# 「海洋環境修復に寄与する生物活性物質に関する研究」
－未利用資源キヒトデ由来の植物生育制御物質－

物質環境科学専攻　生体機能化学講座
博士課程 3 年　石井　貴広（指導教官：沖野　龍文）

＜背景・目的＞

北海道全域で近年、大量発生を繰り返しているヒトデは、水産有用種の食害などの被害を及ぼすために定期的に駆除されている。回収後のヒトデは、利用価値が見出せないために廃棄物処理され、未利用資源となっている。そのような現状から、多様な生物活性物質を有することが知られるヒトデを有効利用し、環境負荷低減を考慮した循環型利用法の開発が期待される。そこで、未利用資源のヒトデから天然有用生物活性物質の探索を行い、得られた物質の機能性を明らかにし、環境負荷に配慮した混和肥料などに活用することを本研究の目的とした。

＜実験方法＞

水またはメタノールを用いてキヒトデの抽出を行った。生物試験を指標に、得られた抽出物を各種クロマトグラフィーによって分画し、活性物質の単離・精製を行った。得られた活性物質の性状を種々の NMR 法や MS などの機器分析により構造解析した。生物活性試験にはコマツナ発芽・初期生育試験を用いた。

＜結果・考察＞

昨年度までの実験結果より、生ヒトデや温水抽出より得た乾燥粉末物にはコマツナの生育やイエバエ幼虫の成育を阻害する効果が認められ、反対にヒトデ混和堆肥はコマツナ生育促進作用を有することがわかった。これらの知見と指標をもとに、ヒトデ水抽出物及びメタノール抽出物から各分離操作を行い、コマツナ種子に対して発芽抑制・阻害あるいは生育促進を示す画分を得た。顕著な促進効果が認められた水抽出物の水溶性画分からは、グリシンを主成分とする種々のアミノ酸や K および Na を含む無機塩、さらに低分子化合物の asterubine が検出された。水溶性促進画分の活性本体はカリウムを含む無機塩であり、アミノ酸は初期成育には関与していないことがわかった。また、脂溶性画分にも促進効果が確認され、全体的な促進傾向を示す画分からは糖脂質の一種であるセレブロシドが、根を著しく伸ばす画分からはセラミドがそれぞれ得られた。一方、水溶性阻害画分の主成分は各種呈色反応および NMR 解析よりアステロサポニンであることが判明した。

本年度は、各活性画分の単離・精製を行い、種々の機器分析を用いて様々な活性物質を同定するとともに、機能性の評価を行った。水溶性低分子化合物については、通常、完全な精製が困難なために微量のマイナー成分が混在し、活性本体を誤るケースがよく報告されている。そこで、アステルビンの活性能を正しく評価するために、天然物と合成品との活性の比較を行った。アステルビンの合成には論文に記載されていた手法を使用し、タウリンと dimethylcyanamide を水溶液中で縮合反応させることによって得た。生物試験の結果より、天然物および合成品ともに同程度の促進活性を示したことから、前駆体がタウリンと予測される asterubine については、活性能はあまり高くはないものの、植物の生理活性を高める活力剤的な要素等をもつ可能性があると推測できた。アステルビンについては、生物学的な観点をついた報告はほとんどなく、本実験より得られた生物活性は新たな知見である。アミノ酸はコマツナの発芽・初期生育においては促進活性を示さなかったが、植物の栄養として吸収され、タンパク質の生合成などにも直接働くため、後の生育段階で促

進効果を示すと考えられる。また、K は植物の必須多量元素でもあり、促進活性に関しては濃度依存的に働いていると思われる。

今までヒトデの促進作用に関しては無機物等の水抽出物（水溶性部）にしか着目されておらず、メタノール抽出物より得た脂溶性部に促進効果が確認できたことは注目される。各促進画分に含まれるセレブロシドおよびセラミドについては、構造内の脂肪酸部がわずかに異なるだけの類縁体が複数種存在し、単離・精製および NMR 法による通常の構造解析が困難であった。そのため、メタノリシスにより糖部と脂肪酸部および長鎖塩基部をそれぞれ切り離し、DMDS 化等によって化学変換した後、GC/MS を用いて生成された誘導体の解析を行った。その結果、全体的な促進活性を示した脂溶性画分からは、asteriacerebroside A と B および新規の asteriacerebroside G を同定した。3 つのセレブロシドには促進効果が認められ、そのうち asteriacerebroside A が最も強い促進活性を示した。セレブロシドは構成スフィンゴイド塩基や脂肪酸組成の違いによって様々な分子種が存在し、その構造上の違いによって、膜流動性の保持能の相違などが報告されている。構造活性相関について少し検討してみると、糖鎖のグルコースには初期生育における活性が見られなかったことから、活性にはセラミド側の脂肪酸鎖もしくは長鎖塩基側鎖が関与していると思われた。また、同じスフィンゴイド塩基を有するグルコセレブロシドでも構造の相違によって活性が異なることから、構成脂肪酸の相違（鎖長や２重結合の位置や数）が促進活性の強弱に起因していると考えられた。ヒトデ由来のスフィンゴ糖脂質は、神経突起伸長作用や細胞の生存維持作用などの薬理活性で広く知られているが、植物の生育に関する機能性の報告は全くない。同じ糖脂質でもグリセロ糖脂質（MGMG）がシロイヌナズナの花芽形成を促進させるという報告はあるが、セレブロシド全般において、植物の生育促進活性は知られていない。本実験より得られたセレブロシドの新たな機能性は注目すべき点だと考えられる。次に、根を伸ばす効果をもつ画分からは、顕著な根伸長活性を示す新規セラミドの asteriaceramide A が単離された。茎や根の伸長生長を制御する要因の１つが細胞壁の伸展性であり、浸透圧調節機能が関与していると言われている。また、植物が伸長する際には、細胞壁中に含まれる低 pH で働く非セルロース性多糖分解酵素などによって細胞壁がゆるむという酸生長説が知られている。その他に、側根の分化や根の伸長には植物ホルモンのオーキシンが深く関与しており、オーキシン濃度を調節するオーキシン酸化酵素が介在するという報告もある。このような事例から、得られたセラミドが伸長に関与する酵素の活性化や浸透圧調節に関与している可能性が示唆された。植物に含まれるある種のテルペン類が、植物の発根促進効果を有することで知られているが、セレブロシド同様にセラミドにおける植物生育促進作用の報告はなく、今回の実験によって新たな知見が得られたことは興味深い。

一方、メタノール抽出物より得られた水溶性画分には、発芽および生育を顕著に阻害する効果が認められ、その阻害画分の主成分は各種呈色反応などからステロイド系サポニンであることが確認できた。さらに、種々の NMR 法に加えて化学変換や LC/MS を駆使して解析を進めると、強い阻害活性を示す化合物は 5 つの糖を有するアステロサポニン類の glycoside $B_2$ と asterosaponin-1 および-4 であると同定された。中でも asterosaponin-4 が最も強い阻害能を有し、高濃度（2.5 mg/ml 以上）では発芽を完全に阻害した。これらのアステロサポニンは同ヒトデから単離されたヒトデ卵成熟阻害物質として以前に報告されている。また、サポニン混合物を加水分解後、得られたアグリコンの硫酸ステロールには根の生育阻害効果が認められた。植物の発芽時には酸素を要求することが知られており、活性物質による還元作用などによって種子が酸素欠乏を引き起こし、発芽等が抑制された可能性が推測される。庭木や観賞用として利用されるクマツヅラ科のタイワンレンギョウ（*Duranta repens*）の木陰では雑草の生育が著しく悪いという事例があり、その落葉から

植物生育阻害活性を有するトリテルペノイド系サポニン（durantannin）がアレロパシー物質として発見されている。サポニン類は駆虫作用を有しており、海洋生物より様々な殺虫作用もつ化合物が検出されていることから、ヒトデから得られたアステロサポニンもイエバエなどの幼虫に対して成育阻害作用などのアレロパシー効果を示すことが予測される。これまでの研究では、ヒトデに含まれるサポニンが魚毒、駆虫、溶血、発泡作用および抗腫瘍活性などの薬理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、化学農薬の節約および低減化など環境に配慮した農業技術の開発に向けて、このような新たな機能性の応用が期待される。

本研究結果より、未利用資源のヒトデから、コマツナに対して生育促進および阻害を示す様々な物質を単離・構造決定することができた。得られた活性物質は、コマツナ以外のスプラウトであるブロッコリーやカイワレなどにも効果を示したことから、植物の生育制御物質としての利用ならびに化学肥料の代替となる混和堆肥などへの活用が大いに期待できる。このように、廃棄物となる海洋未利用資源を巧みに利用することで、循環型社会形成の推進に貢献できると考えられる。

＜論文＞

Ishii, T., Okino, T., Mino, Y., New Ceramide and Cerebroside from the Starfish *Asterias amurensis* Lütken and their Plant-growth Promotion Activities. *Journal of Natural Products* (submitted).

Ishii, T., Okino, T., Mino, Y., Tamiya, H., Matsuda, F., Plant-growth Regulators from the Common Starfish (*Asterias amurensis* Lütken) Waste. *Bioresource Technology* (submitted).

＜学会発表＞

○石井貴広、沖野龍文、美濃羊輔
「未利用資源キヒトデから得られた植物生育制御物質」
第８回マリンバイオテクノロジー学会、熊本、2005 年 5 月.

Ishii, T. Okino, T. and Minou, Y.
Plant Growth Regulators from the Starfish *Asterias amurensis*.
46th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, July 23-27, 2005, Oregon State University, USA.