

称号及び氏名 博士(理学) 横関 俊昭

学位授与の日付 2023 年 9 月 23 日

論文名 シガトキシンのイオンチャネル特異的結合を基盤とした分析法の開発および毒性発現機構の解明

論文審査委員	主査	円谷 健
	副査	木下 誉富
	副査	中瀬 生彦

論文要旨

シガトキシンのイオンチャネル特異的結合を基盤とした分析法の開発および毒性発現機構の解明

横関俊昭（生体高分子化学）

第一章 序論

シガテラ中毒（CFP）は、世界で年間 5 万人以上もの罹患が推定される世界最大規模の魚類食中毒である。主に熱帯・亜熱帯海域の魚の摂取により引き起こされるが、近年の地球温暖化によりその影響地域が拡大し、予防策構築が世界的な緊急課題となっている。原因毒シガトキシン（CTX）は、有毒渦鞭毛藻が産生する脂溶性環状ポリエーテルであり（図 1）、その構造は太平洋型、カリブ海型、インド洋型と発生海域ごとに異なる。これらの毒素は、食物連鎖の過程で強毒化を伴って多数の同族体に変換され、より大型の魚へ移行する。また、その毒性は極めて強く、1 ppb 未満の CTX を含む魚肉の摂取で食中毒を引き起こす。このような CTX の特性から、CFP 予防のためには、魚中に微量に存在する多数の同族体を検出できる分析法が不可欠であるが、既存のアッセイはいずれも広い普及には至っていない。また、CFP のリスクを把握するためには、CTX 同族体間の毒性の違いを明らかにする必要があるが、これまで濃度の正確な CTX 標準品を入手することが困難であったため、正確な評価はされていない。一方近年、定量 NMR で較正された CTX 標準品が利用可能になり、この問題の解決が期待されている。

CTX の毒性発現機構は、主に電位依存性ナトリウムチャネル（Nav チャネル）を開口させて細胞を持続的に脱分極させることに基づいており、その結果として神経系、消化器系症状などを引き起こす。また近年、電位依存性カリウムチャネル（Kv チャネル）を閉口させる作用も明らかになり、現在は Nav チャネルと Kv チャネルへの両方の作用が毒性発現に寄与していると考えられている。CTX の毒性発現機構を明らかにするためには、これらチャネルへの CTX の結合機構やその役割を明らかにすることが重要であるが、その知見は不足している。

さらに、CTX 摂取後の動態に関する知見も少ない。太平洋型 CTX は、塩酸酸性でその毒性が消失することが報告されている。しかし、同族体間の酸安定性の違いを評価した研究はなく、特に魚肉摂取後の胃酸酸性での CTX の安定性を明らかにすることは、CFP のリスク評価のために重要な知見となる。以上、本研究の第二～五章において、上記 CTX 研究における課題を解決するための研究を実施した。

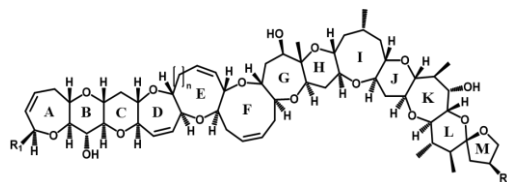


図 1. 太平洋型 CTX の構造

第二章 近赤外蛍光 RBA の開発ならびにシガトキシン同族体のナトリウムチャネル結合親和性の相対評価

CTX 検出のためのレセプターバインディングアッセイ（RBA）は、CTX と Nav チャネルの結合部位を共有するブレベトキシン（BTX）との競合反応を利用する。すなわち、CTX の濃度増加に応じて標識 BTX の Nav チャネルへの結合率が低下する競合阻害曲線により、CTX を定量する。RBA は、全ての同族体を一斉に検出でき、操作が簡便であることから毒魚のスクリーニングに有用であるが、CTX 検出法の中で最も感度が悪く、CTX を多量に消費することが最大の欠点である。CTX は極めて希少性が高いため、アッセイの普及のためには CTX を節約できるよう高感度化が必須である。加えて、レセプターにはラット脳ホモジネート由来の脂質膜（シナプトソーム）を用いるが、動物愛護の観点から、レセプター量

も節約することが望ましい。

RBA のために最初に合成された放射性同位体標識 BTX (^3H -PbTx-3) は現在でも利用されているが、その取り扱い規制や廃棄物の問題から、近年 BTX の蛍光標識体 (BODIPY®-PbTx-2) が合成された。蛍光測定は汎用性が高いが、BODIPY®-PbTx-2 の測定波長では、シナプトソーム等からの自家蛍光の影響を受けやすい。そこで、本研究では、これを回避可能な近赤外蛍光試薬 PREX710-NHS を BTX に結合させ、新規蛍光リガンド PREX710-BTX を合成した (図 2)。これを用いた近赤外領域での測定はアッセイの小スケール化に有効であり、従来よりも CTX およびシナプトソームの使用量を大幅に削減した高感度 RBA の開発に成功した (表 1)。

表 1. RBA における各測定パラメーターの比較

Ligand	PREX710-BTX	BODIPY®-PbTx-2	^3H -PbTx-3
Incubation time	30 minutes	2 hours	3 hours
Amount of synaptosomes	25 μg /well	50 μg /well	240 μg /well
Amount of CTX3C (as IC_{50})	82.85 μg /well	330 μg /well	576.75 μg /well

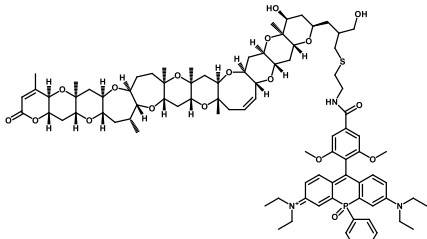


図 2. PREX710-BTX の構造

RBA における CTX 同族体間の Nav チャンネルへの結合親和性の違いは、マウスに対する毒力の違いを反映すると考えられている。通常、魚肉中には複数の CTX 同族体が存在することから、この特性は RBA の利点であるが、これまでに報告された同族体間の親和性の相対値は研究間で著しく異なり、その結論は出ていない。そこで、定量 NMR で較正された CTX 標準品を用いて、同族体の Nav チャンネル親和性を再評価した。その結果、従来の考えとは異なり、Nav チャンネル親和性はマウス毒性と全く相関しないことを明らかにした (表 2)。また、RBA において全ての同族体が同等の親和性を示したことから、同族体間の側鎖構造や立体化学の違いは、結合親和性に影響しないという構造活性相関に関する知見を獲得した。

表 2. CTX 同族体の Nav チャンネル結合親和性とマウス毒性の相対値の比較

Congeners	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ (pg/mL)	Acute toxicity in mice
CTX1B	336.4 ± 46.9 (1.0)	1.0
CTX3C	331.4 ± 36.4 (1.0)	0.2
CTX4A	376.8 ± 51.1 (0.9)	0.1
52-epi-54-deoxyCTX1B	268.0 ± 26.2 (1.3)	0.3
54-deoxyCTX1B	230.4 ± 26.7 (1.5)	0.3
51-hydroxyCTX3C	286.1 ± 24.3 (1.2)	1.0

括弧内の数値は CTX1B を 1.0 としたときの相対値。

第三章 N2a アッセイの改良ならびにシガトキシン同族体の細胞毒性の相対評価

N2a アッセイはマウス神経芽腫細胞 (N2a 細胞) に対する CTX の毒性を利用したアッセイである。N2a 細胞に CTX を作用させると、その脱分極作用により Na^+ が流入し細胞死に至る。N2a アッセイは RBA よりも高感度に魚肉中の CTX を定量できる。しかし、RBA は魚肉抽出液の調製を除いて約 1 時間で結果が得られるのに対し、N2a アッセイは細胞を 24 時間プレ培養した後に CTX を添加し、さらに 24 時間の培養を必要とする。すなわち、結果が得られるまでに 48 時間かかり、N2a アッセイの大きな欠点となっている。そこで本研究では、プレ培養の省略とそれに伴うアッセイの最適化を検討し、プレ培

表 3. CTX 同族体の細胞毒性とマウス毒性の相対値の比較

Congeners	$\text{EC}_{50} \pm \text{SD}$ (pg/mL)	Acute toxicity in mice
CTX1B	1.08 ± 0.06 (1.0)	1.0
CTX3C	2.03 ± 0.20 (0.5)	0.2
CTX4A	12.4 ± 0.89 (0.09)	0.1
52-epi-54-deoxyCTX1B	2.98 ± 0.24 (0.4)	0.3
54-deoxyCTX1B	2.73 ± 0.18 (0.4)	0.3
51-hydroxyCTX3C	1.18 ± 0.10 (0.9)	1.0

括弧内の数値は CTX1B を 1.0 としたときの相対値。

養を省略しても従来法と同等の検出感度を有する方法に改良した。

また、N2a アッセイも RBA と同様に、これまでに報告された同族体間の細胞毒性の相対値が研究間で著しく異なっていたため、定量 NMR で較正された CTX 標準品で細胞毒性を再評価した。その結果、同族体間の N2a 細胞に対する毒性の比は、マウスに対する毒性の比と良く相関しており、N2a アッセイがマウスバイオアッセイの優れた代替法であることを実証した (表 3)。

第四章 シガトキシンの毒性発現機構解明に関する研究

CTX のイオンチャネル結合機構に関する知見を得るために、第一節では抗 CTX モノクローナル抗体を用いた N2a アッセイおよび RBA における CTX の毒性中和試験を行った。N2a アッセイにおいては、CTX1B の分子左側を認識する抗体 (3G8) もしくは分子右側を認識する抗体 (8H4) をそれぞれ単独で用いるよりも、これら 2 つを同時に用いた方が、遥かに毒性中和効果が高かった (図 3a)。一方、RBA における同様の試験では、2 つの抗体を同時に用いることによる CTX1B の Nav チャネルへの結合阻害効果の向上は認められなかった (図 3b)。これらの結果から、CTX 分子半分だけでも毒性を発現する機構があると考えられたため、CTX1B 分子の片側半分だけの構造を有する化合物を両アッセイに供した。予想と異なり、この化合物は N2a 細胞に対して毒性を示さなかったが、分子半分だけの CTX は Nav チャネルに対して結合親和性を有さないことを明らかにした。

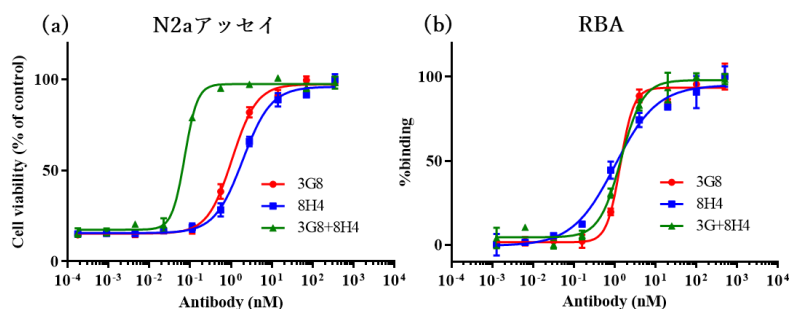
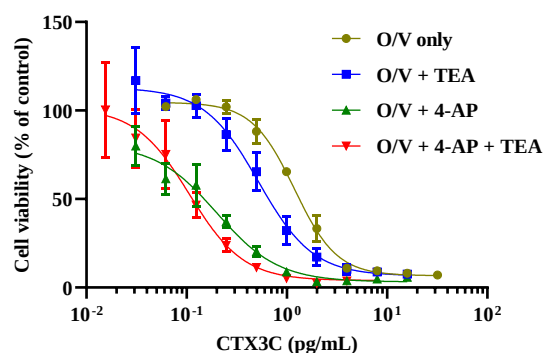


図 3. 抗 CTX1B モノクローナル抗体による N2a アッセイおよび RBA における CTX1B の毒性中和試験

第二節では、CTX の毒性発現機構における Kv チャネルの役割に関する知見を得るための研究を行った。CTX はカリウム電流を阻害することが電気生理学実験によって報告されているが、Kv チャネルの阻害が CTX の毒性を相乗的に高めるかについて、細胞実験による実証はされていない。そこで、CTX が阻害する 2 種類のカリウム電流を、Kv チャネル阻害剤によってより強く阻害することで、CTX の毒性が増強されるかを確認した。その結果、従来の N2a アッセイの条件に加えて、Kv チャネル阻害剤を添加することによって、より低濃度の CTX で細胞死が引き起こされることを実証した (図 4)。これは従来よりも高感度な N2a アッセイの開発につながる成果でもある。

図 4. Kv チャネル阻害剤存在下での N2a 細胞に対する CTX3C の用量反応曲線



O/V (ウアバイン/ベラトリジン) : N2a 細胞の CTX に対する感受性を高める試薬, TEA (テトラエチルアンモニウム), 4-AP (4-アミノピリジン) : Kv チャネル阻害剤。

第五章 太平洋型シガトキシンの酸安定性に関する研究

RBA や N2a アッセイで使える、魚肉中 CTX 検出のための魚肉精製法の検討過程で、太平洋型 CTX の安定性が同族体間で異なるという新規事象を見出した（未発表データ）。これまで、太平洋型 CTX の酸安定性を詳細に評価した研究はないため、本章では人工胃液等の様々な酸性条件での太平洋型 CTX の安定性を、LC-MS/MS によって評価した。その結果、人工胃液中における各同族体の安定性は明確に異なることが明らかになった（図 5）。

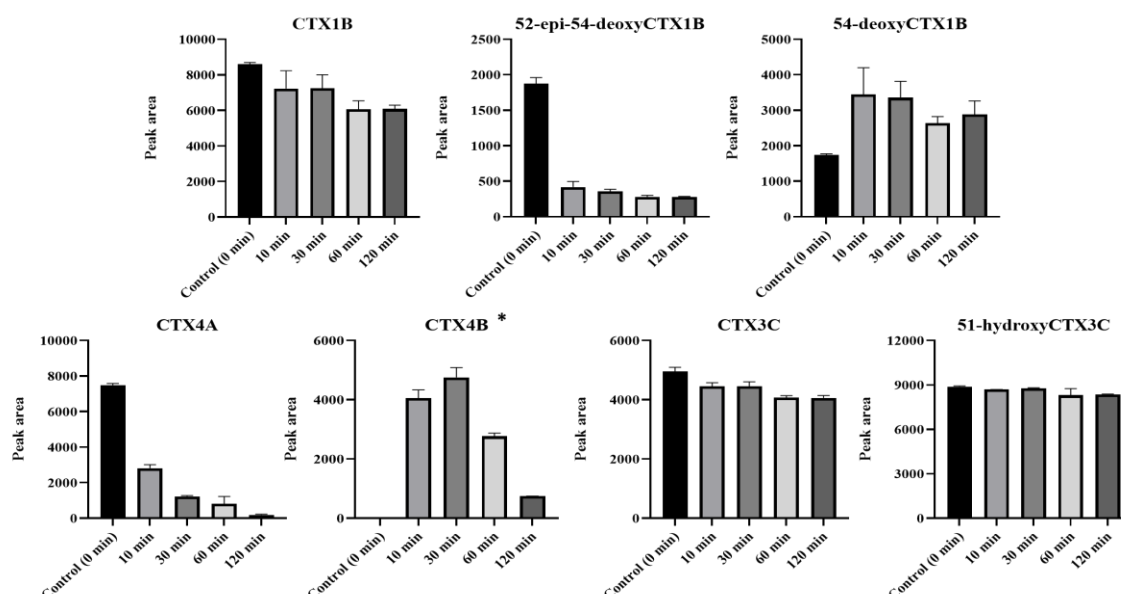


図 5. 人工胃液中でインキュベーション後の CTX 同族体のピーク面積

*CTX4B は保持時間および分子量から推定。

総括

本研究の成果とその重要性を以下にまとめる。1) 従来よりも使いやすい RBA および N2a アッセイを開発した。これはシガテラ魚のスクリーニング検査に利用され、CFP 予防への貢献が期待される。2) 定量 NMR で較正された CTX を初めて使用して、同族体毎の正確な Nav チャネルへの結合親和性および細胞毒性のデータを取得した。これにより、RBA および N2a アッセイで得られた結果を正しく評価することができる。3) Kv チャネル阻害剤を用いることにより CTX の細胞毒性が増強されることを初めて実証した。これは、CTX の毒性発現機構における Kv チャネルの役割を理解するための知見となり、従来よりも高感度な N2a アッセイの開発につながる成果でもある。4) 胃液中で、CTX 同族体毎に安定性が異なることを初めて示した。これは、魚肉摂取後の生体内での CTX の動態の一部を明らかにした成果であり、CFP のリスクを正しく評価するために重要である。

論文目録

1. Evaluation of relative potency of calibrated ciguatoxin congeners by near-infrared fluorescent receptor binding and neuroblastoma cell-based assays. Yokozeki, T., Hama, Y., Fujita, K., Igarashi, T., Hirama, M., Tsumuraya, T. *Toxicon* 230, 107161(2023).

学位論文提出者氏名 横関 俊昭

学位論文題目

シガトキシンのイオンチャネル特異的結合を基盤とした分析法の開発
および毒性発現機構の解明

学位論文審査結果の要旨

シガテラ食中毒（CFP）は、シガトキシン（CTX）を原因毒素とする世界最大規模の魚類食中毒であり、予防策の構築が世界的な緊急課題となっている。また、CFP 治療のためにはその毒性発現機構を明らかにすることが重要である。

本学位論文提出者である横関俊昭氏は、第二章および第三章において、予防策構築に必須である CTX のスクリーニング法を開発した。第二章では、新規近赤外蛍光リガンド PREX710-BTX を合成し、これを用いて希少な CTX の必要量を従来法の 1/4 以下に低減した高感度レセプターバインディングアッセイ（RBA）の開発に成功した。第三章では、N2a アッセイを、従来法と同等の検出感度を維持したまま 24 時間短縮した方法に改良した。両アッセイの従来法に対する優位性は明確に示されており、これらは CFP 予防に大きく貢献する成果である。さらに、両アッセイにおける CTX 同族体の比活性を、較正された標準品を用いて正確に評価した。その結果、RBA においては同族体間でほとんど違いはなくマウス毒性と相関しないこと、N2a アッセイにおいては同族体毎に明確に異なりマウス毒性と良く相関することを初めて明らかにした。これは両アッセイの結果を正しく評価するために不可欠な成果である。

第四章では、CTX 分子の左右いずれかを認識する抗 CTX モノクローナル抗体の、細胞毒性中和および Nav チャネル結合阻害効果を検証した。その結果、CTX 分子を挟む 2 つの抗体を同時に使用することによるその効果の向上は細胞毒性中和にのみ認められること、また、CTX1B の部分構造化合物は、Nav チャネル結合親和性および細胞毒性のいずれも有さないことを明らかにした。さらに、Kv チャネルを阻害することにより CTX の細胞毒性が増強されることを実証した。これらの成果は、CTX の毒性発現機構における Nav チャネルおよび Kv チャネルの役割の解明のために重要な新規知見である。

第五章では、CTX の酸安定性が同族体毎に明確に異なることを初めて明らかにした。特に人工胃液中での挙動の違いを明らかにしたことは、異なる CTX 同族体プロファイルを持つ魚間の CFP のリスクを正しく評価するために極めて重要な成果である。

これらの学位論文の研究内容は、上記の CTX 研究における課題を解決できる基盤技術になりうること、また世界的に緊急課題となっている CFP の予防策構築に大きく貢献できる研究成果である。以上より、学位論文審査において本論文内容は博士学位取得に十分に値すると考える。

主査 教授 円谷 健
副査 教授 木下 誉富
副査 教授 中瀬 生彦