

住木・梅澤記念賞受賞講演会記録

2008年11月7日, グランドヒル市ヶ谷 3階「瑠璃西の間」

【2008年度受賞講演, 座長: 西村吉雄】

海洋渦鞭毛藻由来の抗腫瘍性マクロリドの探索と利用に関する研究

小林淳一 (北海道大学大学院薬学研究院)

渦鞭毛藻は, 赤潮や毒化した魚介類の有毒成分の真の生産者として知られており, その分類学的位置づけや, 染色体構造・配列の特徴から, 生物学的にユニークな微生物として認識されている。また, 渦鞭毛藻は重要な生物活性天然物資源の一つであり, 世界中で広く研究されている。

我々は, 沖縄産の海洋扁形動物 *Amphiscolops* sp. に共生する渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. が産生する, 興味深い化学構造や生物活性を有するマクロリド化合物およびポリケチド類について研究を進めており, 2003年までに細胞毒性を示す34個のマクロリド化合物, amphidinolide A-H (1-8), J-S (9-18), T1 (19), U-Y (20-24), G2 (25), G3 (26), H2-H5 (27-30), および T2-T5 (31-34) を単離・報告している (図1および2)¹⁻⁶⁾。これらの単離収率および細胞毒性を表1に示してある。

Amphidinolide類は, ユニークな化学構造をもち, 顕著な細胞毒性を示すことから, 全合成研究の魅力的なターゲットとされ, これまでに amphidinolide A (1), J (9), K (10), P (15), R (17), T1 (19), T3-T5 (32-34), V (21), W (22), X (23), および Y (24) の全合成が達成されている。

近年, 我々は沖縄の異なる海域で採取した *Amphidinium* 属の渦鞭毛藻5株 (Y-100, Y-71, Y-25, HYA024, およびHYA002) より, 11種の新規マクロリド amphidinolide B4 (35), B5 (36), C2 (37), amphidinolactone A (38), B (39), iriomoteoride 1a-1c (40-42), 3a (43), amphidinolide B6 (44), B7 (45) (表1) を単離・報告している。

本講演では, これらのマクロリドの単離・構造解析, および amphidinolide H (8) の分子標的, amphidinolide類の生合成に関与すると考えられる polyketide synthase (PKS) のクローニングについて, 最新の研究成果を報告するとともに, 近年他の研究グループにより行われた amphidinolide類の全合成研究についても概説する。

1. 渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. の培養

Provasoli's Erd-Schriber (ES) supplement を加えた海水培地にて, *Amphidinium* 属渦鞭毛藻の大量培養を行い, 上清と藻体を分離後, 藻体をメタノール/トルエンで抽出し, 各種クロマトグラフィーを用いて分離・精製することにより, 新規マクロリド化合物を得ることができた⁷⁻¹⁸⁾。

図1. Amphidinolide A-H (1-8), J-S (9-18), T1 (19), U (20) の構造

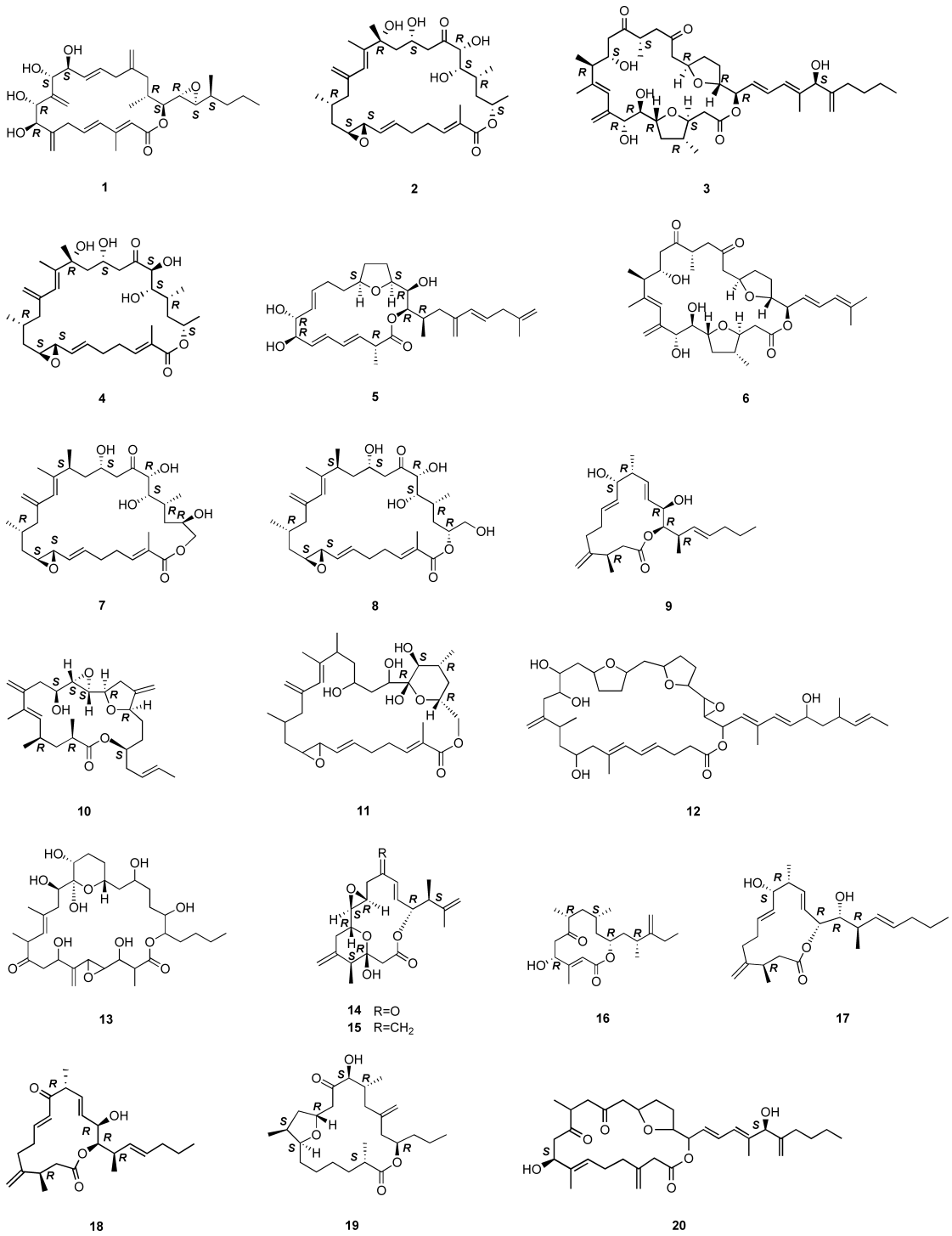


図2. Amphidinolide V-Y (21-24), G2-G3 (25-26), H2-H5 (27-30), T2-T5 (31-34) の構造

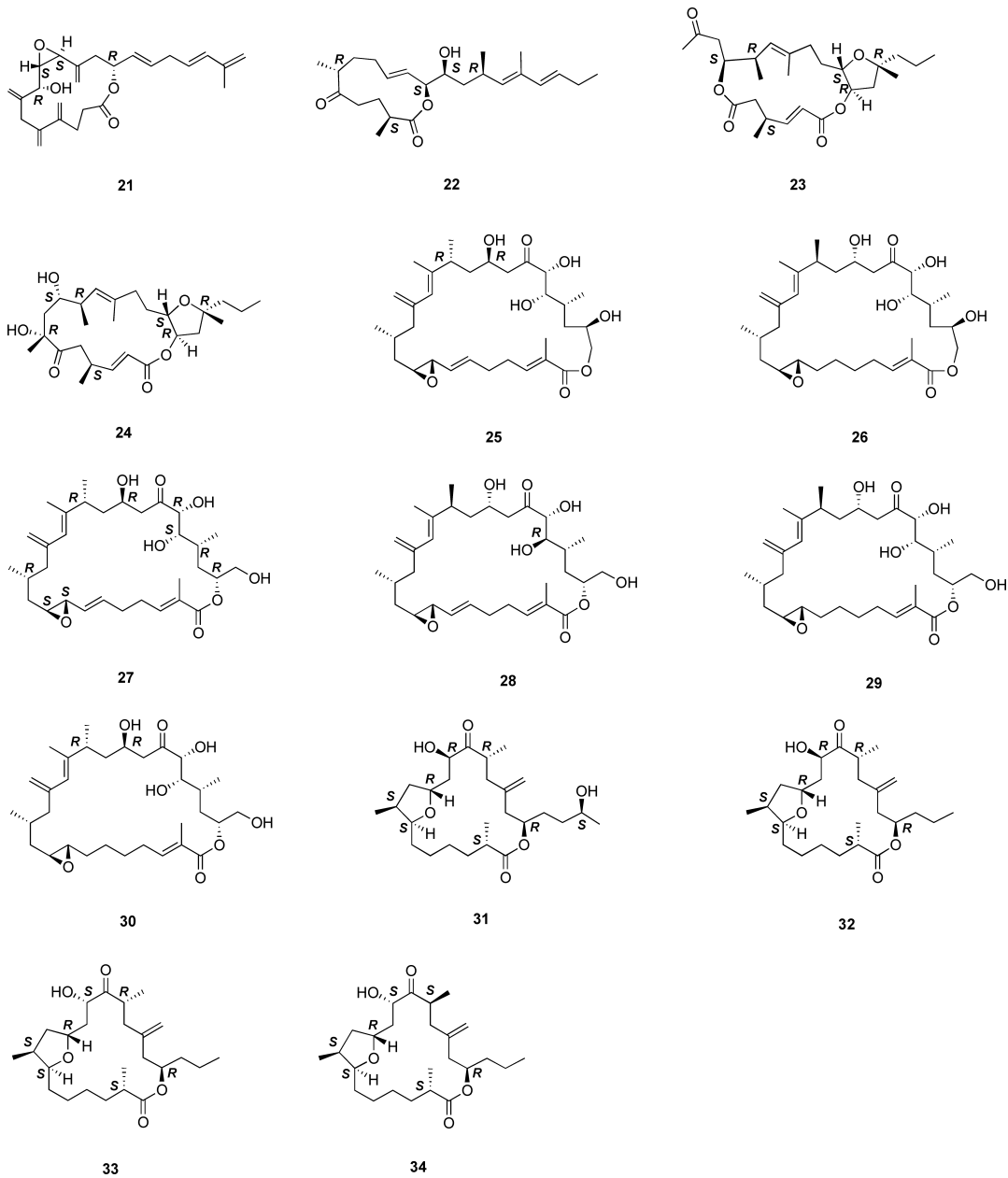


表1. Amphidinolide A-H (1-8), J-S (9-18), T1 (19), U-Y (20-24), B4 (35), B5 (36), B6 (44), B7 (45), C2 (37), Amphidinolactone A (38) および B (39), Iriomoteolide 1a (40), 1b (41), 1c (42), および 3a (43) のラクトン環の大きさ, 単離収率, ならびに細胞毒性

compd.	Lactone ring size	isolation yields (10 ⁻⁴ %)										cytotoxicity	
		strain no. ^a										(IC ₅₀ ^b , μg mL ⁻¹)	
		Y-5	Y-25	Y-26	Y-42	Y-56	Y-71	Y-72	Y-100	HYA002	HYA024	L1210 ^c	KB ^d
1	20	20										2.0	5.7
2	26	10		0.8			17					0.00014	0.0042
35	26							8				0.00012	0.001
36	26							2				0.0014	0.004
44	26									30		^g	^g
45	26									30		^g	^g
3	25	15		0.3			9	12				0.0058	0.0046
37	25						1.5					0.8	3
4	26	4										0.019	0.08
5	19	4										2.0	10
6	25			0.1			6					1.5	3.2
7	27		20		8			46				0.0054	0.0059
8	26		17		7			82		300		0.00048	0.0005
9	15	60										2.7	3.9
10	19	0.3										1.65	2.9
11	27		2									0.092	0.1
12	29	4										1.1	0.44
13	26	9										0.00005	0.00006
14	15	1										1.7	3.6
15	15	2										1.6	5.8
16	12	0.5										6.4	>10
17	15	5										1.4	0.67
18	16	1										4.0	6.5
19	19					50	9.2					18	>20
20	20					2						12	>20
21	14	0.5										3.2	7
22	12				90							3.9	>10
23	16 ^e				4							0.6	7.5
24	17				7							0.8	8.0
38	13											8	>10
39	26	0.1										3.3	5.3
40	20									280 ^f		^g	^g
41	20									20 ^f		^g	^g
42	20									70 ^f		^g	^g
43	15									150 ^f		^g	^g

^a*Amphidinium* sp. ^b50% inhibition concentration. ^cMurine lymphoma cells. ^dHuman epidermoid carcinoma cells.

^eMacrodiolide. ^fDry weight. ^gnot tested.

2. 新規マクロリドの単離・構造解析

2-1. Amphidinolactone A および B

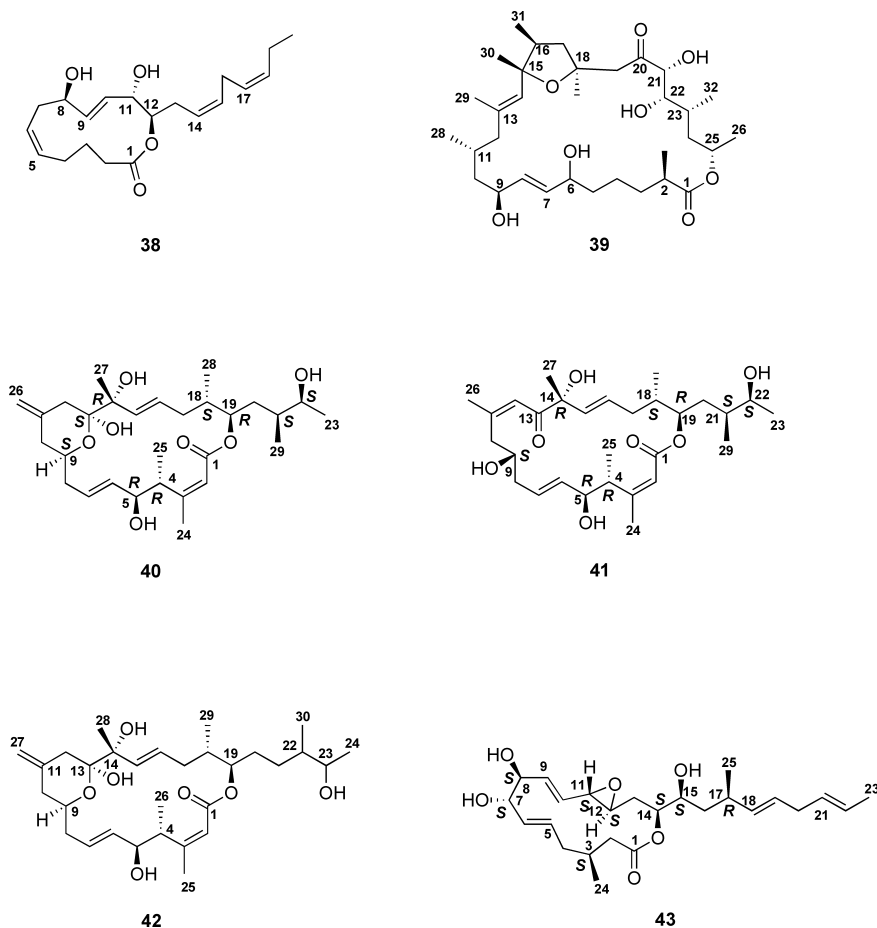
Amphidinium 属の渦鞭毛藻 Y-25 株より, 新規 13員環マクロリド, amphidinolactone A (38), C₂₀H₃₀O₄) を単離した⁷⁾。

¹H-¹H COSY スペクトルの詳細な解析により, C-2 から C-20 までの炭素鎖を帰属した。CH₂-2 および CH-12 のケミカルシフト値より, C-1 と C-12

間のエステル結合の存在が示唆された。5位および9位の二置換オレフィンのジオメトリーを, ¹H-¹H間の結合定数によりそれぞれ Z 体および E 体と帰属した。

NOESY スペクトルにおける相関, ならびに C-16 のケミカルシフト値が, Z 配置の二重結合に挟まれたメチレンの典型的な値を示したことより, C-14 と C-17 の二置換オレフィンをいずれも Z 体

図3. 新規 Amphidinolactone A (38), B (39), Iriomoteolide 1a (40), 1b (41), 1c (42), 3a (43) の構造



と帰属した。

C-8, C-11, およびC-12の相対立体配置については, NOESY スペクトルにおける相関より 38 のように推定した。

同じ *Amphidinium* 属渦鞭毛藻 Y-25 株より, 新規 26 員環マクロリド amphidinolactone B (39, $C_{32}H_{54}O_8$) を得た⁸⁾。2D NMR スペクトルの詳細な検討ならびに重水素誘起シフトより平面構造を帰属し, テトラヒドロフラン環部分の相対立体配置については NOESY スペクトルの解析により, C-2, C-22, C-23, および C-25 の相対立体配置については 1H NMR のカップリング定数ならびに

NOESY 相関に基づいて推定した。C-21 から C-25 部分, C-1 から C-2 部分の相対立体配置, およびマクロラクトン環のコンフォメーションについても推定した。

2-2. Iriomoteolide 1a-1c および 3a

顕著な細胞毒性を示す 20 員環マクロリド iriomoteolide 1a (40 $C_{29}H_{46}O_7$) を, 底生性の *Amphidinium* 属渦鞭毛藻 (HYA024 株) より単離した⁹⁾。

40 の平面構造は主に 2D NMR の解析により, 相対立体配置は 1H - 1H および ^{13}C - 1H カップリング定数の詳細な解析, ならびに ROESY 相関に基づ

図4. Roushらによる amphidinolide E (5) の逆合成解析

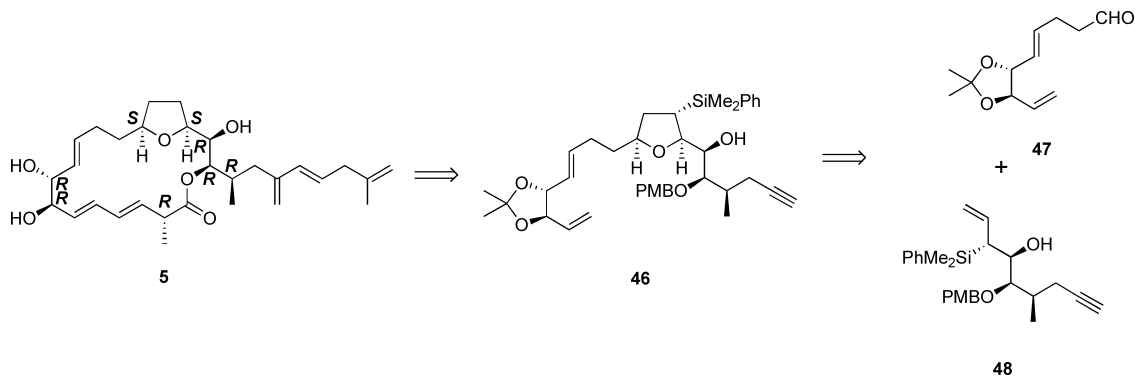
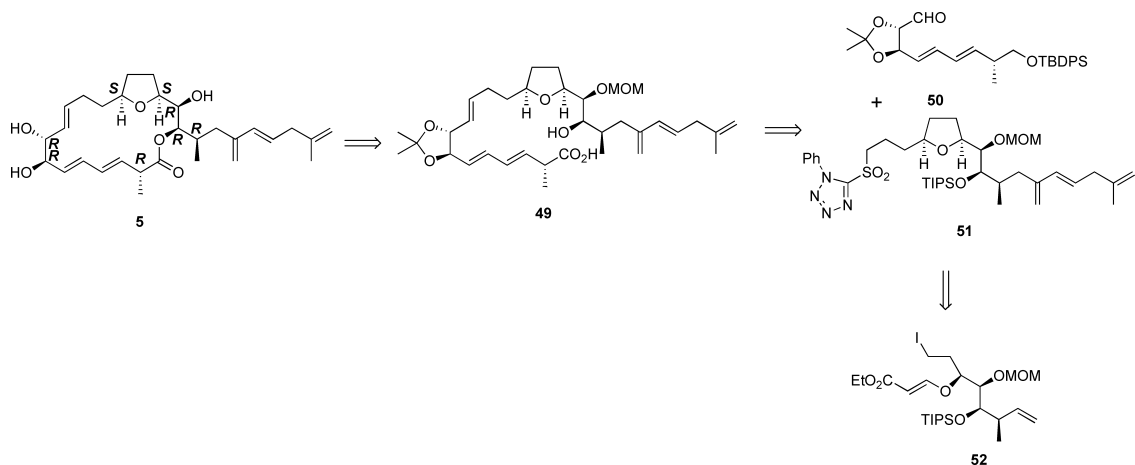


図5. LEEらによる amphidinolide E (5) の逆合成解析



いて推定した。**40**の絶対立体化学については、改良モッシャー法を用いて帰属した。

同じHYA024株からは、20員環マクロリド iriomoteolide 1b (**41**, $C_{29}H_{46}O_7$)および 1c (**42**, $C_{30}H_{48}O_7$)も得られた¹⁰⁾。

42と**40**のROESYおよび 1H - 1H 結合定数の比較を比較したところ、両者のマクロラクトン間部分における相対立体化学は同一であり、**42**は**40**の4-hydroxy-3-methylpentyl側鎖の立体異性体と帰属した。

Iriomoteolide 1b (**41**)は、**40**のアーティファクトであると推定されたが、 $CHCl_3$ またはMeOH中では**41**と**40**との間に変換は観測されなかった。

Iriomoteolide 3a (**43**, $C_{25}H_{38}O_6$)は、*Amphidinium*属渦鞭毛藻HYA024株より得られた細胞毒性を示す15員環マクロリドである¹⁹⁾。2D NMRの解析により**43**の平面構造を、JBCA法ならびにNOESY相関の解析により相対立体配置を帰属した。さらに、改良モッシャー法を適応し、**43**の絶対立体配置を帰属した。

3. Amphidinolide類の全合成研究

3-1. Amphidinolide E

Amphidinolide E (**5**)は、分子中にテトラヒドロフラン環、4個の C_1 分岐鎖、および3個の水酸基を含む19員環マクロリドである¹⁶⁾。近年、渦鞭

毛藻の大量培養により得られた**5** (2 mg) を用いた分解反応により、**5**の絶対立体配置を帰属した。

一方、Amphidinolide E (**5**)の全合成は、ROUSHらのグループにより、アルデヒド**47**とアリルシラン**48**の環化付加反応、つづく**46**のオレフィンメタセシスを鍵反応として達成された(図4)²⁰。近年、LEEらは、**52**の β -alchooxy acrylate部分のラジカル環化反応で得られた**51**と、**50**のJuliaカップリングより生成した**49**のマクロラクトン化により、amphidinolide E (**5**)の全合成を達成した(図5)²¹。これら2グループの全合成研究は、我々が提出したamphidinolide E (**5**)の構造ならびに立体化学を支持するものであった²²。

3-2. Amphidinolide H

26員環マクロリド amphidinolide H (**8**)は、1個のエポキシド、6個のC₁分岐鎖、ならびに4個の水酸基をもつことが構造上の特徴である。本化合物は、腫瘍細胞L1210およびKB (IC₅₀: 0.00048 および0.00052 μ g/mL)^{17,18})に対して顕著な細胞毒性を示した。**8**の相対立体配置は、X線結晶構造解析により帰属した。また、**8**より得たC-22-C-26セグメントのtris-(S)-MTPA エステルの¹H NMRを、(2S)-3-hydroxy-2-methylpropionateより導いたC-22-C-26セグメントのtris-(S)-MTPA体ならびにtris-(R)-MTPA体と比較することにより、**8**の絶対立体配置を帰属した¹⁸。

最近、FÜRSTNERらのグループにより amphidinolide H (**8**)の全合成が達成され、提出構造が正しいことが確認された²³。

4. Amphidinolide BとHの作用機序

アクトミオシンはアクチンとミオシンの再構成により形成されるが、amphidinolide B (**2**)によりそのATPase活性は、トロポニン-トロポミオシン複合体の存在下で濃度依存的に増強されたが、ミオシンのCa²⁺-, K⁺-EDTA-ATPaseまたはMg²⁺-

ATPaseは**2**の影響を受けなかった。

これらの結果より、amphidinolide B (**2**)は、直接アクチンとミオシンに作用し、トロポニン-トロポミオシンを介した収縮機構のCa²⁺感受性を増加させることで、アクトミオシンのATPase活性を増加させ、筋フィラメントの収縮反応を増強させていることが示唆された²⁴。

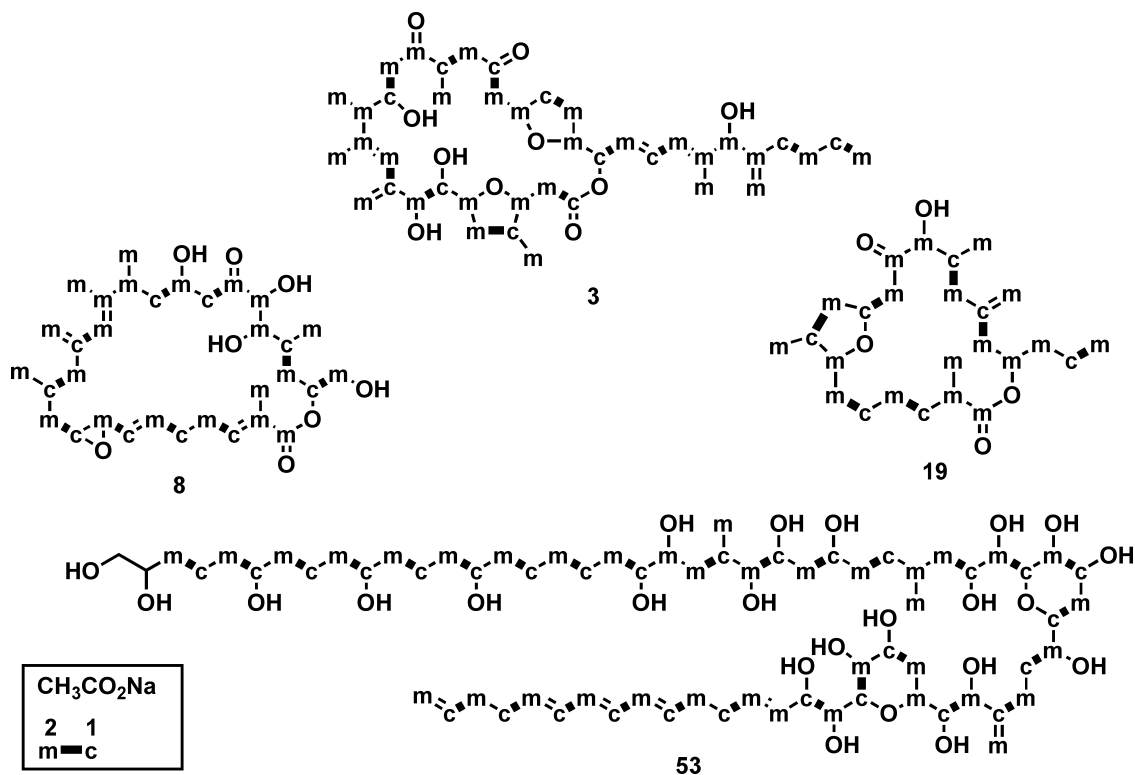
Amphidinolide H (**8**)を作用させた細胞の表現形の解析により、**8**は細胞内アクチンの形成を阻害することが明らかになった。さらに、amphidinolide H (**8**)はアクチンの重合を促進させ、F-アクチンを安定化させることが判明し、その結合部位はアクチンサブドメイン4のTyr200であることが明らかになった。また、amphidinolide H (**8**)は、微小なアクチンの形成を促進し、続いてアクチン繊維の収縮を介したF-アクチンの凝集を引き起こすことを明らかにした。これらの結果より、amphidinolide H (**8**)はアクチンと共有結合する新しいタイプのF-アクチン安定化物質であることが分かった²⁵。さらに、amphidinolide H (**8**)は、F-アクチンとphalloidinの感受性を増強することも示された²⁶。

5. Amphidinolide類の生合成研究

図6⁶)にamphidinolide生産株に対する¹³C標識酢酸の取り込み実験により得られた、amphidinolide C (**3**), H (**8**), T1 (**19**), および他のAmphidinium属の渦鞭毛藻より単離されているamphidinol 4²⁷) (**53**)の¹³C標識パターンを示した。

これらの取り込み実験の結果より、これらマクロリドの主鎖は、通常のポリケチド生合成経路だけではなく、酢酸ユニット(c-m)からC-1が欠落した部分(m, m-m, m-m-mなど)を含むユニークな生合成に基づいて生成していることが判明した。さらに、全てのC₁分岐鎖は酢酸のC-2からなり、酢酸のC-1もしくはC-2に結合していることが明らかになった。これらの特異な酢酸の取り込

図6. Amphidinolide C (3), H (8), T1 (19), Amphidinol 4 (53) への¹³C 標識酢酸の取り込みパターン



みパターンは、他の渦鞭毛藻由来のポリケチドでも観測されている²⁸⁾。

一方、我々は、*Amphidinium* 属渦鞭毛藻 (Y-42 株) より、amphidinolide 類の生合成に関わる PKS 遺伝子のクローニングを試みた。

既知の type I PKSs の β -ketoacyl synthase ドメインのアミノ酸配列よりデザインした縮重プライマーを用いた PCR により、*Amphidinium* sp. (Y-42 株) のゲノム DNA より 14 個の β -ketoacyl synthase 遺伝子を得た。得られた遺伝子配列を検出するプライマーを作成し、他の株について PCR を行った結果、これらの DNA 配列は amphidinolide 産生株に特有のものと判明した。上記のプライマーを用いた PCR スクリーニングにより、*Amphidinium* sp. (Y-42 株) のゲノムライブラリーから単離したポジティブクローンの推定遺伝子産物は、既知の type I PKSs に含まれる β -ketoacyl syn-

thase, acyl transferase, dehydratase, ketoreductase, acyl carrier protein および thioesterase と同一性を示した²⁹⁾。

6. まとめ

最近の研究により、*Amphidinium* 属より単離されたマクロリドは、有望な医薬リード化合物、ならびに生命科学の基礎研究に有用なバイオプローブとなり得ることが明らかとなってきた。

これまでに単離された amphidinolide 類の中で、amphidinolide H (8) および N (13) は、顕著な細胞毒性ならびに抗腫瘍活性を示し、新しいタイプの抗がん剤のリード化合物として期待されている。

Amphidinolide H (8) の作用機序については数多くの研究がなされている一方、多くの amphidinolide 類の作用機序は未解明である。これらの作用解析を行うためには、これらマクロリドの生産性

の改善を行う必要があり、そのひとつのアプローチとして、*Amphidinium*属渦鞭毛藻由来のポリケチド合成酵素遺伝子の利用があげられるが、渦鞭毛藻の巨大なゲノムDNAから目的の遺伝子群を探し出すことは容易ではない。

Amphidinolide類の生物医学的、薬理学的な応用研究をさらに展開させるため、渦鞭毛藻の細胞生物学的、分子生物学的研究のさらなる発展を期待するものである。

謝辞

本研究は、1980年代初期より三菱化成（現三菱化学）生命科学研究所にて開始され、1989年より現在まで北海道大学大学院薬学研究院にて行われたものであり、ともに研究を行った多くのスタッフ、学生の方々に深く感謝致します。

参考文献

- 1) KOBAYASHI, J. & M. ISHIBASHI: Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.* 93: 1753~1769, 1993
- 2) KOBAYASHI, J. & M. ISHIBASHI: Amphidinolides: Unique macrolides from marine dinoflagellates. *Heterocycles* 44: 543~572, 1997
- 3) KOBAYASHI, J. & M. ISHIBASHI: Miscellaneous Natural Products Including Marine Products, Pheromones, Plant Hormones, and Aspects of Ecology. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 8. *Ed.*, K. MORI, pp. 415~650, Elsevier Science, Oxford, UK, 1999
- 4) KOBAYASHI, J.; M. TSUDA & M. ISHIBASHI: Bioactive products from marine micro- and macro-organisms. *Pure Appl. Chem.* 71: 1123~1126, 1999
- 5) KOBAYASHI, J.; K. SHINBO, T. KUBOTA, *et al.*: Bioactive macrolides and polyketides from marine dinoflagellates. *Pure Appl. Chem.* 75: 337~342, 2003
- 6) KOBAYASHI, J. & M. TSUDA: Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates. *Nat. Prod. Rep.* 21: 77~93, 2004
- 7) TAKAHASHI, Y.; T. KUBOTA & J. KOBAYASHI: Amphidinolactone A, a new 13-membered macrolide from dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Heterocycles* 72: 567~572, 2007
- 8) TAKAHASHI, Y.; T. KUBOTA & J. KOBAYASHI: Amphidinolactone B, a new 26-membered macrolide from dinoflagellate *Amphidinium* sp. *J. Antibiot.* 60: 376~379, 2007
- 9) TSUDA, M.; K. OGUCHI, R. IWAMOTO, *et al.*: Iriomoteolide-1a, a potent cytotoxic 20-membered macrolide from a benthic dinoflagellate *Amphidinium* species. *J. Org. Chem.* 72: 4469~4474, 2007
- 10) TSUDA, M.; K. OGUCHI, R. IWAMOTO, *et al.*: Iriomoteolides-1b and -1c, 20-membered macrolides from a marine dinoflagellate *Amphidinium* species. *J. Nat. Prod.* 70: 1661~1663, 2007
- 11) TSUDA, M.; T. ENDO & J. KOBAYASHI: Amphidinolide T, novel 19-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *J. Org. Chem.* 65: 1349~1352, 2000
- 12) KOBAYASHI, J.; T. KUBOTA, T. ENDO, *et al.*: Amphidinolides T2, T3, and T4, new 19-membered macrolides from the dinoflagellate *Amphidinium* sp. and the biosynthesis of amphidinolide T1. *J. Org. Chem.* 66: 134~142, 2001
- 13) OGUCHI, K.; M. TSUDA, R. IWAMOTO, *et al.*: Amphidinolides B6 and B7, cytotoxic macrolides from a symbiotic dinoflagellate *Amphidinium* species. *J. Nat. Prod.* 70: 1676~1679, 2007
- 14) KOBAYASHI, J.; K. SHIMBO, M. SATO, *et al.*: Amphidinolides H2-H5, G2, and G3, new cytotoxic 26- and 27-membered macrolides from dinoflagellate *Amphidinium* sp. *J. Org. Chem.* 67: 6587~6592, 2002
- 15) TSUDA, M.; Y. KARIYA, R. IWAMOTO, *et al.*: Amphidinolides B4 and B5, potent cytotoxic 26-membered macrolides from dinoflagellate *Amphidinium* species. *Mar. Drugs* 3: 1~8,

- 2005
- 16) KOBAYASHI, J.; M. ISHIBASHI, T. MURAYAMA, *et al.*: Amphidinolide E, a novel antileukemic 19-membered macrolide from the cultured symbiotic dinoflagellate *Amphidinium* sp. *J. Org. Chem.* 55: 3421~3423, 1990
- 17) KOBAYASHI, J.; H. SHIGEMORI, M. ISHIBASHI, *et al.*: Amphidinolides G and H: New potent cytotoxic macrolides from the cultured symbiotic dinoflagellate *Amphidinium* sp. *J. Org. Chem.* 56: 5221~5224, 1991
- 18) KOBAYASHI, J.; K. SHIMBO, M. SATO, *et al.*: Absolute stereochemistry of amphidinolides G and H. *Org. Lett.* 2: 2805~2807, 2000
- 19) OGUCHI, K.; M. TSUDA, R. IWAMOTO, *et al.*: Iriomoteolide-3a, a cytotoxic 15-membered macrolide from a marine dinoflagellate *Amphidinium* species. *J. Org. Chem.* 73: 1567~1570, 2008
- 20) VA, P. & W. R. ROUSH: Total synthesis of amphidinolide E. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 15960~15961, 2006
- 21) KIM, C. H.; H. J. AN, W. K. SHIN, *et al.*: Total synthesis of (-)-amphidinolide E. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 8019~8021, 2006
- 22) KUBOTA, T.; M. TSUDA & J. KOBAYASHI: Absolute stereochemistry of amphidinolide E. *J. Org. Chem.* 67: 1651~1656, 2002
- 23) FÜRSTNER, A.; L. C. BOUCHEZ, J. A. FUNE, *et al.*: Total syntheses of amphidinolide H and G. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 9265~9270, 2007
- 24) MATSUNAGA, K.; K. NAKATANI, M. ISHIBASHI, *et al.*: Amphidinolide B, a powerful activator of actomyosin ATPase enhances skeletal muscle contraction. *Biochim. Biophys. Acta* 1427: 24~32, 1999
- 25) USUI, T.; S. KAZAMI, N. DOHMAE, *et al.*: Amphidinolide H, a potent cytotoxic macrolide, covalently binds on actin subdomain 4 and stabilizes actin filament. *Chem. Biol.* 11: 1269~1277, 2004
- 26) SAITO, S.; J. FENG, A. KIRA, *et al.*: Amphidinolide H, a novel type of actin-stabilizing agent isolated from dinoflagellate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 961~965, 2004
- 27) HOUDAI, T.; S. MATSUOKA, M. MURATA, *et al.*: Acetate labeling patterns of dinoflagellate polyketides, amphidinols 2, 3 and 4. *Tetrahedron* 57: 5551~5555, 2001
- 28) MOORE, B. S.: Biosynthesis of marine natural products: microorganisms and macroalgae. *Nat. Prod. Rep.* 16: 653~674, 1999
- 29) KUBOTA, T.; Y. IINUMA & J. KOBAYASHI: Cloning of polyketide synthase genes from amphidinolide-producing dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1314~1318, 2006