褐藻フクリンアミジのジテルペン類によるエゾアワビに 対する摂食阻害作用^{*1}

谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔, 白石一成

(1992 年 3 月 31 日受付)

Feeding-Deterrent Activity of Diterpenes from the Brown Alga
Dilophus okamurai against the Abalone
Haliotis discus hannai

Kazuya Taniguchi,^{*2} Kazuya Kurata,^{*3} Minoru Suzuki,^{*4}
and Kazunari Shiraishi^{*5}

Feeding-deterrent activity of the methanol extract from the brown alga *Dilophus okamurai* was tested on the abalone *Haliotis discus hannai* by the cellulose plate bioassay method. From the neutral fraction of methanol extract which showed feeding-deterrent activity, the following active compounds have been obtained: three spatane-type diterpenes, two of which have also inhibited the settlement and the metamorphosis of the abalone veliger, two secospatane-type, and two cubebane-type diterpenes. It may be suggested that *D. okamurai* chemically deters predation of marine herbivores by the production of these diterpenes. Consequently, the laminariaceous brown algae, such as *Eisenia bicyclis*, whose sporelings are eaten by marine herbivores, can germinate in communities of *D. okamurai* to form their own large communities in place of *D. okamurai*.

東北地方太平洋沿岸においては、潮間帯下部から漸深帯にかけてコンブ科褐藻アラメ *Eisenia bicyclis* (Kjel-lman) Setchell, 次いでアミジグサ科褐藻フクリンアミジ *Dilophus okamurai* Dawson, さらにサンゴモ科サビ亜科紅藻, 無節サンゴモが水深別にそれぞれ優占群落を形成する帯状構造が認められる。¹⁾ フクリンアミジ群落の消長は、アラメ群落の年々の海況条件にもとづく消長と逆の関係にあり、アラメ群落が衰退した場合分布を拡大し、逆にアラメ群落が拡大した場合縮小する。^{2,3)} また、三陸の中部および北部沿岸では、コンブ科褐藻マコンブ *Laminaria japonica* Areschoug 群落が消滅するとフクリンアミジがそれに代わって優占群落を形成する。⁴⁾

一方、フクリンアミジ群落中には、アラメ群落および無節サンゴモ群落と比較して、植食動物の分布が極めて

少ないことも知られている。¹⁾ 著者らは、フクリンアミジ群落中に植食動物が極めて少ない理由として、フクリンアミジが生産する二次代謝産物である数種のジテルペンによってエゾアワビ *Haliotis discus hannai* Ino 被面子幼生の着底、変態が阻害されること、^{5,6)} エゾアワビの行動が規制されること、⁷⁾ およびキタムラサキウニ *Strongylocentrotus nudus* (A. Agassiz) の摂食行動が阻害されること⁸⁾を明らかにした。

アラメやマコンブのような大型海藻は、無節サンゴモ群落のような裸地に近い場所に萌出する場合、植食動物の過剰な摂食圧によって小型の幼体のうちに消滅し、群落の形成に至らないことが多い。^{1,9)} すなわち、海藻群落の形成に対して植食動物の摂食圧はしばしば大きな阻害的影響を与える。¹⁰⁻¹⁶⁾ アラメ群落と無節サンゴモ群落の中間に生育帯をもち、アラメ群落の衰退域にも速やかに

^{*1} BCP 92-IV-D-1.

^{*2} 東北区水産研究所 (Tohoku National Fisheries Research Institute, Shinhamma, Shiogama, Miyagi 985, Japan).

^{*3} 函館工業高等専門学校 (Department of Industrial Chemistry, Hakodate Technical College, Hakodate, Hokkaido 042, Japan).

^{*4} 北海道大学理学部 (Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060, Japan).

^{*5} 宮城県気仙沼水産試験場 (Miyagi Prefectural Kesennuma Fisheries Experimental Station, Kesennuma, Miyagi 988-02, Japan).

群落を形成するフクリンアミジ¹⁻⁸⁾は、ジテルペン類を生産することによって植食動物の行動を規制するとすれば、アラメ群落の衰退域における再形成に対しても何等かの影響を及ぼしていると考えられる。そこで、フクリンアミジの植食動物に対する行動規制要因をより詳細に明らかにするため、フクリンアミジからメタノール抽出物を得て、エゾアワビに対する摂食阻害活性の有無を試験した。その結果、フクリンアミジはキタムラサキウニに対するのと同様にエゾアワビに対しても強い摂食阻害活性をもち、摂食阻害活性物質として合計 7 種のジテルペンを明らかにできた。これらの知見にもとづき、フクリンアミジ群落とアラメ群落との分布をめぐる関係について考察を加えた。

実験方法

フクリンアミジは岩手県釜石市沿岸で 1991 年 6 月に採集し、日陰で乾燥した。採集地のフクリンアミジ群落は、マコンブ群落の衰退後に形成されたものである。乾燥フクリンアミジをメタノールで 1 週間浸漬抽出後、抽出液を減圧濃縮した。得られた抽出物をエーテルと水で分配し、エーテル可溶と水可溶画分を得た。エーテル可溶部を 5% 水酸化カリウム水溶液で抽出後、1 M 塩酸で酸性にし、エーテル抽出して酸性部 (A) を得た。エーテル可溶部から酸性部を抽出した残りのものには塩基性部がほとんどないため、これを中性部 (N) とした。一方、水可溶部を、活性炭カラムに吸着後、水、メタノール、およびメタノール/アンモニア/水 (8:1:1) で逐次溶出し、水溶性活性炭通過部 (WP)、水溶性メタノール溶出部 (WM)、および水溶性メタノール/アンモニア溶出部 (WMA) とした。乾燥藻体 1 kg 当りの、これら画分収量を Table 1 に示した。

生物試験は、フクリンアミジのキタムラサキウニに対する摂食阻害活性^{8,17)} アミジサ科褐藻 *Dictyopectis divaricata* (Okamura) Okamura のキタムラサキウニ、エゾアワビ、クボガイ *Chlorostoma lischkei* (Tapparone-Caneferi) およびバテイラ *Omphalius pfeifferi* (Philippi) に対する摂食阻害活性^{18,19)} およびゴンブ科褐藻数種のエゾアワビに対する摂食阻害活性²⁰⁻²²⁾

Table 1. Yields of fractions obtained from the methanol extract of *Dilophus okamurai* (g/kg dry weight)

N	A	WP	WM	WMA
10.3	6.7	43.7	0.2	0.5

N, neutral part; A, acidic part; WP, fraction eluted with water from activated charcoal column; WM, fraction eluted with methanol from charcoal column; WMA, fraction eluted with methanol/ammonia from charcoal column.

の検定に用いた方法と同様である。まず、直径 20 cm のセルロースアルミシート (DC-Alfolien Cellulose, Merck 社製) の周縁部に直径 2 cm の円を等間隔で 16 区画描き、交互に対照区と試験区を配した。対照区にはアワビ類の摂食刺激物質であるホスファチジルコリン (PC, 和光純薬製)²³⁾ を区画当り 7.5 μ g, エタノールに溶かして吸着させ、試験区には PC 7.5 μ g と抽出画分 75 μ g を混合して吸着させた。この試験板を 20°C の恒温室内で水温を調節した濾過海水を満たした塩化ビニール製の円筒型水槽 (直径 30 cm, 高さ 14 cm) に沈めた。一方、殻長 2.5-3.0 cm のエゾアワビを試験開始 1 日前から水温 20°C の条件で絶食させ、各水槽に 5 個体入れて暗期 15 時間で試験した。試験は画分当り 12 回繰り返した。取り上げた試験板上の対照区と試験区に残された食み跡数を測定し、次式の摂食選択性指数を求めた。

$$\text{摂食選択性指数 } E_t = \frac{P_t - p_t}{P_t + p_t}$$

ここで、 P_t は対照区の食み跡数、 p_t は試験区の食み跡数を示す。また、 t 検定によって対照区と試験区に対する選択の有意差を求めた。

エゾアワビに対して摂食阻害活性をもつ物質の分離精製は、生物試験により強い活性をもつと判定された画分について、アルミナ (Merck 社製, Aluminium oxide 90, activity II-III) カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、および分取薄層クロマトグラフィー (PLC, Merck 社製, Kieselgel 60 F₂₅₄) によって行った。HPLC は逆相系 (日本分光 Megapak SIL-C₁₈, 溶媒: メタノール/水) および順相系 (Megapak SIL-CN, 溶媒: ヘキサン/イソプロピルアルコール) で行った。

結 果

フクリンアミジの第 1 次画分から第 3 次画分までの生物試験結果を Fig. 1 に、また、第 2 次画分以降の物質の分離精製過程を Fig. 2 に示した。第 1 次画分では、N 部に明らかな摂食阻害活性 ($p < 0.05$) が認められたが、他の 4 画分には全く認められなかった。そこで、N 部をアルミナカラムクロマトグラフィーにより分画して、N-1-6 部の第 2 次画分を得た。第 2 次画分では N-3 部が最も強い摂食阻害活性 ($p < 0.01$) を示し、N-1 部にも活性 ($p < 0.05$) が認められた。

明らかに摂食阻害活性が認められた N-1 部と N-3 部、および t 検定の結果では活性を認めることはできなかったが、摂食選択性指数が比較的高かった N-2 部との 3 画分についてさらに分画を行った。N-1 部は、PLC (溶媒: ペンゼン) で分離し、N-1-1~N-1-3 部を得た。N-2 部と N-3 部は、逆相系の HPLC (溶媒: メタノール/

Fig. 1. Feeding-deterrent activity of the first (I), second (II), and third fractions (III, IV, and V) obtained from *Dilophus okamurai* against the abalone *Halotis discus hannai*. N, neutral part; A, acidic part; WM, fraction eluted with methanol from activated charcoal column; WMA, fraction eluted with methanol/ammonia from charcoal column; WP, fraction eluted with water from charcoal column. The shaded and dotted bars indicate fractions which have a significant effect of $p < 0.01$ and $p < 0.05$ on feeding-deterrent by t -test.

Fig. 2. Purification procedures of neutral fraction from *Dilophus okamurai*.

Fig. 3. Feeding-deterrent activity of 8 fractions obtained by HPLC of the third (N-3-1 and N-3-2) and fourth fractions (N-32-1 and N-32-2) against the abalone *Haliotis discus hannai*. The shaded and dotted bars indicate fractions which have a significant effect of $p < 0.01$ and $p < 0.05$ on feeding-deterrent by *t*-test.

水, 90:10) で分離し, それぞれ N-2-1~N-2-4 部および N-3-1~N-3-3 部の第 3 次画分を得た。N-1 部から得られた 3 画分においては N-1-1 部と N-1-3 部 ($p < 0.05$) に, N-2 部から得られた 4 画分においては N-2-4 部 ($p < 0.05$) に, それぞれ阻害活性が認められた。また, 第 2 次画分で最も強い阻害活性を示した N-3 部から得られた 3 画分においてはいずれも阻害活性が明らかに認められ, 特に N-3-1 部の阻害活性 ($p < 0.01$) が最も強かった。

第 3 次画分で最も強い阻害活性が認められた N-3-1 部について, 順相系の HPLC (溶媒: ヘキサン/イソプロピルアルコール, 100:0.5) によって分画し, N-31-1~N-31-3 部を得, また, N-3-2 部から N-32-1~N-32-3 部を得た。さらに, 逆相系の HPLC (溶媒: メタノール/水, 90:10) によって, N-32-1 部から N-321-1~N-321-3 部, および N-32-2 部から PLC (溶媒: ペンゼン/酢酸エチル, 10:1) によって N-322-1 部と N-322-2 部に分画した。これらの画分のうち, N-321-3 部を除いて第 4 次および第 5 次画分の生物試験の結果を Fig. 3 に示した。なお, N-3-3 部についても多数の物質が含まれていたため以後の分離は行わなかった。N-31-1~N-31-3 部においてはすべてに明らかな阻害活性が認められ, 中でも N-31-1 部の阻害活性 ($p < 0.01$) が最も強かった。N-3-2 部からの画分では, N-321-2 部に強い阻害活性 ($p < 0.05$) が認められ, また, N-322-1 部と N-322-2 部においてはともに極めて強い阻害活性 ($p < 0.01$) が, さらに, N-32-3 部においても極めて強い阻害活性 ($p < 0.01$) が認められた。

純粋に単離された摂食阻害活性物質の構造式を Fig. 4 に示した。極めて強い阻害活性を示した N-322-1 部と

N-32-3 部は同一物であり, スパタン型ジテルペンの 1 であった。また, N-322-2 部は 1 の異性体の 2 であった。活性物質 1, 2 はともにエゾアワビ被面子幼生の着底, 変態阻害物質^{8,9)}として単離されている。N-31-3 部は, スパタン型ジテルペンの 3 であった。

N-3 部において最も強い阻害活性を示した N-31-1 部はセコスパタン型ジテルペンの 4 であり, N-31-2 部もセコスパタン型の 5 であった。しかし, 既報のセコスパタン型ジテルペンの 6²⁴⁾には全く活性が認められなかった。

N-321-1 部はキタムラサキウニに対して最も強い摂食阻害活性を示したクベバン型ジテルペンの 7 である^{9,17)}が, エゾアワビにはほとんど阻害活性を示さなかった。しかし, 阻害活性を示した N-1-3 部, N-2-4 部, および N-321-2 部は 7 のメチルエーテル体の 8 であった。

活性物質 8 は, フクリンアミジからメタノールで抽出した際に生成した artifact ではないかと考えられた。このため, 7 をメタノールに溶解し, 微量の酢酸を触媒として室温で 2.5 時間反応させて artifact が否かの確認を行ったところ, 70% の収率で 8 が得られた。また, フクリンアミジをアセトンで抽出し, メタノール抽出の場合と同様の方法で分離精製したところ 7 のみが得られ, 8 は全く得られなかった。以上のことから 8 は 7 の artifact であると結論した。

比較的強い阻害活性を示したクベバン型ジテルペン 9 は, 無色油状物質であり, 各種スペクトルデータから 9 式と決定した。その詳細については別に報告する。

考 察

フクリンアミジのメタノール抽出物に対するエゾアワ

Fig. 4. Structures of diterpenes obtained from *Dilophus okamurai*.

ビの摂食選択性試験の結果、中性部 (N) に強い摂食阻害活性が認められ (Fig. 1), 生物試験と分離精製を繰り返すことによって (Figs. 1-3), 摂食阻害活性物質は、エゾアワビ被面子幼生の着底、変態の阻害活性物質を含む 3 種のスパタン型ジテルペン (1, 2, 3), 2 種のセコスパタン型ジテルペン (4, 5), および 2 種のクベパン型ジテルペン (8, 9) であること^{5,6,8,9,16,17)} が明らかになった (Fig. 4)。エゾアワビに忌避行動を起こさせたのはこれらのジテルペンを最も多く含む第 2 次成分 N-3 部であったこと⁷⁾ から、忌避行動を起こさせる要因はこれらのジテルペンの摂食阻害活性によるとみなされよう。また、天然物であるクベパン型ジテルペンの 7 には阻害活性が認められないのに対し、そのメチルエーテル体の 8 に活性

があることは、今後、構造-活性相関の面から摂食阻害発現機構を解明する必要がある。

以上の結果から、フクリンアミジ群落中に植食動物が少ないという事実は、フクリンアミジが二次代謝産物として多数のジテルペンを生産して植食動物幼生の着底、変態阻害作用^{8,9)} と摂食阻害作用を発現させて植食動物の行動を制御することによってもたらされると結論できる。

フクリンアミジ群落は、通常アラメ群落の下限に接して形成されており、冬～春季に水温が低い寒冷な年には、アラメおよびアラメと同じコンブ科のワカメ *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar およびマコンブがその群落中に多数萌出することによって群落上層が形成される

ため、著しく縮小する。¹⁻⁸⁾ 一方、フクリンアミジ群落の下限に深にみられる無節サンゴモ群落中に人為的に作出したアラメヤマコンブの幼孢子体を移植すると、そこに多数生息する植食動物の集中的な蠕虫と摂食によってこれらの幼孢子体は短期間のうちに消滅する。^{1,9)} これらの知見は、アラメなどコンブ科褐藻の萌出にとって、フクリンアミジ群落の存在は何等影響を及ぼすものではないが、無節サンゴモ群落中では植食動物の強い摂食圧が極めて阻害的に作用することを示している。以上のことから、フクリンアミジが生産するジテルペン類は、植食動物に対する自らの化学的防御物質であるとともに、植食動物を排除することによってアラメ等コンブ科褐藻群落の形成条件をなしていると考えられる。

謝 辞

生物試験の実施に当たり、試験材料を提供していただいた福島県栽培漁業協会志賀 操常務理事初め職員各位に深く感謝する。本研究は農林水産省の大型別枠研究「バイオコスモス計画」の一環として行われた。記して関係各位に謝意を表す。

文 献

- 1) K. Taniguchi: Marine afforestation of *Eisenia bicyclis* (Laminariaceae; Phaeophyta). *NOAA Technical Report NMFS*, 102, 47-57 (1991).
- 2) 谷口和也, 佐藤美智男, 大和田 淳: 常盤沿岸におけるアラメ群落の変動特性. 東北水研研報, 48, 49-57 (1986).
- 3) 谷口和也, 佐藤陽一, 長田 隆, 末永浩幸: 牡鹿半島沿岸におけるアラメ群落の構造. 東北水研研報, 49, 103-109 (1987).
- 4) 高橋広樹, 中本宣典, 煙山 彰: ウニの移植による漁場改良 (中間報告). 日本水産学会東北支部会報, 32, 33 (1982).
- 5) K. Kurata, M. Suzuki, K. Shiraishi, and K. Taniguchi: Spatane-type diterpenes with biological activity from the brown alga *Dilophus okamurai*. *Phytochemistry*, 27, 1321-1324 (1988).
- 6) 谷口和也, 白石一成, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻フクリンアミジのメタノール抽出物に含まれるエゾアワビ被面幼生の着底, 変態阻害物質とその作用. 日本誌, 55, 1133-1137 (1989).
- 7) 白石一成, 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻フクリンアミジのメタノール抽出物によるエゾアワビ稚貝の行動規制. 東北水研研報, 52, 13-15 (1990).
- 8) K. Kurata, K. Taniguchi, K. Shiraishi, and M. Suzuki: Feeding-deterrent diterpenes from the brown alga *Dilophus okamurai*. *Phytochemistry*, 29, 3453-3455 (1990).
- 9) H. Kito, S. Kikuchi, and N. Uki: Seaweed as nutrition for seabed marine life technology for artificial marine forests. in "International Symposium on Coastal Pacific Marine Life" (ed. by C. J. Flora), Western Washington Univ., Bellingham, 1979, pp. 55-66.
- 10) G. R. Foster: The ecology of *Echinus esculentus* L. Quantitative distribution and rate of feeding. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 38, 361-367 (1959).
- 11) D. L. Leighton: Grazing activities of benthic invertebrates in kelp beds. *Beihft zur Nova Hedwigia*, 32, 421-453 (1971).
- 12) J. H. Himmelman and D. H. Steele: Foods and predators of the green sea urchin *Strongylocentrotus dracheniensis* in Newfoundland waters. *Mar. Biol.*, 9, 315-322 (1971).
- 13) K. H. Mann and P. A. Breen: The relation between lobster abundance, sea urchin and kelp beds. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 29, 603-609 (1972).
- 14) P. A. Breen and K. H. Mann: Changing lobster abundance and the destruction of kelp beds by sea urchin. *Mar. Biol.*, 34, 137-142 (1976).
- 15) P. A. Breen and K. H. Mann: Destructive grazing of kelp by sea urchin in eastern Canada. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 33, 1278-1283 (1976).
- 16) C. Lang and K. H. Mann: Changes in sea urchin populations after the destruction of kelp beds. *Mar. Biol.*, 36, 321-326 (1976).
- 17) 白石一成, 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻フクリンアミジのメタノール抽出物によるキタムラサキウニの摂食に及ぼす影響. 日本誌, 57, 1591-1595 (1991).
- 18) 白石一成, 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻エゾヤハズのメタノール抽出物によるキタムラサキウニとエゾアワビに対する摂食阻害作用. 日本誌, 57, 1945-1948 (1991).
- 19) 白石一成, 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻エゾヤハズの植食腹足類 2 種に対する摂食阻害. 東北水研研報, 54, 103-106 (1992).
- 20) 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻ツルアラメのポリフェノール化合物によるエゾアワビに対する摂食阻害作用. 日本誌, 57, 2065-2071 (1991).
- 21) 谷口和也, 秋元義正, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻アラメの植食動物に対する摂食阻害作用機構. 日本誌, 58, 571-575 (1992).
- 22) 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: コンブ科褐藻数種のエゾアワビに対する摂食阻害活性. 日本誌, 58, 577-581 (1992).
- 23) K. Sakata, T. Ito, and K. Ina: A new bioassay method for phagostimulants for a young abalone *Haliotis discus* Reeve. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 425-429 (1985).
- 24) K. Kurata, K. Taniguchi, K. Shiraishi, and M. Suzuki: Structure of secospatane-type diterpenes with feeding-deterrent activity from the brown alga *Dilophus okamurai*. *Tetrahedron Lett.*, 30, 1567-1570 (1989).
- 25) K. Kurata, K. Shiraishi, T. Takato, K. Taniguchi, and M. Suzuki: A new feeding-deterrent diterpenoid from the brown alga *Dilophus okamurai* Dawson. *Chem. Lett.*, 1629-1632 (1988).