褐藻アラメの植食動物に対する化学的防御機構

谷口和也, 秋元義正, 蔵多一哉, 鈴木 稔

(1991 年 10 月 4 日受付)

Chemical Defense Mechanism of the Brown Alga *Eisenia bicyclis* against Marine Herbivores*¹Kazuya Taniguchi,*² Yoshimasa Akimoto,*³ Kazuya Kurata,*⁴
and Minoru Suzuki*⁵

Although the brown alga *Eisenia bicyclis* is regarded as a suitable food for abalones and sea urchins, fresh alga appears to be devoid of predation by these marine herbivores, while fallen thalli are actively eaten. The feeding-deterrent activities of fractions prepared from the methanol extracts were examined against the abalone *Haliotis discus hannai*. The water-soluble fraction prepared from a fresh algal sample showed a marked feeding-deterrent activity, while that from the dried algal sample was inactive. On the other hand, the water-soluble fraction of the brown exudates obtained during air-drying in the shade revealed more potent activity than the water-soluble fraction of fresh alga. The active compounds were found to be phlorotannins which were previously obtained from the brown alga *Ecklonia stolonifera*. It may be suggested that the living *E. bicyclis* excretes phlorotannins into sea water to avoid predation by marine herbivores.

コンブ科褐藻のアラメ *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell は、平均寿命が満 6 歳の多年生海藻であり、¹⁾ 当歳から寿命に達した個体までを含む全齢個体群によって群落を構成している。²⁾ このため、アラメ群落は 2 歳以上の成体群と萌出群との密度依存的機構により、萌出個体密度の低い暖水年³⁾であっても、群落内の成体群密度が 5 個体/m² に低下した場所においては後継群の形成が保障され、維持されている。^{2,4,5)}

一方、各種の海藻群落は、ウニ類を初めとした植食動物の強い摂食圧によって衰退、消滅していくことが知られ、⁶⁻¹²⁾ 植食動物を人為的に駆除したり、蠣集を排除することによって回復できることが明らかにされている。¹³⁻¹⁵⁾ アラメは、アワビやウニ等有用な植食動物の成長にとって最も好適な餌料海藻とされていることからすれば、¹⁶⁻¹⁸⁾ 生育しているアラメに対してそれら植食動物の選択的な強い摂食圧により、アラメ群落の維持に大き

な影響を及ぼすことが予想される。事実、“磯焼け”とよばれるサンゴモ科サビ亜科紅藻、無節サンゴモが優占した群落中に人為的に作出したアラメの幼胞子体を移植しても、植食動物を駆除しない限り萌出個体は消滅する。¹⁹⁾

しかし、アラメ群落内におけるアラメの死亡率は年齢毎にはほぼ一定であり、²⁾ 特に萌出個体の死亡率は主として成体群の葉冠による群落下層の光条件に依存しており、被食による死亡は少ないと考えられている。^{2,4,5,20)} このため、アラメ群落内においては、アラメは植食動物に対して何等かの防御機構をもっていると考えられる。

福島、茨城両県沿岸では、古来「ドンボ釣り」と称して刈り取ったアラメを束にして海底に入れ、アワビやウニを釣り上げる漁法があり、その場合、生鮮なアラメを用いるのではなく、1~3時間陰干したアラメでなければそれらを釣り上げることができないとされている。²¹⁾ ま

*¹ BCP91-IV-D-4*² 東北区水産研究所 (Tohoku National Fisheries Research Institute, Shinjima, Shiohama, Miyagi 985, Japan).*³ 福島県水産試験場 (Fukushima Prefectural Fisheries Experimental Station, Onahama, Iwaki, Fukushima 970-03, Japan).*⁴ 函館工業高等専門学校 (Department of Industrial Chemistry, Hakodate Technical College, Hakodate, Hokkaido 042, Japan).*⁵ 北海道大学理学部 (Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060, Japan).

た, 近年各界の栽培漁業センターで, 生鮮なアラメに対してはアワビやウニの食い付きが極めて悪いことが知られるようになって来た。^{*} さらに, 天然におけるアワビやウニは, 生育状態のアラメを直接摂食することが少なく, 藻体から離脱した側葉や基質から脱落した藻体が流れ藻となった状態を主として摂食することが以前から知られていた。これらの事実は, 生育あるいは生鮮な状態のアラメが摂食され難く, 死亡したアラメが摂食され易いことを示しており, 生育状態における化学的防御機構を示唆するものである。谷口ら²²⁾は, アラメに近縁の日本海に産するツルアラメ *Ecklonia stolonifera* Okamura がアワビに摂食され難い²³⁾理由として, ツルアラメがフロログルシンのオリゴマーやポリマーであるポリフェノール化合物, すなわちフロロタンニン類を二次代謝産物として多量に生産, 蓄積することによって化学的に防御していることを明らかにした。その際, 比較に用いた乾燥アラメからのメタノール抽出物でもツルアラメ同様に水溶性部に摂食阻害活性を認めた。

以上の知見から, 海中に生育するアラメはツルアラメと同様に化学物質によって植食動物の摂食を阻害するという防御機構をもつことによって, 群落を維持する条件をなしているという仮説が導かれる。そこで, 生鮮なアラメおよび陰干後流, 海水浸漬処理したアラメのメタノール抽出物, アラメを陸上にあげ陰干した際に滲出してくる褐色の分泌物について, エゾアワビ *Haliotis discus hannai* Ino に対する摂食選択性試験を行ない, 得られた結果を比較してアラメの化学的防御機構について考察した。

材料および方法

試験に用いたアラメは宮城県松島湾で 1990 年 8 月に採集した。抽出は以下の 3 種の方法により行った。まず, I) 採集直後の生鮮なアラメ, および II) 採集後 3 時間陰干して 1 時間流海水に浸漬したアラメをそれぞれメタノールで 24 時間浸漬抽出を行ない, 抽出液を減圧濃縮後, エーテルと水で分配して脂溶性と水溶性画分を得た。また, III) 採集後 3 時間陰干した際に藻体から滲出してくる褐色の分泌物を集め, さらに藻体を蒸留水に数分間浸漬して水抽出液を得, それらの分泌物ないし抽出液をエーテルで抽出して同様に脂溶性と水溶性画分を得た。

脂溶性部をさらに 5% 水酸化カリウム溶液で抽出, 1 M 塩酸で酸性にした後, エーテル抽出して酸性部 (A) を得た。脂溶性部から酸性部を抽出した残りのものは, 塩基成分がほとんどないため, これを中性部 (N) とした。一方, 水溶性部を, 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。

生物試験には植食動物の摂食刺激物質の検定に用いられているアビセル板法²⁴⁾を改変した以下の方法^{22, 25-27)}を用いた。直径 20 cm のセルロースアルミシート (DC-Alufolien Cellulose, Merck 社製) の周縁部に直径 2 cm の円をそれぞれ等間隔で 16 区画描き, 交互に対照区と試験区とを配した。対照区にはエタノールで溶解した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)²⁸⁾を 7.5 μ g, 試験区には同量の PC と混合した各抽出画分を 75 μ g をそれぞれ吸着させた。この試験板を 20°C の恒温室内で水温を調整した濾過海水を満した塩化ビニール製水槽に沈めて後, 水温 20°C で 2 日間絶食させた平均殻長 3 cm のエゾアワビ 4 個体を収容して暗期 15 時間で対照区と試験区に対する摂食選択性を試験した。

各画分 12 回の繰り返し試験によって得られ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て次式の摂食選択性指数^{22, 25-27)}を求めるとともに, *t* 検定により有意差の検定を行った。

$$\text{摂食選択性指数 } E_i = \frac{P_i - p_i}{P_i + p_i}$$

ここで, P_i は対照区の食み跡数, p_i は試験区の食み跡数を示す。 $E_i = +1$ の場合, 試験区を全く摂食せず, $E_i = -1$ の場合, 対照区を全く摂食しないことを表わす。

上記の試験により, 摂食阻害活性が認められた酸性部 (A) については Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (2.5×90 cm, 溶媒; メタノール) により分画して A-1~4 部の 4 画分を得て試験を行った。また, 水溶性メタノール/アンモニア溶出部 (WMA) については水に溶解し, 酢酸エチル, 1-ブタノールを用いて順次溶媒抽出を行ない, 酢酸エチル可溶部 (WMAAc), 1-ブタノール可溶部 (WMABu), および水可溶部 (WMAH) の 3 画分を得て同様に試験を行うとともに, 各画分を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (2.5×90 cm, 溶媒; WMAAc, WMABu 部はメタノール, WMAH 部は水) により分画して試験した。摂食阻害活性の認められた画分についてはその化学的性状を検討するため, パニリン・硫酸法²⁹⁾によるフェノールの定性試験と ¹H- および ¹³C-NMR の測定を行った。

結 果

採集直後の生鮮アラメ, 採集後 3 時間陰干, 1 時間流海水浸漬アラメの各 1 kg 当り, および採集後 3 時間陰干した 1 kg 当りのアラメから得られた分泌物からの各

* 町口, 私信。

Table 1. Yields of fractions obtained from the fresh algal sample (I), a sample which was dried in the shade and then submerged in running sea water (II), and brown exudates of *Eisenia bicyclis* (III)

	(g/kg dry weight)		
	I	II	III
N	1.50	0.06	0.01
A	1.27	0.48	0.02
WM	3.35	0.79	0.08
WMA	1.72	1.03	0.23
WP	22.61	35.33	5.54

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.

画分の収量を比較すると (Table 1), WP 部を除く各画分では生鮮アラメにおける収量が最も多く、3時間陰干後1時間流水に浸漬したアラメではそれらが少なくなっており、分泌物として滲出していることがわかる。

これら3種のメタノール抽出物から得られた各画分のエゾアワビに対する摂食選択性の試験結果を Fig. 1 に示した。生鮮アラメでは A 部と WMA 部の2画分に明らかに摂食阻害活性 ($P < 0.05$) が認められた。一方、3時間陰干後1時間流水に浸漬したアラメの場合、摂食阻害活性は A 部では摂食選択性の指数値の低下がみられたもののなお認められた ($P < 0.05$) が、WMA 部では明らかに消失した。これらに対して、分泌物においては、A 部、WMA 部とも摂食摂食性指数からみた阻害活性は生鮮アラメの場合より明らかに強くなった。特に、WMA 部における阻害活性 ($P < 0.01$) は顕著であった。

3種の抽出物を通して摂食阻害活性のみられた画分は A 部と WMA 部である。このため、生鮮アラメのこれら2画分についてさらに Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーで分画し、A 部から A-1~4 画分を、また、WMA 部から酢酸エチル、1-ブタノールを用いて順次溶媒抽出を行い、WMAAc 部、WMABu 部、WMAH 部を得た。A 部および WMA 部 1 g 当りの各画分収量は A-1 が 0.16 g, A-2 が 0.54 g, A-3 が 0.12 g, A-4 が 0.17 g, WMAAc が 0.04 g, WMABu が 0.11 g, WMAH が 0.85 g であった。これらの画分を用いて試験した結果 (Fig. 2), A 部では A-3 及び A-4 部が極めて強い摂食阻害活性 ($P < 0.01$) を示し、A-1 部がそれらに次いで明らかな活性 ($P < 0.05$) を示したが、A-2 部には認められなかった。また、WMA 部では3種ともに明らかな摂食阻害活性 ($P < 0.05$) が認められた。

WMA 部の摂食阻害活性物質を特定するため、上記活性画分3種を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーによって分画して得た画分の生物試験を行った

Fig. 1. Feeding-deterrent activity against the abalone *Haliotis discus hannai* of fractions obtained from the methanol extracts of fresh sample (top), dried-soaked sample (middle), and exudates of *Eisenia bicyclis* (bottom). N, neutral part; A, acidic part; WP, fraction eluted with water from activated charcoal column; WM, fraction eluted with methanol; WMA, fraction eluted with methanol/ammonia. The shaded and dotted bars indicate the fractions having a significant effect of $P < 0.01$ and $P < 0.05$ on the feeding deterrent by *t*-test.

(Fig. 3). WMAAc-1 (WMAAc 部 100 mg 当り収量, 17 mg), -2 (21 mg), -3 (21 mg), -4 (41 mg) のうち、WMAAc-2 部には摂食阻害活性が全く認められなかったが、他には明らかな活性 ($P < 0.05$ または $P < 0.01$) が認められた。また、WMABu-1 (WMABu 部 100 mg 当り収量, 12 mg), -2 (29 mg), -3 (25 mg), -4 (12 mg), -5 (22 mg) では、WMABu-3 および -5 部 ($P < 0.01$) と WMABu-4 部 ($P < 0.05$) に明らかな阻害活性が認められた。WMAH-1 (WMAH 部 100 mg 当り収量, 38 mg),

Fig. 2. Feeding-deterrent activity of 4 fractions (A-1~4) obtained by Sephadex LH-20 column chromatography of the acidic part (A) and 3 fractions (WMAAc, WMABu, and WMAH) obtained by solvent partitioning of the WMA. The shaded and dotted bars indicate fractions with a significant effect of $P<0.01$ and $P<0.05$ on the feeding deterrent by t -test.

Fig. 3. Feeding-deterrent activity of fractions obtained by Sephadex LH-20 column chromatography of active fractions (WMAAc, WMABu, and WMAH). The shaded and dotted bars indicate fractions with a significant effect of $P<0.01$ and $P<0.05$ on the feeding deterrent by t -test.

-2 (36 mg), -3 (10 mg), -4 (16 mg) では, WMAH-3 部 ($P<0.01$) および WMAH-2, -4 部 ($P<0.05$) に明らかな阻害活性が認められた。

摂食阻害活性を示した画分はバニリン・硫酸法による定性試験ではすべて陽性であった。また, その ^1H - および ^{13}C -NMR スペクトルはそれぞれ δ 5.7~6.6, δ 94~162 にシグナルが認められ, 褐藻ツルアラメの摂食阻害活性物質であるフロログルシンのオリゴマーやポリマーであるフロロタンニン類²³⁾のスペクトルと酷似した。さらに, 活性画分の薄層クロマトグラフィー (TLC, Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, 溶媒; クロロフォルム/メタノール/酢酸 12:6:1) では $R_f=0.1\sim0.5$ にスポットを示し, ツルアラメのフロロタンニン類と同様なクロマトグラムであった。なお, 活性が認められなかった WMAAc-2 部はスペクトル分析 (^1H -NMR, IR, EIMS) からフロログルシンと同定した。これらのことからアラメの摂食阻害活性物質もツルアラメと同様にフロロタンニン類であることが判明した。

考 察

アラメのメタノール抽出物に対するエゾアワビの摂食選択性試験の結果, A 部と WMA 部に強い摂食阻害活性が認められ (Figs. 1~3), それらの主成分はフロログルシンのオリゴマーやポリマーであるフロロタンニン類であることが明らかになった。海藻におけるポリフェノール化合物は, 近縁のツルアラメ²²⁾のほか, ヒバマタ目褐藻の *Fucus vesiculosus* や *Ascophyllum nodosum*^{30,31)} およびコンブ科褐藻のアイヌワカメの 1 種 *Alaria marginata* の孢子葉³²⁾に多量に認められ, いずれも植食動物の摂食を阻害することが明らかにされている。

フロロタンニン類を主成分とするアラメのメタノール抽出物, WMA 部は, アラメを陰干と流水水浸漬処理することによってエゾアワビに対する摂食阻害活性が著し

く低下するのに対し、分泌物では生鮮な状態のアラメよりもさらに強い摂食阻害活性が認められた (Fig. 1)。これらのことは、アラメは、海中で生育している時はフロロタンニン類を二次代謝産物として生産し、周辺に分泌することによって植食動物の摂食から免れていることを強く示唆している。このため、アラメ群落内におけるアラメの死亡率は、アラメがフロロタンニン類を群落周辺に分泌して植食動物の集結と摂食を排除するという化学的防御機構によって、年齢に対応して一定であるとみなされる。^{3,4,5,20)}

アワビやウニがアラメの流れ藻を主として摂食するという事実は、藻体の着生基質からの脱落および側葉の藻体からの離脱にともなうフロロタンニン類含量の低下によるとみなすことができる。また、福島、茨城両県沿岸で古くから行われている「ドンボ釣り」は、アラメのもつアワビやウニに対する水に溶けにくい摂食刺激物質²⁸⁾と本研究により明らかになった水に溶け易い摂食阻害活性物質の、陰干処理による組成変化にともなったアワビやウニの摂食行動を巧みに利用した優れた漁法といえよう。

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。本研究は農林省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。記して関係各位に御礼申し上げる。

文 献

- 1) 谷口和也, 加藤史郎: 褐藻類アラメの年齢と生長. 東北水研研報, 46, 15-19 (1984).
- 2) 谷口和也, 鬼頭 鈞: アラメ群落における年級群組成の変動. 日本誌, 54, 1583-1588 (1988).
- 3) 谷口和也, 佐藤陽一, 長田 輝, 末永浩章: 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) 谷口和也: 牡鹿半島沿岸におけるアラメ群落の更新過程. 東北水研研報, 52, 9-12 (1990).
- 5) 谷口和也: アラメ群落の後継群形成に及ぼす間引き効果. 日本誌, 56, 595-597 (1990).
- 6) 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).
- 7) D. L. Leighton: Grazing activities of benthic invertebrates in kelp beds. *Beihft zur Nova Hedwigia*, 32, 421-453 (1971).
- 8) J. H. Himmelman and D. H. Steele: Foods and predators of the green sea urchin *Strongylocentrotus dracachiensis* in Newfoundland waters. *Mar. Biol.*, 9, 315-322 (1971).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) C. Land and K. H. Mann: Changes in sea urchin populations after the destruction of kelp beds. *Mar. Biol.*, 36, 321-326 (1976).
- 13) J. A. Kitching and F. J. Ebling: The ecology of Lough Ine XI. The control of algae by *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). *J. Anim. Ecol.*, 30, 373-383 (1961).
- 14) N. S. Jones and J. M. Kain: Subtidal algal colonization following the removal of *Echinus*. *Helgoländerwiss. Meeresunters.*, 15, 460-466 (1967).
- 15) R. T. Pain and R. S. Vadas: The effects of grazing by sea urchins, *Strongylocentrotus* spp., on benthic algal populations. *Limnol. Oceanogr.*, 14, 710-719 (1969).
- 16) 菊地省吾, 桜井保夫, 佐々木 実, 伊藤富夫: 海藻 20 種のエゾアワビ稚貝に対する餌料効果. 東北水研研報, 27, 93-100 (1967).
- 17) 浮 永久: エゾアワビに対するコンブ目海藻の餌料価値. 東北水研研報, 42, 19-29 (1981).
- 18) N. Uki, M. Sugiura, and T. Watanabe: Dietary value of seaweeds occurring on the Pacific coast of Tohoku for growth of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 257-266 (1986).
- 19) K. Taniguchi: Marine afforestation of *Eisenia bicyclis* (Laminariaceae; Phaeophyta). *NOAA Technical Report NMFS*, 102, 47-57 (1991).
- 20) M. Maegawa, W. Kida, Y. Yokohama, and Y. Aruga: Comparative studies on critical light conditions for young *Eisenia bicyclis* and *Ecklonia cava*. *Jpn. J. Phycol.*, 36, 166-174 (1988).
- 21) 田中二良: ウニ釣り漁法について. 水産増殖, 7, 57-59 (1960).
- 22) 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).
- 23) 吉田昭喜知, 土屋文人, 金山笙子: 生海藻 12 種類および乾燥海藻 8 種類のクロアワビ稚貝に対する餌料効果. 新潟水試村上支場研究報告, 2, 1-9 (1969).
- 24) K. Sakata, T. Itoh, and K. Ina: A new bioassay method for phagostimulants for a young abalone, *Haliotis discus Reeve*. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 425-429 (1985).
- 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).
- 26) K. Kurata, K. Taniguchi, K. Shiraishi, and M. Suzuki: Structures of secospatane-type diterpenes with feeding-deterrent activity from the alga *Dilophus okamurai*. *Tetrahedron Lett.*, 38, 1567-1570 (1989).
- 27) K. Kurata, K. Taniguchi, K. Shiraishi, and M. Suzuki: Feeding-deterrent diterpenes from the brown alga *Dilophus okamurai*. *Phytochemistry*, 29, 3453-3455 (1990).
- 28) K. Sakata, and K. Ina: Digalactosyldiacylglycerols and phosphatidylcholines isolated from a brown alga as effective phagostimulants for a young abalone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51, 659-665 (1985).
- 29) 船久保英一: 改著 有機化合物確認法 I, 養賢堂, 東京, p. 21 (1967).
- 30) J. A. Geiselman and O. J. McConnell: Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *Jour. Chem. Ecol.*, 7, 1115-1133 (1981).
- 31) P. D. Steinberg: Feeding preferences of *Tegula funebris* and chemical defenses of marine brown algae. *Ecol. Monogr.*, 55, 333-349 (1985).
- 32) P. D. Steinberg: Algal chemical defense against herbivores: Allocation of phenolic compounds in the kelp *Alaria marginata*. *Science*, 223, 405-407 (1984).