

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。

令和元年度（今年度）は、さらに 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し、LC-MS や NMR で純度を確認し、活性測定に十分な純度の予定していた類縁体を調製した。また、これらの TTX 類縁体について、TTX 標品を外部標準として、<sup>1</sup>H NMR スペクトル測定による定量(qNMR)を行った。さらに、これらの TTX 類縁体を用いて、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害活性を評価するため、マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A を用いた比色法と、同細胞を用いたホールセルパッチクランプ法での評価について検討した。

## 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した。まず過去にフグやイモリから TTX 類を抽出し、粗精製した画分から、TTX用LC/MSや蛍光HPLCを用いて分析した。これらの類縁体を比較的多く含む画分から、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<sub>5</sub>I<sub>0</sub><sub>6</sub>で酸化して11-norTTX-6,6-diolとし、その後NaBH<sub>4</sub>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: TTX類縁体の定量

上記のように、高純度に精製した4-*epi*TTX, 11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-olは、渡邊らがTTXのNMR定量法として報告した方法(Watanabe et al., 2019)を参考に、<sup>1</sup>H NMRで定量することを試みた。それぞれの類縁体を、4% CD<sub>3</sub>COOD/D<sub>2</sub>O に溶解し、内径5 mmのNMR tubeにいれて、液高3.5 cmとした。外部標準として、中央水 8 研で調製、定量したTTX標品1 μg/μLを、同様に5 mmのNMR tubeにいれ、液高3.5 cmとしてそれぞれ<sup>1</sup>H NMRスペクトルを測定し、各シグナルの積分値を比較した。

#### B-3: 電位依存性ナトリウムチャンネル(Na<sub>v</sub>)阻害試験(Neuro2A細胞を用いた比色法)

4-*epi*TTX, 11-oxoTTX, 11-norTTX-6(S)-olは、簡便なマウス神経芽細胞腫Neuro2A細胞を用いた比色法により、電位依存性ナトリウムチャンネルに対する阻害作用を評価することをまず検討した。方法は既報の通りである(Sarunashi et al., 2016, Toxicon)。すなわち、Na<sub>v</sub>を発現しているNeuro2A細胞に、Na<sub>v</sub>活性化剤のveratridine (VTD)とNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase阻害剤のOuabainを加えて、細胞内のNa<sup>+</sup>濃度が過剰になる条件下に細胞をおき、24時間後に、ホルマザン試薬のWST-8を加えて細胞生存率を計測する方法である。TTXなどのNa<sub>v</sub>阻害剤を加えることにより、細胞生存率が上昇するため、それを指標にNa<sub>v</sub>阻害活性を評価する。本方法では、特に4-*epi*TTXは中性条件で、化学的な不安定性により、高活性のTTXに変換することが懸念されるため、4-*epi*TTXについて、本方法の条件下で、どの程度TTXに変換するかをTTX用蛍光HPLCを用いて検討した。実際に上記の試験終了後(24時間37度放置、WST-8を添加してさらに2時間37度放置後)、4-*epi*TTXを最終濃度1 μM加えた細胞培養液を抜き取り、濾過後にTTX用蛍光HPLCに供して培地中のTTX類を分析した。

#### B-4: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験(電気生理実験)

電位依存性ナトリウムチャンネルには9つのサブタイプが存在し、Na<sub>v</sub>1.1-1.9と分類されている。複数のサブタイプが発現するNeuro2A細胞に対してTTX類縁体の作用を調べることは仮にTTX類縁体にサブタイプ選択生が見られる場合、Navへの作用を見逃す可能性がある。そこで、Nav1.5、Nav1.8、Nav1.9の3つのサブタイプを除く他6つのサブタイプの293T細胞への発現を試みることにし、各Navサブタイプの観測にも成功した。

### 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<sup>1</sup>H 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。<sup>1</sup>H 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hemilactal型でも<sup>13</sup>C 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H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>で酸化し、処理後に<sup>1</sup>H NMRとHR-ESI-MSを測定して反応を確認した。反応ではNaBH<sub>4</sub>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。

#### C-2: 類縁体のNMR定量

TTXのH4aシグナルの積分値と、各類縁体のH4aシグナルの積分値を比較することにより、上記の3類縁体を定量できた。Hemilactal型とlactone型のH4aシグナルが分離している場合は、それぞれを測定して合計を定量値とした。

#### C-3: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験 (Neuro2A細胞を用いた比色法)

本方法で、安定なTTX類縁体を評価できることはこれまでの実績からもわかっている。しかし、蛍光HPLCによる分析結果から、4-epiTTXは、本試験条件の計26時間37度細胞培養液(RPMI 1640 10% FBS)中放置後に、0.7%しか残存せず、57%がTTXに変換し、他は回収できていないか、非活性型のテトロドトキシン酸タイプの化合物に変換したと思われる。このことから、本方法では、4-epiTTXの活性試験として適さないことが示された。そこで、短時間で結果がでる電気生理実験に供する必要があることが確認された。

#### C-4: 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験 (電気生理実験)

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、IC<sub>50</sub> (濃度) は文献記載値に近く、観測系の確立を確認した。溶液調製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

令和元年度(今年度)は、活性試験に用いるために、高度に精製した4-epiTTX、11-oxoTTX、11-norTTX-6(S)-olを<sup>1</sup>H NMRスペクトルを用いて定量した。また、Neuro2A細胞を用いた比色法による電位依存性ナトリウムチャンネル阻害試験の実験条件において、4-epiTTXの安定性について調べ、本実験の条件下ではほぼ残存することができず、56%がTTXに変換していた。このことから4-epiTTXは、短時間で結果をだすことができる、電気生理実験で活性評価することが必要であることを確認した。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yuta Kudo and Mari Yotsu-Yamashita, Isolation and biological activity of 8-epitetradotoxin and the structure of a possible biosynthetic shunt product of tetrodotoxin, Cep-226A, from the newt, *Cynops ensicauda popei*, *Journal of Natural Products*, 82, 1656-1663, 2019.  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b00178>

Yukari Maeno, Ryuta Terada, Yuichi Kotaki, Yuko Cho, Keiichi Konoki, and Mari Yotsu-Yamashita, Possible biosynthetic products and metabolites of kainic acid from the red alga, *Digenea simplex*, and their biological activity, *Journal of Natural Products*, 82, 1627-1633, 2019.  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b00128>

Takashi Minowa, Yuko Cho, Yasukatsu Oshima, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita, Identification of a Novel Saxitoxin Analogue, 12-Deoxygonyautoxin 3, in the Cyanobacterium, *Anabaena circinalis* (TA04), *Toxins* 2019, 11, 539  
<https://doi.org/10.3390/toxins11090539> (open access)

Satoshi Numano, Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki and Mari Yotsu-Yamashita, Temporal Variation of the Profile and Concentrations of Paralytic Shellfish Toxins and Tetrodotoxin in the Scallop, *Patinopecten yessoensis*, Cultured in a Bay of East Japan, *Mar. Drugs*, 2019, 17(12), 653;  
<https://doi.org/10.3390/md17120653> (open access)

Ryuichi Watanabe, Masato Tanioka, Hajime Uchida, Ryoji Matsushima, Hiroshi Oikawa, Masahiro Matsumiya, Mari Yotsu-Yamashita, and Toshiyuki Suzuki, Quantitation of tetrodotoxin and its analogues with a combination of liquid chromatography - tandem mass spectrometry and quantitative <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 2019, 67, 46, 12911-12917.  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.9b06380>

Kanna Adachi, ‡ Tomoshi Yamada, ‡ Hayate Ishizuka, Mana Oki, Shunsuke Tsunogae, Noriko Shimada, Osamu Chiba, Tatsuya Orihara, Masafumi Hidaka, Takatsugu Hirokawa, Minami Odagi, Keiichi Konoki,\* Mari Yotsu-Yamashita,\* Kazuo Nagasawa\* (‡ contributed equally to this work), Synthesis of C12 keto saxitoxin derivatives with unusual inhibitory activity against voltage gated sodium channels, *Chem. Eur. J.*, 2020, 26, 2025-2033.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chem.201904184>

Dietrich Mebs, Mari Yotsu-Yamashita, Katharina Hartmann, Christine Elbert, Richard Zehner, Stefan W. Toennes, Revisited - Failure of tetrodotoxin to protect red-spotted newts, *Notophthalmus viridescens*, from endoparasites, *Toxicon*, 2020, 178, 77-81.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.02.026>

## 2. 学会発表

○前野優香理、小瀧裕一、寺田竜太、長由扶子、此木敬一、山下まり：第30回万有仙台シンポジウム神経興奮物質カイノイド類の生合成中間体の同定及び生理活性評価 2019.6.29 ポスター

○Yuko Cho, Shigeki Tsuchiya, Takuo Omura, Kazuhiko Koike, Hiroshi Oikawa, Keiichi Konoki, Yasukatsu Oshima and Mari Yotsu-Yamashita: Metabolomic study of saxitoxin biosynthesis in dinoflagellates using <sup>15</sup>N-labelled sodium nitrate as a nitrogen source, Gordon reserch conference, Mycotoxins and Phycotoxins, June 16 - 21, 2019, Stonehill College, 320 Washington Street, Easton, MA, US. Poster.

○Yukari Maeno, Yuichi Kotaki, Ryuta Terada, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita: Identification of biosynthetic intermediates of amnesic shellfish toxin domoic acid and anthelmintic compound kainic acid Gordon reserch conference, Mycotoxins and Phycotoxins, June 16 - 21, 2019, Stonehill College, 320 Washington Street, Easton, MA, US. Poster.

○角替俊輔、此木敬一、山下まり、八代田陽子、村田道雄、Charles Boone, Jason Moffat: Crip Screening による Maitotoxin の作用標的分子探索、新学術領域化学コミュニケーションのフロンティア, 第三回若手シンポジウム, 2019.6.26 大阪大学豊中キャンパス大阪大学会館 口頭

○山下まり:テトロドトキシン類縁体の電位依存性 Na チャネル阻害活性と生合成経路の推定第46回日本毒学会学術年会,シンポジウム「海産毒リビジテッド」, 2019年6月26日 招待講演

○前野優香理、小瀧裕一、寺田竜太、長由扶子、此木敬一、山下まり:神経興奮物質カイノイド類の生合成中間体の同定及び生理活性評価, 第30回万有仙台シンポジウム, 2019年6月29日 poster

○山下まり:中間体に基づく海洋生物毒の生合成研究,東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教

室セミナー, 2019年7月5日 招待講演

Kudo, Y. and Yotsu-Yamashita, M. : Identification of new analogs and putative biosynthetic intermediates of tetrodotoxin aimed at elucidating its biosynthetic pathway and structure activity relationship, 60th American Society of Pharmacognosy Annual Meeting, 2019 2019年7月13日 口頭

○Goto, M., Kikuchi, S., Okada, K., Cho, Y., Yotsu-Yamashita, M. and Konoki, K. : Screening of novel secondary metabolites from microorganisms associated with the marine sponge *Halichondria okadai*, Tohoku University's Chemistry Summer School, 2019年7月27日 Poster

○Yaegashi, Y., Ueyama, N., Kudo, Y., Cho, Y., Konoki, K. and Yotsu-Yamashita, M. : Isolation and structural elucidation of tetrodotoxin related compounds from pufferfish, Tohoku University's Chemistry Summer School, 2019年8月27日 Poster

宮坂忠親, 安立昌篤, 工藤雄大, 杉本敬太, 山下まり, 西川俊夫: テトロドトキシンの推定生合成中間体の全合成と絶対立体配置の決定, 第61回天然有機化合物討論会, 2019年9月11日 口頭

○安達菜菜, 石塚 颯, 山田智士, 日高將文, 広川貴次, 小田木 陽, 此木敬一, 山下まり, 長澤和夫: C11位炭素置換型サキシトキシン誘導体の合成と活性評価, 第61回天然有機化合物討論会, 2019年9月11日 poster

○前野優香理, 小瀧裕一, 寺田竜太, 長 由扶子, 此木敬一, 山下まり: ドウモイ酸とカイニン酸の新規関連化合物の単離 構造決定と生合成経路, 第61回天然有機化合物討論会, 2019年9月11日 poster

○沼野 聡, 加賀克昌, 工藤雄大, 山下まり: ホタテガイに含有する麻痺性貝毒の代謝物に関する研究, 第115回日本食品衛生学会学術講演会, 2019年10月4日 poster

○山下まり: 海洋生物毒の謎に迫る, 仙台青葉学院短期大学講演会, 2019年10月7日 招待講演

○赤松みちる, 長 由扶子, 此木敬一, 山下まり : 淡水産藍藻 *Anabaena circinalis* (TA04 株) における新規麻痺性貝毒類縁体の探索, 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日

工藤雄大, 山下まり: LC-MS/MSを用いた抗マラリア活性天然物サリニポスチンの新規類縁体の探索, 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日

○角替俊輔, Katherine Chan, Amy Hin Yan Tong, Kamaldeep Kaur Aulakh, Andrea Habsid, 八代田陽子, Jason Moffat, Charles Boone, 山下まり, 村田道雄, 此木敬一: Crispr スクリーニングによる maitotoxin の標的分子探索(1), 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日口頭

角替俊輔, Katherine Chan, Amy Hin Yan Tong, Kamaldeep Kaur Aulakh, Andrea Habsid, 八代田陽子, Jason Moffat, Charles Boone, 山下まり, 村田道雄, ○此木敬一: Crispr スクリーニングによる maitotoxin の標的分子探索(2), 公益社団法人日本農芸化学会東北支部・第154回大会, 2019年11月9日 口頭

此木敬一: 海洋天然毒の作用機序解明, 生物有機化学講演会, 九州大学理学部化学科(2019年12月3日) 招待講演

沼野 聡, 加賀克昌, 工藤雄大, 山下まり: 岩手県

産ホタテガイの中腸腺に含有する麻痺性貝毒の分析, 第 56 回 全国衛生化学技術協議会年会, 2019 年 12 月 5 日 Poster

○山下まり, 土肥裕花, 島田紀子, 岩崎浩太郎, 佐々木 理, 川島悠岐, 此木敬一, 佐々木誠: 致死性海藻中毒原因物質ポリカバノシド類の作用機序, 科研費新学術領域研究 化学コミュニケーションのフロンティア 第 6 回公開シンポジウム, 2019 年 12 月 9 日 Poster

高柳優夏、安達菜菜、石塚 颯、此木敬一、山下まり、小田木 陽、長澤和夫: サキシトキシン類の非天然型エナンチオマーの合成及びナトリウムチャンネル阻害活性評価, 日本化学会 第 100 春季年会 (2020), 2020 年 3 月 15 日 Poster

工藤 雄大、ハニフィン チャールス、小瀧 裕一、山下 まり: 有毒イモリより得られた N-hydroxy 型テトロドトキシン類縁体の構造解析, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月 26 日 口頭

東海林 千容、長 由扶子、赤松 みちる、安達菜菜、石塚 颯、此木 敬一、長澤 和夫、山下 まり: 麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒生物中の分析, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月 26 日 口頭

八重樫優士、工藤雄大、長由扶子、此木敬一、山下まり: フグ由来の新規テトロドトキシン関連化合物の単離と構造, 日本農芸化学会 2020 大会, 2020 年 3 月 26 日 口頭

山下まり・佐藤恭佳・千葉 修・長 由扶子・此木敬一: 高純度テトロドトキシン類縁体の定量と Nav 阻害活性, 令和 2 年度日本水産学会春季大会, 2020 年 3 月 27 日 口頭

長 由扶子、土屋 成輝、小池 一彦、此木 敬一、大島 泰克、山下 まり: コルヒチン存在下

の渦鞭毛藻サキシトキシン 生合成のメタボロミクス解析, 令和 2 年度日本水産学会春季大会, 2020 年 3 月 27 日 口頭

角替 俊輔、チャン キャサリーン、トン エイミー、ヒンヤン、アウラク カマルディーブカウアー、ハスビド アンドレア、松本 健、八代田 陽子、モファット ジェイソン、ブーン チャールズ、山下 まり、村田 道雄、吉田 稔、此木 敬一: 超活性海洋天然有機化合物マイトトキシンの標的分子探索, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月 28 日 口頭

島田 紀子、長 由扶子、此木敬一: クロイソカイメン抽出物由来電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤の探索, 日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月 28 日 口頭

## 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