

学位論文題名

共生渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. が生産する血管収縮物質

Zooxanthellatoxin-A の構造

学位論文内容の要旨

近年、海洋生物から多くの新規な構造、特異な生理活性をもつ化合物群が単離されている。しかし、これら海洋由来の生理活性天然物の生物起源や生合成経路の解明は、海中の生物系の食物連鎖・共生が複雑に入り組んでいるため、かなり困難である。しかし、将来的に、培養、遺伝子工学による医薬・農業の大量供給のためには必須である。我々は、これらの解明を目指して、へん形動物うず虫類に属するヒラ虫の一種 *Amphiscolops* sp. の体内に共生する渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. の培養を行い、その結果、この藻体が新規血管収縮物質を生産していることを見だし、Zooxanthellatoxin-A, B (以下 ZT-A, B と略記する) と命名した。ZT-A は、 Ca^{2+} イオンの存在下で $7 \times 10^{-7} \text{M}$ の濃度でウサギ大動脈摘出標本を収縮させる。分子式 $\text{C}_{140}\text{H}_{292}\text{O}_{57}\text{N}_5\text{SNa}$ (分子量 2896) をもち、糖・アミノ酸などの既知のユニットを含まない、大員環マクロライド構造を有する全く新規な直鎖状ポリオール化合物であると推定された。我々は、ZT-A の特異な生理活性と構造に興味を持ち、ZT-A 関連の研究の第一歩として最も基礎になる構造解析を行った。以下に ZT-A の単離・構造決定の詳細について記載する。

沖縄県サタンビーチで採取したヒラ虫 *Amphiscolops* sp. から渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. を分離し、1% ES 培地含有の天然海水で明 12 時間、暗 12 時間のサイクルで、20-25 °C の条件下、30-40 日間静置培養した。吸引濾過で藻体を収集し、海水 1 L 当たり 0.7-0.9 g (湿重量) の藻体を得た。ZT-A の単離は以下のように行った。なお、各段階での ZT-A の追跡は、血管収縮活性を指標として行った。収集した藻体 476.6 g を、70% エタノールで抽出し、濃縮後、酢酸エチル、ブタノールで順に分配した。ブタノール画分の残査を逆相系ポリスチレンカラム (CHP-20P) で分離し、次いで、イオン交換カラム (DEAE Sephadex A-25) を用いて精製した。脱塩精製後、高速液体クロマトグラフ

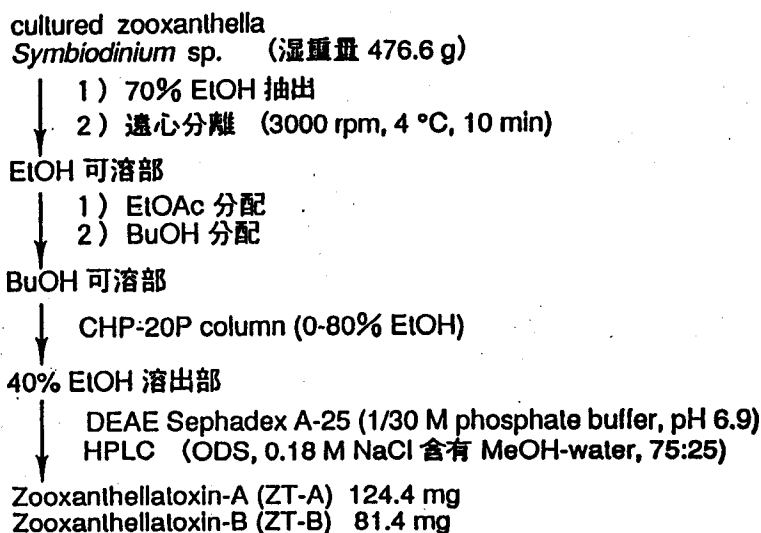


図1 ZT-A, -Bの単離

ィー (ODS カラム、0.2M NaCl 含有 MeOH-water 80:20) で分取し、ZT-A(124.4 mg)、ZT-B (81.4 mg) を単離した。(図1)

ZT-A の構造決定には、主として高分解能核磁気共鳴装置 (NMR) を用いたが、232個ものプロトンが存在するため、そのままではシグナルの重なりが激しく構造解析は困難であった。そこで、過ヨウ素酸ナトリウムによる分解反応を行い小さなフラグメントとし、各々の構造を決定した後、最後にそれらの結合様式を決定する方法を用いた。分解反応は、① NaIO₄ (20 eq.), MeOH-water (1:1), 0 °C, 10 分間 ② NaIO₄ (3 eq.), MeOH-water (1:1), 0 °C, 10 分間 ③ NaIO₄ (80 eq.), MeOH-water (1:1), 0 °C, 2 時間の3種の条件で行い、①の条件からフラグメントA～Gの7個、②からフラグメントH、③からフラグメントSの合計9個の分解生成物をシリカゲルカラムを用いて精製・単離した。NMRの測定溶媒は重メタノールを使用したが高、精製が不十分なものとシグナルの重なりのために構造解析が困難であったフラグメントB、C、F、Sは、完全アセチル化を行い、測定溶媒を重メタノールから重ベンゼンに変えて測定した。¹H, ¹³C-NMR, DQF-COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, NOE等の測定方法を駆使して、各フラグメントの構造を決定した。これらの構造から、ZT-Aの8割に相当する部分構造が明らかとなった。(図2) この段階で構造が確認できなかった箇所は、C1-C5, C66, C78, C96-C106, C1'-C4'位の合計22個の炭素であった。次に、各フラグメントがどの様に結合しているかを

ZT-A の TOCSY, HMQC, HMBC スペクトル (CD_3OD , $\text{CD}_3\text{OD}-\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 1:1 の 2 種の測定溶媒を検討した) を用いて解析した。その結果、C1-C13, C14-C104, C105-C1'-C25' の結合様式が決定された。ここで、ZT-A の含まれている 140 個全ての炭素原子が帰属されたことが、マスマスペクトルと ^{13}C -NMR の両方によって確認された。ラク톤の結合位置は、ZT-A を 1 M KOH/MeOH で処理したときに分子量が 18 増加し、かつ、重メタノール中で δ 5.43 に観測されていた C61 位のオキシメチンプロトンが加水分解後に δ 4.38 に高磁場シフトしたことから証明した。スルホン酸エステルは、ZT-A の塩酸加水分解混合液をイオンクロマト分析に供し、スルホン酸イオンを 1 分子検出したことと、C59 位のオキシメチンプロトンが δ 4.70 と他のオキシメチンプロトンより低磁場に観測されたことから決定した。C13-C14, C104-C105 位の結合の証明が最後に残されたが、前項②の分解反応での副産物として C1-C78 からなるフラグメント J が単離されたことにより、C13-C14 の結合が示され、ZT-A の全体構造が決定された。(図 2) なお、2 つのテトラヒドロフラン環とスピロ環上の置換基の相対配置については、プロトン間の結合定数の値と NOE 測定から決定した。

以上のことから、ZT-A は 2 本の炭素鎖からなる 62 員環マクロライド構造を有する極めて特異な構造であることが明らかになった。

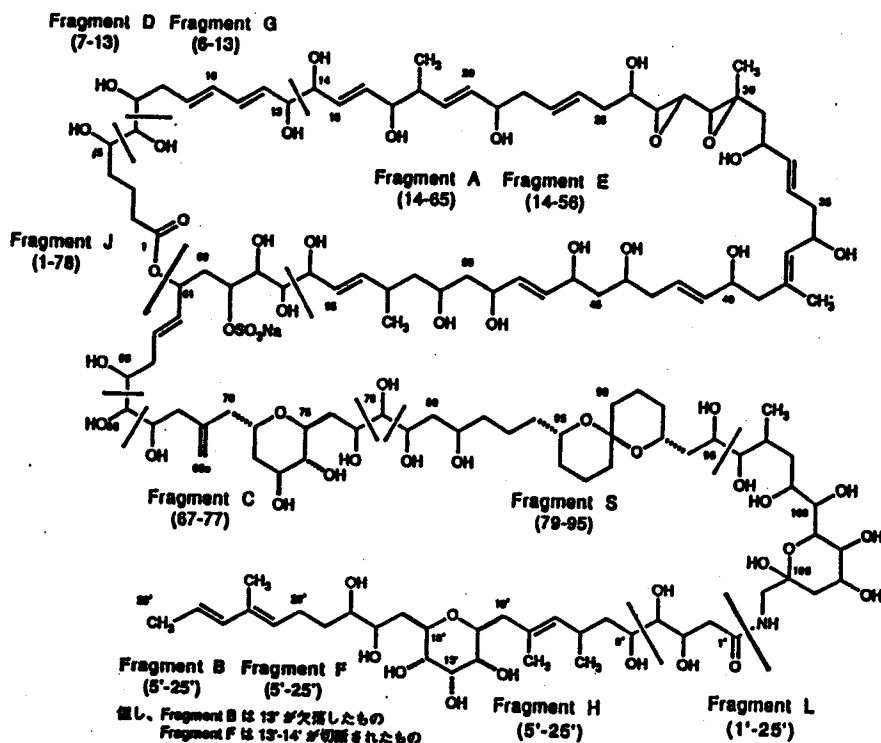


図2 Zootoxanthellatoxin-A の構造

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 村 井 章 夫
副 査 教 授 高 杉 光 雄 (地環研)
副 査 助 教 授 鈴 木 稔 (地環研)
副 査 助 教 授 中 村 英 士

学 位 論 文 題 名

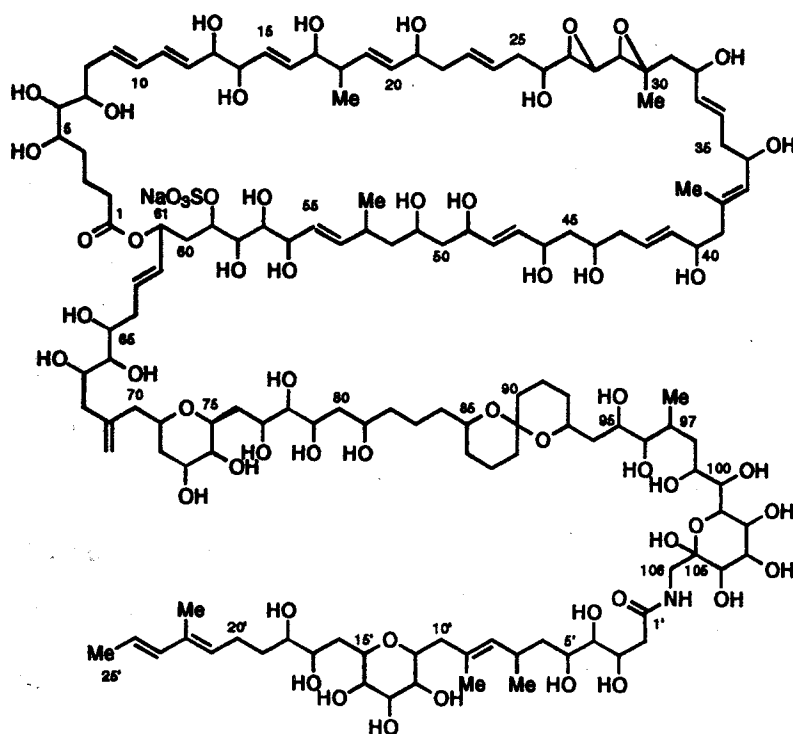
共生渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. が生産する血管収縮物質 Zooxanthellatoxin-A の構造

本論文は総ページ数130の和文論文であり、共生渦鞭毛藻が生産する血管収縮物質として単離された巨大分子Zooxanthellatoxin-Aの構造について論述されており、別に参考論文3編が添えられている。

近年、海洋生物から多くの新規な構造、特異な生理活性をもつ化合物群が単離されている。申請者は、海洋由来の生理活性天然物の生物起源の解明を目指して、へん形動物渦虫類に属するヒラ虫の一種 *Amphiscolops* sp. の体内に共生する渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. の培養を行った。すなわちヒラ虫 *Amphiscolops* sp. から渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. を分離し、1% ES培地含有の天然海水で静置培養した。その結果、海水1L当たり0.7-0.9 g (湿重量) の藻体を得た。そしてこの藻体が新規血管収縮物質を生産していることを見い出し、その本体物質を単離してZooxanthellatoxin-A, B (以下 ZT-A, Bと略記する) と命名した。すなわち収集した藻体476.6 gからZT-A (124.4 mg) およびZT-B (81.4 mg) を単離した。ZT-A は、 Ca^{2+} イオンの存在下 $7 \times 10^{-7} \text{M}$ の濃度でウサギ大動脈摘出標本を収縮させる。ZT-A の分子式を $\text{C}_{140}\text{H}_{232}\text{O}_{57}\text{N S Na}$ (分子量2396) をもつものと決定した。構造決定には、主として高分解能核磁気共鳴装置 (NMR) を用いたが、232個ものプロトンが存在するため、そのままではシグナルの重なりが激しく構造解析は困難であった。そこで過ヨウ素酸ナトリウムによる分解反応を行って小さなフラグメントとし、各々の構造を決定した後、最後にそれらの結合様式を決定する方法を用いた。すなわち3種の異なる条件下で

の過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化反応によって合計9個の分解生成物を精製・単離した。種々の測定溶媒を多用し、 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DQP-COSY, TOCSY, HMQC, HMBC およびNOE等の測定方法を駆使して、各分解生成物の構造を決定した。これらの構造から、ZT-Aの8割に相当する部分構造を明らかにした。次に、各フラグメントがどのように結合しているかをZT-A自身のNMRスペクトルを用いて解析し、各フラグメントの結合様式を決定した。またスルホン酸エステルの存在をイオンクロマト分析およびNMRによって決定し、さらにラクトンの結合位置を種々の反応によって証明した。このようにしてZT-Aが2本の炭素鎖からなる62員環マクロライドを有する極めて特異な構造であることを明らかにした。

この研究経過および結果は現段階で考えられる世界で最も水準の高いものと、極めて高い評価を得ている。審査員一同は本論文の提出者 浅利 徹が博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。



ZT-A の構造