

# NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY

## Annual Research Highlights

### (1) “Brevisulcenal-F: A polycyclic ether toxin associated with massive fish-kills in New Zealand”

A novel marine toxin, brevisulcenal-F (KBT-F, from *Karenia brevisulcata* toxin) was isolated from the dinoflagellate *Karenia brevisulcata*. A red tide of *K. brevisulcata* in Wellington Harbour, New Zealand in 1998 was extremely toxic to fish, shellfish and other marine animals and also caused respiratory distress in harbour bystanders. An extract of *K. brevisulcata* showed potent mouse lethality and cytotoxicity, and laboratory cultures of *K. brevisulcata* produced a range of novel lipid-soluble toxins. A lipid soluble toxin, KBT-F was isolated from bulk cultures by using various column chromatographies. Chemical investigation showed that KBT-F has the molecular formula, C<sub>107</sub>H<sub>160</sub>O<sub>38</sub> and a complex polycyclic ether nature. NMR and MS/MS analyses revealed the structure for KBT-F which is characterized by a ladder-frame polyether scaffold, a 2-methylbut-2-enal terminus and an unusual substituted dihydrofuran at the other terminus (Fig. 1). The main section of the molecule has 17 contiguous 6- and 7-membered ether rings. Unlike brevetoxins, KBT-F does not have unsaturated middle sized ether rings. The molecule consists of two parts, one is the rigid ether ring assembly, rings A-Q and the other is a flexible acyclic part and the short ether ring assembly rings S-X. The majority of the 13 hydroxy groups reside in the flexible part of the molecule from C-60 to C-94, while all the angular methyls reside on the rigid ring assembly A-Q. These structural features must be related to their potent biological activities which are much higher than those of other polycyclic ether toxins. From a biosynthetic point of view, the terminal dihydrofuran is unusual among the marine polyethers. KBT-F showed potent mouse lethality and cytotoxicity against mouse leukemia P388 cells.

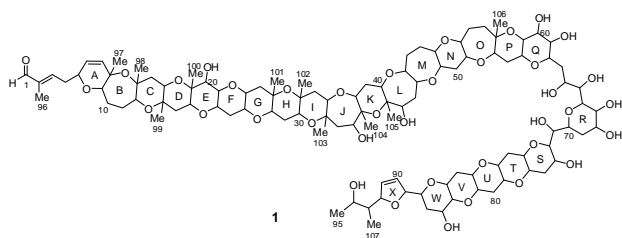


Fig. 1 Structure of brevisulcenal-F (KBT-F).

1.(1)-1) *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 4963-4968 (2012)

### (2) “Origins of oxygen atoms in a marine ladder-frame polyether”

Yessotoxin is a ladder-frame polyether produced by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum*. Previous <sup>13</sup>C labeling experiments established the unique assembly of the carbon chain from intact and cleaved acetate units. The origins of ether and hydroxyl oxygens in the molecule, which would yield further information regarding the assembly of the ladder-frame structure, have yet to be established. The incorporation experiments of <sup>18</sup>O were conducted. The dinoflagellate was cultured under <sup>18</sup>O<sub>2</sub> atmosphere and the culture media was supplemented with [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]acetate. Labeled yessotoxin obtained from these experiments was subjected to collision-induced dissociation tandem mass spectrometry to determine the positions of <sup>18</sup>O-incorporation pattern in the molecule. Detailed analyses of product ions from the fragmentation processes led to the identification of <sup>18</sup>O-labeled positions and the incorporation ratios. The data revealed that the ether oxygens were labeled from <sup>18</sup>O<sub>2</sub> and the hydroxyl oxygen on C32 was derived from [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]acetate. These results support proposed biosynthetic mechanism of marine ladder-frame polyethers that a polyene precursor was oxidized by a monooxygenase after acetate condensation. Thus an *E*-polyene precursor is stereoselectively epoxidized by a monooxygenase to produce a polyepoxide precursor and then *endo*-tet cyclization of the resultant polyepoxide precursor proceeded successively to biosynthesize a ladder-frame polyether.

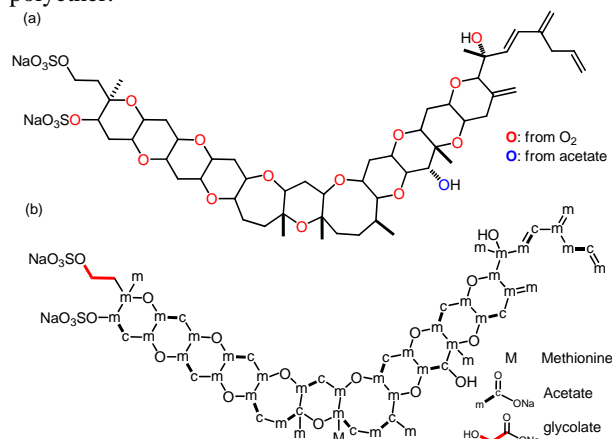


Fig. 2 Structure of yessotoxin and <sup>18</sup>O and <sup>13</sup>C labeling patterns.

1.(1)-3) *J. Org. Chem.*, **77**, 4902-4906 (2012)

# 天然物化学研究室

## 研究ハイライト

### (1) ニュージーランドで発生した新種赤潮渦鞭毛藻が生産する有毒成分プレビスルセナル-F (KBT-F) の構造

1998年ニュージーランド北島ウェリントン湾で大規模な赤潮が発生し、湾内の海洋生物に甚大な被害をもたらした。この赤潮により、500人にもおよぶ呼吸器障害の被害が報告された。赤潮の原因藻は、新種の渦鞭毛藻 *Karenia brevisulcata* と同定され、有毒成分の生産が確認された。この渦鞭毛藻の研究室培養を行い、有毒成分の構造解明に成功した。

人工培養した藻体から各種クロマトグラフィーにより有毒成分4成分が単離され、プレビスルセナル (KBT) と命名された。KBTは、Na付加イオンが  $m/z$  2000以上に観測される巨大ポリ環状エーテル化合物であった。最も収量の多かった KBT-F の構造決定を行った。KBT-Fは、 $^{13}\text{C}$ NMRスペクトルとMALDI spiralTOF MSの解析から分子式  $\text{C}_{107}\text{H}_{160}\text{O}_{38}$  と推定された。シグナルの重なり合いを解消するため800 MHzの高磁場装置を使用して2次元NMR測定を行った。KBT-Fは、95個の炭素鎖にジヒドロフランを含む24個のエーテル環、13個のヒドロキシ基と末端にエナール側鎖を有するポリ環状エーテル化合物であった(図1)。構造の確認は、MALDI-spiralTOF-TOFにより行った。KBT-Fには、チャージサイトとなり得る適当な酸性官能基が分子内に存在しないため、ベンゼンスルホン酸カルボニルヒドラジンを末端のアルデヒドと反応させて誘導体化し、チャージサイトとした。その結果、ジヒドロフラン環構造の存在を支持するプロダクトイオンが観測された。その他のプロダクトイオンからもNMRスペクトルから推定した構造を支持する結果が得られた。KBT-Fは、強力なマウス致死毒性とマウス白血病細胞P388に対する細胞毒性を示した。

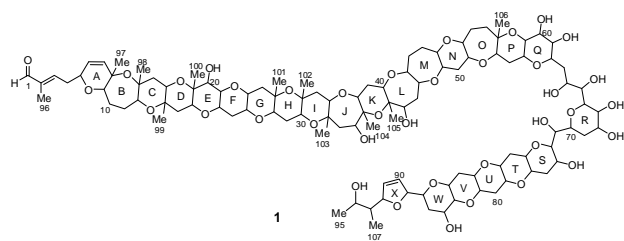


図1 赤潮毒プレビスルセナルFの構造

1.(1)-1) *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 4963-4968 (2012)

### (2) 梯子状ポリエーテル化合物のエーテル酸素は、1分子酸化によって形成される

渦鞭毛藻が生産する梯子状ポリエーテル化合物の生成研究は、渦鞭毛藻の生産量の少なさ、培養の困難さ、およびゲノム情報の欠如により、構造決定や全合成研究に比べて遅れているのが現状であった。梯子状ポリエーテル化合物イェソトキシンを生産する渦鞭毛藻 *Protoceratium reticulatum* を  $^{18}\text{O}_2$  雰囲気下培養と  $^{18}\text{O}_2$  酢酸ナトリウム添加培養実験により、梯子状ポリエーテル化合物の酸素の起源を明らかとし、エーテル環形成機構の考察を行った(図2)。グリコレートの酸素由来である1位酸素を除き、イェソトキシンの炭素に結合した全14個の酸素のうち13個が  $^{18}\text{O}_2$  由来であった。酢酸のカルボニル炭素由来である32位に結合したヒドロキシ酸素は、 $^{18}\text{O}_2$  酢酸で標識された。酢酸のメチル基由来であるエーテル炭素に結合した酸素が全て  $^{18}\text{O}_2$  でラベルされたことから、エーテル酸素は、炭素鎖形成後に、1分子酸化により導入されることが明らかとなった。すなわち、これまで提唱されてきたトランスオレフィン前駆体がモノオキシゲナーゼにより立体選択的にエポキシ化され、エポキシドの連続的または段階的な開環反応により、梯子状ポリエーテル構造が形成される機構を裏付ける重要な結果が得られた。

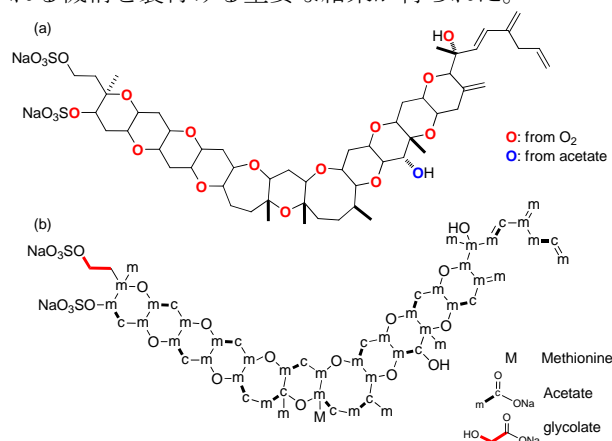


図2 イェソトキシンの構造と (a)  $^{18}\text{O}$  と (b)  $^{13}\text{C}$  ラベル化合物の取り込み位置

1.(1)-3) *J. Org. Chem.*, **77**, 4902-4906 (2012)

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) Y. Hamamoto, K. Tachibana, T. P. Holland, F. Shi, V. Beuzenberg, Y. Itoh, M. Satale, "Brevisulcinal-F: A polycyclic ether toxin associated with massive fish-kills in New Zealand", *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 4963-4968 (2012).
- 2) A. Yoshinaka-Niitsu, T. Yamagaki, M. Harada, K. Tachibana, "Solution NMR analysis of the binding mechanism of DIVS6 model peptides of voltage-gated sodium channels and the lipid soluble alkaloid veratridine", *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 2796-2802 (2012).
- 3) M. Yamazaki, M. Izumikawa, K. Tachibana, M. Satake, Y. Ithoh, M. Hashimoto, "Origins of oxygen atoms in a marine ladder-frame polyether: evidence of monooxygenation by <sup>18</sup>O-labeling and using tandem mass spectrometry", *J. Org. Chem.*, **77**, 4902-4906 (2012).
- 4) T. P. Holland, F. Shi, M. Satake, Y. Hamamoto, E. Ito, V. Beuzenberg, R. Munday, L. Briggs, P. Truman, R. Goonertne, P. Edwards, M. S. Pascal, "Novel toxins produced by the dinoflagellate *Karenia bevisulcata*", *Harmful Algae*, **13**, 47-57 (2012).

## 4. その他

- 1) Chemical & Engineering News (2012 March 5) "Algal Toxin Breaks Record"