海洋付着生物の付着阻害物質†

伊 奈 和 夫

(静岡大学農学部)

1. はじめに

海洋付着生物の付着阻害物質の研究は、われわれのほかにはほとんど報告がなく、ここにわれわれの研究を紹介する。

海洋の岩礁、人工構造物、船底、魚網などに付着して生活する生物は海洋付着生物と呼ばれ、これらのなかで、とくに構造物、船底、魚網などに大きな被害を及ぼす生物を海洋汚損生物と呼んでいる。

われわれは、海洋生物の付着行動制御と有機化合物とのかかわり合いを解明しようとする研究の一環として、代表的な汚損生物の一種であるムラサキイガイ (*Mytilus edulis* L.) を用い、この貝に対する付着忌避物質を食品素材または飼料を中心とした植物の成分に求める研究を進めてきた。

本稿では、各種植物から得られた付着忌避物質とこれらの化学構造をヒントにして開発された防汚物質について化学的性質および防汚試験の結果を述べる。

2. 付着忌避物質の検索

(1) 付着忌避活性の検定法 ムラサキイガイを用いた検定法 (平板足糸計測法)⁽¹⁾ : 本検定法は著者らが独自に開発した方法である。ムラサキイガイは海水中に放置すると貝殻の前方に足を出し、付着位置を探した後、足糸を図 1a のように固定する。そのとき、もし貝の前方に貝の嫌がる物質が存在すると図 1b のように、それを避けて貝殻の後方に足糸を出す。特殊なボール紙 (ウェブロン、特種製紙製) の上に直径 40 mm のサンプルゾーンを描き、この円周に接して図 1 のように殻長 20~25 mm の貝を一辺が約 5 mm のゴム片を介して固定する。サンプルゾーン内には、約 0.5 ml の有機溶媒または水に溶解した試料を均一に塗布する。このように

調製された試験板は、新鮮な海水が流入する試験水槽に暗所 3 時間浸漬、付着した足糸の総数、付着位置 (サンプルゾーン内、外) の比を求め、表 1 を用い忌避活性の判定を行う。なお、活性の表示は CuSO_4 との対比をもって示す。

(2) 植物成分抽出物を用いた忌避活性スクリーニング 採集した被検植物は 1 週間から 10 日間室温にて風乾後、その 10~20 g をメタノールにて抽出を行う。粗抽出物はゾーン当り、50 mg (4.0 mg/cm^2) 塗布し、忌避活性を判定する。

(3) 付着忌避活性物質 セスキテルペン類 : i) オナモミ *Xanthium strumarium* 地上部全草から抽出された忌避物質で、化合物名は Xanthatin であり、活性ユニットは 19 である⁽²⁾。ii) トベラ *Pittosporum tobira* Ait 地上部全草から抽出された忌避物質で、化合物名は Pittosporanoside A₁ である。化学構造は糖アシル化セスキテルペン配糖体であり、活性ユニットは 8 である⁽³⁾。

イソチオシアネート類⁽⁴⁾ : 沢ワサビ *Wasabia japonica* Matsum および西洋ワサビ *Cochlelia armoracia* L. のエーテル抽出物に付着忌避活性が認められた。活性物質は合成品を用いた試験から -NCS 化合物であることが確認された。

カテキン類⁽⁵⁾ : 緑茶およびヤマザクラ *Prunus jamasakura* 樹皮から得られた忌避物質で (+)-Catechin ユニット 6、および (-)-Epicatechin ユニット 14 であった。

糖アシル化配糖体 : i) アシル化フラボノール配糖体⁽⁶⁾、カシワ *Quercus dentata* の葉から得られた忌避物質で、Kampferol の糖部分に 2 個の *p*-クマロイル基がエステル結合しているのが特徴であり、ユニットは 227 である。ii) アシル化スチルベン配糖体^(7,8)、ユーカリ属ルビダ種 *Eucalyptus rubida* の葉から抽出された 2 種の忌避物質で、Polydatin および Raponticin の配糖体の糖

† Attaching Repellent Compounds for Antifouling Substances.

Kazuo INA (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 420)

図 1 ムラサキガイを用いた生物検定法

6'' 位に p -クマロイル基が結合したもので、ユニットは両者とも約 180 である。アシル基はいずれも p -クマル酸であり、クマル酸が活性上昇の大きな要因となっていることが予測された。

複合脂質類⁽⁹⁾: i) ワカメ *Undaria pinnatifida*, スジメ *Costaria costata* の葉状体から分離された 3 種の忌避物質である。これらはいずれも複合糖脂質であり界面活性的性質を持っている。

その他: アカメガシワ *Mallotus japonicus* Mueller-Arg. の葉から単離された忌避物質で、ニコチン酸アミド⁽¹⁰⁾である。ユニットは 313 と高い値を示すが、この活性は二枚貝にのみ作用するものである。

(4) 単純フェノール性化合物の付着忌避活性⁽¹¹⁾ 天然物からムラサキガイに対する付着忌避物質を分離する過程において、上述のように種々のフェノール性化合物(p -クマル酸エステル)が単離された。

糖アシル化配糖体のそれぞれの物質について構造と活性の相関を明らかにするため、種々の化合物を用いて検討を行った。

その結果、アルキルフェノール類が忌避活性の要因であることを察知した。次にアルキル基の鎖の長さで活性の関係では、ノルマル型においても両者の相関は明確にみられるが、分岐型においてその傾向はさらに顕著となり、ターシャリー型で鎖長がオクチル (C_8)~ノニル (C_9) で活性は最高となった。

(5) アルキルフェノールおよびその他の忌避活性物質の野外試験⁽¹¹⁾ 平板足糸計測法により得た、代表的な忌避物質を塗料に混合し塩化ビニル板上に塗布した後、野外(海洋)に浸漬して防汚活性を調べた。

この結果、ムラサキガイを用いる忌避試験法は防汚物質検索のための必要条件であることは明らかになったが、十分条件でないことも明らかになった。

また、浸漬試験の経時変化観察において、浸漬初期の

表 1 忌避活性の判定法

1) $B \geq 7$	$A/B \geq 2/3$	+2					
	$A/B < 2/3$	-2					
2) $6 \geq B \geq 2$							
B/A	0	1	2	3	4	5	6
2	-1	0	+2				
3	-1	-1	+1	+2			
4	-2	-1	0	+1	+2		
5	-2	-2	-1	0	+1	+2	
6	-2	-2	-2	-1	+1	+2	+2

総点数 (T_p *)

活性

i) $4(B-A) \leq 2$

+8

+

ii) $4(B-A) > 2$ +8 $\geq T_p \geq +4$

+

+4 $> T_p > 0$

±

0 $\geq T_p$

-

A, サンプルゾーン外に付着した足糸数; B, 分泌(付着)足糸総数。

* それぞれ 4 個の貝を用い、 T_p はその合計から得られた。

活性ユニット

$$= 100 \times \frac{\text{CuSO}_4 \text{ (仕を示す最少量, } \mu\text{mol/cm}^2\text{)}}{\text{サンプル (仕を示す最少量, } \mu\text{mol/cm}^2\text{)}}$$

スライムの付着をいかに制御するかが重要であることがわかった。

(6) 抗菌活性と防汚活性との相互関係⁽¹²⁾ 浸漬初期に付着する生物を制御する方法の検討のなかで、抗生物質を用いて防汚試験を行った。抗生物質は浸漬 15 日以後には活性は消失してしまう。もちろん、供試抗生物質はイガイに対する付着忌避性は持っていない。

このような事実から、防汚物質の検索には抗菌と動物(イガイ)の付着忌避の両活性をテストする必要がある。著者らは防汚活性を示す物質の抗菌活性を試験した。

その結果、オクチル、ノニルフェノールは *Bacillus subtilis*, 海洋細菌 No. 38 [海洋浸漬板上のスライムから分離した細菌, グラム (+)], および *Trichophyton mentagrophytes* に対し共通して抗菌活性を示した。グラム (+) 菌である *B. subtilis*, No. 38 菌および *T. mentagrophytes* に対して強い抗菌活性を持つ物質はスライム形成に対し阻止能力を有すると判断された。

(7) 海洋防汚物質検索用一次スクリーニング法の確立⁽¹²⁾ 海洋防汚物質の検索には平板足糸計測法は必要条件ではあるが、十分条件でないことが明らかになった。そこでこの相関をより高める目的から、スライム形成が汚損と大きく関係することを予測し、海洋から分離した

図 2 防汚活性物質検索のための必要試験条件

菌および通常の微生物に対する抗菌活性と防汚活性との相関を調べた。

その結果、グラム (+) 菌と *T. mentagrophytes* に対する抗菌活性が防汚活性との間に高い相関のあることを認めた。

これらの事実から、海洋防汚物質の検索には、ムラサキイガイの付着忌避試験とグラム (+) 菌 (たとえば *B. subtilis*) および *T. mentagrophytes* に対する抗菌活性試験を組合せることでより効率的な検索が可能になり、そのほかに植物性付着物の付着忌避試験として防藻活性試験の追加でより効率的な防汚物質の一次スクリーニング法が確立されるものと確信している⁽¹³⁾ (図 2)。

- (1) A. Harada, K. Sakata, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 641—644 (1984) ; K. Ina, R. Takasawa, A. Yagi, and K. Sakata : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3319—3321 (1989).
- (2) A. Harada, K. Sakata, H. Ina, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1887—1888 (1985).

- (3) D. Takaoka, H. Kawahara, S. Ochi, H. Nozaki, M. Nakayama, K. Ishizaki, K. Sakata, and K. Ina : *Chem. Lett.*, **1986**, 1121—1124.
- (4) K. Ina, R. Takasawa, A. Yagi, H. Etoh, and K. Sakata : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3323—3325 (1989).
- (5) A. Yoshioka, H. Etoh, A. Yagi, K. Sakata, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3355—3356 (1990).
- (6) N. Yamashita, H. Etoh, K. Sakata, Y. Yagi, H. Ina, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1383—1385 (1989).
- (7) N. Yamashita, H. Etoh, K. Sakata, H. Ina, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2827—2829 (1989).
- (8) H. Etoh, N. Yamashita, K. Sakata, H. Ina, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2443—2444 (1990).
- (9) M. Katsuoka, C. Ogura, H. Etoh, K. Sakata, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3043—3044 (1990).
- (10) N. Yamashita, K. Sakata, H. Ina, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3351—3352 (1989).
- (11) R. Takasawa, H. Etoh, A. Yagi, K. Sakata, and K. Ina : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1607—1610 (1990).
- (12) R. Takasawa, C. Ogura, N. Watanabe, H. Etoh, K. Sakata, and K. Ina : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1208—1211 (1992).
- (13) N. Watanabe, A. Watanabe, C. Ogura, H. Etoh, K. Sakata, K. Okamoto, T. Kimura, and K. Ina : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1747—1749 (1993).