

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20611012

研究課題名（和文）藻類由来の毒性物質および機能性小分子をプローブとした二枚貝致死の機構

研究課題名（英文）Chemical-biological Study on the Bioactive Compounds from Marine Algae

研究代表者

平賀 良知 (HIRAGA YOSHIKAZU)

広島大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10238347

研究成果の概要（和文）：

新種渦鞭毛藻，ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマが産生するカキなどの二枚貝に対して毒性を示す物質の化学構造と活性発現機構解明のため，毒性物質の分光学的手法による解析ならびに毒性物質の化学分解を行った。また，毒性物質の部分構造を有するトレーサー分子の合成に必要な立体化学を構築するために，立体選択的アルドール反応などを触媒する有機分子の創製や非対称化アセチル化による不斉炭素構築法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate the chemical structures of the toxic substances and the biological activities of the harmful phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama* caused mass mortalities of bivalves, e.g. oyster, the spectroscopic analyses of toxic compounds and the chemical degradation reactions were carried out. Also, in order to construct the the partial structure of the toxic compounds, the novel organocatalyst which catalyzed for the enantioselective aldol and Michael reactions and the desymmetrization of symmetric alcohols were developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：赤潮プランクトン，渦鞭毛藻，ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ，構造決定  
トレーサー分子，有機触媒，二枚貝致死活性物質，構造活性相関

## 1. 研究開始当初の背景

植物微細藻類である新種渦鞭毛藻，ヘテロカプサ・サーキュラリスカーマ(*Heterocapsa circularisquama*) (以下，ヘテロカプサ) は，瀬戸内海など日本近海で発生する赤潮プランクトンである。ヘテロカプサは，カキや真珠貝などの二枚貝に対してのみ特異的に毒性を示す。しかしながら，ヘテロカプサが産

生する毒性物質ならび毒性発現機構の学術的な解明は未だなされていない。

これまでに，我々は，ヘテロカプサの藻体に分子量約 5000 の画分および約 2000 の画分に毒性活性を示す極微量の物質が存在していることを見出している。さらに，これらの化合物の核磁気共鳴スペクトルを解析した結果，多数の水酸基をもつ超炭素鎖有機分子

であった。これら極微量の毒性物質の構造解析を推進するとともに、毒性物質ならびに構造活性相関を基に創製した機能性小分子をプローブとして、生体内の動的挙動の解析や未だ解明されていない生物間のケミカルバイオロジーを詳細に解明することを目標とした。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヘテロカプサの毒性物質および構造活性相関を基に創製した機能性低分子をプローブとして特異な生理活性の発現メカニズムの解明である。

具体的には、①構造活性相関に基づく活性発現に必須な化学構造の探索、②構造活性相関に基づいた生理活性を有する機能性低分子化合物の設計・合成、③毒性物質および合成低分子化合物と生体との相互作用の精密な解明、④ヘテロカプサの毒性物質の生合成に関与する遺伝子群およびタンパク質群の特定と大腸菌を用いた分子生物学的手法による発現系の構築を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1. 構造活性相関に基づく活性発現に必須な化学構造の探索

○ヘテロカプサ操体が産生する毒性物質の単離・精製ならびに構造解析

ヘテロカプサ操体から効率的に毒性物質を単離・精製する確立ならびに、核磁気共鳴や質量分析装置など分析装置による解析ならびに、毒性物質の化学反応による分解と生成した小分子の構造解析を実施する。

○毒性物質の活性発現に必須な化学構造の探索

ヘテロカプサが産生する毒性物質に対して有機合成的に修飾した化合物の合成とそれらを用いた構造活性相関を行う。

○機器分析による毒性物質と生体の相互作用の解明の実施

分光学的手法を用いたトレーサー毒性分子の生体での分布ならびに相互作用の解析の検討する。

○毒性物質の生合成に関する知見

ヘテロカプサから毒性物質の生合成に関与する遺伝子群ならびに酵素群の特定の検討

### ②立体化学を制御したトレーサー化合物の合成

○活性発現機構に基づく機能性低分子化合物の創製

毒性物質の分解反応によって生成した小分子を有機合成的手法を用いて合成すること、それらの化学構造を範とした機能性低分子化合物の創製ならびに合成手法の開発を行う。その中で、特に効率的に立体化学を制御するために、新規な有機分子触媒の創製

ならびに触媒活性の検討を行う。また、効率的に不斉炭素原子を構築する方法として、対称化合物の非対称化による手法の開発を行う。

○トレーサー毒性物質の創製

純粋培養したヘテロカプサ藻体に安定同位体の導入ならびに、有機化学的手法を用いた毒性物質への安定同位体もしくは蛍光官能基の導入の検討する。

以上の点について、総合的に研究を実施することにした。

## 4. 研究成果

### 1. 構造活性相関に基づく活性発現に必須な化学構造の探索

純粋培養したヘテロカプサ操体に見出している毒性物質は、分子量約 5000 (HTX-A) および分子量 1980 (HTX-B) の 2 種の超炭素鎖有機分子であった。これらの化合物について、その構造活性相関に基づく活性発現に必須な化学構造の探索を行った。特に、HTX-B の構造決定を行った。<sup>1</sup>H NMR および <sup>13</sup>C NMR スペクトルから 4 個のメチル基、2 個の 4 級炭素、そして 3 個の二重結合が存在していることがわかった。二重結合のうち、2 個は末端二重結合であった。重溶媒による重水素置換法を用いて HTX-H 中には 19 個の水酸基が存在していた。これらの官能基と各種二次元 NMR スペクトルから HTB-X の部分構造を決定した。

現在、HTX-B の各種 NMR 解析において、分子量 1010 に対応する構造が未決定である。つぎに、分解反応などを用いて詳細な構造を解析するため、オゾン酸化による分解、過ヨウ素酸酸化による分解を検討した。その結果、オゾン酸化においては、末端に存在する二重結合が開裂して得られる分子の他に、様々な小分子が生成した。一方で、連続した水酸基部分の開裂を目的に、過ヨウ素酸酸化を実施したが、オゾン酸化と同様に、非常に多くの小分子が生成した。

一方、分子量約 5000 の超炭素鎖有機分子 HTX-A については、オゾン酸化による分解生成物を調査した結果、分子量約 988 に関しては、構造決定が完了したが、残り分子量約 4000 に対応する分解生成物に関しては、未決定の状況であった。HTX-B と同様に、HTX-A の過ヨウ素酸酸化による分解反応を試みた。その結果、HTX-A は、反応によって非常に多数の分解生成物を与え、さらに非常に極性の高い生成物であった。高速液体クロマトグラフィーによる単離精製を試みたが、現在のところ構造決定可能な小分子および分解化合物を得るには至っていない。

これらの結果から、HTX-A ならびに HTX-B においても、現在単一成分として分画精製している毒性物質のさらなる精製度の向上

ならびに必要な量の確保を行い、引き続き、分子内にある二重結合に対する開裂反応を用いて小分子へと導き、毒性物質の構造解析を実施する。さらに、これらの毒性物質に対する有機合成的手法による修飾化合物の合成を行い、構造活性相関に基づく特異な生理活性発現機構の解明を実施する。

## ②立体化学を制御したトレーサー化合物の合成

毒性物質の分子内に多く含まれる水酸基の立体化学を制御したトレーサー分子の創製を目的として、立体選択的に水酸基を形成するため、新規の有機触媒の創製を行った。

水酸基の様々な立体化学を効率的に制御するために、有効な合成法として、直接的アルドール反応およびマイケル反応に着目し、それらの反応に対応する有機触媒として、 $\beta$ -ホモプロリン誘導体を合成した。

創製した新規有機触媒のうち、アルドール反応を触媒する $\beta$ -ホモプロリン誘導体は、分子内に、カルボン酸の他、様々な官能基で修飾可能な水酸基を有するものを設計した。この触媒を用いた不斉アルドール反応においては、中間体として生成したエナミン中間体のカルボン酸および水酸基が協調することによって高いエナンチオ選択性を誘起することを見出した。また、強酸性の官能基であるリン酸エステルを有する新規 $\beta$ -ホモプロリン誘導体を誘起分子触媒として用いた不斉マイケル反応を検討した結果、基準の有機触媒であるプロリンよりも高いエナンチオ選択性を発現することを見出した。今後、さらなる基質特異性ならびに各種有機反応への適用を試み、毒性物質に含まれる水酸基の立体化学を効率的に合成する手法として適用する。

一方で、毒性物質である HTX-B の分子中に数多く存在する 4 級炭素の立体化学の決定ならびに、構造活性相関に必要な小分子の化学合成において、光学活性な 4 級炭素を構築するために、リパーゼを用いた対称ジオールの選択的アセチル化による非対称化を検討した。3 位水酸基を様々なシリル基で保護した 1,3,5-ペンタントリオールを用いて、1 位もしくは 5 位の水酸基を非対称化的にアセチル化することによって不斉炭素を構築する反応の開発を行った。様々なリパーゼを用い、3 位のシリル基の種類の異なる 1,3,5-ペンタントリオールを用いてリパーゼを用いたアセチル化による非対称化反応を実施した。その結果、特定のリパーゼにおいて、3 位水酸基を保護するために導入したシリル基の種類によって、3 位の立体化学が異なる非対称モノアセチル体が高エナンチオ選択的に得られることを見出した。

今後、反応条件の最適化を行いことによつて、4 級炭素を有する対称化合物の非対称化

を検討する。さらに、この知見を HTX-B のアナログ化合物の合成に適用する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Hiraga, Yoshikazu; Triana Widdianti, Kunishi, Tsuyoki; Abe, Manabu, Cooperative effect of a hydroxyl and carboxyl group on the catalytic ability of novel  $\beta$ -homoproline derivatives in the direct asymmetric aldol reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*, 査読有, **22**, 226-237 (2011).
2. Yabuno, Youhei; Hiraga, Yoshikazu; Takagi, Ryukichi; Abe, Manabu, Concentration and temperature dependency of regio- and stereoselectivity in a photochemical [2 + 2] cycloaddition reaction (the Paternò-Büchi reaction): Origin of the hydroxy-group directivity, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, **133**, 2592-2604 (2011).
3. Arimura, Jyunya; Mizuta, Tsutomu; Hiraga, Yoshikazu; Abe, Manabu, Formation of macrocyclic lactones in the Paternò-Büchi dimerization reaction, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 査読有, **7**, 265-269 (2011).
4. Yagi, Shingo; Hiraga, Yoshikazu; Takagi, Ryukichi; Abe, Manabu Stereochemical deuterium labeling study on the denitrogenation of 7,7-diethoxy-2,3-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-ene, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 査読有, **24**, 849-901 (2011).
5. Triana Widdianti; Hiraga, Yoshikazu; Kojima, Satoshi; Abe, Manabu, Novel cyclic  $\beta$ -aminophosphonate derivatives as an efficient organocatalyst for the asymmetric Michael addition reactions of ketones to nitrostyrenes, *Tetrahedron: Asymmetry*, 査読有, **21**, 1861-1868 (2010).
6. Isogai, Atsuko; Kanda, Ryoko; Hiraga, Yoshikazu; Iwata, Hiroshi; Sudo, Shigetoshi, Contribution of 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl)pentan-3-one (DMTS-P1) to the formation of dimethyl trisulfide (DMTS) during the Storage of Japanese sake, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 査読有, **58**, 7756-7761 (2010).
7. Hiraga, Yoshikazu; Shikano, Tatsuya; Triana, Widdianti; Ohkata, Katsuo, Three new glycolipids with cytolytic activity from cultured marine dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, *Natural Product Research*, 査読有, **22**, 649-657 (2008).

8. Iwaki, Tomoko; Iefuji, Haruyuki; Hiraga, Yoshikazu; Hosomi, Akira; Morita, Tomotake; Giga-Hama, Yuko; Takegawa, Kaoru, Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Microbiology*, 査読有, **154**, 830-841 (2008).
9. Yabuno, Youhei; Hiraga, Yoshikazu; Abe, Manabu, Site- and stereoselectivity in the photochemical oxetane formation reaction (Paterno-Büchi reaction) of tetrahydrobenzofuranols with benzophenone: Hydroxy-directed diastereoselectivity? *Chemistry Letters*, 査読有, **37**, 822-823 (2008).

[学会発表] (計 27 件)

1. 清川一矢, 田中克幸, 山本真司, 平賀良知, 守口和基, 鈴木克周, イネによって *vir* 遺伝子発現が促される *Agrobacterium rhizogenes* 菌株の解析, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 23 日, 京都女子大学 (京都市)
2. 坂本勇哉, 平賀良知, 安倍 学, 拡張型クマリン骨格を有する新規光解離性保護基の合成とその光反応性, 2011 年光化学討論会, 2011 年 9 月 7 日, 宮崎市民プラザ (宮崎市)
3. 平賀良知, Triana Widiанти, 國西剛基, 安倍 学, 光学活性な水酸基を有するホモプロリン誘導体を有機触媒とした不斉アルドール反応, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26 日, 神奈川大学 (横浜市)
4. 小坂有史, 平賀良知, 安倍 学, フランと環状エノンとの光[2+2]付加環化反応の位置および立体選択性における機構的研究, 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26 日, 神奈川大学 (横浜市)
5. 有村淳也, 平賀良知, 安倍 学, フルフルリアルアルコール誘導体を用いた分子内光環化反応, 第 21 回基礎有機化学討論会, 2010 年 9 月 10 日, 名古屋大学(名古屋市)
6. 庭山聡美, 平賀良知, Zhong Mei, 対称ジエステルの実用的モノ加水分解反応のメカニズムの物理化学的研究, 日本プロセス化学会 2010 サマーシンポジウム, 2010 年 7 月 16 日, タワーホール船堀 (東京都)
7. 國西剛基, Triana Widiанти, 平賀良知, 安倍 学, 新規有機触媒ホモプロリンメチルエステル誘導体の合成と不斉アルドール反応への適用, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 27 日, 同志社大学(大阪市)
8. Triana Widiанти, 平賀良知, 小島聡志, 安倍 学, リン酸モノエステル基を有するホモプロリン誘導体を触媒とした不斉マイケル反応, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 同志社大学(大阪市)
9. 中村嘉宏, 平賀良知, 正木和夫, 家藤治幸, 安倍 学, 酵母由来のリパーゼを用いた 3 位水酸基を保護した 1,3,5-ペンタントリオールの不斉アセチル化を利用した非対称化, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 同志社大学(大阪市)
10. 藪野洋平・久本 謙・平賀良知・安倍 学, フルリアルアルコール誘導体の Paterno-Büchi と反応における位置及び立体選択性, 2009 年光化学討論会, 2009 年 9 月 17 日, 桐生市市民文化会館 (桐生市)
11. 平賀良知, 赤潮プランクトンが産生する生理活性天然物の構造解析, 日本分析化学会, 高分子分析研究懇談会, 2009 年 4 月 21 日, ゆうぼうと (東京都)
12. 中村嘉宏, 平賀良知, 正木和夫, 家藤治幸, 安倍 学, 酵母由来のリパーゼを用いた 3 位水酸基を保護した 1,3,5-トリオールのエナンチオ選択的不斉エステル化反応, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 30 日, 日本大学 (船橋市)
13. 平賀良知, 松尾昭彦, 赤潮プランクトン, *Heterocapsa circularisquama* が産生する二枚貝致死活性物質の構造解析, 2008 年日本化学会西日本大会, 2008 年 11 月 15 日, 長崎大学 (長崎市)
14. Satomi Niwayama, Hezhen Wang, Hanjoung Cho, Yoshikazu Hiraga, Studies of solvent effects in the selective monohydrolysis of symmetric diesters, First International Symposium on Process Chemistry (ISPC 08), 2008 年 7 月 29 日, 京都国際会議場 (京都市)
15. Yoshikazu Hiraga, Tsuyoki Kunishi, Triana Widiанти, Satoshi Kojima, Manabu Abe, Synthesis and application of proline-based asymmetric organocatalysts for enantioselective aldol reactions, Third International Conference on Advanced Organic Synthesis Directed toward the Ultimate Efficiency and Practicability, 2008 年 5 月 26 日, 大津プリンスホテル (大津市)

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/roc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平賀 良知 (Hiraga Yoshikazu)  
 広島大学・大学院理学研究科・准教授  
 研究者番号：10238347

### (2) 研究分担者

なし