

# 超活性天然分子によるイオンチャネルの特異的認識機構 Specific Recognition of Ion Channels by Superactive Natural Products

村田道雄\*

Michio MURATA\*

東京大学大学院理学研究科化学専攻

Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo

Our research objective is to understand the mechanism of interaction between polyether compounds and ion channels. Among these natural products, maitotoxin (MTX) is known as a very potent toxin implicated in seafood poisoning. The potency of MTX is extremely high and only exceeded by a few proteinoaceous ones. Thus the mode of action has attracted much attention in the wide range of biochemical/biomedical sciences. During this research programme, we could successfully elucidate that MTX-induced  $Ca^{2+}$  influx was inhibited by ganglioside GM1 and brevetoxins, which is another group of polyether marine toxins sharing similar cyclic ether moiety with MTX.

## 1. 研究目的

海洋生物から、従来の常識を越える複雑な構造と桁外れに強い生物活性を有する天然有機化合物（超活性天然物）が発見されている。近年の機器分析の進歩によって、このような化合物の構造が徐々に決定されるようになり天然物化学や有機合成化学等の分野で注目を集めている。本重点研究で取り上げたマイトトキシン (MTX) をはじめとして、パリトキシン、ゾーザンテラトキシン、プリムネシンなどがこの範疇に属すると考えられるが、構造解析の進展に比べて、生物作用の機構解明は遅れており、代表的な超活性天然物であるパリトキシンや MTX ですら未解明の部分が多い。筆者らは、MTX の作用標的分子の解明を目指して研究を行っているが、最近、MTX の立体構造が明らかになり (右下構造) [1]、その作用機構に関しても分子構造に基づいた議論ができるようになった。本研究では、代表的な超活性天然分子の分子論的作用機構の解明をイオンチャネルとの相互作用をいう観点から行うことを研究目的とした。

## 2. 研究経過

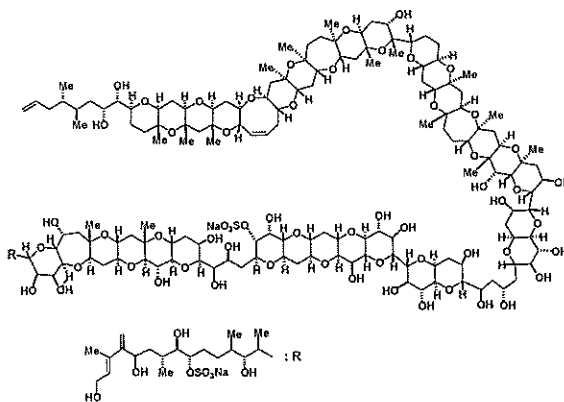
この研究で取り上げた生物毒は、当初は食中毒の原因となっていた海洋天然有機化合物である。マイトトキシン (MTX) は、当初、熱帯域で多発する魚類による食中毒であるシガテラの原因毒のひとつとして報告された。その後、シガテラの原因生物である渦鞭毛藻の *Gambierdiscus toxicus* によって生産されることが分かり、生物学的および化学的研究は、渦鞭毛藻の培養から得られた試料が用いられた。MTX の作用については、

Ohizimi らが細胞内に顕著なカルシウムの流入を促すことを発見して以来[2]、細胞生理の研究に多用されており、現在では研究試薬として頻用されている。また、化学構造については、Yasumoto らが大半を明らかにしていたが[1]、数カ所の立体化学と絶対立体配置が未解明であった。そこで、本研究では、まず、MTX の完全構造を決定することから開始した。

## 3. 研究成果

### 1) マイトトキシンの化学構造の解明

TX は、渦鞭毛藻 *G. toxicus* の培養藻体を抽出して、調製したものをを用いた。平面構造と環状部分の立体化学に関しては、通常の NMR を中心とする方法論によって解明されたが、分子両末端に存在する鎖状の部分については立体配置が未解明であった。そこで、筆者ら



マイトトキシン (MTX) の化学構造

\* 現在の所属：〒560-0043 豊中市待兼山町 1-16 大阪大学大学院理学研究科化学専攻

は、炭素—水素間のスピン結合定数を用いる方法を新たに開発し、この部分の構造を解明した。また、絶対立体配置に関しては、左上末端付近の1,2-ジヒドロキ基を過ヨウ素酸分解して得られる、3,4-dimethyl-6-hepten-1-olを用いた。このアルコールに対して4個の可能な立体化学異性体を化学合成し、光学分割ガスクロマトグラフィーで分離・同定したところ、構造に示す立体化学を有することが分かり、ここにMTXの完全構造が決定された[3]。

## 2) マイトキシシン作用のガングリオシドや細胞表層リン脂質による阻害

MTXのトリチウム標識体を用いた実験によって、細胞膜に対する親和性が高いことが示されたので、ラットグリオーマC6細胞に対するMTXのCa<sup>2+</sup>流入促進作用を指標にして種々の脂質の阻害作用を調べた。Phosphatidylcholine (PC) など脂質二重膜を形成する

脂質を添加することによって、MTX (0.3 nM) の Ca<sup>2+</sup>流入作用は濃度依存的に抑制された (PC30 mMの投与で14%に減少)[4]。これは、脂質量が増えたことによって膜中の MTX 濃度が低下し作用標的分子に対する有効濃度が下がり、結果的に MTX の作用が抑制されたと考えられる。次に、スフィンゴ糖脂質であるガングリオシド GM1 の阻害効果を調べた[5]。GM1 は非常に強く MTX の作用を阻害し、その IC<sub>50</sub> 値は約 2 mM であった (Fig. 1)。この値は、既知の MTX 阻害剤の中でも最強の部類に属する。しかし、シアル酸の脱離した化合物であるアシアロガングリオシド GM1 の阻害活性は、GM1 の 10 分の 1 以下に減少するので (Fig. 1)、シアル酸 (おそらくカルボン酸) が重要な役割を担っていると考えられる。GM1 から Gal-GalNAc 部分が脱落した GM3 の阻害活性は、GM1 と比べてやや劣るものや強い活性をやはり強い活性を示した (3 μM で約 60%に減少)。また、tunicamycin (Fig. 1) や concanabarin A で細胞を処理すると、MTX 作用の顕著な増強が認められた。これは、これらの処理によって MTX に結合する糖脂質と糖タンパク質が減少し、結果的に MTX の有効濃度が上昇したためと考えられる。

## 3) マイトキシシン作用のプレベトキシシンおよび合成フラグメントによる阻害

MTX の疎水的ポリエーテル部分と構造の類似したプレベトキシシン B (PbTx2) は、ラットグリオーマ C6 細胞に対する MTX の Ca<sup>2+</sup>流入促進作用を濃度依存的に抑制示した (3 mM で約 60%に減少)。また、tunicamycin (Fig. 1) や concanabarin A で細胞を処理すると、MTX 作用の顕著な増強が認められた。これは、これらの処理によって MTX に結合する糖脂質と糖タンパク質が減少し、結果的に、MTX の有効濃度が上昇したためと考えられる。した (Fig. 2)。この阻害作用と既知のプレベトキシシンの作用 (電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルを活性化、および高濃度での脱分極作用) との関連を調べた。その結果、MTX 作用の阻害は、テトロドトキシシンにより影響を受けないこと、また、他の脱分極剤によって阻害されないことから、Na<sup>+</sup>チャネルや脱分極を介している可能性は低い。これらの実験事実から、プレベトキシシンは、MTX の作用標的に対する結合を直接ブロックすることによって阻害作用を発現している可能性が示唆された[6]。また、MTX の合成フラグメントのうち、EF-GH 環を含むものは、顕著に MTX の作用を阻害した (Fig. 2)[6]。その脱硫酸体はほとんど阻害活性を示さなかったので、硫酸エステル存在は、MTX が作用標的分子を認識する場合に重要であることを示唆した。

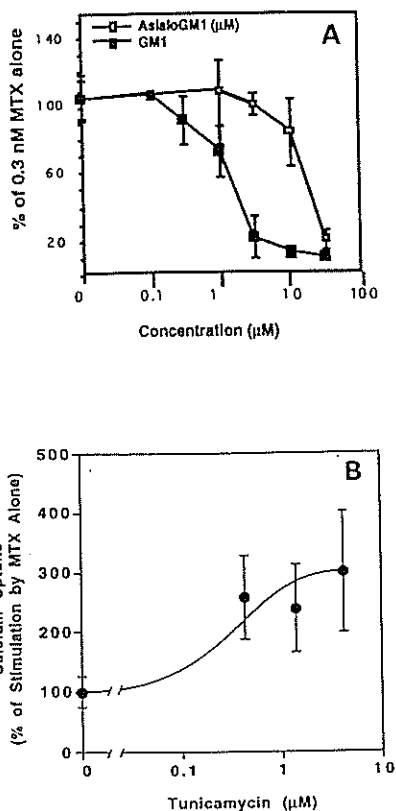


図 1. MTX が惹起するカルシウム流入に対するガングリオシド GM1 の阻害作用とツニカマイシンの活性化作用  
Fig. 1. Inhibition of MTX-induced Ca<sup>2+</sup> uptake by GM1 / asialoGM1 (A); and potentiation by tunicamycin (B)

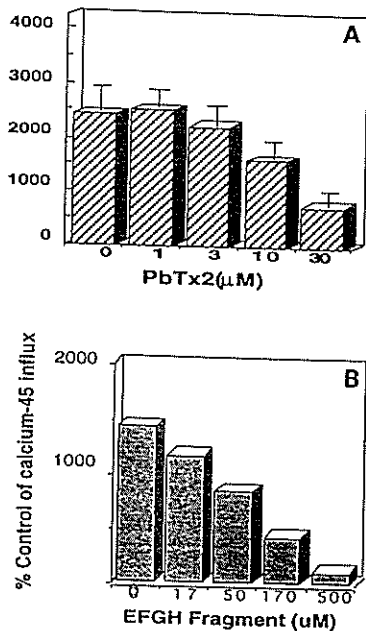


図2. MTXによるカルシウム流入作用がプレベトキシシンと合成フラグメントによって阻害を受ける。

Fig. 2. Inhibition of MTX-induced Ca<sup>2+</sup> uptake by brevetoxin-B (A) and model compound for rings EF-GH (B)

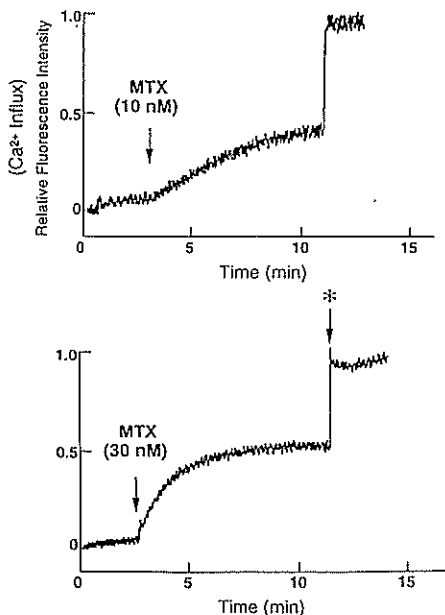


図3. 赤血球ゴーストに対するMTXによるカルシウム流入  
Fig. 3. MTX-induced Ca<sup>2+</sup> in erythrocyte ghosts at 10 nM and 30 nM monitored with Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent dye (fura-2). Asterisk denotes addition of detergent to induce full fluorescence.

#### 4) 赤血球ゴーストに対するマイトトキシシンのカルシウム流入作用

MTXの毒性は、比較的組織特異性が低く報告されているほとんどの組織や培養細胞で生理活性が報告されており、MTXの作用標的分子が普遍的に存在する膜タンパク質である可能性が指摘されていた。そこで、もっとも単純な細胞膜系である赤血球ゴーストに対するMTXの作用を調べた。その結果、Fig. 3に示すように、蛍光色素(fura-2)を封入したリン脂質リポソームに対して、10 nMのMTXが顕著なカルシウム流入活性を示した[4]。このことは、MTXの標的分子が赤血球膜上に存在することを示すとともに、今後、単純でありかつ情報の豊富な赤血球膜を用いることによってMTXの作用研究が進展することが期待される。

#### 4. 今後の課題と発展

筆者らは、最近得られたMTXの主要部分の立体化学をもとに、NMR情報と分子力場計算により3次元構造を推定した。その結果、MTXの後半部分の17個の疎水的エーテル環部(R-F'環)がほぼ直線的な立体配座を有することが判明した[1, 3]。また、分子前半の親水性部分(C1-Q環)は、NMR測定溶媒中においてEF-GH環の部分でヘアピン型に屈曲した配座を取るものと推定されている[3]。すなわち、MTXが膜に結合した場合には、その疎水的ポリエーテル環部分は脂質二重膜を貫通するが、親水性部分は膜外に留まっており、また、この部分は屈曲することによって比較的膜に近い位置に留まる配座を取っていると思われる。今回の薬理実験とこれらの立体構造を総合的に考察すると、Fig. 4に示したように、MTXが疎水性部分を細胞膜に貫通させ細胞表面に結合するモデルが想定される。

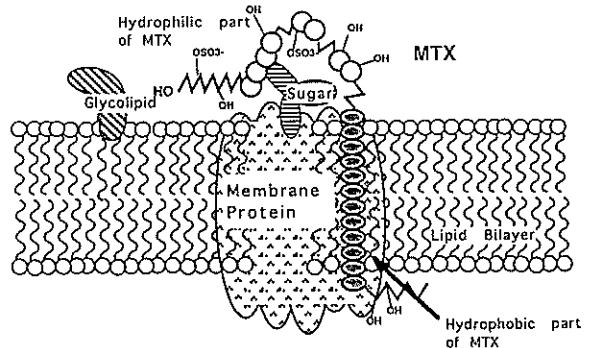


図4. マイトトキシシンと標的分子の相互作用の想像図  
Fig. 4. Hypothetical illustration of target membrane protein for maitotoxin.

MTX は膜蛋白を作用標的とし親水性部分はその糖鎖と相互作用を有しており、また、疎水性部分は膜タンパク質の膜結合部分を認識しているものと考えられる。さらに、MTX の作用が単純なアルキルアミンによって阻害されることが明らかとなり[7]、硫酸エステルの対イオンが活性に大きく影響すると考えられる。これは、硫酸エステルがカルシウムなどの2価金属と塩を形成することによって活性型の配座を取ることを示唆する。現在、筆者らは、化学的手法を用いて直接 MTX の作用標的分子を標識する実験を進めており、近い将来、真の標的分子が同定されるものと信じて研究を進めている。

本研究にご援助頂きました日産科学振興財団に深謝致します。

## 文 献

- [1] For structure: M. Murata, H. Naoki, S. Matsunaga, M. Satake & T. Yasumoto: *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 7098-7107 (1994). For biological actions: F. Gusovsky and J. W. Daly, *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1633-1639 (1990).
- [2] M. Takahashi, Y. Ohizumi, & T. Yasumoto, *J. Biol. Chem.*, **258**, 7287-7289 (1982),
- [3] (a) M. Sasaki, N. Matsumori, T. Maruyama, T. Nonomura, M. Murata, K. Tachibana, & T. Yasumoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 1672-1675 (1996). (b) T. Nonomura, M. Sasaki, N. Matsumori, M. Murata, K. Tachibana, & T. Yasumoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 1675-1678 (1996). (c) Matsumori, N., Nonomura, T., Sasaki, M., Murata, M., Tachibana, K., Satake, M. and Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **37**, 1269-1272 (1996). (d) Matsumori, N., Kaneno, D., Murata, M., Nakamura, H. and Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **64**, 866-876 (1999).
- [4] K. Konoki, M. Hashimoto, M. Murata, and K. Tachibana, *Chem. Res. Toxicol.* In press.
- [5] J. P. Bressler, L. Belloni-Olivi & S. Forman: *Life Sci.*, **54**, 49-60 (1993).
- [6] K. Konoki, M. Hashimoto, T. Nonomura, M. Sasaki, M. Murata & T. Tachibana, *J. Neurochem.* **70**, 409-416 (1998).
- [7] K. Konoki, M. Hashimoto, M. Murata, K. Tachibana & T. Yasumoto, *J. Natur. Toxins.* **5**, 209-217 (1996)

## 5. 発表文献リスト

- 1) 上記文献[4] K. Konoki, M. Hashimoto, M. Murata, and K. Tachibana, "Maitotoxin-induced calcium influx in erythrocyte ghosts and rat glioma C6 cells, and blockade by gangliosides and other membrane lipids," *Chem. Res. Toxicol.* In press.
- 2) K. Konoki, M. Hashimoto, T. Nonomura, M. Sasaki, Murata, M. and K. Tachibana, "Inhibition of maitotoxin-induced  $Ca^{2+}$  influx in rat glioma C6 cells by brevetoxins and synthetic fragments of maitotoxin." *J. Neurochem.* **70**, 409-416 (1998).
- 3) M. Izumikawa, M. Murata, K. Tachibana, T. Fujita and H. Naoki, "18O-labeling pattern of okadaic acid from H2O elucidated by tandem mass spectrometry, a possible new index for biosynthesis of secondary metabolites, submitted to *Biochemistry*."