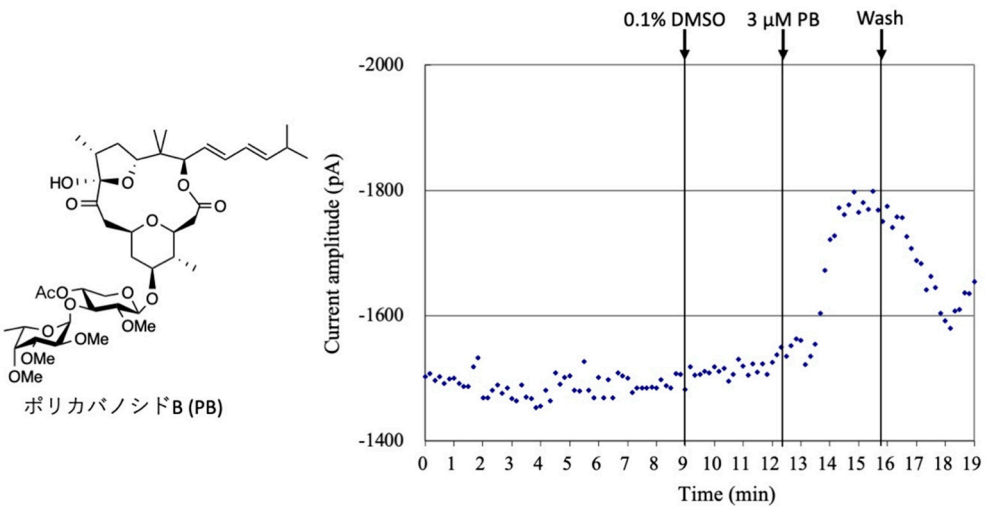
19　致死性海藻中毒原因物質ポリカバノシド類の作用機序	山下　まり

【目的】 ポリカバノシド（polycavernoside）AおよびB（PA、PB）は、1991年にグアムで発生した紅藻カタオゴノリ *Gracilaria edulis* による致死性食中毒の原因物質として単離、構造決定した化合物で、共役トリエンまたは共役ジエンを有する配糖体マクロリドである。この事例では13名が発症し3名が死亡した。さらに、2002～2003年にもフィリピンで同様の食中毒が発生し、36 名が発症し 8 名が死亡した。PA、PB のマウス腹腔内投与毒性は LD_{50} 200～400 μg/kg であった。その作用機序として、これまで、非天然型の合成PA類縁体をヒト神経芽細胞腫BE(2)M-17細胞に作用させて蛍光色素で検出する系で、細胞外 Ca^{2+} が細胞内へ流入し、脱分極が誘発されることが報告されたが、作用機序の詳細は解明されていなかった。本研究は、ポリカバノシド類の作用機序の解明を目的とした。

【方法】 上記の食中毒発生時に天然から精製したポリカバノシド類は、微量で作用機序の研究には用いることができなかった。しかし、藤原、村井らによる1998年のPAの初の全合成をはじめ、複数のグループの全合成が報告された。さらに、東北大学大学院生命科学研究科の佐々木誠教授らが2017年にPA、PBの全合成に成功し、PBを合成中間体とともに供与いただいた。これを用いて本研究の作用機序の研究を行った。ポリカバノシド類の作用機序として、その症状から神経毒が疑われたため、電位依存性Naチャネル（Na_v）および電位依存性Caチャネル（Ca_v）にターゲットを絞って調査した。まず、マウス神経芽細胞腫Neuro2Aにウアバインとベラトリジンを添加し、細胞毒性を指標に Na_v に対する作用を調べるNeuro2Aアッセイを行った。次に、Na_v、Ca_v を対象とした電気生理実験（パッチクランプ法）を実施した。また、合成中間体は一部化学誘導して構造活性相関研究に用い、Neuro2Aアッセイで評価した。

【結果】 マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞にウアバインとベラトリジン共存在下、PB を作用させると 5 μM、10 μM で細胞生存率の上昇が示された。この現象から Na_v の阻害作用が疑われたため、共同研究者の此木がNeuro2A細胞を用いた Na_v のパッチクランプ法を行ったが、25 μM で阻害活性はみられなかった。この結果および既報から、Ca_v に対する作用が考えられた。そのため、ヒト $Ca_v1.2$（$hCa_V1.2/\beta 2/\alpha 2\delta 1$）をCHO細胞に発現させた系で、電気生理実験を実施（委託）したところ、上図のようにPB 3 μMで弱い活性化作用が観測された。このことから、ポリカバノシド類の作用機序の一つとして、$Ca_v1.2$ の活性化作用が示唆された。しかし、この作用が二次的な作用である可能性は残されている。Neuro2A アッセイによる合成中間体を用いた構造活性相関研究では、側鎖がビニル基の場合は10 μMで活性が示されなかったが、ヨウ化ビニル基の場合はPB（EC_{50} 約3 μM）の約1/2の活性が見られた。この結果から、二糖を有する場合、側鎖が短くても電子豊富でかさ高い置換基（ヨウ素）があれば活性を示すことが初めて明らかになった。

ポリカバノシドB（PB）の化学構造とPB（3 μM）のヒト $Ca_v1.2$ に対する電気生理実験の結果



ポリカバノシドB (PB)

19. 致死性海藻中毒原因物質ポリカバノシド類の作用機序

山下　まり

*東北大学 大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻
天然物生物機能科学講座 天然物生命化学分野

Key words：ポリカバノシド類，食中毒，電位依存性カルシウムチャネル，作用機序，構造活性相関

緒　言

ポリカバノシドA および B（PA（**1**）、PB（**2**））（図 1）は、1991 年にグアムで発生した紅藻カタオゴノリ *Gracilaria edulis* による致死性食中毒の原因物質として安元らと単離、構造決定した化合物である［1］。この事例では 13 名が発症し 3 名が死亡した。その後、2002～2003 年にもフィリピンで同様の食中毒が発生し、36 名が発症し 8 名が死亡した事例も発生し、同様に PA、PB を同定した［2］。PA と PB はマウスに対して致死毒性を示し、マウス腹腔内投与毒性は LD_{50} 200～400 μg/kg であった。その後、藤原、村井ら［3］、および Paquette ら［4］が全合成した PA の類縁体についてマウス毒性を指標に構造活性相関研究を行い、側鎖の構造や糖部の有無が活性に大きく影響することを示した［5］。また、アグリコンの構造が PA、PB と異なる、ポリカバノシド C 類（PC、PC2）（図 1）を単離し、アグリコンのモデル化合物を合成して構造を決定した［6］。ポリカバノシド C 類の毒性は A、B に比べて低く、アグリコンの 5 員環アセタールが毒性発現に重要であることが示された。

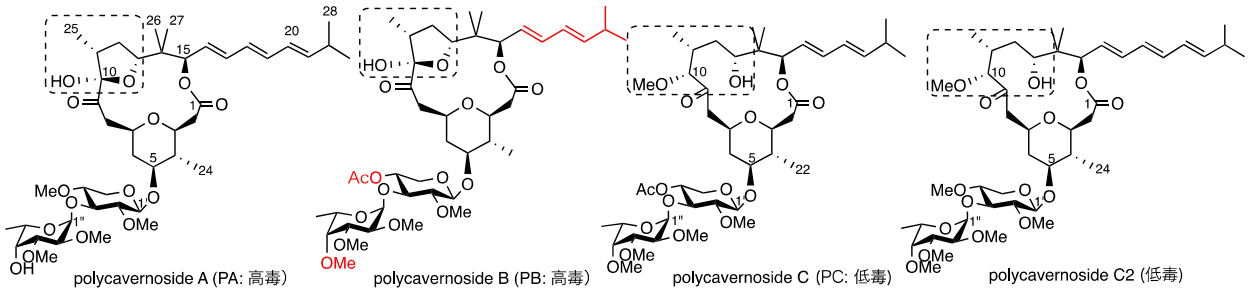


図 1. ポリカバノシド類の化学構造

ポリカバノシド類の作用機序について、これまで非天然型の合成 PA 類縁体をヒト神経芽細胞腫 BE(2)M-17 細胞に作用させ、Ca^{2+}を蛍光色素で検出する系で、細胞外 Ca^{2+}が細胞内へ流入し、脱分極が誘発されることが Botana らにより報告された［7］。しかし、作用機序の詳細は解明されていなかった。東北大学大学院生命科学研究科の佐々木誠教授らが 2017 年に PA、PB の全合成に成功し［8］、PB を合成中間体とともに供与いただいた。本研究では、その全合成された天然型 PB を用いて実験を行い、ポリカバノシド類の作用機序に関する新たなデータを得て、電位依存性カルシウムチャネル（Ca_V）の活性化作用がある可能性が強まった。また、構造活性相関に関するデータを得た。詳細について、以下に報告する。

*現在の所属：東北大学 大学院農学研究科 農芸化学専攻 食品天然物化学講座 天然物生命化学分野

方法および結果

1. Na_vに対する作用

ポリカバノシド類の作用機序として、食中毒患者の症状から神経毒であることが疑われた。そのため、電位依存性 Na チャネル（Na_v）および Ca_v にターゲットを絞って調査した。まず、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A にウアバインとベラトリジンを添加し、細胞毒性を指標に Na_v に対する作用を調べる Neuro2A アッセイを行った。Neuro2A 細胞に一定濃度の Na^+/K^+ATPase 阻害剤のウアバインと Na_v 活性化剤のベラトリジンを加えると細胞死に至るが、テトロドトキシンなどの Na_v 阻害剤を加えると濃度依存的に細胞生存率が上昇する［9］。この試験（Neuro2A アッセイ）を PB に対して実施したところ、ウアバイン、ベラトリジン存在下で PB を作用させると 5 μM、10 μM の濃度で、濃度依存的に細胞生存率が上昇することが示された（図 2）。このことから、PB の Na_v 阻害作用が疑われたため、共同研究者の此木が Neuro2A 細胞を用いた Na_v のホールセルパッチクランプ法（電気生理実験）を行った。しかし、予想に反して PB 25 μM で阻害作用は全く観測されなかった。この結果は、Neuro2A アッセイでは Na_v 阻害剤以外でも陽性の結果がでる場合があることを示していた。これはまだ報告がなく、さらにその理由を詳細に検討する必要があるが、後に述べるように PB は Ca_v 活性化作用をもつことが示されたため、Ca_v 活性化剤でも Neuro2A アッセイで陽性を示すことが示唆された。

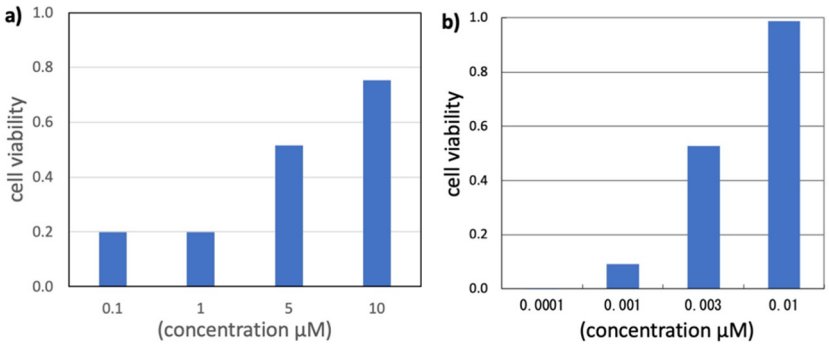


図 2. Neuro2A アッセイの結果（代表的一例）
ウアバイン、ベラトリジン存在下での Neuro2A 細胞の細胞生存率を示す。
PB（a）、比較に用いたテトロドトキシン（b）。

2. Ca_vに対する作用

上記の Neur2A アッセイで PB は陽性を示したが、Na_v 阻害作用は示されなかった。この結果および既報の結果［7］から、PB の Ca_v に対する作用が推測された。そこで、ヒト $Ca_v1.2$（$hCa_v1.2/\beta 2/\alpha 2\delta 1$）を CHO 細胞に発現させた系で、ホールセルパッチクランプ法（電気生理実験）を薬物安全性試験センターに委託して実施したところ、図 3 のように PB 3 μM で弱い活性化作用が観測された。この結果から、ポリカバノシド類の作用機序の一つとして、$Ca_v1.2$ の活性化作用が示唆された。

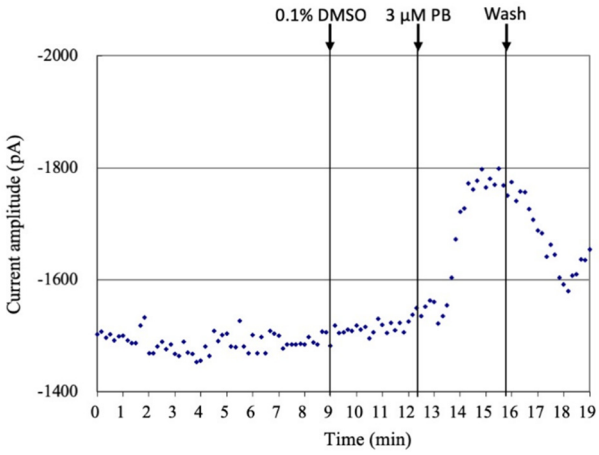


図 3. PB（3 μM）のヒト $Ca_v1.2$ に対する電気生理実験の結果（代表的一例）
9 min に比較のための 0.1% DMSO を添加し、12 min に PB（3 μM）を添加し、16 min に洗浄を開始した。

3. 合成中間体 3 から還元体 4 の調製と活性の比較

佐々木らの合成中間体 PB-vinyl iodide (**3**)（図 4）から、還元体 PB-vinyl (**4**)（図 4）を調製し、**3**, **4** の活性を PB と比較し、ポリカバノシド類の構造活性相関研究の一助とすることとした。化合物 **3** から **4** への還元反応は、佐々木らの **3** から PB へ共役ジエン側鎖を形成する際の Still カップリングの条件を参考に図 4 に示した条件［8］で行い、**3**（0.40 mg）から 43%の収率で **4**（0.14 mg）が得られ、HR-MS、^{1}H NMR で構造を確認し、^{1}H NMR で定量した。

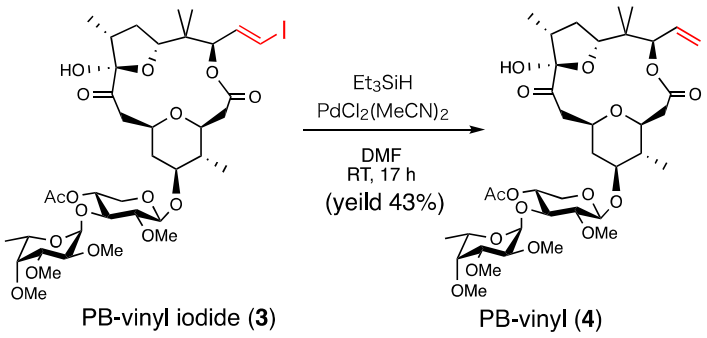


図 4. 合成中間体 PB-vinyl iodide (**3**)から PB-vinyl (**4**)の合成

上記の Neur2A アッセイで合成 PB (**2**)、**3**、**4** の活性を調べて比較した。その結果を図 5 に示す。側鎖がビニル基の場合(**4**)は 10 μM で活性が示されなかったが、ヨウ化ビニル基の場合(**3**)は PB（EC_{50} 約 3 μM）の約 1/2 の活性が見られた。この結果から、二糖を有する場合、側鎖が短くても電子豊富で、かさ高い置換基（ヨウ素）があれば活性を示すことが初めて明らかになった。

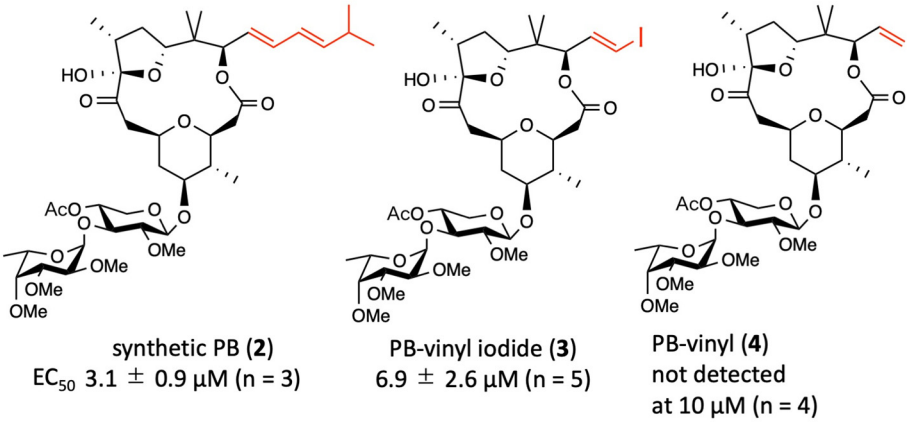


図 5. 合成 PB (**2**)、合成中間体 PB-vinyl iodide (**3**)、PB-vinyl (**4**)の Neuro2A アッセイによる活性比較

考　察

本研究では、全合成された天然型のポリカバノシド B（PB, **2**）が、3 μM でヒト $Ca_v1.2$ に対して弱い活性化作用を示した。この結果は、先に Botana らが報告している［7］、非天然型ポリカバノシド A 類縁体（12 μM）がヒト神経芽細胞腫 BE(2)M-17 細胞に蛍光色素（Fura-2）で検出する系で、細胞外 Ca^{2+}が細胞内へ流入し、脱分極が誘発される結果と矛盾しない。一方、彼らはその細胞内 Ca^{2+}レベル上昇が、nifedipine で阻害されなかったため、L-type の Ca^{2+}チャネルを介した作用ではないと考察している［7］。しかし、本研究では、天然型の PB を用いて、直接的に電気生理実験でヒト $Ca_v1.2$ が弱く活性化されることが示されたので、L-type Ca_v であるヒト $Ca_v1.2$ は、ポリカバノシド類の作用機序に関わっていると考えられる。蛍光色素による Ca^{2+}濃度の検出系では細胞内プール（小胞体）からの Ca^{2+}放出が関与して生じた可能性も考えられる。PB が、小胞体への Ca^{2+}取り込みを阻害し、小胞体 Ca^{2+}の枯渇により二次的にヒト $Ca_v1.2$ の活性化が起こっている可能性も考えられる。構造活性相関については、本研究で新しく、二糖を有し側鎖が vinyl iodide の PB 類縁体は、Neuro2A アッセイで PB の約半分の活性を保っていることが示された。一方、vinyl だけでは活性は示されなかった。これまで、二糖がない vinyl iodide ではマウス毒性がなくなることが示されたが［5］、本研究の結果から、二糖を有する場合、側鎖が短くても電子豊富でかさ高いヨウ素があれば活性を示すことが初めて明らかになった。今後、さらに十分な検討が必要であるが、ポリカバノシド類による食中毒に対して、これらの知見が有効な治療法探索の一助になれば幸いである。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、全合成ポリカバノシド B および合成中間体を譲渡下さった東北大学大学院生命科学研究科の佐々木誠教授、および Na_v パッチクランプ実験を実施して下さった東北大学大学院農学研究科の此木敬一准教授である。共同研究者並びにポリカバノシド B の合成をされた東北大学大学院生命科学研究科の岩崎浩太郎博士、佐々木理氏、川島悠岐博士、および本研究に関わった東北大学大学院農学研究科の土肥裕花氏、島田紀子氏に深謝する。

文　献

1） Yotsu-Yamashita M, Haddock LH, Yasumoto T. Polycavernoside A: A Novel Glycosidic Macrolide from the Red Alga *Polycaremosa tsudai* (*Gracilaria edulis*). *J Am Chem Soc*. 1993;115:1147-1148. doi:10.1021/ja00056a048

2) Yotsu-Yamashita M, Yasumoto T, Yamada S, Bajarias FA, Formeloza MA, Romer ML, Fukuyo Y. Identification of polycavernoside A as the causative agent of the fatal food poisoning resulting from ingestion of the red alga *Gracilaria edulis* in the Philippines. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(9):1265-1271. doi:10.1021/tx0498556

3) Fujiwara K, Murai A, Yotsu-Yamashita M, Yasumoto T. Total Synthesis and Absolute Configuration of Polycavernoside A. *J Am Chem Soc.* 1998;120:10770-10771. doi:10.1021/ja982431b

4) Paquette LA, Barriault L, Pissarnitski D. A Convergent Total Synthesis of the Macrolactone Disaccharide Toxin (-)-Polycavernoside A. *J Am Chem Soc.* 1999;121:4542-4543. doi:10.1021/ja990384x

5) Barriault L, Boulet SL, Fujiwara K, Murai A, Paquette LA, Yotsu-Yamashita M. Synthesis and biological evaluation of analogs of the marine toxin polycavernoside A. *Bioorganic Med Chem Lett.* 1999;9:2069-2072. doi:10.1016/S0960-894X(99)00341-8

6) Yotsu-Yamashita M, Abe K, Seki T, Fujiwara K, Yasumoto T. Polycavernoside C and C2, the new analogs of the human lethal toxin polycavernoside A, from the red alga, *Gracilaria edulis. Tetrahedron Lett.* 2007;48(13):2255-2259. doi:10.1016/j.tetlet.2007.02.003

7) Cagide E, Louzao MC, Ares IR, Vieytes MR, Yotsu-Yamashita M, Paquette LA, Yasumoto T, Botana LM. Effects of a synthetic analog of polycavernoside A on human neuroblastoma cells. *Cell Physiol Biochem.* 2007;19:185-194. doi:10.1159/000099206

8) Iwasaki K, Sasaki S, Kasai Y, Kawashima Y, Sasaki S, Ito, T, Yotsu-Yamashita, M, Sasaki, M. Total Synthesis of Polycavernosides A and B, Two Lethal Toxins from Red Alga. *J Org Chem.* 2017;82(24):13204-13219. doi:10.1021/acs.joc.7b02293

9) Saruhashi S, Konoki K, Yotsu-Yamashita M. The voltage-gated sodium ion channel inhibitory activities of a new tetrodotoxin analogue, 4,4a-anhydrotetrodotoxin, and three other analogues evaluated by colorimetric cell-based assay. *Toxicon.* 2016;119:72-76. doi:10.1016/j.toxicon.2016.05.012