コンブ科褐藻数種のエゾアワビに対する摂食阻害活性

谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔

(1991 年 10 月 4 日受付)

Feeding-Deterrent Activity of Some Laminariaceous Brown Algae against the Ezo-abalone^{*1}Kazuya Taniguchi,^{*2} Kazuya Kurata,^{*3} and Minoru Suzuki^{*4}

Feeding-deterrent activities of the methanol extracts from the brown algae of the family Laminariaceae, *Ecklonia cava*, *E. kurome*, *Laminaria japonica*, *L. religiosa*, *L. angustata*, and *L. angustata* var. *longissima*, were tested on the ezo-abalone *Haliotis discus hannai* by a bioassay with the cellulose plate method. Three phlorotannin-rich fractions from the methanol extracts of *E. cava* and *E. kurome*, which are perennial algae, showed potent feeding-deterrent activity as in the cases of *E. stolonifera* and *Eisenia bicyclis*. On the other hand, none of the fractions from the methanol extracts of four *Laminaria* species, which are annual algae, showed any significant feeding-deterrent activity as in the cases of *Eckloniopsis radicata*. Among four perennial species, the feeding-deterrent activities are, in order of effectiveness, *E. stolonifera*, *E. kurome*, *E. cava*, and *Eisenia bicyclis*, this being in reciprocal proportion to their size. It was concluded that laminariaceous algae have a chemical defense mechanism against marine herbivores, which adaptively depends on the rate of algal growth and size.

著者らは、コンブ科褐藻ツルアラメ *Ecklonia stolonifera* Okamura, アラメ *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell, およびアントクメ *Eckloniopsis radicata* (Kjellman) Okamura の乾燥標本からメタノール抽出物を得て、エゾアワビ *Haliotis discus hannai* Ino に対する摂食選択性試験を行った結果、ツルアラメの水溶性画分に強い摂食阻害作用があることを見出した。そこで、摂食阻害活性を指標として分離精製を行ったところ、活性物質はフロログルシンの重合体であるフロロタンニン類であることを明らかにした。¹⁾ また、生鮮なアラメおよび陰干後流水水浸漬処理したアラメのメタノール抽出物、陰干中に藻体から滲出してくる褐色の分泌物を用いた生物試験によって、生育状態のアラメはツルアラメと同様にフロロタンニンを生産、海中に放出することによって植食動物の摂食に対して化学的に防御しているが、死亡しつつある場合にはフロロタンニン含量の低下によって摂食され易くなることを明らかにした。²⁾ これらの諸知見は、これまでに報告されているヒバマタ目褐藻^{3,4)}と

同様にアラメ、カジメ属においても二次代謝産物としてポリフェノール化合物が植食動物の摂食から免れる手段となっていること、種による摂食され難さの差異はポリフェノール化合物の生産量とその溶出し易さの違いによることを示唆している。このため、コンブ科褐藻種間における植食動物に対する摂食阻害活性の差異をもたらし生態学的な要因を、より多くの種の知見を得ることによって明らかにする必要がある。今回、カジメ属のカジメ *Ecklonia cava* Kjellman とクロメ *Ecklonia kurome* Okamura, およびコンブ属のマコンブ *Laminaria japonica* Areschoug, ホソメコンブ *L. religiosa* Miyabe, ミツイシコンブ *L. angustata* Kjellman, ナガコンブ *L. angustata* Kjellman var. *longissima* Miyabe の乾燥標本を得て、ツルアラメ等と同様にメタノール抽出物を用いてエゾアワビに対する摂食選択性試験を行ない、得られた結果からコンブ科褐藻 4 属における種間の摂食阻害活性の比較を行った。

^{*1} BCP91-IV-D-5^{*2} 東北区水産研究所 (Tohoku National Fisheries Research Institute, Shinama, 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).

Table 1. Yields of fractions obtained from the methanol extract of some laminariaceae algae (g/kg dry weight)

	N	A	AP	WM	WMA	WP
<i>Ecklonia cava</i>	2.45	4.18	1.87	2.73	4.06	162
<i>E. kurome</i>	3.85	4.99	4.68	4.34	3.59	142
<i>Laminaria japonica</i>	1.64	2.77	—	0.34	0.36	87
<i>L. religiosa</i>	2.15	4.26	—	0.41	0.70	115
<i>L. angustata</i>	1.00	4.45	—	0.99	0.42	65
<i>L. angustata</i> var. <i>longissima</i>	3.03	10.59	—	0.18	0.35	38

Symbols for the fractions are as follows: (N) neutral part, (A) acidic part, (AP) acidic precipitate, (WP) fraction eluted with water on activated charcoal column chromatography of the water-soluble part, (WM) fraction eluted with methanol on the above chromatography, (WMA) fraction eluted with methanol/ammonia on the above chromatography.

材料と方法

カジメは 1989 年 7 月徳島県阿部町にて、クロメは同年 7 月に山口県東和町にて、マコンブとミツイシコンブは 1990 年 7 月に岩手県種市町および久慈市にて、ホソメコンブは同年 7 月に北海道余市町にて、およびナガコンブは同年 7 月に北海道釧路市にて採集し、日陰で風乾した。これらの標本からメタノールで浸漬抽出した抽出液を減圧濃縮後、得られた抽出物をエーテルと水で分配して脂溶性部と水溶性部の粗画分を得た。脂溶性部を 5% 水酸化カリウム溶液で抽出、1 M 塩酸溶液で酸性にした後にエーテル抽出して酸性部 (A) を得た。この際、カジメ、クロメについてはエーテル不溶のタール状物質が生成するため、これらを濾取して酸性沈澱部 (AP) とした。脂溶性部から酸性部を抽出した残りのものは塩基性部がほとんどないため、これを中性部 (N) とした。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。これらの乾燥藻体 1 kg 当りの第 1 次画分収量を Table 1 に示した。

生物試験は、前報^{1,2)}と同様直径 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て、それらに対するエゾアワビの摂食選択性を求めることによって行った。⁵⁻⁹⁾ 対照区にはアワビ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)¹⁰⁾ を 7.5 μ g, 試験区には同量の PC と抽出画分 75 μ g をエタノールで溶解して吸着させた。この試験板で水温 20°C, 暗期 15 時間で、2 日間絶食させた平均殻長 2.5 cm のエゾアワビ 5 個体により試験した。画分毎に 12 回の繰り返し試験によって対照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⁵⁻⁹⁾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。

カジメクロメにおいて極めて強い摂食阻害活性が認められた AP 部と WMA 部については、さらに第 2 次画分を調製し、生物試験を行った。AP 部については Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (3.0×60 cm; 溶媒、メタノール) により分画して、それぞれ AP-1~4 部を得た。WMA 部は水に溶解後、酢酸エチル、および 1-ブタノールで順次抽出して、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 画分を得た。生物試験の結果から強い活性が認められた画分についてバニリン・硫酸法¹¹⁾によるフェノールの定性試験と ¹H- および ¹³C-NMR の測定を行って摂食阻害活性物質の化学構造を推定した。

結 果

Fig. 1 にカジメとクロメの各画分のエゾアワビに対する摂食選択性試験結果を示した。カジメの場合、WMA 部と AP 部が極めて強い摂食阻害活性 ($P < 0.01$) を示し、WM 部にも明らかに活性 ($P < 0.05$) が認められた。クロメもカジメと同様に AP 部と WMA 部が極めて強い活性 ($P < 0.01$) を示し、WM 部にも活性 ($P < 0.05$) が認められた。

一方、マコンブ、ホソメコンブ、ミツイシコンブ、ナガコンブにおいては、カジメとクロメにおいて WM 部と WMA 部に摂食阻害活性が認められたのに対してこれらの画分を含むいずれの画分においても明らかな摂食阻害活性は認められなかった (Fig. 2)。

カジメとクロメについて、極めて強い摂食阻害活性を示した AP 部から得た 4 種の第 2 次画分 [カジメ: AP-1 (AP 部 100 mg 当り収量 37 mg), AP-2 (23 mg), AP-3 (18 mg), AP-4 (22 mg)。クロメ: AP-1 (11 mg), AP-2 (12 mg), AP-3 (18 mg), AP-4 (59 mg)] および WMA 部から得た 3 種の第 2 次画分 [カジメ: WMAAc(WMA

Fig. 1. Feeding-deterrent activity of fractions obtained from the methanol extracts of *Ecklonia* against the ezo-abalone *Haliotis discus hannai*. Symbols for the fractions are the same as those shown in Table 1. The shaded and dotted columns indicate the fractions having a significant effect of $P < 0.01$ and $P < 0.05$ on the feeding-deterrent by t -test.

Fig. 2. Feeding-deterrent activity of fractions obtained from the methanol extracts of *Laminaria* against the ezo-abalone *Haliotis discus hannai*. Symbols for the fractions are the same as those shown in Table 1.

部 1g 当り収量 21 mg), WMABu (118 mg), WMAH (860 mg), クロメ: WMAAc (20 mg), WMABu (76 mg), WMAH (904 mg)] を用いて試験した結果を Fig. 3 に示した。カジメにおいては、AP-2, AP-3, AP-4 部および WMAH 部が極めて強い摂食阻害活性 ($P < 0.01$) を示し、WMAAc 部と WMABu 部にも明らかに活性 ($P <$

Fig. 3. Feeding-deterrent activity of the seven second fractions from *Ecklonia* against the ezo-abalone *Haliotis discus hannai*. Symbols for the fractions are defined in the text. The shaded and dotted columns indicate the same as those shown in Fig. 1.

0.05) が認められた。また、クロメにおいては AP-3 および AP-4 部が極めて強い活性 ($P < 0.01$) を示した他, AP-2 および WMABu 部, WMAH 部にも活性 ($P < 0.05$) が認められた。

摂食阻害活性を示した画分はバニリン・硫酸法によるフェノールの定性試験で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 $\delta 5.7 \sim 6.6, \delta 94 \sim 162$ にそれぞれシグナルが認められ, ツルアラメやアラメから単離したフロロタンニン類^{1,2)} と酷似したスペクトルを示した。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: クロロホルム/メタノール/酢酸 12:6:2) では, $R_f = 0.1 \sim 0.5$ にスポットを示し, フロロタンニン類と同様なクロマトグラムであった。これらのことから, カジメ, クロメの摂食阻害活性物質はツルアラメやアラメと同じフロロタンニン類と推定した。

考 察

エゾアワビを用いて摂食阻害活性の比較を行ったコンブ科褐藻 2 属 5 種 1 変種において, カジメおよびクロメのカジメ属 2 種には明らかな摂食阻害活性が認められたが, コンプ属には全く認められなかった (Figs. 1~3)。また, カジメおよびクロメの摂食阻害活性物質は, すでに同属のツルアラメ,¹⁾ およびアラメ属アラメ²⁾ より得られたフロログルシンの重合体であるフロロタンニンであると推定された。

フロロタンニン類を含有し, 摂食阻害活性が認められたカジメ属 3 種のカジメ, クロメ, ツルアラメとアラメ属アラメはいずれも多年生海藻であり, 活性が全く認められないコンプ属 3 種 1 変種とアントクメ属アントクメは 1~2 年生海藻である。^{12,13)} また, 乾燥藻体 1 kg 当りの摂食阻害活性物質を含む第 1 次画分収量は多年生海藻では多く, 1~2 年生海藻では少ない (Table 1 および谷口¹⁾)。すなわち, 成体に達するまで 1 年以上を要する多年生海藻^{12,13)} の方が, 速やかに生長し, 1 年未満で成熟する 1~2 年生海藻よりも植食動物に対する化学的防御機構を備えていることが明らかになった。

カジメとクロメの摂食阻害活性物質を含む第 1 次画分は AP 部, WM 部および WMA 部であった。それらの収量を合計するとそれぞれ 8.66 g と 12.61 g である (Table 1)。また, 以前報告したようにツルアラメは WM 部 10.08 g ($E_t = 0.79$) + WMA 部 6.05 g ($E_t = 0.95$) = 16.13 g, アラメは WMA 部 1.57 g ($E_t = 0.65$) の値が得られている。¹⁾ これらの収量に摂食選択性指数値 (Fig. 1 および谷口¹⁾) を乗じ, 得られた数値を合計することによって摂食阻害活性の程度を求めた。例えば, カジメ

の場合, AP 部, WM 部および WMA 部の収量がそれぞれ 1.87 g, 2.73 g, 4.06 g であり, それらの摂食選択性指数がそれぞれ 0.73, 0.67, 0.92 であるから摂食阻害活性の程度は次のように計算される。

$$1.87 \times 0.73 + 2.73 \times 0.67 + 4.06 \times 0.92 = 6.97$$

このように計算すると, ツルアラメは 13.71, クロメは 9.06, アラメは 1.02 となる。摂食阻害活性の程度は, はば第 1 次画分収量を反映している。つまり, 多年生海藻種間においてはツルアラメが最も高い摂食阻害活性をもち, クロメ, カジメ, アラメの順に活性が低下していくことを示している。カジメ属の中ではツルアラメが最も小型の種であり, クロメ, カジメの順に大型になる。^{12,13)} また, 多年生海藻の中で最も活性が低いアラメはコンプ型からカジメ型の形態を経て, 最終的に茎の上端で両側に枝を形成し, その上に多数の側葉をもつという形態変化を示す種である。^{12,14-16)} これらのことから, カジメ属 3 種とアラメの, 近縁の多年生海藻間における摂食阻害活性の程度は, 基本的には藻体の大きさに逆比例して小型の種ほど高いといえる。最も摂食阻害活性の高いツルアラメは多年生海藻とはいえず, 1~2 年生海藻のコンプ属褐藻やアントクメに似て短い茎状部をもち,¹²⁾ アラメおよびカジメのような長大な茎状部によって直立することはない。このため, 小型の種ほど植食動物に摂食され易いと考えられる。したがって, アラメ, カジメ属におけるフロロタンニン類による摂食阻害活性は生長速度および形態に対応した合理的な化学的防御機構であると結論できる。

アントクメは, 属間交雑試験によりカジメおよびクロメと交雑可能であるため, それらに最も近縁な種と考えられるが,¹⁷⁾ 摂食阻害活性が全く認められない。¹⁾ また, 静岡県伊豆半島沿岸ではカジメ群落の消滅域で植食動物による食害が多いにもかかわらず早期にアントクメの濃密な群落が形成され, その群落中に移植したカジメには食害が少ないことが記録されている。^{*} 以上のことからアントクメはコンプ属褐藻と同様にカジメ属 3 種およびアラメと較べて生長が著しく速いことによって植食動物の摂食に対する阻害活性物質を生産することなく分化したものと考えられる。

謝 辞

生物試験の実施に当たり, 試験材料の御提供を賜った南海海区水産研究所 吉川浩二主任研究官, 徳島県水産試験場 小島 博増殖科長, 岩手県北部栽培漁業センター 千葉公郎上席専門研究員, 北海道中央水産試験場 吾妻行雄海藻科長, 北海道釧路水産試験場 名畑進一海藻科長および福島県栽培漁業協会 志賀 操常務理事始め

* 静岡県水産試験場伊豆分場資料, 122, 1-14 (1980).

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。
 記して関係各位に御礼申し上げる。

文 献

- 1) 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻ソ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。日水誌, 57, 2065-2071 (1991).
- 2) 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化学的防御機構。日水誌, 58, 571-575 (1992).
- 3) 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*. *J. Chem. Ecol.*, 7, 1115-1138 (1981).
- 4) P. D. Steinberg: Feeding preferences of *Tegula funebris* and chemical defenses of marine brown algae. *Ecol. Monogr.*, 55, 333-349 (1985).
- 5) 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).
- 6) K. Kurata, K. Taniguchi, K. Shiraishi, and M. Suzuki: Structures of secospatane-type diterpenes with feeding-deterrent activity from the brown alga *Dilophus okamurai*. *Tetrahedron Lett.*, 30, 1567-1570 (1989).
- 7) K. Kurata, K. Taniguchi, K. Shiraishi, and M. Suzuki: Feeding-deterrent diterpenes from the brown alga *Dilophus okamurai*. *Phytochemistry*, 29, 3453-3455 (1990).
- 8) 白石一成, 谷口和也, 蔵多一哉, 鈴木 稔: 褐藻フクリン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。日水誌, 57, 1591-1595 (1991).
- 9) 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。日水誌, 57, 1945-1948 (1991).
- 10) 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).
- 11) 船久保英一: 改著 有機化合物確認法 I, 養賢堂, 東京, p. 21 (1967).
- 12) 岡村金太郎: 日本海藻誌, 内田老鶴圃, 東京, pp. 266-273 (1936).
- 13) 瀬川宗吉: 原色日本海藻図鑑, 保育社, 東京, pp. 43-44 (1956).
- 14) 谷口和也, 鬼頭 鈞: アラメ群落における年級群組成の変動。日水誌, 54, 1583-1588 (1988).
- 15) K. Yendo: On *Eisenia* and *Ecklonia*. *Bot. Mag., Tokyo*, 16, 203-206 (1902).
- 16) W. A. Setchell: Post-embryonal stages of the Laminariaceae. *Univ. California Publ., Botany*, 2, 115-138 (1905).
- 17) 右田清治: コンブ科海藻の交雑。海洋科学, 17, 713-718 (1985).