

氏 名(本籍)	鳥 越 浩 一 郎
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 4 2 9 号
学位授与年月日	平 成 3 年 3 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学位論文題目	渦鞭毛藻 <u>Prorocentrum lima</u> の生産する 生理活性物質の構造と生合成に関する研究
論文審査委員(主査)	教 授 安 元 健 教 授 目 黒 熙 教 授 藤 本 健四郎

論文内容要旨

序論

元来、海洋の微細藻類、特に渦鞭毛藻は赤潮などのように漁業被害との関連で議論されることが多かったが、麻痺性貝中毒、下痢性貝中毒などと渦鞭毛藻との関連が明らかにされるにしたがってその生物学的研究、生産される毒素の化学的な研究が盛んになった。特に近年、海洋生物の生産する化合物が陸上生物の産物にはみられない構造上の新奇性、様々な生理的、薬理的作用の特異性を有するこびとが次々と明らかにされ、天然物化学や生化学の分野で脚光を浴びつつある。海洋生物の中でも特に渦鞭毛藻は真核生物と原核生物の中間に位置する特異な生物と考えられ、メソカリオートの名称が提案されている。その生産物には新奇化合物が多く、食物連鎖や共生によって他の生物に移行する事でも注目されるようになってきている。渦鞭毛藻の生産する生理活性物質はTable 1に示したように様々な活性を有するが、中でもポリエーテル、ポリオキシ化合物は強力でしかも特異的な活性を示し、その多くは鞭毛藻の培養によってのみ再現性良く得ることが可能である。

Prorocentrum lima は熱帯、亜熱帯の珊瑚礁海域に生息する付着性の渦鞭毛藻である。この鞭毛藻は南方海域におけるシグァテラ食中毒の原因生物スクリーニングの過程でその毒生産能が初めて明らかにされ、我々の研究室でその有毒成分としてオカダ酸とその誘導体が明らかにされきた。しかし、P. limaの有毒成分には未だ構造の不明なものがあり、オカダ酸の誘導体もさらに多くの未知成分があることが予想された。

また、その特異的な生理活性にもかかわらず、渦鞭毛藻の生産するポリエーテル化合物の生合成に関する知見は現在のところ殆どない状態である。渦鞭毛藻の生化学的特性を知る上でも、現在生化学試薬として最も注目されているオカダ酸などの生合成経路の解明が重要であると考えられる。

そこで本研究では、

1. 渦鞭毛藻 Prorocentrum lima から未だ構造が明らかではなかった有毒成分を単離した。プロロセントロライドと命名したその化合物の構造と化学的性状、さらに生理活性について究明した。さらに同鞭毛藻からオカダ酸の新奇誘導体を単離しその構造と活性について追求した。
2. P. lima に ^{13}C 標識酢酸を取り込ませ、生産されるポリエーテル化合物のラベル化を行い、その標識パターンからオカダ酸、プロロセントロライドがどの様な生合成の過程を経るかを推定した。

第一章 渦鞭毛藻 Prorocentrum lima の生産する生理活性物質の単離と構造決定

第一節 新奇ポリエーテルマクロサイクル、プロロセントロライドとその同族体

1) 渦鞭毛藻 Prorocentrum lima の分離と培養

まず始めに培養法の検討を行った。P. lima は1985年10月、沖縄県潮底島にて分離した株を用いた。培地は従来使用されていたES-1培地 (Table 2) を選択した。P. lima は底生、付着性の鞭毛藻である為、容器を棚付きの水槽をにして培養を行った。さらに容器と棚の中心に穴を開けメンブランフィルタで滅菌した空気エアレーションを行うことによって細胞密度の増殖に成功した (Table 3)。

2) プロロセントロライド類の単離

約1000Lの培養液から藻体約 2.7×10^{10} cellsを得た。藻体を有機溶媒で抽出し、溶媒分画の後、ブタノール層からマウス毒性とドラージェンドルフ試薬に対する発色を指標としてカラムクロマトグラフィーにより3種の新奇化合物を単離した (成分A~C、Fig. 1)。3成分の中で最も量の多い化合物をプロロセントロライドと命名し、その性状と構造について解析した。

3) 成分A - プロロセントロライドの化学的性状と構造

化学的性状は以下の通りである。FABMS: m/z 980 (MH)⁺, HR-FAB MS found, m/z 980.61684 (calc. 980.610 C₅₈H₇₅NO₁₁); UV_{max}, 235 nm (MeOH), IR: 3400 (-OH), 1715 (-COO-), 1670, 1640 (-C=C-), 1200, 1060 (-C-O-) cm⁻¹, $[\alpha]_{23/D} +136.5$ (c=0.147, MeOH). IRの1670cm⁻¹の吸収、元素分析、ドラージェンドルフテスト、電気泳動の結果からプロロセントロライドはイミンを一つ有する。プロロセントロライドは難結晶性の化合物でX線解析に適した結晶を得ることができなかったため、構造解析は殆どすべてNMRを用いて行った。NMRは500MHzの分光器を用い、DMSO d-6, C₆D₆-CD₃OD(3:1)の2種の溶媒中で測定した。

¹H NMRスペクトル (Fig. 2) ではオキシメチンに由来するシグナルが多数観測されこの化合物がポリオキシ化合物であることが示唆された。DEPT, 重水素シフトによる水酸基の数と位置の決定、¹H-¹H, ¹³C-¹H, long-range ¹³C-¹H COSY, PS-NOESYなど二次元NMRの解析 (Fig. 3, 4) からプロロセントロライドの構造を推定した

(Fig. 5 1)。プロロセントロライドは現在までに構造の判明している海産毒と同様に高度に酸素化された骨格を有するがラクトン1、水酸基8、置換イミン1、エーテル環3、二重結合6を持つ全く新

奇な構造を持つことが明かとなった。なかでもイソキノリンを中心として、マクロライドの部分と26員の炭素環の両方を有すること、特に大きな炭素環を有することは天然物で初めてであり、その生合成にも興味をもたれる。

3) 成分Bの構造

二番目に多い成分は約4.0 mg得られた。FABMSで m/z 982 $[MH]^+$ に分子イオンピークを与え、 1H NMRではプロロセントロライドと類似したスペクトルを与えた。しかし、1.1ppmにダブルットメチルのシグナルが1本多く観測され、さらにプロロセントロライドのエキソメチレン(51位)が消失していた(Fig.6)。 1H - 1H COSYでは他のスピン系は一致していたのでこの化合物を9,51-ジヒドロプロロセントロライド($C_{25}H_{27}NO_{17}$, MW 981, Fig.5 2)と同定した。

4) 成分Cの構造

残る成分は約1.0 mg得られた。ケイ酸TLCではプロロセントロライドと比較して高極性であった。 1H NMR, 1H - 1H COSYスペクトルがプロロセントロライドと類似していること(Fig.7)、FT-IRではプロロセントロライドと比較して硫酸基に相当する $1257cm^{-1}$ の吸収が明らかに増加しており、FABMSで m/z 1058 $[M-Na]^-$ が観測されたことから、この化合物がプロロセントロライドのモノ硫酸エステル体であると推定した。この化合物を分解脱硫酸し、遊離した硫酸イオンをイオンクロマトグラフィーで分析することにより硫酸基の存在を確認した(Fig.8)。また、 1H NMR, 1H - 1H COSYにおいてプロロセントロライドの30位の水素が約0.6 ppm 低磁場シフトしていること、54位のメチル基が0.1 ppm 低磁場シフトしていることから硫酸基の結合位置は30位であると推定し、この化合物をプロロセントロライド30-サルフェート($C_{25}H_{25}NO_{16}SNa$, MW 1081, Fig.5 3)と同定した。

5) プロロセントロライド類の生物活性

プロロセントロライドのマウスに対する致死毒性は LD_{50} 0.4 mg/kg (i.p.)と比較的弱い。フグ毒や麻痺性貝毒と同様に痙攣、四肢の麻痺を伴い呼吸困難となって15-25分以内に死亡する。ジヒドロ体は0.5mg/kgの比毒性で、致死症状には殆ど変化はないがプロロセントロライドより若干弱く、致死時間は長くなる傾向にあった。硫酸エステル体は比毒性1.25 mg/kg以下であり、無毒に近い。抗菌抗カビ活性、魚毒性、溶血活性を行ったが顕著な活性は認められなかった(Table 4)。

第二節 渦鞭毛藻 Prorocentrum lima 及び、クロイソカイメン Halichondria okadai のオカダ酸の新奇誘導体の単離と構造

1) 渦鞭毛藻 Prorocentrum lima の生産する新奇オカダ酸誘導体、2-デオキシオカダ酸の単離と構造

渦鞭毛藻 Prorocentrum lima は現在唯一培養可能なオカダ酸関連化合物の生産生物で、オカダ酸の他に35-メチル体(ディノフィシストキシン1, DTX1)や7-デオキシ体を生産することを考えると、さらに多くの同族体が存在していることが考えられる。第二章で述べるオカダ酸の生合成との関連で、P. limaの脂溶性画分にオカダ酸前駆体の検索を行ったところ、オカダ酸の誘導体と思われる化合物を検出し、Fig. 9の様に処理して単離した。FABMSでは m/z 789 $[M-H]^-$, m/z 787 $[M-H]^-$ を与え、分子量は788と推定した。これはオカダ酸のモノデオキシ体の分子量に相当する。 1H NMRはオカダ酸と類似していたが(Fig. 10 A) 1.19 ppmにダブルットメチルのシグナルが新たに観測されており、オカダ酸の2位のメチル基に相当するシグナルが消失していた。さらに、2.67 ppmに水素一個分のシグナルが観測された。 1H - 1H COSYの解析結果からこの化合物を2-デオキシオカダ酸と同定した($C_{14}H_{22}O_7$, MW 788, Fig. 11 A)。しかし、微量であることとオカダ酸からの誘導が困難であることから2位の立体化学に関しては現在のところ明かではない。なおADAM(9-anthryl diazomethane)を蛍光化剤として用いたHPLC分析への応用が可能であり、DTX1-ADAMより約1分遅れた位置にピークを与えた(Fig. 12)。

2) クロイソカイメン H. okadai からの新奇オカダ酸誘導体の単離と構造

クロイソカイメンはオカダ酸を非常に多く蓄積する海洋生物であるがオカダ酸の他、DTX1を有している。そのオカダ酸の精製の過程でADAM分析においてオカダ酸の直後にピークを確認した(Fig. 13)のでこの化合物の単離、構造決定を試みた。

クロイソカイメン Halichondria okadai 約100 kgをアセトンで抽出し、Fig. 14に示した方法でオカダ酸画分を得た。この画分に含まれるこの化合物は通常のクロマトグラフィーによっては分離ができなかった。そこで、メチルエステルにした結果、分離に成功し、最終的に本化合物のメチルエステルを1.1 mg得た(Fig. 14)。このメチルエステルとアルカリ加水分解物を機器分析に供した。FABMSにおいてメチルエステルは m/z 819 $[M-H]^-$, ケン化物は m/z 805 $[M-H]^-$ のピークをそれぞれ与えこの化合物の分子量を806と推定した。 1H NMRはオカダ酸と類似したスペクトルを与えたが(Fig. 10 B) オカダ酸の14, 15位のトランスオレフィンと13位のメチンのシグナルが消失しており、また、42位のメチル基のシグナルが0.1 ppm高磁

場シフトしていた。 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSYで13位のメチンシグナルは0.5ppm高磁場シフトしている事が明らかになり、この化合物を14,15-ジヒドロオカダ酸と同定した ($\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_4$, MW 806 Fig.11 B)。

3) 新奇オカダ酸誘導体の生物活性

2-デオキシオカダ酸の比毒性は0.5 mg/kg (mouse i.p.)以下でオカダ酸に比較して弱い。一方、14,15-ジヒドロ体の比毒性は200 μg /kg (mouse i.p.)でありオカダ酸と同等であった。どちらの化合物も10 μg /diskで *A.niger* に対して抗カビ活性を示すが、2-デオキシ体はより弱く、オカダ酸の二つの作用は2位の水酸基に、決定的ではないが影響を受けることを示唆した。

第二章 渦鞭毛藻 *Prorocentrum lima* のオカダ酸、プロロセントロライドの生合成経路に関する研究

1) ^{13}C 標識酢酸によるオカダ酸、プロロセントロライドの標識

P.lima の生産するポリエーテル化合物の生合成経路を明らかにするために ^{13}C 標識酢酸に鞭毛藻に取り込ませ、そのパターンの解析を行った。

P.lima はさきに示した ES-1 栄養塩を添加した濾過海水に、バクテリアによる酢酸の分解を抑制するための抗生物質群と標識酢酸ナトリウムを加えた培地中で培養した。培養容器はバクテリアによる汚染の少ないカブ型プラスチックを用いた。標識酢酸はカルボキシラベル、メチルラベル、二重ラベルの三種を用いそれぞれ独立に実験を行った。培養液は Fig.15 に示したように処理し、オカダ酸、プロロセントロライドを単離した (Table 5)。

2) オカダ酸における標識パターンと推定される生合成の前駆体

この研究に於いてはオカダ酸の炭素の NMR シグナルの帰属が不可欠であるので、まず始めに、クロイソカイメンから大量のオカダ酸を精製し帰属を試みた。Fig.14 で示したオカダ酸画分の各種二次元 NMR の測定に供し解析し (Fig.16, 17)、Table 6 に示した様に全ての炭素とそれに結合する全ての水素の帰属に成功した。

各標識物と非標識物の ^{13}C NMR シグナルの強度の比較、炭素のカップリング定数から標識酢酸の取り込みパターンの解析を行った。

オカダ酸における標識パターンは Fig.18 に示した通りであり、分子の末端に相当する 1, 2, 37, 38, 44 位は酢酸によっては標識されなかった。また、酢酸のメチル基に由来する炭素が連続する部分を有すること、9, 40, 42 位のメチル基はすべて酢酸のカルボキシル

炭素から分岐しており、かつ酢酸から直接導入されている点の特徴的である。以上のことはオカダ酸が放線菌などの生産するポリエーテル化合物とは異なり、単純なポリケタイド経路によってのみ生合成されるのではないことを示唆している。標識パターンからFig.19に示した前駆体を推定した。オカダ酸はポリケタイド鎖、トリカルボン酸、コハク酸、3-hydroxyl-3-methylglutarate (HMG) の誘導体と、様々な経路から生成する中間体によって構成されていると推定した。

2) プロロセントロライドにおける標識パターンと生合成経路の前駆体

プロロセントロライドの標識パターンをFig.20に示す。オカダ酸と比較して標識された炭素は少なく炭素56個のうち44個(二重ラベルの結果では49個)であった。中でもイソキノリン環周辺の標識率が低かった。また、酢酸のカルボキシル、メチルどちらからも誘導される炭素がありその点ではオカダ酸と明かに異なる。また、単一標識の酢酸では標識されなかったのに二重標識で明かに酢酸の導入が認められる部分が三箇所(C17-C18, C36-C37, C40-C41)あり、標識実験の再現性に問題があるのではないかと考えられる。標識パターンから総合的に考えて推定される前駆体をFig.21に示した。オカダ酸と同様にポリケタイド鎖、コハク酸、HMGの誘導体から構成されると推定されるが、これらの点に関してはオカダ酸と類似している。

総括

- 1) 渦鞭毛藻 Prorocentrum lima の生産する新奇ポリエーテルマクロサイクル、プロロセントロライドとその誘導体2種を単離し構造を決定した。
- 2) 同鞭毛藻からオカダ酸の新奇同族体2-デオキシオカダ酸を単離し構造決定した。
- 3) クロイソカイメン Halichondria okadai からオカダ酸を単離し、炭素、水素全シグナルの帰属を行い、さらに新奇同族体14,15-ジヒドロオカダ酸を単離し構造決定した。
- 4) 渦鞭毛藻 P. lima を ^{13}C 標識酢酸存在下で培養し、オカダ酸、プロロセントロライドを ^{13}C で標識した。それらの標識パターンから各々の化合物について生合成経路における前駆体を推定した。

Table 1 BIOACTIVE COMPOUNDS ISOLATED FROM MARINE MICROORGANISMS

marine organism	active compound	activity
<i>Prorocentrum lima</i>	okadaic acid	diarrheagenicity cytotoxicity tumor promoting protein phosphatase inhibiting
	dinophysistoxin 1	diarrheagenicity cytotoxicity tumor promoting
<i>Dinophysis fortii</i>	dinophysistoxin 1 pectenotoxin 2	mouse lethal toxicity
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	GT-4b (CTX congener)	Na ⁺ channel opening
	maitotoxin	Ca ⁺⁺ channel activating
	gambieric acid	antifungal
<i>Gymnodinium breve</i>	brevetoxins	Na ⁺ channel opening
<i>Amphidinium</i> sp.	amphidinolide A-C	antitumor
<i>Amphidinium klebsii</i>	amphidinol	antifungal
<i>Amphidinium carteri</i>	hemolysin 3	hemolytic
<i>Alexandrium hiranoi</i>	goniodomin A	antifungal

Table 2 CULTURE CONDITIONS OF PROROCENTRUM LIMA

culture media	: sea water enriched with ES-1 nutrient
temperature	: 25 °C
illumination	: 2000-3000 lux, 16hr. on/8hr. off
vessel	: water tank with 6-7 shelves
incubation period	: 35 days
aeration	: 50 ml/min.

ES-1 NUTRIENT

NaNO ₃	70 mg/L	ZnSO ₄	25 µg/L
Na β-glycero- phosphate	10 mg/L	CoSO ₄	1 µg/L
Fe-EDTA	550 mg/L	Tris	100 mg/L
Na ₂ -EDTA	5 mg/L	Vitamin B12	2 µg/L
H ₃ BO ₃	1 mg/L	D-biotin	1 µg/L
MnSO ₄	200 µg/L	thiamine	100 µg/L
		pH	7.8

Table 3 COMPARISON OF CELL DENSITY AMONG DIFFERENT VESSELS

vessel		cell density (cells/ml)
Fernbach frask(2L)	1.24x10 ⁷	6200
water tank(24L)	4.0x10 ⁸	14300
water tank(24L)	4.1x10 ⁸	14600
water tank(24L)+aeration	1.1x10 ⁹	39300

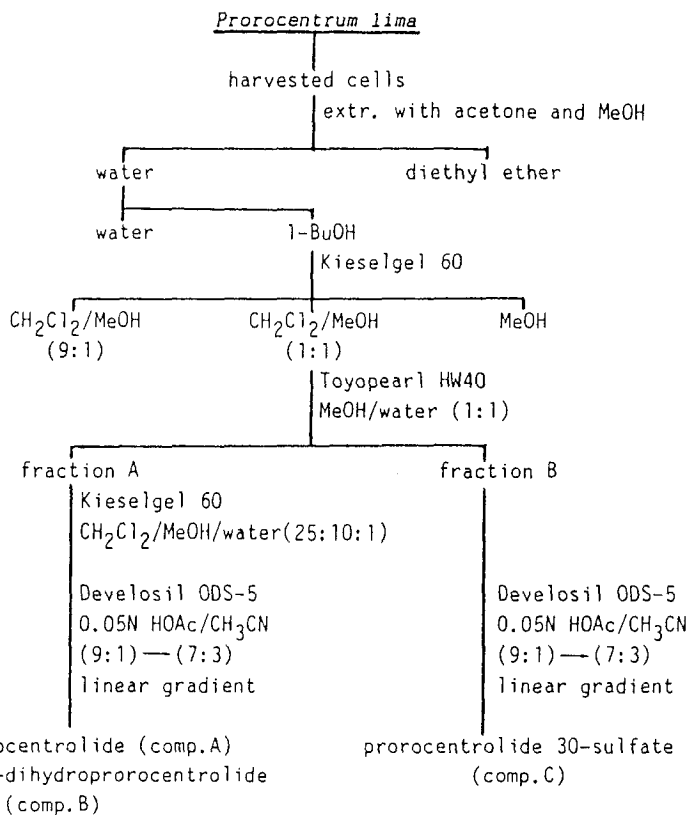


Fig.1 ISOLATION OF PROROCENTROLIDES FROM PROROCENTRUM LIMA

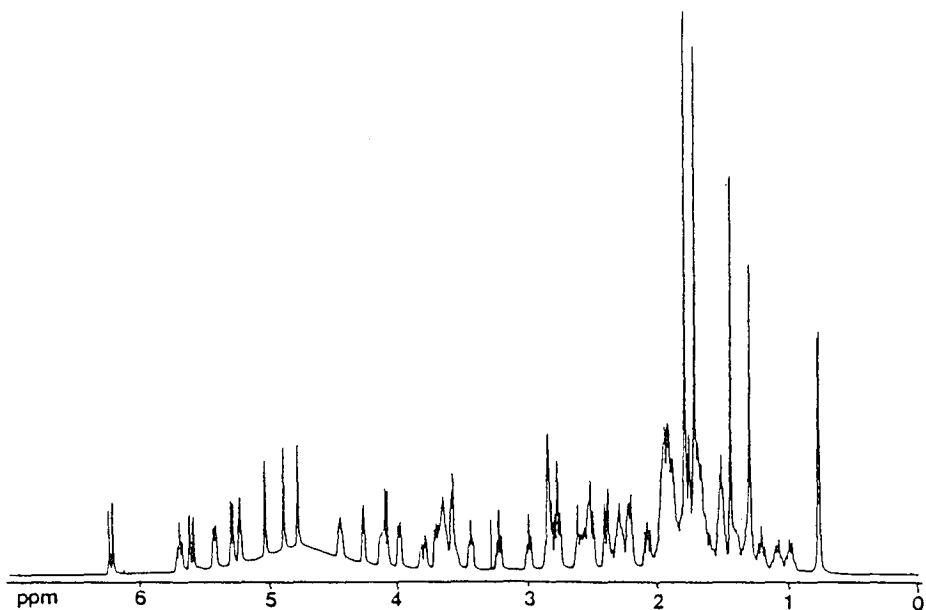


Fig.2 ¹H NMR SPECTRUM OF PROROCENTROLIDE (DMSO-d₆, 500MHz)

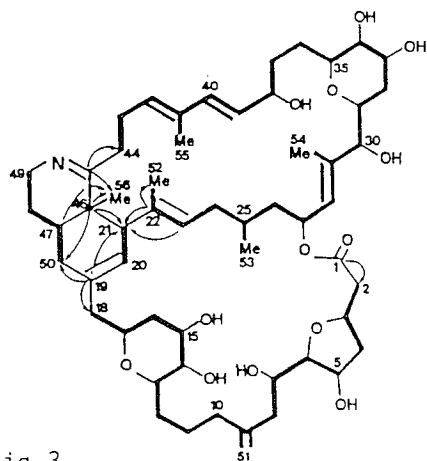


Fig. 3

CONNECTIVITIES ASSIGNED BY ^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H COSY AND LONG-RANGE ^{13}C - ^1H COSY SEQUENCES. Broad lines indicate the connectivities assigned by ^1H - ^1H and ^{13}C - ^1H COSY. Arrows denote $^{13}\text{C}(\text{head})$ - $^1\text{H}(\text{tail})$ coupling observed in long-range ^{13}C - ^1H COSY.

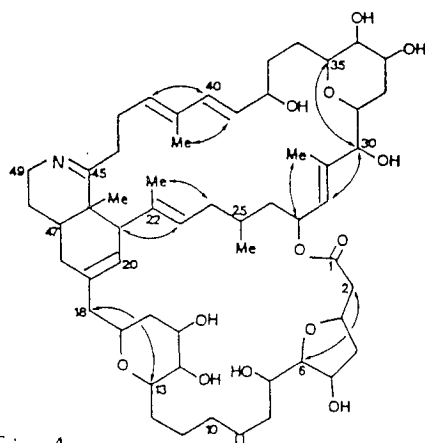


Fig. 4

ETHER LINKAGES AND GEOMETRY OF DOUBLE BONDS ASSIGNED BY NOE MEASUREMENTS. "—" indicates the protons around the ether and double bonds that give cross-peaks on phase-sensitive NOESY.

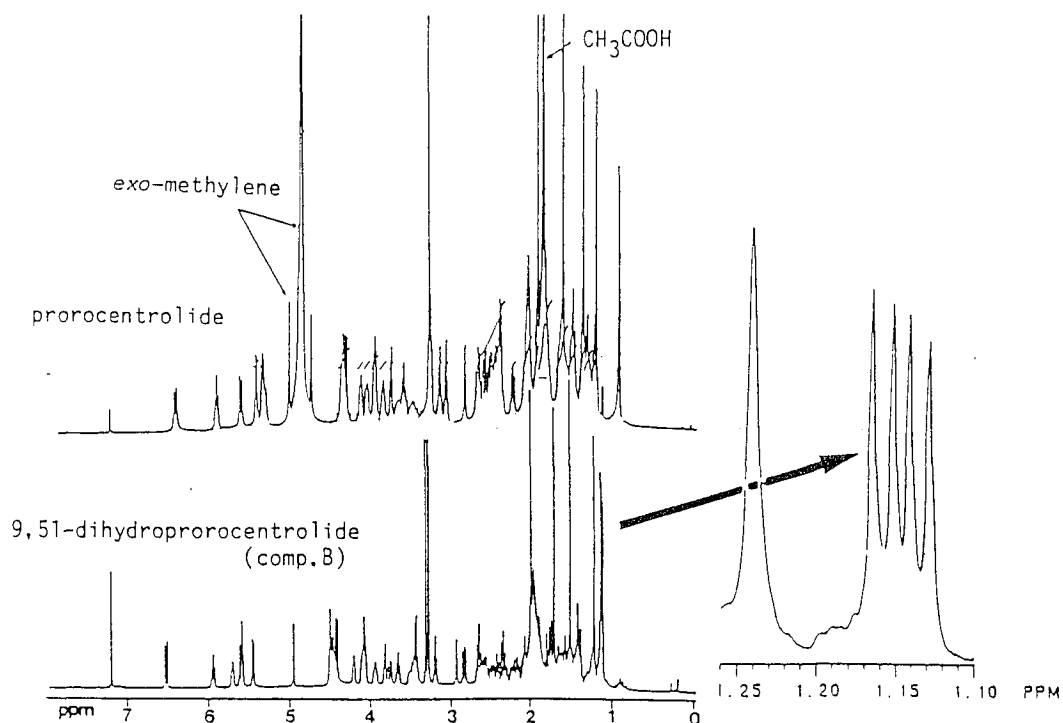


Fig. 6 ^1H NMR SPECTRA OF PROROCENTROLIDE AND 9,51-DIHYDROPROROCENTROLIDE (comp. B)
(C_6D_6 - CD_3OD 3:1, 500MHz)

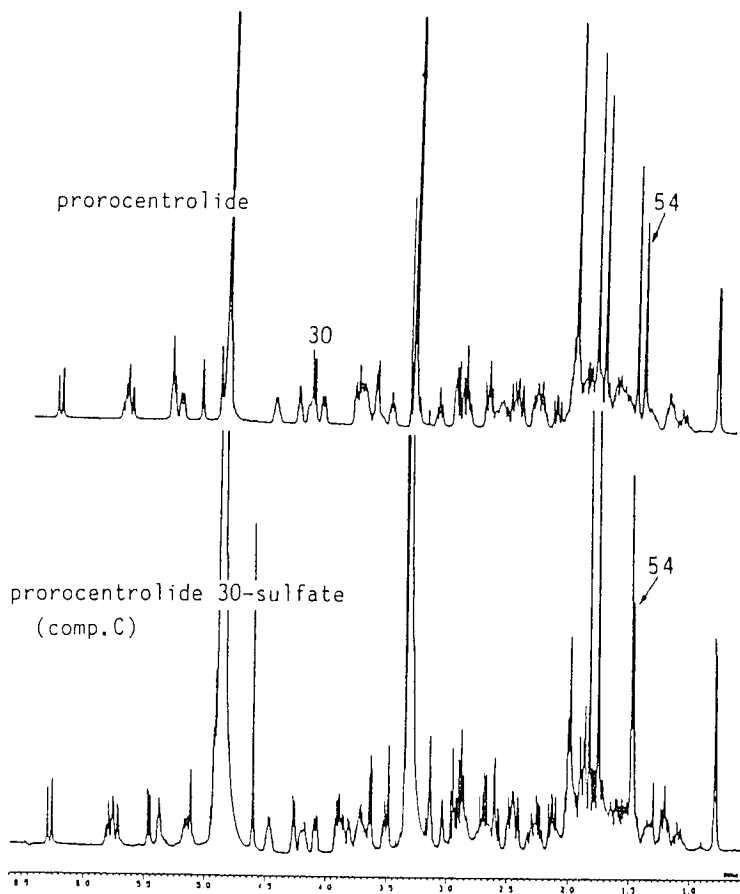


Fig.7 ^1H NMR SPECTRA OF PROROCENTROLIDE AND PROROCENTROLIDE 30-SULFATE (comp.C)
(CD_3OD , 400MHz)

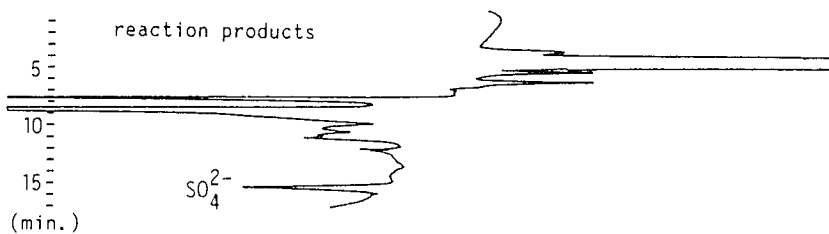
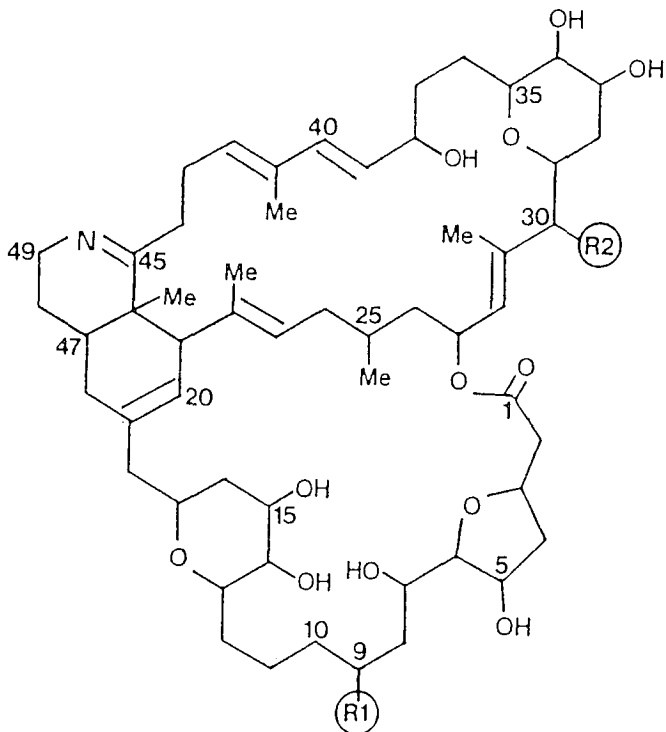


Fig.8 ION CHROMATOGRAM OF REACTION PRODUCTS OF COMPONENT C

column : Develosil ODS-5 (0.8x25cm)
 mobile phase : 0.8mM trimesic acid
 1.0mM tetramethylammonium hydroxide
 pH 4.6
 flow rate : 1.5mL/min.
 detection : UV 282nm (Shimaz SPD-6A, range 0.005)



	R1	R2
1 prorocontrolide	=CH ₂	-OH
2 9,51-dihydroporocontrolide	-CH ₃	-OH
3 prorocontrolide 30-sulfate	=CH ₂	-OSO ₃ ⁻ Na ⁺

Fig.5 STRUCTURES OF PROROCENTROLIDE DERIVATIVES

Table 4 PROPERTIES OF PROROCENTROLIDE DERIVATIVES

	prorocontrolide	9,51-dihydro prorocontrolide	prorocontrolide 30-sulfate
molecular formula	C ₅₆ H ₈₅ NO ₁₃	C ₅₆ H ₈₇ NO ₁₃	C ₅₆ H ₈₄ NO ₁₆ SNa
molecular weight	979	981	1081
mouse lethality(i.p.)	0.4mg/kg	0.5mg/kg	>1.25mg/kg
antifungal activity*	>80µg/disk	>80µg/disk	>80µg/disk
hemolytic activity	>4.0ppm	NT**	NT
fish lethality	>100ppb	NT	NT

* against *Aspergillus niger*

** not tested

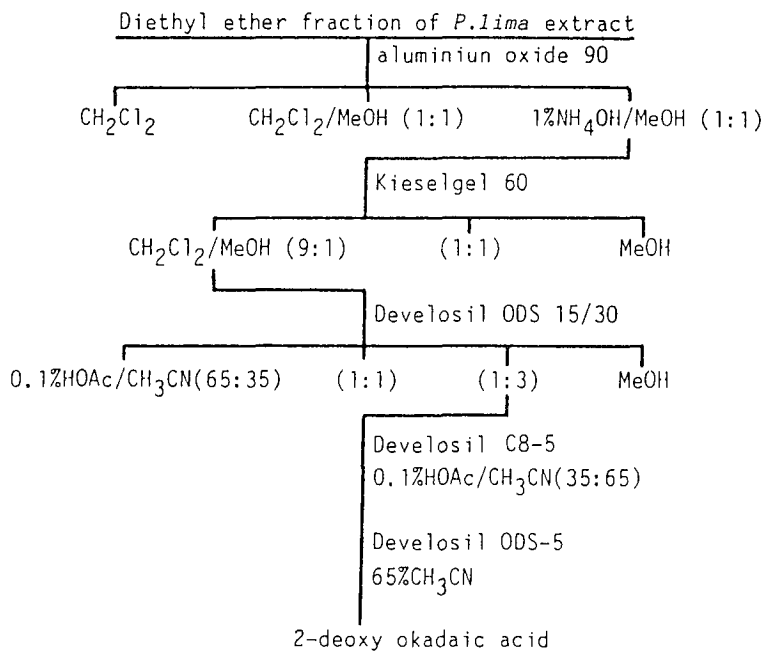


Fig.9 ISOLATION OF 2-DEOXY OKADAIC ACID FROM PROROCENTRUM LIMA

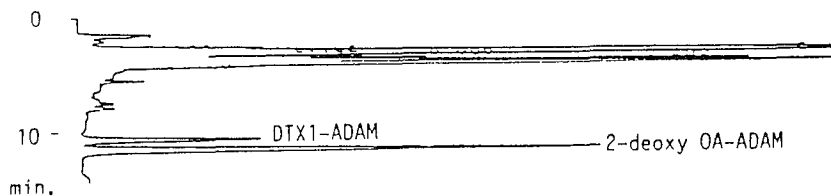


Fig.12 COMPARISON BETWEEN DTX1 AND 2-DEOXY OA ON FLUOROMETRIC HPLC
 column : Develosil ODS-5 (4.6x250mm)
 mobile phase : MeCN-MeOH-water 8:1:1
 flow rate : 1.1 mL/min.
 detection : Ex.365nm, Em.412nm (JASCO FP-110, range 8)

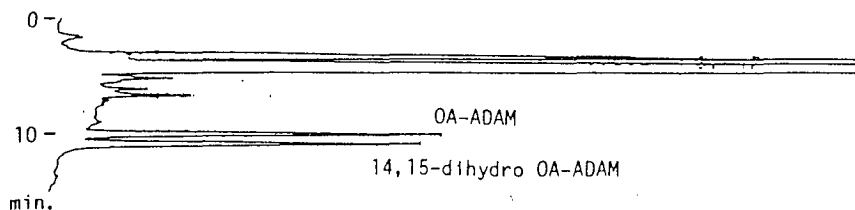


Fig.13 COMPARISON BETWEEN OA AND 14,15-DIHYDRO OA ON FLUOROMETRIC HPLC

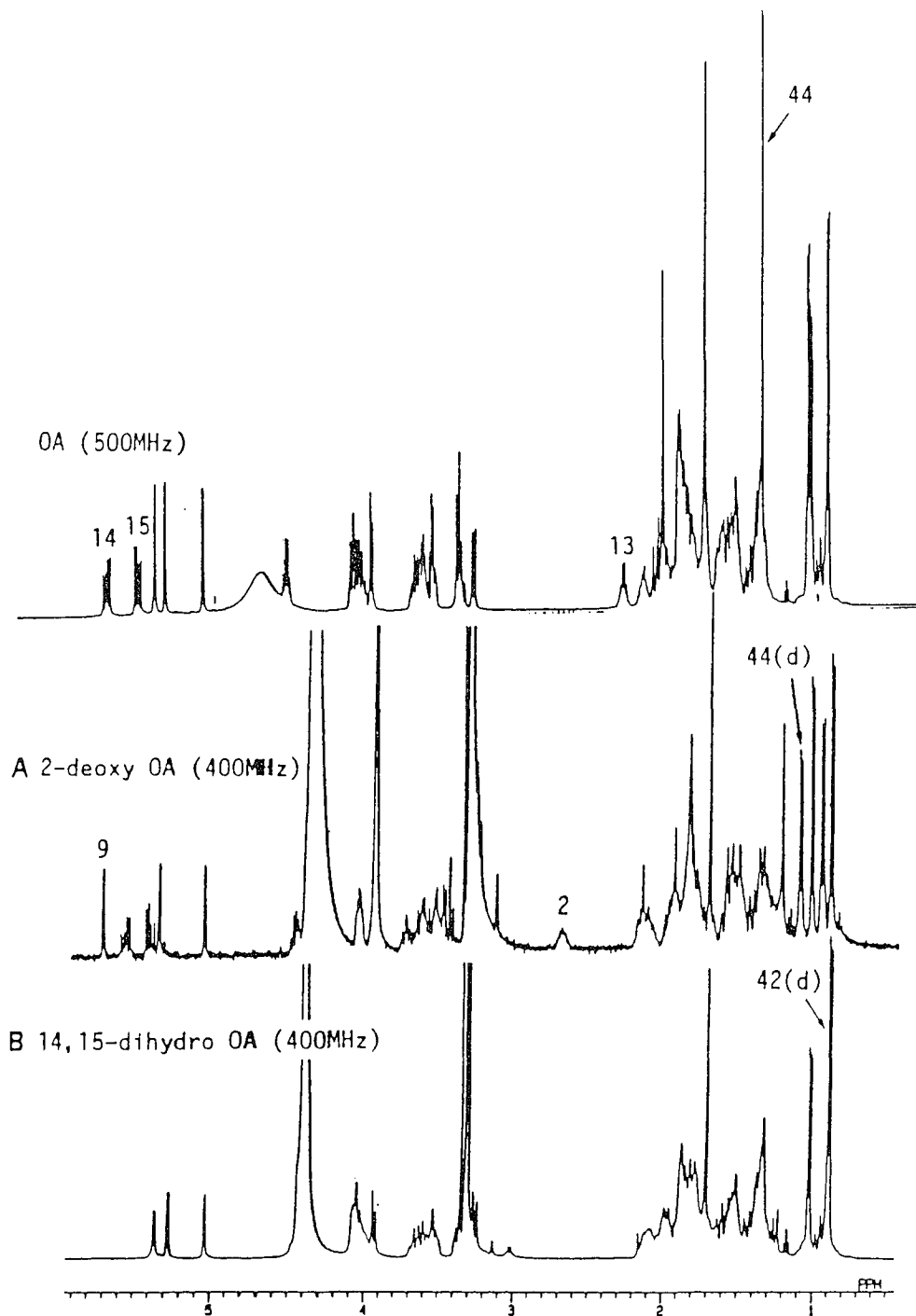
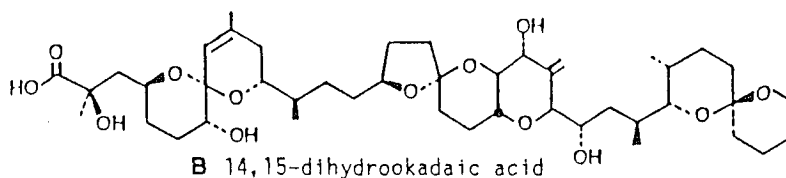
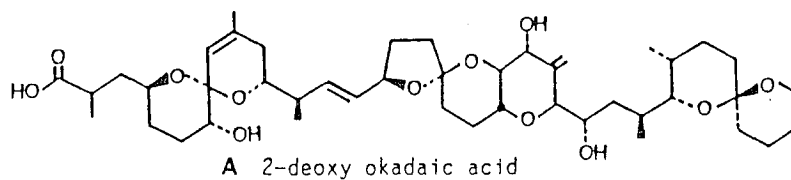
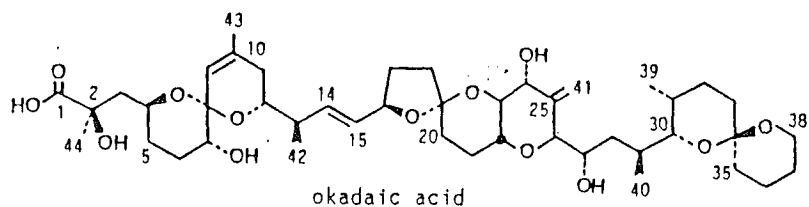


Fig.10 ^1H NMR SPECTRA OF OA AND ITS NOVEL DERIVATIVES ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ 2:1)



	OA	2-deoxy OA	14,15-dihydro OA	DTX1
molecular formula	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₂	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₃	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₃
molecular weight	804	788	806	818
mouse lethality* ¹	200µg/kg	>500µg/kg	200µg/kg	160µg/kg
antifungal activity (10µg/disk)* ²	positive (23mm)	positive (11mm)	positive (18mm)	positive (19mm)

*1 i.p. injection to mice

*2 against *Aspergillus niger*; () denotes the diameter of inhibition circle

Fig.11 STRUCTURES AND ACTIVITIES OF NEWLY ISOLATED OA DERIVATIVES

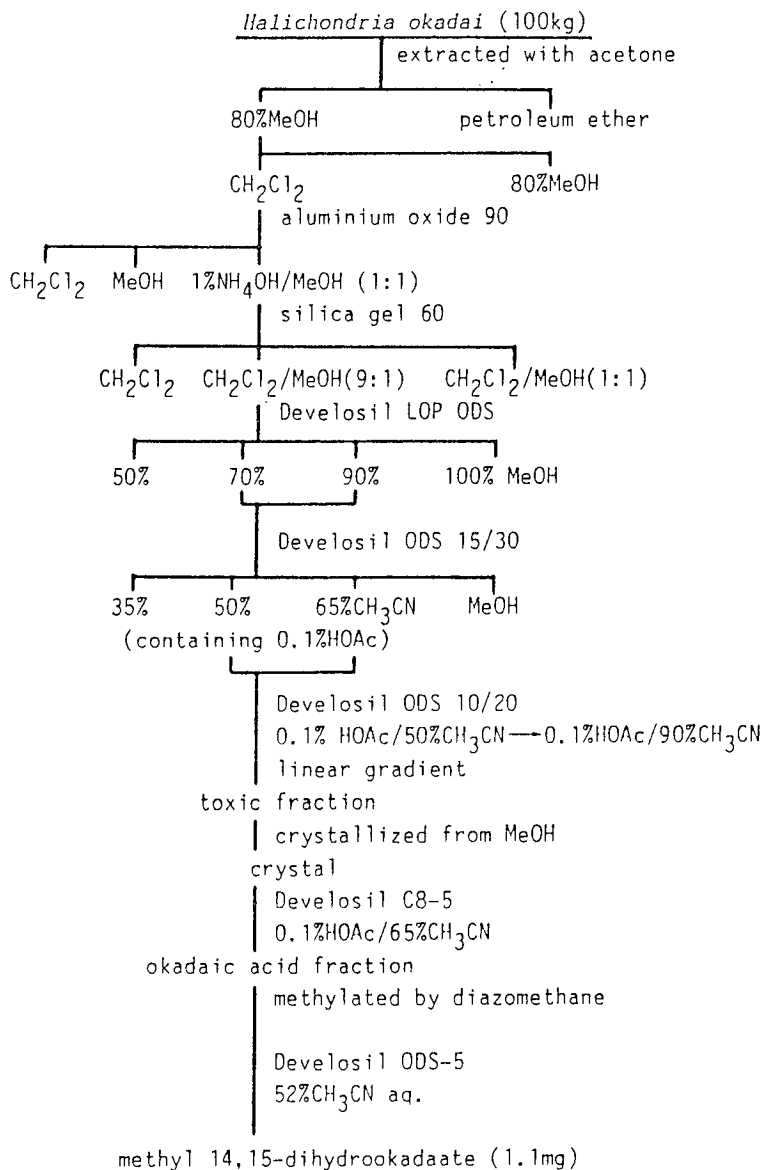


Fig.14 ISOLATION OF METHYL 14,15-DIHYDROOKADAATE FROM *H. OKADAI*

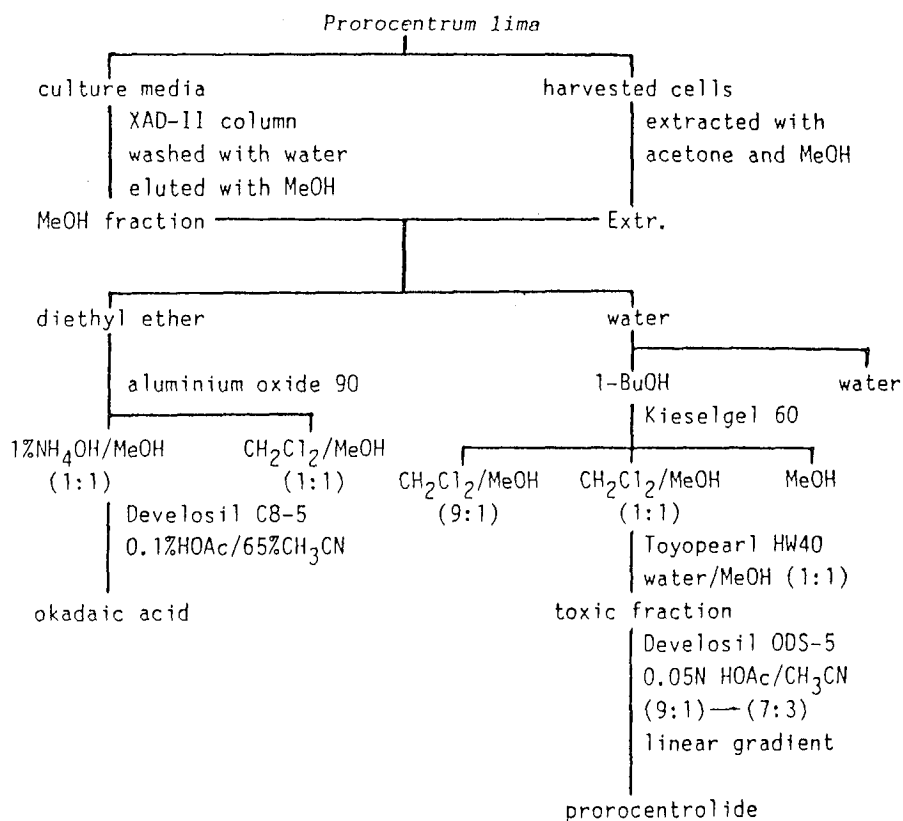


Fig.15 ISOLATION OF OKADAIC ACID AND PROROCENTROLIDE FROM P.LIMA

Table 5 CELL DENSITIES AND TOXIN PRODUCTIONS BY PROROCENTRUM LIMA IN FEEDING EXPERIMENTS

sodium acetate (50mg/L)	cell density (cells/ml)	yield(mg)	
		okadaic acid	prorocentrolide
[1- ¹³ C]	13700	1.6	4.6
[2- ¹³ C]	19900	0.6	3.5
[1,2- ¹³ C]	17600	0.3	4.2

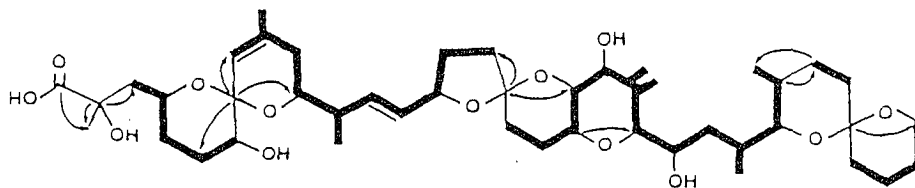


Fig. 16 CONNECTIVITIES ASSIGNED BY ^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H COSY AND LONG-RANGE ^{13}C - ^1H COSY SEQUENCES. Broad lines indicate the connectivities assigned by ^1H - ^1H COSY and ^{13}C - ^1H COSY. Arrows denote ^{13}C (head)- ^1H (tail) coupling observed in long-range ^{13}C - ^1H COSY.

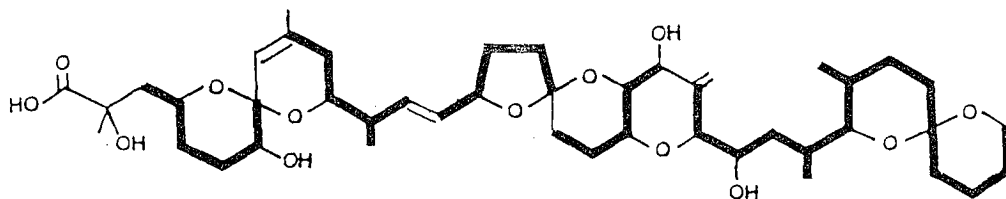


Fig. 17 CONNECTIVITIES ASSIGNED BY 2D-INADEQUATE SEQUENCE
Broad lines indicate the connectivities assigned by 2D-INADEQUATE

Table 6 NMR SPECTRAL DATA OF OKADAIC ACID

pos.	^{13}C (ppm) ^a	^1H (ppm) ^b	pos.	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1	179.5		21	27.7	1.73 1.86
2	76.7		22	71.1	3.61
3	45.1	1.62 2.05	23	77.7	3.35
4	70.0	4.00	24	72.2	4.08
5	33.1	1.31 1.71	25	146.3	
6	27.9	1.70 1.87	26	86.1	3.94
7	72.8	3.35	27	66.3	4.04
8	97.5		28	36.6	0.95 1.34
9	122.8	5.28	29	32.3	1.87
10	140.3		30	76.6	3.25
11	34.2	1.88 1.88	31	28.6	1.78
12	72.0	3.58	32	27.4	1.36 1.95
13	43.3	2.26	33	31.4	1.36 1.56
14	138.0	5.66	34	97.0	
15	132.1	5.46	35	37.0	1.41 1.61
16	80.4	4.50	36	19.8	1.51 1.84
17	31.6	1.56 2.12	37	26.5	1.51 1.51
18	38.3	1.81 1.99	38	61.5	3.51 3.65
19	106.9		39	11.6	0.89
20	33.9	1.84 1.84	40	17.2	1.02
			41	113.2	5.03 5.34
			42	17.0	1.01
			43	23.9	1.71
			44	28.4	1.34

^a $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$ as 49.8 ppm (CDCl_3 - CD_3OD 2:1, 125 MHz)

^b CHD_2OD as 3.31 ppm (500 MHz)

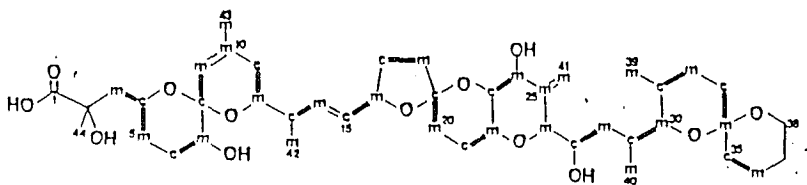


Fig. 18 ¹³C LABELING PATTERN OF OKADAIC ACID
(c -- acetate carboxyl, m -- acetate methyl, m-c acetate unit)

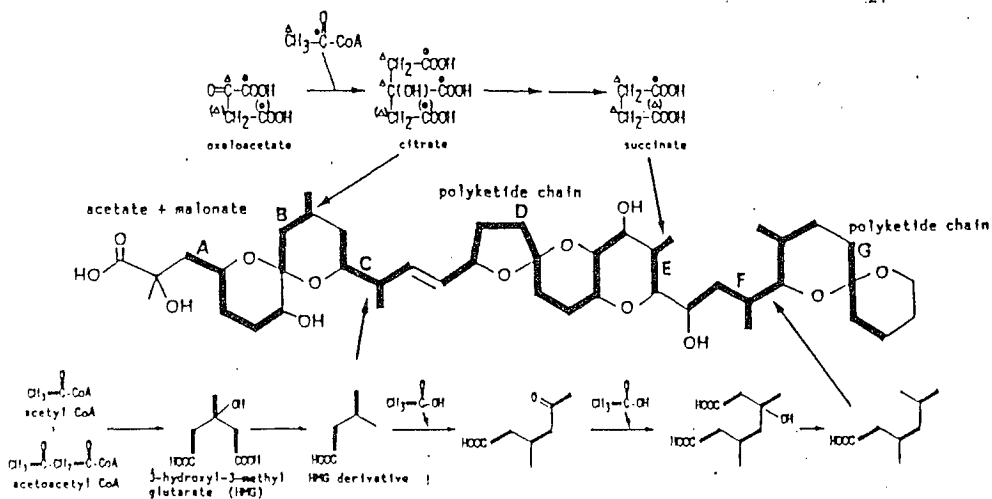


Fig. 19 PROBABLE INTERMEDIATES OF OKADAIC ACID

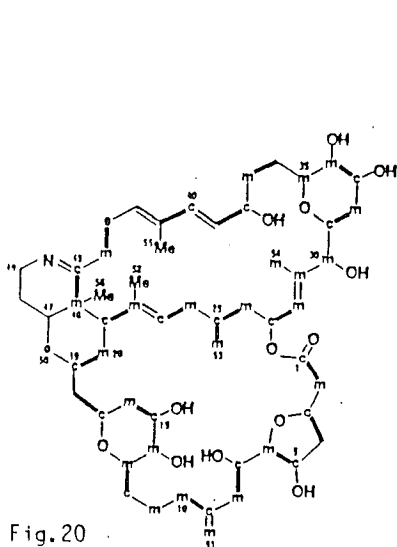


Fig. 20
¹³C LABELING PATTERN OF PROROCENTROLIDE
(c -- acetate carboxyl, m -- acetate methyl
● -- both c and m, m-c acetate unit)

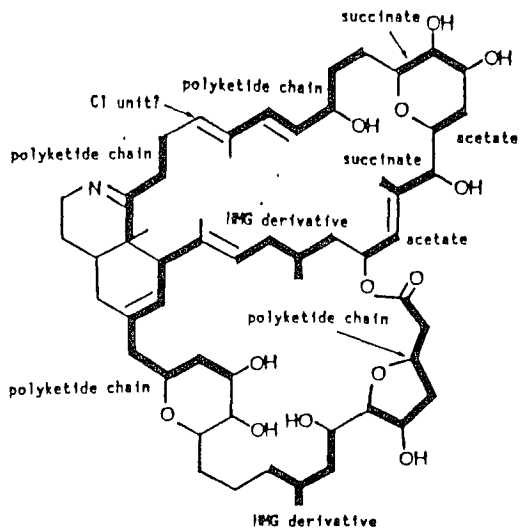


Fig. 21
PROBABLE INTERMEDIATES OF PROROCENTROLIDE

審査結果の要旨

海洋の微細藻類、特に、渦鞭毛藻は多様な生理活性物質を生産して、魚貝類の大量へい死や毒化の原因となることが多い。本研究で対象とした *Prorocentrum lima* は代表的な有毒種で、本来はシガテラと呼ばれる魚類の毒化現象に関連して発見した種類の一つである。その主要産物のオカダ酸は下痢性貝毒の主原因として重要なばかりでなく、新規発癌プロモーターとして癌研究に使用され、さらに、プロテインフォスフォターゼ 2 A, 2 B, 1 の特異的阻害剤として、種々の細胞情報制御機構の解明試薬として広く用いられつつある。

本研究ではまず *P. lima* のオカダ酸以外の成分を検索し、プロロセントロライドと命名した新規物質を単離し、分子量 979, 分子式 $C_{56}H_{85}NO_{13}$ の大きな化合物であることを確認した。この化合物について、核磁気共鳴を中心とした最新の分光学的手法を駆使し、平面構造を決定した。官能基としては水酸基 8, 置換イミン 1, エーテル環 3, 二重結合 6 を有する。部分水素化されたイソキノリン環と 28 員環ラク톤と 26 員の炭素環の存在は従来の天然物には見られない構造である。さらに微量成分として、9, 15-ジヒドロ体, 30-サルフェート, および、2-デオキシオカダ酸も単離・同定された。

次にオカダ酸およびプロロセントロライドの特異的な骨格の生合成機構の解明が為された。最初の段階として、全ての炭素のシグナルの帰属が必要なので、クロイソカイメンを大量処理して約 100mg のオカダ酸を得た。その過程で微量の新規成分 14, 15-ジヒドロオカダ酸の単離・同定がなされた。 ^{13}C でラベルした 3 種の酢酸を添加してそれぞれ取り込みを行わせ、オカダ酸とプロロセントロライドを単離して、NMR で標識パターンを解析した。その結果、放線菌のポリエーテルで提唱されているポリケチド経路とは大きく異なることが示され、その機構について考察が為された。

以上の研究成果は食品衛生上重要な生理活性天然物の化学構造の決定、および、生合成機構の解明に大きく寄与するものであり、審査員一同は著者に農学博士の学位を授与する価値があるものと判定した。