

《様式B》

研究テーマ	「ポリオール化合物アンディジェノール類分子断片の機能解明へ向けた研究」		
研究責任者	所属機関名	岐阜大学	
	官職又は役職	助教	
	氏名	犬塚 俊康	メールアドレス inuzuka@gifu-u.ac.jp
共同研究者	所属機関名		
	官職又は役職		
	氏名		

(平成 28 年度募集) 第 29 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

沖縄県石垣島産渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. が生産する長鎖ポリオール化合物群アンディジェノール類の生物活性発現機構解明へ向けた足掛かりとして、アンディジェノール類を化学分解することで得られる分子断片の機能を解明するための研究を実施した。

沖縄県石垣島沿岸で採集した渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. を、栄養補助剤を添加した海水培地中で 2 ヶ月間培養した後、吸引ろ過により藻体と海水培地に分離した。アンディジェノール類の多くは藻体から海水培地中に放出されているため、海水培地を吸着ゲルろ過することにより、脱塩、および、海水培地中の渦鞭毛藻生産物質の分離を行った。これらの物質を 4 段階の各種クロマトグラフィーによる分離を繰り返すことで、4 種のアンディジェノール類を単離した。

これらのうち、アンディジェノール D および F は新規化合物であったため、まず、MS/MS 分析により構造解析を試みた。アンディジェノール F は、フラグメントイオンピークの解析結果より、アンディジェノール E にオキシメチン炭素が 1 個挿入された構造であることが判明した。一方、アンディジェノール D は、アンディジェノール A と炭素鎖両末端構造は同一で中央部が異なることが判明したが、フラグメントイオンピークの情報のみではその構造を解明するには至らなかった。

次いで、アンディジェノール類の分解反応条件を確立するため、構造既知のアンディジェノール E と未知のアンディジェノール D を用いて、Grubbs 触媒を用いた炭素-炭素結合開裂反応を検討した。アンディジェノール D については、分解断片の構造を解析することにより、MS/MS 分析で明らかにできなかった部分の構造解析も兼ねることとした。メタセシス開裂反応を行ったところ、アンディジェノール類が分解されたことは TLC 分析により確認できたが、目的とする炭素鎖オレフィン部の開裂反応に加えジオール部の酸化的開裂反応が副反応として起こっていることが反応混合物の ESI 質量分析により明らかとなった。そのため、反応生成物が非常に多種類となり、各生成断片の生成量も非常に少なくなってしまうことから、各断片の生物活性は確認できず、生物活性発現に重要な部位の特定には至らなかった。

今後、渦鞭毛藻の培養条件や化合物の精製法の改善を行ってより多くのアンディジェノール類の単離を行った後、本課題では副反応として起こった炭素鎖の酸化的開裂反応を主反応として用いた分解反応を行えば、生物活性試験に十分な量の化合物断片を確保でき、生物活性発現に重要な部位を確認して、化合物の機能解明できると考えられる。

1. 実施内容および成果の説明（A 4 で、5 ページ以内）

沖縄県石垣島産渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. は、カルシウムイオンチャネル開口阻害活性を持つ長鎖ポリオール化合物、アンディジェノール類を生産することをこれまでの研究で明らかにしてきた。アンディジェノール類は、分子内に互いに類似な構造を持つ一方で、分子量 1276～2169 と様々な分子サイズの化合物が見つかった。本研究では、これらの特異な長鎖ポリオール化合物の機能解明研究を行うため、アンディジェノール類を分解反応により断片化し、それぞれの断片の生物活性等からアンディジェノール類の生物活性発現機構を解明することを目指して以下に述べる各実験を実施した。

沖縄県石垣島で採集した渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. を、ES タイプの栄養補助剤を 2 % 添加した海水培地中で、自然光下、25 °C にて 2 ヶ月間培養した。培養後、吸引ろ過により藻体と海水培地とに分離した。これまでの研究で、アンディジェノール類は海水培地中に多く含まれることが分かっているため、海水培地を TSK-G3000S ゲルを用いた吸着ゲルろ過クロマトグラフィーにて脱塩と精製を行った。次いで、アンディジェノール類を含む画分を、ESI マスペクトルによる長鎖ポリオール化合物由来の分子イオンピークを指標として、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、陰イオン交換 HPLC、および、逆相 HPLC による精製を行うことにより、既知の化合物アンディジェノール E とともに、新規化合物アンディジェノール D および F を単離することに成功した。海水培地 120 L から得られたアンディジェノール D、E および F の量はそれぞれ、0.9 mg、2.8 mg、2.4 mg であった。

アンディジェノール D および F は新規化合物であったため、まず、平面構造を決定するためのスペクトル解析を行った。アンディジェノール D は ESI マスペクトルで m/z 2200 [M-Na] で、これまでに存在を確認しているアンディジェノール類の中は最大であり、また、既知のアンディジェノール A の分子量と近いことが分かった (m/z 2146 [M-Na])。¹H-NMR スペクトルも、アンディジェノール A と D は類似していたが、共役ジエン部由来のピーク (6.0～6.5 ppm) に違いが確認できた。そこで、タンデム質量分析 (MS/MS) による構造解析、アンディジェノール A との構造比較を行った。その結果、 m/z 959.5 以下のフラグメントイオンピークがアンディジェノール A と D とで一致したこと、アンディジェノール D の m/z 1281.7 以上のフラグメントイオンピークのパターンがアンディジェノール A の m/z 1227.6 以上のフラグメントイオンピークのパターンと 54 マスユニットずれた値で一致したことが判明した。したがって、アンディジェノール A と D の炭素鎖両末端構造 (C1～C40、C56～C98) は、同一であると判

断した (Figure 1)。

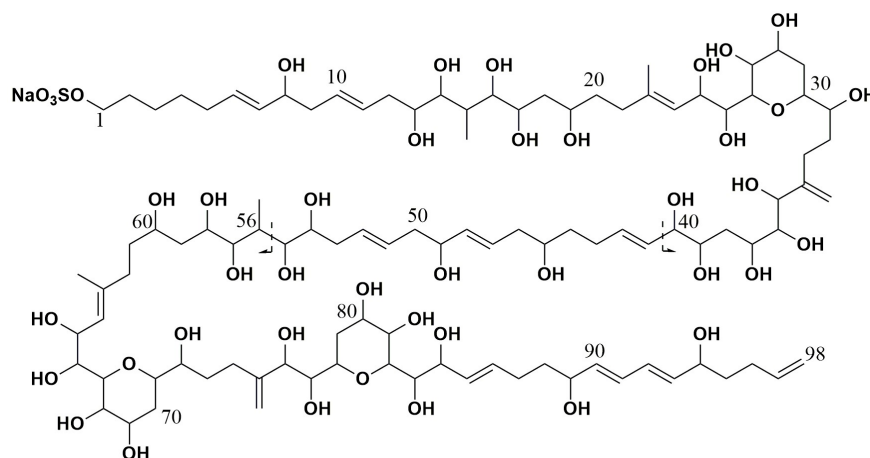


Figure 1 アンディジェノール A の構造とアンディジェノール D との共通部分構造 (C1~C40、C56~C98)

アンディジェノール F は ESI マスペクトルで m/z 1776 $[M-Na]^+$ で、既知のアンディジェノール E の分子量と近いことが分かった (m/z 1746 $[M-Na]^+$)。 1H -NMR スペクトルも、アンディジェノール E と F は類似しており、エポキシド構造由来のピーク (3.0~3.5 ppm) にわずかな違いが確認できたが、二次元 NMR スペクトル解析のみでは構造の違いを明らかにできなかった。そこで、MS/MS によって、アンディジェノール E と F の構造比較を行った。その結果、 m/z 1207.6 以下のフラグメントイオンピークがアンディジェノール E と F とで一致したこと、 m/z 1277.6 と 1349.6 のフラグメントイオンピークの存在から、アンディジェノール F の構造は、アンディジェノール E の炭素鎖にオキシメチン炭素が 1 個挿入された構造であると判断した。さらに、C54~C55 のメチレンの存在が NMR スペクトルでアンディジェノール E と F で同一であったため、アンディジェノール F の構造を Figure 2 のように決定した。

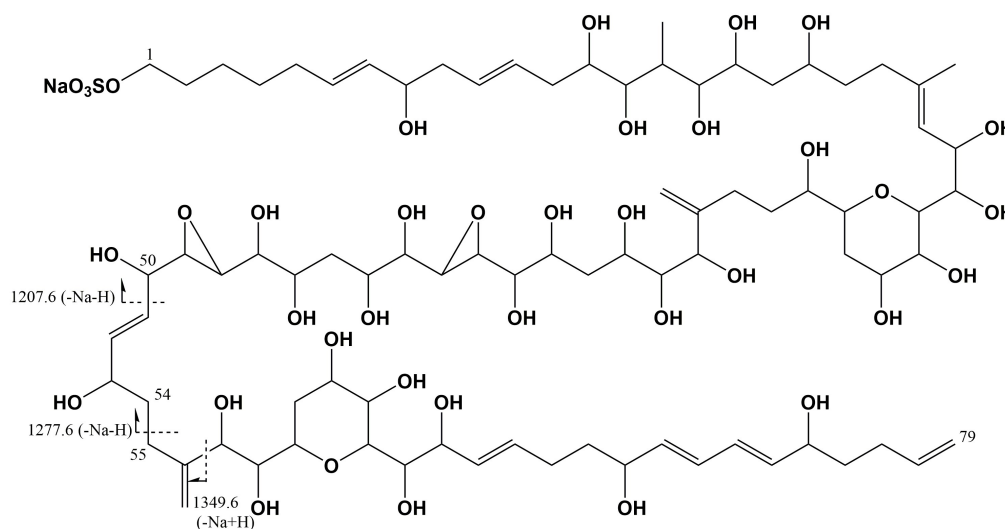


Figure 2 アンディジェノール F の構造