

氏 名(本籍) 五十嵐 友二

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 542 号

学位授与年月日 平成 8 年 1 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 赤潮原因ハプト藻 *Prymnesium parvum*
の生産するプリムネシン-1, プリムネ
シン-2 の化学構造と作用に関する研究

論文審査委員(主査) 教授 安元 健
教授 目黒 熙
教授 大久保 一 良

論文内容要旨

序論

微細藻類の大量増殖による赤潮は発生頻度および発生地域のいずれについても増加しつつあり、世界的な見地に立った対策が重要な問題となっている。原因物質の究明は被害防止の対策樹立、水産増養殖および環境保全にとって不可欠であるが、魚類の大量弊死原因となる魚毒成分の化学構造が解明された例はこれまでのところ渦鞭毛藻 *Gymnodinium breve* の毒プレベトキシンのみであった。ハプト藻 *Prymnesium parvum* は、1939年以来世界各地で赤潮を形成し、プリムネシンという強い魚毒成分を生産することが知られている。しかし毒の精製が困難なために、その化学的実体は不明のままであり、本毒の解明は赤潮研究における長年の課題となっていた。この様な背景のもとに *Prymnesium parvum* 培養藻体からのプリムネシンの単離、構造決定、諸性状の確認及び生物活性発現機構の解明を目的とし研究を進めた。

第一章 *Prymnesium parvum* の培養とプリムネシンの生産

大量培養を目指して通気培養条件(100ml/sec)を検討し、静置培養に比べて約4倍の細胞密度を達成した。通気条件では、細胞あたりの毒生産量も約5倍上昇したので、培養液当たりの毒の総生産量は約20倍に向上した (Fig. 1)。また、炭素核NMRの測定を容易にするため、 $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ を用いる ^{13}C 集積培養を検討し、 ^{13}C 濃度を約5%に高めることに成功した。

第二章 プリムネシンの精製、理化学的性状及び反応誘導体の調製

各種精製法を改善した結果、プリムネシン-1 (PRM1, 10mg)及びプリムネシン-2 (PRM2, 15mg)の2成分を初めて単離した。また、 ^{13}C 集積培養液よりPRM1とPRM2の各1.5mgをN-アセチル体として単離した (Fig. 2)。各種分光スペクトルの解析の結果、PRM1及びPRM2ともに分子内に3共役系、アミノ基及び塩素が存在すると推定した (Table-1)。構造解析及び生物活性の確認に必要なN-アセチル体 (NAPR1、NAPR2と略す)、完全アセチル体、水素

付加還元体、85, 86位脱塩酸体及び*N*-アセチル脱塩酸体を調製した。

MSスペクトルの結果、PRM1は m/z 2265 [M+H]⁺、2287[M+Na]⁺に、PRM2は1971 [M+H]⁺、1993 [M+Na]⁺に、さらに*N*-アセチル体はNAPR1で2305[M-H]⁻、NAPR2で2011[M-H]⁻に顕著なイオンが観測された。*N*-アセチル体のスペクトル中には脱塩酸体(-36 mu)に相当するイオンが観測され、関連イオンの分布から分子中には複数の塩素の存在が予想された。後述する構造解析の結果得られた分子式[NAPR1; C₁₀₉H₁₅₆Cl₃NO₄₅, NAPR2; C₉₈H₁₃₈Cl₃NO₃₆]及び各脱塩酸体の分子式 [C₁₀₉H₁₅₅Cl₂NO₄₅, C₉₈H₁₃₇Cl₂NO₃₆]について同位体パターンの算出を行った結果、分子関連イオン及び同位体パターンはともによく一致した (Fig. 3)。これらの結果及び後述するNMRによる構造解析の結果よりPRM1, PRM2の分子式はそれぞれC₁₀₇H₁₅₄Cl₃NO₄₄, C₉₆H₁₃₆Cl₃NO₃₅であると決定した。

第三章 プリムネシンの構造決定

本物質は結晶化しないので、NMRによる構造決定をまずプリムネシン-2について行い、次に各種スペクトルを比較検討することによりプリムネシン-1について実施した。

1) プリムネシン-2の構造

1D ¹H NMRの結果、両物質は類似ポリオキシ構造を持つ化合物であると推定された (Fig. 4)。¹H-¹H COSY、HOHAHAの結果、6つのシーケンスが明らかとなり (Fig. 5)、遠隔カップリングが観測されたことからH2/H5、H6/H9間には共役系を介した構造の存在が予想された。また、各結合定数の値から二重結合は全て*E*型であると推定された。BBD、DEPT、HSQC及びHMBCの測定によりメチル 2、メチレン 24、オレフィンメチン10、その他メチン54、四級炭素 8、計98の炭素を帰属した。

次にHMBCにより各シーケンスを連結することができ C1'-C5'はペントフラノースと確定した。HMBCの解析から、2-5、6-9位間に各2個の4級炭素が示唆されたので先の遠隔

カップリングの結果を併せて、3, 4位、7, 8位に三重結合を配した。ケミカルシフト、UV吸収から本構造は支持された。同様に86位以降に3個の四級炭素が示唆されたこと及び末端アセチレンの重水素への交換を確認できたことにより、2つの三重結合を含む末端部(86-90位)の構造を推定した (Fig. 6)。エーテル環(A-N)はNOEにより推定し、環A-Eは梯子状構造を持つことが明らかとなった (Fig. 7)。一方、トランス1, 6-ジオキサデカリンが単結合で繋がった部分の推定根拠をより明確にするため、MM-2 PROGRAMによる分子力場計算を行った。この際、推定構造以外では最もNOE等の情報を反映していると考えられた構造を選び推定構造との比較を行った (Fig. 8 中 破線矢印)。各構造に特徴的なNOEと結合定数を比較し、20位より74位にかけての環部分の相対立体配置は推定構造においてのみ妥当であることを確認した。

アミノ基はN-アセチル化後の、また水酸基は完全アセチル化後の付け根メチンプロトンの低磁場シフトにより推定した (Fig. 9)。1位塩素はC1 (86.58, 131.8) の $1J_{C-H}$ (200 Hz) から決定した。C1-56とC1-85は完全アセチル化後にC56とC85が低磁場シフトしないこと及びそのケミカルシフト (δ c60.3, 64.1)から決定した。さらに85位塩素は近傍のジインの影響で、H86とともに脱塩酸を起こすことを確認した。水素添加物のMS, NMRによる解析の結果、推定構造に含まれる4つの三重結合、5つの二重結合の正当性が証明された。

分子中のペントフラノースについては加水分解後にトリフルオロアセチル誘導体を調製し、FID-GC法で絶対構造を確認した結果、L-xyloseと決定した。

以上の結果、Fig. 11に示すプリムネシン-2の化学構造を立証するデータは全て揃ったものと考えた。

2) プリムネシン-1の構造

同一条件下で測定したNAPR1とNAPR2の $1H-1H$ COSY, HOHAHA及びHSQCのスペクトルを比較検討した結果、Fig. 10に示した78-82位以外の部分ではその差異は炭素核で1ppm、プロト

ンで0.1ppm以下であった。一方、NAPR1にはNAPR2に加えペントース、ヘキソースが各1個結合していると推定され、分子量の差(294mu)もこれを支持した。NOESY、HMBC及びGC分析によって、L-arabinopyranoseとD-galactofuranoseの2種の糖がそれぞれ78位、82位に結合していると推定した。一方、PRM1ではPRM2に存在するL-xyloseに代わってD-riboseが検出され、生合成に興味を持たれた。

これらの結果、プリムネシン-1についてもその平面構造が決定され、これまで報告されたことのない全く新規な構造が明らかとなった (Fig. 11)。

第四章 プリムネシンの生物活性 (Table-2)

両物質はほぼ同じような生物活性を示した。この中で溶血活性は植物サポニンの1000倍以上という前例のない強さであった。また、100nM以下の濃度でCa²⁺の細胞内流入を活性化した。魚毒性もCa²⁺の添加で上昇するので、魚毒発現にCa²⁺が関与すると推定された。マウス毒性 (50-80μg/kg, ip) は下痢性貝毒イエツトキシシンと同程度であった。

第五章 溶血性及び魚毒性発現機構の解明

プリムネシン (PRM2)の強い溶血性及び魚毒性について、構造と活性に共通点の多いマイトトキシシン (MTX) と比較検討しつつその作用機構を解明した。なお、魚毒性はLC50値 (5mM トリス緩衝液中24hr)、溶血性はHC50 (50% 溶血濃度、マイクロプレート法)を活性評価の基準とした。

1) プリムネシンの溶血性、魚毒性発現機構

PRM2の溶血活性は微酸性側で上昇し、溶血は約20分で平衡に達した。Ca²⁺及びCa²⁺チャネルブロッカー (ベラパミル、ニフェジピン、プレニルアミン、クロルプロマジン、ジルチアゼム)の影響はなく、PRM2による溶血のCa²⁺依存性は認められなかった。コレステロール等の赤血球膜脂質成分の添加はかなり強い阻害 (20μM 以下)を示し、赤血球膜への直接

的な攻撃が推測された (Fig. 12)。 PRM2の各種反応誘導体では85-86位脱塩酸体のみが約20分の1の溶血活性を示し、微細な構造変化で大きな活性低下が認められた。次にPRM2誘導体とPRM2との相互作用を測定した結果、水素付加還元体及び完全アセチル体は $1\mu\text{M}$ レベルでPRM2による溶血を阻害した。この結果は膜表面に何らかの親和性部位が存在し、PRM2の結合が競合的に阻害されることを示唆した (Fig. 13)。さらに動物種 (マウス、羊、兎、犬、鶏、鯉) 間では、犬の血球に対してサポニンの5万倍の活性を示し、特異的親和性部位と特異な溶血機構の存在が推定された (Table-3)。 プレベトキシシン (PbTx-3) を対照として魚毒性に対する Ca^{2+} 及びpHの影響を検討した結果、PRM2の魚毒性は Ca^{2+} 依存性を示した。特にpH8でその影響が強く Ca^{2+} 2mMではPbTx-3の活性を凌いだ (Fig. 14)。なお、各種反応誘導体の魚毒性は溶血の場合と同様に、85-86位脱塩酸体のみに約50分の1の活性が認められた。

2) MTXの溶血性、魚毒性発現機構

MTXによる溶血は微アルカリ側で上昇し、約1時間で平衡に達した。 Ca^{2+} による顕著な活性上昇が認められ (Fig. 15)、この Ca^{2+} をEDTAでキレートすると溶血は阻止された。また細胞内カルモジュリン (CAM) 阻害物質 (プレニルアミン、クロルプロマジン) 及びホスホリパーゼA2 (PLA2) 阻害物質 (キナクリン) は、それぞれ溶血を抑制した (Fig. 16)。CAMは Ca^{2+} 、PLA2はCAMにより活性化されるので、溶血機構として Ca^{2+} 流入によりCAM-PLA2が活性化され、その結果膜リン脂質が分解されると考えた (Fig. 17)。一方、 Ca^{2+} イオノフォアが溶血性を示したのに対し、 Ca^{2+} チャンネルアゴニストは溶血を起こさない。また、 Ca^{2+} チャンネルに特異的なブロッカーでは不完全阻害しか認められない。 Ca^{2+} 流入経路は既知のチャンネルではなく、未知のものとして推定された。なお、鯉、鶏の有核赤血球に対しては極端な活性低下が認められ、血球膜構造の違いに加えて血球内の代謝機能の差異も影響すると考えられた (Table-4)。魚毒性は、PRM2の場合と同じように Ca^{2+} 、pHの影響を強く受け、pH8、 Ca^{2+} 2mMの条件ではpH7、 Ca^{2+} フリーの場合の3000倍以上に活性が上昇した (Table-5)。

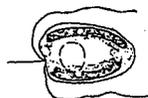
総括

- 1) 赤潮原因藻 *Prymnesium parvum* の培養条件を検討し、100ml/secでの通気条件により培地あたりの毒生産量を約20倍に高めた。
- 2) 各種精製法の改良により主毒プリムネシンを単離し、本毒が分子量2261及び1967の2成分よりなることを明らかとした。
- 3) NMRを中心とした構造解析によりプリムネシン-1, -2の全平面構造と環部分の相対立体配置を決定した。この結果、両物質はポリエーテル、ポリオキシ骨格に加え、共役二重結合、三重結合、糖、塩素、アミノ基などの多様な官能基を含む全く新規な構造を持つことが明らかとなった。また、分子全体として疎水部(C1-C45)と親水部(C46-C90)に2分され脂質膜との相互作用が推定された。
- 4) プリムネシン-1, -2 はともに植物サポニンの1000倍以上という前例のない溶血活性を有し、さらに魚毒性、Ca²⁺流入活性、マウス毒性などの種々の生物活性を有した。
- 5) プリムネシンの溶血はCa²⁺依存性を示さず膜脂質成分に存在する特異的親和性部位との結合に起因すると推定した。一方、プリムネシンの魚毒性はCa²⁺、pHにより大きく変動しpH 8、2mM Ca²⁺の条件ではプレベトキシンを凌ぐ魚毒性を発現した。
- 6) プリムネシンと構造、活性に類似性のあるマイトトキシンの溶血が赤血球内へのカルシウムイオンの流入に起因するホスホリパーゼA2の昂進によること、またそのカルシウムイオンの流入が 既知チャンネルとは異なる未知の経路によることを明らかとした。さらに、マイトトキシンのプレベトキシンの2000倍という強烈な魚毒性を持ち、その発現はカルシウム、pHの影響を強く受けることを示した。

Prymnesium parvum

Classification	Haptophyceae (Cartar 1937)
Damage	Massive fish kills(Otterstrome <i>et al.</i> 1939~)
Affected area	Israel, Netherlands, Denmark, UK, Spain, Bulgaria, USA,China, Norway
Toxin	Prymnesin named by Yariv (1958)

Size



4-7 μ m

10-15 μ m

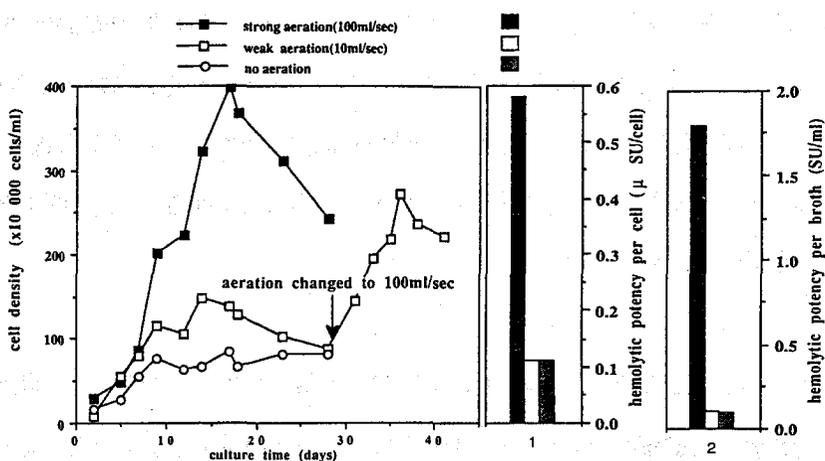


Fig. 1 The effect of aeration on growth and toxin production of *P. parvum*. Growth curves are shown on the left side (lines). Column on the right side show hemolytical potency measured 23 days after inoculation

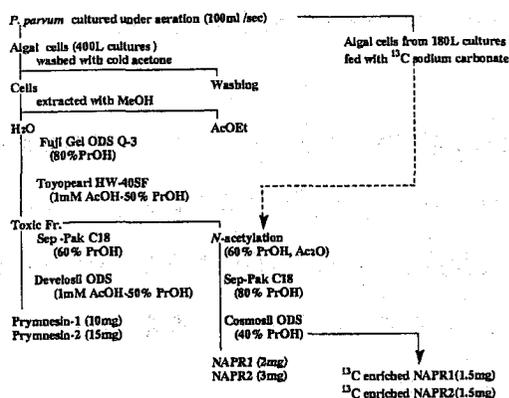


Fig. 2 Purification of prymnesins and their *N*-acetates

Table-1 Chemical properties of pymnesins

	pymnesin-1	pymnesin-2
$[\alpha]_D^{23}$	+9.04 (c0.12)	+21.7 (c0.15)
ninhydrin	positive	positive
X-ray analysis	Chlorine	Chlorine
UV	267, 278, 242nm	267, 278, 242nm
IR	3300, 2220, 1570, 1280,1100nm	3300, 2220, 1570, 1280,1100nm
$[M+H]^+$	2,265	1,971
$[M(N\text{-acetate})-H]^-$	2,305	2,011

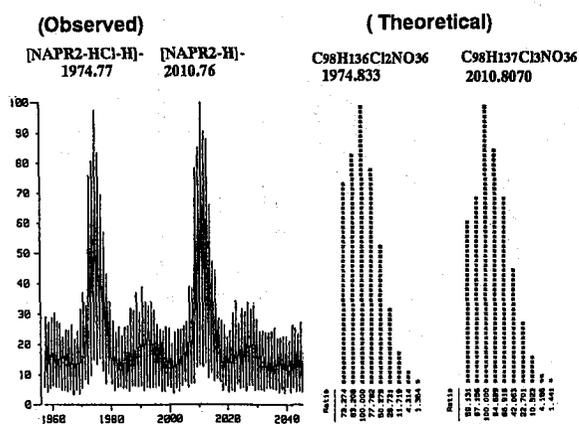


Fig. 3 Negative ion FAB MS spectrum of NAPR2 and the theoretical ion distribution data for C₉₈H₁₃₆Cl₂NO₃₆ and C₉₈H₁₃₇Cl₃NO₃₆

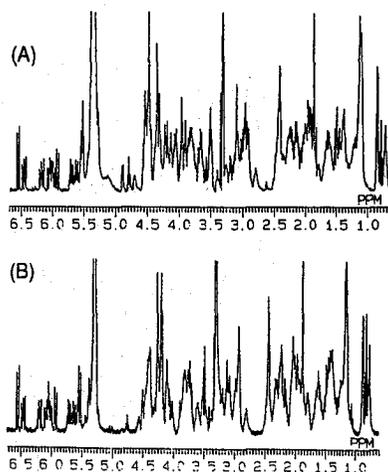


Fig. 4 ¹H-NMR spectra of NAPR1(A) and NAPR2(B) (CD₃OD-C₂D₅N=1/1, JEOL JNM-GSX-400)

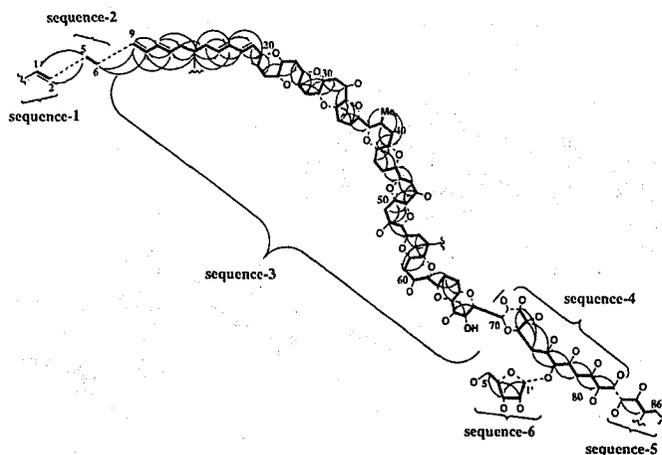


Fig. 5 Correlation from ¹H-¹H COSY, TOCSY (BOLD LINE) in NAPR2
Arrows denote long range coupling in TOCSY spectrum

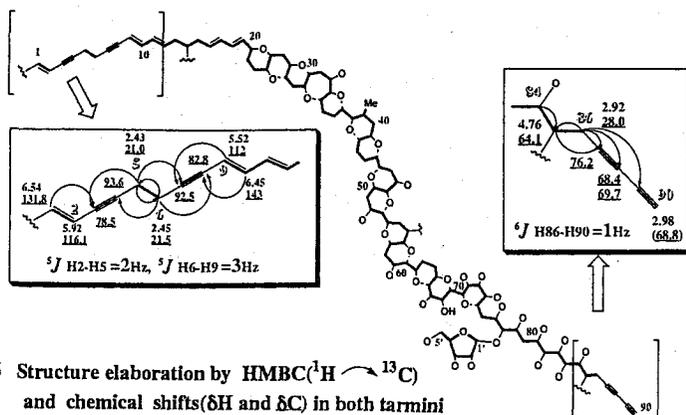


Fig. 6 Structure elaboration by HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$) and chemical shifts (δH and δC) in both tarmini

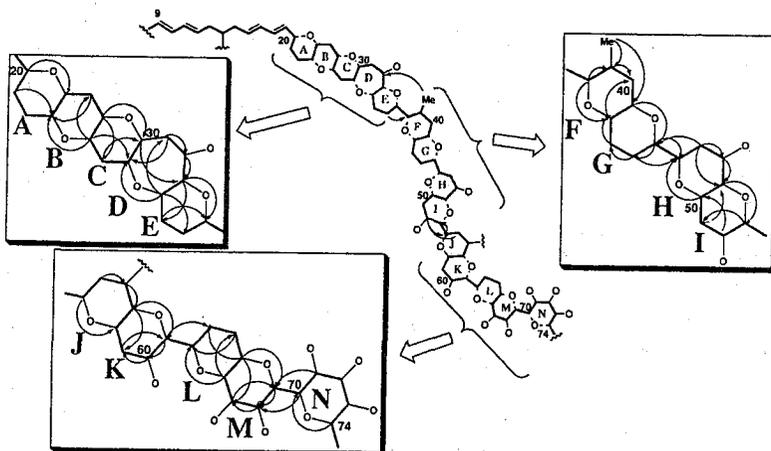


Fig. 7 Ring construction from NOESY measurements in NAPR2. Arrows show NOE correlation

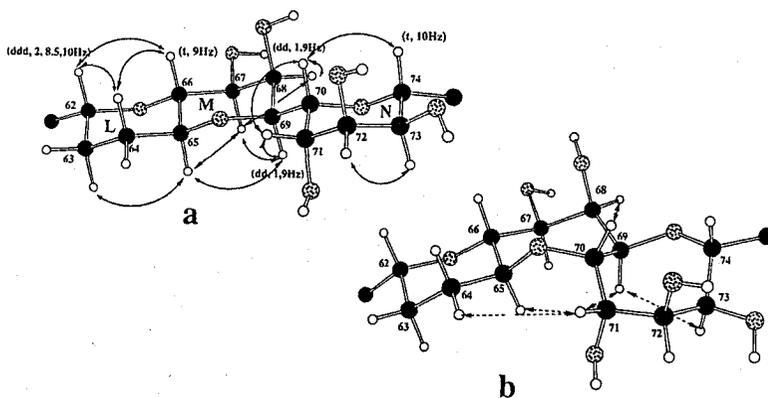


Fig. 8 Stereostructure of rings L-N (a, 6/6-6) and alternative stereostructure (b, 6/7/7). Coupling constants and multiplicities are shown in parentheses
 () ; NOE
 - - - - - ; disagreement with observed results

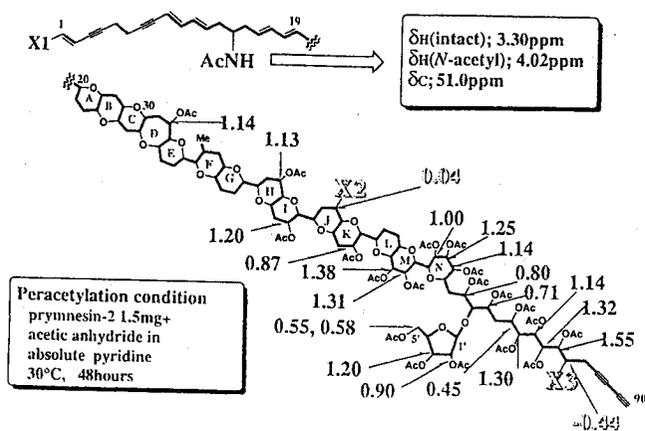


Fig. 9 Position of Nitrogen and down field shift of methine proton after peracetylation

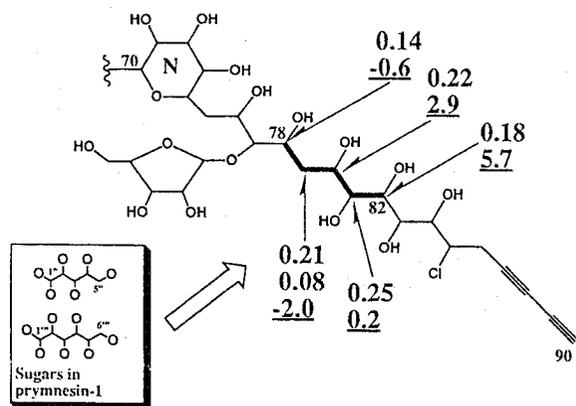


Fig. 10 Differences in chemical shifts between NAPR1 and NAPR2

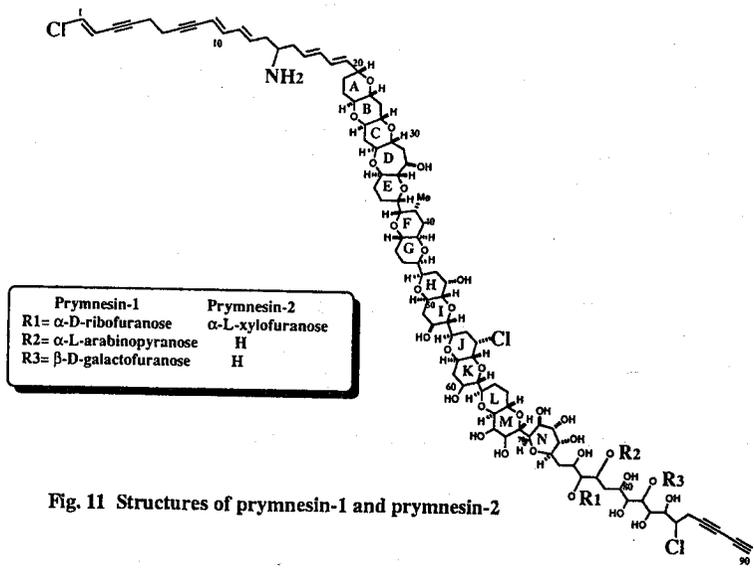


Fig. 11 Structures of prymnesin-1 and prymnesin-2

Table-2 Biological properties of prymnesins

	Prymnesin-1	Prymnesin-2
Hemolytic activity		
mouse blood cells relative to saponin	1,200 (4500*)	1,800 (6000*)
Ichthyotoxicity		
<i>Tanichthys albonubes</i>	9 nM	10 nM
20mM TrisHCl buffer(pH8)	2 nM**	3 nM**
ED50 for Ca ion influx		
rat glioma C6 cells	80 nM	70 nM
Mouse lethality		
male ddY ip. injection	50 µg/kg	80 µg/kg

*calculated on a molar basis

**In the presence of CaCl₂(2mM)

Table-3 Sensitivities of blood cells from different animal species to PRM2

	Saponin(nM*)	PRM2 (nM)	relative to saponin
mouse	17000	2.5	6800
rabbit	15000	1.7	8800
dog	25000	0.5	50000
sheep	23000	0.6	38000
chicken	17000	1.9	8900
Carp	11500	1.6	7200

*MW was assumed to be 600

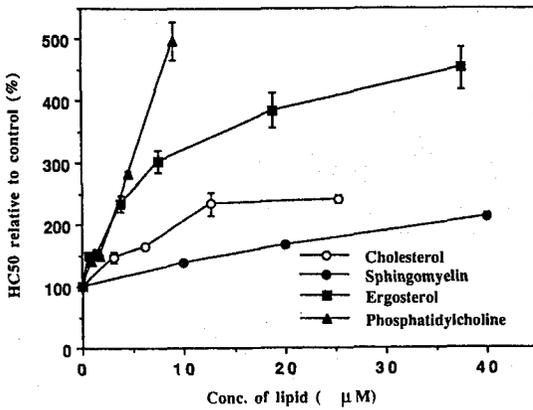


Fig. 12 Effect of lipids on hemolytic activity of PRM2

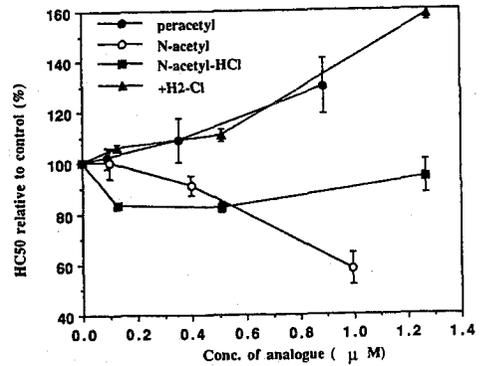


Fig. 13 Effect of PRM2 derivatives on hemolytic activity of PRM2

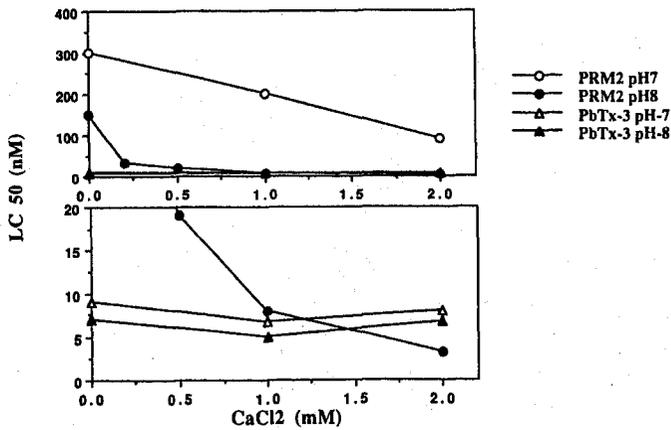


Fig. 14 Effect of calcium ion on ichthyotoxicity

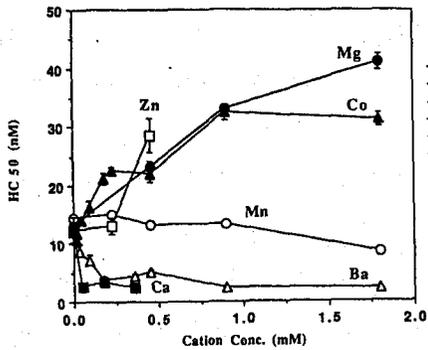


Fig. 15 Effect of Cations on HC50 of MTX

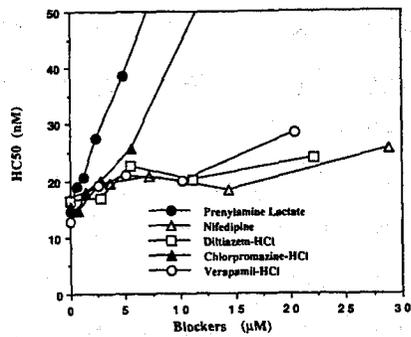


Fig. 16 Effect of Ca²⁺ channel blockers on HC50 of MTX

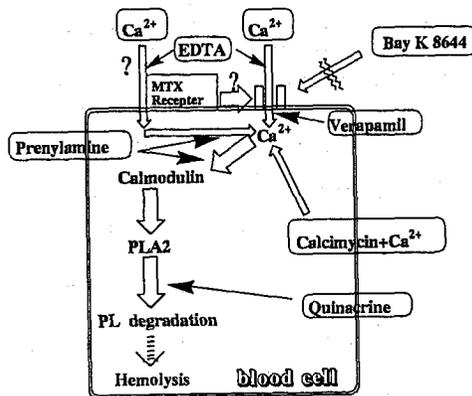


Fig. 17 Mechanism of hemolysis by MTX

Table-4 Sensitivities of blood cells from different animal species to MTX

	Saponin (nM*)	MTX (nM)	relative to saponin
mouse	17000	15	1100
rabbit	15000	29	520
dog	25000	26	960
sheep	23000	37	620
chicken	17000	490	35
Carp	11500	670	17

*MW was assumed to be 600

Table-5 Effect of Ca²⁺ on ichthyotoxicity (LC50 in nM)

		Ca ²⁺ free	Ca ²⁺ 1mM	Ca ²⁺ 2mM
MTX	pH7	11	3.2	0.27
	pH8	5.0	1.7	0.003
PbTx-3	pH7	9.0	6.8	7.9
	pH8	7.0	5.0	6.8

論文審査の要旨

微細藻類の大量増殖（赤潮）による魚介類の大量死は世界的に増加しており，漁業資源の保護及び保健衛生の観点から原因毒の解明は急務である。しかしながら毒の化学性状や作用機構が解明された例は極めて少ない。

本研究の対象であるハプト藻 *Prymnesium parvum* は世界各地で大きな被害を与える代表的な有害赤潮種であり，原因毒のプリムネシン（prymnesin）の実体は，多くの研究者の努力にも拘らず不明であった。本研究では，まず培養条件の改善によって20倍もの毒の増収が達成された。次に，2価金属イオンの除去，酸化防止，最適溶媒の検討によって，強力な魚毒性と溶血性を合わせ持った2成分の毒，prymnesin-1 (PRM1) および prymnesin-2 (PRM2) が初めて単離された。主成分のPRM2について， ^{13}C 集積体，N-アセチル体，過アセチル体，還元体，脱塩酸体，加水分解物等が調製された。これらの試料を用いて，NMRおよび質量分析等の分光学的手法による構造解析が行われた結果，PRM2は分子量が1967で，分子式 $\text{C}_{96}\text{H}_{136}\text{Cl}_3\text{NO}_{35}$ を有する巨大な配糖体であることが確定され，環状構造部の相体立体配置を含めた全構造が決定された。次いで，各種スペクトルの比較と分解物の分析によってPRM1 ($\text{C}_{107}\text{H}_{154}\text{Cl}_3\text{NO}_{44}$ ，分子量2261) の全構造も決定された。両成分は C_{90} の長大な炭素鎖とアセチレン，共役二重結合，エーテル環，塩素，アミノ基，糖などの多彩な官能基を有する全く新規な化合物である。

PRM1及びPRM2は共に植物サポニンの千倍以上の溶血作用と強力な魚毒作用を示す。その作用機構はミセルの形成による生体膜の破壊によるものであり，同様な巨大ポリエーテル毒のマイトトキシンとは明らかに異なることが示された。

以上のように，本研究では赤潮研究及び海洋天然物化学の分野で長年の課題とされていた赤潮毒プリムネシンの化学構造と作用が初めて解明された。分子量が2000にも達し，多彩な官能基を有する分子の新規構造を僅か数ミリグラムの試料で解明した成果は，天然物化学における重要な貢献であり，博士（農学）の学位を授与するに値すると判定された。