

NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “Brevisulcatic acids from a marine microalgae implicated in a toxic vent in New Zealand ”

In 1998, a wide-spread dinoflagellate bloom occurred in Wellington Harbour, New Zealand that caused mortality of many species from diatoms to fish. It also caused human illness with more than 500 harbor bystanders reporting respiratory distress with a dry cough, severe sore throat, skin and eye irritations, severe headaches, and facial sun-burn sensations. A new dinoflagellate, *Karenia brevisulcata* was identified as the causative species. Dinoflagellates within the *Karenia* genus are well known to cause red-tide events and have been shown to produce marine ladder-frame polyethers with unsaturated aldehyde side-chains such as brevetoxins, and gymnocins. Cell culture extracts of *K. brevisulcata* showed mouse lethality, cytotoxicity, and ichthyotoxicity.

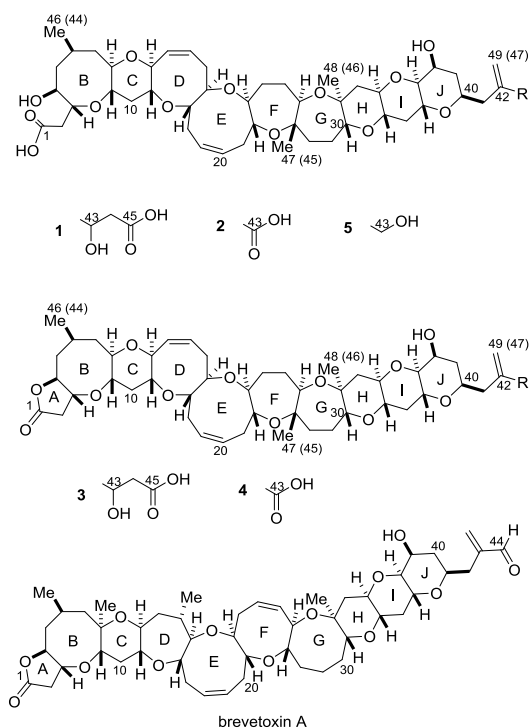


Fig. 1 Structures of brevisulcatic acids-1 (BSX-1, **1**), -2 (BSX-2, **2**), -4 (BSX-4, **3**), -5 (BSX-5, **4**), and -7 (BSX-7, **5**) and brevetoxin A

Two new classes of marine ladder-frame polyethers were isolated from the dinoflagellate extracts. Brevisulcenals (initially called *karenia brevisulcata* toxins (KBTs) were contained in a neutral lipophilic fraction. KBT-F shows potent mouse lethality and cytotoxicity

against mouse lymphoid P388 cells. Its structure consists of 24 ether rings including an unusual dihydrofuran, 13 hydroxyl groups, 13 methyl groups, and a 2-methylbut-2-enal terminus. The 17 contiguous ether rings A-Q are the longest of known polycyclic ethers. In addition to the KBTs, smaller polycyclic ethers were isolated from an acidic fraction and the neutral lipophilic fraction. These were named brevisulcatic acids (BSXs). Ladder-frame polyethers, brevisulcatic acids (BSX) -1 (**1**), -2 (**2**), -4 (**3**), -5 (**4**) and -7 (**5**) were isolated from the dinoflagellate *Karenia brevisulcata* as causative toxins of a red tide incident in New Zealand in 1998. The structures of **2**, **4**, and **5** were elucidated in this study. Brevisulcatic acids possessed common nine ether ring backbones and their size and sequence was 8/6/8/9/7/7/6/6/6. Rings B, C, H, I and J of brevisulcatic acids were similar to those of brevetoxin A, a well-known polyether toxin and **4** had a γ -lactone as the 5-membered A-ring analogous with brevetoxin A, while **2** and **5** were carboxylic acids. In addition to the lactone structure the structural difference of brevisulcatic acids resided on their side chains. Those of **2** and **4** were 2-methylenepropionic acids and that of **5** was 2-methylenepropanol. Considering from the molecular structure of the various BSX side chains, the biosynthetic conversion within dinoflagellate cells is proposed as follows (Figure 2): the primary alcohol in BSX-7 is oxidised to the aldehyde in BSX-3, the aldehyde is further oxidised to a carboxylic acid in BSX-2. Alternatively, the aldehyde can also be converted to the 3-hydroxy-4-methylenepentanoic acid side chain (as in BSX-1) by condensation with acetyl-CoA via an aldol reaction.

Cytotoxicity of **4** against neuroblastoma cells indicated that not only the structures, but also activity of brevisulcatic acids, are similar to those of brevetoxin A. This indicates that brevisulcatic acids potentially play a significant role in the toxicity observed during the only documented *Karenia brevisulcata* bloom to date.

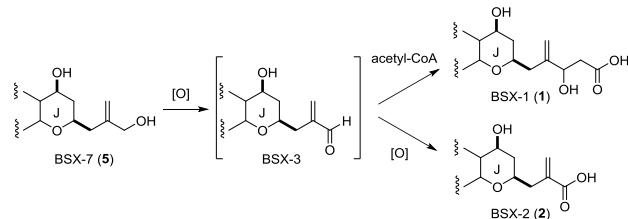


Figure 2. Hypothesized biosynthetic conversion of side chains of brevisulcatic acids. The structure of BSX-3 was deduced from ESI-MS analysis.

1.(1)-1) *Heterocycles*, **62-65** (2015)

研究ハイライト

(1)大規模赤潮被害を引き起こした、梯子状ポリエーテル赤潮毒類縁体 brevisulcatic acid 類縁体の構造

1998年初頭、ニュージーランド南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 brevisulcenal (KBT) が含まれていた。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。

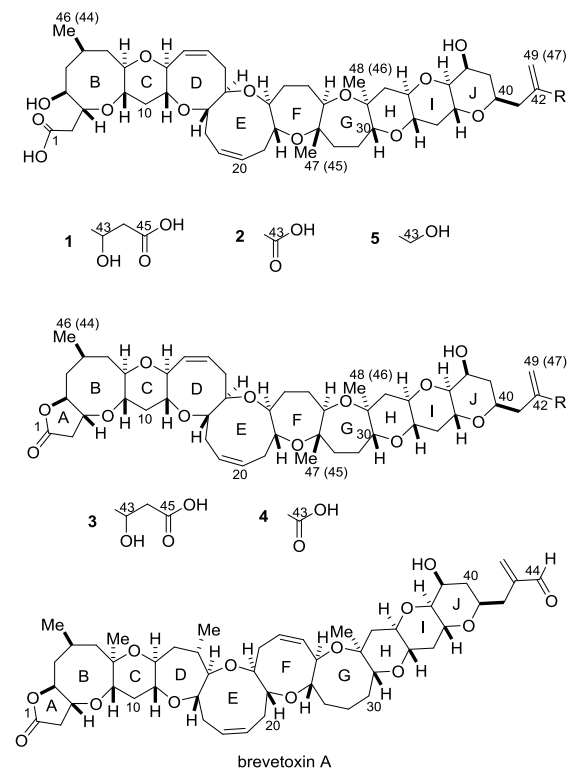


図1 梯子状ポリエーテル赤潮毒, brevisulcatic acids-1 (BSX-1, 1), -2 (BSX-2, 2), -4 (BSX-4, 3), -5 (BSX-5, 4), and -7 (BSX-7, 5) と brevetoxin A の構造

Brevisulcatic acidの構造は、分子中央に二重結合を含む9員エーテル環を有する9環性梯子状ポリエーテルであった。常温NMR測定においては、9員環の配座変換によりNMRシグナルの消失が起こり構造決定が困難であったが、低温測定により、配座変換速度をNMRの時間軸に収めることに成功し、9員エーテル環周辺のNMRシグナルの観測に成功した。エーテル環部の構造確認は、分子末端にタウリンを導入した誘導体のネガティブモードのMS/MS測定により行った。チャージリモートフラグメンテーションにより生じたプロダクトイオンは、常にスルホン酸基を保持したイオンとして観測されたため、開裂位置を一義的に決定でき、エーテル環の員数、メチル基、ヒドロキシ基の置換位置を決定できた。その結果、これまでに、5成分の類縁体が単離・構造決定された(図1)。エーテル環部の構造は、フロリダ沖周辺で赤潮被害を発生させるbrevetoxinAと類似の構造であった。

各類縁体の構造変化は、分子末端に見られ、末端カルボキシル基を有するグループとカルボキシル基が環化した5員環ラク톤を有するグループが確認された。側鎖部は、1級ヒドロキシ、アルデヒド、カルボキシルを有しており、海洋プランクトンの生体内酸化により生合成されたと推定された。BSX-1 (1)の側鎖は、アルデヒドに、アセチルCoAがアルドール反応により縮合し、生合成されたと推定された(図2)。

BSXはveratridine, ouabain共存下で神経芽腫細胞Neuro-2aに対する毒性を有していたことから、ナトリウムチャネルの活性化により、毒性を発現するものと推定された。構造と作用発現機構がbrevetoxinAと類似することから、brevisulcatic acid類がニュージーランド南島ウェリントン湾での大規模赤潮被害の原因毒であると推定された。

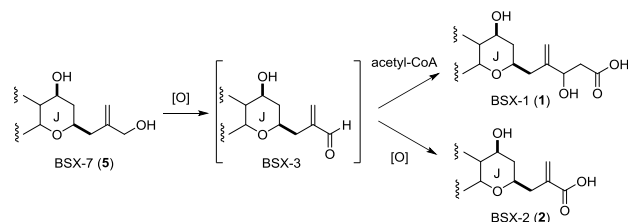


図2 Brevisulcatic acid 側鎖の推定生合成機構

1.(1)-1) *Heterocycles*, **62-65** (2015)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) R. Irie, R. Suzuki, K. Tachibana, P. T. Holland, D. T. Harwood, F. Shi, P. McNabb, V. Beuzenberg, F. Hayashi, H. Zhang, M. Satake, "Brevisulcatic acids from a marine microalgae implicated in a toxic vent in New Zealand" *Heterocycles*, 92, 45-54 (2016).