

NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “Novel toxins from the New Zealand red tide dinoflagellate *Karenia brevisulcata*”

A red tide dinoflagellate bloomed in Wellington Harbour, New Zealand in 1998. This caused mass mortalities of fish and invertebrates within the harbour. Over 500 cases of human respiratory distress were also reported. The causative dinoflagellate was identified as the new species, *Karenia brevisulcata*, and its cell extract showed strong mouse lethality and cytotoxicity.

The extract was partitioned between organic solvents and aqueous methanol under neutral and acidic conditions. From the neutral lipophilic fraction novel polyether toxins, brevisulcenals (KBT, Fig. 1) were isolated. The structure of KBT-F was determined to be a large polycyclic ether compound with 24 ether rings, including dihydrofuran, 13 hydroxy groups, and a 2-methylbut-2-enal side chain that is similar to those of gymnocins produced by *Karenia mikimotoi*.

From the hydrophilic acidic fraction different toxins, brevisulcatic acids (BSXs, Fig. 2) were obtained. The structures of BSXs consist of nine contiguous ether rings and contain a 9-membered ether ring within the central portion of the molecule. BSX-4 showed cytotoxicity against neuro-2a cells analogous with brevetoxins and ciguatoxins.

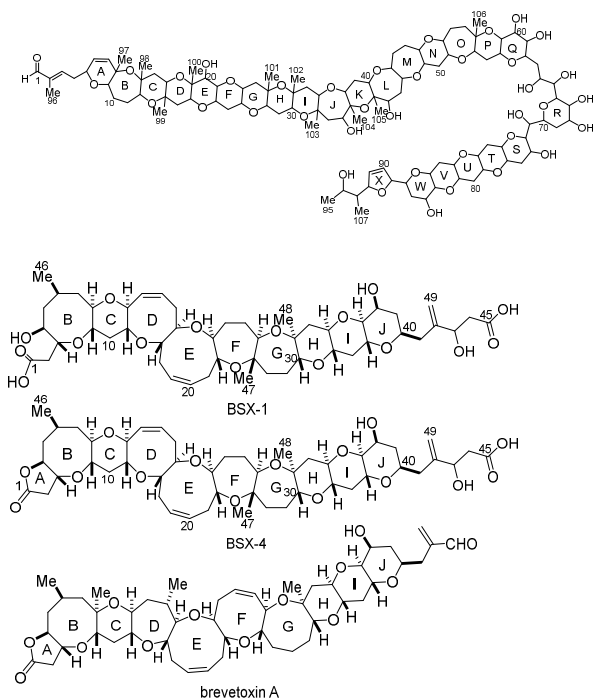


Fig. 1 Structures of KBT-F, BSX-1, BSX-4, and brevetoxin-A. 1.(1)-1) *Marine and Freshwater Harmful Algae.*, **62-65** (2015)

(2) “Discovery of enzymes related to marine polyether biosynthesis in dinoflagellate extracts”

The biosynthesis of ladder-frame polyethers has been assumed as follows. A *trans*-polyene precursor is polyepoxidized and then resultant epoxides are cyclized in a cascade of an *endo-tet* epoxide-opening process by enzymes. However, this mechanism still remains unproved because of a lack of genetic information of dinoflagellates and the complexity of these structures.

Biosynthetic enzymes such as epoxidase and an epoxide-opening enzyme were searched for using synthesized epoxide and olefine precursor compounds as substrates for the enzymatic reaction. A monocyclic ether brevisamide (1) was isolated from the dinoflagellate *Karenia brevis*. The proposed biosynthesis of brevisamide is shown in Figure 2. In order to detect the enzymatic activity and prove the pathway, plausible biosynthetic precursors 2 and 3 of brevisamide were synthesized via Suzuki-Miyaura cross coupling and Katsuki-Sharpless asymmetric epoxidation and then incubated with dinoflagellate extracts. In the incubation experiments performed using synthesized substrates (epoxides and olefins) with extracts of known polyether producing dinoflagellates, objective 6-*endo* cyclization and epoxidation was not detected. However, oxidation and hydrogenation of aldehyde groups, dehydrogenation of a hydroxyl group, and several additional unknown reactions that are presumed to be due to isomerization, were observed. Cyclic ether compounds produced by *Karenia* spp. have enal side chain structures. Therefore, these types of reactions, especially the dehydrogenation of the hydroxy group, are potentially involved in the biosynthesis of ladder frame polyethers.

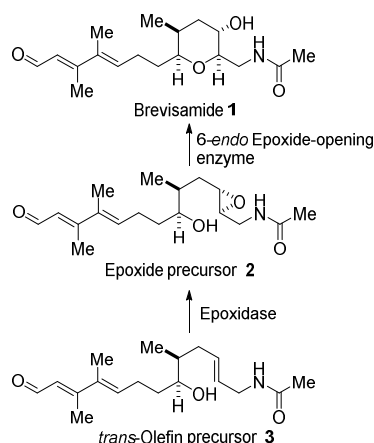


Fig. 2 Biosynthesis of brevisamide

1.(1)-2) *Marine and Freshwater Harmful Algae.*, **98-100** (2015)

研究ハイライト

(1) ニュージーランドの赤潮藻類が生産するポリ環状エーテル類の構造

1998年初頭、ニュージーランド北島のウェリントン湾で大規模な赤潮が発生し、湾内で海洋生物が大量死した。同時に、エアロゾルが原因と推定されるヒトの健康被害も500症例以上報告された。原因種は新種の渦鞭毛藻 *Karenia brevisulcata* と同定され、その抽出液は細胞毒性、マウス致死毒性、溶血作用、魚毒性を示した。LC/MSによる分析の結果、2種の梯子状ポリエーテル化合物が検出された。赤潮毒の全容解明に向け、その単離構造決定に着手した。

K. brevisulcata の抽出液をクロロホルム/水で二相分配したところ、脂溶性画分には主に分子量2,000を超す梯子状ポリエーテル化合物 brevisulcena (KBT) が含まれていた (図1)。KBTは、マウス致死毒性およびマウス白血病細胞P388に対する毒性をもつ。一方、水溶性画分には分子量900程度の酸性梯子状ポリエーテル化合物 brevisulcatic acid (BSX) が含まれていた。BSXは veratridine、ouabain 共存下で神経芽腫細胞 Neuro-2a に対する毒性をもつ。

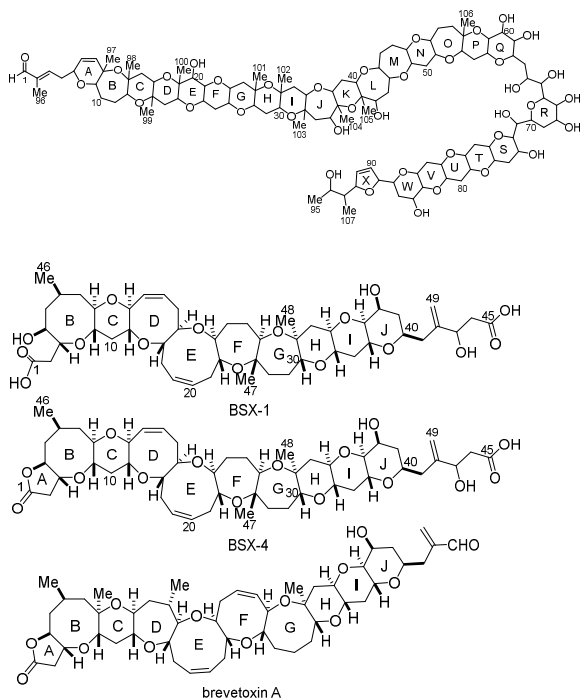


図1 赤潮毒 KBT-F, BSX-1, BSX-4, and brevetoxin-A の構造
1.(1)-1 *Marine and Freshwater Harmful Algae.*, 62-65 (2015)

(2) 渦鞭毛藻中の生物活性物質生合成酵素の発見

赤潮渦鞭毛藻 *Karenia brevis* が生産するプレベトキシシンやシガテラ原因渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* が生産するシガトキシシン、マイトトキシシンに代表される梯子状ポリエーテル化合物は、海洋の微細藻類のみが生産する二次代謝物である。5から9員エーテル環が梯子状に縮環した特異な構造と、強力な生物活性を有している事から多くの研究者に興味を持たれ、構造決定や全合成といった化学的な研究が盛んに行われてきた。その一方で、生合成に関する研究は、プレベトキシシン B の構造決定以後、Nakanishi、Shimizu らによるプレベトキシシンの ¹³C 取り込み実験が報告されていたのみであった。その理由として、渦鞭毛藻のゲノム解析が進んでいないこと、渦鞭毛藻による生産量が微量であること、梯子状ポリエーテル化合物の構造が複雑であることが考えられた。梯子状ポリエーテル構造の形成機構は、Nakanishi により、炭素鎖形成後、ポリエン前駆体のエポキシ化、続くカスケード様式の *endo* 型エポキシド開環反応による生合成仮説が提唱されたが (図2)、未だ実験的な証明は成されていない。

環状エーテル化合物推定生合成前駆体モデル化合物を合成し、渦鞭毛藻酵素抽出液とのインキュベーション実験により、環状エーテル化合物生合成に関与すると考えられる側鎖の脱水素反応とアルデヒド基の酸化反応を触媒する酵素を渦鞭毛藻酵素液中に発見した。

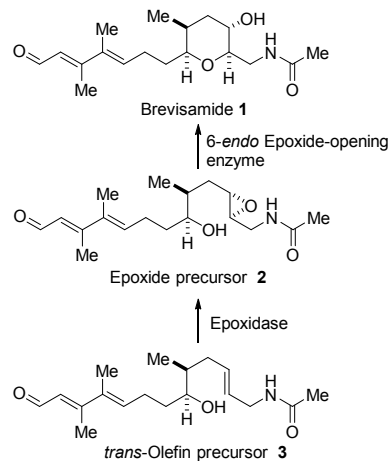


図2 モノ環状エーテル化合物プレビスアミドのエーテル環生合成機構

1.(1)-2 *Marine and Freshwater Harmful Algae.*, 98-100 (2015)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) M. Satake, Y. Hamamoto, R. Suzuki, R. Irie, P. T. Holland, D. T. Harwood, P. McNabb, F. Shi V. Beuzenberg, “Novel toxins from the New Zealand red tide dinoflagellate *Karenia brevisulcata*“ Marine and Freshwater Harmful Algae. 62-65 (2015).
- 2) M. Satake, D. Naganuma, Y. Takimoto, T. Genji, D. T. Harwood, P. S. McNabb, L. L. Rhodes, J. L. C. Wright, “Discovery of enzymes related to marine polyether biosynthesis in dinoflagellate extracts“ Marine and Freshwater Harmful Algae. 98-100 (2015).