

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22404006

研究課題名(和文)国内で被害未確認の神経毒生産渦鞭毛藻の検出法開発と有毒成分の解明

研究課題名(英文)Structure and detection of toxins from dinoflagellate

研究代表者

佐竹 真幸 (Satake, Masayuki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90261495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニュージーランドで大規模被害を発生させた赤潮渦鞭毛藻から、ポリ環状エーテル化合物を単離した。有毒成分は、マウスに対する強力な毒性を示した。酸性画分からは、梯子状ポリエーテル化合物を単離し、神経芽細胞に対して毒性を示す事を明らかとした。ニュージーランドの研究チームとの共同研究により、これらの成分の定量法を開発し、今後の中毒事件を未然に防ぐことが可能となった。

アメリカ西海岸で採集された発ガンプロモーション活性を有する有毒成分を生産する渦鞭毛藻から、細胞毒物質の単離構造決定に成功した。

研究成果の概要(英文)：A red tide occurred in New Zealand. This caused mass mortalities of fish within the harbour. Over 500 cases of human respiratory distress were also reported, with symptoms including a dry cough, severe sore throat, and headache. A cell extract of the causative dinoflagellate showed strong mouse lethality and cytotoxicity.

From the neutral lipophilic fraction five novel toxins were identified. Isolation was guided by cytotoxicity against mouse leukemia P388 cells. The sodiated cations of toxins in MALDI mass spectra were observed at over  $m/z$  2000. The most abundant toxin was determined to be a large polycyclic ether compound with 24 ether rings, including dihydrofuran, 13 hydroxy groups, and a 2-methylbut-2-enal side chain. From the hydrophilic acidic fraction another novel set of toxins were identified. The toxins consist of nine contiguous ether rings and contain a 9-membered ether ring within the central portion of the molecule. Toxins showed cytotoxicity against neuro2A cells.

研究分野：天然物化学

キーワード：構造決定 定量法開発

### 1. 研究開始当初の背景

海洋の微細藻類は、魚介類中毒原因毒や赤潮毒を生産することが知られている。近年の地球規模での環境変化により、有毒藻類の発生域が拡大している。そのため、これまでは国内で報告例がなかった有毒微細藻類の発生に備えて、微細藻類が生産する有毒成分の化学構造解明と定量法開発が必要であった。

### 2. 研究の目的

日本国内ではまだ発生が確認されていないが、神経毒を生産することが知られている渦鞭毛藻をニュージーランド、アメリカ西海岸などの諸外国周辺海域から入手し、有毒渦鞭毛藻の分布と生産する毒成分の組成を調査する事を第一の目的とした。採集した藻類を研究室で単藻培養し、作用機構解明と検出法開発に向けた標準品として神経毒成分を単離し二枚貝食中毒事件や魚貝類大量斃死の健康・漁業被害を科学的に未然防止する。また、未知化合物を探索し、新規化合物の単離構造決定を目指し、藻類の潜在的毒性を明らかにする。さらに、新規骨格を有する化合物の単離構造決定を通して、有機合成化学者に対する合成ターゲットと、生化学研究者に対する生化学試薬の供給を目指し、化学、生命科学分野に対する貢献を目的とした。

### 3. 研究の方法

日本国内ではまだ発生が確認されていないが、神経毒を生産することが知られている渦鞭毛藻をニュージーランド、アメリカ西海岸などから入手し、研究室で単藻培養した藻体から溶媒抽出、カラムクロマトグラフィーにより、有毒成分を単離精製し、その化学構造を分光学的手法を用いて解明する。有毒渦鞭毛藻の分布と生産する毒成分の組成を調査する。

### 4. 研究成果

(1) アメリカ西海岸で採集された渦鞭毛藻 *Prorocentrum hoffmannianum* を人工培養し、*P. hoffmannianum* の脂溶性画分には、発ガンプロモーション活性を有するオカダ酸が含まれていることを確認した。水溶性画分には、分子内に多数のヒドロキシ基と二重結合を有する新規ポリエンポリオール化合物プロロセントロールが含まれていることを見出した。栄養源添加海水培地を用いて、渦鞭毛藻の大量培養を行い、藻体を収穫した。藻体をメタノール抽出後、溶媒分画、各種カラムクロマトグラフィーを用いて、プロロセントロールの単離に成功した。天然有機化合物の構造決定に有効なNMRスペクトルの測定を容易にするために、分子内の安定同位体炭素 ( $^{13}\text{C}$ ) を強化したプロロセントロールを別途調製した。各種2次元NMRスペクトルの解析により、プロロセントロールの平面構造を決定した。JBCA法とユニバーサルデータベース法を用い

て、連続したヒドロキシ基の相体立体配置の決定を行った。

(2) 渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* は仏領ポリネシアなどの熱帯亜熱帯のサンゴ礁海域に生息する魚類による食中毒シガテラの原因毒シガトキシン、マイトトキシンを生産している。*Gambierdiscus toxicus* の脂溶性画分には、神経毒シガトキシンが含まれている。水溶性画分には、マイトトキシン以外にも、はしご状ポリエーテル骨格に硫酸エステル基とエポキシドを有する、新規ポリ環状エーテル化合物ガンビエロキシドが含まれていることを見出した。栄養源添加海水培地を用いて、渦鞭毛藻の大量培養を行い、藻体を収穫した。藻体をメタノール抽出後、溶媒分画、各種カラムクロマトグラフィーを用いて、ガンビエロキシドの単離に成功した。培養した藻体から得られたガンビエロキシドは僅か数100  $\mu\text{g}$  であったが、800MHzの高磁場NMR装置を用いることによりその構造決定に成功した。ガンビエロキシドの構造は、北日本のホタテガイなどに含まれる貝毒成分イェソトキシンと類似の構造を有していた。

(3) ニュージーランドウェリントン湾で赤潮を形成し、大量の魚類斃死とヒトに対する健康被害を引き起こした渦鞭毛藻 *Karenia brevisulcata* の培養藻体をアセトン抽出した。抽出液を希釈し、HP-20カラムに通過させた。カラム吸着物をアセトンで溶出させ、抽出物を中性条件下でクロロホルムと水による二層分配を行なった。クロロホルム層を sep-pak ジオールカラムで精製した。有毒成分を含む画分を C30 カラムを用いた逆相カラムクロマトグラフィーにより精製した。C30 カラムによる精製を繰り返し、4 種の有毒成分を単離した。精製は、マウスリンパ腫細胞 P388 に対する細胞毒性を指標に行なった。もっとも収量の多かった成分の MALDI MS を測定したところナトリウム付加イオンが 2076 に観測され、有毒成分が分子量 2000 以上の化合物である事を明らかとした。有毒成分は、重メタノールに対する溶解性が乏しかったため、重ピリジン中で NMR スペクトルを測定した。プロトン NMR スペクトルでは、11本のシングレットメチルと2本のダブルットメチル、5本のオレフィンシグナルが観測された。3-5ppm の間にオキシ炭素に結合した多数のプロトンシグナルが観測され、有毒成分がポリ環状エーテル化合物である事を明らかとした。単離した有毒成分は、強力なマウス致死毒性と細胞毒性を示した。腹腔内投与によるマウス致死毒性は有名なフグ毒テトロドトキシンと比較しても、わずかに弱いだけであることを明らかとした。さらに、ニュージーランドの研究チームとの共同研究により、有毒成分の検出法を開発し、今後の中毒の未然防止を可能とした。

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 8件)

R. Suzuki, R. Irie, Y. Harntaweewsup, K. Tachibana, P. T. Holland, D. T. Harwood, F. Shi, V. Beuzenberg, Y. Itoh, S. Pascal, P. J. B. Edwards, M. Satake, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 5850-5853. 査読有、Brevisulcatic acids, marine ladder-frame polyethers from the red tide dinoflagellate *Karenia brevisulcata* in New Zealand. DOI: 10.1021/ol502700h

D. T. Harwood, F. Shi, M. Satake, P. T. Holland, *TOXICON* **2014**, *84*, 19-27. 査読有、A sensitive LC-MS/MS assay for brevisulcinal and brevisulcatic acid toxins produced by the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*.

DOI:10.1016/j.toxicon.2014.03.004

R. Watanabe, H. Uchida, T. Suzuki, R. Matsushima, M. Nagae, Y. Toyohara, M. Satake, Y. Oshima, A. Inoue, T. Yasumoto, *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 10299-10303. 査読有、Gambieroxide, a novel epoxy polyether compound from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* GTP2 strain. DOI:10.1016/j.tet.2013.10.022

Y. Hamamoto, K. Tachibana, P. T. Holland, F. Shi, V. Beuzenberg, Y. Itoh, M. Satake, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4963-4968. 査読有、Brevisulcinal-F: a polycyclic ether toxin associated with massive fish-kills in New Zealand. DOI:10.1021/ja212116q

J.-S. Lee, M. Satake, Y. Horigome, Y. Oshima, T. Yasumoto, *Fish. Aqua. Sci.*, **2012**, *15*, 15-19. 査読有、Gamakamide-E, a strongly bitter tasting cyclic peptide with a hydantoin structure from cultured oysters *Crassostrea gigas*.

DOI:10.5657/FAS.2012.0015

P. Holland, F. Shi, M. Satake, Y. Hamamoto,

E. Ito, V. Beuzenberg, P. McNabb, R. Munday, L. Briggs, P. Truman, R. Gooneratne, P. Edwards, S. Pascal, *Harmful Algae* **2012**, *13*, 47-57. 査読有、Novel toxins produced by the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*.

DOI:10.1016/j.hal.2011.10.002

K. Sugahara, Y. Kitamura, M. Murata, M. Satake, K. Tachibana, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3131-3138. 査読有、Prorocentrol, a polyoxy linear carbon chain compound isolated from the toxic dinoflagellate, *Prorocentrum hoffmannianum*.

DOI:10.1021/jo102585k

T. Kuranaga, N. Ohtani, R. Tsutsumi, D.G. Baden, J. L. C. Wright, M. Satake, K.

Tachibana, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 696-699. 査読有、Total synthesis of (-)-brevisin: a concise synthesis of a new marine polycyclic ether. DOI:10.1021/ol102925d

[学会発表](計 10件)

— M. Satake, Y. Hamamoto, R. Suzuki, R. Irie, P. Holland, T. Harwood, P. McNabb, F. Shi, V. Beuzenberg, Novel toxins from the New Zealand red tide dinoflagellate *Karenia brevisulcata* 2014.10.27, The 16<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae, Wellington (New Zealand)

— 入江 樂、鈴木 里菜、佐竹 真幸、橘 和夫、T. Harwood、P. Holland、伊藤 喜之 ニュージーランドの赤潮渦鞭毛藻が生産する梯子状ポリエーテル化合物の単離と構造解析 第56回天然有機化合物討論会 2014年10月15日 高知県民会館(高知県・高知市)

— 鈴木 里菜、佐竹 真幸、橘 和夫、P. Holland, T. Harwood, F. Shi, V. Beuzenberg. ニュージーランド産有毒渦鞭毛藻の生産する新規水溶性化合物の構造解析 日本化学会第94春季年会 2014年3月29日 名古屋

- 大学 (愛知県・名古屋市)
- M. Satake, Y. Hamamoto, K. Tachibana, P. Holland, T. Harwood, F. Shi, V. Beuzenberg, New marine toxins from the red tide dinoflagellate, *Karenia brevisulcata* in New Zealand, 2012.11.5, WMF meets IUPAC, Rotterdam (Netherland)
- 佐々木幸治、濱本友佳、佐竹真幸、橘和夫 合成的手法によるポリ環状エーテル、赤潮毒 KBT-F の構造解明 日本化学会第 9 2 春季年会 2012 年 3 月 27 日 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)
- 濱本友佳、佐竹真幸、橘和夫、P. Holland、V. Beuzenberg、F. Shi ニュージージーランドの赤潮渦鞭毛藻被害に関わる巨大ポリ環状エーテル化合物群の構造決定 日本化学会第 9 2 春季年会 2012 年 3 月 27 日 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)
- M. Satake, Y. Hamamoto, K. Tachibana, P. Holland, F. Shi, V. Beuzenberg, P. Edwards, S. M. Pascal, Marine toxins in New Zealand. 2011 Nov27-Dec1, NZ Institute of Chemistry Conference, Hamilton (New Zealand).
- M. Satake, Y. Hamamoto, K. Tachibana, P. Holland, F. Shi, V. Beuzenberg, New polycyclic ethers from a red tide dinoflagellate in New Zealand. 2011 Dec11-15, The 6<sup>th</sup> International Conference on Cutting-Edge organic Chemistry in Asia, Hongkong (China)
- 菅原孝太郎、北村嘉章、佐竹真幸、村田道雄、橘和夫 オカダ酸産生渦鞭毛藻由来 ポリエンポリオール化合物 prorocentrol の立体構造解析 第 53 回天然有機化合物討論会 2011 年 9 月 27 日 大阪国際センター (大阪府・大阪市)

- 濱本友佳、佐竹真幸、橘和夫、P. Holland、V. Beuzenberg、F. Shi ニュージージーランドで発生した渦鞭毛藻が生産する巨大ポリ環状エーテル化合物の構造決定 第 53 回天然有機化合物討論会 2011 年 9 月 27 日 大阪国際センター (大阪府・大阪市)

〔図書〕(計 1 件)

佐竹真幸  
微細藻類の毒素 藻類ハンドブック  
p259-267 株式会社 NTS 2012 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/natural/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐竹 真幸 (SATAKE, Masayuki)  
東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
研究者番号：90261495