[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol.54, No.1, pp. 7~12, 1980]

ゴカイの1種 (*Perinereis vancaurica tetradentata* Imajima)

に含まれるマダイ (*Chrysophrys major*)

に対する摂餌刺激物質の検索†

伊奈和夫, 松井博司

(静岡大学農学部)

昭和54年4月27日受理

Survey of Feeding Stimulants for the Sea Bream (*Chrysophrys major*) in the Marine Worm (*Perinereis vancaurica tetradentata*) (Feeding Stimulants for Fishes Part IV)

Kazuo INA and Hiroshi MATSUI

Department of Agricultural Chemistry, Shizuoka University,
836 Ohya, Shizuoka 422

The aqueous methanolic extract of the marine worm (*P. vancaurica tetradentata*) was concentrated and poured into acetone. The precipitate showing feeding stimulant activity was dissolved in a small amount of water and poured into methanol. The methanol-soluble part was fractionated by ion exchange column chromatography. The neutral fraction thus obtained was active and rich in ninhydrin-positive components. The neutral fraction was further separated into 8 fractions by ion exchange chromatography. The most active fraction (Fr. J-5) contained three ninhydrin-positive substances which were identified as Gly, L-Ala and L-Val. Authentic specimens of the three amino acids and their mixture were assayed their activity at various concentrations, but they showed less stimulant activity than Fr. J-5, suggesting that other active substances should be contained in this fraction. From the ninhydrin-negative part of Fr. J-5 a fluorescent substance was identified by TLC on silica gel and this component may participate in the activity of Fr. J-5.

It may reasonably be concluded from these results that the stimulant activity of *P. vancaurica tetradentata* is attributable for the most part to Gly, L-Ala, L-Val and an amphoteric fluorescent substance.
(Received April 27, 1979)

本種 (*P. vancaurica tetradentata*) は環形動物, 多毛綱, 遊在目, ゴカイ科に属する体長 8~20 cm, 体重 1~5 g の海岸動物の1種で, 通常は潮間帯付近の砂底に生息する。和名はないが, 通称青イソメと呼ばれ (以下, 便宜上ゴカイと記す), 釣餌として広く用いられている。

著者らは前報⁽¹⁾で種々の水産動植物に含まれるマダイの摂餌刺激物質の検索を行った。その際, ゴカイの80%メタノール可溶, アセトン不溶物がマダイに対して強い摂餌刺激活性を示すことを報告した。そこで, 引き続き

このアセトン沈殿物中の活性物質の分離, 同定を行った結果, 活性発現に3種のアミノ酸と蛍光を有するある種の化合物が関与していることを知ったので報告する。

実験方法および結果

1. 生物試験 装置, 試験方法, 摂餌刺激活性判定法は前報⁽¹⁾のとおりである。

2. 供試魚 1976年6月, 静岡県水産試験場伊豆分場で孵化したマダイ稚魚で, 生後6か月から1年 (試験開始時の体長 8~10 cm) のものを用いた。

3. 試料 ゴカイは韓国産で, 前述のとおり, 通称

† 魚類の摂餌刺激物質の研究 (第4報)。

青イソメと呼ばれているが、国立科学博物館の今島実博士によりゴカイの1種 (*Perinereis vancaurica tetradentata* Imajima) と同定された。供試試料の体長は8~20cm, 体重は1~2gであった。

4. 摂餌刺激物質の抽出 ゴカイ 3kg をミキサーで泥状物にした後、最初5倍量の80%メタノールで2回、次に3倍量の水で2回、最後に5倍量のメタノールで1回、それぞれ室温に一夜放置して抽出した。抽出液を合わせて減圧下40°C以下で濃縮し、得られた水溶液(A)に約1/3容のエーテルを加え、エーテル可溶成分を除去した。水層は減圧下エーテルを除去した後、約10倍量のアセトン中に投入し、遠心分離してアセトン可溶部(B)と沈殿部(C)に分けた。次いでアセトン沈殿部(C)を少量の水に溶かし、減圧下アセトンを除去した。続いてこの液(E)を約10倍量のメタノール中に静かに投入し、生じた沈殿を濾別し、メタノール層は減圧下メタノールを除去して活性物質の粗抽出液(F)約100mlを得た。これら各抽出、分離段階における活性をTable Iに示す。

5. 粗抽出液から活性画分分離 活性物質を含む

Table I. Responses of Sea Bream to Fractions Separated from the Aqueous Methanolic Extract of Marine Worm^a

Fraction	Grading by biting counts ^b	Grading by feeding behavior ^b	Composite grading ^b
Aq. MeOH extract (A)	4	C	卅
Residue	0	A	一
Acetone soln. (B)	0	A	一
Acetone ppt. (C)	4	C	卅
MeOH soln. (F)	4	C	卅
Cation (H ⁺) eluate with:			
0.1N NH ₄ OH (F-1)	0	A	一
0.3N NH ₄ OH (F-2)	0	A	一
0.5N NH ₄ OH (F-3)	4	C	卅
0.7N NH ₄ OH (F-4)	1	B	±
1.0N NH ₄ OH (F-5)	0	A	一
1.5N NH ₄ OH (F-6)	0	A	一
2.0N NH ₄ OH (F-7)	0	A	一
Cation (NH ₄ ⁺)			
Eluate (G)	0	A	一
Effluent (H)	4	C	卅
Anion (CH ₃ COO ⁻)			
Eluate (I)	2	B	±
Effluent (J)	4	4	卅

^a The observation time was 2 min.

^b The responses of fish were graded as described in the previous paper⁽¹⁾.

粗抽出液 F 50ml をイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 のカラム (6×45cm, H⁺-型) に流し、活性物質を吸着させた。カラムを水洗後吸着物を0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0N NH₄OH で溶出した。溶離液は F-1~F-7 の7画分とし、それぞれからアンモニアを除去後、生物試験をした。その結果は Table I に示すように活性は F-3 (0.5N NH₄OH 溶出区) に集中していた。そこで、F-3 の塩基性物質を分離する目的で、pH を7.0に調整後、Amberlite IR-120 のカラム (6×45cm, NH₄⁺-型) に通し、吸着部 (G) と通過部 (H) に分けた。活性は通過部 H に集中していた。

次に活性部 H から酸性物質を分離する目的で、Amberlite IRA-400 のカラム (4×45cm, 酢酸型) に添加し、吸着部 (I) と通過部 (J) に分けた。活性物質は通過部 J に集まっていた (Table I)。

活性部 J はアミノ酸自動分析計 (日立製作所 835 型) によりアミノ酸分析を行った。その結果は Fig. 1 のようであり、多数のアミノ酸の存在が確認された。

続いて活性物質を含む J 画分 1.6g をピリジン-ギ酸緩衝液 (pH 3.0) で平衡化した Dowex 50W×4 のカラム (1.8×125cm, ピリジン型, 100~200mesh) に添加し、ピリジン-ギ酸、ピリジン-酢酸緩衝液を用い、Fig. 2 に示すような条件で展開し、溶離液はニンヒドリン定性試験により8画分 (Fr. J-1~8) に分画した。これら各画分の生物試験の結果を Table II に示した。

6. Fr. J-5 から活性物質の分離 Table II に見られるように、活性物質は Fr. J-5 にほぼ集中して溶出された。Fr. J-5 の溶媒を減圧下40°Cで除去し、真空デシケーター中に放置すると淡褐色の結晶が析出した。こ

Fig. 1. Chromatography of Fr. J with an Automatic Amino Acid Analyzer.

Fig. 2. Fractionation of the Active Fraction (J) by Ion Exchange Chromatography. * pH 3.0, 0.2 N pyridine-HCOOH; pH 3.4, 0.2 N pyridine-HCOOH; 3.8, pH 0.2 N pyridine-HCOOH; pH 4.2, 0.6 N pyridine-HCOOH. 4.6~5.0, 0.6~1.0 N pyridine-CH₃COOH.

Table II. Responses of Sea Bream to Fractions Separated from the Active Fraction (J) by Ion Exchange Chromatography

Fraction	Grading by biting counts ^a	Grading by feeding behavior ^a	Composite grading ^a
J-1	0	A	—
J-2	1	B	±
J-3	0	A	—
J-4	0	A	—
J-5	4	C	卅
J-6	1	B	±
J-7	1	B	±
J-8	1	B	±

^a See footnote in Table I.

の結晶を少量の水に溶かし、TLC (シリカゲル, 溶媒, BuOH : AcOH : H₂O, 4 : 1 : 2) を行ったところ, 標準の Gly, L-Ala, L-Val の R_f 値にそれぞれ一致する3種のニンヒドリン陽性物質の存在が確認された。

次に Fr. J-5 の物質を分離するため, 分取 TLC (シリカゲル, 溶媒, CHCl₃ : MeOH : 17% NH₄OH, 2 : 2 : 1) に付し, 得られた3つの画分 (Fr. J-5-1~3) をそれぞれメタノールで抽出, 減圧下溶媒を除去した。析出した結晶, I, II, III を含水エタノールから再結し, IR スペクトルを測定したところ, 標品の Gly, L-Ala, L-Val のスペクトルに一致した。なお, それぞれの結晶の収量は, I, 105mg, II, 121mg, III, 63mg であった。また結晶 II および III の旋光度を測定したところ, 結晶 II を Ala として $[M]_D^{25} = +11.9^\circ$ (in 5N HCl), 結晶 III は Val として $[M]_D^{25} = +30.1^\circ$ (in 5N HCl) であり, それぞれ

標品の L-Ala と L-Val の測定値に類似していた。

以上の結果から結晶 I, II, III をそれぞれ Gly, L-Ala, L-Val と同定した。

7. 分離アミノ酸の濃度と活性の関係 活性画分 Fr. J-5 の1回の生物試験量 (ゴカイ 10g 相当量) に含まれるアミノ酸をアミノ酸自動分析計で測定すると Gly, 0.28mmol, L-Ala 0.12mmol, L-Val 0.09mmol であった。そこでこの量で活性を示すかどうか調べた。その結果, いずれのアミノ酸も単独では無効であった。続いて上記の量のアミノ酸を混合した混合物 (A) について試験した。その結果活性は認められたが, Fr. J-5 の活

Table III. Comparison of Activities of Various Samples

Sample ^a	Grading by biting counts ^b	Grading by feeding behavior ^b	Composite grading ^b
Fr. J-5	4	C	卅
Mixture (A)	2	B	+
Mixture (B)	4	C	卅
Mixture (A) + Vitamin B ₂	4	C	卅
L-Ala 0.60 mmol	4	C	卅
L-Val 0.44 mmol	4	C	卅
Gly 0.60 mmol	2	B	+

^a Mixture (A) : The Mixture contained 0.28 mmol of Gly, 0.12 mmol of L-Ala and 0.09 mmol of L-Val in 10 ml. Mixture (B) : The mixture contained 0.43 mmol of Gly, 0.30 mmol of L-Ala and 0.11 mmol of L-Val in 10 ml.

^b See footnote in Table I.

Fig. 3. Relationship between the Activity and Concentration of Gly, L-Ala and L-Val.

性には及ばなかった (Table III).

これら2つの事実から次のことが考えられた。その第1は、先に橋本⁽²⁾がウナギに対するアミノ酸の誘引活性がアミノ酸の協同効果によると報告しているが、マダイの場合にもそれと全く類似の傾向を示しており、Gly, L-Ala, L-Val の2種または3種のアミノ酸の協同効果により活性を高めているものと考えられた。第2に Fr. J-5 の活性と、これに相当する市販アミノ酸の混合物 (A) との間に活性の差があることから、Fr. J-5 にはアミノ酸以外にその効果を増強する物質の存在が考えられた。

これらの点を明らかにするため、まず Gly, L-Ala, L-Val の濃度と活性の関係を調べた。すなわち前記3種のアミノ酸について、Fig. 3 に示すように 0.1~1.0 mmol/10ml を含む溶液を調製し、これを用いて生物試験を行った。その結果、Fig. 3 に示すように Gly は 0.43 mmol 付近で (±) から (+) に変わり、0.6 mmol 以上では活性はほぼ一定となった。L-Ala では 0.30 mmol で (±) から (+) に、0.39 mmol で (+) から (++)、0.60 mmol で (++) から (+++) へと比較的濃度に比例して活性は上昇した。最後に L-Val では 0.11 mmol で (±) から (+) に、以後急激に活性は上昇して 0.30 mmol では (++) から (+++) となり、個々のアミノ酸で最高活性に多少差のあることがわかった。

次にアミノ酸の協同効果を調べるため、各アミノ酸の最低有効量 (10ml 中)、Gly 0.43 mmol, L-Ala 0.30

mmol, L-Val 0.11 mmol を混合し、混合物 (B) を作り試験した、その結果は Table III に示すように Fr. J-5 の活性とほぼ同程度の活性を得ることができた。一方、これら各アミノ酸単独で Fr. J-5 と同程度の活性を得るためには、L-Ala では 0.60 mmol, L-Val では 0.44 mmol 以上が必要であり、Gly では 0.60 mmol 以上としてもその活性は得られなかった (Table III)。これらアミノ酸の数値をゴカイ中の量と比較すると、L-Ala, L-Val は約5倍、Gly では約2倍の値であった。

これらの事実から考えて、マダイの場合も、先に橋本⁽²⁾が報告したアミノ酸の協同効果が働き、これに関与するアミ

ノ酸は少なくとも Gly, L-Ala, L-Val のうち2種または3種であることがわかった。

8. 活性画分に含まれるアミノ酸以外の物質 前項で活性画分に含まれるアミノ酸の種類、量および各アミノ酸の協同効果について述べたが、Table III に見られるように、Fr. J-5 と混合物 (A) との間には著しい活性の差が見られた。そこで、この原因を明らかにするため、Fr. J-5 からアミノ酸の結晶を濾別した母液 (K) を TLC (シリカゲル) で調べた。その結果を Fig. 4 に示す。これによると、TLC 上 Gly および Ala と挙動の似た物質で、紫外線照射下蛍光を発する物質が存在することを確認した。そこでこの母液 Fr. K について、日立蛍光光度計 650 型を用い、溶媒水、励起波長 310 nm で蛍光スペクトルを測定したところ Fig. 5 のように 380 nm に最大発光をもつスペクトルを得た。

著者ら⁽³⁾は先に蛍光がマダイの視覚を刺激し、誘引することを報告した。このことから、Fr. J-5 の活性にはアミノ酸以外に蛍光物質も関与することが考えられ、前回⁽³⁾の試験で用いた vitamin B₂ を 10ml 当り 0.80 mg (最適濃度) 混合物 (A) に添加して試験した。その結果は Table III に示すように、活性は Fr. J-5 と同程度となった。

以上の結果から、ゴカイの活性は Gly, L-Ala, L-Val のうち2種または3種のアミノ酸の協同効果と、これを増強する因子として紫外線照射下蛍光を発する物質が関与するものと考えた。

Fig. 4. Silica Gel TLC of Fr. K. Solvent system: (A) BuOH-AcOH-pyridine-H₂O, 4:2:1:1; (B) CHCl₃-MeOH-17%NH₄OH, 2:2:1.

Fig. 5. Fluorescence Spectra of Fr. K and Vitamin B₂ (exciter wavelength, 310 nm).

考 察

ゴカイ中のマダイに対する摂餌刺激物質として Gly, L-Ala, L-Val を分離した。しかしこれらのアミノ酸は単独の場合よりも混合した場合に活性がより高くなり、橋本⁽²⁾がウナギに対するアミノ酸の誘引効果においてアミノ酸の協同効果を報告しているが、今回の実験においてもこれと全く同じ傾向が見られ、マダイの摂餌刺激に対しても少なくとも Gly, L-Ala, L-Val の3種またはこれらのうち2種の協同効果によることが明らかになった。一方これら3種のアミノ酸の活性をさらに増強す

るものとして蛍光物質の存在が確認され、この効果は vitamin B₂ によっても得られることが明確になった。

魚類に対する誘引または摂餌刺激に関する化学物質の検索では、橋本⁽²⁾がウナギに対して L-Arg, L-Ala, Gly が有効であると報告している。一方、米⁽⁴⁾は種々のアミノ酸各1%をカゼインを用いた基本飼料に添加し、マダイに給餌したとき、摂餌量が多いものについて加えたアミノ酸に摂餌刺激効果があったものと判定し、L-Ser, L-Leu, L-Ile, L-Phe, L-Arg·HCl, L-(CyS)₂, DL-Ala, L-Asp·Na, L-Lys·HCl, L-Val, Gly, L-Tyr 等が有効であったと報告している。また Pawson⁽⁵⁾はクロムシ類 *Arenicola* の抽出液を用いてタラの類 *Merlangius merlangus* L., *Gadus morhua* L. に対する誘引活性を検討し、活性物質として Gly, L-Ala を分離している。Sutterlin⁽⁶⁾は海中にテレビカメラを置き、各種アミノ酸を海水中に流したときの魚の行動を観察し、Gly を流したとき、魚の集合が一番多かったと報告している。他方著者⁽⁷⁾は淡水魚の稚ゴイに対しアミノ酸混合液を用いて試験し、試験液に明瞭な誘引活性を認めた。

以上のように、アミノ酸、とくに Gly, L-Ala はマダイ以外の魚種に対しても誘引または摂餌刺激活性を示すと報告されており、両アミノ酸は多くの魚種に対して有効な物質と考えられる。しかし L-Val が魚類に対して活性を示すことは今回著者の報告が最初であり、米⁽⁴⁾の報告とも考え合わせると、この物質はマダイに対して特有の活性を示すのかもしれない。

要 約

(1) ゴカイの1種 (*Perinereis vancaurica tetradentata* Imajima) に含まれるマダイの摂餌刺激物質を検索し、活性物質として Gly, L-Ala, L-Val を分離、同定した。

(2) Gly, L-Ala, L-Val の活性発現濃度はそれぞれ 0.43mmol, 0.30mmol, 0.11mmol/15g 試験飼料で、本種のエキスではこれらのアミノ酸の協同効果により強い活性が発現されていると考えられる。

(3) エキス中の蛍光物質は Gly, L-Ala, L-Val の混合物の活性の増強効果を示し、この効果は vitamin B₂ でも発現する。

終りに、ゴカイの同定をお願いした国立科学博物館今

島実博士に深謝いたします。

- (1) 伊奈和夫, 東 久美: 農化, **52**, 19~23(1978).
- (2) 橋本芳郎, 鴻巣章二, 伏谷伸宏, 能勢健嗣: 日水誌, **34**, 78~83, 84~87 (1968).
- (3) 伊奈和夫, 領木快一, 東 久美: 日水誌, **45**, 1~5 (1979).
- (4) 米 康夫: 水産増殖, **20**, (4~5), 193~199

(1972).

- (5) M.G. Pawson: *Comp. Biochem. Physiol.*, **56 A**, 129~135 (1977).
- (6) A.M. Sutterlin: *J. Fish Res. Board Can.*, **32**, 729~738 (1975).
- (7) 津嶋純一, 伊奈和夫: 農化, **52**, 225~229 (1978).