

# 秋田県にかほ市から採集されたイギス目フジマツモ科ソゾ属海藻由来 新規 C<sub>15</sub>-acetogenin の構造解析と各化合物の生物活性試験

南田悠

秋田大学大学院 理工学研究科 技術部

## 概要

大学や研究機関等の技術職員の主な業務として、学生や研究者の教育及び研究支援がある。化学を専門とする技術職員であれば、分析機器を用いた委託測定及び解析業務等も担当されている職員も多いと考えられる。しかし、各種分析機器の管理及び解析方法は、環境によって見識に差異がある。特に、化学構造の推定時に利用される核磁気共鳴分光法では、測定者の主観によって測定結果が解析されるため誤った化学構造が推定される懸念もある。発表者は、学内で実施されている研修や科研費へ応募を行い、化学分析機器の取り扱いや解析方法について技術職員間で教示し合うことで、知識及び技術の向上に努めている。本発表では、実際に研修で実施した研究課題と講習会について紹介する。

## 1. 研究背景・研究目的

化学分析機器の1種に核磁気共鳴分光法【NMR: **Nuclear Magnetic Resonance**】という、化合物の化学構造を測定・解析できる分析法がある。本手法の課題点として、解析する化合物の骨格構造が複雑なほどスペクトル内の各ピークの重なりが生じることから、解析結果の誤りが多い点にある。また、測定時は1種類の化合物に精製を行う必要があり、複数の化合物が共存した状態での化学構造の解析は困難である点も挙げられる。以上の理由から、特に新規化合物の化学構造の解析を行う際は、構造の誤りが無いよう複数の見識者の意見を伺い、化学構造を決めることが重要である。そのため、各技術職員に対してNMRの問題点や基本的な解析方法を周知する手法として研究課題「秋田県産の海藻由来機能性成分の探索」を介したNMRの解析講習を実施した。

本研究課題は、秋田県内の生物資源から生物活性物質を探索する研究の一環として、未利用海藻の成分探索を実施した。非食用海藻の1種であるイギス目フジマツモ科に分類される紅藻のソゾ属 (*Laurencia* sp.) は、臭素や塩素を含む複雑な骨格構造を有する化合物を生産している[1-4]。また、それら化合物の中には、細胞毒性[5]や抗菌活性[6]、海洋生物の付着阻害活性[7]等の生物活性を有しているとの先行研究がある。本研究では、成分探索の報告例が少ない秋田県沿岸に生息するソゾに着目し、代謝産物の調査とそれら化合物を用いた生物活性試験を行うことを目的として実施した。

また、ソゾから得られた化合物のNMRスペクトルを技術職員間で共有することでNMRの分析及び解析手法の周知を目指した。即ち、ソゾ由来の化合物や汎用されている化学物質(有機溶媒であるエタノールや酢酸エチル等)のNMRスペクトルを共有・解析することで参加者の理解度に併せた講習会を実施した。なお、講習時にNMRスペクトルを用いた構造解析を行う際の注意点等を技術職員間で共有した。



図1. 海藻採集箇所



図2. 研究課題にて採集された *Laurencia* sp.

## 2. 実験方法・研修方法

### 2.1 ソゾの採取及び化合物の抽出・分配方法

ソゾ(*Laurencia* spp.)を秋田県男鹿市及びにかほ市の潮間帯から採集を行い、自然乾燥後、メタノールを用いて代謝産物の抽出を行った(図1、図2)。得られた抽出物を油層と水層に分配し、濃縮乾固することで粗抽出物をそれぞれ得た。

### 2.2 ソゾ由来化合物の単離及び化学構造の解析手法

粗抽出物(油層)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及び分取薄層クロマトグラフィー等を用いて精製し、個々の画分に精製した。精製後の化合物を高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析法【ESI-MS: ElectroSpray Ionization-Mass Spectroscopy】及び1次元NMR( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 1D-NOE)、2次元NMR( $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ , HMQC, HMBC,  $^1\text{H-}^1\text{H-NOESY}$ )、赤外分光法【IR: InfRed spectroscopy】、紫外分光法【UV: Ultra Violet spectroscopy】、旋光計を用いて化学構造の立体相対配置を推定した。

### 2.3 ソゾ由来化合物の生物活性試験方法

化学構造を推定した各化合物の生物活性を DPPH 抗酸化活性試験[8]、ブラインシュリンブ毒性試験[9]、担子菌類を用いた抗菌活性試験等の生物活性試験を用いて評価した。なお、DPPH 抗酸化活性試験は DPPH Antioxidant Assay Kit (株式会社同仁化学研究所) [10] を用いて実施した。

### 2.4 NMR の基礎解析を主とする研修会の実施

「核磁気共鳴分光法(NMR)講習会—NMRの基礎基本と1次元NMRの解析—」との題で技術職員を対象に3日間に分けて講習会を実施した(図3)。1,2日目は、2時間程の座学を行い、NMRの基本原則から1次元NMR( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ )の解析方法、2次元NMRの紹介までの講習及び演習を実施した。3日目は、測定手法やNMRの解析アプリケーション(JEOL社Delta)を用いた分析・解析方法の手順を示し、説明を行った。



図3. NMR講習会の様子

## 3. 研究及び研修成果

研究課題に関して、秋田県にかほ市産の *Laurencia* spp. のメタノール抽出物の画分から3種類の化合物が単離された。その内、1種が現在までに報告がない8員環エーテル構造を有する新規  $\text{C}_{15}$ -acetogenin であることが ESI-MS、各種 NMR、IR を用いた構造解析の結果より示唆された。一方、NMR の測定方法や化学構造の解析に興味がある技術職員を募集後、5名の技術職員を対象とした NMR の講習会を実施した。参加者から講習会の内容や理解度及び時間、開催時期等についてアドバイスを頂きつつ反省点等进行分析した。

本発表では、主として新規  $\text{C}_{15}$ -acetogenin の構造解析と単離された化合物の生物活性試験の結果及び NMR 講習会の内容について報告する。

## 謝辞

本研究及び研修は、JSPS 科研費 23H05225 の助成及び秋田大学総合技術部、秋田大学大学院理工学研究科技術部の助成を受けて行われたものです。

## 参考文献

- [1] Wang, B.-G.; Gloer, J. B.; Ji, N.-Y.; Zhao, J.-C. Halogenated Organic Molecules of Rhodomelaceae Origin: Chemistry and Biology, *Chem. Rev.* **113**, 3632 (2013).
- [2] Masuda, M.; Abe, T.; Sato, S.; Suzuki, T.; Suzuki, M. Chemical races in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales), *J. Phycol.* **33**, 196 (1997).
- [3] Minamida, Y.; Matsuura, H.; Ishii, T.; Sato, K.; Kamada, T.; Kato, A.; Yamagishi, Y.; Abe, T.; Kikuchi, N.; Suzuki, M. Chemical composition of *Laurencia* spp. collected from the Seto Inland Sea of Japan. *Biochem. Syst. Ecol.* **96**, 104259, (2021).
- [4] Minamida, Y.; Matsuura, H.; Ishii, T.; Miyagi, M.; Shinjo, Y.; Sato, K.; Kamada, T.; Mihara, Y.; Togashi, I.; Sugimoto, K.; Abe, T.; Kikuchi, N.; Suzuki, M. New acetogenin katsuurallene from *Laurencia saitoi* collected from Katsuura, Japan. *Nat. Prod. Bioprospect.* **12**, 10, (2022).
- [5] Kim M.-M.; Mendis E.; Kim S.-K.; *Laurencia okamuraei* extract containing laurinterol induces apoptosis in melanoma cells. *J Med Food.* **11**, 2, (2008).
- [6] Vairappan, C.-S.; Suzuki, M.; Abe, T.; Masuda, M. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species, *Phytochemistry*, **58**, 3, (2001).
- [7] Umezawa, T.; Oguri, Y.; Matsuura, H.; Yamazaki, S.; Suzuki, M.; Yoshimura, E.; Furuta, T.; Nogata, Y.; Serisawa, Y.; Matsuyama-Serisawa, K.; Abe, T.; Matsuda, F.; Suzuki, M.; Okino, T. Omaczallene from Red Alga *Laurencia* sp.: Structure Elucidation, Total Synthesis, and Antifouling Activity *Angew, Chem, Int. Ed.* **53**, 3909 (2014).
- [8] Sharma, O.-P.; Bhat, T.-K.; DPPH antioxidant assay revisited, *Food chem.*, **113**, 4, (2009).
- [9] Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta Medica*, **45**, (1982).
- [10] DPPH Antioxidant Assay kit, D676, dojindo Co. Ltd..