今日の話題

スギヒラタケ急性脳症事件の化学的解明の試み 複数の物質がかかわる発症機構

スギヒラタケ (*Pleurocybella porrigens*) は、秋に、針葉樹、特にスギの古い切株や倒木に重なり合うように群生する。現時点では、人工栽培は成功していない。東北、北陸、中部地方を中心に広く食用とされていた。ところが、2004年秋に、このキノコの摂取により、急性脳症が発生した。この事件前までは食中毒に関する報告はなく、たいへん美味なキノコであり、筆者（河岸）も事件前までは毎年食べていた。患者数は59名に達し、腎機能障害をもっていた17名が亡くなった。この事件は戦後最悪の食中毒事件とされているが、原因の解明は困難を極め、厚生労働省研究班は「原因不明」と結論した。しかし、この研究班の班員であった筆者の一人（河岸）はその後も現在に至るまで研究を続け、もう一人の筆者（菅）と協力してその化学的解明を試みている。これまでの経緯を以下に記す。

事件発生直後、この中毒の原因としてキノコへの細菌やウイルスの感染やキノコの突然変異など諸説があった。筆者（河岸）は事件発生直後にいち早く、このキノコを大量に入手し、このキノコ自身が毒物質を産生しているのかを調べ、抽出物をマウスに腹腔内注射すると死亡することを見いだした。そして、この致死毒性を指標に各種クロマトグラフィーによって、SDS電気泳動で単一バンドを示す致死活性を示す糖タンパク質（B3と仮称）の精製に成功した⁽¹⁾。また、事件発生当時、スギヒラタケはレクチン（特定の糖や糖鎖と特異的に結合するタンパク質で赤血球などを凝集する）活性がほかのキノコより非常に強いことから、レクチン原因説が新聞紙

上に掲載された。そこでレクチン (*Pleurocybella porrigens lectin*; PPL) を精製し、一次構造の決定と遺伝子のクローニングを行った⁽²⁾。このレクチンはラットに対して致死毒性を示した。しかしながら、B3、PPLともに、これらの物質の投与によって死亡した動物の脳に異常をきたさなかった。

一般に脳では血液脳関門 (BBB) が無秩序な物質の脳への移行を防いでいる。筆者（河岸）は、スギヒラタケを食することによってBBBが破壊され、急性脳症が発症するのではないかと考えた。そして、B3とPPLを混合することによってタンパク質分解活性が出現し、この複合体をマウスに腹腔内注射したところ、BBBが破壊された⁽¹⁾。

この2成分系を考え出したのには2つのヒントがあった。その一つはインフルエンザ脳症の発症機構である。この脳症では、ウイルスの感染によってトリプシン様タンパク質分解酵素が生成されBBBが破壊される。もう一つのヒントは、PPLのアミノ酸配列のホモロジー検索の結果だった。PPLはリシンB鎖とHA1（ボツリヌス毒ヘムアグルチニン）に構造類似性を有していた。この2つのタンパク質はそれら自体に毒性はないが、毒本体（リシン、ボツリヌス毒）と複合体を形成し、毒性発現に関与している。そこで、B3とPPLを混合したのである。この複合体はN末端からもC末端からも順次非特異的にタンパク質を分解するという酵素科学の常識ではありえない活性を示した。

このキノコによる脳症で亡くなった患者の脳では共通

図1 ■ 低分子毒の構造

して、大脳白質のミエリン鞘に非常に特異な脱髄病変が起こっていた。そこで、筆者（河岸）はBBB通過後に特異な脱髄病変を惹起するのは特定の低分子物質であるはずと考え、前記の2成分の研究と同時に、低分子の毒性物質の探索を開始し、弱い細胞毒性を示す物質（1-7）を得た⁽³⁾（図1）。筆者（河岸）は化合物1から7の構造を眺め、共通の前駆体8の存在を仮定した。すなわち、化合物1～6は、 β -ヒドロキシバリン誘導体であるが、7はアミノ基と水酸基の位置が逆である。これは1～6は8の β 位に、7は α 位に求核置換反応を受けて生成したと考えられる。そして、この前駆体8が毒本体であると考えた。そこでこのキノコの抽出物を精査したが、8の単離はできなかった。これはアジリジン骨格の不安定性によると考え、8の合成による存在の証明を行うこととした。

合成はもう一人の筆者（菅）が行った。菅研究室では、独自の合成方法論を基盤とする生理活性天然物の全合成研究を専門としている。それら合成方法論のなかでも、ニトロベンゼンスルホン基を保護かつ活性化基として用いる第二級アミン合成法（Ns-strategy）⁽⁴⁾は、高い反応性と穏和な反応条件から、多くの含窒素化合物の合成に汎用されている。その概略を図2に示した。まず、第一級アミン9を塩基存在下、2-ニトロベンゼンスルホニルクロリド（NsCl: 10a）と反応させるとスルホンアミド11aが得られる。この*N*-モノ置換スルホンアミド11aは、ハライド（R'-X）とのアルキル化反応、あるいはアルコール（R'-OH）との光延反応の条件にて、アルキル化が容易に進行し*N*-二置換スルホンアミド12aを与える。最後に、スルホンアミド12aに対してチオラートアニオンのようなソフトな求核剤を作用させると、マイゼンハイマー複合体13aを形成後、SO₂の脱離を伴い第二

図2 ■ Ns-strategy による第一級アミンから第二級アミンの合成

図3 ■ 光延反応によるアジリジン環の構築と予期せぬ開環

級アミン14へと変換される。

このNs-strategyの活用が、河岸がスギヒラタケに存在を予想した不安定なアジリジンカルボン酸8の合成を可能にすると考えた。安価で多用されるNs基で保護された16を合成し、光延反応に付することで環化は円滑に進行し、アジリジン17が得られた。しかし、17に対し硫黄求核剤（PhSH, Cs₂CO₃）を作用させたところ、Ns基の脱保護は全く進行せず、アジリジン環が開環した18が得られた（図3）。しかし、幸運なことに、この第二級アミン合成法の研究では、2,4-ジニトロベンゼンスルホン基（DNs）基が、Ns基よりも穏和な条件にて脱保護が進行することを明らかにしていた⁽⁵⁾。このDNs基はNs基より不安定であるが、合成条件の最適化がアジリジンカルボン酸8の合成を可能にすると考えた。

図4にアジリジンカルボン酸8のメチルエステル体19の合成ルートを示した。セリンより容易に得られるGarnerエステル20に対し、過剰量のMeMgBrを作用させメチル基を導入した後、アセトニドの加水分解により21へと導いた。つづいて、21の第一級アルコールのカルボン酸への変換は、TEMPO酸化により達成し、第三級アルコールを損なうことなく22が得られた。カルボン酸22をメチルエステルに変換後、Boc基をDNs基へと変換した。さらに、DNsアミド23への光延反応は円滑に進行しアジリジン環を構築した。最後、DNsアミ

図4 ■ メチルエステル体19の合成

ドにプロピルアミンを作用させたところ、アジリジン環が開環することなく DN-基の除去は進行し、目的のアジリジンカルボン酸メチルエステル体19が得られた。この19を標品とすることで、以下のようにスギヒラタケ抽出物に8の存在が証明された。

2004年に採集して、冷凍保存してあったスギヒラタケの凍結乾燥体をメタノールにて抽出後、ジアゾメタンで処理した。その溶液をTLCにて分析した結果、合成標品のメチルエステル19と一致するスポットを確認した。その後、2回のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製を行い、合成標品と完全に¹H NMR スペクトルが一致する物質を得、アジリジンカルボン酸体8がスギヒラタケに存在することを証明した。このメチルエステル19は、濃縮ならびに精製過程でも顕著な分解が進行する不安定な化合物であった。

天然物としての存在が明らかとなったアジリジンカルボン酸8が、筆者らの予想どおり活性本体であることを証明するため、カルボン酸8の合成にも着手した(図5)。この際、カルボン酸の保護基は中性条件にて脱保護可能なジフェニルメチルエステルを選択した。メチルエステル19の合成中間体の22にジフェニルジアゾメタン(Ph₂CN₂)を作用させた後、Boc基をDN-基へと変換し24を得た。つづく、24への光延反応はDIADを用いることで円滑に進行し、アジリジン25が得られた。さらに、25のDN-基の脱保護はメチルエステル体19の合成のときと同様に、イソプロピルアミンにて進行し26を合成した。また、ジフェニルメチルエステル体26は、その立体的なかさ高さのために、メチルエステル19やカルボン酸8よりも、濃縮操作などに安定であった。そのため、抽出物のジフェニルジアゾメタン処理により得られる化合物と合成品26との比較により、アミノ酸の絶対配置をS配置と決定できた。さらに、天然物の各種

図5 ■ アジリジンカルボン酸pleurocybellaziridine (8) の合成

分析はジフェニルメチルエステルへと変換することで可能となった。ジフェニルメチル基の脱保護は、水素添加反応により達成し、目的のアジリジンカルボン酸8が白色結晶として得られ、筆者らはこれをpleurocybellaziridineと命名した⁽⁶⁾。結晶状態の8は十分な安定性(−80℃の冷蔵庫にて半年以上)を有していたが、水溶液中では顕著な分解が観測された。

前述のように、このキノコによる脳症で亡くなった患者の脳白質のミエリン鞘に非常に特異な脱髄病変が起こっていた。ミエリン鞘はオリゴデンドロサイトで構成されている。脳内に存在する細胞としてはそのほかに神経細胞とアストロサイトがある。そこで、pleurocybellaziridineのこれら細胞への毒性を検討したところ、オリゴデンドロサイトのみに強い細胞毒性を示した(投稿準備中)。

前述のようにB3とPPLの複合体は全く非特異的タンパク質分解活性を示す。B3とPPLは電気泳動では単一バンドを示すが、この非特異性は微量のほかの酵素の混入の可能性を否定できない。そのため、現在は両タンパク質の異種発現を試みている。B3のそれは苦戦しているが、すでに大腸菌や担子菌によるPPLに成功している(投稿準備中)。そして、この組み換えPPLはB3と

図6 ■ スギヒラタケ急性脳症発症機構の仮説

混合することによって同様の酵素活性を示した。

以上、筆者らの「高分子2成分によって血液脳関門 (blood brain barrier; BBB: 無秩序に物質が脳に移行しないための関門) が破壊され、低分子毒によって急性脳症が惹起された」(図6) という仮説が証明されつつある。今後の研究による詳細な毒性発現の機構解明にかかる期待は大きい。本研究では研究者の想像を超えた不安定な化合物が自然界にはいくつも存在する可能性も示唆している。われわれが天然物と呼んでいるものは、幸運にも安定で単離構造決定可能な化合物だけを見ているのかもしれない。

- 1) 鈴木智大, 藤田基寛, 天野裕子, 浅川倫宏, 赤星早江子, 脇本敏幸, 小林夕香, 森田達也, 新井信隆, 長井 薫, 田中滋康, 平井浩文, 菅 敏幸, 河岸洋和: “第52回天然有機化合物討論会講演要旨集”, 2010, pp. 655-660.
- 2) T. Suzuki, Y. Amano, M. Fujita, Y. Kobayashi, H. Dohra, H. Hirai, T. Murata, T. Usui & H. Kawagishi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 702 (2009).
- 3) T. Kawaguchi, T. Suzuki, Y. Kobayashi, S. Kodani, H. Hirai, K. Nagai & H. Kawagishi: *Tetrahedron*, **66**, 504 (2010).
- 4) T. Kan & T. Fukuyama: *Chem. Commun.*, 353 (2004).
- 5) T. Fukuyama, M. Cheung, C.-K. Jow, Y. Hidai & T. Kan: *Tetrahedron Lett.*, **38**, 5831 (1997).
- 6) T. Wakimoto, T. Asakawa, S. Akahoshi, T. Suzuki, K. Nagai, H. Kawagishi & T. Kan: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **50**, 1168 (2011).

(河岸洋和*¹, 菅 敏幸*², *¹静岡大学創造科学技術大学院, *²静岡県立大学薬学部)

プロフィール

河岸 洋和 (Hirokazu KAWAGISHI)
 <略歴> 1985年北海道大学大学院農学研究科博士課程修了 (農学博士) / 同年静岡大学農学部助手 (農芸化学科) / 1989年同大学農学部助教授 (応用生物化学科) / 1998～1999年文部省在外研究員 (米国ハーバード大学化学・化学生物学科) / 1999年静岡大学農学部教授 (応用生物化学科) / 2006年同大学創造科学技術大学院教授 (統合バイオサイエンス部門) / 2011年同大学卓越研究者, 現在に至る<研究テーマと抱負> 生物, 特にキノコにかかわるあらゆる生命現象を「化合物」で説明したい<趣味> 読書, 家庭菜園, 2月から5月までのタケノコ掘り

菅 敏幸 (Toshiyuki KAN)
 <略歴> 1986年北海道大学理学部化学学科卒業 / 1993年サントリー生物有機科学研究所研究員 / 1996年東京大学薬学部助手 / 2004年同大学大学院薬学系研究科助教授 / 2005年静岡県立大学薬学部教授<研究テーマと抱負> 有機合成化学<趣味> ラクビー, 自転車