

3. 異常に長い炭素鎖を持つ海洋天然物の化学的研究

上村 大輔

Key words: 天然物化学, 巨大炭素鎖分子,
生物活性物質, 渦鞭毛藻

神奈川大学 理学部 化学科 上村研究室

緒 言

私たちはこれまで、自然界に存在する物質の中でも特に、人智を凌ぐ化学構造と切れ味鋭い生理活性を併せ持つ化学物質について研究を展開してきた。とりわけ、海洋生物の二次代謝産物研究においては、世界的にも注目される成果を挙げてきた。例えば、腔腸動物イワスナギンチャクから単離・構造決定したバリトキシンは、現在知られている最も強力な毒物であると同時に、分子量 2,680 と従来の常識から逸脱した巨大分子として歴史に残る。さらに、クロイソカイメンからハリコンドリリン B (分子量 1,110) を顕著な抗腫瘍活性を示す化合物として発見した。この分子もその新規な構造、顕著な活性、そして独特な作用機構から大きなインパクトを与えた。さらに、本分子をリードとして開発された医薬品ハラヴェンは抗癌剤として実用化された。これらの分子は、次の特徴を持つ有機分子である。

- ・ポリケチド由来と考えられる極めて長い一本の炭素鎖を骨格とする。
- ・分子量は数千を超え、一つの化学式で表される純粋な化学分子として最大級である。

私たちは、このような巨大な有機分子を「巨大炭素鎖有機分子」と定義した。しかしながら巨大炭素鎖有機分子に関しては、構造や機能、あるいは生成成といったあらゆる点において未だ断片的にしか解明されていない。従って、この未知の創造物について総合的な研究を行う事により、その性質を体系的に理解する必要があると考える。そこで本研究計画では「巨大炭素鎖を持つ特異な天然有機分子の化学」として研究を展開し、今後新しい分野として確立する事を目的とした。

この目的を達成するために私達は、これまで天然物化学の分野では行われてこなかったような手法をとり入れる事とした。海洋性天然物の研究では、藻類やカイメン等を直接有機溶媒で抽出して単離が行われている。しかしながら、天然から得られる化合物は非常に微量な場合が多い。巨大炭素鎖分子の構造決定や活性の検定には量的供給が不可欠であり、この点がネックとなっていた。ところで近年の研究によれば、海洋由来天然物の多くはカイメンそのものが真の生産者ではなく、そこに共生する微生物が生産していると示唆されている。そこで本研究では、このような微生物を大量培養し、新規長炭素鎖分子の探索を行った。

方 法

私たちはこれまでに、種々のカイメンやヒラムシから微生物を単離して、およそ 410 株からなる渦鞭毛藻ライブラリーを構築した。そのうち本研究においては、紅藻 *Digenea simplex* の表面から採集した渦鞭毛藻, *Amphidinium* sp. を 120 L の海水培地で静置培養した。培養後、ろ過によって海水培地と藻体を分離した。このうち、海水を TSK-G3000S ゲルカラム, DEAE-Sephadex ゲルカラム, Sephadex LH-20 カラムによって順次分離した。その後さらに、陰イオン交換 HPLC を繰り返した。これら化合物の化学構造は、マススペクトルによる分子量測定と一次元、二次元による各種 NMR スペクトルから決定した。

カルシウムチャンネルの阻害活性に関しては、次のように行った。分化させた神経芽腫細胞, IMR-32 を各種濃度 *amdigenol* 存在下、塩化カリウムで刺激した。細胞内カルシウム濃度は、Fura 2 を用いて測定した。

結果

私達の渦鞭毛藻大量培養とそれに続く精製のステップによって、最終的に amdigenol E 及び amdigenol G と名付けた新規化合物二種類をそれぞれ 1.3 mg, 0.9 mg 単離する事に成功した¹⁾ (図 1).

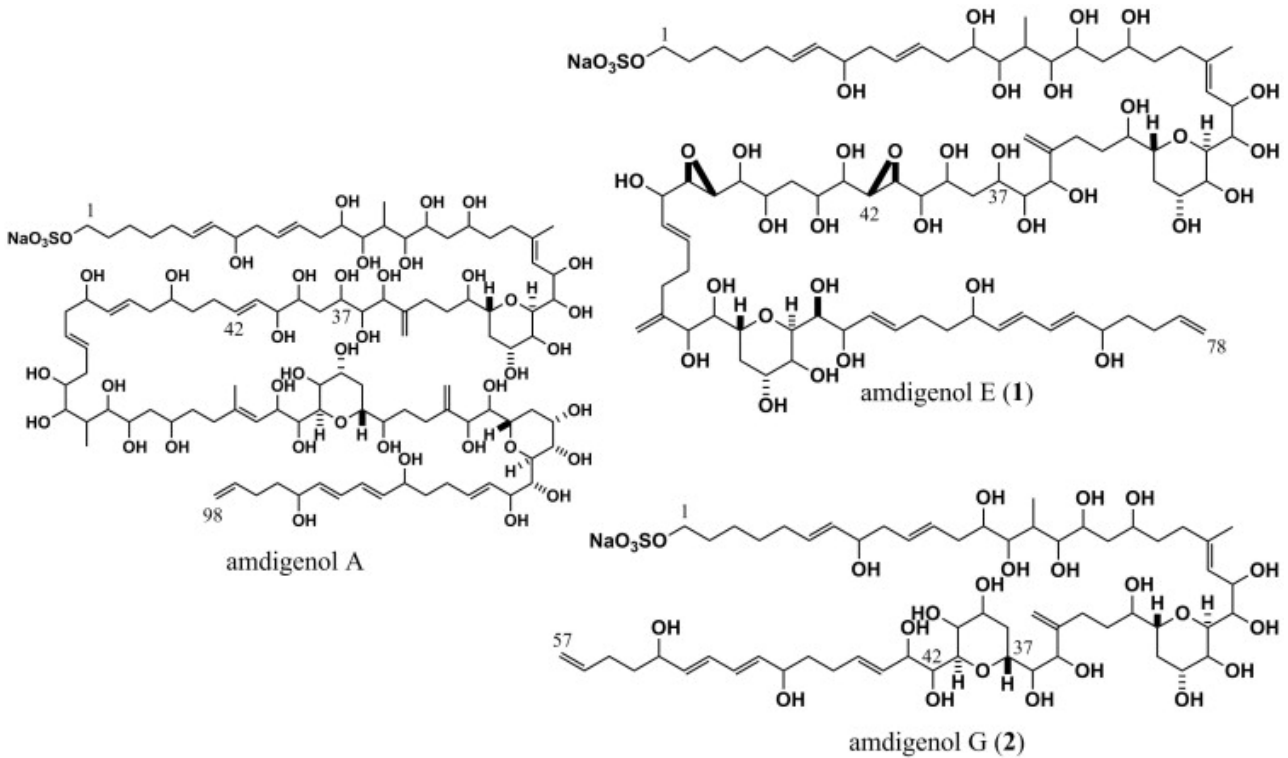


図 1. Amdigenol A, E 及び G の化学構造.
新規分子 amdigenol 類の化学構造.

Amdigenol E は無色アモルファス状の固体として得られた。高分解能 ESI-MS の分析結果から、その分子式は $C_{82}H_{137}NaO_{37}S$ と決定した (m/z 1745.8533 [M-Na]⁻: calcd for $C_{82}H_{137}O_{37}S$, -0.2 mu)。プロトン NMR を測定したところ、amdigenol E には 1 本のダブルレットメチル、4 つのエポキシドプロトンを含むオキシメチレン或いはオキシメチンプロトン及びオレフィンプロトンが多数観測された (図略)。Amdigenol E のプロトン NMR は amdigenol A のそれと酷似していたが、amdigenol A にはエポキシドのプロトンは観測されない。さらに、COSY, TOCSY, HMQC の観測結果から、図 2 の太線で示した 10 個の部分構造が明らかとなった。オレフィン部位の配座に関しては、ROESY の相関と J 値によって決定した (図 2)。

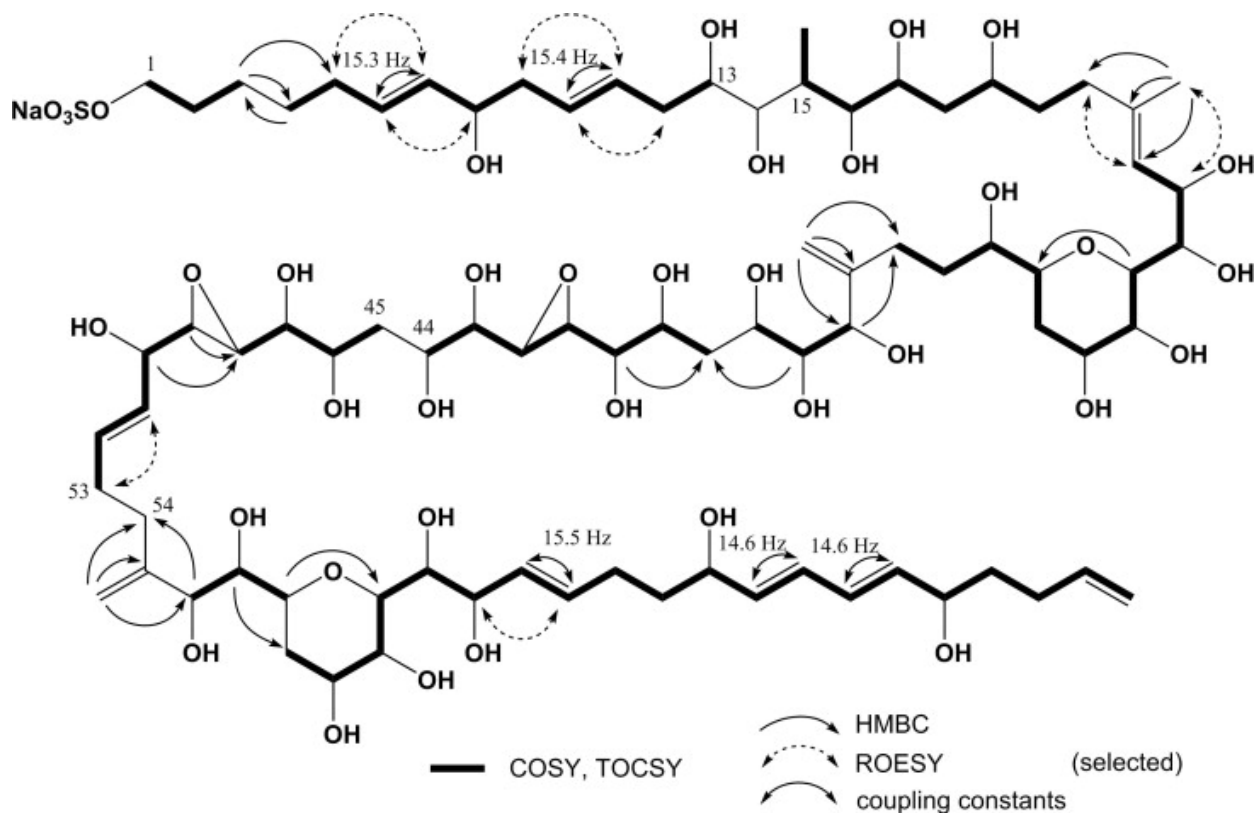


図2. Amdigenol E の二次元 NMR 解析.

二次元 NMR 解析によって得られた amdigenol E の COSY, TOCSY, HMBC, ROESY 相関を示す.

さらに、HMBC の相関から 10 個の部分構造をつなぎ合わせ、C1-C13, C15-C44, C45-C53, C54-C78 という 4 つの部分構造が明らかとなった。しかしながら、これら 4 つの部分構造をつなぎ合わせるまでには HMBC 相関が充分ではなかった。分子式とこれら部分構造から、この分子は 1 個の硫酸エステルと 28 個の水酸基を持つと予想された。そこで 4 つの部分構造硫酸エステルとの位置関係を明らかにする為に、MS/MS 解析を行った (図 3)。

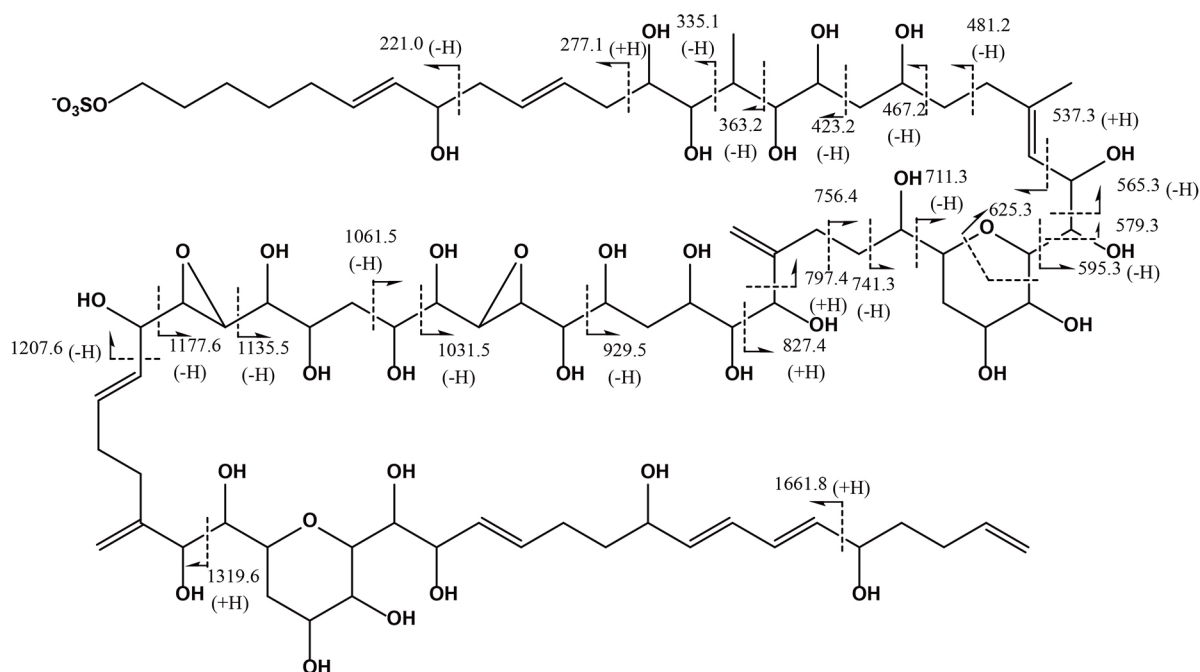


図3. Amdigenol E の MS/MS 解析.

MS/MS 解析によって検出された amdigenol E のフラグメントイオン解析を示す.

ほとんど全てのフラグメントイオンピークは、929.5 以下であった。これは、amdigenol A の C1-C39 部分に一致すると考えられた。従ってこの結果から、C1-C13 部分構造と C15-C45 部分構造の間にオキシメチンが一つある事が示唆された。また、図3に示すフラグメントイオンピークから、4つの部分構造全てが連結できた。その構造を図1に示す。

Amdigenol G は、無色アモルファス状の固体として単離された。高分解能 ESI-MS の分析結果から、その分子式を $C_{60}H_{101}NaO_{25}S$ と決定した (m/z 1253.6351 $[M-Na]^-$)。この化合物のプロトン NMR スペクトルにおいては、1 個の二重線メチルプロトン、オキシメチレン或いはオキシメチンプロトン、オレフィンプロトンのシグナルが多数観測された。このスペクトルは、amdigenol A や E のそれと非常に類似していたが、エポキシドのシグナルは観測されなかった。また、COSY, TOCSY, HMQC の観測結果から、図4の太線で示した6個の部分構造が明らかとなった。

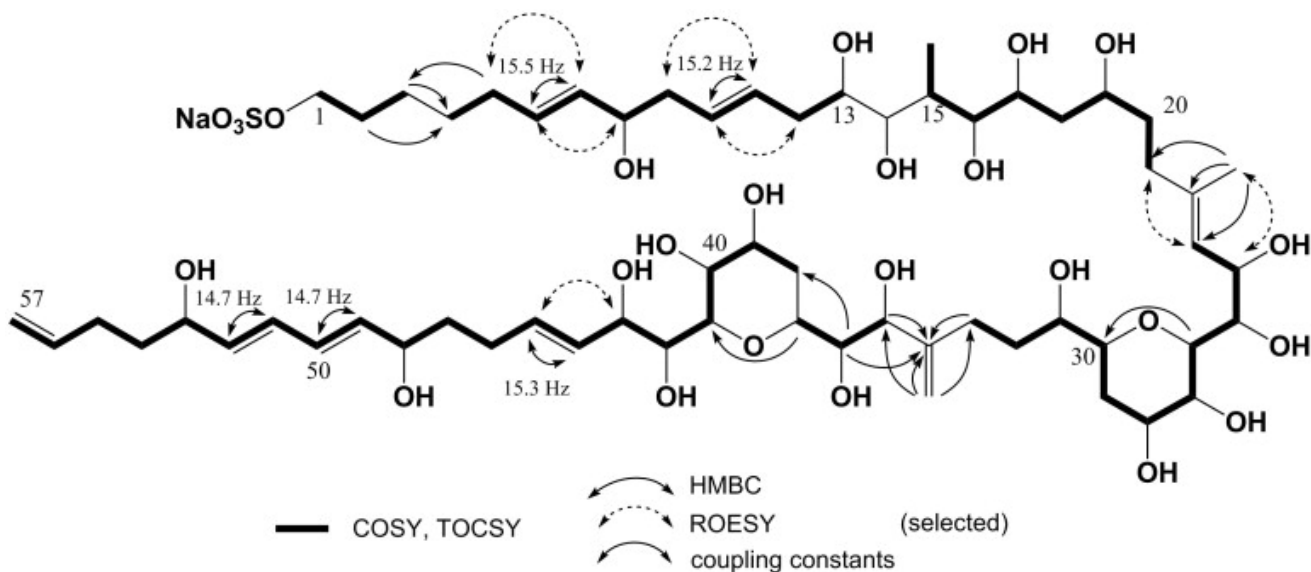


図4. Amdigenol G の二次元 NMR 解析.

二次元 NMR 解析によって明らかになった amdigenol G の COSY, TOCSY, HMBC, ROESY 相関を示す.

さらに, HMBC 相関の測定から, C3 と C4, C21 と C23, C33 と C35, C37 と C38 の結合が明らかとなった. ROESY 相関とカップリング定数から, オレフィン部位における配座を図4に示すように決定した.

NMR 解析のみでは二つの部分構造 C1-C13 と C15-C57 を連結させる事ができなかったため, MS/MS 解析を行った. フラグメントイオンピークの殆どは 827.4 以下であり, この値は amdigenol A のそれと一致した. 従って, C13-C15 部分は, amdigenol A と同一であると考えられた (図5).

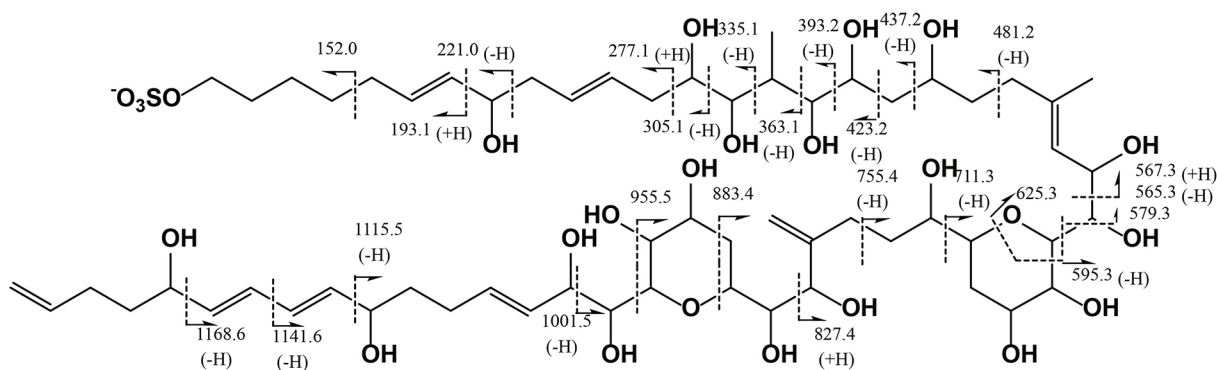


図5. Amdigenol G の MS/MS 解析.

MS/MS 解析によって検出された amdigenol G のフラグメントイオン解析を示す.

以上から導いた amdigenol G の平面構造を図1に示す.

また amdigenol E と G の生物活性としては, N-型カルシウムチャネルを阻害する事が明らかとなった. L-型カルシウムチャネル阻害剤であるニフェジピン存在下, 塩化カリウムで刺激した分化した IMR-32 神経芽腫細胞において, amdigenol 類を共存させると細胞内カルシウム濃度の上昇が観察されなかった. この結果は, 本化合物群が N-型カルシウムチャネルの開口を阻害する事を示唆している.

考 察

Amdigenol E と G は, amphidinol の類縁体であると考えられる. 特に amdigenol G はその典型であり, 二本の直鎖状炭素鎖が, 核となる部位 (C22-C41) で連結している. Amdigenol E, G, 及び A は, 多くの共通な部分構造を共有している. 炭素鎖の両末端は全く同一であり, またテトラヒドロピラン部位の相対立体配置も共通である. しかし, 連結部分は各々において全く異なる. Amdigenol A は繰り返しの部分構造であるが, amdigenol E ではその部分がエポキシドになっている. また炭素鎖長が異なるため, 全体の形も各々によって全く異なっている. このような構造の相違は, これら化合物の生合成を考える上で重要なヒントとなる. 例えば, C37-C42 部分のテトラヒドロピラン部位は, 図 6 に示すような生合成経路の存在を示唆する.

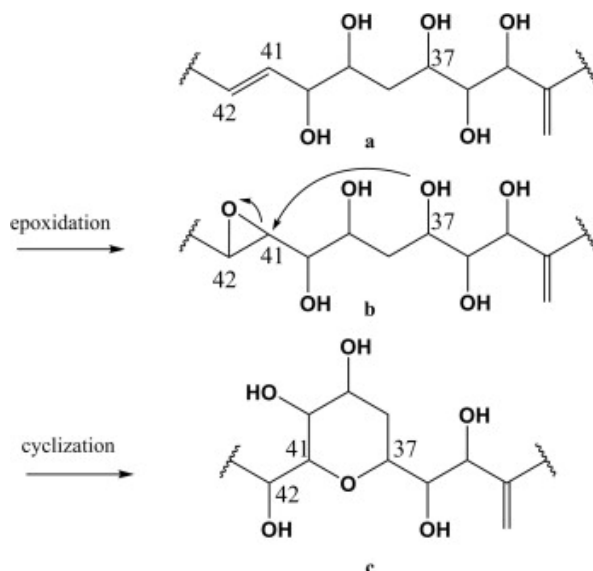


図 6. Amdigenol 類の生合成経路.
Amdigenol 類の化学構造から示唆される生合成経路を示す.

以上まとめると, 私達は二つの新規長炭素鎖分子, amdigenol E と G を渦鞭毛藻の大量培養を通じて単離し, その化学構造を決定した. これらは炭素鎖長は異なるものの, 特徴的な構造を共有しており, amdigenol A の類縁体であると考えられた. これら化合物の絶対立体配置や生理学的重要性に関して, 現在研究を進めているところである.

共同研究者

本研究の共同研究者は岐阜大学生命科学総合支援センター犬塚俊康, 神奈川大学天然医薬リード探索研究所川添嘉徳である.

文 献

- 1) Inuzuka, T., Yamada, K. & Uemura, D. : Amdigenol E and G, long carbon-chain polyol compounds, isolated from the marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Tetrahedron Lett.*, **55** : 6319-6323, 2014.