

## 海洋環境修復に寄与する生物活性物質に関する研究

物質環境科学専攻 生体機能化学講座

博士課程 1年 石井 貴広 (指導教官: 沖野 龍文)

北海道全域で大量発生を繰り返しているヒトデは、駆除後廃棄物処理され、未利用資源となっているが、様々な生物活性を有することが知られている。そこで、ヒトデに含まれる生物活性物質を活用して、環境に適合した循環型利用法を開発できる可能性がある。

そこで、利用価値の少ないヒトデから環境に悪影響を及ぼさない天然有用生物活性物質の探索を行い、環境に配慮したヒトデ混和肥料や殺虫剤を開発することを目的とした。

ヒトデの全道発生量の 60%以上を占める道東海域より、生息度の高い一般的なキヒトデ *Asterias amurensis* を採集した。生ヒトデと牛糞や木材系資材をベースとした堆肥素材から成るヒトデ混和堆肥の有効性を調べるために、毒物に敏感に反応する植物の一つコマツナを用いて発芽および初期生育に及ぼす影響を調査した。その結果、ヒトデ混和堆肥はコントロール(無処理)や特殊肥料のバーク堆肥よりもコマツナの地上部および地下部の生育をともに促進させた。したがって、ヒトデにはコマツナなどの植物の生育促進効果があることが判明した。

また、作物の害虫となるハエなどの生育に及ぼす影響を調べた。その結果、イエバエ幼虫の餌に対して 10%の割合で生ヒトデや温水抽出より得た粉末ヒトデを混入すると、蛹の変態を阻害した。

上記の生物試験結果により判明したヒトデのコマツナ生育促進作用やイエバエ幼虫の成育阻害作用を示す活性物質を得るために以下の実験を行った。

### <温水抽出によって得たコマツナ発芽・初期生育促進物質>

凍結保存した生キヒトデ(2.0kg)を 60 ℃の温水に 30 分間浸漬して抽出を行った。得られた温水抽出物を水と酢酸エチルで 2 層分配した。さらに、水可溶部を水と 1 - ブタノールで 2 層分配して水溶性画分(H-W, 75.8g)を得た。温水抽出物より得た水溶性画分(H-W)はコマツナの発芽および初期生育を促進させた。得られた水溶性画分(H-W)を <sup>1</sup>H-NMR で分析すると、糖類などを含有することが推定された。

### <メタノール抽出によって得たコマツナ発芽・初期生育促進物質と阻害物質>

凍結保存した生キヒトデ(950g)を室温でメタノールに 24 時間浸漬して抽出を行った。粗抽出液を遠心分離・ろ過後、濃縮乾固してメタノール抽出物(31.0g)を得た。得られた抽出物を酢酸エチルと水で 2 層分配して水層と有機層を得た。

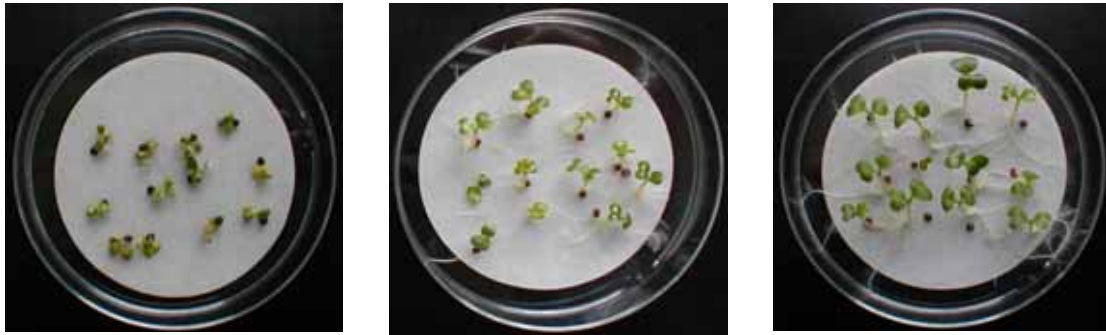
まず、水層は、溶離液に水 - メタノール系を使用して Amberlite XAD-2 カラムクロマトグラフィーで分離し、5つの画分(Me-H-A~E)に分画した。75%メタノールで溶出した画分(Me-H-D)に強いコマツナ生育阻害活性が見られた。次いで活性画分(Me-H-D)を、

溶離液に水 - メタノール系を用いて ODS カラムクロマトグラフィーで分離し、4 つの画分 (Me-H-D-a ~ d) を得た。このうち 75%メタノールで溶出した画分 (Me-H-D-c, 131.4mg) は、コマツナ種子の発芽・初期生育に対して顕著な阻害効果を示した。この活性画分は、<sup>1</sup>H-NMR によりサポニンを含有することが推定された。

一方、有機層は、溶離液にクロロホルム - メタノール - 水系を使用してシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、6 つの画分 (Me-EA-A ~ F) に分画した。クロロホルム : メタノール : 水 (80 : 20 : 1) で溶出した画分 (Me-EA-E) はコマツナの発芽および初期生育を促進させた。次いで活性画分 (Me-EA-E) を、展開溶媒にトルエン : エタノール (3 : 1) を用いて薄層クロマトグラフィーで分取し、5 つの画分 (Me-EA-E-a ~ e) を得た。これらのうち 2 つの画分 (Me-EA-E-b, 3.7mg と Me-EA-E-c, 17.0mg) はコマツナの発芽・初期生育に対して顕著な促進効果を示した。<sup>1</sup>H-NMR を用いて 2 つの活性画分の分析を行うと、いずれもグリセロ糖脂質もしくはその類似物質を含有することが推定された。3 つの活性画分の生物試験結果は図 1 に示す通りである。

本研究結果より、キヒトデがコマツナ種子の発芽および初期生育に対する促進効果あるいは阻害効果を示す生物活性物質を含有することが示された。水抽出物の水溶性画分からは促進画分が得られ、主成分は糖類であると推定された。メタノール抽出物の脂溶性画分からはグリセロ糖脂質を主成分とする促進画分が得られた。一方、メタノール抽出物の水溶性画分からは発芽および生育を顕著に阻害する作用を示す画分が得られ、サポニンを含有することが推定された。サポニン類は魚毒作用や駆虫作用を有することで知られており、イエバエなどの幼虫に対しても成育阻害効果を示すことが示唆された。

これまでの研究では、ヒトデに含まれるサポニンが魚毒作用、駆虫作用、溶血作用、発泡作用および抗ウィルス活性や抗腫瘍活性などの薬効作用を有することは知られていたが、コマツナなどの植物に対して発芽や生育を阻害する効果は報告されておらず、この新たな機能性の応用が期待される。今後の展開として、ヒトデの有効利用を図るために、ヒトデから得た活性物質の構造解析、効率的な抽出法の検討、他の植物や昆虫に対する生物試験を行って、ヒトデを混和堆肥や殺虫剤などに活用することを目指す。



左から阻害画分 (Me-H-D-c)、コントロール (H<sub>2</sub>O)、促進画分 (H-W)



左：促進画分 (Me-EA-E-c) 右：コントロール (1.0% DMSO)

図 1. 各活性画分によるコマツナ種子の発芽・初期生育試験結果

シャーレ (90 × 15 mm) につきサンプル 2.0mg/2.0ml を添加した。促進画分 (Me-EA-E-c) については 1.5mg/2.0ml を添加して試験を行った。

< 論文 >

Takahiro Ishii, Tatsufumi Okino, Minoru Suzuki, Kazunari Kuramata, and Yuji Machiguchi, Feeding-deterrent activity of phenylpropanoids from the red alga *Tichocarpus crinitus* against the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Journal of Marine Biotechnology* (submitted).

< 学会発表 >

Ishii, T., Okino, T., Suzuki, M., and Machiguchi, Y., Feeding-deterrents against the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* from the red alga *Tichocarpus crinitus*. 6<sup>th</sup> International Marine Biotechnology Conference 21-27 Sept. 2003 Chiba, Japan.