

氏 名(本籍) なが 永 井 宏 史

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 4 6 4 号

学位授与年月日 平 成 4 年 12 月 10 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 渦鞭毛藻 Gambierdiscus toxicus の生産する生理活性物質に関する研究

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

1970年代より海洋生物から医薬品のリード化合物あるいは生化学試薬を探索する研究が活発に行われており、海洋生物の二次代謝産物が陸上生物由来の化合物と比べて、新奇な構造と強力な活性を有する成分が多い事実が明かにされている。しかし最近になって、さまざまな海洋生物から得られる生理活性物質の真の生産者として渦鞭毛藻を含む共生微生物の存在がクローズアップされてきている。例えば、海綿では重量の約4割もの共生微生物が含まれることがあり、海綿など海洋生物から得られた生理活性物質の中には共生微生物または餌としている微生物が生産していると考えられる事例が少なくない。海綿などを大量に採集することは生態系の破壊を招くので、生理活性物質の供給源として第一次生産者である培養可能な微生物を探索することが重要と考えられる。

従来、渦鞭毛藻の生産する生理活性物質は、漁業被害をもたらす赤潮毒、下痢性貝毒、まひ性貝毒、シガテラなどの魚介類食中毒の原因毒としての観点から研究が行われていた。その結果、プレベトキシン、オカダ酸、シガトキシンなどのポリエーテル、ポリオキシン化合物が多数得られており、このようなタイプの化合物は、渦鞭毛藻に特徴的な二次代謝産物であることが認識されてきている。またこれら一連の化合物はその特異で強力な生理活性作用から薬理・生化学試薬として使用され、一方ではその新奇な化学構造から、天然物有機化学の挑戦的ターゲットとなっている。

このように、渦鞭毛藻は放線菌と並んで新奇ポリエーテル化合物の宝庫であることが示唆された。そこで従来は検討されることの少なかった有用生理活性物質を得ることを目的として研究を行った。

本研究では、下記4項目について研究を進めた。

- 1) 各種渦鞭毛藻由来ポリエーテル化合物の抗菌活性の測定。
- 2) 各種微細藻類の生産する抗カビ活性成分、細胞毒性成分のスクリーニング

グ。

- 3) スクリーニングによって強い抗カビ活性が検出された渦鞭毛藻 Gambier-discus toxicus の活性本体 gambieric acid-A, B, C, D の単離と構造決定。
- 4) Gambieric acids の各種生物活性の測定。

第1章 渦鞭毛藻由来ポリエーテル化合物の抗菌活性

渦鞭毛藻由来の魚介毒の研究を通して単離、構造決定された (brevetoxin を除く) 13種類のポリエーテル化合物 (Fig.1) について、Aspergillus niger, Penicillium funiculosum, Candida rugosa, Escherichia coli, Bacillus megaterium, Staphylococcus aureus の各菌に対する活性をペーパーディスク法により調べた (Table 1)。

その結果、okadaic acid, dinophysistoxin-1, 7-deoxyokadaic acid, ethyl okadaate, yessotoxin, desulfated yessotoxin の計6種の化合物がカビに対して生育阻害を示した。食中毒シガテラの原因毒であり特に強力なマウス毒性を示す ciguatoxin と maitotoxin は、各々 0.5, 10 μ g/disk で A. niger に対してまったく抗菌活性を示さなかった。また、yessotoxin の抗カビ活性は脱硫酸により著しく増強された。約5割という高い確率でこれらポリエーテル化合物から抗カビ活性が検出されたのに反して供試したいずれの化合物も、酵母、グラム陰性・陽性の各検定菌に対してまったく活性を示さなかった。

これらの結果から、操作の容易なペーパーディスク法を用いた抗カビ活性試験は渦鞭毛藻中のポリエーテル化合物のスクリーニングに適していると考えられた。

第2章 海産微細藻類の生産する抗カビ活性成分，細胞毒性成分のスクリーニング

第1節 海産微細藻類の抗カビ活性スクリーニング

赤潮を形成することが知られている微細藻類を中心に培養し抗カビ活性スクリーニングに供した。また天然に赤潮を形成した Pavlova lutheri、および Eutripiella sp. の2種の藻体も供試した。培養藻類をろ過により収穫し、藻体はメタノール抽出後、液-液分配を行った。またろ液区はポリスチレン系の Amberlite XAD-2カラムに通し、メタノールで吸着区を溶出した (Fig. 2)。これら各フラクションについて A. niger に対するペーパーディスク法を用いた抗カビ活性スクリーニングを行った。

ラフィド藻3種中2種、渦鞭毛藻9種中7種で藻体抽出物中に抗カビ活性が検出された (Table 2)。このようにラフィド藻、渦鞭毛藻は非常に高い確率で抗カビ活性物質を生産していることが判明した。これら抗カビ活性はほとんどの藻体抽出物において1-BuOH区に存在していた。

Gambierdiscus toxicus のXAD-2カラムMeOH溶出区は特に強い抗カビ活性を示しており、後述するようにその活性成分の単離精製、構造決定を行った。

第2節 海産渦鞭毛藻の抗カビおよび細胞毒性スクリーニング

前節の結果からも示されたように渦鞭毛藻は抗真菌活性物質の生産者として有望であった。そこで国立環境研究所より入手した13種の渦鞭毛藻を培養し、その抽出物について抗カビおよび細胞毒性スクリーニングを行った (Fig 3)。細胞毒性試験はマウス白血病P388細胞に対する生育阻害作用をMTT法を用いて測定した。

供試した13種中6種に抗カビ活性が検出された (Table 3)。Amphidinium

carteraeの培養ろ液画分が顕著な抗カビ活性を示した。また13種中6種は細胞毒性が検出された。Protoceratium reticulatumの藻体区と培養ろ液区、またGymnodinium nagasakienseの培養ろ液区に顕著な細胞毒性活性が検出された。A. carteraeでは異なる生物活性を有する二つ以上の化合物の生産が確認された。また供試した13種中計8種から抗カビもしくは細胞毒性活性が検出されており、これら渦鞭毛藻は極めて多彩な生理活性物質の生産者であることがあらためて示唆された。

第3章 渦鞭毛藻 Gambierdiscus toxicus の生産する抗カビ活性物質の単離と構造決定

第1節 G. toxicus の活性物質生産の経時変化

渦鞭毛藻 G. toxicus は、仏領ポリネシアで分離し、3Lのカブ型フラスコ中でES-1栄養塩添加培地を用い、25℃、照度2000-4000Lux、明18時間-暗6時間のサイクルで培養した (Table 4)。

経時的に G. toxicus を収穫し培養藻体区、培養ろ液区の A. niger に対する抗カビ活性 (Fig.4)、マウス毒性を測定し、藻体の成長曲線と比較した。その結果 G. toxicus の生産する抗カビ成分は藻体細胞外へ放出されていること、また細胞最大増殖時より1週間ほど遅れて抗カビ活性が最高値を示すことが判明した。

第2節 Gambierdiscus toxicusの生産する抗カビ活性物質 gambieric acids

1) G. toxicusの生産する抗カビ成分の精製

活性成分の精製 (Fig.5) は A. niger に対する抗カビ活性を指標として行った。培養液をろ過して得たろ液を Amberlite XAD-2カラムに通し、吸着した活性画分をメタノールで溶出後、溶媒分画を行った。5000Lの培養液から得た活性画分についてさらにゲルろ過、逆相系・順相系シリカゲルHPLCで順次精製し、gambieric acid-A (GA-A, 0.6mg), gambieric acid-B (GA-B, 0.15mg), および主要活性画分の gambieric acid-C (GA-C) と gambieric acid-D (GA-D) の混合物 (5.4mg) を得た。通常のカラムクロマトグラフィーでは GA-C と GA-D を収量良く分離することは不可能であった。そこで GA-C と GA-D の混合物をアルカリ加水分解した後、逆相系・順相系シリカゲルHPLCによって精製し GA-A、GA-B および 3-methylglutaric acid を得た (Fig.6)。これらをあわせ最終的に GA-A 7.0mg, GA-B 2.3mg, GA-C と GA-D の混合物 5.6mg をそれぞれの構造決定に用いた。

2) Gambieric acid Aの化学的性状

GA-Aの化学的性状は以下の通りであった。

FABMS: m/z 1057 (M+H)⁺, HR-FABMS 実測値 m/z 1079.6330 (M+Na)⁺ (計算値 1079.6280 C₅₉H₉₂O₁₆Na); UV λ_{max} (MeOH) 210nm以上に極大吸収なし;

IR(KBr) 3500, 1735cm⁻¹, $[\alpha]_D^{20} +33^\circ$ (c 0.49, MeOH)。

3) Gambieric acid Aの構造決定

¹H-COSYと 2D-HOHAHAスペクトルの詳細な解析により、Fig.7に示す4つのフ

ラグメントの存在が明かとなった。また4級炭素に結合したメチル基周辺のつながりを明かにするためにHMBCスペクトルを測定した (Fig.8)。その結果52, 53, 55, 56位メチル基の周りの結合状況が明かとなった (Fig.7)。これにより4つのフラグメントを1本の炭素鎖としてつなげることができた。2D-NMRの結果からは、50位のメチル基がC2、C3のどちらに結合しているのか判然としなかった。そこで、50位のメチル基を照射しその磁化移動状況を調べる1D-HOHAHA実験を行った。その結果、磁化は3位のメチンを経由し4位のオキシメチンへと移動していくことが確認でき、この部分の結合状況が明かとなった (Fig.9)。

IRスペクトルの結果から分子内にカルボキシル基の存在が示唆されていたが、GA-Aの ^{13}C NMRスペクトルではカルボニル炭素は確認できなかった。そこでGA-Aをメチルエステルに誘導しその ^{13}C NMRを測定することによりカルボキシル基の存在を確認した。GA-Aおよびそのメチルエステルの2位メチレンの化学シフト値の比較などからカルボキシル基はC2に結合していることが明かとなった。水酸基の結合している炭素は重水素シフト実験により特定された。

HMBC (Fig.7,8) とNOESYスペクトル (Fig.10) の解析によってB,C,D,E,F,H,Jの各エーテル環の存在が明かとなった。G環はその環上のプロトンの結合定数から、またI環はNOE差スペクトルからその存在が明かとなった。残るA環の存在は、重水素シフト実験の結果や、分子式より求められる不飽和度から支持された。またC4(δ 86.7)とH7(δ 4.40)の化学シフト値は、3置換tetrahydrofuranによく対応していた。これらの結果からFig. 12に示すGA-Aの平面構造が得られた。GA-Aはエーテル環がbrevetoxin型のハシゴ状に連結したポリエーテル部分と、エーテル環が部分的にほどけた部分 (C1-C10) からなるユニークな化合物であった。

4) Gambieric acid Aの立体構造

NOESY (Fig.10) およびROESYスペクトル、またプロトンの結合定数 (Table

(Fig.10) から判明した。これらエーテル環の安定なコンホメーションを決定するためにNMR解析の結果をもとにMM2計算を行った。その結果B,E環はねじれた椅子型のコンホメーションをとっていることが推定された (Fig.11)。またF環はNOE実験とMM2計算の結果からFig.11に示すようなコンホメーションであることが明かとなった。A環の立体配置はNOESYスペクトルの結果から推定された。またC12,C36位上の水酸基の配向もNOESYスペクトルおよびプロトンの結合定数より判明した。

これらの結果から非環式部分を除くGA-Aの部分立体構造を明かにすることができた (Fig. 11, 12)。

5) Gambieric acid Bの構造

GA-Bの ^1H および ^{13}C NMRスペクトルはGA-Aのそれと一部を除いてよく一致していた。GA-Bの分子量は m/z 1198を示しGA-Aと比べ14マスユニット大きかった。 ^1H -NMRスペクトルで δ 1.14にシングレットメチルが観測されたことから、GA-BはGA-Aのメチル誘導体であることが示唆された。またGA-BのC12位が4級炭素であることが ^1H -COSY、2D HOHAHAスペクトルから示唆された。さらにHMBCスペクトルの測定によって11,12,13位の各カーボンからメチルプロトンの連絡が観測され、GA-BはGA-AのC12メチル誘導体であることが確認された (Fig.12)。

6) Gambieric acid Cおよびgambieric acid Dの構造

GA-CとGA-Dの混合物は、通常のカラムクロマトグラフィーでは分離できなかった。スペクトル解析の結果これら化合物中にはエステル結合が存在することが示唆されたため、この混合物についてアルカリ加水分解を行った。加水分解物を精製し、GA-A、GA-Bと3-methylglutaric acidを得た (Fig.6)。3-methylglutaric acidは ^1H -NMRで標品との異同を確かめることにより同定された。またGA-C/GA-D混合物は、アルカリ処理時にヘミエステルが加水分解された以外に構

造変化がなかったことを詳細なNMR解析から確認した。GA-C/GA-Dのヘミエステルの結合位置は¹H-NMRにおける化学シフトをGA-A, GA-Bのそれと比較することによりC49位であることが推定され、重水素シフト実験によって確認された。

第4章 Gambieric acidsの生物活性

第1節 ペーパーディスク法による抗菌活性試験

Gambieric acidsについてペーパーディスク法による抗菌活性試験を行った。Table 6に示したようにGA-Aは3種のカビに対して、GA-BとGA-C/GA-D混合物は2種のカビに対して活性を示した。A. nigerに対する活性を、抗真菌薬として代表的な抗生物質amphotericin-Bと比較すると、GA-A、GA-B、GA-C/GA-D混合物は各々2000、1000、2000倍という非常に強力な活性を示した。しかしgambieric acidsは試験したバクテリア、酵母に対して1 μ g/diskで活性を示さなかった。

第2節 液体希釈法を用いた抗菌活性試験

液体希釈法による抗菌活性試験をGA-A、GA-Bに対して行った (Table 7, 8)。その結果、各種のカビに対して顕著な活性を示した。特に、両化合物とも供試菌種によっては0.01 μ g/ml以下といった非常に低濃度で不完全阻止を示すことが示され、MIC値と比較して非常に低いsub-MIC値がgambieric acidsの抗菌作用の特徴であった。

第3節 エルゴステロールのgambieric acid A抗カビ活性に対する影響

GA-A、GA-BのA. nigerに対する生育阻害活性はエルゴステロールの添加によっても活性は変わらず、amphotericin-Bを初めとするポリエン系抗生物質とは

作用機作の異なることが示唆された。

第4節 Gambieric acidsの抗菌活性におよぼす金属イオンの影響

鉄イオン、とくに3価の鉄イオンの存在下でGA-A, GA-Bの活性が増強することが判明した (Table 9)。このような抗菌物質の鉄イオンによる活性増強は今まで例がなく、本化合物はカビに対し特殊な活性発現機構を有することが示唆された。

第5節 細胞毒性試験

GA-A, GA-Bのマウス白血病細胞 P388cellに対する細胞毒性を $[^3\text{H}]$ -Thymidine, $[^3\text{H}]$ -Uridine, $[^{14}\text{C}]$ -Leucineの各取り込み阻害を指標に測定した。GA-A, GA-Bともに各ラベル化物の取り込み阻害の IC_{50} は $0.07\text{-}0.49\ \mu\text{g/ml}$ (Table 10) と、いう値を示した。またGA-C, GA-Dは、マウスリンパ腫細胞L5178Yに対する細胞毒性を同様の方法で測定し、 $1.1\text{-}4.7\ \mu\text{g/ml}$ (Table 10) という IC_{50} 値を示した。これらの結果は、GAが腫瘍細胞のDNA, RNA, タンパク合成系などを特異的に直接阻害するのではないことを示していた。

第6節 マウス毒性試験

マウス腹腔内投与毒性試験においてGA-A, GA-Bともに 1mg/kg の投与量ではまったく毒性を示さなかった。

第7節 溶血性試験

マウス血球に対する溶血活性試験においてGA-CとGA-Dの混合物は $12.5\ \mu\text{g/ml}$ の濃度で活性を示さなかった。

総括

- 1) 渦鞭毛藻由来の多数ポリエーテル化合物の抗菌活性を測定し、クロカビを検定菌とするペーパーディスク法が抗カビ活性化合物の探索法として有用であることを示した。
- 2) 各種微細藻類抽出物について抗カビ活性、細胞毒性を指標としてスクリーニングを行い、渦鞭毛藻は多彩な生理活性物質の生産者であることを確認した。
- 3) 渦鞭毛藻 Gambierdiscus toxicus の生産する新奇ポリエーテル化合物 gambieric acid A, B, C, D を単離し、各種分光学的手法を用い構造決定を行った。
- 4) Gambieric acids の各種生物活性を測定し本化合物が極めて強力な抗カビ活性を有することを明かにした。またこれらの成分は特異な活性発現機構を有することが示唆された。

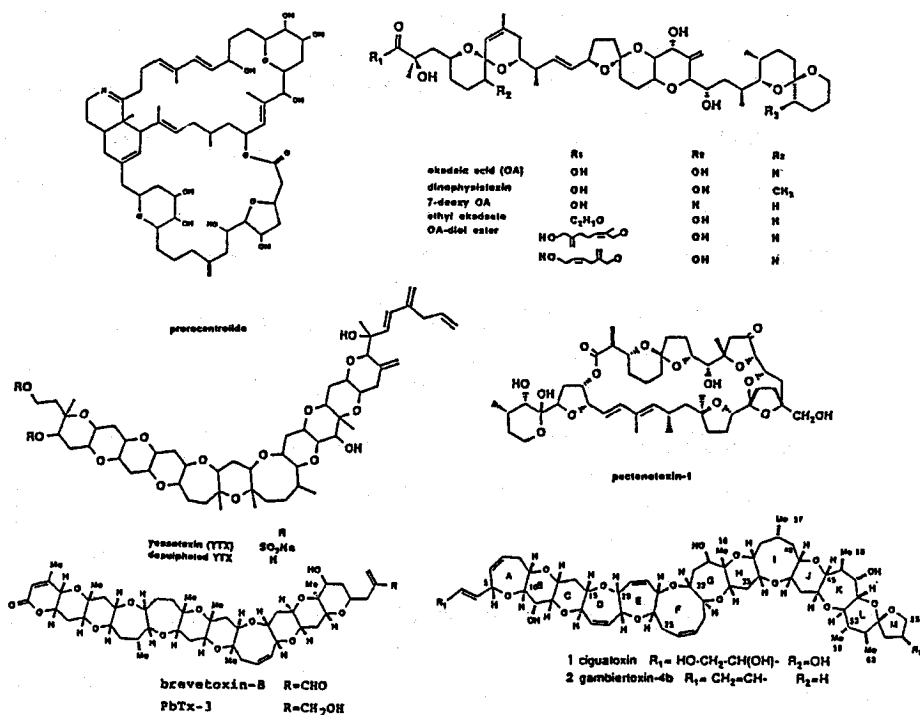


Fig. 1 Polyether Compounds Originated from Dinoflagellates

Table 1 Antimicrobial Activities of Polyethers of Dinoflagellates Origins

Sample	Dose µg/disk	* Test microorganisms					
		<u>A.</u> <u>niger</u>	<u>P.</u> <u>funiculosum</u>	<u>C.</u> <u>rugosa</u>	<u>B.</u> <u>megaterium</u>	<u>E.</u> <u>coli</u>	<u>S.</u> <u>aureus</u>
Okadaic acid	10	+	+	-	-	-	-
Dinophysistoxin-1	10	+	+	+	-	-	-
7-deoxyokadaic acid	10	+	+	+	NT	-	-
Ethyl okadaate	100	+	NT	NT	NT	NT	NT
Okadaic acid diol ester	100	-	NT	NT	NT	NT	NT
Prorocentrolide	80	-	-	-	-	NT	-
Pectenotoxin-1	10	-	-	-	-	NT	NT
Yessotoxin	10	±	-	NT	-	-	-
Desulfated yessotoxin	10	+	+	+	-	-	-
Maitotoxin	10	-	-	NT	-	NT	NT
Desulfated maitotoxin	10	-	-	NT	-	NT	NT
Ciguatoxin	0.5	-	NT	NT	NT	NT	NT
Brevetoxin(PbTX-3)	10	-	NT	NT	NT	NT	NT

+ positive; ± trace; - negative; NT not tested;.

*

Paper disk method.

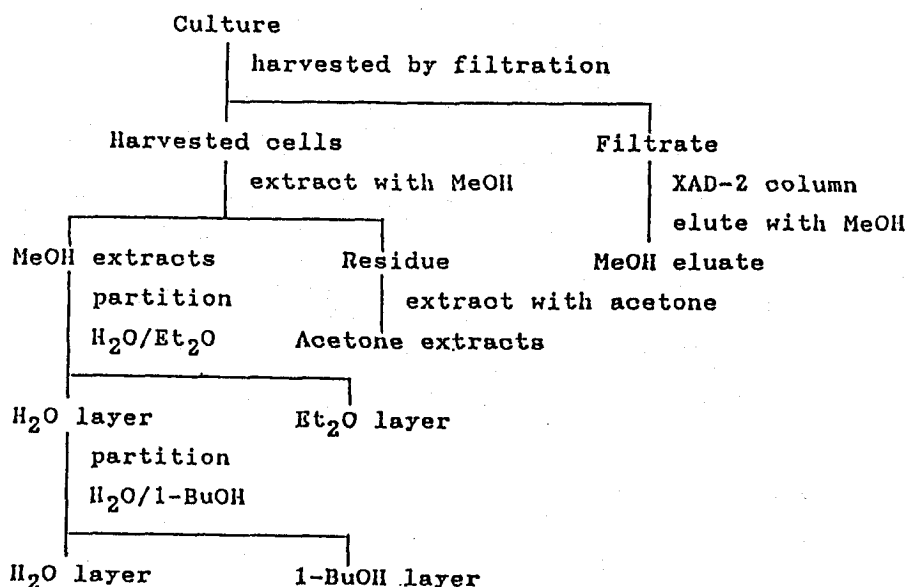


Fig.2 Preparation of Test Samples

Table 2 Antifungal activity of phytoplankton extracts.

Phytoplankton	H ₂ O layer	1-BuOH layer	Et ₂ O layer	Acetone extracts	XAD-2 MeOH
(Bacillariophyceae)					
<u>Phaeodactylum tricornutum</u>	-	-	-		
(Haptophyceae)					
<u>Pavlova lutheri</u>	-	-	-		
<u>Prymnesium parvum</u>	-	-	-		-
(Euglenophyceae)					
<u>Eutripiella sp.</u>	-	-	-		-
(Raphidophyceae)					
<u>Chattonella antiqua</u> (NIES-1)	-	+	-	-	-
<u>Olisthodiscus luteus</u> (NIES-15)	-	-	-	+	-
<u>Heterosigma akashiwo</u> (NIES-6)	-	-	-	-	-
(Dinophyceae)					
<u>Alexandrium tamarense</u>	-	+	-	-	-
<u>Amphidinium carteri</u>	-	+	-	-	-
<u>Amphidinium klebsii</u>	-	+	-	-	-
<u>Gambierdiscus toxicus</u>	-	+	-	-	+
<u>Gymnodinium nagasakiense</u>	-	+	-	-	-
<u>Gymnodinium sanguineum</u> (NIES-11)	-	+	-	-	-
<u>Prorocentrum lima</u>	-	-	+	-	-
<u>Prorocentrum micans</u> (NIES-12)	-	-	-	-	-
<u>Scrippsiella trochoidea</u> (NIES-369)	-	-	-	-	-

Paper disk method was performed against A. niger. An aliquot of the test solution corresponding to 100 ml of the culture was placed on a disk.
 + Positive; - Not detected; Blank Not tested.

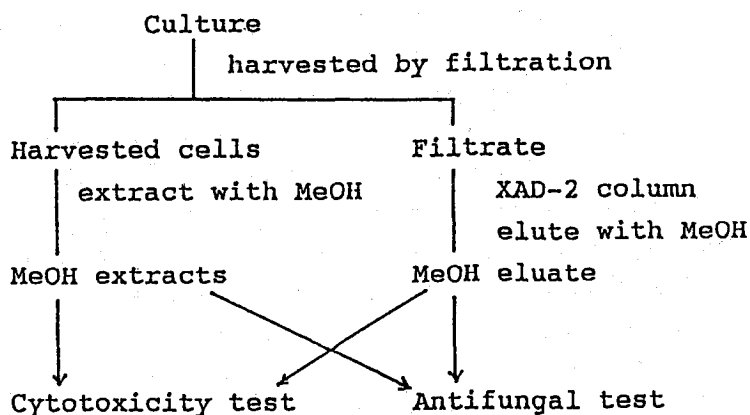


Fig.3 Preparation of Test Samples

Table 3 Antifungal activity and cytotoxicity of dinoflagellates extracts

Dinoflagellates	Antifungal activity ¹⁾		Cytotoxicity ²⁾	
	3)		3)	
	Fr.A	Fr.B	Fr.A	Fr.B
<u>Amphidinium britannicum</u> (NIES 405) ⁴⁾	0	0	0	0
<u>Amphidinium carterae</u> (NIES 331)	0	3	1	1
<u>Cachonina niei</u> (NIES 420)	3	0	3	0
<u>Gymnodinium nagasakiense</u> (NIES 249)	0	0	0	4
<u>Heterocapsa pygmaea</u> (NIES 472)	1	0	1	0
<u>Heterocapsa triquetra</u> (NIES 7)	0	1	0	0
<u>Prorocentrum dentatum</u> (NIES 314)	0	1	0	0
<u>Prorocentrum gracile</u> (NIES 315)	0	0	0	0
<u>Prorocentrum mexicanum</u> (NIES 317)	0	0	0	0
<u>Prorocentrum triestinum</u> (NIES 13)	0	0	0	0
<u>Protoceratium reticulatum</u> (NIES 318)	0	0	4	4
<u>Protogonyaulax catenella</u> (NIES 220)	0	1	0	2
<u>Pyrophacus steinii</u> (NIES 222)	0	0	0	0

1) 3; positive when the sample solution corresponding to 2ml of the culture was tested against *A. niger* on a paper disk method. 2; positive to 5ml, 1; trace to 5ml, 0; negative to 5ml.

2) 4; positive when the sample solution corresponding to 0.1ml of the culture was tested against P388 cells on a MTT method. 3; positive to 0.2ml, 2; positive to 0.5ml, 1; trace to 0.5ml, 0; negative to 0.5ml.

3) Fr.A cell MeOH extracts; Fr.B XAD-2 MeOH eluants

4) Numbers denote culture strains of the National Institute for Environmental Studies, The Environmental Agency, Japan.

Table 11 Cytotoxicity of the GA-C and GA-D mixture

Table 4 Culture condition of Gambierdiscus toxicus

culture media ; sea water enriched with ES-1 nutrient
 temperature : 25°C
 illumination : 2000-4000 lux, 18hr. on/6hr. off
 incubation period : 38 days
 vessel : Fernbach flask 3L

ES-1 nutrient

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

pH 7.8

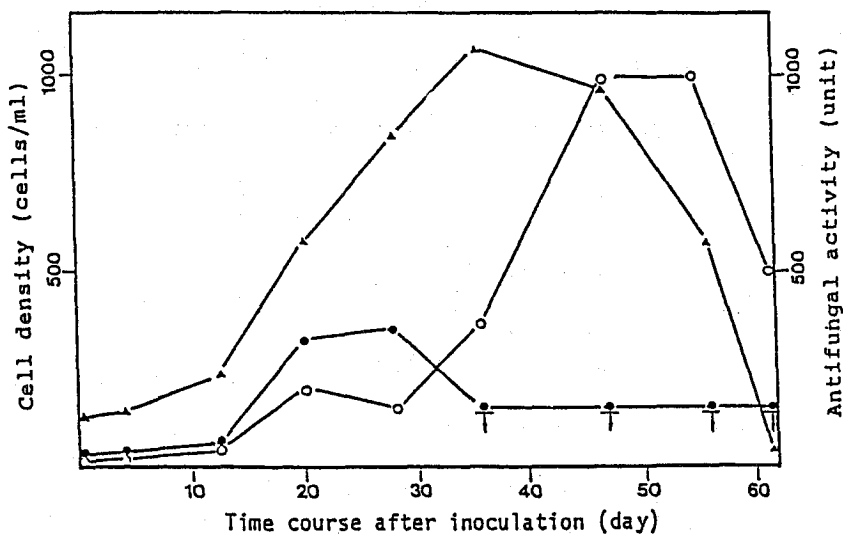


Fig. 4 Time course of antifungal activity in cells (●) and in media (○); as contrasted with cell densities (▲) of G. toxicus.

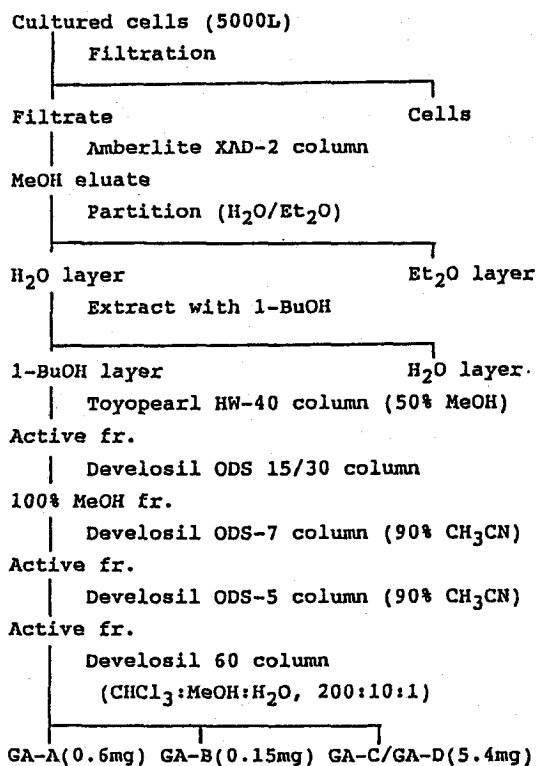


Fig. 5 Purification of Gambieric acids from *G. toxicus* Culture

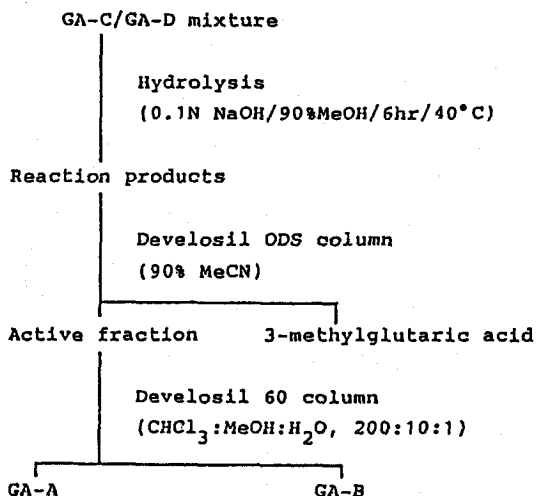
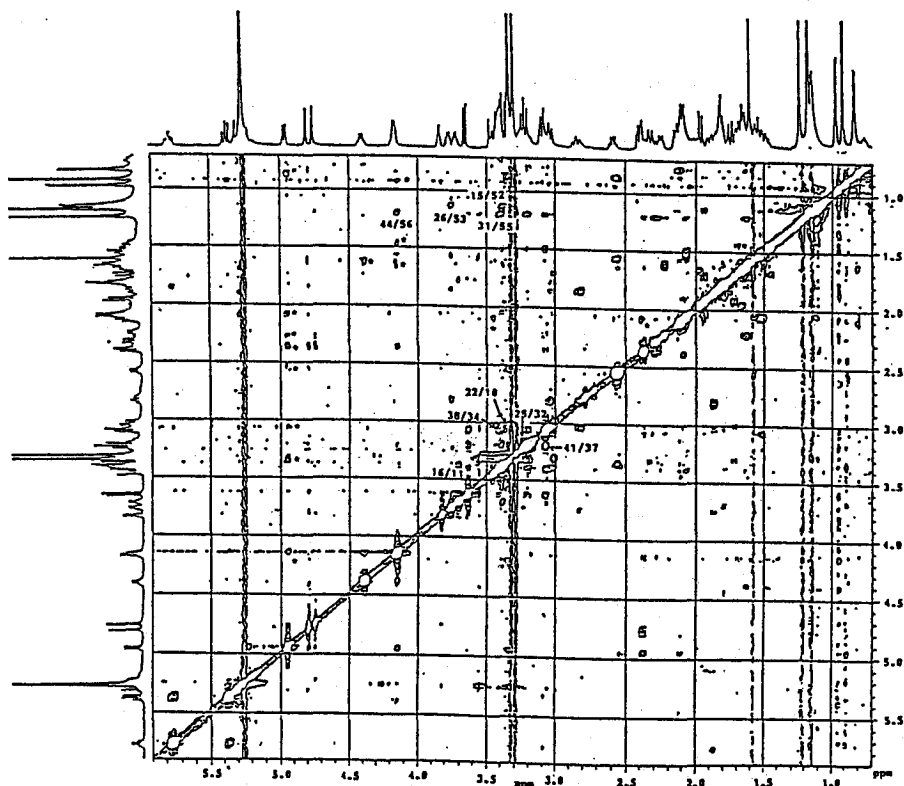
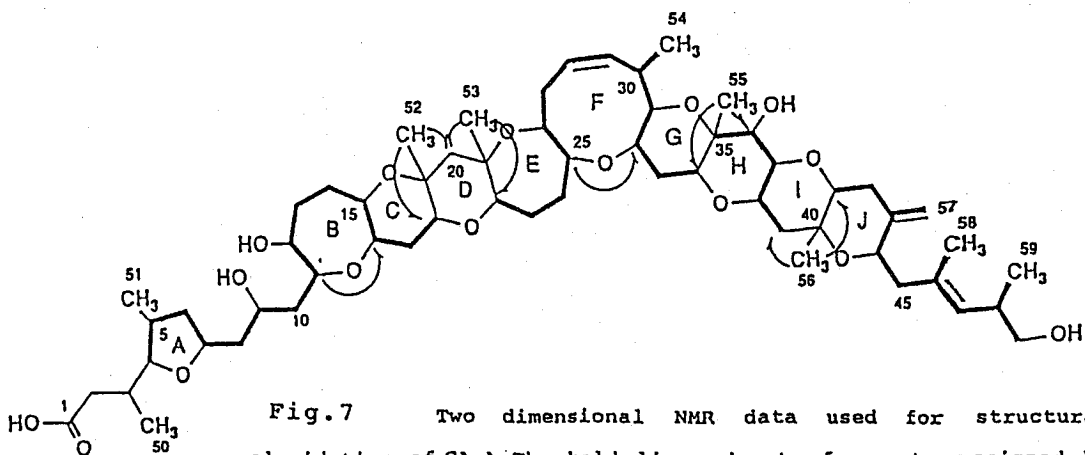


Fig. 6 Hydrolysis and purification of gambieric acids



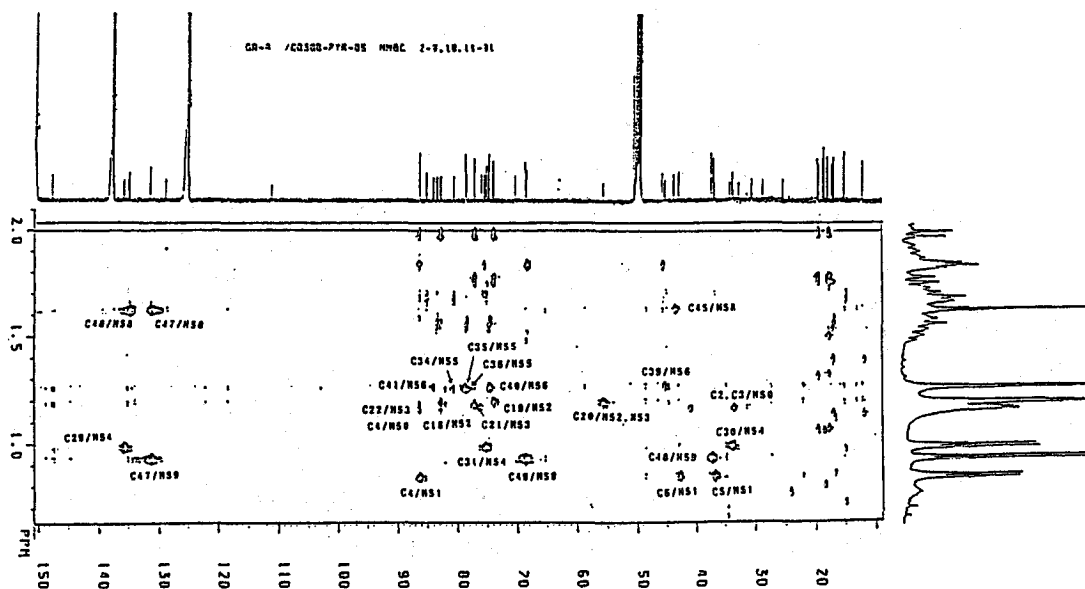


Fig. 8 PARTIAL HMBC SPECTRUM OF GAMBIERIC ACID A (1)
 $(J_{CH} = 8.3\text{Hz}, 500\text{MHz}, C_5D_5N/CD_3OD 1:1)$

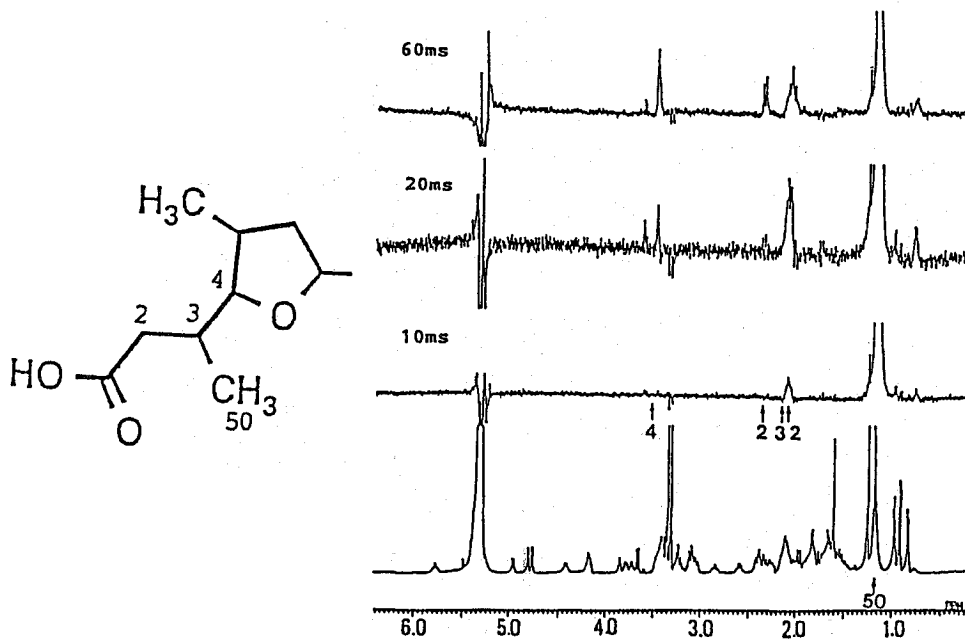


Fig. 9 1D HOBAHA Spectra of Gambieric acid-A
 $(400\text{MHz}, C_5D_5N-CD_3OD 1:1)$

Table 5 ¹³C and ¹H NMR Assignments of Gambieric Acid A (1) and Gambieric Acid B (2)

position	gambieric acid A (multiplicity)		gambieric acid B	
	¹³ C ^a	¹ H ^b	¹³ C	¹ H
1				
2	40.8, t	2.35, 2.04	40.8	2.36, 2.08
3	33.6, d	2.08	33.5	2.10
4	86.4, d	3.48 (3, 9)	86.5	3.49
5	36.9, d	2.14 (m)	36.9	2.18
6	42.8, t	1.67 (2 H)	42.9	1.65 (2 H)
7	75.2, d	4.40 (m)	75.0	4.46
8	45.7, t	1.71, 1.50 (4, 11, 12)	45.6	1.74, 1.45
9	68.5, d	4.10 (m)	68.9	4.22
10	45.1, t	1.82 (2 H)	41.1	1.91, 1.88
11	86.5, d	3.73 (5, 6, 6)	86.3	3.60
12	75.6, d	3.84 (4, 4, 5)	75.0	
13	30.6, t	1.87, 1.80	41.5	1.93, 1.75
14	28.7, t	2.01, 1.68	29.7	1.93, 1.75
15	76.0, d	3.43	77.1	3.42
16	83.5, d	3.41	86.4	3.30
17	34.2, t	2.10, 1.53	34.0	2.21, 1.60
18	82.9, d	3.03 (5, 12)	83.4	3.10
19	74.1, s		74.5	
20	55.8, t	1.97 (12), 1.76 (12)	55.8	1.99, 1.78
21	77.2, s		77.3	
22	86.4, d	3.34 (4, 11)	86.6	3.39
23	25.4, t	1.84, 1.63	25.4	1.86, 1.63
24	32.7, t	2.08, 1.69	32.6	2.13, 1.65
25	86.4, d	3.26	86.4	3.30
26	78.8, d	3.78 (5, 5, 9)	78.8 ^c	3.79
27	33.8, t	2.85 (5, 11, 12), 1.91 (5, 5, 12)	33.8 ^c	2.84, 1.91
28	129.0, d	5.78 (5, 11, 11)	128.9	5.77
29	135.9, d	5.39 (11, 11)	135.9	5.35
30	33.7, d	3.08 (m)	33.7 ^c	3.07
31	75.5, d	3.43 (7, 12)	75.6	3.43
32	85.3, d	3.22 (6, 12, 12)	85.3	3.22
33	34.4, t	2.27 (5, 5, 11), 1.66 (11, 12, 12)	34.4	2.32, 1.68
34	80.8, d	3.11 (5, 12)	80.8	3.12
35	78.8, s		78.8	
36	78.9, d	3.66 (10)	78.9 ^c	3.65
37	85.3, d	3.23 (10, 10)	85.3	3.22
38	78.6, d	3.43	78.6 ^c	3.45
39	45.3, t	2.11, 1.57	45.4	2.12, 1.55
40	74.8, s		74.8	
41	84.2, d	3.11 (5, 12)	84.2	3.10
42	36.7, t	2.42 (5, 13), 2.32 (12, 13)	36.8	2.41, 2.32
43	147.7, s		147.7	
44	70.4, d	4.18 (7, 9)	70.6	4.18
45	43.7, t	2.40 (7, 14), 2.13 (9, 14)	43.4	2.40, 2.13
46	135.0, s		135.0	
47	131.5, d	4.95 (9)	131.5	4.97
48	37.3, d	2.58 (m)	37.3	2.59
49	68.7, t	3.37, 3.34	68.7	ca. 3.36 (2 H)
50	19.4, q	1.14 (8)	19.5	1.21
51	15.1, q	0.83 (7)	15.1	0.85
52	17.8, q	1.18 (s)	17.9	1.20
53	19.6, q	1.17 (s)	19.7	1.19
54	16.8, q	0.97 (7)	16.8	0.97
55	12.0, q	1.25 (s)	12.0	1.25
56	17.1, q	1.26 (s)	17.1	1.27
57	111.3, t	4.83 (br s), 4.76 (br s)	111.3	4.82, 4.76
58	17.9, q	1.62 (s)	17.9	1.62
59	18.5, q	0.92 (7)	18.6	0.93
			Me on C12 25.8	1.14

^a¹³CD₃OD as 49.8 ppm (C₂D₅N-CD₃OD (1:1), 100 MHz). ^bCD₂HOD as 3.31 ppm (C₂D₅N-CD₃OD (1:1), 400 MHz). ^cDenotes each assignment is interchangeable.

Table 6 Antimicrobial activity of gambieric acids

Microorganisms	Dose($\mu\text{g}/\text{disk}$)		
	GA-A	GA-B	GA-C/GA-D mixture
<u>Aspergillus niger</u>	0.01	0.02	0.01
<u>Aspergillus oryzae</u>	1	1	N.T.
<u>Penicillium funiculosum</u>	1	>1	0.01
<u>Bacillus subtilis</u>	>1	>1	>1
<u>Bacillus megaterium</u>	>1	>1	N.T.
<u>Escherichia coli</u>	>1	>1	>1
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	>1	>1	N.T.
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	>1	>1	N.T.
<u>Hansenula anomala</u>	>1	>1	N.T.
<u>Rhodotorula rubula</u>	>1	>1	N.T.
<u>Candida rugosa</u>	N.T.	N.T.	>1

Activity was determined by paper disk method.
N.T.; not tested.

Table 7 Antimicrobial activity (MIC value) of GA-A and GA-B in comparison with that of amphotericin B (AMPH)

Microorganism	MIC values($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	GA-A	GA-B	AMPH
<u>Aspergillus fumigatus</u> No.184	0.39	0.78	3.13
<u>Aspergillus niger</u> IFM 40606	0.20	0.20	3.13
<u>Aspergillus oryzae</u> IFM 40607	3.13	6.25	6.25
<u>Epidermophyton floccosum</u> IFM 40770	3.13	1.56	3.13
<u>Paecilomyces variotii</u> IFM 30539	0.78	0.78	3.13
<u>Penicillium chrysogenum</u> Q176	1.56	1.56	6.25
<u>Penicillium citrinum</u> IAM 7003	3.13	3.13	>12.5
<u>Trichophyton mentagrophytes</u> IFM 45110	0.78	0.78	1.56

MIC (minimum inhibitory concentration) was determined by broth microdilution method using buffered yeast nitrogen base medium with 1% glucose.

Table 8 Antimicrobial activity (sub-MIC value) of GA-A and GA-B in comparison with that of amphotericin B (AMPH)

Microorganism	sub-MIC values($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	GA-A	GA-B	AMPH
<u>Aspergillus fumigatus</u> No.184	0.02	0.02	3.13
<u>Aspergillus niger</u> IFM 40606	0.02	0.02	3.13
<u>Aspergillus oryzae</u> IFM 40607	<0.01	0.02	6.25
<u>Epidermophyton floccosum</u> IFM 40770	<0.01	<0.01	3.13
<u>Paecilomyces variotii</u> IFM 30539	0.02	0.05	3.13
<u>Penicillium chrysogenum</u> Q176	0.05	0.09	6.25
<u>Penicillium citrinum</u> IAM 7003	<0.01	<0.01	>12.5
<u>Trichophyton mentagrophytes</u> IFM 45110	<0.01	<0.01	1.56

Antimicrobial activity was determined by broth microdilution method using buffered yeast nitrogen base medium with 1% glucose.

Table 9 Potentiation of antifungal activity of GA-A and GA-B against Aspergillus niger IFM 40406

Compound	GA-A	GA-B
CaCl ₂	-*	-
FeCl ₂ /4H ₂ O	±	±
FeSO ₄ /7H ₂ O	±	±
Fe ₂ (SO ₄) ₃ /nH ₂ O	+	+
FeCl ₃	+	+
KCl	-	-
MgCl ₂ /6H ₂ O	-	-
NaCl	-	-
ZnCl ₂	-	-

* Potentiation was determined by paper disk method.
 +; positively potentiated, ±; slightly potentiated,
 -; not effected.

Table 10 Cytotoxicity of gambieric acids

	GA-A(ng/ml) ¹⁾	GA-B(ng/ml) ¹⁾	GA-C/GA-D mixture(ng/ml) ²⁾
³ H-thymidine	490	370	1100
³ H-uridine	480	430	1900
¹⁴ C-leucine	120	70	4700

IC₅₀ values of incorporate inhibition against
 1) mouse leukemia P388 cells, 2) mouse lymphoma
 L5178Y cells were measured.

審査結果の要旨

本論文は、海産微細藻類が広く抗菌物質や細胞毒性物質等の活性物質を生産することを明らかにし、とりわけ強い抗真菌活性を示した渦鞭毛藻 Gambierdiscus toxicus から活性本体を単離し、その特異な化学構造と前例のない強力な生物活性を解明したものである。

第一に、渦鞭毛藻由来の多数ポリエーテル化合物について抗菌活性を測定し、その半数に抗真菌活性を検出した。スクリーニング法としては、クロカビを検定菌とし、ペーパーディスク法によって生育阻止活性を測定する方法が簡便かつ有用であることを示した。

第二に、多数の微細藻類の培養に成功して抗真菌活性、細胞毒性をスクリーニングし、渦鞭毛藻が高率（60%以上）で活性物質を生産しており、多彩な生理活性物質の宝庫であることを示した。

第三に、渦鞭毛藻 G. toxicus から抗真菌物質として gambieric acid-A, B, C, D の4成分を単離し、NMRを中心とした最新の分光学的手法を用いて構造を決定した。まず、主成分の gambieric acid-A ($C_{58}H_{92}O_{18}$) は、9個のエーテル環（7/6/6/7/9/6/6/6/6）がトランス結合で梯子状に連結した部分と、孤立5員エーテル環を含む新奇ポリエーテルカルボン酸であることを明らかにした。ついで各種スペクトルの比較により他の3成分の構造も決定した。これら化合物は培養後期に藻体外へ分泌された。

第四に、gambieric acidsの各種病原性真菌に対する強力な生育阻害活性を明らかにした。特にクロカビに対する生育阻害活性（ペーパーディスク法）は、抗真菌薬のアンホテリシンBの2,000倍という前例のない強力なものであった。動物細胞やマウスに対する急性毒性は弱く、抗真菌薬としての可能性が示唆された。また、抗真菌活性が三価の鉄イオンによって増強されることを見だし、新奇かつ特異な活性発現機構の存在を示唆した。

以上のように本論文は海産微細藻類、特に渦鞭毛藻が放線菌にも比肩しうる生理活性ポリエーテルの供給源であることを示した。また、分子量が1,000を超える複雑な化合物を、最新の分光学的手法を駆使して、僅か数ミリグラムの試料で構造決定したことは、天然物有機化学の面でも高く評価される。さらに、gambieric acidsが既存の抗真菌薬をはるかに上回る強力な活性と、特異な作用機構を有することを示し、抗真菌薬に新知見を加えた。よって審査員一同は著者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。