

日本食品分析センター 安元 健、東北大院農 ○佐竹真幸

【目的】単細胞藻類の渦鞭毛藻によって生産される ciguatoxin (CTX) や brevetoxin (BTX) は、電位依存性ナトリウムチャンネル (VSSC) と特異的に結合し、チャンネルの脱分極を阻害する。これらの化合物は、梯子状に連結したエーテル環構造を特徴とし、ポリエーテル化合物と呼ばれている。渦鞭毛藻からは、CTX や BTX の他にも多数のポリエーテル化合物が単離構造決定され、生体膜機能の解明に必要な研究試薬となっている。新たな活性を有する新規な海産ポリエーテル化合物の探索と構造解析は、生体膜機能解明に向けて重要な課題である。そこで、国内外で赤潮を形成し、魚類の大量斃死を引き起こしている渦鞭毛藻 *Gymnodinium mikimotoi* が生産する強力な細胞毒性ポリエーテル化合物 gymnocin 類の化学構造を解明することを目的とした。

【方法】和歌山県串本で分離された *G. mikimotoi* を、栄養塩添加海水培地中 25°C で 28 日間培養した。また、gymnocin 類の分子内  $^{13}\text{C}$  濃度を上昇させるため、 $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  添加培養を行った。遠心分離によって収穫した藻体を脱脂後、80%PrOH で抽出した。抽出物を溶媒分画に供した後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、細胞毒を単離した。単離した毒を MS および NMR 測定に供し、化学構造の決定を行った。

【結果】約 1500 L の培養から、gymnocin-A と命名した成分を 1.5 mg 単離した。gymnocin-A は、メタノール等の極性溶媒に対する溶解性が極端に悪く、使用可能なカラム、溶媒の種類が限定されたため、精製が困難であった。 $^{13}\text{C}$  強化ギムノシン-A は、360 L の培養から、400  $\mu\text{g}$  単離した。MS および NMR 分析よりギムノシン-A の分子式は、 $\text{C}_{55}\text{H}_{90}\text{O}_{18}$  と推定された。NMR スペクトル と FAB CID MS/MS スペクトルの詳細な解析から、gymnocin-A の構造は、分子末端側鎖に共役アルデヒドを有し、14 個のエーテル環が梯子状に連結した新規ポリエーテル化合物と推定した。14 個の連続エーテル環は、既知のポリエーテル化合物と比較して最大であった。末端の共役アルデヒドや連結したエーテル環など BTX との構造上の類似点も見られたが、ナトリウムチャンネル活性化作用は示さなかった。環の構成が異なることに加えて、分子中央付近に配座交換可能な二重結合を含む中員環が存在しないことが原因と考えられた。Gymnocin-A のマウスリンパ腫細胞 P388 に対する細胞毒性は、1.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

#### 神経特異的に作用する新規ペプチドトキシンの Na チャンネル結合部位の解析および超低温電子顕微鏡解析による L 型 Ca チャンネルの立体構造

熊本大薬 ○中山 仁・國安明彦・清水英介

天然物毒の中には、動物の神経や筋肉など、いわゆる興奮性膜の電位作動性イオンチャンネルを主要な標的分子としているものが多い。これらの毒は、生体膜上において膜タンパク質であるチャンネル分子と巨大分子量の超分子複合体を形成すると考えられている。本研究では、超分子複合体が形成される時の分子相互の認識と作用様式を、その高次構造も含め分子レベルで明らかにすることを目的としている。

今回は神経の Na チャンネルに特異的に作用する新しいハチ毒の結合点の解析、および精製した L 型 Ca チャンネルの単分子 (single particle) を超低温電子顕微鏡で解析し、その立体構造を初めて観察した結果を報告する。

カリウドバチから単離され、神経特異的に作用する新規 Na チャンネル毒 PMTX の結合部位の同定を、光アフィニティラベル法と遺伝子の点変異法によって調べているが、本年度は後者による実験結果が得られた (広島大・医 瀬山研との共同研究)。それによると、PMTX の結合には神経 Na チャンネルのドメイン IV の S3-S4 リンカー一部にある特定の酸性アミノ酸残基が重要であることがわかった。筋肉型の Na チャンネルはこの酸性残基が別のアミノ酸で置換されているも結果の妥当性を支持している。結合部位は一次構造上かけ離れた複数のアミノ酸残基で構成されると予想されるので、光アフィニティラベル法によりそれらを精査する予定である。

ウサギ骨格筋から単離・精製した L 型 Ca チャンネル複合体の立体構造解析の第一歩として、超低温電子顕微鏡を用いた single particle の解析を行った。その結果、 $\alpha 1-\beta$  複合体をはじめ、5 種全てのサブユニットの相対的空間配置についてより解像度が向上したデータが得られた (生理研・村田博士らとの共同研究)。Ca チャンネル複合体の立体構造として最初の成果である。より精度の高い立体構造像を得るため、二次元および三次元での結晶解析をめざしている。