

学 位 論 文 題 名

黄金色藻 *Ochromonas danica* から得られた クロロスルフォリピッド類の立体化学に関する研究

学位論文内容の要旨

黄金色藻（Chrysophyceae）*Ochromonas danica*は、不等毛植物門（Heterokontophyta）に属する単細胞遊泳性の植物性鞭毛虫である。1964年に*Ochromonas*属から魚毒性が示されて以来、動物プランクトンや魚類に対する毒性、バクテリア成長阻害活性、赤血球溶血作用などが報告されている。毒性物質は界面活性剤様の極性物質だと示唆されたが、単離されておらず構造は不明であった。一方で、*O. danica*は、クロロスルフォリピッド(CSL)と呼ばれる含塩素長鎖脂肪酸族硫酸エステル化合物を大量に有することが知られている。リン脂質二重膜をもたない*O. danica*にとって、双極性の脂質であるCSL類は、生体膜構成成分とみなされ毒性評価の対象とされなかった。また、粗画分を加水分解して得られたCSLの推定構造は10個以上報告されているが、天然の状態で単離されていないため生理活性評価はされておらず、その後研究は途絶えていった。近年、アドリア海産のイガイから細胞毒として得られたCSLは、その構造のユニークさと貝毒との関係から注目され、2009年に全合成が報告された。

本研究は、微細藻類などの抽出物を対象としてブラインシュリンプによるスクリーニングを行い（第1章）、強い毒性を示した*O. danica*の毒性物質解明を目的とした。また、各種クロマトグラフィーによる分離で得られた化合物の立体化学構造の解析（第2, 3, 4章）と、構造活性相関の評価および生合成経路の考察（第5章）を行なった。

*O. danica*の培養液(430 L)を遠心分離で培地を除去し、藻体を有機溶媒で抽出した。ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノール、水で分画された粗抽出物を生物試験した結果、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノールの3画分に毒性が確認された。

第2章では、*O. danica*の抽出物から得られた酢酸エチル可溶性画分に含まれる毒性物質の分離と構造解析を行なった。シリカゲルおよびODSカラムクロマトグラフィーで分画し、ELSD検出による逆相HPLCで精製した結果、主要なCSLである2,2,11,13,15,16-hexachlorodocosane-1,14-disulfate(**1**, LC_{50} 2.2 $\mu\text{g/mL}$)とともに、2,2,11,13,15,16-hexachloro-14-docosanol-1-sulfate (**2**, LC_{50} 0.27 $\mu\text{g/mL}$)と2,2,11,13,15,16-hexachlorodocosane-1,14-diol(**3**, LC_{50} > 30 $\mu\text{g/mL}$)が得られた。これらは、HR-ESI-MSで分子式(**1**: $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{Cl}_6\text{S}_2$, **2**: $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_5\text{Cl}_6\text{S}$, **3**: $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_2\text{Cl}_6$)が決定され、IRから**1**と**2**に硫酸エステルの存在が示された。1Dおよび2D NMRスペクトルから3つの部分構造を決定し、ESI-MS/MSにより部分構造間のメチレン鎖長を決定すると共に塩素と硫酸エステルの結合位置を確認した。立体構造

の決定は、 ^1H -NMRから得られる $^3J_{\text{HH}}$ と、異種核 J 分解スペクトルから算出した遠隔CHカップリング定数を組み合わせて立体配置を求めるJBCA法を用いた。電気陰性度の高い塩素原子はJBCAにおいて酸素原子と同様に扱えることから、これを応用し相対立体構造を決定した。絶対立体構造を明らかにするために**1**を酸加水分解して得られたジオール体(**1a**)を(*R*)-および(*S*)-MTPAClで処理し、(*S*)-および(*R*)-MTPAジエステルを得た。二つのMTPAエステルの ^1H NMR化学シフトを比較した結果、硫酸エステルが結合する不斉炭素が*S*配置だと決定でき、すべての不斉中心の絶対立体が明らかになった。化合物**2**を加水分解して得られたジオール体**2a**と**3**は、**1a**と ^1H NMRスペクトルが一致したため、これらが同じ相対立体配置を有することが示された。さらに、これらがすべて右旋性を示したことから、絶対立体配置も一致すると決定した。

第3章では、ブタノール可溶性画分から毒性物質を探索した。化合物の分離は第2章にならったが、CSL類が高極性で粘性が高く、ODSなどの一般的なHPLCカラムではピークがブロードになり分離が困難であった。カラムを種々検討した結果、MeOH/H₂O、MeCN/H₂O溶媒系では、C30カラムが良好な分離を示した。その結果、主要成分の**1**と共に11,13,15,16-tetrachlorodocosane-1,14-disulfate(**4**)、11,13,15-trichlorodocosane-1,14-disulfate(**5**)、13-chlorodocosane-1,14-disulfate(**6**)、14-chlorotetracosane-1,15-disulfate(**7**)、docosane-1,14-disulfate(**8**)が得られた。これらは**1**と同様に、2D NMR、ESI-MS/MS、JBCA法により平面構造と相対立体構造を決定した。化合物**4-7**の絶対立体配置は、新Mosher法により決定し、**8**は旋光度を文献値との比較により決定した。

第4章では、低極性ながら活性を示したクロロホルム画分の分離を行った。活性を指標とした各種クロマトグラフィーによる分離の結果、**1**と新規CSLの2,11,13,15,16-pentachlorodocosa-1-ene-1,14-disulfate(**9**)、およびポルフィリン骨格のpyropheophorbide **a**(**10**)が単離された。化合物**9**の平面構造は他の化合物と同様に決定したが、NMR測定中に分解したため立体化学配置は未決定である。化合物**10**は、標品と ^1H NMRが一致したことにより同定した。

単離した化合物のうち、最も強く活性を示したのは、**10**(LC₅₀ 0.025 μg/mL)で、CSLの中では、**2**のみが強い活性を示した。他の二置換硫酸エステル化合物の活性は、LC₅₀ 2.2-6.9 μg/mLであった。この結果は、活性には硫酸エステルが必要で、塩素原子の有無や数に依存しないことを示した。Pyropheophorbide **a**は強い毒性を示したが、この化合物の含有量がCSLsと比較して微量であったことと、低極性化合物であることから、CSLが本藻の主要な極性毒性物質である。

今回得られたCSLsの立体配置はすべて同じであった。このことは、同一生合成経路上にあることを示唆すると共に、アリファティック硫酸ジエステルから段階的な塩素化が行なわれ、最終生成物が生合成されることを示唆する。

本研究により、1960年代から問題となっていた本藻由来の毒性物質がCSL類であると示された。また、本研究で初めて主要毒性成分**1**の絶対立体配置が決定された。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	沖野龍文
副査	教授	松田冬彦
副査	教授	坂入信夫
副査	教授	本村泰三

学位論文題名

黄金色藻 *Ochromonas danica* から得られた

クロロスルフォリピッド類の立体化学に関する研究

クロロスルフォリピッドは、1970年頃から知られる黄金色藻 *Ochromonas danica* が生産する多数の塩素と硫酸エステルを有する特異な構造の脂質である。クロロスルフォリピッドが、*Ochromonas* に報告された毒性の本体であることが示唆されたが、単離されておらず毒性を確認できなかった。混合物から化学分解後平面構造が決定されたが、立体化学についても不明のままであった。長く報告が途絶えていたが、2000年前後にアドリア海産の貝毒で知られるイガイから細胞毒性物質として構造類似のクロロスルフォリピッドが報告された。特異な構造と貝毒の関係から注目されるようになり、イガイのクロロスルフォリピッドは2009年に全合成が報告された。海洋環境の観点からも、有機化学の観点からも非常に注目されている分子である。しかしながら、最も代表的なクロロスルフォリピッドである *Ochoromonas* 由来の本脂質は、単離にすら成功せず、約40年経過していた。そこで、申請者は、本課題に取り組んだ。

まず、申請者が本課題に取り組んだきっかけは、学位論文第1章に示されるように微細藻類に対するブラインシュリンプ毒性のスクリーニングの結果であった。*Ochromonas* の毒性物質を探索することは、長年謎のままであるクロロスルフォリピッドの単離に取り組まなければならないことが予想されたが、申請者は果敢にその課題に取り組むこととした。

O. danica を抽出後、溶媒分画したところ、毒性は複数の画分に分散したが、丁寧に各画分から毒性成分の精製に取り組んだ。毒性成分の高速液体クロマトグラフィーによる検出はELSDを用いることで成功し、C30のカラムを最終的に用いることで、長年不可能であった *Ochoromonas* のクロロスルフォリピッドの単離を成し遂げた。結果的には、毒性のある複数の画分から精製し、塩素6個を有する主要成分を含む9種類のクロロスルフォリピッドと pyropheophorbide a を単離した。クロロスルフォリピッド類の分子式の決定にあたっては、過去には混乱があったが、ESI-MS-MSにより明快にそれぞれの塩素および硫酸エステルの

数を含めて決定した。平面構造の決定は2次元NMRに加えて、MS・MSにより決定した。相対立体配置は、JBCA法により決定したが、そのためにCHの小さな遠隔結合定数を正確に測定することは一般的に非常に難しい。申請者は、異種核 J 分解スペクトルから遠隔CHカップリング定数を正確に算出し、相対立体配置を決定することに成功した。最近になり主要化合物についてラセミ体合成が報告され、申請者の決定した相対立体配置が正しいと証明されている。さらに、MTPAエステルに誘導化し、新Mosher法により絶対立体配置を決定した。微量成分についても、1種類を除いて、絶対立体配置を同様に決定した。ただし、3種類については、旋光度の文献値あるいは実験値が存在する化合物に誘導化して決定した。以上のように塩素が0～6個、硫酸エステルが0～2個の9種類のクロロスルフォリピッドについて、丹念に膨大な量のNMRおよびマススペクトルを解析して化学構造を決定したが、これは現在の構造決定技術でも非常に困難な部類のものを達成したと評価される。

以上、単離・精製された化合物について生物活性を評価した。最も活性が強かったのは pyropheophorbide aであるが、含量が少なく活性の本体とは言えない。クロロスルフォリピッドは、概ね同程度の活性を示したが、硫酸エステルが末端のみに存在する化合物が強い活性を示す一方で、硫酸エステルが存在しない化合物は活性を示さなかった。塩素原子の数と活性には相関がなかった。

以上の通り、精製及び構造決定が難しく長年決定されてこなかった *Ochromonas* のクロロスルフォリピッドの主要成分の立体化学および、生合成中間体と考えられる微量成分の構造について新知見を得たものであり、水圏生態系における重要プランクトンである *Ochromonas* を理解することに対して貢献する。

よって、審査委員一同は、申請者は博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。