

論文内容の要旨

論文題目 : Biosynthetic Studies on Yessotoxin, a Marine Ladder-Frame Polyether
(海産梯子状ポリエーテル yessotoxin の生合成研究)

山崎 正稔

1. 序論

海洋に生息する植物プランクトンは海洋のバイオマスや有機化合物の主要な生産者である。これらのうち、特に渦鞭毛藻は複雑な構造を有し強力な毒性や生物活性を示す二次代謝物を生産していることが知られている。これらの化合物研究では、単離構造解析や合成研究に比べて、生理活性物質の作用機序や生合成研究ははるかに遅れている。これまでに生合成研究が報告された化合物を構造的な特徴から分類すると、分子内に複数のエーテル環を有するポリエーテルカルボン酸、マクロライド、直鎖状ポリエンポリール、そしてエーテル環が縮環した梯子状ポリエーテルに分けられ、これら二次代謝物の炭素骨格は酢酸ユニット (m-c; m: 酢酸のメチル炭素, c: 酢酸のカルボニル炭素) の繰り返しから形成されるポリケチド経路で生合成されている。しかしながら、分岐メチル基やエキソメチレン部分では酢酸のメチル炭素同士が結合した m-m 結合が観測され、放線菌などが生産するポリケチド化合物と生合成パターンが異なることが明らかとされている。さらに梯子状ポリエーテル brevetoxin の生合成はさらに複雑で、酢酸ユニットの繰り返しがほとんど見られず、多くの m-m 結合が観測された。このことより、渦鞭毛藻が生産する海産梯子状ポリエーテルの生合成は放線菌などに由来する従来のポリエーテルの生合成とは大きく異なることが示唆された。

近年、放線菌が生産するポリエーテルの生合成研究は遺伝子解析により急速に進歩しているが、渦鞭毛藻のポリケチド遺伝子はまだ同定されていない。そこで、 ^{13}C または ^{18}O 標識前駆体を取り込ませて渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum* が生産する梯子状ポリエーテル yessotoxin (YTX, 図 1) の炭素と酸素の起源を明らかとし、梯子状構造の形成機構を推定することとした。YTX は 2 つの *trans* 縮環した連続の六員環構造 (A-D 環と H-K 環) を有している。この連続した六員環は多くの梯子状ポリエーテルに見ら

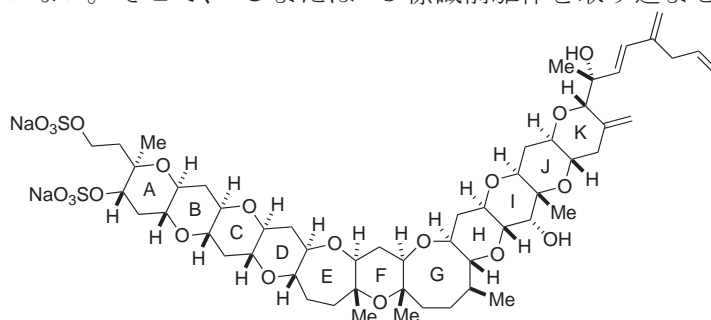


図 1 Yessotoxin (YTX)

れるため、この構造の標識パターンを明らかにすることで、海産梯子状ポリエーテルの生合成機構における基本則を導き出せると考えた。

2. 炭素の起源

YTX の炭素の起源を明らかにするために、渦鞭毛藻 *P. reticulatum* の培養開始時に $[1-^{13}\text{C}]$ 、 $[2-^{13}\text{C}]$ 、 $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 酢酸、 $[1-^{13}\text{C}]$ グリコール酸、または $[\text{methyl-}^{13}\text{C}]$ メチオニンを各々添加して 40 日間培養した。藻体をメタノールで抽出し、二層分配とカラムクロマトグラフィーを用いて標識 YTX を精製した。

^{13}C NMR 測定より非標識 YTX とピーク高を比較した。 $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸では 55 個の全炭素のうち 37 個が標識され、それらは 6 個の分岐メチル炭素のうち 5 個とほとんどのオキシメチン炭素であった (図 2a)。また $[1-^{13}\text{C}]$ 酢酸ではエーテル環のメチレン炭素を中心に 15 個が標識された (図 2b)。 $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ 酢酸標識実験より YTX 中には 15 個の酢酸ユニットが見られ、さらに炭素鎖の伸長は 1、2 位から始まることが分かった。酢酸で標識されなかった 1、2 位および 50 位はそれぞれグリコール酸とメチオニンで標識された。これらの結果から YTX 中のすべての炭素の由来を明らかにすることができた。

YTX の標識パターン (図 3) より、YTX の 2 つ連続した六員環構造 (A-D 環と H-K 環) は単純な酢酸の繰り返しからではなく、酢酸の Claisen 縮合 (m-c-m-c) の脱炭酸によって生じた C3 (m-m-c) ユニットから形成されていた。さらに七、八員環構造は C3 ユニットで作られる六員環構造に酢酸ユニットを挿入することで環の大きさを調節していることが分かった。またオカダ酸や amphidinol 類では m-m 結

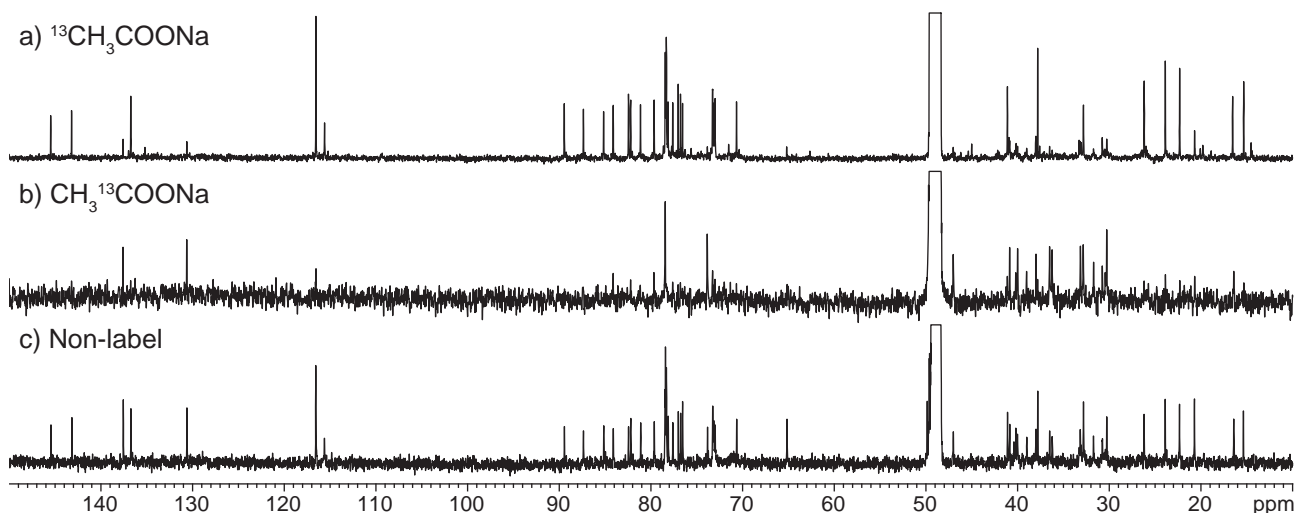


図 2 標識および非標識 YTX の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 100 MHz)

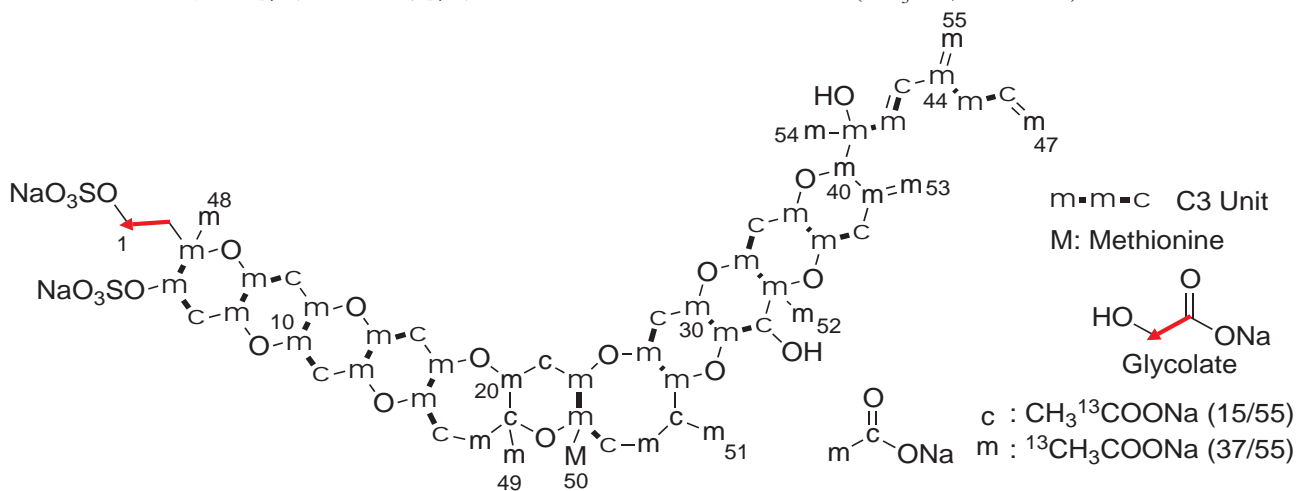
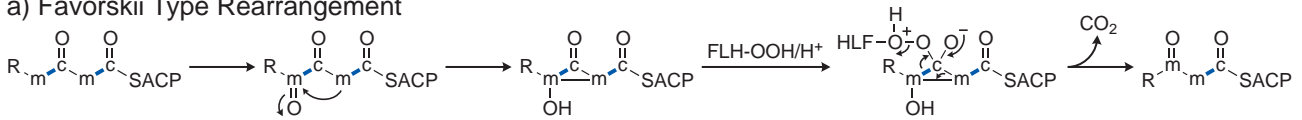


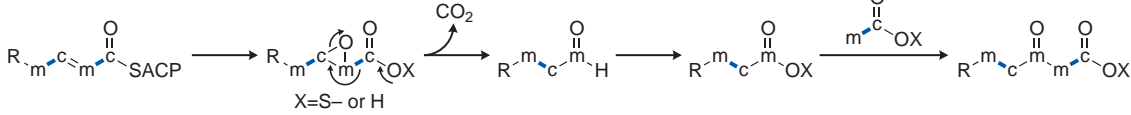
図 3 YTX の標識パターン

スキーム 1 推定される生合成経路

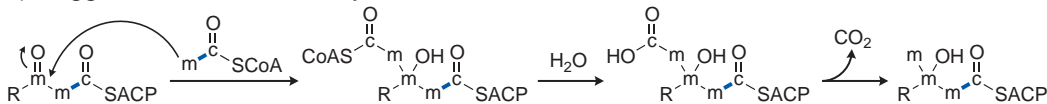
a) Favorskii Type Rearrangement



b) Oxidative Decarboxylation



c) Suggested Branched Methylation



合が主にメチル基やエキソメチレン部分で見られることから、C3 ユニットは梯子状ポリエーテルの基本的な生合成単位であることが明らかとなった。

渦鞭毛藻の二次代謝物に見られる特徴的な m-m 結合の形成機構について、これまでに 2 つの推定経路が提唱されている。1 つは Favorskii 型転移反応 (スキーム 1a) で、シクロプロパノン中間体を形成し、続くフラビン介在ヒドロペルオキシドの攻撃と脱炭酸により m-m 結合が形成される。もう 1 つは酸化的脱炭酸による機構 (スキーム 1b) で、エポキシド中間体の形成に続き脱炭酸によって生じたアルデヒドの酸化、そして次の酢酸ユニットの縮合により m-m 結合が形成すると推定している。

しかしながら、これらの経路では分岐メチル基の形成機構を説明することができない。バクテリア由来のポリエーテルでは分岐メチル基は一般にメチオニンあるいはプロピオン酸に由来している。YTX の標識パターンより分岐メチル基は C50 を除いて酢酸のメチル炭素由来であったことから、別のメチル化の生合成経路があると推定できる。スキーム 1c に推定される分岐メチル形成機構を示した。

すなわち、 β -ケト前駆体とアセチル CoA のアルドール縮合によって β -ヒドロキシメチルグルタル様中間体を生成し、続いて加水分解と脱炭酸を経て β -ヒドロキシメチル体が得られると考えられた。この β -ヒドロキシメチル体は脱水後に YTX の側鎖のエキソメチレン部分も形成できる。同様に、アセチル CoA が C19 と C26 で酢酸のカルボニル炭素と縮合してメチル基を形成している。このように、分岐メチル基とエキソメチレンはこの推定経路によって生合成されている一方で、C50 はこの分岐メチル化では形成できないため、他のポリエーテルにも見られるメチオニン経由で形成していると考えられた。

次に、スキームに示した m-m 結合の形成機構を確認するために $[2-^{13}\text{CD}_3]$ 酢酸標識を行った。重水素の同位体効果を用いて ^{13}C NMR 測定を行ったところ、C3 ユニット (m_1 - m_2 -c) の m_1 には同位体シフトのピークは観測されなかった。これは m_1 炭素が酸化されてケトンを経由して脱炭酸反応が進行したため重水素が軽水素に置換されたと考えられた。さらに、酢酸のメチル由来の分岐メチル炭素では 2 つの重水素が保持された同位体ピークが観測されたため、スキーム 1c の形成機構が起こることが示唆された。

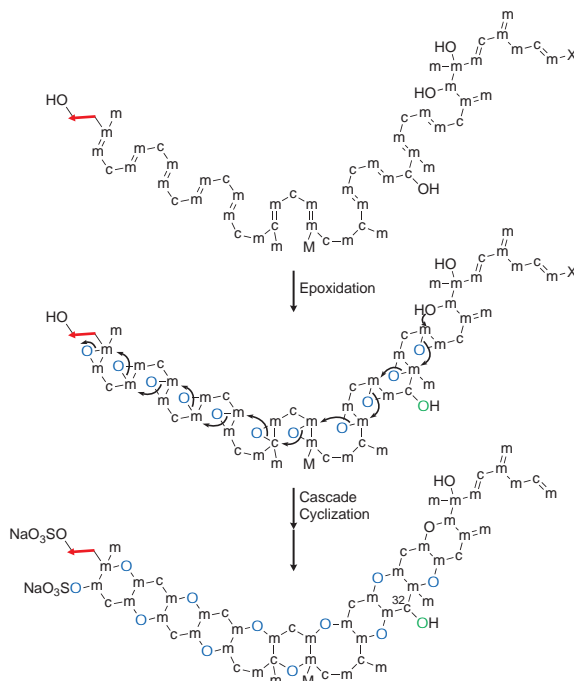
3. 酸素の起源

梯子状ポリエーテルはオレフィン前駆体のポリエポキシ化、カスケード様式の環化によって生合成されると推定されている (スキーム 2)。エポキシ化は分子状酸素から 1 つの酸素原子を使った一原子酸化が起こると考えられる。 ^{13}C 標識パターンから 32 位のヒドロキシ基は酢酸のカルボニルで標識され

ると推定される。そこで、YTX の酸素の起源を明らかにするために、 $^{18}\text{O}_2$ 雰囲気下および $[\text{O}_2]$ 酢酸存在下で *P. reticulatum* を培養して ^{18}O 標識 YTX を単離した。

CID-MS/MS 測定により、モノアイソトピックピークと同位体ピークの開裂パターンの比較を行った。 $^{18}\text{O}_2$ 標識した YTX の脱硫酸ピークの CID-MS/MS プロダクトイオンスペクトル (図 4) では同位体イオン (m/z 1063) の主要なフラグメントピークが 2 マスユニットずれた二重線となって観測されたことと、 ^{13}C 標識パターンにおいてエーテル酸素が酢酸のメチル炭素に結合していたことと併せて、エーテル酸素が分子状酸素由来であることを証明することができた。また、 $[\text{O}_2]$ 酢酸では 32 位前後のフラグメントイオン (m/z 743 と 713) において、 m/z 713 の同位体イオンのピーク高の低下が見られたため、32 位の酸素は酢酸由来であることを明らかにした。

スキーム 2 YTX の推定生成機構



4. 総括

本研究において、梯子状ポリエーテル yessotoxin の全炭素と酸素の起源を明らかにした。これにより海産梯子状ポリエーテルの炭素鎖の伸長が他の海産ポリケチド化合物と異なることを示した。また、32 位のヒドロキシ基は酢酸由来で、炭素鎖の伸長時にケトンが還元されて形成されることが示唆された。そして、エーテル環酸素は分子状酸素由来で、スキーム 2 のような炭素鎖の伸長後に一原子酸化される経路を経て YTX が生合成されていることが裏付けられた。

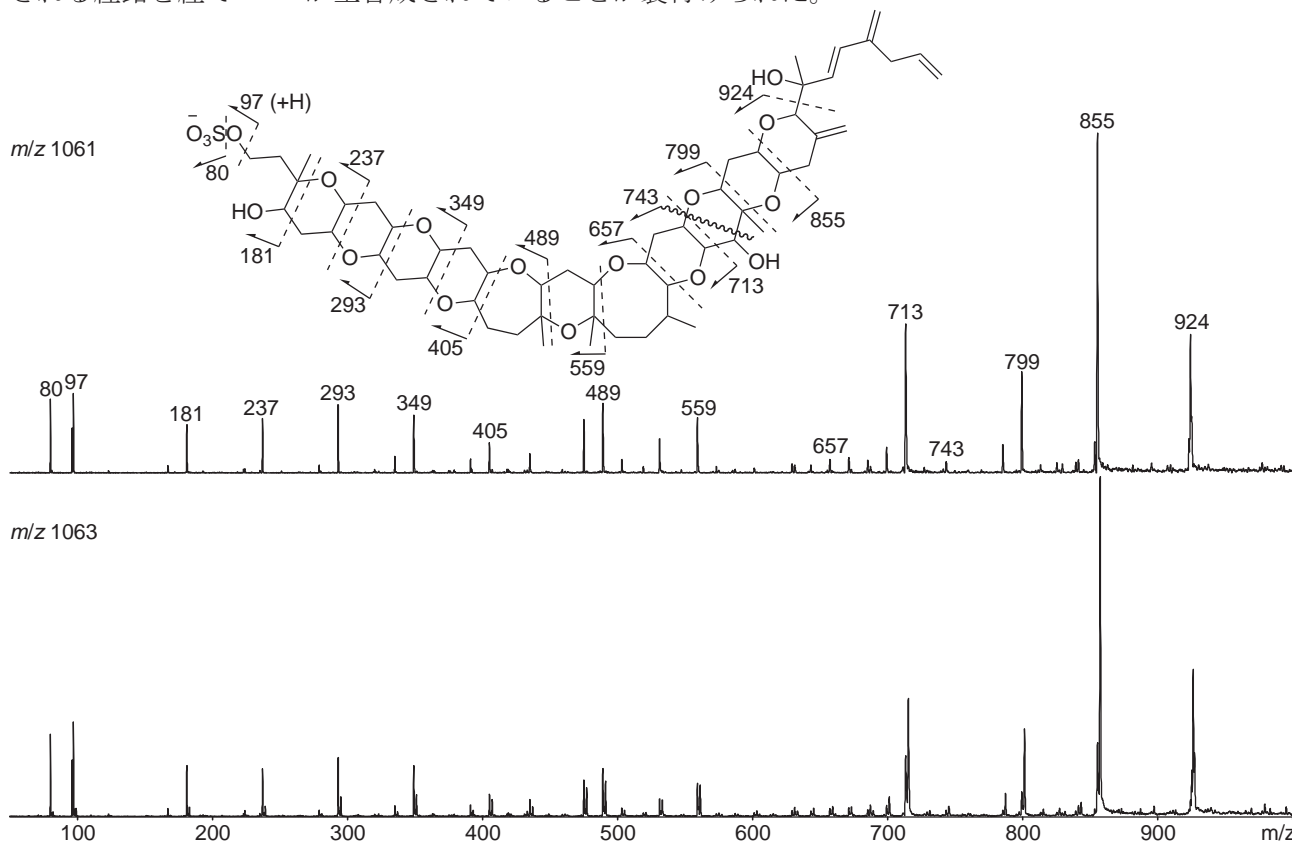


図 4 $^{18}\text{O}_2$ 標識 YTX の脱硫酸ピークの CID-MS/MS プロダクトイオンスペクトル