

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510298

研究課題名(和文) 赤潮プランクトンが産生する特異な生理活性を有する巨大分子構造と毒性発現機構

研究課題名(英文) Chemical and Biological Studies of the Bioactive Supermolecules from Red Tide

研究代表者

平賀 良知 (Yoshikazu, Hiraga)

広島工業大学・その他部局等・教授

研究者番号：10238347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* (ヘテロカプサ) が産生する二枚貝に対して特異的に致死活性を示す毒性物質の単離・構造解明およびその毒性物質の作用因子について探求を実施した。ヘテロカプサが産生する毒性物質は、水酸基を数多くもつ構造であり、各種クロマトグラフィーによる単離・精製、および分解実験による小分子への誘導を実施した。また、ヘテロカプサが産生する不飽和脂肪酸について、構成成分を調査した。ヘテロカプサ藻体の脂肪酸組成は飽和脂肪酸が主要成分であり、C26の超長鎖脂肪酸をわずかに含むことを見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the chemical structure and biological activity of the bioactive supermolecule from the harmful phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama* caused mass mortalities of bivalves, e.g. oyster, the purification of the active compounds and the chemical degradation reactions were carried out. Also, in order to evaluate of the fatty acid composition of the *H. circularisquama*, the extract of the algae was analyzed. Major constituents of fatty acid were saturated C14 and C16 fatty acid.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：赤潮プランクトン ヘテロカプサ 構造解析 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

日本近海で発生する赤潮プランクトンのうち、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、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に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から、毒性活性物質として、分子量約 5000 および約 2000 の極微量の巨大分子が存在していることを見出している。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と推定された。

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による毒性発現機構の解明するために、機能性小分子による生体内の動的挙動の解析など、毒性物質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、ヘテロカプサが産生し、特異な生理活性を示す巨大分子の構造解析ならびに生理活性発現機構を解明するために、毒性活性を示す巨大分子の構造解析、生理活性発現に必須な化学構造の探索、生理活性を有する低分子化合物の設計・合成、毒性物質や合成低分子化合物を用いた生理活性発現機構の解明を研究目的とした。

3. 研究の方法

ヘテロカプサが産生する毒性活性を示す巨大分子の構造解析を目的として、以下の3項目について実施した。

(1) 安定した毒性物質の産生のためのヘテロカプサ培養法

ヘテロカプサから極微量に産生する毒性物質の構造を効率的に解明するため、ヘテロカプサの安定的な培養法の確立が必要である。天然海水を培地として、添加する必要栄養分、ビタミン、添加塩の割合など、培養条件の検討を実施する。特に、微量成分として添加する金属塩の組成ならびに必要な金属元素について検討した。

この培養条件の確立に伴って、安定同位体で標識した添加塩 ($\text{Na}_2^{13}\text{C}\text{O}_3$ など) を利用することによって、炭素骨格に安定同位体 (^{13}C) を導入した毒性物質を産生することも可能となる。

(2) ヘテロカプサ操体が生産する毒性物質の構造解析

ヘテロカプサが生産する毒性物質は、分子量約 2000 および約 5000 の巨大分子と推定している。これら毒性成分をヘテロカプサ操体から効率的に毒性物質を単離・精製する手法について検討した。

得られた毒性成分は、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検討した。

特に、毒性成分は、分子中の二重結合が非常に少ないこと、水酸基を多く含むことから、オゾン酸化ならびに過ヨウ素酸による酸化分解などによる化学的な分解を利用した小分子の化合物への誘導を検討した。

化学的に小分子に分解した生成物は、水酸基を多く含むため、高極性となる。そのため、分離が困難と予想される。使用する分離用担体としてアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて、高極性化合物の分離・精製を試みた。

一方で、赤潮プランクトンに含まれる脂肪酸が魚介類のエラの壊死の原因物質となることが知られている。そこで、未解明であったヘテロカプサ藻体の脂肪酸組成について検討した。

(3) 毒性物質から誘導した小分子の合成法の開発

毒性物質から誘導した小分子に含まれる立体化学を検討するため、類似有機分子を立体特異的に合成する手法の検討を行った。特に、効率的に立体化学を制御するために、アミノ酸であるプロリンを基本骨格とした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。特に、毒性物質には光学活性な水酸基を含んでいるため、アルドール反応やマイケル付加反応によって、立体制御された水酸基生成反応の開発、ならびに立体特異性を制御できる有機分子触媒の検討を行った。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った。

4. 研究成果

(1) 安定した毒性物質の産生のためのヘテロカプサ培養法

ヘテロカプサを実験室で培養する際、季節的培養による季節的な生育量の変動が認められ、毒性物質の供給量に支障をきたしていた。そこで、天然海水に添加する必須栄養分であるリン、カリウム、窒素源の添加量とヘテロカプサ生育量の季節変動の解析を実施した。その結果、主要な必須栄養源の添加量とヘテロカプサ生育速度には、明瞭な相関関係は認められなかった。次に、ヘテロカプサの培養に必要な金属塩の影響について検討した。主な添加金属イオンである鉄イオンの他、微量金属イオンとして、マンガンイオン、亜鉛イオン、コバルトイオン、銅イオンを含む培地の検討を行った。その結果、ヘテロカプサの増殖について、上記の金属イオンのいずれも必須であった。しかしながら、主成分として添加している鉄イオンの他、どの金属イオン微量成分として増殖に影響しているのかについては、引き続き検討している。

一方で、ヘテロカプサは植物プランクトンであるため、日照を必要とするため、人工気象器による明時間と暗時間との割合を検討した。その結果、最も培養量が良好であったのは、明16時間 暗8時間であった。

(2) ヘテロカプサ藻体が産生する毒性物質の構造解析

ヘテロカプサが産生する毒性物質の抽出と精製を行った。毒性物質は、ヘテロカプサ藻体のブタノール抽出物をメタノールおよびヘキサン可溶部に分配後、メタノール可溶部を逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を行った。分子量約5000 および約2000の毒性物質を含む画分をそれぞれ得た後、それぞれの画分をゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。これらの毒性成分の更なる精製を行うため、再結晶による精製を試みた。

ヘテロカプサから単離した巨大分子は、溶媒としてメタノールならび水に可溶であった。X線結晶解析を念頭に、毒性物質の再結晶を検討した。種々の有機溶媒に対する溶解性を検討した結果、低沸点溶媒として、アセトンおよびアセトニトリルを用いた際、極端に溶解性が低下し、沈殿を形成することを見出した。しかしながら、単結晶の生成は認められなかった。

そこで、ゲルろ過によって得られた粗画分にアセトニトリルを添加したのち、沈殿した毒性物質を遠心分離にて回収することによって、容易に精製度をあげることを見出した。

得られた2種の毒性物質は、それぞれ核磁気共鳴スペクトルおよび質量分析による構造解析を実施した。

分子量約2000の毒性分子については、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おり、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分子中の水酸基の数を19個と決定した。これらの官能基と各種二次元NMRスペクトルから部分構造を推定した。

次に、過ヨウ素酸酸化による小分子への誘導を行った。過ヨウ素酸酸化による分解生成物は、液体クロマトグラフ質量分析計を用いて解析した結果、分子量約800の分子の他、多数の高極性化合物の生成を確認した。現在、生成したそれぞれの分子について単離・精製を行い、構造解析を実施している。

一方、分子量約5000の毒性物質については、オゾン酸化による分解生成物を調査した。これまでに、分子量988の小分子の構造決定については完了している。残り分子量約4000に対応する分解生成物に関しての知見を得るため、各種カラムクロマトグラフィーによる分離・精製を試みた。オゾン酸化によって、高極性の生成物が得られているため、逆相担体による保持が困難であ

った。そのため、アミノ基で修飾したアフィニティーカラムクロマトグラフィーによる分離を試みた。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ため、今後検討し、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。

ヘテロカプサ藻体に含まれる脂肪酸の組成について調査した。ヘテロカプサ藻体のブタノール抽出物から調製した酢酸エチル可溶性成分に含まれる脂肪酸をメチルエステルに誘導した後、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて分析・同定した。その結果、その結果、不飽和脂肪酸としてC18:2, C18:4, C22:6を主要成分としていること、飽和脂肪酸としてC14:0, C16:0が主要成分であることを見出した。さらに、超長鎖脂肪酸として、C26:0をわずかに含むことを見出した。超長鎖脂肪酸については、ほとんど報告例が無いため、更なる調査を行っている。

(3) 毒性物質から誘導した小分子の合成法の開発

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、有効な合成法としてプロリン誘導体を有機触媒としたマイケル反応を検討した。創製した有機触媒は、水酸基を有するトレオニン、セリンおよびアラニン、フェニルアラニンをプロリンに結合したジペプチドを合成した。また、水酸基を有するアミノ酸は、水酸基を様々なシリル基で保護した。これら有機触媒を用いた不斉マイケル反応を実施した結果、フェニルアラニンをプロリンに結合した有機触媒は、基準となるプロリンを有機触媒としたときと同程度のエナンチオ選択性が認められた。一方、アラニンをプロリンに結合した有機触媒は、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。さらに、水酸基をもつアミノ酸(セリン、トレオニン)をプロリンに結合したジペプチドを有機触媒として、マイケル付加反応に適用した。その結果、シリル基の種類によって、エナンチオ選択性の向上が認められた。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予定である。

一方で、非対称分子に対してエステル化ならびに加水分解を行うことによって立体特異的に非対称化する反応条件の検討を行った。対称ジオールのリパーゼによる非対称アセチル化反応を検討した。特に、基質として3位の水酸基を様々なシリル基で保護した

ペンタン-1,5-ジオールを基質として、微生物由来のリパーゼによるモノアセチル化を検討した。その結果、水酸基の保護として導入したシリル基の構造によって、リパーゼによるモノアセチル化体が互いに逆の立体化学を有する鏡像異性体が主生成物となっていることを見出した。現在、生成物の絶対立体配置の決定を実施している。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

Takagi, Ryukichi; Tanaka, Kenji; Yamamoto, Koumei; Hiraga, Yoshikazu; Kojima, Satoshi; Abe, Manabu, Formation of isomerized E,Z-configured 1,3-dienes in construction of macrocyclic trienes by diene-ene RCM. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 査読有, **88**, 146-148 (2015).

Nakata, Satoshi; Tenno, Ryoichi; Deguchi, Ayako; Yamamoto, Hiroya; Hiraga, Yoshikazu; Izumi, Shunsuke, Marangoni flow around a camphor disk regenerated by the interaction between camphor and sodium dodecyl sulfate molecules.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 査読有, **466**, 40-44 (2015).

Tojo, Shigeo; Kim, Ji-Yun; Tanaka, Yukinori; Inaoka, Takashi; Hiraga, Yoshikazu; Ochi, Kozo, The *mthA* Mutation Conferring Low-Level Resistance to Streptomycin Enhances Antibiotic Production in *Bacillus subtilis* by Increasing the S-Adenosylmethionine Pool Size. *Journal of Bacteriology*, 査読有, **196**, 1514-1524 (2014).

平賀良知, 生物工学とケミカルバイオロジー, *生物工学会誌*, 査読有, **91**, 526 (2013).

Takagi, Ryukichi; Yamamoto, Koumei; Hiraga, Yoshikazu; Kojima, Satoshi; Abe, Manabu, A novel non-metathetic behavior of Grubbs catalyst: Ruthenium-mediated intramolecular [3+2]cycloaddition of bis-1,3-dienes. *Journal of Organometallic Chemistry*, 査読有, **723**, 171-175 (2013).

〔学会発表〕(計3件)

Niwayama, Satomi; Hiraga, Yoshikazu, Mechanistic Studies on Selective Monohydrolysis of Symmetric Diesters with the use of Dynamic Light Scattering/Electrophoretic Light Scattering, 日本化学会 第96春季年会, 2016年3月26日, 同志社大学京田辺キャンパス(京都府京田辺市)

Niwayama, Satomi; Hiraga, Yoshikazu, Mechanistic Studies on Selective Monohydrolysis of Symmetric Diesters

with the use of Dynamic Light Scattering, 249th American Chemical Society Annual Meeting, American Chemical Society, 2015年3月25日, Denver, CO (USA).

越智幸三・東條繁朗・金 智潤・田中幸徳・稲岡隆史・平賀良知, 放線菌・枯草菌における低レベルストレプトマイシン耐性変異の発見とその利用, 第29回日本放線菌学会, 2014年6月19日, つくばカピオ(茨城県つくば市)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.it-hiroshima.ac.jp/faculty/life/food/teacher/yoshikazu_hiraga/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平賀 良知 (Hiraga, Yoshikazu)

広島工業大学・生命学部・教授

研究者番号: 10238347