

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（総括・分担）研究報告書

テトロドトキシンのリスク管理のための研究

研究代表者又は研究分担者

山下 まり 東北大学大学院農学研究科 教授
此木 敬一 東北大学大学院農学研究科 准教授

研究要旨

本分担研究では、主要な TTX 類縁体である 11-oxoTTX、4-*epi*TTX、11-norTTX-6(*S*)-ol について、高度に精製した純品を調製し、それぞれの TTX 類縁体についてナトリウムチャンネル阻害活性を評価することを目的とする。

平成 30 年度（今年度）は、11-oxoTTX、4-*epi*TTX、11-norTTX-6(*S*)-ol をフグやイモリ、および化学反応生成物から高度に精製する方法を確立し、LC-MS や NMR で純度を確認した。また、11-oxoTTX や 4-*epi*TTX については、初めて lactone 型の NMR シグナルを観測し、hemilactal 型と lactone 型の存在比を決定し、lactone 型の NMR シグナルを帰属して化学的データも蓄積した。さらに、TTX 類縁体のナトリウムチャンネル阻害活性を評価する方法を検討し、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いて、電気生理実験装置にて電位依存性ナトリウムチャンネルの観測に成功した。

A．研究目的

フグの有毒成分としては、テトロドトキシン (TTX) が主であるが、我々や他の研究者はフグから多くの TTX 類縁体を単離、構造決定してきた。欧州食品安全機関 (EFSA) が取りまとめた二枚貝の安全確保を主眼とした TTX に関する報告書でも、TTX 類縁体の活性について多くの記載があるが、活性の評価方法が様々で、直接比較しにくいものもある。TTX の類縁体の中で、特に 4-*epi*TTX や 4,9-anhydroTTX は TTX と化学的に平衡関係にあるため、溶液中で容易に変換する。そのため、高純度の精製した状態で生物活性を評価することは困難と考えられてきた。しかし、4-*epi*TTX は TTX とともにほぼ必ず含まれる類縁体であるので、正しく活性評価をする必要がある。TTX の主な生物活性として電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性が最もよく知られている。そこで、本研究では、4-*epi*TTX を高純度に精製して、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性を調べることにした。

さらに、11-oxoTTX はこれまで TTX よりも強い活性を示すと評価されたことがある類縁体であり、11-noTTX-6(*S*)-ol はフグ中の主な類縁体であ

る。このことから、11-oxoTTX や 11-noTTX-6(*S*)-ol も高純度に精製して、4-*epi*TTX とあわせて、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性を評価することを目的とした。

B．研究方法

B-1: TTX類縁体の精製

4-*epi*TTX と 11-oxoTTX は、含有動物由来の試料から精製する方が化学反応で調製するより効率がよいと考えられた。そのため、まず過去にフグやイモリから TTX 類縁体を抽出し、粗精製した画分から、TTX 用 LC/MS や 蛍光 HPLC を用いて分析し、これらの類縁体を比較的多く含む画分を見出した。次にその画分から、主として弱酸性陽イオン交換カラムと親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) カラムを用いて目的物を分取し、溶出フラクションを LC-MS と 蛍光 HPLC で分析し、目的物を精製した。11-norTTX-6(*S*)-ol は、まず、化学反応で TTX から誘導した。既知の反応を用いて、TTX を H_5IO_6 で酸化して 11-norTTX-6,6-diol とし、その後 $NaBH_4$ で還元し、11-norTTX-6(*S*)-ol と 11-norTTX-6(*R*)-ol の混合物を得て、その混合物から

11-norTTX-6(S)-olを上述の液体クロマトグラフィーで精製した。さらに、量を確保するために11-norTTX-6(S)-olはフグからも精製した。

B-2: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験の確立

TTX類縁体の精製Neuro2A細胞に対して電気生理学的手法の一つであるホールセル記録法を適用し、電位依存性ナトリウムチャンネルに対するTTX類縁体の阻害効果を調査した。

C. 研究結果及び考察

C-1: TTX類縁体の精製

4-*epi*TTXはコモンフグ卵巣およびシリケンイモリの皮膚由来粗精製画分に、11-oxoTTXはスジモヨウフグの皮膚由来の粗精製画分に比較的高濃度で存在していた。そのため、上述の方法で液体クロマトグラフィーを繰り返し行い、4-*epi*TTXは90 µg、11-oxoTTXは30 µgを精製した。4-*epi*TTXは¹H NMR, LC-MS, 蛍光HPLCで純度を確認した。LC-MSで他の低活性の類縁体が微量(2%程度)に検出されたが、どの分析方法でもTTXは検出されず、4-*epi*TTXの純度は約98%と考えられ、活性測定に支障ないと判断した。また、4-*epi*TTXは、COSY, TOCSY, HSQC, HMBCスペクトルも測定し、これまで帰属されていなかった化学平衡体のlactone型のNMRシグナルの帰属も行い、hemilactal型-lactone型の比率も決定できた。

11-oxoTTXはLC-MSと蛍光HPLCで純度を確認した結果、TTXや他の類縁体は検出されず、98%以上の純度であると思われた。¹H NMRも測定し、TTX類縁体以外の不純物は少量検出されたが、TTXや類縁体は検出されなかった。なお、11-oxoTTXは、存在比の高い化学平衡体のhemilacta型でも¹³C NMRのデータの報告がなく、存在比の低い10,7-lactone型は存在が報告されていないが、今回得られた純品では検出されており、COSY, TOCSY, HSQC, HMBCスペクトルも測定し詳細に解析し、これらのNMRデータを新たに取得できた。

11-norTTX-6(S)-olの調製では、TTX粗精製物(1-2 mg)をH₅IO₆で酸化し、処理後に¹H NMRとHR-

ESI-MSを測定して反応を確認した。反応ではNaBH₄による還元反応も既報通り進むことを蛍光HPLCやLC-MSで確認した。反応物は活性炭とHILICカラムなどによる精製を行い、上述と同様に純度を確認した。また、フグ卵巣からも精製し、純度98%の11-norTTX-6(S)-olが約100 µg得られた。以上のように、活性測定に十分な純度の類縁体を予定どおり順調に調製できた。この3つの化合物について、これ以上多くの量を精製することは困難と考えられ、次年度からの活性測定は、今回精製した分を使用して行う予定である。

C-2: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験の確立

理化学研究所より、マウス神経芽細胞腫Neuro 2Aを譲渡して頂き、所有の電気生理実験装置にて電位依存性ナトリウムチャンネルの観測に成功した。標品として、TTXに対する感受性を評価した結果、IC₅₀(濃度)は文献記載値に近く、観測系の確立を確認した。溶液調整から感受性評価を終えるまで最大1-2時間前後となり、分解を含む化合物の構造変換が生じる可能性を極力、抑えられると判断した。

D. 結論

平成30年度(今年度)は、4-*epi*TTX 90 µg、11-oxoTTX 30 µg、11-norTTX-6(S)-ol 100 µgを約98%の純度で精製した。また、これまで決定されていなかった4-*epi*TTXと11-oxoTTXのhemilactal型-lactone型の比を決定し、¹³C NMRシグナルも含めてほぼ全てのシグナルの帰属をおこない、化学的データを蓄積した。これらの精製品は、今後の電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験を行うのために使用可能と思われる。また、マウス神経芽細胞腫Neuro 2Aを用いて、電気生理実験装置にて電位依存性ナトリウムチャンネルの観測に成功した。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Dietrich Mebs*, Mari Yotsu-Yamashita, Werner Pogoda, Joseph Vargas Alvarez, Raffael Ernst, Gunther Köhler, Stefan W. Toennes, Lack of alkaloids and tetrodotoxin in the neotropical frogs *Allobates* spp. (Aromobatidae) and *Silverstoneia flotator* (Dendrobatidae). *Toxicon* 152, 103-105, 2018.

Mari Yotsu-Yamashita*, Yuuma Nagaoka, Koji Muramoto, Yuko Cho and Keiichi Konoki, Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein (PSTBP) Analogues in the Blood Plasma of the Pufferfish *Arothron nigropunctatus*, *A. hispidus*, *A. manilensis*, and *Chelonodon patoca*, *Mar. Drugs* 2018, 16(7), 224.

Dietrich Mebs*, Max Lorentz, Mari Yotsu-Yamashita, Daniela C. Rößler, Raffael Ernst, Stefan Lötters, Geographic range expansion of tetrodotoxin in amphibians - First record in *Atelopus hoogmoedi* from the Guiana Shield, *Toxicon*, 2018, 150, 175-179.

Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Mari Yotsu-Yamashita*, Spiro Bicyclic Guanidino Compounds from Pufferfish, Possible Biosynthetic Intermediates of Tetrodotoxin in Marine Environments, *Chemistry, a European Journal*, 2018, 24, 7250-7258.

2. 学会発表

山下まり 2018 年度農芸化学会東北支部シンポジウム 天然有機化合物が拓く新研究展開 2018.6.30 秋田大学地方創生センター2号館 大セミナー室 化学的手法による海産毒の生合成経路の推定 (招待講演)

塚本匡顕, 千葉雪絵, 若森 実, 日高將文, 山田智士, 角替俊輔, 長 由扶子, 榊原 良, 今津拓也, 所 聖太, 佐竹佳樹, 安立昌篤, 西川俊夫, 山下まり, 此木敬一 第60回天然有機化合物討論会、テトロドトキシン類縁体に対する電位依存性ナトリウムチャンネルの感受性評価、福岡県久留米市 2018.9.26-9.28 (ポスター)

山下まり 「第22回天然薬物の開発と応用シンポ

ジウム」日本薬学会生薬天然物部会 2018.10.7-8 熊本大学薬学部 (熊本市) 中間体を基盤とした海産毒の生合成研究 (特別講演)

山下まり 仙台青葉学院短期大学講演会、海洋生物毒の謎に迫る 2018.10.29 (招待講演)

Mari Yotsu-Yamashita, Nozomi Ueyama, Keita Sugimoto, Yuji Yaegashi, Yuta Kudo, Ken-ichi Onodera, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Toshio Nishikawa, Identification of seven possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin in marine environments isolated from pufferfish, ICHA 2018 2018.10.21-26 Nantes, France, 18th International conference on Harmful Algae, Nantes, France 25th October, 2018. (Selected, Oral)

杉本敬太、工藤雄大、宮坂忠親、安立昌篤、長由扶子、此木敬一、千葉親文、西川俊夫、山下まり、テトロドトキシン推定生合成中間体のテトロドトキシン含有生物への投与、日本農芸化学会2019年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

沼野 聡、工藤雄大、長 由扶子、此木敬一、山下まり、東日本で養殖したホタテガイ中の LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析、日本農芸化学会2019年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

工藤雄大、長 由扶子、此木敬一、山下まり、陸上由来のテトロドトキシン新規類縁体、生合成関連化合物の構造と生理活性、日本農芸化学会2019年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

山田智士、安達栞菜、長 由扶子、山下まり、此木敬一、長澤和夫、電位依存性ナトリウムチャンネルに対するサキシトキシン誘導体の阻害活性評価、日本農芸化学会2019年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

春日政人, Clyde Gorapava Puilingi, 角替俊

輔、中崎敦夫、長 由扶子、西川俊夫、此木敬一、山下まり、ソロモン諸島産の海洋生物中の Na_v 阻害活性物質の探索、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019/3/24-27、東京農大、口頭

山下まり、佐藤恭佳、工藤雄大、長 由扶子、此木敬一、高純度テトロドトキシン類縁体の調製と定量(仮題)、2019 年度日本水産学会春季大会、2018/3、東京海洋大学、口頭

星 美波、安達菜菜、山田智士、大木麻菜、石塚 颯、此木敬一、山下まり、長澤和夫、C11 位に着目した新規サキシトキシン誘導体の合成及びパッチクランプ法を用いた Na チャネル阻害活性評価、日本化学会 第 99 春季年会 2019/3 ポスター

Tadaaki Tsukamoto, Yukie Chiba, Shunsuke Tsunogae, Tomoshi Yamada, Yuko Cho, Ryo Sakakibara, Takuya Imazu, Shouta Tokoro, Yoshiki Satake, Yuki Ishikawa, Yoshiki Nakane, Masaatsu Adachi, Atsuo Nakazaki, Toshio Nishikawa, Minoru Wakamori, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi Konoki*, Sensitivity of the voltage-gated sodium channel subtypes, $\text{Na}_v1.1$ to $\text{Na}_v1.7$, against guanidine-containing natural products and their analogues. Frontier Research on Chemical Communications, The MEXT Grant-in aid for Scientific Research on innovative Area, The 1st International Symposium on Chemical Communication, Hitotsubashi Hall, National Center of Sciences Building (Tokyo) 9-10th January, 2019 (Poster).

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

