

発表番号 44

磯焼け生物サンゴモおよび関連藻類の化学成分

助成研究者名 石橋正己(千葉大学大学院薬学研究院)

共同研究者名 奥山恵美(千葉大学大学院薬学研究院)

1. サンゴモ科海藻の成分研究

房総半島天津小湊町にてサンゴモ科紅藻3種(ピリヒバ: *Corallina pilulifera*, ウスカワカニノテ: *Amphiroa zonata*, ヘリトリカニノテ: *Marginisporum crassissimum*)を採取した。各サンゴモの抽出物についてグラム陽性の枯草菌(*Bacillus subtilis*)に対する抗菌活性試験, およびTLC(薄層クロマトグラフィー)分析を行った。その結果, ピリヒバ(*C. pilulifera*)の酢酸エチル可溶画分を選別し成分研究を行って, コレステロール関連化合物, pyropheophorbide a, モノアシルグリセリドを分離した。他の2種のサンゴモ(ウスカワカニノテ *A. zonata*, ヘリトリカニノテ: *M. crassissimum*)についても, 主にTLC分析の結果, ほぼピリヒバ(*C. pilulifera*)と同様の成分を含むことが示唆された。

2. 微細藻ライブラリーの構築と珪藻の成分

主に千葉県沿岸で採取した海水サンプルに栄養剤を添加し予備培養を行った。増殖した微細藻を顕微鏡下にてキャピラリーピペットで分離し, これまでのところ珪藻13種, 藍藻1種の単藻培養株を得た。また海洋動物ウミウシの一種であるムカデミノウミウシのフンより渦鞭毛藻を単離しその単藻培養株を得た。これらについてカブ型フラスコ中にて予備的大量培養を行い, 得られた藻体抽出物についてTLC分析, brine shrimp 毒性試験, 抗菌活性試験を行ったところ, 珪藻1種に弱いながら抗菌活性が認められた。またウミウシ由来の渦鞭毛藻の抽出物にbrine shrimp に対する毒性が認められた。また珪藻 *Odontella aurita* (NIES-589)を大量培養し, 藻体抽出物の酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーにより分離・精製を行い, グリセロリピド, 5 α , 8 α エピジオキシステロール硫酸エステルを単離した¹⁾。

3. 房総産海藻コレクションの作製と成分研究

房総半島館山市, 天津小湊町等において約100種の海藻を採取した。各々のメタノール抽出物について, *Artemia salina* 毒性試験, 抗菌活性試験, TLC分析等のスクリーニングを行い, 数種の海藻を選別し, その成分探索を行った。その結果, イシゲ(*Ishige okamurae*)よりフロロタンニンの一種 diphlorethohydroxycarmarol, アズマネジモク(*Sargassum yamadae*)より抗菌物質 sargahydroquinoic acid, アミジグサ(*Dictyota dichotoma*)よりガラクトシルジアシルグリセロール等を単離した。

1) Toume, K.; Ishibashi, M. *Phytochemistry* 2002, 61, 359-360.

19

助成番号 0219

磯焼け生物サンゴモおよび関連藻類の化学成分

助成研究者名 石橋正己 (千葉大学大学院薬学研究院)

共同研究者名 奥山恵美 (千葉大学大学院薬学研究院)

① 研究目的

岩礁生態系における遷移機構の解明には、海藻群落や動物群集の構造を調べるとともに海洋動植物の適応戦略を明らかにする必要がある。とくに紅藻サンゴモ科が優先して極相状態を示す「磯焼け」海域において、サンゴモと海洋無脊椎動物の情報交換はいかにあるのかという問題は重要であり、なかでも化学的情報に興味もたれる。すなわちサンゴモまたはサンゴモと共存する微細藻等に由来する化学物質が海洋無脊椎動物の浮遊幼生の変体を誘発または阻害することも考えられる。

サンゴモ科 (Corallinaceae) 藻類は、体に多量の石灰を沈積し、とくに温帯海域では水深 20~30mの海底が無節サンゴモ類によって覆われることが多い。本研究では、サンゴモ科紅藻に含まれる化学成分の探索を行い、それら化学成分の生物活性を明らかにすることにより、化学成分の磯焼け海域で果たす役割を解析することを目的とする。対象としては、千葉県周辺で採取されるサンゴモを中心とした海藻類および微細藻類を主に取り上げ、これらの抽出物の海洋動物・微生物等に対する生理活性試験を行いながら、成分の分離精製を行う。本研究により、サンゴモ等海藻に含まれる特有の生理活性物質が明らかにされれば、磯焼け形成をはじめとする海洋岩礁生態系における遷移機構に関する化学的根拠が与えられることが期待される。

② 研究方法

1) サンゴモの入手：研究材料として、とくに千葉県沿岸海域において棲息するサンゴモ科等海藻の集中的な調査ならびに採取を行う。この際一度に採取する生物材料は少量にとどめ、環境保全に配慮する。本研究では、サンゴモ科等海藻分類学の専門家である千葉県立中央博物館植物学研究科の宮田昌彦博士との共同研究を通じて、房総半島周辺におけるサンゴモ科等の海藻の採取を行う。

2) 生物活性物質の分離・精製：1)で得られた各々のサンゴモ等の海藻をメタノール等有機溶媒で抽出し、各々の抽出物について、海洋動物または微生物への生理活性に関する生物検定試験 (*Artemia salina* 等の海洋動物への作用、抗菌作用等)を行う。活性が認められたサンゴモ等の海藻の抽出物について、溶媒分画により数種の画分に

分配し、同様の生物検定試験を行いながら、各画分について各種分離用担体を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、活性成分を単離する。

3) 活性物質の化学構造の決定: 2)で分離された活性物質に対して、各種スペクトル的手法ならびに化学的手法を組合せて、化学構造を解明する。さらに、最新のスペクトル的手法を取り入れることにより、精密な立体構造の解明ならびに活性発現機構との関連について解析する。

③ 研究結果

1. サンゴモ科海藻の成分研究

サンゴモ科海藻はこれまでに成分研究の報告があまりなく、その成分に興味もたれ、成分検索を行った。

房総半島天津小湊町にてサンゴモ科紅藻3種(ピリヒバ: *Corallina pilulifera*, ウスカワカニノテ: *Amphiroa zonata*, ヘリトリカニノテ: *Marginisporum crassissimum*)を採取した。この3種についてメタノール抽出後、それぞれ酢酸エチルと水と溶媒分配を行い、さらに *n*-ブタノールと水で分配を行った。

得られた各フラクションについてグラム陽性の枯草菌 (*Bacillus subtilis*) に対する抗菌活性試験、及び TLC(薄層クロマトグラフィー)分析を行った。その結果、ピリヒバ (*C. pilulifera*) の酢酸エチル可溶画分には、他の2種とは異なり、オレンジ色でドラッグエンドルフ試薬噴霧後、青色となるやや低極性の特徴的なスポットの存在が認められた。また、3種のサンゴモの酢酸エチル可溶画分は弱いながら抗菌活性を示した。

そこで、まずピリヒバ (*C. pilulifera*) の酢酸エチル可溶画分の成分研究を図1に示すスキームに従って行った。その結果、コレステロール関連化合物、pyropheophorbide a, モノアシルグリセリド (CP-1) を分離した。

Pyropheophorbide a は濃緑色で DMSO 以外のほとんどの有機溶媒には不溶であった。TLC 上では UV 254 nm で吸収し、UV 360 nm で赤く発色した。MS スペクトルから分子量が 534 と示唆され、また、¹H NMR の結果から、本化合物は以前当研究室でアメフラシより単離された pyropheophorbide a と同定した。本化合物は 2 型単純ヘルペス

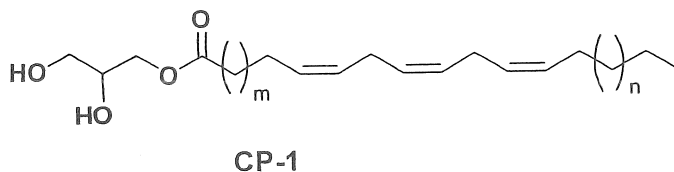
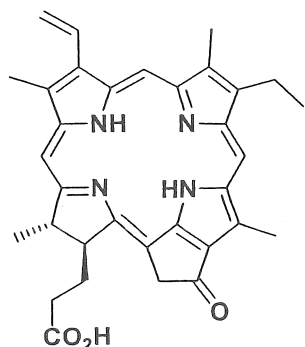
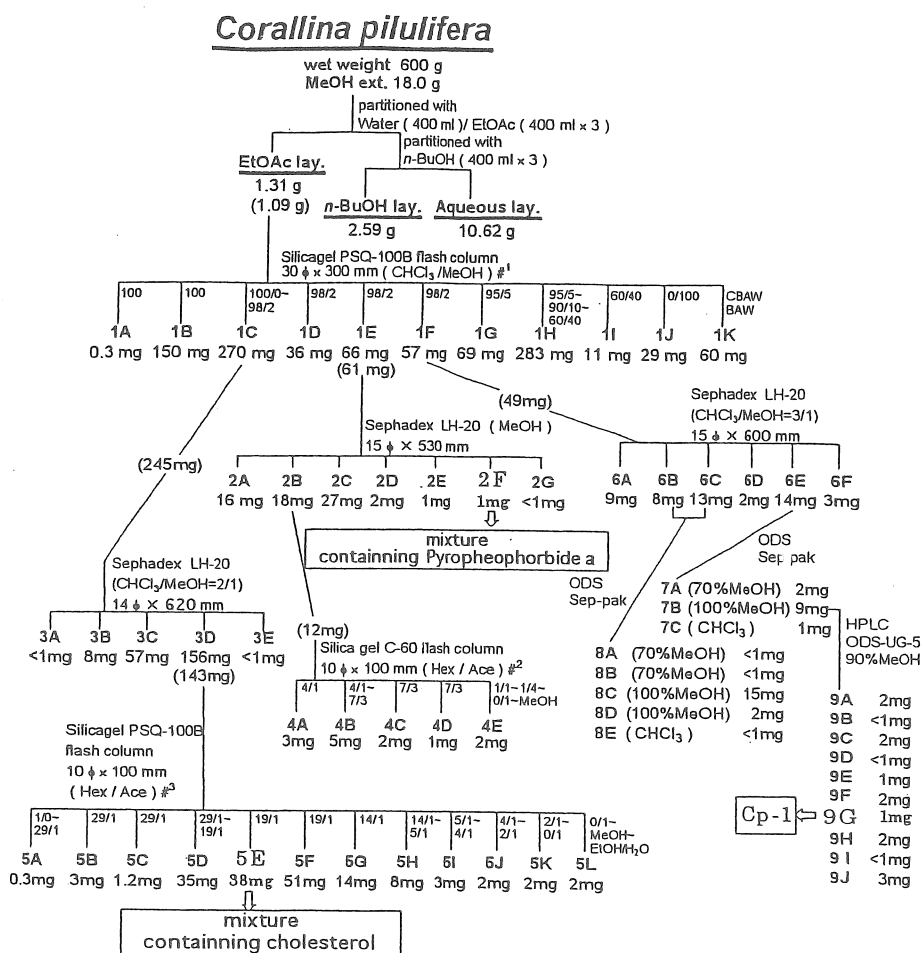


図1. ピリヒバ (*C. pilulifera*) の成分分画

ウィルス(HSV-2)に対して抗ウィルス活性を示すことが報告されている。

CP-1 は ¹H NMR の解析により、グリセロールの1位のヒドロキシル基に不飽和脂肪酸がエステル結合したモノアシルグリセロールであることが判明した。側鎖の脂肪酸部分には非共役の二重結合が三つ存在しているものと推定した。

他の2種のサンゴモ (ウスカワカニノテ: *Amphiroa zonata*, ヘリトリカニノテ: *Marginisporum crassissimum*) についても、主に TLC 分析の結果、ほぼピリヒバ (*C. pilulifera*) と同様であることが示唆された。

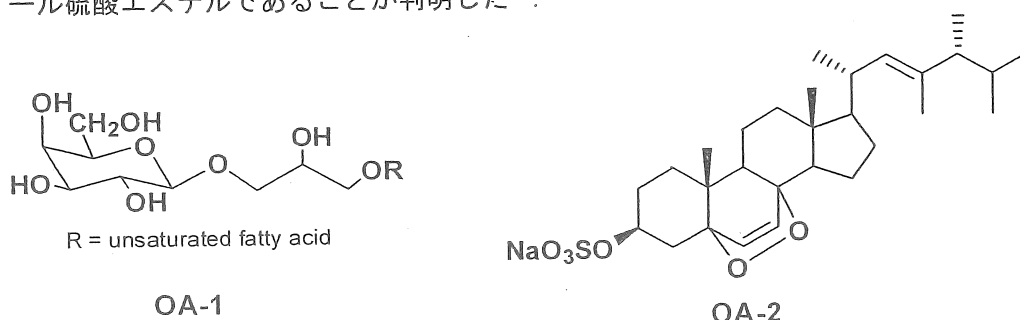
2. 海産珪藻 *Odontella aurita* ならびに *Lithodesmium variable* の培養と成分検索

海産微細藻はこれまでの研究から興味深い化合物を生産することが知られている。文献検索の結果、国立環境研究所(NIES)より分譲を受けた *Odontella aurita* (NIES-589) および *Lithodesmium variable* (NIES-588)に関する成分研究例は報告されておらず、その成分に興味もたれた。*Odontella aurita* (NIES-589)および *Lithodesmium variable*

(NIES-588)を f/2 海水栄養補強剤を 1% 添加した天然海水中, カブ型フラスコにて 25 ℃, 16 時間明・8 時間暗の光照射サイクルを繰り返し, 静置培養を行った. また培養条件の検討を行い, 3 週間の培養期間を設定した.

濾過により藻体を収穫し, それぞれメタノール抽出後, 酢酸エチル, *n*-ブタノール, 水にて溶媒分配を行った. 得られた各溶媒可溶部について種々の検出試薬を用いて TLC 分析, 枯草菌に対する抗菌活性試験等のスクリーニングを行った.

TLC 分析において特徴的なスポットがみられた *O. aurita* の酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーにより分離・精製を行い, NMR を中心とした各種スペクトルデータの解析の結果, グリセロリポド OA-1, ステロイド硫酸エステル OA-2 を単離した. OA-2 は高分解能 FABMS より分子式 $C_{29}H_{46}O_6SNa$ をもつことが示され, 1H および ^{13}C -NMR データを類似化合物と比較することにより 5 α , 8 α エピジオキシステロール硫酸エステルであることが判明した¹⁾.



3. 微細藻ライブラリーの構築に関する研究

微細藻は, 自然界から大量に採取することは困難であるため, 多くの種の微細藻は未だ成分探索の対象とはなっていない. 成分探索素材としての微細藻の確保を目的に微細藻ライブラリーの構築を行った.

千葉県ならびに沖縄県にてプランクトンネットまたは直接採取した海水サンプルに栄養剤を添加し予備培養を行った. 増殖してきた微細藻を顕微鏡下にてキャピラリーピペットで分離し, これまでのところ珪藻 13 種, 藍藻 1 種の単藻培養株を得た. また海洋動物ウミウシの一種であるムカデミノウミウシのフンより渦鞭毛藻を単離しその単藻培養株を得た.

さらにカブ型フラスコ中にて予備的大量培養を行い, 得られた藻体抽出物について今後の成分探索材料として選別すべく, TLC 分析, brine shrimp に対する毒性試験, 抗菌活性試験を行ったところ, 珪藻 1 種に弱いながら抗菌活性が認められた. またウミウシ由来の渦鞭毛藻の抽出物に brine shrimp に対する毒性が認められた. またトリプシンに対するプロテアーゼ阻害活性試験等を行ったところ活性は認められなかった.

4. 房総産海藻コレクションの作製とスクリーニング

4. 1 房総産海藻の採取とスクリーニング

未利用資源からの生物活性天然物の探索研究の一環として、千葉県にて採取した海産藻類からの生物活性天然物の探索を行った。千葉県房総半島館山市、天津小湊町等において100種の実藻を採取した(表1)。各々のメタノール抽出物について、*Artemia salina* に対する毒性試験および枯草菌 *B. subtilis* に対する抗菌活性試験、TLC分析等のスクリーニングを行い、数種の実藻を選別しその成分について探索を行った。

4. 2 イシゲの成分研究

千葉県にて採取したイシゲ *Ishige okamurae* には brine shrimp に対する毒性が認められた。文献検索の結果、本褐藻に関する成分探索はほとんど行われていなかったため、その brine shrimp 毒性成分を中心に成分の探索を行った。

本褐藻抽出物は、TLC分析においてファストレッド試薬陽性の高極性成分が含まれていた。溶媒分配を行ったところ毒性とファストレッドにて発色するスポットは含水 MeOH 層に集約していた。TLC と brine shrimp 毒性を指標に各種クロマトグラフィーを用い分離精製を進めた(図2)。その結果、フロロタンニン類である IO-1 を単離した。各種二次元 NMR 等のスペクトルの詳細な解析の結果、構造を推定したところ IO-1 のアセチル化体が文献既知であることがわかった。そこで IO-1 をアセチル化し文献値のデータと比較することで、IO-1 を Diphlorethohydroxycarmarol と同定した(図3)。

図2. イシゲ *Ishige okamurae* の成分分画

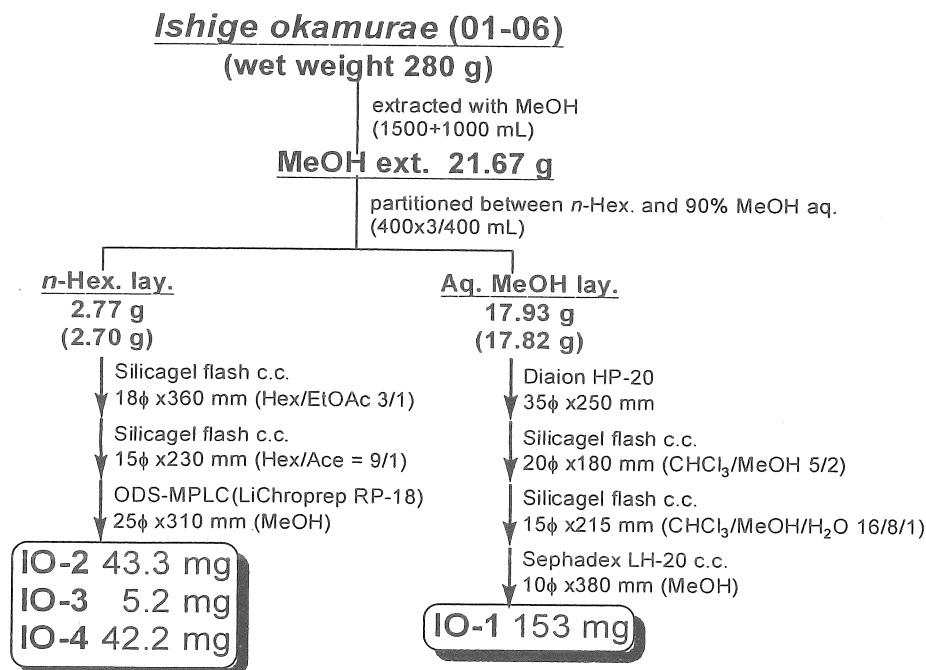


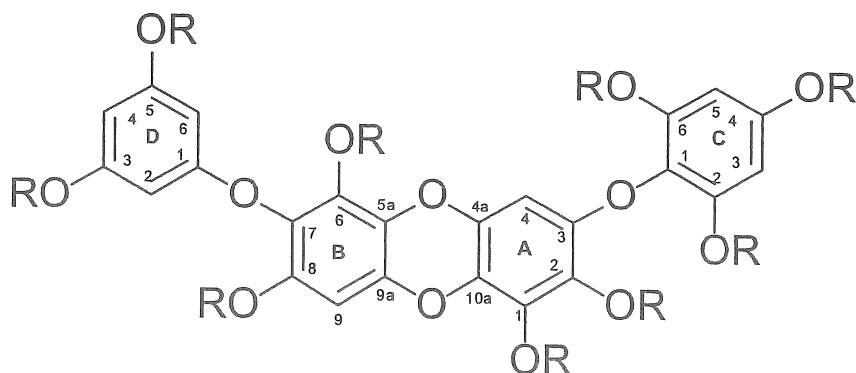
表 1. 海藻コレクション

stock No.	和名	Genus	species	3分類	種取地	MeOH wet (g)	MeOH (mL)	抗菌活性試験	Brine Shrimp Test
									1mg/mL
1	99-01	アナアオサ	<i>Ulva pertusa</i>	緑藻	宮津市竹園海岸	39.80	5600	—	0
2	99-02	ヒシホ	<i>Hiphia fastuiformis</i>	褐藻	251	19.30	1000*500	—	0
3	99-03	オゴノリ	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	紅藻	2,200	74.30	1100x5	—	0
4	99-04	マクサ	<i>Gelidium elegans</i>	紅藻	150	5.60	600x2+Ace.600x2	—	0
5	99-05	ビロヒバ	<i>Corallina pillifera</i>	紅藻	600	18.00	1200*800	—	0
6	99-06	ウスカワカニノテ	<i>Amphiroa zonata</i>	紅藻	350	8.30	1000*500	—	0
7	99-07	ヘリトカニノテ	<i>Marginisporum crassissimum</i>	紅藻	100	2.58	300x2	—	0
8	00-01	ベニオゴノリ	<i>Gracilaria rhodocaudata</i>	褐藻	256	8.76	1000*500	—	0
9	00-02	ヒラガラ?	<i>Gelaxaura</i> sp.	紅藻	77	1.15	750*150	—	0
10	00-03	マクサ	<i>Gelidium elegans</i>	紅藻	150	5.50	1200	—	0
11	00-04	オゴノリ	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	紅藻	487	74.20	8500	—	0
12	00-05	イキダ	<i>Ceramium</i> sp.	紅藻	202	4.75	1000*500	—	0
13	01-01	フクロフソ?	<i>Gloeropsia furcata</i>	紅藻	95	9.50	1500*600	—	0
14	01-02	ヒエモク	<i>Myagropis Yendoi</i>	褐藻	330	14.09	800*400	—	0
15	01-03	サナダクサ	<i>Pachycladon coriaceum</i>	褐藻	35	1.37	700*300	+	0
16	01-04	イロロ	<i>Ishige sinicola</i>	褐藻	230	16.28	1000*500	—	0
17	01-05	ウミトナゾ	<i>Sargassum thunbergii</i>	褐藻	170	12.38	1000*500	—	0
18	01-06	イソノ	<i>Ishige okamurae</i>	褐藻	280	21.67	1500*1000	—	2
19	01-07	ボタアサ	<i>Ulva conglobata</i>	緑藻	440	24.85	3000*1500	—	0
20	01-08	ヒトエガサ	<i>Monostroma nitidum</i>	緑藻	610	36.16	1000*500	—	0
21	01-09	アオモクサ	<i>Boodlea caeata</i>	緑藻	310	3.04	1000*500	—	0
22	01-10	イボツノマタ	<i>Chondrus verrucosus</i>	紅藻	240	8.57	1000*750	—	0
23	01-11	ハナフソ	<i>Gloeropsia complanata</i>	紅藻	220	7.76	500*300	—	0
24	01-12	フミノ	<i>Grateloupia elliptica</i>	紅藻	180	0.55	200*100	—	0
25	01-13	ビロヒバ	<i>Corallina pillifera</i>	紅藻	35	58.62	2000*1000	—	0
26	01-14	ウカメ	<i>Undaria pinnatifida</i>	褐藻	1,000	26.36	800*400	—	0
27	01-15	オオハマク	<i>Sargassum ringoldianum</i>	褐藻	320	22.49	—	—	0
28	01-16	ホンダワラ? (A)	<i>Sargassum fulvellum</i>	褐藻	460	2.89	—	—	0
29	01-17	ホンダワラ? (B)	<i>Sargassum fulvellum</i>	褐藻	470	5.88	—	—	0
30	01-18	ホンダワラ? (C)	<i>Sargassum fulvellum</i>	褐藻	130	12.00	—	—	0
31	01-19	ホンダワラ? (D)	<i>Sargassum fulvellum</i>	褐藻	195	3.26	—	—	0
32	01-20	ホンダワラ? (E)	<i>Sargassum fulvellum</i>	褐藻	120	6.09	—	—	0
33	01-21	ホンダワラ? (F)	<i>Sargassum fulvellum</i>	褐藻	120	70.50	1500*2	—	0
34	01-22	クモメ	<i>Ecklonia kureme</i>	褐藻	1,450	4.67	400x2	—	0
35	01-23	アナアオサ	<i>Ulva pertusa</i>	緑藻	100	3.04	300x2	—	0
36	01-24	カブサアサ	<i>Capsosiphon fulvescens</i>	緑藻	195	5.08	400x2	+	3
37	01-25	アミシクサ	<i>Dictyota dichotoma</i>	褐藻	130	5.04	400x2	—	0
38	01-26	ウミノ種	<i>Laurencia sp.</i>	褐藻	270	10.60	400x2	—	0
39	01-27	ウミトナゾ	<i>Sargassum thunbergii</i>	褐藻	60	2.58	300x2	—	0
40	01-28	ウミトナゾ	<i>Sargassum thunbergii</i>	褐藻	?	—	—	—	—
41	01-29	カイロモ	<i>Cladophora conchophera</i>	緑藻	?	—	—	—	—
42	02-01	アカモク(オス)	<i>Sargassum homeri</i>	褐藻	650	3.42	400 x 2	—	—
43	02-02	アカモク(メス)	<i>Sargassum homeri</i>	褐藻	1,370	2.65	400*200	—	—
44	02-03	フツナギ	<i>Lomentaria catenata</i>	紅藻	200	5.17	200*100	—	—
45	02-04	モリソ	<i>Solenia pacificum</i>	褐藻	360	0.262	100 x 2	—	—
46	02-05	フタモク	<i>Sargassum divaricatum</i>	褐藻	30	1.07	100 x 2	—	—
47	02-06	クロミル	<i>Codium divaricatum</i>	褐藻	50	0.709	100 x 2	—	—
48	02-07	マメタワ	<i>Sargassum pilliferum</i>	褐藻	40	3.09	200*100	—	—
49	02-08	ウカノモク	<i>Cystoseria hekadensis</i>	褐藻	120	0.76	300*150	—	—
50	02-09	フツナギ	<i>Lomentaria catenata</i>	紅藻	350	—	—	—	—

stock No.	和名	Genus	species	3分類	種取地	MeOH wet (g)	MeOH (mL)	抗菌活性試験
51	02-10	ウミウチク	<i>Padina arborescens</i>	褐藻	190	5.69	400*200	—
52	02-11	カモカシラハリ	<i>Dermonema pulvinatum</i>	紅藻	200	11.55	400*200	—
53	02-12	マクサ	<i>Gelidium elegans</i>	紅藻	60	1.14	200*100	—
54	02-13	ヒトツマツ	<i>Carpowellia affinis</i>	紅藻	150	5.36	300*200	—
55	02-14	アズマネジモク	<i>Sargassum yamadai</i>	褐藻	500	19.94	800*700	+
56	02-15	カイイハラノリ	<i>Hypnea japonica</i>	紅藻	950	6.5	400 x 2	+
57	02-16	ナラサモ	<i>Sargassum nigrifolium</i>	褐藻	150	5.35	300*100	—
58	02-17	ホンダワラ	<i>Sargassum fulvellum</i>	褐藻	100	—	—	—
59	02-18	糸網定			1,800	—	—	—
60	02-19	糸網定			130	—	—	—
61	02-20	糸網定			780	—	—	—
62	02-21	糸網定			780	—	—	—
63	02-22	アナアオサ	<i>Ulva pertusa</i>	緑藻	200	1.39	200 x 2	—
64	02-23	ユカリ	<i>Plocamium telfairiae</i>	紅藻	40	15	—	—
65	02-24				75	3.49	300 x 2	—
66	02-25	ヤブレクサ	<i>Ulva japonica</i>	緑藻	120	4.75	300 x 2	—
67	02-26	サイダイハラ	<i>Hypnea salsana</i>	紅藻	20	0.98	200 x 2	—
68	02-27	イハラハリ	<i>Hypnea charoides</i>	紅藻	425	—	—	—
69	02-28	アミシクサ	<i>Dictyota dichotoma</i>	褐藻	1,190	—	—	—
70	02-29	クロミル	<i>Codium divaricatum</i>	褐藻	1,990	6.1	400 x 2	—
71	02-30	クロミル	<i>Codium divaricatum</i>	褐藻	220	3.35	300 x 2	—
72	02-31	トサカノリ	<i>Meristotheca papulosa</i>	紅藻	85	4.83	300 x 2	—
73	02-32	サイミ	<i>Ahnfeltiopsis concinna</i>	紅藻	50	2.48	300 x 2	—
74	02-33	イワヒゲ	<i>Myelophycus simplex</i>	褐藻	205a	6.54	600 x 2	—
75	02-34	チヤシクサ	<i>Cladophora wrightiana</i>	褐藻	100	5.89	600 x 2	—
76	02-35	オオソコ	<i>Serritardia maxima</i>	紅藻	180	0.797	300 x 2	—
77	02-36				160	1.62	300 x 2	—
78	02-37	マカリカニノテ	<i>Marginisporum declinatum</i>	紅藻	35	1.62	300 x 2	—
79	02-38	ヘリトカニノテ	<i>Marginisporum crassissimum</i>	紅藻	70	3.73	400 x 2	—
80	02-39	ヘラヤハズ	<i>Dictyoeris prolifera</i>	紅藻	190	0.292	200 x 2	—
81	02-40	ヒラカサ	<i>Ptilophora subcostata</i>	紅藻	10	1.22	300 x 2	—
82	02-41	イハラノリ	<i>Hypnea charoides</i>	紅藻	25	6.43	400 x 2	—
83	02-42	ミソオゴノリ	<i>Gracilaria incurvata</i>	紅藻	70	0.592	200 x 2	—
84	02-43	オオフソ	<i>Gelidium pacificum</i>	紅藻	20	—	—	—
85	02-44	コブソフソ	<i>Laurencia undulata</i>	紅藻	50	—	—	—
86	02-45	ミツノカ	<i>Laurencia okamurae</i>	紅藻	20	—	—	—
87	02-46	ミツノカ	<i>Laurencia sp.</i>	紅藻	50	—	—	—
88	02-47	ヒトツマツ	<i>Carpowellia affinis</i>	紅藻	20	—	—	—
89	02-48	オオフソ	<i>Gelidium pacificum</i>	褐藻	480	2.06	300 x 2	—
90	02-49	アミシクサ	<i>Dictyota dichotoma</i>	紅藻	60	0.309	200 x 2	—
91	02-50	タンハリ	<i>Grateloupia elliptica</i>	緑藻	10	1.61	200 x 2	—
92	02-51	ジュズモの一種	<i>Chaetomorpha spiralis</i>	緑藻	50	—	—	—
93	02-52	ケイダ	<i>Ceramium tenerimum</i>	紅藻	75	—	—	—
94	02-53	トサカノリ	<i>Meristotheca papulosa</i>	紅藻	—	—	—	—
95	02-54	サイダイハラ	<i>Hypnea salsana</i>	紅藻	—	—	—	—
96	02-55	ヒトツマツ	<i>Carpowellia affinis</i>	紅藻	25	—	—	—
97	02-56	イハラハリ	<i>Hypnea charoides</i>	紅藻	500	3.41	700 x 2	—
98	02-57	イカノジ	<i>Mastocarpus yendoi</i>	褐藻	—	2.42	300 x 2	—
99	02-58	オキナウウキ			—	—	—	—
100	02-59	アミシクサ	<i>Dictyota dichotoma</i>	褐藻	—	—	—	—

Brine Shrimp Assay
 3: mortality > 2/3
 2: 2/3 > mortality > 1/3
 1: 1/3 > mortality > 0
 0: no mortality

図3. IO-1 の同定



R = H ; Diphlorethohydroxycarmalol



R = OH ; Diphlorethohydroxycarmalol nonaacetate

IO-1 は褐藻 *Carpophyllum maschalocarpum* より分離されていた²⁾。その分離は、粗分画をあらかじめアセチル化することにより行われていた。IO-1 のフェノール性ヒドロキシル基が存在する形での分離は今回が初めてである。

今回、IO-1 に対して細胞毒性試験を行った。すなわち抗ガン剤感受性細胞 (P388/S), ビンクリスチン耐性細胞 (P388/VCR) を用い、感受性細胞においては IO-1 の細胞毒性を、ビンクリスチン耐性細胞では、IO-1 によるビンクリスチン感受性の変化を評価した。各細胞に対する IO-1 の IC₅₀ 値は表 2 の通りであった。

表 2. IO-1 の細胞毒性

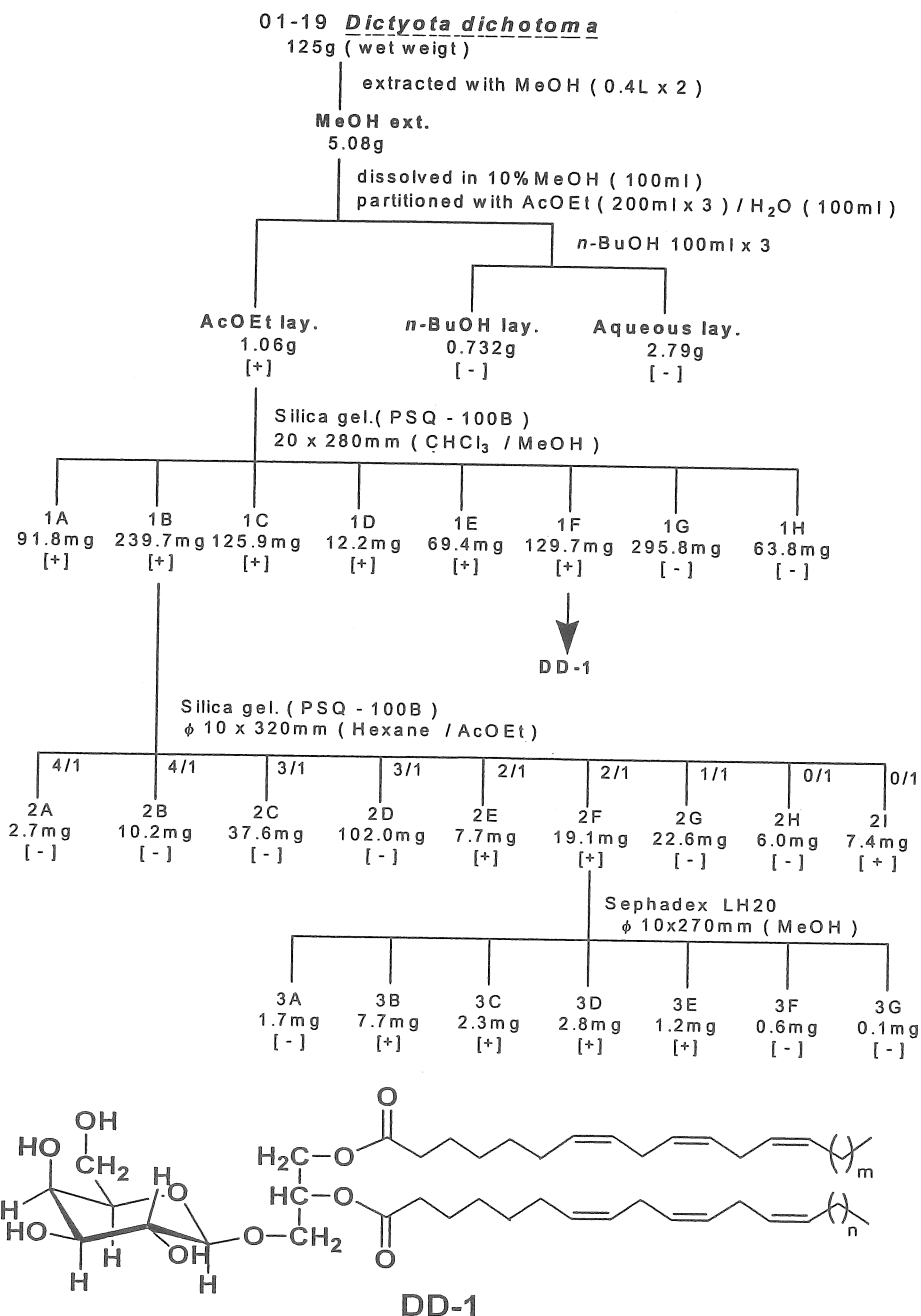
	IC ₅₀
P388/S	10.5
P388/VCR(+)	5.5
P388/VCR(-)	8.0

IO-1 では細胞毒性はみられたものの、抗ガン剤耐性克服作用は認められなかった。

また、甲殻類の一種である *A. salina*(Brine Shrimp) に対する毒性を評価した。この毒性を指標として分離を行った。分離の過程において IO-1 を含むフラクションは高濃度(1mg/mL)においてのみ強い毒性を示した。単離した IO-1 について毒性評価を行ったが、高濃度 (1mg/mL) においてのみ毒性は見られたものの、濃度を下げると毒性は示さなかった。

一方、本海藻抽出物の低極性ヘキサン可溶画分からは 3 種のステロール(IO-2~IO-4) を分離し、各種スペクトルデータより、それぞれ 24-hydroperoxy-24-vinyl-cholesterol, 24-methylenecholesterol, fucosterol と同定した³⁻⁵⁾。

図4. アミジグサ *Dictyota dichotoma* の成分分画



4. 5 アズマネジモクの成分研究

千葉県にて採取したアズマネジモク *Sargassum yamadae* の抽出物には枯草菌に対する抗菌活性が認められた。溶媒分画後、活性の認められた酢酸エチル可溶部をシリカ

ゲルカラム、セファデックス LH20 を用いて精製し、抗菌活性成分を単離した。各種スペクトルデータの解析の結果、抗菌活性物質は sargahydroquinic acid であると判明した⁶⁾。

④ 考察および今後の課題

房総半島にて採取した紅藻サンゴモ科3種の抽出物のうち枯草菌に対する抗菌活性が認められたピリヒバの酢酸エチル可溶画分について、成分探索を行い、色素、グリセロ脂質、脂肪酸、ステロール等を同定した。また、薄層クロマトグラフィーによる分析の結果では、これら3種のサンゴモは共通した成分が多いことが示唆された。これまでのところ、サンゴモ類に特有の化学成分の存在は明らかではないが、さらに詳細な成分探索を今後行っていきたい。

その他にも房総産の海藻サンプルの採取を行い、約100種の海藻抽出エキスをライブラリーを構築した。また、微細藻についても培養による藻体の供給を行うために基礎的な実験を行った。これらの藻類を材料としてこれまでも数種の生物活性天然物を単離したが、本ライブラリーを有効に活用することによりさらに興味深い生物活性物質が単離されることが期待されるため、現在さらに研究を継続して行っている。

⑤ 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御支援賜りましたソルト・サイエンス研究財団に深謝いたします。また海藻採取にあたり御指導いただいた千葉県立中央博物館・宮田昌彦博士に感謝いたします。

⑥ 文献

1. Toume, K.; Ishibashi, M. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 359-360.
2. Li, S. M.; Glombitza, K. W. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3417-3421.
3. Guyot, M.; Davoust, D.; Belaud, C. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 1905-1906.
4. Nasu, K.; Takahashi, K.; Morisaki, M.; Fujimoto, Y. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 381-385.
5. Tang, H.; Yi, Y.; Yao, X. *Chinese Journal of Marine Drug* **2002**, *21*, 1-4.
6. Segawa, M.; Shirahama, H.; *Chem. Lett.*, **1987**, 1365-1366.

Studies on the Chemical Constituents of Corallinaceous Algae and Other Marine Algae

Masami Ishibashi, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Emi Okuyama, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Chemical constituents of three Corallinaceous algae (*Corallina pilulifera* Postels et Ruprecht, *Amphora zonata* Yendo, and *Marginisporum crassissimum* (Yendo) Ganesan), collected at Tainoura, Amatsu-Kominat, Chiba, were studied by thin-layer chromatography screening as well as antimicrobial activity assay against *Bacillus subtilis*. These three algae were revealed to have very similar TLC profiles to one another, and EtOAc layers of three algae showed weak antimicrobial activity. The ethyl acetate-soluble fraction of the methanol extract of *Corallina pilulifera* was revealed to contain pigments such as pyropheophorbide a, monoacylglycerol, unsaturated fatty acids, and sterols.

Isolation of microalgae such as diatoms or dinoflagellates from seawater samples collected in Chiba and other places in Japan has been investigated to use the purified microalgae for mass culture in the laboratory and preliminary bioactivity-test screenings. Thirteen diatoms, one blue-green alga, and one dinoflagellate were separated. On the other hand, we also investigated the cultivation of microalgae obtained from the culture collection centers. A 5 α ,8 α -epidioxysterol sulfate was isolated from the cultured diatom *Odontella aurita* (NIES 589), and its structure was elucidated by spectroscopic methods.

We also collected almost 100 kinds of marine algae from Boso Peninsula and preliminary bioactivity-test screenings such as antimicrobial activity test against *Bacillus subtilis* and brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity test were carried out. Among them the chemical constituents of *Ishige okamurae*, *Sargassum yamadae*, and *Dictyota dichotoma* were investigated and a phlorotannin (diphlorethohydroxycarmarol), antimicrobial plastoquinone (sargahydroquinolic acid), and galactosyldiacylglycerol, respectively.