

• 総説
• 解説

有機化学から見た渦鞭毛藻

中村英士

北海道大学理学部科学科 〒060 札幌市北区北10条西8丁目

Nakamura, H. 1995. Organic Chemistry of dinoflagellates. Jpn. J. Phycol. (Sôri) 43 : 22-29.

Dinoflagellates are interesting microorganisms because they produce various types of organic compounds such as sea food toxins with potent biological activities. Marine animals accumulated the compounds from dinoflagellates via food chain mechanisms and/or symbiotic relationship. However biochemical aspects of dinoflagellates are still not well understood. There are two examples of interesting compounds isolated from a symbiotic dinoflagellate and a bioluminescent dinoflagellate.

Key Index Words : dinoflagellate-toxin-symbiotic-bioluminescence-circadian rhythm-methionine cascade

Hideshi Nakamura : Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

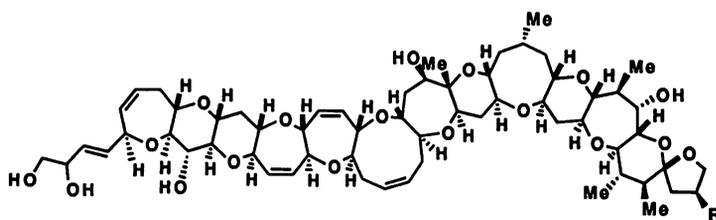
1. なぜ渦鞭毛藻が注目されているのか？

今、日本には世界中からいろいろな海産物が集まり食卓を賑わせ、いつの間にか私たちもそれらを日常的に食するようになった。また、グルメと称して珍奇(?)な食べ物をもて囃されている。このような状況下では、遠い異国で起きた食中毒も、けっして他人事ではなく、実は身近なものである。確かに世界は狭くなった気がする。

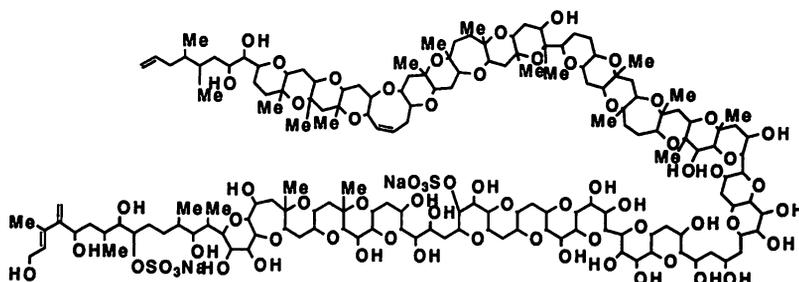
未開拓な部分の残された、この豊かな海洋から、有用な資源を得ようとする試みは、今始まったばかりではない。海洋牧場、海底資源、熱水鉱床、深海微生物などさまざまな試みの中、我々有機化学者にとっても海は魅力的である。治療の難しいガン、エイズなど手強い新たな病気をはじめとする様々な問題に直面し、古くからある伝承を頼りとした生薬、微生物の発酵に基づいた抗生物質などに加えて、新たな医薬資源として海洋生物が着目されてきた。海の生物は食用として、あるいは駆虫薬として利用された紅藻マクリなど医薬品として我々と接触を持ってきたが、その数は全

体からみれば極一部であり、多くの生物は全く接することもなく過ごしてきた。こうした未知の生物との遭遇を求めて、国内外において大小さまざまな研究プロジェクトが生まれ、海綿、ホヤ、サンゴをはじめとする腔腸動物、大型海藻など海洋生物の抽出物が様々な薬理試験にかけられ、有用な薬理試薬あるいは薬剤として有望な化合物が得られてきた (Fig. 1)。一方、魚介類の食中毒の原因物質として極めて強い毒性物質が得られ、その特異な化学構造が、最近続々と明らかにされ注目されている (Fig. 2) (安元 1992, 中村 1993, Shimizu 1993, Yasumoto *et al.* 1993)。

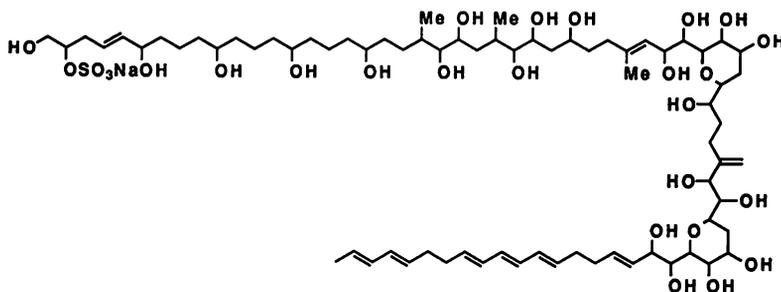
なぜ海産生物活性天然物が注目されるのか。構造が新しく珍しい、生物活性が強い、分子量が大きく構造が複雑であるなど、海産生物活性天然物の特徴は多々上げられるが、それでは、何故そのような化合物を海の生物は必要としているのか。海の生物と陸の生物の差は、陸上生物では個体間を隔てる空間が気体で満たされているのに対し、海の生物では液体で満たされている点にある。従って、陸上生物では情報伝達を、細胞間は水中を、また個体間では空気中をと、2つの異



シガトキシン



マイトトキシン



アンフィジノール

Fig. 2. Toxic compounds from dinoflagellates. 渦鞭毛藻から単離された有毒成分

なるメディアを介して行うことができるのに対し、海の生物は、栄養源の獲得、老廃物の排泄をはじめ、種間あるいは個体間の情報伝達など総て水を媒体とし、さらに閉鎖された環境の中で行わなければならない。従って、イオン強度、浸透圧調節等海の生物固有の問題が生じてくる。そのため、海において生物種間に働く機能物質（水圏アレロケミックス）の多くが、両親媒性で、また高活性であるのかもしれない。

このように海産生物活性物質には多くの謎が伴い、また、海の生物には、変わりものが多い。特に、海洋微小生物は魚介類の毒をはじめとして、多種多様な構造を持つ魅力的な化合物を生産する。中でも、渦鞭毛藻の仲間は、赤潮の形成をはじめ、生物発光、腔腸動物との共生など興味ある生物現象を示し、また原生動物と微小藻との共生形成を経た進化など生物自身極めて変わり種でもある。われわれのところで行っている

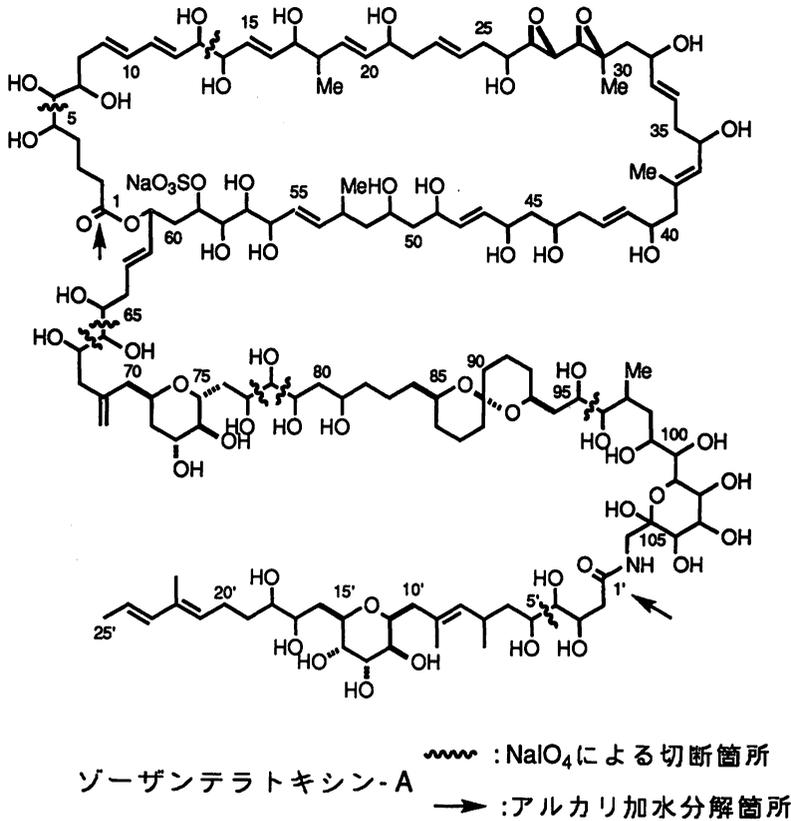


Fig. 3. Vasoconstrictive substance Zoxanthellatoxin. 血管収縮性物質ゾーザンテラトキシン

海産天然物の研究の中から、共生微小藻の生産する血管平滑筋を収縮させる分子量が比較的大きな物質、そして、これとは対照的に、分子量は小さいが、含量が高い含硫黄化合物について紹介したい。

2. 共生藻の生産する血管収縮物質

海産毒の中には、その含量が、季節あるいは地域により変動し、また同じ毒が異なる生物種にまたがって見出されたりする現象が古くから知られ、その原因として、毒の真の生産者がほかに存在する可能性が考えられていた。最近、フグ毒が細菌によって生産されることが、また南方で続発する食中毒、シガテラ原因毒の食物連鎖による移行過程についても解明され、海洋微小生物が一躍注目されるに至った。

アレロケミックス (種間, 個体間生物活性物質)
→ 生物移行, 濃縮 (食物連鎖, 共生, 他) →
海産生物活性物質 (毒, 抗ガン物質, 他)

腔腸動物イワスナギンチャクの毒として単離、構造決定された猛毒パリトキシンは、当時非タンパク性物質の中で最強の毒として、またその構造のユニークさから興味を持たれた (Hirata et al. 1988)。そして、その毒の含量が季節変動する上、個体差もあり、また海藻など他の関連性のない生物からも検出されたことから、細菌、微細藻など真の生産者が他にいるものと推定され、事実細菌が一時的にはあるがパリトキシンを生産したという報告もなされた。我々は、パリトキシンの強烈な薬理活性に着目し、種々の共生微小生物

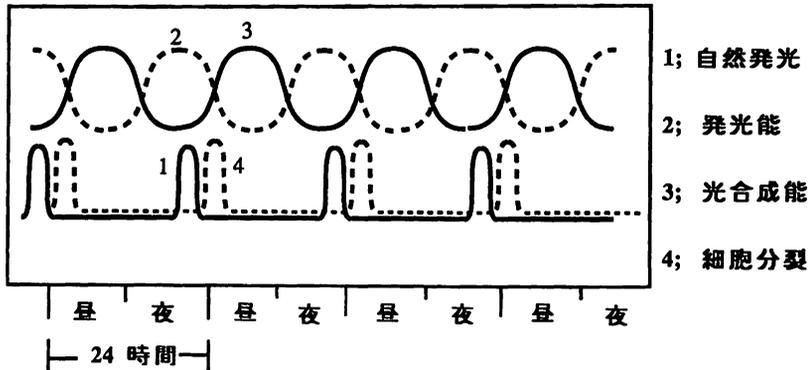


Fig. 4. Circadian rhythmicity in four distinct biological processes of a unicellular alga *Gonyaulax polyedra*.
概日性リズムを示すゴニオラックスの生物現象

の培養抽出物について、パリトキシンに類似した薬理活性を示す物質を検索した。その結果、イワシナギンチャクとは何ら関係のないヒラ虫の一種に共生する渦鞭毛藻が、ウサギの血管平滑筋をパリトキシンに似た作用機序で収縮させることを見出した (Nakamura *et al.* 1993)。この渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. は一般に褐虫藻 *Zooxanthella* と呼ばれ、サンゴなどの腔腸動物をはじめとする海洋無脊椎動物に広く分布する。この共生渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. を大量培養し、血管収縮作用を指標として分離精製を進めた結果、2種の活性成分 *Zooxanthellatoxin-A* (ゾーザンテラトキシナーA, ZT-A) および ZT-B を単離した。これらの化合物は薬理活性のみならずパリトキシンのように水溶性が高く、また分子量も2900あまりと化学的性状も類似していた。収量は、500g (概ね1000Lの培養に相当する) の培養藻体あたり150mg前後と他の渦鞭毛藻由来の物質に比べて良好で、早速 ZT-A の構造決定に取りかかった。

このように複雑で分子量の大きな化合物の構造を決定するのは、最近急速に進歩した超伝導磁石を用いた核磁気共鳴装置 (NMR) など最新の機器分析装置をもってしても容易ではない。この化合物は、酸ならびにアルカリに対して不安定で、また分子が大きいため複雑なスペクトルを与える。まず化学的性質のアウトラインを知るために種々の化学反応を行い。その過程で、ビスエポキシド、硫酸エステル、共役ジエンなどの特徴的な構造単位を含む概ね80%に相当する部分構造を得ることが出来た (Nakamura *et al.* 1993, Asari *et*

al. 1993)。また、窒素原子の存在が元素分析ならびに NMR から示唆され、種々検討した結果、これまでに知られている天然物中最も大きな62員環ラクトン構造を含む全構造を明らかにすることができた (Fig. 3) (Nakamura *et al.* 1995)。この化合物の構造には、窒素原子が含まれていること、環構造が少ないことなど目的としたパリトキシンに類似している点もあるが、2重結合が多いなど、異なる点も多々見受けられる (中村 1993, Shimizu 1993)。いずれにしても、当初の目的を達成出来たわけではないが、海洋生物に広く共生する褐虫藻が特異な生物活性物質を生産していることを初めて明らかにすることが出来た。最近、東北大学安元らによって微細藻からパリトキシン類縁化合物が単離され、パリトキシンの真の生産者が分かるのも近い。

共生微小生物が、種々の生物活性物質を作っているのではないかということが以前より考えられていた。例えば、腔腸動物の一種ヤギ類からは、特異なプロスタグランジン類が分離されているが、ヤギ類に共生する褐虫藻がプロスタグランジンを合成するかどうか、E.J. Corey らによって検討されている。また、イソギンチャクに共生する褐虫藻がイソギンチャクの毒を生産するについても検討された。しかし、こうした試みはいずれも褐虫藻の関与には否定的であった。そもそも、培養条件下においては、共生 (自然) 条件下とは成長速度をはじめ種々な生理的条件が異なっており、直接物質生産能を比較することは困難である。今後さらに詳細に検討する必要がある。

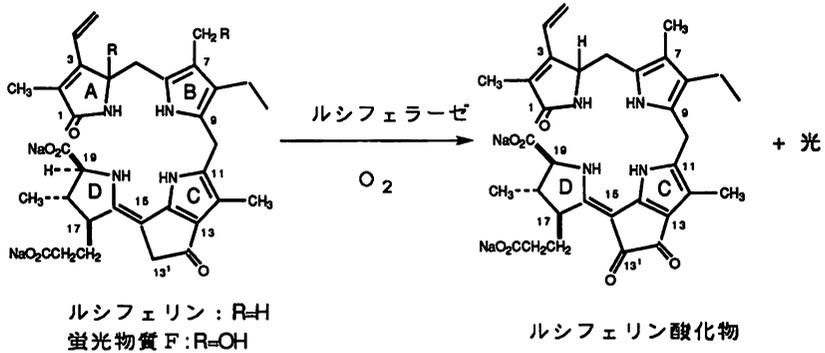


Fig. 5. Dinoflagellate luciferin, luciferin-luciferase reaction and krill fluorescent substance F.
 渦鞭毛藻ルシフェリンとルシフェリンルシフェラーゼ反応ならびにオキアミ蛍光物質F.

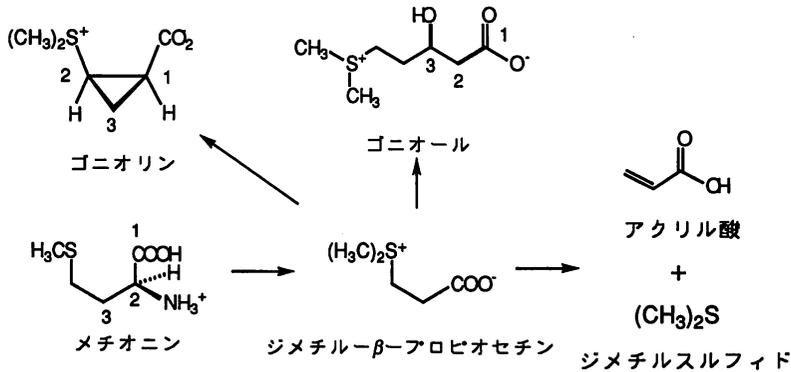


Fig. 6. Metabolism of methionine in *Gonyaulax polyedra* (Methionine cascade) .
 ゴニオラックスにおけるメチオニンの代謝 (メチオニンカスケード).

3. 渦鞭毛藻ゴニオラックスの生物発光と含硫黄化合物の代謝

渦鞭毛藻には、夜光虫など多くの発光種が知られているが、渦鞭毛藻の一種ゴニオラックスの発光系は概日性時計によって制御され、約24時間の周期をもった自然発光を示す。(Fig. 4) この発光反応は典型的なルシフェリンルシフェラーゼ反応を示し、基質ルシフェリンは、酵素ルシフェラーゼと同様その合成系が体内時計によって制御され、夜にのみ合成される。従って、昼間は発光するための成分が極めて僅かしか

存在しないため、光る事が出来ない(中村 1989, 中村 1992)。ルシフェリンの構造は、その関連物質オキアミ蛍光物質、化合物Fとの比較によって決定され、それらの構造から、ルシフェリンはクロロフィルあるいはその関連化合物から生合成されるものと推定されている。オキアミは、渦鞭毛藻と同様化合物Fを利用して発光するが、オキアミはクロロフィルを合成することは出来ないため、ルシフェリンあるいはその前駆体を食物連鎖によって入手し、うまく利用して化合物Fを合成しているものと考えられている (Fig. 5) (Nakamura et al. 1989)。

ルシフェリンの生合成仮説の裏付けと発光のより詳細な反応機構を調べるため、ルシフェリンとオキアミ化合物Fの構造の内、最も重要な部分構造であるD環部の絶対配置について検討した。両化合物に共通するオゾン分解生成物を立体選択的に合成し、光学活性カラムにて絶対配置を決定する微量検定法を確立して、両化合物について調べたところ、両者ともクロロフィルと同じであることが分かり、上に述べた仮説の妥当性が示された (Nakamura *et al.* 1993)。渦鞭毛藻とオキアミの生物発光に関わる物質の構造が類似することから、両者の発光反応の交差反応性が調べられ、確かにある程度の反応性があると報告されている。我々も、再度注意深く渦鞭毛藻のルシフェラーゼならびに化合物Fを精製し、両者の交差反応性を調べたところ、その交差反応性は極めて小さく、水酸基の有無によって両者が厳密に識別されていることが分かった。

ゴニオラックスの発光周期を短縮する内在性物質として単離されたゴニオリンは (Roenneberg *et al.* 1991, Nakamura *et al.* 1992), その藻体含量が極めて高く (10mg / 1g 湿重量), またゴニオラックス自身がこの化合物の能動輸送系を持っていることから、何らかの重要な役割を持っているものと考えられる。まず、ゴニオリンの藻内での動態を調べる目的で、生合成前駆体と考えられるメチオニンのラベル化合物を投与したところ、SMeについては効率良く取り込まれたがC1炭素は一切取り込まれなかった。また、高濃度のメチオニンを投与するとゴニオラックスは新たにゴニオールを藻内に蓄積することが分かった。ゴニオラックスに1, 2位を安定同位体¹³Cにて標識した酢酸を投与すると、ゴニオールのC1-C2に取り込まれることから、ゴニオールのC1-C2ユニットが酢酸に由来することが分かった。このことから、メチオニンは容易に脱炭酸し、磯の香として知られるジメチルスルフィドの前駆体であるジメチル-β-プロピオセチンに変換している可能性が示唆された。事実、C2, C3を¹³Cにて二重標識したメチオニンを合成して投与したところ、予想した通りにC2, C4が¹³CでラベルされたゴニオリンならびにC3, C4が¹³Cでラベルされたゴニオールが得られてきた (Fig. 6) (Nakamura *et al.* 1993)。渦鞭毛藻において、メチオニンからジメチルスルフィドの前駆体であるジメチル-β-プロピオセチンへ変換する過程は既によく知られていたが、ジメチル-β-プロピオセチンからさらに変換される過程については見出されていなかった。こうしたメチオニンを出発点とする一連の硫黄化合物の代謝過程は、渦鞭毛藻全般に存在するよう

で、他の渦鞭毛藻類においてもこれらの含硫黄化合物の存在が認められ、種によって蓄積する化合物が異なっていることが明らかになった。従って、ゴニオラックスにおいては、ゴニオリンは何か特別な意味を持っているらしく、ゴニオリンの前駆体となるメチオニン等が増加すると、過剰分はゴニオールへと変換後代謝され、ゴニオリンの量が厳密に制御されているものと考えられる。

含硫黄化合物は、藻内の浸透圧の調節など細胞の恒常性を保つ上に重要であると考えられている。また、海から空中に放出されるジメチルスルフィド等揮発性硫黄化合物は、酸性雨の原因物質として最近注目されている。培養容器の中から、地球規模のグローバルな理解が望まれている。

渦鞭毛藻は有用な生物活性物質の宝庫であり、また特異なバイオリクターとしても利用することが出来るようになってきた。有機化学者は、物質の新規性を求めることから、ともすれば生物の多様性に重きを置きがちであるが、それらの情報の積み重ねから生物の一様性を理解することが必ず出来るはずであり、そのように目指したい。生物の多様性が見直されるなか、渦鞭毛藻における物質代謝過程を理解することが、我々の海洋生態系への理解を深める上に極めて重要となってきた。

以上の結果は、三菱化成生命科学研究所ではじめた海洋共生微生物の研究から得られたものであり、平田義正名古屋大学名誉教授、大泉康現東北大学薬学部教授、小林淳一現北海道大学薬学部教授、弥益輝文琉球大学教授、岸義人ハーバード大学教授、ウッズホール海洋生物研究所下村脩教授、ヘイスティングスハーバード大学教授、ならびにロエネバークミュンヘン大学準教授、岡崎共同研究機構基礎生物学研究所近藤孝男博士と共同で行いました。また、現在、北海道大学理学部村井章夫教授のもとで多くの学生と進めているものであり、これまでにご協力頂きました多くの共同研究者に心より深謝いたします。また、今回このような機会を頂いた、北海道大学理学部堀口健雄、小亀一弘両博士に御礼申し上げます。

引用文献

- Asari, T., Nakamura, H., Murai, A. and Kan, Y. 1993. Structures of periodate oxidation products with a conjugated diene or an exomethylene from

- zooxanthellatoxin-A. *Tetrahedron Lett.* 34 : 4059-4062
- Hirata, Y., Uemura, D. and Ohizumi, Y. 1988. Chemistry and pharmacology of palytoxin. In *Marine Toxins and Venoms, Handbook of Natural Toxins Vol. 3*; Tu, A. T. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York, pp 241-258.
- 中村英士 1992. 植物プランクトンの発光時計. 化学増刊 121, 安元 健 (編), 化学同人, 京都, pp 97-104, 1992.
- 中村英士 1993. 海洋生物の生物活性物質. 日本農芸化学会誌 67 : 1-6.
- Nakamura, H., Asari, T., Murai, A., Kondo, T., Yoshida, K., and Ohizumi, Y. J. 1993. Structure of periodate oxidation products with characteristic partial structures of zooxanthellatoxin-A, a potent vasoconstrictive polyol from a symbiotic dinoflagellate. *J. Org. Chem.* 58 : 313-314 .
- Nakamura, H., Asari, T., Murai, A., Kan, Y., Kondo, T., Yoshida, K. and Ohizumi, Y. 1995. Zooxanthellatoxin-A, a potent vasoconstrictive 62-membered lactone from a symbiotic dinoflagellate. *J. Am. Chem. Soc.* 117 : 550-551
- Nakamura, H., Asari, T., Ohizumi, Y., Kobayashi, J., Yamasu, T. and Murai, A. 1993. Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp. *Toxicon*, 31 : 371-376.
- Nakamura, H., Fujimaki, K., Sampei, O. and Murai A. 1993. Gonyol : Methionine induced sulfonium accumulation in a dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Tetrahedron Lett.* 52 : 8481-8484.
- Nakamura, H., Kishi, Y., Shimomura, O., Morse, D., and Hastings, J. W. 1989. Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymatic and nonenzymatic air-oxidation products. *J. Am. Chem. Soc.* 111 : 7607-7611.
- 中村英士・近藤孝男 1989. 単細胞藻類の生物時計. 遺伝 43 (12) : 126-129.
- Nakamura, H., Oba, Y., and Murai, A. 1993. Synthesis and absolute structure of the ozonolysis product of krill fluorescent substance F. *Tetrahedron Lett.* 34 : 2779-2782.
- Nakamura, H., Ohtoshi, M., Sampei, O., Akashi, Y. and Murai, A. 1992. Synthesis and absolute configuration of (+) -gonyauline : A modulating substance of bioluminescent circadian rhythm in the unicellular alga *Gonyaulax polyedra*. *Tetrahedron Lett.* 33 : 2821-2822.
- Roenneberg, T., Nakamura, H., Cranmer III, L. D., Ryan, K., Kishi, Y. and Hastings, J. W. 1991. Gonyauline : A novel endogenous substance shortening the period of the circadian clock of a unicellular alga. *Experientia*, 47 : 103-106.
- Shimizu, Y. 1993. Microalgal metabolites. *Chem. Rev.* 93 : 1685-1698.
- 安元 健 (編) 1992. 化学で探る海洋生物の謎, 化学増刊 121, 化学同人
- Yasumoto, T. and Murata, M. 1993. Marine toxins. *Chem. Rev.* 93 : 1897-1909.