海産無脊椎動物の付着・着底・変態に関わる ケミカルシグナルとその応用

渡辺 修治, 衛藤 英男

静岡大学農学部応用生物化学科

(平成 7 年 11 月 20 日受理)

Chemical Signals Involved in Attachment, Settlement, and Metamorphosis of Marine Invertebrate, and Their Application on Marine Sessile Organisms

Naoharu WATANABE and Hideo ETOH

Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture,
Shizuoka University, Ohya, Shizuoka 422, Japan

はじめに

多くの海産無脊椎動物は受精、発生後、海中で浮遊期間を送り、ある一定の時期に達すると着底し、底生生活に適した形態へと変態し底生生活に入る。着底・変態後でも能動的に移動できるものと、着底した場所から移動せずにそこで一生を終えるものがある。後者にとって幼生の浮遊期間は、その種の保存、勢力拡大にとってたいへん重要である。また浮遊期から底生生活に移る際、より生存に適した場所を認識して着底することも重要である。この期間に浮遊幼生は何らかの化学物質を認識することによって着底・変態を引き起こすと考えられ、海産無脊椎動物幼生の着底・変態誘導因子やメカニズムの解明研究がすすめられてきた。

一方、海洋の岩礁、人工構造物、船底などに付着してその機能を大きく低下させるなどの被害を及ぼすことで知られている海洋汚損生物（フジツボ、ムラサキイガイなどの動物種、海藻などの植物種など）の防除を目的として、とくにムラサキイガイの特有な行動様式を利用した新しい防除法、防汚物質の開発研究が展開されている。また人工魚礁への藻類の付着促進、磯やけ防止、テトラポットなどの早期安定化などへの付着誘引物質の応用の可能性も検討されている。第 1 章では海産無脊椎動物幼生の着底・変態誘導物質の解明研究について、第 2 章で海洋付着生物の制御を目的とした新しい観点からの防汚物質および付着誘引物質の探索、開発研究の現状について紹介する。

1. 海産無脊椎動物幼生の着底・ 変態誘導物質の解明研究

海産無脊椎動物幼生の着底・変態誘導物質の解明研究には主として次に紹介する二つの方法がとられている。第一は神経伝達物質に対する幼生のレスポンスを観察する方法である。第二は浮遊幼生がその棲息圏内に存在する何らかの化学的因子：ケミカルシグナルを認識して着底・変態を起こすとの考えに基づき、藻類、成体や成体の棲管等から幼生の着底・変態を誘起する物質を探索し、これらを天然物化学的手法で精製、単離、構造決定をする方法である。

1) 神経伝達物質による着底・変態

脊椎動物と同様な神経伝達システムが海産無脊椎動物にも存在すると仮定して、多くの研究者が幼生の神経伝達物質に対する影響を検討している。その結果、図 1 に示すような各種の神経伝達物質によって幼生の着底変態が起こることが報告されている。これらについては最近、著者との共同研究者である Okamoto が詳しく紹介している（未発表）。

神経伝達物質による幼生の変態誘導にはレセプターを介したメカニズムが提唱されている。たとえば図 2¹⁾に示すように、着底の条件が満たされた（化学物質等の刺激を受けた）カキ幼生の神経末端から dopamine が放出され、これが神経系にある Integration Center (IC) を刺激することによって着底行動が始まる。着底行動の途中、あるいは着底後に内因性の epinephrine, norepinephrine 等の物質が放出さ

れ、アドレナリンレセプターと相互作用して変態が開始される。ウミウシの一種、*Onchidoris bilamellata* の幼生からは着底に関係するレセプターの存在が確認されている。また、Okamoto および著者ら²⁾は、管棲多毛類の一種であるエゾカサネカンザシ *Hydroides ezoensis* の幼生は DOPA によって変態が誘導されるが、L-DOPA はその光学異性体である D-DOPA よりも強い変態誘導を起こすことから、L-DOPA に対するレセプターの存在を示唆している。

2) 天然物起源の着底・変態を誘起する物質

生態系において海産無脊椎動物の分布は様様ではない。たとえば管棲多毛類のある種は同種が塊となってコロニーを形成しており、しかもコロニーの外縁部ほど個体の世代が若くなる傾向がみられる。またアワビやウニなどの栽培漁業において、浮遊幼生がある種の珪藻が生育している場所に集中的に付着する現象が観察されている。ムラサキイガイ、フジツボ、カンザシゴカイなどの汚損生物等の付着過程では、人工構築物等の基盤に初めはなかなか付着が進まないが、ある程度微生物が付着すると生物の付着量は急激に増加するという知見もある。

Pawlik³⁾は管棲多毛類である *Phragmatopoma californica* の棲管から同幼生の着底・変態を誘起する数種の脂肪酸を単離した。これに対して Jensen ら⁴⁾は *P. californica* の棲管は幼生の変態を誘導したが、棲管中には Pawlik の報告した脂肪酸をほとんど含有していないことから、単離された脂肪酸は微細藻類のコンタミネーションによるもので、棲管中に含まれる変態誘導物質は別にあると指摘している。

Kitamura ら⁵⁾は、有節サンゴモの一種である *Corallina pilulifera* からウニ *Pseudocentrotus depressus* や *Anthocidaris crassispina* の幼生の変態を誘導する遊離不飽和脂肪酸 arachidonic acid (20:4) および icosapentaenoic acid (IPA, 20:5) を単離した。

Taniguchi ら⁶⁾はウニの一種 *Strongylocentrotus nudus*、アワビの一種 *Haliotis discus* の幼生の変態を誘導する無節サンゴモ *Lithophyllum yessoense*、有節サンゴモ *Serraticardia maxima*、*Calliarthron yessoense*、緑藻 *Ulvella lens* の成分を分析した結果、3種類のハロメタン (dibromomethane, dibromochloromethane, tribromomethane) が共通して含まれていることがわかり、市販のハロメタンを用いてそれらの幼生の変態に対する影響を検討したところ、dibromomethane が *S. nudus* 幼生の変態を 100% 誘導したと報告している。

Kato ら⁷⁾は褐藻 *Sargassum tortile* からヒドロ虫 *Coryne uchidai* 幼生の変態誘導物質として δ -tocotrienol を単離した。また、塚本⁸⁾は、ユウレイボヤ *Ciona savignyi* の成体から同幼生の変態誘導物質として urochordamine A, B を、褐藻 *Sargassum thunbergii* からマボヤ *Halocynthia roretzi* 幼生の変態誘導物質として diphlorethol, sulfoquinovosyl

diacylglycerol を単離した。さらに彼ら⁹⁾は伊豆半島で採取した海綿 *Jaspis* sp. の抽出物から (Z)-および (E)-narain を単離構造決定した。変態誘導活性には陰イオン部分が重要であり、(Z)-体の変態誘導活性が (E)-体の 10 倍高いという結果を報告している。

Chevolot ら¹⁰⁾は紅藻 *Delesseria sanguinea* からホタテ *Pecten maximus* 幼生の変態誘導物質として jacaranone を単離し、その類縁化合物や神経伝達物質を用いて、幼生の変態に対する影響と化学構造との関係を検討したところ、天然にある変態誘導物質はキノンやキノン様構造をもっていているとしている。

著者ら¹¹⁾は最近、静岡県浜名湖に生息するエゾカサネカンザシ *H. ezoensis* の群居性に注目して、エゾカサネカンザシの棲管抽出物から幼生の着底・変態を誘起する化学因子を検索した。その結果 DHA monoacylglycerol をはじめとする数種の acylglycerol が変態誘導活性に関わっていることを明らかにした。

以上の化合物の多くは抗酸化能（酸化反応のよい基質となりうる）を有すると考えられ興味深い。

3) 真の変態に関わるケミカルシグナルを求めて

著者らはエゾカサネカンザシ幼生を飼育する途上、容器内での幼生密度が異常に高くなると彼らは互いに集まり大きな塊を形成し、やがて変態することを観察している。このことから、ある密度以上になると幼生がケミカルシグナルを放出していることが示唆され、現在この点から真の変態誘導物質を求めべく検討している。一方、さきの塚本¹²⁾らはホヤのオタマジャクシ型幼生においてもわれわれと同様な知見を見だし、すでに高密度培養液から活性物質の単離に成功している。また幼生のライフサイクルを通じた本化合物の消長も明らかにされ、この物質は発生の初期にすでに存在するというきわめて興味深い事実も明らかにしている。本稿が読者の目に触れる頃には化学構造も明らかになっていると思われる。

4) その他

上村ら¹³⁾は、カサネカンザシ *Hydroides elegans* の *in situ* における付着の様子を検討するために実海域にスライドガラスを浸漬し、幼生がよく付着したスライドガラスを得、幼生の付着状況を詳しく調べた。その結果、幼生がよく付着しているスライドガラスには原生動物である太陽虫（未同定）が多く観察され、カサネカンザシ幼生は太陽虫の周りを巡回した後にスライドガラスに付着して変態することが観察された。この太陽虫を培養してカサネカンザシ幼生に添加してその影響を検討したところ、太陽虫無添加ではカサネカンザシ幼生は変態しなかったのに対して、添加区ではほとんどの幼生が変態した。一方、太陽虫のアセトン抽出物は変態を誘起しなかったことから、太陽虫によるカサネカンザシ幼生の変態誘導は太陽虫がカサネカンザシに

接触することで起こると指摘している。

ところで、海産無脊椎動物幼生の変態時には、細胞の分化が劇的に起こっているものと考えられる。細胞分化の研

図1 海産無脊椎動物幼生の着底・変態誘導活性を有する神経伝達物質

図2 カキ幼生の着底・変態機構のモデル²⁾

究はおもに脊椎動物の細胞（とくに癌細胞）を用いて行なわれており、細胞分化を誘導する化学因子として活性酸素類が関与していると指摘する報告がある。また、ウミウシの一種、*Phestilla sibogae* の幼生の変態は活性酸素種の H_2O_2 によって誘導されたといわれている。これらの活性酸素と分化・変態誘導に関する研究例、および、多くの海産無脊椎動物幼生の着底・変態誘導物質が上述したように抗酸化能を有する、あるいは酸化に対して良い基質となりうる化合物である点とを考え合わせると、酸化-還元系と幼生の着底、変態との関係に興味がもたれる。

2. ムラサキイガイを用いた防汚、付着誘引物質の探索、開発研究

1) ムラサキイガイの付着忌避物質の探索

フジツボ、ムラサキイガイなどの動物種、海藻などの植物種は、海洋の岩礁、人工構築物、船底などに付着してその機能を大きく低下させるなどの被害を及ぼすことから、汚損生物と呼ばれている。これらの防除対策は実にさまざまな方法がとられてきた。最近まで用いられていた方法は、亜酸化銅または有機錫化合物を塗料に混ぜて用いるものであった。ところが、最近有機錫化合物（たとえば tributyltin oxide (TBTO) や triphenyltin oxide (TPT) 化合物など）が海洋に流出し、汚染をまねき、さらにこれらが食物連鎖を経て、貝類、魚類に移行した。その結果、生体への影響が懸念され、使用が禁止された。このため、これらに替わる安全な防汚剤の開発が急務となっている。

筆者らは、代表的な汚損生物の一種であるムラサキイガイ (*Mytilus edulis*) を用い、この貝に対する付着忌避物質（付着生物を殺すことなく付着を忌避させる物質）を、食品素材または動物の飼料を中心とした植物成分から求める研究を行なっている。

図3 天然物起源の海産無脊椎動物幼生の着底・変態に関わる物質

① ムラサキイガイを用いる忌避物質検索法

防汚活性の検定は、実際の海での効果を見る浸漬試験法がよいと思われるが、生物検定が長期にわたることや、季節や海水の状態によって、結果が不安定になるなど問題点が多い。そこで、活性測定のための生物検定法として、独自に開発したムラサキイガイを用いる付着忌避活性試験法¹⁴⁾を用いている。その方法を簡単に述べる。この貝は、他の付着生物フジツボなどと異なり、足 (foot) と呼ばれる器官で付着位置を検索し、その後、粘着板 (disk) に続く足糸 (byssus) と呼ぶ強靱なタンパク質の繊維状の物質を分泌し、海水中的の基盤に貝殻を固定する。貝をゴム片で固定し、海水の流入する水槽内に放置すると、3時間で十数本の足糸を貝殻の前方に出す。もし前方に貝が嫌がる物質 (忌避

物質) があると、図 4B のようにそれを避けて足糸を出す。この性質を利用した方法である。

② 付着忌避物質とそれらの強さ

硫酸銅の最少の忌避量をユニット 100 として、現在までに活性のみられた化合物とそれらの強さを図 5^{15, 16)}に示した。著者らの発見したなかで、硫酸銅より活性の強い物質は nicotinamide (1) (ユニット 310), kaempferol 3-*O*-(2'', 6''-di-*O*-(*E*)-*p*-coumaryl- β -D-glucopyranoside (2) (ユニット 230), polydatin 6''-*O*-(*E*)-*p*-coumarate (3) (ユニット 190) および rhaponticin 6''-*O*-(*E*)-*p*-coumarate (4) (ユニット 180) であった。Nicotinamide は、貝柱の筋肉に対する作用があることがわかっているが、その他の忌避の機構はわかっていない。

図4 ムラサキイガイを用いた付着忌避物質検索法¹⁴⁾

図5 ムラサキイガイの付着忌避物質^{15, 16)}

$$\text{ユニット} = 100 \times \frac{\text{硫酸銅 (++) を示す最少量, } \mu\text{mol/cm}^2}{\text{サンプル (++) を示す最少量, } \mu\text{mol/cm}^2}$$

同じ方法で、海洋バイオ清水研では、海洋の生物、微生物から活性物質の単離を行っており、ubiquinone (8, 10) (5, 6, 7) が硫酸銅と同じ強さを有していると報告している。

③ 付着忌避物質の実用化

忌避活性のみられた物質がすぐに実用化できるかというところ簡単ではない。海中では、まず微生物の付着（スライム）が起き、次に微細藻類（植物種）の付着、その後ウズマキゴカイ、ムラサキイガイ、フジツボ、カキなどの動物種が付着していく。これらすべての付着を忌避する必要がある。たとえば、抗生物質は、菌に対しては効果があるが、藻類や動物種には効果がない。著者らは、ムラサキイガイに対する忌避試験に加えて、抗菌活性試験（カビの1種、*Trycophyton mentagrophytes*）および藻類に対する防藻試験を行ない、それらに活性がみられた物質を海水中での浸漬試験を行ない、実用化にもっていくことを提案している。

以上の点および価格の点から、現在までに実用化できた化合物は nonylphenol のみであった。

毒性の問題から、著者らは炭素、水素、酸素から成る有機化合物に重点をおいて研究してきたが、その他の元素を有する農薬のなかから安全で、効果的な化合物がみつえられる可能性もある。ただ、実際に利用する場合、一つの化合物のみに防汚効果を期待するのではなく、それぞれのステージにのみ有効な物質を組み合わせるなどの方角に今後進むものと思われる。

2) ムラサキイガイの付着誘引物質の探索

日本は、古来より海から海藻や魚類などを食糧資源として得てきた。しかしながら、近年人工の増加、資源の乱獲や海洋汚染によって海洋資源の枯渇が懸念されるようになってきた。そのため、人工魚礁と呼ばれる海中構築物を海中に敷設し、魚類などが安全に繁殖できるような栽培漁業が盛んとなった。しかし、敷設物としてコンクリート、プラスチック、鉄や古タイヤなどを用いた人工魚礁では、実際に藻類が付着、繁殖し、魚礁としての機能を発揮するまでには、少なくとも3～4年の歳月が必要である。そのため、魚礁用構築物に初期付着生物である藻類などの付着、発育促進作用をもつ物質を塗布して、効果的に海産物を得る試みが広く行なわれている。それは、魚礁表面に藻類が付着しやすくするため、表面を粗にする、光ファイバーで藻類の成長に欠かせない太陽光を照射する、魚礁材料表面にあらかじめ藻類の胞子を付着しておく、などの物理的方法と、化学物質の塗布により付着生物の付着誘引、発育促進をさせる、有用藻類の成長を阻害する雑藻の成長を阻害する、藻食動物を忌避させる、などの化学的方法に分けられる。

海藻などの増殖促進の研究で発見された化学物質は、(1) 肥料の利用、(2) 金属単体の利用、(3) 植物ホルモンの利用、(4) ステロイド・高級アルコールの利用、(5) 有機酸

およびそれらの誘導体の利用、などに分類される。

著者らは、浸漬試験法により現在まで報告されていない benzoic acid および kojic acid に付着生物の付着誘引効果を認めた。これらを用いて、ムラサキイガイを用いる簡単な付着誘引物質検索法の確立を行なった。

① ムラサキイガイを用いる付着誘引物質の探索

付着忌避試験に利用していたムラサキイガイを用いる試験法を一部改良することで、付着誘引物質の検索に応用し得るかを検討した。方法は、特殊な厚紙ウェブロンに直径4 cmの内円と、直径7 cmの外円を描き、それらを8等分して交互にサンプルを塗る。次に、内円の周りに4個の貝を、それぞれちょうつがい方向を内側にして固定する。その板を、海水が流入する水槽内に3時間浸漬した後、試験板を取り出し、貝の足糸の数と付着位置を数える。この方法を図6に示した。図6Bは、サンプルを塗った部分と塗らない部分どちらも同じように足糸が出ている。それに対して、図6Aではサンプルを塗った部分にのみ足糸が出ている。つまり、左に塗った化合物は付着誘引効果があると判定で

図6 ムラサキイガイを用いた付着誘引物質検索法

図7 ムラサキイガイの付着誘引物質

Table 1 Attaching attractive activity for blue mussel.

Compounds	Sample amount ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	Attaching (%)	Activity
BHT	28	77 $\pm$ 8 ^{a)}	(+)
	14	76 $\pm$ 19	(-)
3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyanisole	28	87 $\pm$ 15	(+)
	14	77 $\pm$ 25	(-)
Galvinoxyl	14	100 $\pm$ 0	(+)
	7.0	81 $\pm$ 0	(+)
	3.5	83 $\pm$ 23	(-)
Curcumin	1.0	87 $\pm$ 9	(+)
Curcumin Mg chelate	1.0	94 $\pm$ 6	(+)
4 <i>H</i> -curcumin	1.0	76 $\pm$ 13	(+)
Indigocarmine	1.0	89 $\pm$ 2	(+)
α -Tocopherol	1.0	75 $\pm$ 12	(+)
Control		44 $\pm$ 19	(-)

^{a)} Standard deviation, number of trials 4-18.

+ : attractive activity, - : not attractive activity.

きる。

② ムラサキイガイの付着誘引物質^{16,17)}

Kojic acid (8) は塗布量の増加に伴って誘引効果を示したが、マグネシウムキレートでは、少ない塗布量でも効果があった。この他、効果が認められた化合物とその活性を図7およびTable 1に示した。これらの構造と活性の関係はまだわからないが、金属が重要であると考えられる。

海洋バイオ清水研では、スライムの2/3の抽出物に弱い誘引活性を認め、さらに tyrosine および DOPA に活性があることを報告している。

おわりに

海水は海洋生物のケミカルコミュニケーションの媒体である。したがって海洋生物のケミカルシグナルの情報伝達機能は、哺乳動物の体液を介した生体内での情報伝達機構と類似していると予測される。海産無脊椎動物幼生の着底、変態に関わる真のケミカルシグナルの解明が哺乳動物の生理機能の解明につながる可能性を秘めている。

一方、地球規模の環境問題は、人間からみただけの問題としてとらえないで、地球に住むあらゆる生物との共存で考えなければならない。海洋汚損生物に対する効果的な防汚物質がみつけれれば、人間生活にとっては好都合であるが、付着生物にとっては住み場所がなくなる。また、そのことによって付着生物に耐性が付けば、さらに多量の防汚剤が必要となる。付着忌避物質と付着誘引物質の両者をうまく使い分けられれば、原子力発電所、火力発電所などの給水口などの閉鎖系において、付着生物を1か所に集め、付着して欲しくないところには付かないようにし、集められた付着生物は別のところで生活してもらうということが可能となり、人間と付着生物との地球上での共存が可能になる。また、付着誘引物質は、人工魚礁への藻類の付着促進、磯やけ防止、テトラポットなどの早期安定化など幅広

い用途が考えられる。環境を考えた産業廃棄物の再利用など、付着忌避および付着誘引物質の利用の研究が今後ますます盛んになると思われる。

本稿を通読いただきました東京大学農学部附属水産実験所助手 岡本 研先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) S. L. Coon, W. K. Fitt & D. B. Bonar : *Mar. Biol.* **106**, 379 (1990)
- 2) K. Okamoto, A. Watanabe, N. Watanabe & K. Sakata : *Fish. Sci.* **61**, 69 (1995)
- 3) J. R. Pawlik : *Mar. Biol.* **91**, 59 (1986)
- 4) R. A. Jensen, D. B. Morse, R. L. Petty & N. Hooker : *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **67**, 55 (1990)
- 5) H. Kitamura, S. Kitahara & K. Hirayama : *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 75 (1992)
- 6) K. Taniguchi, K. Kurata, T. Maruzoi & M. Suzuki : *Fish. Sci.* **60**, 795 (1994)
- 7) T. Kato, A. J. Kumanireng, I. Ichinose, Y. Kitahara, Y. Kakinuma, M. Nishihara & M. Kato : *Experientia* **31**, 433 (1975)
- 8) 塚本佐知子 : 化学と生物 **31**, 701 (1993)
- 9) S. Tsukamoto, H. Kato, H. Hirota & N. Fusetani : *Tetrahedron Lett.* **35**, 5873 (1994)
- 10) L. Chevrolot, J. C. Cochard & J. C. Yvini : *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **74**, 83 (1991)
- 11) 岡本 研・井出純次・渡邊重夫・坂田完三・渡辺修治 : 平成7年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 300, 1995
- 12) 塚本佐知子 : 第9回海洋生物活性談話会講演プログラム, p. 2, 1995
- 13) 上村一雄・布施博之・滝村 修・山岡到保 : 中国工業技術試験場報告 No. 38, 9 (1992)
- 14) 伊奈和夫・衛藤英男 : 化学と生物 **28**, 132 (1990)
- 15) 伊奈和夫・衛藤英男 : 化学と生物 **30**, 249 (1992)
- 16) 産業科学技術研究開発「高機能化学製品等製造法(海洋生物活用)」第一期研究, 開発評価, 平成6年3月
- 17) H. Etoh, N. Murayama, N. Watanabe, R. Takasawa, W. Miki & K. Ina : *J. Mar. Biotechnol.* **2**, 55 (1994)