

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810096

研究課題名(和文) 渦鞭毛藻の生産する巨大分子の構造解析研究・巨大分子の機能解明へ向けて

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of the huge compound produced by the dinoflagellate

研究代表者

犬塚 俊康 (Inuzuka, Toshiyasu)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：50467271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：渦鞭毛藻Amphidinium種が生産する巨大分子SCC5148を単離し、その部分構造を解明した。二次元NMRスペクトルより断片的な構造を明らかとした。また、分解反応によって得られた分子断片の構造一つを決定した。さらに、同じ渦鞭毛藻が生産する巨大分子アンディジェノールEとGの構造を、二次元NMRスペクトルとMS/MS解析により明らかとした。アンディジェノール類はサイズが大きく異なっても共通の部分構造を持つこと、アンディジェノール類とSCC5148のNMRスペクトルを比較すると類似点が多く見られることから、SCC5148はアンディジェノール類の構造の一部を含む化合物であることが推定された。

研究成果の概要(英文)：A huge molecule, SCC5148, produced by the dinoflagellate Amphidinium sp. was isolated and analyzed its partial structure. Some partial structures of SCC5148 were revealed by the 2D-NMR spectra. Degradation reaction of SCC5148 gave many segments, and one of them was determined its structure. Additionally, novel huge molecules, amdigenols E and G, produced by the same dinoflagellate were isolated and determined their structures with 2D-NMR spectra and MS/MS analyses. Amdigenols have the common partial structures, and the some NMR signals of amdigenols were similar to those of SCC5148. This extrapolates that SCC5148 have the partial structures of amdigenols.

研究分野：天然物化学

キーワード：渦鞭毛藻 巨大分子 ポリオール NMR 質量分析 構造解析 分解反応

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻からは有用天然有機化合物が数多く発見されており、中でも、海洋渦鞭毛藻からは、特異な生物活性を示す分子量 1000 を超える巨大なポリオール・ポリエテル化合物がいくつも発見されている点が注目される。これら化合物は、酸素官能基化された長い炭素鎖骨格からなる特徴的構造をもつ。分子量 2700 程度のパリトキシン類のようにその生物活性が生体機能解明のツールとして利用されている一方、生物がなぜこのような巨大で複雑な分子をわざわざ作り出しているのかという点については謎である。この問題を解決するためには、さらに数多くの巨大分子を見出し、それらの機能や役割を解明していく必要があると考えられる。

このような背景の元、研究代表者らが新奇巨大分子の探索を行った結果、沖縄県石垣島産渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. の培養液から細胞毒性ポリオール化合物、アンディジェノール A (図 1) を見出した。¹ 一方、この渦鞭毛藻は、アンディジェノール A 以外にも、分子量 5148 の化合物 (SCC5148) を含む巨大分子を数多く産生することも判明した。

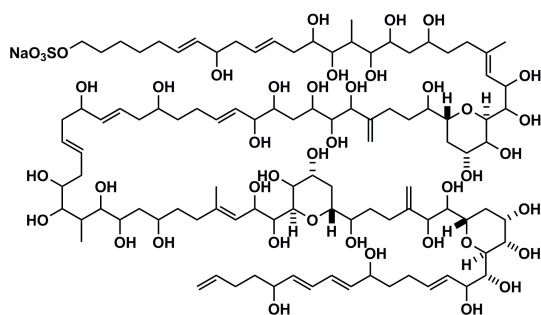


図 1 アンディジェノール A の構造

巨大分子の構造・機能解析において最も問題になるのは、複雑で巨大な構造ゆえスペクトルのシグナルが複雑化したり重なり合っており、解析が困難になることである。そのため、高分解能、高感度の分析機器の利用が不可欠である。加えて、巨大分子を断片化して個々の分子断片の構造・機能を解明し、その結果を集約して巨大分子の構造・機能を理解することも重要である。分子内の特定の構造部分のみを選択的に・効率的に開裂して分子を断片化する手法、機能性官能基を導入して断片を分子プローブ化する手法が望まれている。

1) Inuzuka, T.; Yamamoto, Y.; Yamada, K.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 239.

2. 研究の目的

巨大分子 SCC5148 の構造決定、および、巨大分子の化学分解・分子断片の化学修飾法の確立。

NMR およびマスマスペクトルの解析結果と化学分解によって得られた分子断片の構造情報とを組み合わせた巨大分子の構造解析法の構築と、効率的な巨大分子の化学分

解・修飾条件の確立を目指す。

3. 研究の方法

渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. を海水培地中で培養した後、用いた海水培地をゲルろ過、陰イオン交換クロマトグラフィー、および、逆相クロマトグラフィーを繰り返すことによって、本研究で用いる巨大分子 SCC5148 を単離した。また、その過程で、アンディジェノール A、および、新規ポリオール化合物アンディジェノール E-G を単離した。

巨大分子 SCC 5148 の構造解析を行うため、まず、二次元 NMR スペクトル解析、および、ESI-MS/MS を含む質量分析を行った。次いで、グラブス触媒を用いて、巨大分子の化学分解を行った。種々のグラブス触媒を用いて、エチレン雰囲気下、または、アルゴン雰囲気下で反応を行うことにより、異なる位置で分子が開裂するよう反応を行った。分解断片は、各種高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製を行った。さらに、ESI-CID-MS/MS 測定を行った。開裂パターンを、他の巨大分子と比較することにより分子構造の推定を試みた。

一方、巨大分子 SCC5148 を単離する過程で得られた新規ポリオール化合物アンディジェノール E および G の構造解析も行った。それぞれ、二次元 NMR スペクトル、および、MS/MS の解析を行った。アンディジェノール E については、アルゴン雰囲気下、グラブス触媒を用いた化学分解も行った。

4. 研究成果

渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. を培養した海水培地から巨大分子 SCC5148 を単離する手順は、ゲルろ過 陰イオン交換 ゲルろ過 HPLC 陰イオン交換 HPLC 逆相の書くクロマトグラフィーによる分離が最も良いことが判明した。また、この手順による分離により、新規巨大分子アンディジェノール E-G を単離することもできた。

巨大分子 SCC 5148 の二次元 NMR スペクトル解析からは、炭素鎖末端を含む断片的部分構造情報を得ることができた (図 2)。しかし、シグナルが激しく重なった複雑なスペクトルであったため、これ以上の構造情報を得ることは困難であった。

巨大分子 SCC 5148 の MALDI 質量分析から、この化合物は硫酸基を持つことが示唆された。一方、ESI-MS/MS の開裂パターンをアンディジェノール A のものと比較したところ、共通の開裂パターンを持つ部分は見られなかった。一次元 NMR スペクトルからは、SCC5148 とアンディジェノール A に共通の部分構造があることが推定されたことから、アンディジェノール A の特定の一部分と同じ構造が SCC5148 に存在すると判断した。

エチレン雰囲気下、第二世代グラブス触媒を用いた SCC5148 の分解反応から、多数の

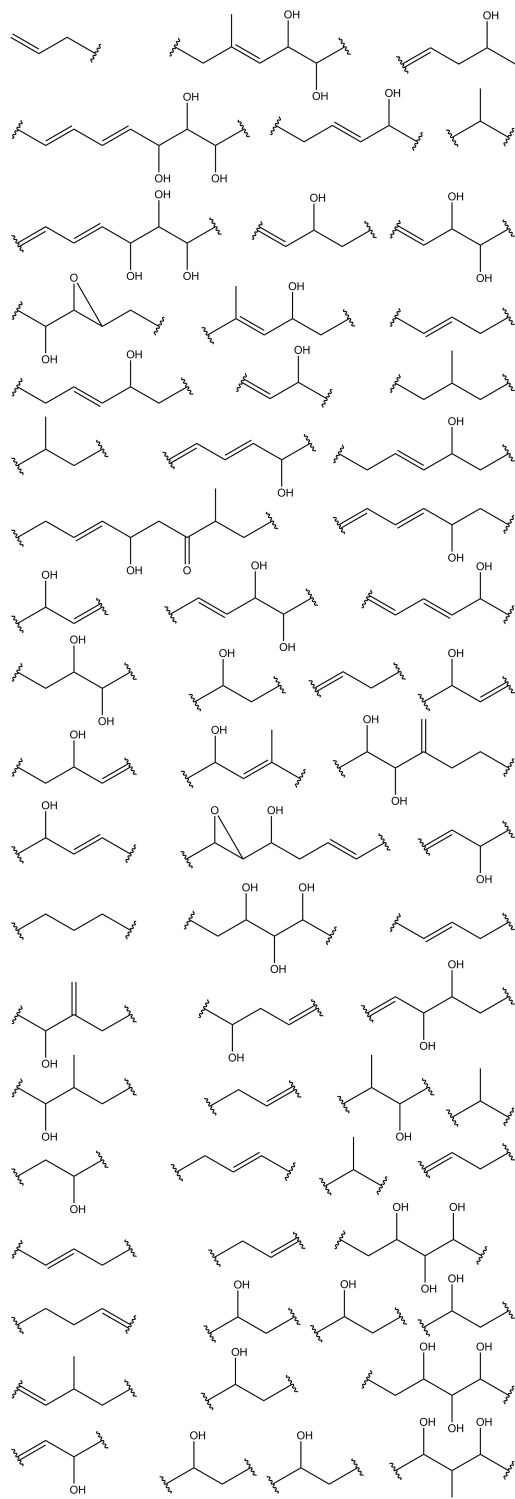


図 2 SCC5148 の部分構造

分解断片が生成した。反応混合物を、ゲルろ過、および、順相クロマトグラフィーを繰り返すことによって精製した結果、ひとつの分解断片を得ることができた(図 3)。しかし、これ以外の分解断片の単離には至らなかった。次いで、アルゴン雰囲気下、各種グラブス触媒により分解反応を実施した。第二世代ホベイダ-グラブス触媒を用いた反応で最もよく分解反応が進行した。しかし、反応混合物が複雑すぎるゆえ、ゲルろ過、順相、およ

び、逆相クロマトグラフィーを行った結果、分解断片を単離することはできなかった。さらに、分解反応後、各種機能性官能基を導入するためのモデル反応として、スチレンを加えた条件でグラブス触媒による SCC5148 の分解、および、分解断片の化学修飾を試みた。しかし、化合物は反応しなかった。

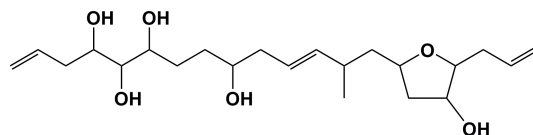


図 3 SCC5148 の分解断片

巨大分子 SCC5148 のほかに、新たに単離したポリオール化合物アンディジェノールのうち、アンディジェノール E および G の構造を解析した。

単離したアンディジェノール E の二次元 NMR スペクトル解析からは、4 つの部分構造が解析できた(図 4)。そして、MS/MS の開裂パターンをアンディジェノール A のものと比較した結果から、部分構造 a と b のつながりが分かった(図 5)。さらに、部分構造 b-d のつながりは、開裂パターンの帰属が可能なたながり方を考慮することにより決定した。これらの結果から、アンディジェノール E の平面構造、および相対立体配置の一部を決定した(図 6)。

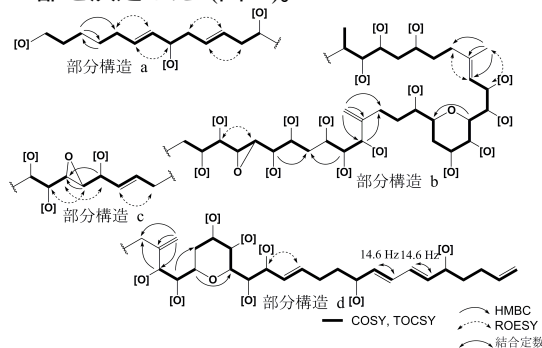


図 4 アンディジェノール E の二次元 NMR スペクトル解析

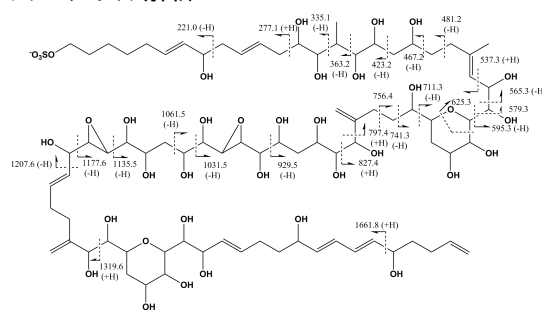


図 5 アンディジェノール E の MS/MS 解析

単離したアンディジェノール G の二次元 NMR スペクトル解析からは、2 つの部分構造が解析できた(図 7)。そして、MS/MS の開裂パターンをアンディジェノール A のものと比較した結果から、部分構造間のつなが

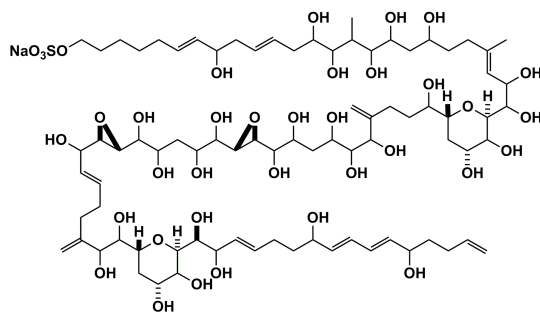


図 6 アンディジェノール E の構造

りが決定できた (図 8)。これらの結果から、アンディジェノール G の平面構造、および相対立体配置の一部を決定した (図 9)。

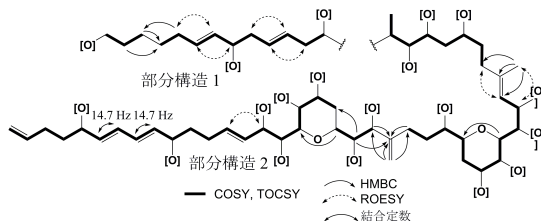


図 7 アンディジェノール G の二次元 NMR スペクトル解析

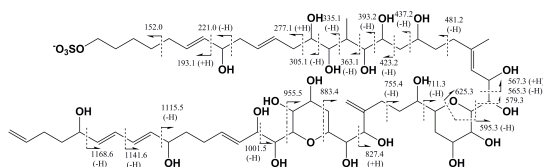


図 8 アンディジェノール G の MS/MS 解析

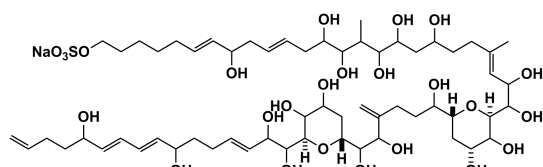


図 9 アンディジェノール G の構造

以上の結果から、巨大分子 SCC5148 の構造の一部を決定することができた。しかし、分子全体の構造を決定するには至っていない。スペクトル解析の結果を補完するための分解反応による部分構造解析で十分な結果が得られなかったためである。分解反応はエチレン雰囲気下、アルゴン雰囲気下とも十分進行しているため、いかに分解断片を精製するか、より詳細な検討が必要である。もしくは、より開裂箇所が少なくなる反応条件を見出して反応後の精製を容易にすることが必要である。分解断片の化学修飾は、分解反応と同時に行うのではなく、反応後に行うのが適切であると考えられる。

また、新たに 2 個の新規ポリオール化合物アンディジェノール E および G を単離・構造解析することができた。これらの化合物は、アンディジェノール A と共通の部分構造を持つ一方、炭素鎖長が大きく異なる点特徴的である。そして、それぞれの構造

を比較すると、生合成経路に関する推定もできる。同じ渦鞭毛藻から様々な炭素鎖長の化合物が得られたことから、スペクトル解析だけでなく生合成的にも、巨大分子 SCC5148 が、アンディジェノール類と共通の部分構造を持つ化合物であることが示唆された。今後、SCC5148 の構造決定を行う上で、この点を考慮しながら解析を進める。

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 1 件)

Amdigenols E and G, long carbon-chain polyol compounds, isolated from the marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. Inuzuka, Toshiyasu; Yamada, Kaoru; Uemura, Daisuke *Tetrahedron Letters* 2014, 55, 6319-6323. 査読・有

〔学会発表〕(計 4 件)

犬塚 俊康, 渦鞭毛藻由来新規超炭素鎖化合物の探索、第 4 回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム、2015 年 3 月、岐阜薬科大学 (岐阜県・岐阜市)

Inuzuka Toshiyasu, Long Carbon-Chain Polyols Isolated from the Marine Dinoflagellate *Amphidinium* sp., 1st Joint International Seminar of Faculty of Science and Technology (Universiti Kebangsaan Malaysia) and Faculty of Engineering (Gifu University) 2014 "Nurturing Science and Technology", 2014 年 8 月、岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

犬塚 俊康, 山田 薫, 上村 大輔, 渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. 由来の様々な炭素鎖長から成るポリオール化合物群の構造解析、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月、名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

犬塚 俊康, 山田 薫, 上村 大輔, 渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. の産生するポリオール化合物群の構造解析、第 55 回天然有機化合物討論会、2013 年 9 月、同志社大学 (京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://aris2.gifu-u.ac.jp/profile/ja.w74k29.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

犬塚 俊康 (INUZUKA, Toshiyasu)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センタ

ー・助教

研究者番号 : 5 0 4 6 7 2 7 1