への阻害剤の開発が期待できる。

そこで本研究では、ZTX と STX の構造の違いに着目した構造展開研究を行い、TTX-r へ阻害活性を有する化合物の創製を目的とした。ZTX は、STX 骨格中の C11 位から炭素-炭素結合を介して特異な大環状骨格を有することから、STX の C11 に着目した構造展開を行い、合成した化合物の NavCh 阻害活性を評価した。

方法、結果および考察

Saxitoxin (STX) (1) は、これまで 50 種以上の類縁体が報告されている。Fig. 1 に STX (1) およびその代表的な類縁体 2~3、zetekitoxin AB (ZTX) (4) の構造を示した。ZTX (4) は、STX の C11 位から C13 位にかけて 10 員環の特異な構造を有している。特に 4 は STX 類縁体の中で、C11 位に炭素-炭素結合を有している極めて希な類縁体であり、4 の他に 11-saxitoxinetahnoic acid (SEA) (5) が知られているのみである (Fig. 1) ²⁾。本研究では、STX (1) と ZTX (4) の構造的な差異から、STX の C11 位に炭素-炭素結合を介した誘導体に着目することで、TTX-r に対する阻害活性を有する化合物の創製を計画した。

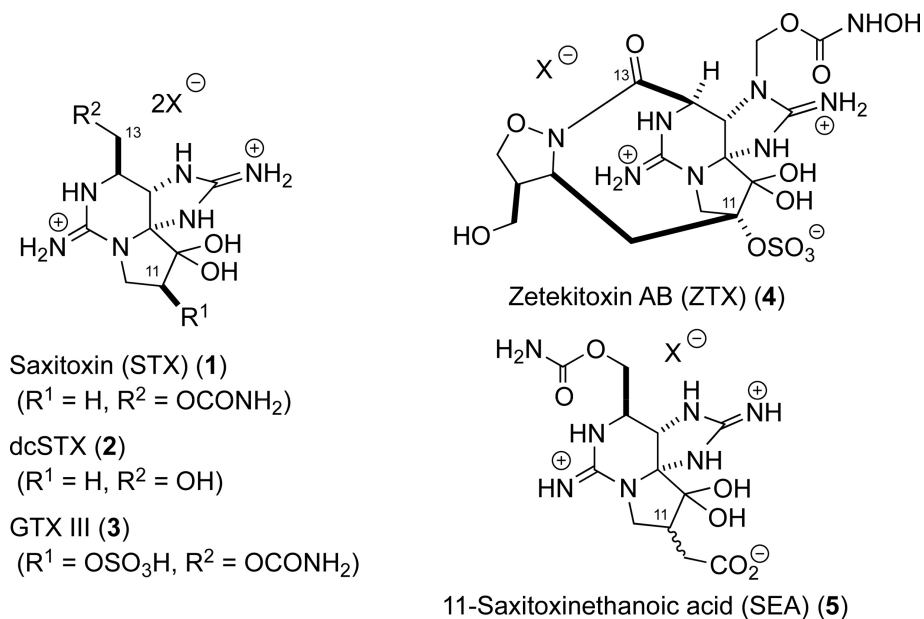
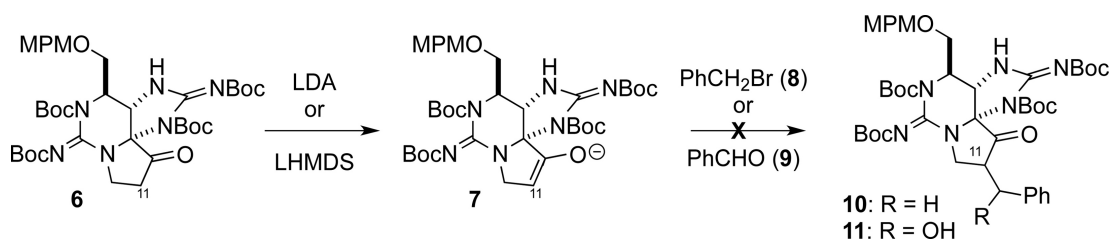


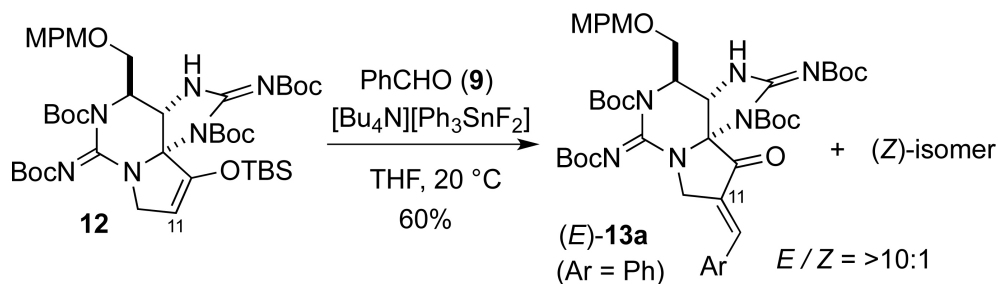
Fig. 1. Structure of saxitoxin (**1**) and its natural analogs **2**~**5**

STX の C11 位に着目した誘導体の合成を行うために、まず C11 に対する炭素-炭素結合の導入について検討を行った。即ち、私達が以前に報告した STX の全合成における鍵中間体ケトン **6** を用い³⁾、アルキル化反応またはアルドール反応を検討することとした。ケトン **6** に対し強塩基 (LDA または LHMS) を作用させエノレート **7** とし、これにベンジルブロミド (**8**) またはベンズアルデヒド (**9**) を反応させた。しかし目的とする C11 位にベンジル基が導入された **10** または **11** は痕跡量しか得られず、ほぼ原料のケトン **6** が回収された (Scheme 1)。



Scheme 1. Alkylation or Aldol reaction of ketone **6** with benzyl bromide or benzaldehyde

そこでつぎに向山型アルドール反応について検討を行った。ケトン **6** から得られるシリルエノールエーテル **12** に対し、ベンズアルデヒド (**9**) を用い、種々反応条件を検討した。その結果、THF 中、 $[\text{Bu}_4\text{N}][\text{Ph}_3\text{SnF}_2]$ を 20°C で作用させることで、目的とするアルドール縮合体 **13a** が収率 60% で得られることがわかった (Scheme 2)。そこで本反応の基質一般性 (アルデヒド) について検討を行った。その結果、種々の芳香族アルデヒドに対しても同様に反応が進行し、対応するアルドール縮合体 **13b**~**13f** が 45~80% の収率で得られることがわかった。またこの時、(*E*)-体がいずれの場合にも優先して得られた (Table 1)。



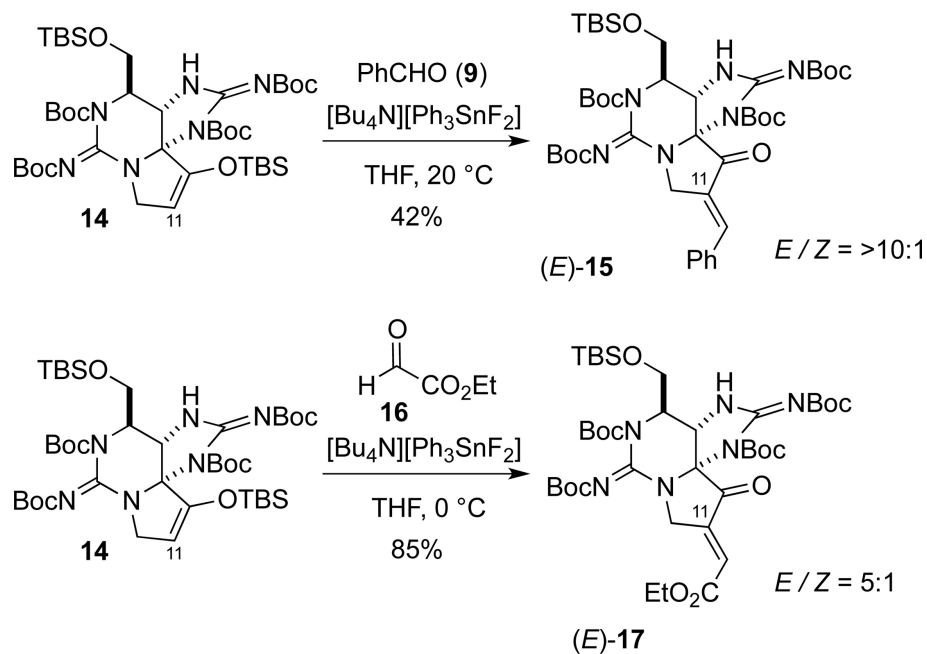
Scheme 2. Mukaiyama aldol condensation reaction of **12** with **9**

Table 1. Substrate scope of the Mukaiyama aldol condensation reaction of **12** with aromatic aldehydes

Entry	Ar (ArCHO)	Products	<i>E/Z</i>	Yield (%)
1	4-MeC ₆ H ₄	13b	>10:1	45
2	3-FC ₆ H ₄	13c	>10:1	63
3	4-ClC ₆ H ₄	13d	>10:1	65
4	4-NO ₂ C ₆ H ₄	13e	6:1	80
5	2-furyl	13f	>10:1	80

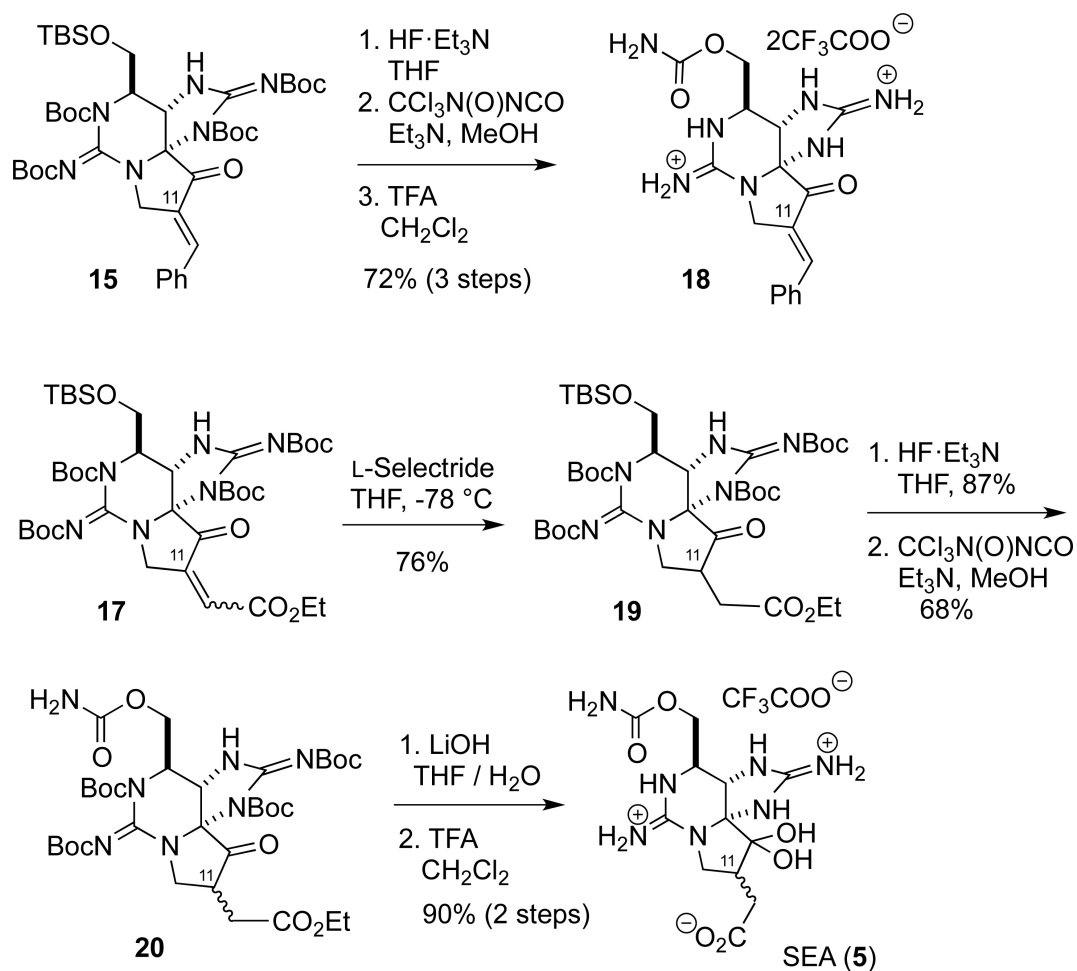
大変興味深いことに、本反応条件下では、C13位の水酸基がシリルエーテルで保護されたシリルエノールエーテル**14**を用いた場合でも同様に反応が進行した。即ち、**14**とベンズアルデヒド(**9**)およびエチルグリオキシレート(**16**)との反応において、対応するアルドール縮合体**15**および**17**がそれぞれ収率42%、85%で得られることがわかった(Scheme 3)。

以上述べた通り、シリルエノールエーテル**12**または**14**を用い、種々のアルデヒドとの向山型アルドール縮合反応を行うことで、STX骨格のC11位へ効率よく炭素-炭素結合を導入する手法を確立することができた。



Scheme 3. Mukaiyama aldol condensation reaction of **14** with **9** and **16**

そこで得られた **15** および **17** を用い、STX 誘導体 **18** および 11-saxitoxinethanoic acid (SEA) (**5**) の合成を行った (Scheme 4)。**15** に対し、HF·Et₃N を用いシリルエーテルを脱保護後、生じた水酸基をカルバモイル基に変換した。ついで Boc 基を TFA を用いて脱保護することで、STX 誘導体 **18** を合成することができた (72%、3 行程収率)。一方 **17** に対し、L-Selectride を反応させると 2 重結合が還元され **19** が 76% で得られた。ついでシリルエーテルを HF·Et₃N を用い脱保護後 (87%)、カルバモイル化を行い **20** を得た (68%)。エチルエステルを水酸化リチウムを用いて加水分解した後、Boc 基を TFA を用いて脱保護することで、SEA (**5**) を全合成することができた (90%、2 行程収率) [4](#))。



Scheme 4. Synthesis of 11-benzylidenSTX (**18**) and SEA (**5**)

得られた STA 誘導体 11-benzylidenSTX (**18**) および SEA (**5**) について、NavCh 阻害活性を Neuro-2a 細胞を用いて評価した⁵⁾。なおコントロールとしてテトロドトキシシン (TTX) を用いた (Table 2)。その結果、SEA (**5**) の阻害活性は、TTX の約 1/10 程度であったが、11-benzylidenSTX (**18**) は、TTX に匹敵する阻害活性を示すことがわかった。また加えて、C11 位に様々な置換基を導入した化合物から STX 誘導体へ変換した化合物も同様に、NavCh 阻害活性を示すことがわかった。これらの一部の化合物について、パッチクランプ法を用い NavCh のサブタイプに関する感受性を評価したところ、TTX-s と TTX-r に対する感受性が逆転する化合物を見出すことができた。これらの化合物について、今後より詳細な生物活性評価を計画する。

Table 2. NavCh inhibitory activity of **5** and **18** in a cell-based assay with Neuro-2a cells

Compound	IC ₅₀
SEA (5)	47 ± 12 nM
11-benzylidenSTX (18)	16 ± 6.9 nM
Tetrodotoxin (TTX)	5.0 ± 1.6 nM

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学大学院農学研究科教授の山下まり氏である。最後に、ご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Yotsu-Yamashita M, Kim YH, Dudley Jr. SC, Choudhary G, Pfahnl A, Oshima Y, Daly JW. The structure of zetekitoxin AB, a saxitoxin analog from the Panamanian golden frog *Atelopus zeteki*: A potent sodium-channel blocker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(13):4346-51. doi: 10.1073/pnas.0400368101. PubMed PMID: 15070720.
- 2) Arakawa O, Nishio S, Noguchi T, Shida Y, Onoue Y. A new saxitoxin analogue from a xanthid crab *Atergatis floridus*. *Toxicon* 1995;33(12):1577 – 84. PubMed PMID: 8866615.
- 3) Iwamoto O, Nagasawa K. Total synthesis of (+)-decarbamoylsaxitoxin and (+)-gonyautoxin 3. *Org Lett.* 2010;12(9):2150–3. doi: 10.1021/ol1006696. PubMed PMID: 20355743.
- 4) Wang C, Oki M, Nishikawa T, Harada D, Yotsu-Yamashita M, Nagasawa K. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(38):11600-3. doi: 10.1002/anie.201604155. PubMed PMID: 27512941.
- 5) Yotsu-Yamashita M, Urabe D, Asai M, Nishikawa T, Isobe M. *Toxicon.* 2003;42(5):557-60. PubMed PMID: 14529738.