

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05333

研究課題名(和文)天然長鎖ポリオール化合物の活用・機能解明のための化合物同定・生物活性評価

研究課題名(英文) Identification and biological activity of novel natural huge polyols

研究代表者

犬塚 俊康 (Inuzuka, Toshiyasu)

岐阜大学・高等研究院・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)：渦鞭毛藻が生産する特異な構造や機能をもつ長鎖ポリオール化合物の生物学的機能解明や活用へ向けて、様々な渦鞭毛藻由来化合物の同定研究を実施した。

渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. から新たに8種類の化合物を見出し、*amdigenol D* など2種類の化合物の構造決定に成功した。同一渦鞭毛藻から見出した化合物は分子サイズが分子量1276～5148と非常に幅広いが、共通部分構造が多数存在する、他種由来化合物とは炭素鎖末端構造が異なる、等の化合物機能に関する知見を得ることができた。渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. から、これまで数例しか同定例のない分子量3000以上の物質を新たに発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子量数千の複雑で大きな生物由来機能性物質は、分析手法や合成技術の発展とともに有効活用することが容易となり、現在注目されている。本研究では、これら物質の生物学的機能解明も見据えた物質同定を行った。渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. が生産する化合物を新たに8種発見し、既知物質も含めて類似性や多様性を比較した結果、生物種の違いと分子認識に関わると推定される構造的知見を見出すことができた。また、他種の渦鞭毛藻からも新規化合物を複数発見し、渦鞭毛藻が多様な構造の長鎖ポリオール化合物を生産する証左を得た。

研究成果の概要(英文)：Identification of novel polyols derived from some marine dinoflagellates were performed.

8 novel compounds were isolated from the Okinawan dinoflagellate *Amphidinium* sp. 2 of them, *amdigenols D* and *F*, were determined their structures by NMR spectra and MS/MS analyses. Polyols derived from the same dinoflagellate have some common partial structures despite their molecular weight was quite difference from each other, from 1276 to 5148. This seems to mean that the common structures of polyols play an important role for the dinoflagellate producing them to identify the species of dinoflagellate.

Novel polyols produced by another dinoflagellate, *Symbiodinium* sp., whose molecular weight were over 3300 were found. This result means that dinoflagellates produce polyols with a variety of structures.

研究分野：生物有機化学

キーワード：渦鞭毛藻 長鎖ポリオール化合物 単離 構造解析

1. 研究開始当初の背景

渦鞭毛藻は、多様な生物活性物質、なかでも、長い炭素鎖骨格で構成された分子量 1000 を超える巨大なポリケチド化合物の生産者であり、特異な構造をもつ新規有用化合物の探索源として精力的に研究が行われてきた。近年は分子量数千前後の生物活性分子（中分子）の利活用に注目が集まりつつあるが、ペプチドや多糖など生体高分子を対象とした研究がその中心で、ポリケチド化合物などの非生体高分子に関しては、機能解明とその利活用に関する研究分野は発展途上であった。一方、生物がなぜわざわざ巨大な化合物を生産してどのような役割を担っているのか、という点も謎であった。

これらの問題の解決には、数多くの巨大ポリケチド化合物を見出し、その分析手法や作用機構・役割を明らかにする必要がある。したがって、渦鞭毛藻から新規ポリケチド化合物の探索を行い、その構造と機能の解明研究が問題解決に寄与すると考えた。

2. 研究の目的

多様な渦鞭毛藻種から、長い炭素鎖骨格で構成された分子量 1000 を超える巨大なポリケチド化合物を見出し、単離する。単離した化合物の構造解析を、NMR スペクトル解析や MS/MS 分析等による機器分析と、化学分解による断片化を伴う部分構造解析との組み合わせによって行う。様々な渦鞭毛藻由来巨大ポリケチド化合物の構造を比較し、それらの構造類似点や相違点を比較して、これら化合物の構造多様性や機能の推定などの議論を行う。

3. 研究の方法

沖縄県石垣島産渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. を 2 か月間培養した培養液を、ゲルろ過クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離をそれぞれ複数回行うことで、分子量 1000~2300 の化合物を 10 種類以上含む画分を得た。これを、陰イオン交換および逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離を繰り返し、化合物の単離を行った。

沖縄県産渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. を 4 か月間培養した後ろ取し、含水エタノールによって抽出した成分を、ゲルろ過クロマトグラフィーによる分離を複数回行うことで、分子量 3300 程度の化合物を 2 種類以上含む画分を得た。これを、逆相 HPLC 分離を繰り返すことで、化合物の単離を行った。

渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. 由来の化合物のうち、単離できた化合物を、ESI-CID-MS/MS 分析した。その結果を、同じ渦鞭毛藻からこれまでに単離・構造解析した化合物 amdigenol A (文献 1) や E (文献 2) のデータを比較することで、構造の共通点と相違点の推定を行った。その後、各種二次元 NMR スペクトル測定を行い、MS/MS 分析の結果との比較を行いながらスペクトルデータの解析を行った。さらに、量的に多く単離することのできた化合物については、Grubbs 触媒によるジオール部の開裂反応 (文献 3) を用いた分解反応を実施して化合物を断片化し、その分解断片の構造解析による構造確認も行った。

4. 研究成果

沖縄県石垣島産渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. の培養液より、新たに 8 種類の化合物の単離に成功した。

それらのうち、分子量 2223 の化合物 amdigenol D については、既知の amdigenol A、E およ

び G と同一の炭素鎖末端構造を両側に有し、炭素鎖中ほどの部分に相違点が存在することが ESI-CID-MS/MS 分析から明らかとなった。この点を考慮して amdigenol D の二次元 NMR スペクトル解析を行ったところ、化合物の平面構造と、環状部分の相対立体配置を決定することができた (図 1)。そして、渦鞭毛藻から数多く報告されている amphidinol 類に共通して存在するテトラヒドロピラン 2 個とそれらをつなぐ中心構造が amdigenol D には 2 個存在する一方、炭素鎖両末端はこの渦鞭毛藻種の大きさが異なるポリケチド化合物と同一である点が amdigenol D の構造的特徴であった。

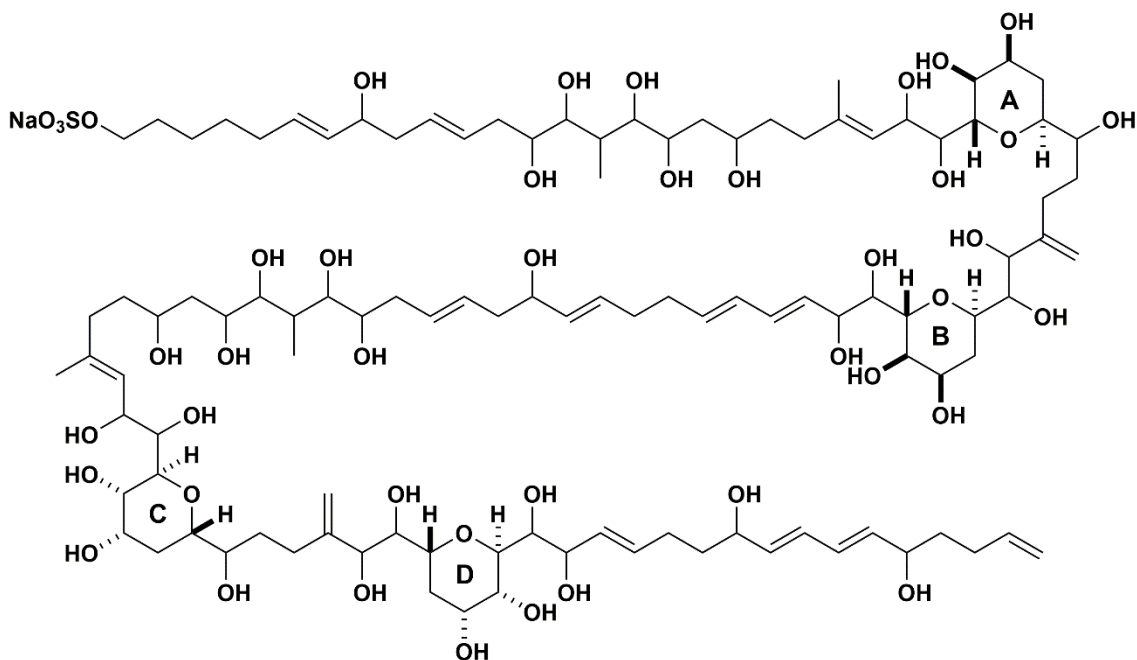


図 1 amdigenol D の構造

単離に成功したその他の化合物のうち、分子量 1799 の amdigenol F については、MS/MS 分析の結果を amdigenol E と比較することでその平面構造を推定することができた。分子量 2179、2213、2229 の amdigenol I、M、N については、MS/MS 分析の結果から、炭素鎖末端のうち硫酸基の結合していない側の炭素鎖の官能基の位置が異なっていることが判明し、その推定構造を NMR スペクトル解析から行った。これらの化合物は、いずれも化合物単離量が現在のところ 0.5 mg 以下であるため詳細なスペクトルデータを得ることができておらず、さらなる分質量の確保ののちスペクトルデータを再度得て解析する必要があると考えている。

これまでに本渦鞭毛藻種から見出した化合物の構造やこれまでの研究成果の蓄積から、amdigenol 類を含む amphidinol 類縁化合物は、渦鞭毛藻種によって共通の中心構造をもつ一方、末端鎖状部分の構造が種によって異なることが予想された。すなわち、種によって分子認識等を行うのが末端直鎖部分の役割の一つではないかと考察された。共通部分構造と異なる部分構造の役割の明確化、分子サイズによる機能の違いなどが、amphidinol 類の構造多様性研究の次の段階であると考えられた。

沖縄県産渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. の藻体抽出物に、分子量 3292 および 3308 の化合物の存在を ESI マススペクトルで見出した。これらの化合物は、3 段階の分配操作と 2 段階のゲルろ過クロマトグラフィーにより両者を分離することができると分かった。さらに、逆相 HPLC 精製を繰り返すことで、それぞれの化合物の夾雑物をほとんど除くことができた。しかし、一部の夾雑物を除ききることができなかつたため、完全に化合物を単離するための精製条件の検討を現在進めている。

・参考文献

1. Inuzuka, T.; Yamamoto, Y.; Yamada, K.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 239.
2. Inuzuka, T.; Yamada, K.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6319.
3. Han, C.; Yamano, Y.; Kakiuchi, F.; Nakamura, K.; Uemura, D. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9622.
4. Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Fujita, T.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9859.
5. Matsuda, M.; Kubota, Y.; Funabiki, K.; Uemura, D.; Inuzuka, T. *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 152376.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuda Miki、Kubota Yasuhiro、Funabiki Kazumasa、Uemura Daisuke、Inuzuka Toshiyasu	4. 巻 61
2. 論文標題 Amdigenol D, a long carbon-chain polyol, isolated from the marine dinoflagellate Amphidinium sp.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 152376 ~ 152376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2020.152376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田 美樹・犬塚俊康・船曳一正・窪田裕大・上村大輔
2. 発表標題 渦鞭毛藻Amphidinium sp.由来amdigenol Dの構造解析
3. 学会等名 第50回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中裕之・犬塚俊康・船曳一正・窪田裕大・上村大輔
2. 発表標題 沖縄県石垣島産渦鞭毛藻Amphidinium sp.由来新規二次代謝産物の単離、構造解析
3. 学会等名 第50回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤泰志・油井佑太・犬塚俊康・船曳一正・窪田裕大
2. 発表標題 渦鞭毛藻が生産する細胞毒性物質の探索研究
3. 学会等名 第50回中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中裕之・犬塚俊康・船曳一正・窪田裕大・上村大輔
2. 発表標題 沖縄県石垣島産渦鞭毛藻 <i>Amphidinium</i> sp. 由来新規amdigenol類縁化合物の単離、構造解析
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田美樹・犬塚俊康・窪田裕大・船曳一正・上村大輔
2. 発表標題 渦鞭毛藻 <i>Amphidinium</i> sp. 由来ポリオール化合物 amdigenol D の単離、構造解析
3. 学会等名 日本化学会第 99 春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤泰志・油井佑太・窪田裕大・船曳一正・犬塚俊康
2. 発表標題 渦鞭毛藻 <i>Amphidinium carterae</i> Hulburt (NIES-331) が産生する新規細胞毒性物質の探索
3. 学会等名 日本化学会第 99 春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田美樹・犬塚俊康・船曳一正・上村大輔
2. 発表標題 渦鞭毛藻 <i>Amphidinium</i> sp. 由来ポリオール化合物 amdigenol D の単離、構造解析
3. 学会等名 第49回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴村成生・犬塚俊康・船曳一正・上村大輔
2. 発表標題 渦鞭毛藻 <i>Amphidinium</i> sp. 由来 <i>amdigenol</i> 類の単離、構造解析
3. 学会等名 第49回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 油井佑太・犬塚俊康・船曳一正
2. 発表標題 渦鞭毛藻 <i>Amphidinium carterae</i> Hulburt からの細胞毒性物質の単離・構造解析
3. 学会等名 第49回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤泰志・船曳一正・犬塚俊康
2. 発表標題 渦鞭毛藻が生産する細胞毒性物質の探索研究
3. 学会等名 第49回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田美樹・鈴村成生・田中裕之・窪田裕大・船曳一正・上村大輔・犬塚俊康
2. 発表標題 渦鞭毛藻由来長鎖ポリオール化合物 <i>amdigenol</i> D および F の単離・構造解析
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------