

## 二国間交流事業 共同研究報告書

平成 23年 4月 8日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 東京大学 大学院理学系研究科

職・氏名 (ふりがな) 教授・ たちばな かずお 橘 和夫

1. 事業名 相手国 (ニュージーランド) との共同研究 振興会対応機関 (FRST )
2. 研究課題名 ニュージーランドで大規模な被害が発生した赤潮毒の性状解明

3. 全採用期間

平成21年4月1日 ~ 平成23年3月31日 ( 2年  ヶ月)

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 5,000 千円

初年度経費2,500千円、 2年度経費2,500千円、 3年度経費  千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額   0千円

## 5. 研究組織

### (1) 日本側参加者

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
たちばな かずお 橘 和夫	東京大学大学院理学系研究科・教授	研究統括
さたけ まさゆき 佐竹 真幸	東京大学大学院理学系研究科・准教授	有毒成分の構造解析
すがはら こうたろう 菅原 孝太郎	東京大学大学院理学系研究科・博士課程	有毒成分の機器分析
はまもと ゆか 濱本 友佳	東京大学大学院理学系研究科・修士課程	有毒成分の精製と構造解析

### (2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名      コースロン研究所・Program leader・Patrick Thomas Holland

### (3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
○ Patrick Thomas Holland	Cawthron Institute ・ Program leader	研究統括
Lesley Rhodes	Cawthron Institute ・ Program leader	有毒藻類の遺伝子解析
Lincoln Mackenzie	Cawthron Institute ・ Researcher	有毒藻類の生理
Paul McNabb	Cawthron Institute ・ Technical Manager	有毒成分の機器分析
Andy Selwood	Cawthron Institute ・ Researcher	有毒成分の定量法開発
Rex Munday	Agresearch ・ Team leader	有毒成分の病理試験
Penny Truman	ESR ・ Team leader	有毒成分の活性試験

## 6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

【目的】1998年1月から3月にかけて、ニュージーランド北島東部のウェリントン湾周辺で渦鞭毛藻による赤潮が大発生した。この赤潮の発生は、魚貝類の大量斃死を引き起こし、海域の環境に壊滅的な打撃を与えた。また、ヒトに対する健康被害も報告され、エアロゾルとよばれる海洋からの飛沫が原因と推定される呼吸困難、せき、のどの痛み、目の腫れ、皮膚炎、頭痛、吐き気などの症状が500件以上報告され、公衆衛生上も大きな問題となった。赤潮の原因種はニュージーランドの研究者により新種の渦鞭毛藻 *Karenia brevisulcata* と同定された。この渦鞭毛藻の抽出物はマウス致死毒性、細胞毒性を示し、渦鞭毛藻 *K. brevisulcata* が有毒成分を生産していることが明らかとされた。日本と同様にニュージーランドにおいても、水産業に壊滅的な打撃を与える赤潮や魚貝類食中毒の発生は、公衆衛生面のみならず産業面並びに経済面でも大きな社会問題になる。有毒成分の構造解明は定量検出法の開発、作用発現機構の解明へと繋がり、赤潮による魚類斃死や魚貝類食中毒防止に必須の知見である。本研究課題では、ニュージーランド・コースロン研究所の研究グループと協力して、渦鞭毛藻 *K. brevisulcata* の生産する有毒成分を単離し、質量分析 (MS) および核磁気共鳴 (NMR) スペクトルなどの分光学的手法を用いて有毒成分の構造を明らかとすることを第一の目的とした。

【内容】ニュージーランド・コースロン研究所で培養された渦鞭毛藻 *K. brevisulcata* をアセトンで抽出し、抽出物をクロロホルムと水で二層分配を行なった。有毒成分を含むクロロホルム層を Sep-pak diol カラムに供した。酢酸エチルメタノールで溶出して、主に、メタノール画分に毒性物質を得た。次に、Develosil C30 カラムを用いた HPLC を繰り返し行なうことにより、KBT-F, G, H, I と仮称した4種の有毒成分を単離した。これらの化合物は、NMR スペクトルの解析から類縁化合物であると推定された。

【成果】KBT-F は、マウスリンパ腫細胞 P388 に対する細胞毒性が、5.5 ng/mL と強力な細胞毒性を有していた。マウスに対する致死毒性は、腹腔内投与で 30 µg/kg であった。この値は、フグ毒テトロドトキシンの 10 µg/kg に匹敵する強さであり、KBT 類が強力なマウス致死毒性を有することを明らかとした。マウスに対する病理試験の結果、KBT-F は、肺、肝臓、腎臓などの多臓器に損傷を与えることを明らかとした。

構造解析は、KBT-F を中心に行なった。KBT-F は、MALDI MS において、Na 付加イオン [M+Na]<sup>+</sup> が *m/z* 2076 に観測され、さらに、<sup>1</sup>H NMR スペクトルの解析から、巨大ポリ環状エーテル化合物であると推定された。最も単離された量が多かった KBT-F ですら、1450 L の渦鞭毛藻培養液から 3.1 mg しか単離することが出来なかった。そのため、NMR 測定では、<sup>13</sup>C NMR スペクトルの感度が不足し、構造解析に適したスペクトルが得られず、構造決定が困難であった。この問題を解決するため、コースロン研究所で *K. brevisulcata* の培養液に NaH<sup>13</sup>CO<sub>3</sub> を添加して培養を行ない、KBT-F の分子内 <sup>13</sup>C 濃度を上昇させた。得られた <sup>13</sup>C 強化 KBT-F を用いて NMR 測定を行った結果、<sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H COSY、HMBC、HSQC-TOCSY スペクトルなどの <sup>13</sup>C 関連測定で良好なスペクトルを得ることが出来た。

得られたスペクトルを用いて構造解析を行い、KBT-F の推定構造の提出に成功した。KBT-F は、分子末端に共役アルデヒド側鎖を有し、多数のエーテル環が梯子状に連結した構造を有する巨大梯子状ポリエーテル化合物であることを明らかとした。