

NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “Structures of the Largest Amphidinol Homologues from the Dinoflagellate *Amphidinium carterae* and Structure-Activity Relationships”

Amphidinols (AMs) are polyketide metabolites produced by *Amphidinium* spp. dinoflagellates. Amphidinols and the related compounds have been isolated from dinoflagellates collected in Japan, New Zealand, Taiwan, Spain, and the US. The dinoflagellate *Amphidinium carterae* was collected in South Korea, and 21.4 mg of amphidinol 20 (AM20, $C_{87}H_{152}O_{27}$, **1**) and 4.7 mg of amphidinol 21 (AM21, $C_{94}H_{166}O_{30}$, **2**) were isolated from 112 L of cultures cells using successive column chromatography. Their structures were elucidated by detailed NMR analyses as amphidinol 6-type compounds with remarkably long polyol chains. Amphidinol 21 (**2**) has the longest linear structure among the amphidinol homologues reported so far. The general structure of AMs is best characterized by a very long carbon chain encompassing multiple hydroxy and olefinic functionalities. All AMs and congeners have a common central core structure that consists of two tetrahydropyrans linked by a C6 alkyl chain spacer.

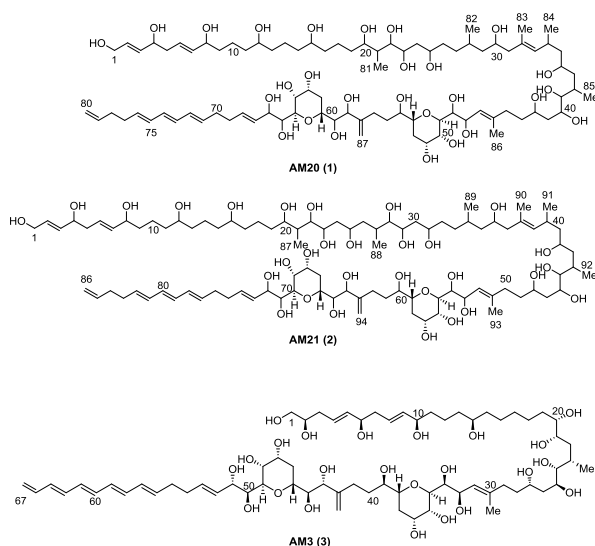


Fig. 1 Structures of amphidinol-20 (AM20, **1**), -21 (AM21, **2**), and -3 (AM3, **3**)

AM20 and AM21 showed hemolytic activity against human erythrocytes. The dose dependency of hemolysis of AM20 or AM21 was very weak as compared with other AM homologues. Additionally, AM20 and AM21 did not inhibit the growth of *Aspergillus niger* at 15 μ g/disk in an antifungal activity assay. Membrane disrupting activities of AM20 and AM21 were examined by using artificial liposomes consisting of 1-palmitoyl-2-

oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) or POPC/cholesterol (Chol). Results indicated that both AM20 and AM21 have significantly weaker activities compared with other AM analogues with a maximum of dye leakage even at the highest AM concentration. The potent analogue was reported to cause 100% calcein leakage at about 10 μ M.

The hemolysis activity of AM21 was weak compared with shorter chain homologues. This difference is likely caused by their longer polyol chains as the only structural difference between AM20/AM21 and AM6 resides in the polyol moiety. The longer chain of AM20/AM21 may prevent their penetration into the membrane interior, which is considered necessary for forming the barrel-stave pore as illustrated in Fig. 2. Another interesting feature of their activity is sterol dependency; the potency of AM20/AM21 was not dependent on the level of Chol in the membrane. This finding supports that the polyol chain of AM3 with potent activity can penetrate membranes in the presence of sterol, and its terminal portion reaches the opposite side of the bilayer as shown in Figure 2A. Their weak activity, on the other hand, can be explained by the carpet model-type mechanism, in which the shallow interaction of the polyol portion somehow disrupts the integrity of lipid packing in bilayers (Figure 2B). Another possible cause of the reduced biological activities of AM20 and AM21 may be their higher solubility due to a longer polyol chain and more hydroxy groups. As seen in AM homologues such as AM4 and AM9, higher water solubility due to a sulfate substitution always results in reduced biological activity. Heavier hydration also prevent the polyol chain from approaching the membrane surface, which is a necessary step to disrupt membrane either by carpet or barrel-stave mechanism.

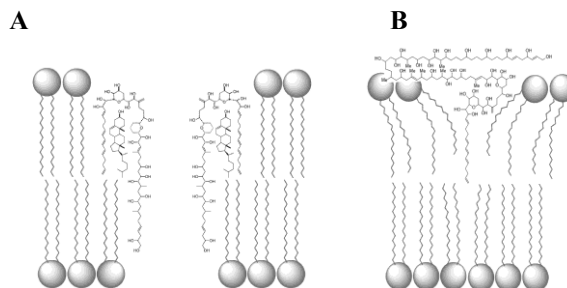


Fig. 2. Schematic illustration of mode of action. **A**) A barrel-stave channel formed by short chain AMs, such as dsAM7. **B**) A longer polyol chain hampers penetration of an AM molecule into the membrane interior. Instead, disruption of membrane packing may occur by the binding of longer AMs, such as AM21, which somewhat mimics the “carpet-model” proposed for membrane-active peptides.

研究ハイライト

(1)渦鞭毛藻 *Amphidinium carterae* が生産する最大のアンフィジノールの構造と構造活性相関

アンフィジノール類は、*Amphidinium* 属渦鞭毛藻が生産するポリケチド化合物である。アンフィジノール関連化合物は、日本、ニュージーランド、スペイン、台湾、アメリカで採集された *Amphidinium* から単離されている。アンフィジノールは、分子内に存在する2個の6員環エーテル、ポリオール側鎖、ポリエーテル側鎖を特徴とする両親媒性化合物である。類縁体の構造変化は、ポリオール側鎖の長さやヒドロキシ基の数、置換位置などに見られる。

韓国で採集された *Amphidinium carterae* の抽出液をクロロホルム/40%メタノールで二相分配したところ、メタノール画分にアンフィジノール類 (AM) が含まれていた。ゲルろ過、逆相カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、アンフィジノール-20、アンフィジノール-21 をそれぞれ 21.4 mg、4.7 mg 単離した。アンフィジノール-20 の分子式は、高分解能質量分析より $C_{87}H_{152}O_{27}$ と決定された。2次元 NMR の解析からアンフィジノール-20 は、ポリオール側鎖の類縁体であると決定した。アンフィジノール-21 分子式は、 $C_{94}H_{166}O_{30}$ と決定された。アンフィジノール-21 は、これまで構造決定されたアンフィジノール関連化合物の中で最大の類縁体であった。アンフィジノール-20、アンフィジノール-21 の構造確認は、ESI-MS/MS 実験により行った。

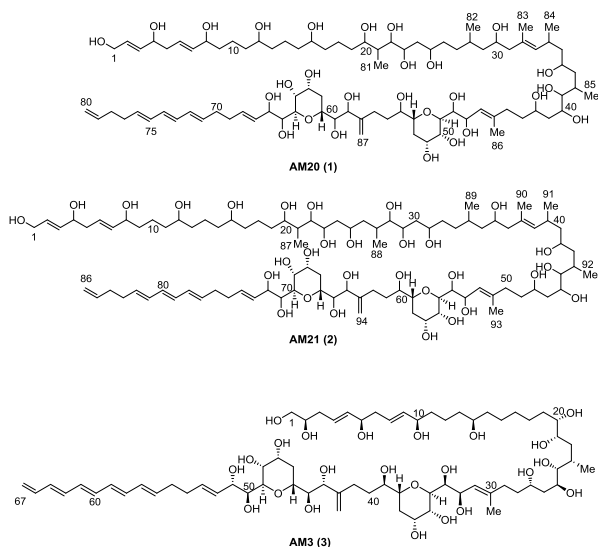


図 1 抗カビ物質アンフィジノール-20 (AM20, 1)、-21 (AM21, 2)、-3 (AM3, 3)の構造

アンフィジノール-20、アンフィジノール-21は、赤血球に対する溶血活性を示した。しかしながら、アンフィジノール-20、アンフィジノール-21の溶血活性は、既知の類縁体に比べて弱いものであった。また、黒カビ *Aspergillus niger* に対してペーパーディスク法によって、15 $\mu\text{g}/\text{disk}$ の濃度で抗カビ活性を示さなかった。

アンフィジノール-20、アンフィジノール-21の膜破壊活性を1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) or POPC/cholesterol (Chol)で構成された人工リポソーム膜を使用して試験した。その結果、アンフィジノール-20、アンフィジノール-21は、他のアンフィジノール同族体に比べて、活性が大きく低下することが明らかとなった。

アンフィジノール-20、アンフィジノール-21の溶血活性が他のアンフィジノール類に比べて弱い理由は、脂質二重膜との相互作用の違いと考えられた。強力な活性を有するアンフィジノール類は、ポリオール側鎖部分が二重膜を貫通し、バレル型ポアを形成し活性発現すると考えられる (図2A)。一方、活性の弱いアンフィジノール-20、アンフィジノール-21では、より長いポリオール部分が膜内部に貫通せず、ポリオール部分が膜外部に位置するカーペットモデル機構で活性発現するためと推測された (図2B)。また、アンフィジノール類の活性は、膜構成成分であるコレステロールの膜中濃度に依存するが、アンフィジノール-20、アンフィジノール-21の活性は、コレステロールの膜中濃度に依存しなかった。

他の類縁に比べてアンフィジノール-20、アンフィジノール-21のポリオール側鎖にヒドロキシ基が多く置換され、極性が上昇したことも膜内部への貫通を妨げた要因であることが示唆された。

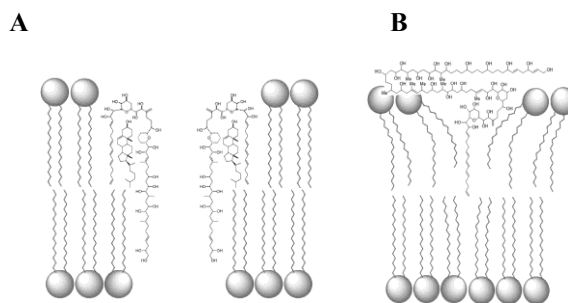


図 2 脂質二重膜とアンフィジノールの相互作用機構モデル

1.(1)-1) *J. Nat. Prod.*, 2883-2888 (2017)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) M. Satake, K. Cornelio, S. Hanashima, R. Malabed, M. Murata, N. Matsumori, H. Zhang, F. Hayashi, S. Mori, J. S. Kim, C.-H. Kim, J.-S. Lee, “Structures of the Largest Amphidinol Homologues from the Dinoflagellate *Amphidinium carterae* and Structure-Activity Relationships” *J. Nat. Prod.*, *80*, 2883-2888 (2017).