

## アオサが放出する赤潮生物増殖抑制活性物質に関する研究

浪越通夫

東京水産大学海洋環境学科

海洋沿岸域に無機栄養塩が流入して富栄養化されるのに伴い、赤潮の発生が頻繁に観測されているが、同じような富栄養海域でも、大型緑藻のアオサが増殖している場所もある。アオサが異常に繁殖した現象は、微細藻類の異常増殖による赤潮 (red tide) に対比して、green tide と呼ばれている。我々は閉鎖性の高い海洋沿岸域でアオサが優先種となる要因に興味を持ち、この研究に着手した。

アオサが異常増殖する場所の地形的な要因やアオサ自体の生物学的な特性が優先種となる重要な因子であるが、アオサが繁茂したところでは赤潮の発生が見られないという現象も観察された。そのようなことから、アオサは化学生態学的な戦略を用いて微細藻類の繁殖を妨げ、豊富な栄養を利用して大繁殖しているのではないかと考えた。そこで赤潮を形成する微細藻とアオサと一緒に培養したところ、微細藻の成長が押さえられるという現象を発見した。この研究で使用したアオサは横浜市の人工海浜公園「横浜海の公園」で採取し、継代培養しているものを用いた。赤潮生物にはラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* と渦鞭毛藻 *Prorocentrum minimum* の継代培養株を利用した。アオサと赤潮生物の混合培養は微細藻の至適条件で行った。アオサを単独で培養して得られた培養液を赤潮生物の培養液に加えたところ、微細藻の増殖が強く抑制された。また、アオサ培養液を酢酸エチルで抽出し、濃縮した抽出物を赤潮生物の培養液に加えても同じ効果を示した。よってアオサは赤潮生物の増殖を抑制する物質を培養液中に放出していると考えられたので、その物質の分離を行った。赤潮生物の増殖抑制試験にはプレート生物検定法を用いた。24穴のプラスチックアッセイプレートの各穴に検定用の赤潮生物と培養液および検定試料を入れて観察すると、活性物質を含む試料では約30分程で赤潮生物の細胞形態が変化し始め、その後直ぐに細胞の破壊、原形質の流出が認められた。このプレートアッセイを指標にして、アオサが培養液中に放出する赤潮生物増殖抑制活性物質の分離を行った。アオサ培養液を順次、酢酸エチル、n-ブタノールで抽出したところ、ブタノール抽出物が強い活性を示した。そこで、高速液体クロマトグラフィーによる分離操作を何度も繰り返して、この抽出物から赤潮生物増殖抑制物質の単離を行った。分離を進めて行くうちに、活性を示すフラクションが複数になり、個々のフラクションの活性も低下することが分かった。よって、増殖抑制活性には複数の化合物が関与していると推定した。そのうちの1種類を比較的単一にできたので、<sup>1</sup>H NMR を測定したが、物質量が少なすぎたために良いスペクトルが得られず、解析にはもう少し時間が必要であると思われる。



27

助成番号 0227

## アオサが放出する赤潮生物増殖抑制活性物質に関する研究

助成研究者：浪越通夫（東京水産大学海洋環境学科）

## 1. 研究目的

海洋沿岸域に無機栄養塩が流入して富栄養化されるのに伴い、赤潮の発生が頻繁に観測されているが、同じような富栄養海域でも、大型緑藻のアオサが増殖している場所もある。そのような場所では赤潮の発生は見られない。我々はこれまで、アオサが優先種となる原因を研究してきた。地形的な要因やアオサ自体の生物学的な特性が優先種となる重要な因子であるが、アオサは化学生態学的な戦略も用いているのではないかと考えた。

アオサは、アオサ目、アオサ科、アオサ属の海洋大型緑藻類で、外海に面した波の静かな岩礁域や内湾、河口域の岩や砂地の小石に多く観察される。日本沿岸によくみられる種はアナアオサ *Ulva pertusa*、ボタンアオサ *U. conglobata*、リボンアオサ *U. fasciata*、アミアオサ *U. reticulata*、ヤブレグサ *U. japonica*、ナガアオサ *U. arasakii* である。この中で、内湾性のアナアオサが最も広く分布し、量的にも多い [1]。アオサは生殖細胞によって繁殖する「生殖繁殖」と、栄養体の一部から波などの影響でちぎれてできた葉状断片が独立して新しい個体となる「栄養繁殖」の2通りの方法で繁殖する [2]。

1960年代になって、アナアオサに形態的に似ているが日本産の種とは異なるアオサが日本各地の内湾に繁茂しはじめ、その異常繁殖が確認された。異常繁殖型アオサは、海外からタンカーなどに付着して侵入した外来種、あるいは日本在来種との交雑種といわれている。このようなアオサの異常繁殖現象を植物プランクトンの異常発生“赤潮”(red tide)に対応し、“green tide”と呼ぶ。欧米ではアオサのみでなく他の緑藻の大発生も“green tide”の範疇にいれているが、日本では「アオサ類の大発生・繁殖した現象」と定義している。Green tideを形成するアオサは生殖繁殖のみならず、葉状断片による繁殖能力が非常に高い。

アオサは海水中の栄養塩類を吸収して生育するので、富栄養化した海の水質浄化や炭酸ガスの吸収に貢献していると考えられ、大量繁茂したアオサの水質浄化バイオフィルターとしての有効利用も検討されている。しかし、その異常な大量繁茂は環境に悪影響を及ぼし、優占的な繁茂は潮間帯の生態系にも悪影響を与えるため、green tideは重大な環境問題となっている [1, 3]。アオサが大量に発生し、波などの影響によってちぎれて浮遊した葉状断片は、船のスクリューに巻き込まれ、航行に悪影響をもたらしている。また、海底を覆うアオサの葉状断片により稚貝や稚魚、底棲性動物類が窒息するという被害も出ている。波打ち際に大量に打ち寄せられたアオサの葉状断片は、腐敗し、悪臭を放ち、潮干狩りや海水浴などのレクリエーションに美観や衛生上の問題から悪影響を及ぼし、海浜管理上の大きな障害をもたらしている [1]。

Green tide 形成の要因は、地形的な特徴による地理的要因、生育環境の化学的特徴による環境化学的要因、アオサの生物的特性による生理・生態的要因があげられる。地理的要因には、水の交換が少ない静穏な閉鎖的水域で、生殖細胞が付着できる岩礁や人工構築物が豊富にあり、葉状断片が栄養繁殖するのに有利な障害物が少ない砂地の海浜があることなどが挙げられる [1, 2]。

環境化学的要因には、生活排水や産業廃水によって起こされる富栄養化があげられる。一般に、窒素やリンなどの栄養塩の増加は藻類を増殖させ、富栄養化の影響を頻繁に受ける沿岸域の藻類は、高栄養塩における生長がよく、優占種となりやすい。しかし、増殖した藻体の腐敗による硫化水素の発生や、微生物分解による周辺海域の貧酸素化によって、その水域の水質は悪化する。よって、沿岸種の中でもこの富栄養化によって悪影響を受け排除される種と、富栄養化によって繁茂する種がある。ある種の藻類の生育にはこのような水質条件は悪影響となるが、異常繁殖型のアオサは生育することができるため、優占的に繁茂すると考えられている [2, 4-6]。

生理・生態的要因とは、生活史の観点からみた繁殖方法と栄養塩吸収、生長、生理的特性である。異常繁殖型のアオサは、主に栄養繁殖によって増殖するので、生殖繁殖による増殖よりも一段と効率的である。生殖繁殖は、成熟（生殖細胞形成）、放出、生殖細胞の着生、発芽、成長という過程を経なければならないが、栄養繁殖ではそのような過程を経ずに増殖しつづけることができる。このような栄養繁殖で増殖を続ける異常繁殖型アオサは、不稔性アオサといわれているが、生育条件によっては生殖繁殖も行うので、異常繁殖型アオサは環境に見合った方法によって繁殖することができる。このような異常繁殖型アオサは他の藻類に比べて栄養塩吸収能力に優れ、その生長速度は著しく速い [6-8]。また、アンモニアや硫化水素などによる水質悪化や、光強度、温度、塩分変化などの生理的ストレスに対する耐性を持ち、環境変動に対する適応能力に優れている [4-6]。

以上のような、地理的要因や環境化学的要因、生理・生態的要因は相互に作用しあい、相乗的に green tide が形成されると考えられる。我々が研究フィールドにしている横浜市「海の公園」に green tide が観察されるのは、これら全ての要因が存在しているからであると思われる。「海の公園」は1970年代末に人工海浜として誕生し、1980年代後半に人工島が造成されて環境が大きく変貌した。これに隣接する平潟湾は4本の都市河川から栄養塩が流入して富栄養化しており、この栄養塩は野島水路を経由して「海の公園」に流入している。人工島の造成による水域の閉鎖化により、「海の公園」に慢性的な富栄養化がもたらされた。このように、「海の公園」は green tide 形成の地理的、環境化学的要因が満たされた。また、ここに繁殖したアオサは、green tide 形成種に特徴的な生理、生態的特性を持つことが明らかとなった。

Green tide が形成される地理的、環境化学的、生理生態的要因は明らかとなったが、微細藻類ではなく、なぜアオサが繁茂するのかについての明確な理由は不明であった。

我々は、陸上植物でみられるようなアレロパシー、すなわち化学生態学的な戦略が関与しているのではないかと考えた。そこで、アオサを海洋沿岸域で大增殖する微細藻とともに混合培養したところ、微細藻の成長が押さえられるという現象を発見した。アオサを培養して得られた培養液は、東京湾で分離した赤潮形成種のラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* や渦鞭毛藻 *Prorocentrum minimum* の増殖を強く抑制した。

そこで本研究では、アオサが培養液中に放出している赤潮生物の増殖を抑制する物質の単離を目指して実験を行った。

## 2. 研究方法

### 生物試料

アオサは横浜市「海の公園」で採取され、東京水産大学資源育成学科応用藻類学研究室で継代培養されている株を使用した。藻体からのメタノール抽出に用いたアオサは「海の公園」で採取した。赤潮形成種のラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* と渦鞭毛藻 *Prorocentrum minimum* は、東京湾で採取され、単藻分離されて東京水産大学海洋環境学科浮遊生物学研究室で継代培養されている株を用いた。

### アオサと微細藻の混合培養

[アオサの前培養] コルクボーラーでアオサ藻体を直径 1.4 cm の円形に切り抜き、T1 改変培地 (mol/L :  $\text{NaNO}_3$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ; Fe-EDTA,  $5 \times 10^{-6}$ ;  $\text{ZnSO}_4$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ;  $\text{MnCl}_2$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ;  $\text{CoCl}_2$ ,  $2 \times 10^{-7}$ ;  $\text{CuSO}_4$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ; EDTA- $\text{Na}_2$ ,  $2.4 \times 10^{-5}$ ; Thiamine HCl,  $5.93 \times 10^{-7}$ ; Biotin,  $4.1 \times 10^{-9}$ ; Cyanocobalamin,  $7.38 \times 10^{-10}$ ; Tris - HCl (pH 8.0),  $5 \times 10^{-3}$ ) で前培養をおこなった。海水は、東海汽船(芝浦)から購入した八丈島沖の黒潮海水を用いた。使用前に membrane filter (0.45, 0.22  $\mu\text{m}$ ) で順次吸引ろ過した。天然海水に上の栄養素を加え、オートクレーブで 120  $^{\circ}\text{C}$ 、20 分間滅菌処理した。この培地 300 mL を 350 mL 容の通気培養用丸底フラスコに入れ、切り抜いたアオサを入れて、20  $^{\circ}\text{C}$ 、光強度 80  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  以上、長日周期 (14 L:10 D) で、5 日間通気培養した。

[微細藻の前培養] T1 改変培地 45 mL を 100 mL 容の三角フラスコに入れ、シリコ栓をしてオートクレーブ滅菌したものに、各微細藻けん濁液 5 mL を加え、20  $^{\circ}\text{C}$ 、光強度 150  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  以上、長日周期 (14 L:10 D) で、5 日間静地培養した。混合培養実験には、この前培養によって増殖期にある渦鞭毛藻 *P. minimum* とラフィド藻 *H. akashiwo* を最終濃度にしてそれぞれ約 200 cells/mL および 3000 cells/mL に調整した。

[混合培養] 100 mL 容の三角フラスコに T1 改変培地 45 mL を分注してオートクレーブ滅菌したものに、前培養したアオサ 3 枚と、微細藻の懸濁液 5 mL を加え、ガラス管で作った通気管と排気管を埋め込んだシリコ栓をした。通気管にはエアーフィルターをつけた滅菌済みチューブを付け、排気管には滅菌済みの綿で綿栓をした。これを微細藻に適した培養条件 (20  $^{\circ}\text{C}$ 、150  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、長日周期) で 5 日間通気培養した。

アオサのみを入れた実験区、微細藻のみのコントロール、およびアオサと微細藻の混合培養区をそれぞれ3本ずつ培養した。培養開始時と5日後にそれぞれの培養液をよく混合し、その2 mLを海水28 mLの入った測定用平底試験管に分注し、Turner デザインの蛍光光度計でクロロフィル-a 蛍光値を測定して細胞密度の変化を観測した。蛍光値と両微細藻の細胞数の相関式（下式）により、細胞数に変換した。

$H. akashiwo$  の細胞密度 (cells/mL) =  $-339.56 + 24164 \times C$  (感度:  $\times 1, \times 10$ )

$P. minimum$  の細胞密度 (cells/mL) =  $-6.1135 + 2339.4 \times C$  (感度:  $\times 1, \times 10$ )

(C は各赤潮生物のクロロフィル蛍光値 (実測値) をあらわす。)

### 赤潮生物増殖抑制活性試験

[検定法 1] この生物検定法には、100 mL 容の三角フラスコ (培地 50 mL) または 25 mm x 150 mm の測定用平底試験管 (培地 30 mL) を用い、微細藻を5日間培養して、増殖抑制作用をその細胞数の変化によって検出した。

100 mL 容の三角フラスコに 45 mL、測定用平底試験管に 29 mL の T1 改変培地を入れてオートクレーブ滅菌した。これに、検定試料 (アオサ培養液あるいは抽出液など) を加え、さらに上記のように前培養した微細藻を三角フラスコには 5 mL、試験管には 1 mL を入れて培養した (微細藻の最終濃度:  $P. minimum$ , 約 200 cells/mL;  $H. akashiwo$ , 約 3000 cells/mL)。培養初日と5日後に蛍光光度計で微細藻のクロロフィル蛍光値を測定した。

[検定法 2] この方法では 24 穴プレートを用いて顕微鏡観察により、微細藻の形態変化から増殖抑制活性の有無を判定した。

24 穴プレートの各 well に前培養した微細藻のけん濁液を 500  $\mu$ L 分注し、濃度調整した検定試料 (分離画分など) を 500  $\mu$ L 加えた (微細藻の最終濃度:  $P. minimum$ , 約 200 cells/mL;  $H. akashiwo$ , 約 3000 cells/mL)。検定試料を混合した直後 (0 分) と 30 分後に微細藻の細胞の状態を倒立顕微鏡で観察した。各 well 全体をよく観察し、全細胞に形態変化および細胞破裂、原形質の流出などによる致死が確認された場合に活性有り と判定した。

[検定試料の調製] 検定試料を少量の天然海水 (孔径 0.2  $\mu$ m の membrane filter でろ過滅菌) またはメタノールに溶解し、検定用培地で希釈して濃度を調整した。メタノールの最終濃度は 1%未満になるようにした。

[アオサ抽出液の調製] 横浜海の公園で採取したアオサを天然海水で良く洗い、さらに表面に付着しているものを歯ブラシで丁寧に落としてからメタノールに浸漬した。冷蔵庫で約 20 時間、時々振りまぜがら抽出した。デカンテーションしてメタノール抽出液を分離し、エバポレーターで濃縮乾固して検定用試料とした。

[ $H. akashiwo$  のメタノールに対する耐性 (メタノール濃度の決定)] T1 改変培地に  $H. akashiwo$  を入れ、最終濃度がそれぞれ 2, 1.5, 1, 0.5%になるようにメタノールを加えて、顕微鏡下で細胞の様子を観察した。この結果 (表 1) から、メタノール濃度は活性に全く影響のない 1%未満 (最終濃度) になるように調整した。

表1. *Heterosigma akashiwo* に対するメタノールの影響

メタノール濃度 (%)	0.5	1	1.5	2	
評価	◎	◎	○	△	◎ : 正常 ○ : 約20%弱の遊泳停止細胞がみられる △ : 約50%の遊泳停止細胞がみられる

赤潮生物増殖抑制活性物質の分離

[アオサの培養（培養液の調製）] 1 Lの通気培養用丸底フラスコに Grund 改変培地（1 L中:EDTA 2Na塩, 3.72 mg; FeSO<sub>4</sub>, 0.15 mg; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.26 mg; NaNO<sub>3</sub>, 42.5 mg; MnCl<sub>2</sub>, 12.6 μg; cyanocobalamin, 1 μg）を1 L加えてオートクレーブで滅菌した。これに、円形に切り抜いて（直径 1.4 cm）前培養したアオサを入れて 20 °C、光強度 80 μE/m<sup>2</sup>/s 以上、長日周期（14 L:10D）にて5～7日間通気培養した。得られた培養水をガラス繊維フィルター（GF/B: 1.0 μm, GF/F: 0.7 μm, GF/75: 0.3 μm）で順次吸引ろ過して、赤潮生物増殖抑制活性物質の分離に使用した。

[活性物質の分離] アオサ培養ろ過液（1 L）は順次、酢酸エチルと *n*-ブタノールで2回ずつ抽出した。ブタノール抽出液はエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥した（517 mg）。これを ODS カラムに吸着させ、水とメタノールの混合液でグラジエント溶出した。水-メタノール（1:9）溶出部（2.82 mg）に強い活性がみられた（15 ppm）ので、このフラクションを図1に示したように HPLC で繰り返し分離した。まず ODS カラム（関東化学 Mightysil RP-18 GP 250-10, 10 mm x 25 cm、流速 3 mL/min）に吸着させ、60% アセトニトリルで洗った後、100% アセトニトリルで活性物質（1.05 mg）を回収した。このフラクションを次に、C<sub>4</sub> カラム（関東化学 Mightysil RP-4 GP 250-10, 10 mm x 25 cm、流速 3 mL/min、95% アセトニトリル）で5つのフラクションに分離した。活性フラクション（820 μg, 6.6 ppm）をさらに C<sub>4</sub> カラム（関東化学 Mightysil RP-4 GP 250-4.6, 4.6 mm x 25 cm、流速 1.5 mL/min、93% アセトニトリル）で分離して8フラクションを得た。活性フラクション（230 μg, 5 ppm）を同じカラムでもう一度分離（90% アセトニトリル）した。活性ピークはリテンションタイム 3.65 分に独立して現れたので、この条件で繰り返し精製を行い、活性物質を数十μg（1 ppm）得た。

## 3. 研究結果

混合培養による微細藻の増殖抑制

横浜市「海の公園」で green tide を形成しているアオサが赤潮生物に対して化学生態学的能力（アレロパシー）を持つかどうかを検討するため、ラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* と渦鞭毛藻 *Prorocentrum minimum* に対する増殖抑制活性を調べた。これらの微細藻は、東京湾で1960年頃から頻発するようになった赤潮形成種である。

微細藻の生育に適した培養条件で、*P. minimum*（初期細胞密度 200 cells/mL）とアオサ、および *H. akashiwo*（同 3000 cells/mL）とアオサを同一容器内で混合培養した。培養初日と5日後の細胞数を表2と表3に示した。

表2. アオサと *Heterosigma akashiwo* の混合培養による細胞密度 (cells/mL) 変化

培養日数	<i>H. akashiwo</i> のみ	<i>H. akashiwo</i> + アオサ
0	3127	2719
5	44968	119

表3. アオサと *Prorocentrum minimum* の混合培養による細胞密度 (cells/mL) 変化

培養日数	<i>P. minimum</i> のみ	<i>P. minimum</i> + アオサ
0	172	202
5	337	18

微細藻のみを培養したコントロールでは、*H. akashiwo* と *P. minimum* の細胞数は5日間でそれぞれ約14倍と2倍に増加したが、アオサとの混合培養ではそれぞれ99.5%と91%の細胞が死ぬという著しい増殖抑制がみられた。この増殖抑制活性が化学物質によるものかどうかを検討するため、アオサ培養液を酢酸エチルで抽出した試料とアオサの藻体を抽出した試料を微細藻の培養液に加えて、同様の条件で5日間培養した結果、アオサ培養液と藻体抽出物の両方に、混合培養と同様の活性が再現した。

#### 赤潮生物増殖抑制活性試験

微細藻の増殖抑制活性試験には2種類の方法を用いた。生物検定試験では、試料を少量の滅菌海水またはメタノールに溶解し、検定用の培地で希釈して濃度調整した。メタノール濃度は1%までは *H. akashiwo* の細胞に全く変化を与えなかったため（表1）、最終濃度を1%未満になるように調整した。

検定法1は、50 mL (100 mL 容三角フラスコ) または 30 mL (平底試験管) の培養液を使用し、微細藻がアオサや検定試料による影響で増殖できずに細胞数が減少する様子と、影響なしに増殖する様子が比較できるので、混合培養、アオサ培養液や藻体抽出物の検定に適している。しかしながら、微量の活性物質を単離するための生物試験法としては、培養液の量が多すぎるため、検定法1は不利であった。検定法1において、赤潮生物の細胞の変化を顕微鏡下で観察したところ、細胞の破裂などが見られた。増殖抑制活性を示す試料濃度ではこのような細胞形態変化は30分以内に観察されたので、*H. akashiwo* と *P. minimum* の細胞形態変化を1 mL の培養液で短時間 (30分) に観察する検定法2を開発した。

*H. akashiwo* の細胞はソラマメ形で活発に遊泳しているが、増殖抑制活性物質が存在すると次第に遊泳を停止した。その後直ぐに細胞形態が球形に変化し、さらに細胞膜が破れて細胞質が溶出した。*P. minimum* も同様に通常は遊泳状態にあるが、増殖抑制活性物質により次第に遊泳を停止し、細胞の殻が破れて細胞質が流出した。顕微鏡観察の結果より、両微細藻共に細胞外皮に何かしらの影響を受けて、増殖が抑制されていると考えられた。*H. akashiwo* は *P. minimum* よりも影響を受けやすいが、これは *H. akashiwo* が細胞外皮に殻を持たないためであると思われる。

このような、細胞に形態変化を起こす増殖抑制活性はアオサを入れていない培養液にはみられなかった。よって、これらの微細藻類の増殖抑制はアオサが培養液中に放出する物



質によることが強く示唆された。そこで、アオサ培養液中に含まれる赤潮生物増殖抑制活性物質の探索を行った。

### 赤潮生物増殖抑制活性物質の分離

分離操作によって得られた分離フラクションの赤潮生物増殖抑制活性試験は、*H. akashiwo* を用いた検定法2を適用した。

アオサをその生育に最も適した培養条件 (Grund 改変培地、20 °C、光強度 80  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、長日周期 (14 L:10 D)) で培養した。培養液はガラス繊維フィルター (1.0  $\mu\text{m}$ , 0.7  $\mu\text{m}$ , および 0.3  $\mu\text{m}$ ) で順次吸引ろ過し、ろ液を酢酸エチルで洗浄した後、*n*-ブタノールで抽出して 517 mg の抽出物を得た (図1)。これは 100 ppm で *H. akashiwo* の細胞を完全に破壊した。ブタノール抽出物を ODS カラム (水-メタノールのグラジエント溶出) で5つのフラクションに分離した。そのうち、水-メタノール (1:9) 溶出部 (2.82 mg) が最も強い活性を示した (15 ppm で 100% の活性) (図1)。

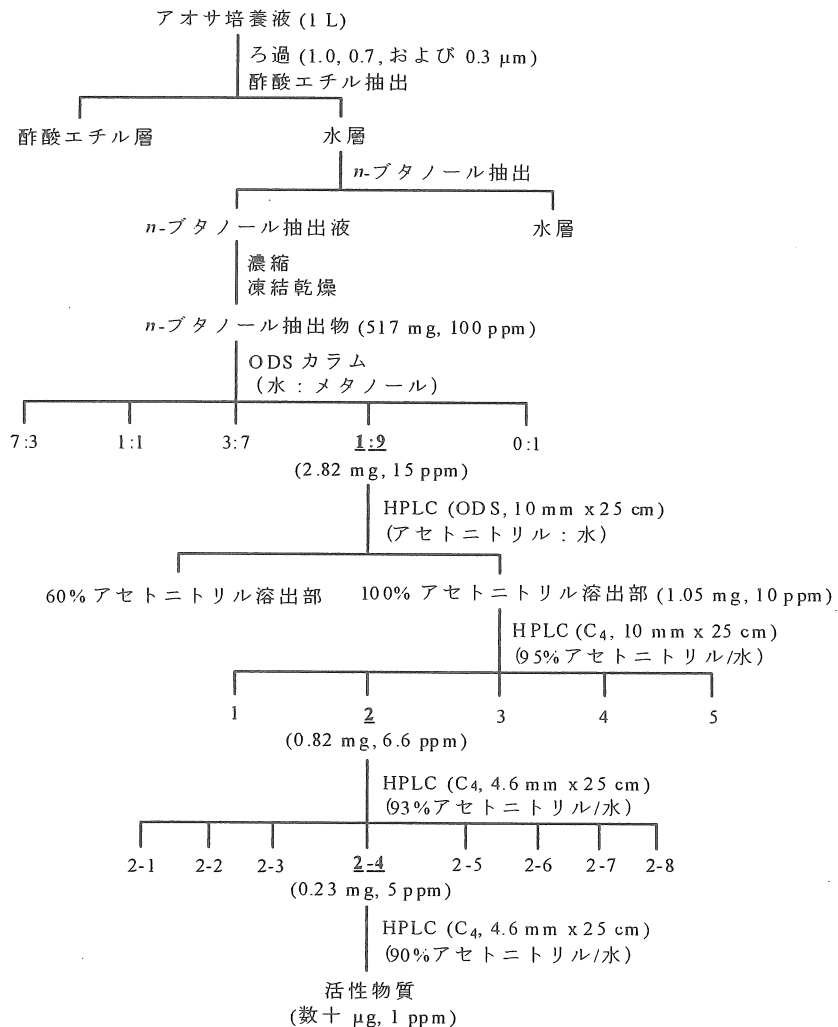


図1. 赤潮生物増殖抑制活性物質の分離フローチャート

図1の分離操作のフローチャートには、それぞれ最も活性の強かったフラクションの重量と100%の増殖抑制活性を示す濃度をカッコ内に記した。

水-メタノール (1:9) 溶出部は次に、ODS カラムで HPLC 分離を行った (図1)。60% アセトニトリル-水でカラムに吸着させ、同じ溶媒で洗浄した後、100% アセトニトリルで溶出した (1.05 mg, 10 ppm で100% の活性)。これを C<sub>4</sub>カラム (内径 10 mm) で HPLC 分離 (95% アセトニトリル-水) し、5つのフラクションを得た。このうち最も活性の強かったフラクション2 (0.82 mg, 6.6 ppm) をさらに C<sub>4</sub>カラム (内径 4.6 mm、93% アセトニトリル-水) で8フラクションに分離した。最も活性の強かったフラクション2-4 (0.23 mg, 5 ppm) を同じカラムで HPLC 分離を繰り返し、1 ppm で活性を示す化合物 (活性物質) を得た。この活性物質は微量であったため、正確な重量が測定できなかったが、<sup>1</sup>H NMR の測定結果から、数十μg であると思われる。

分離した活性物質を空气中で保存すると、増殖抑制活性が徐々に失われた。空気を遮断して保存すれば活性は保たれた。活性の低下にともない、活性物質の HPLC ピーク (3.65 分) が減衰し、1.67 分に検出されるピークが増大した。活性物質はおそらく、空気酸化され易い構造を持つと考えられる。

<sup>1</sup>H NMR スペクトルには、0.8~1.3 ppm 付近のメチル基の重なりや直鎖のメチレンに特有のシグナルが見られることから、脂肪鎖の存在が推定された。5 ppm 付近にはシグナルが検出できないことから、不飽和脂肪酸ではないと思われる。また、グルコース、ガラクトース、キノボースなどの糖に由来するシグナルも検出されなかった。分離の状況と NMR スペクトルから、今回分離した活性物質は単純な脂肪酸ではなく、脂質のようなものであることが示唆された。しかし、NMR スペクトルには不純物に由来すると思われるシグナルが少し検出されたことから、この活性物質はまだ完全に精製されていないことがわかった。また、分離できたサンプル量が少なすぎたためこれ以上の分離、構造解析は出来なかった。

#### 4. 考察

本研究では、大型緑藻のアオサの培養液に、赤潮を形成する微細藻の増殖を抑制する化学物質が存在することを明らかにし、そのうちの1種類の化合物を分離して、化学構造に関する情報を得た。

海洋におけるアレロパシーについてはこれまで、植物プランクトン間の報告が多く、タンニン様物質 [9, 10]、ヒドロキサム酸型の鉄キレート物質 procoentrin [11]、キレート作用を及ぼす多糖類 glycocalyx [12-14]、ステロイド様物質の aponin [15]、ポリエーテル化合物 amphidinol [16] などが知られている。

一方、海洋大型藻類における報告は少なく、そのほとんどは紅藻や褐藻の例である。紅藻アカバ *Neodilsea yendoana* から単離された高度不飽和脂肪酸

(5z,8z,11z,14z,17z)-eicosapentaenoic acid (EPA) は、緑藻ヒトエグサ *Monostroma oxyspermum* の成長と遊走子の定着を阻害する。同様の活性物質は紅藻 *Palmaria palmata*, *Chondrus yendoi*, *Ptilota filicina* から報告されている [17]。サンゴモ *Lithophyllum* spp. から分離された物質は、褐藻コンブ *Laminaria religiosa* の遊走子やラフィド藻 *Heterosigma akashiwo* の細胞を破壊する。コンブの藻場からサンゴモに遷移する現象 (磯焼け) に、このような物質が関与しているのではないかと示唆されている [18]。また、褐藻のオキナワモズク *Cladosiphon okamuranus* から単離された高度不飽和脂肪酸 (6z,9z,12z,15z)-octadecatetraenoic acid (ODTA) は、紅藻スサビノリの孢子付着阻害活性、褐藻アカモクやワカメの遊走子および数種の微細藻類に対する細胞破壊活性を示す [19]。本研究で明らかにしたアオサ培養液中の化学物質による微細藻類細胞形態変化は、これらの高度不飽和脂肪酸による活性と似ているが、アオサ培養液から分離した化合物の NMR には不飽和脂肪酸に由来するシグナルは検出されなかった。

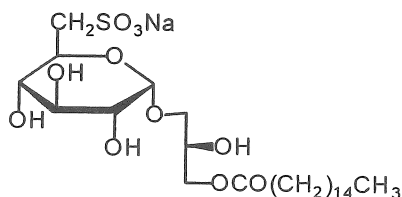


図 2 . 1-O-palmitoyl-3-O-(6'-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopyranosyl)-sn-glycerol (PSQG)

緑藻の例としては、ハネモ *Bryopsis* sp. から単離された 1-O-palmitoyl-3-O-(6'-sulfo- $\alpha$ -D-quinovopyranosyl)-sn-glycerol (PSQG) (図 2) がある [20]。この化合物は、付着性渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* に対する脱皮誘導因子として単離されたが、それ以前に溶血因子としてアナアオサからも単離されていた [21]。PSQG は脱皮のみを誘導するため、数日後に *G. toxicus* は再び殻を形成する。一方、本研究で得た赤潮生物増殖抑制活性物質により *P. minimum* は、殻が剥がれ、細胞質が吐出して死に至る。また、NMR 解析の結果、PSQG のような糖を持たないことが分かっている。よって、作用としては似ているが、本研究で得た赤潮生物増殖抑制活性物質は PSQG ではない。

大型海藻から得られたアレロパシー物質のほとんどは藻体抽出物から得られているが、本研究で明らかにした物質は培養液中に放出されているもので、その点でもアオサ由来の赤潮生物増殖抑制活性物質は大変興味深い。

## 5. 今後の課題

本研究では、大型緑藻類であるアオサの培養液中に放出される化学物質が赤潮生物の *Heterosigma akashiwo* と *Prorocentrum minimum* の増殖を抑制する作用を持つことを見出した。その培養液から赤潮生物増殖抑制活性物質を 1 種類分離し、化学構造に関する情報を得た。しかしながら、この活性物質は不安定な化合物で、しかも得られた量が少なかった

ために、最終的な構造決定には至らなかった。今後は今回の実験結果を踏まえ、大量の培養液から手早く活性物質を分離して、構造決定を完了できる量を単離する必要がある。また、今回得られた化合物以外にも複数の活性物質が存在することが分かったので、今後それらの単離と構造決定も行っていきたいと考えている。

## 6. 文献

- [1] 能登谷正浩, 「アオサの利用と環境修復」, 成山堂書店 (1999).
- [2] Fletcher, R. L. The occurrence of 'Green Tide' – a review. In: *Ecological Studies, Vol. 123. Marine Benthic Vegetation.* (Schramm, W.; Nienhuis, P. H. Eds.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. pp. 7-43 (1996).
- [3] Jiménez del Río, M.; Ramazanov, Z.; García-Reina, G. *Hydrobiologia* **1996**, 326/327, 61-66.
- [4] Floreto, E. A. T.; Teshima, S.; Ishikawa, M. *Bot. Mar.* **1996**, 39, 69-74.
- [5] Vermaat, J. E.; Stand-Jensen, K. *Mar. Biol.* **1987**, 95, 55-61.
- [6] 右田清. 長崎大学水産学部研究報告, **1985**, 57, 33-37.
- [7] Rosenberg, G.; Ramus, J. *Aquat. Bot.* **1984**, 19, 65-72.
- [8] Fujita, R. M. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1985**, 92, 283-301.
- [9] Pratt, D. M. *Limnol. Oceanogr.* **1966**, 11, 447-455.
- [10] 本城凡夫, 下鶴瀬忠, 上田直子, 花岡資. 日本プランクトン学会報, **1978**, 25, 13-19.
- [11] Trick, C. G.; Andersen, R. J.; Gillam, A.; Harrison, P. J. *Science*, **1983**, 219, 306-308.
- [12] Honjo, T.; Tabata, K. *Limnol. Oceanogr.* **1985**, 30, 653-664.
- [13] Yokote, M.; Honjyo, T.; Asakawa, M. *Mar. Biol.* **1985**, 88, 295-299.
- [14] 岡市友利, 門谷茂, 蓮井昭宏. 昭和 63 年度日本水産学会春季大会講演要旨, p. 91 (1988).
- [15] McCoy, L. F., Jr.; Martin, D. F. *J. Agric. Chem.* **1979**, 27, 69-74.
- [16] Satake, M.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Fujita, T.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9859-9861.
- [17] Suzuki, M.; Wakana, I.; Denboh, T.; Tatewaki, M. *Phytochemistry* **1996**, 43, 63-65.
- [18] Suzuki, Y.; Takabayashi, T.; Kawaguchi, T.; Matsunaga, K. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1988**, 225, 69-77.
- [19] Kakisawa, H.; Asari, F.; Kusumi, T.; Toma, T.; Sakurai, T.; Oohusa, T.; Hara, Y.; Chihara, M. *Phytochemistry* **1988**, 27, 731-735.
- [20] Sakamoto, B.; Hokama, Y.; Horgen, F. D.; Scheuer, P. J.; Kan, Y.; Nagai, H. *J. Phycol.* **2000**, 36, 924-931.
- [21] Fusetani, N.; Hashimoto, Y. *Ag. Biol. Chem.* **1975**, 39, 2021-2025.

**Growth Inhibition of *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum minimum*  
by the substances released from *Ulva* sp.**

Michio Namikoshi

*Department of Ocean Sciences, Tokyo University of Fisheries*

**Summary**

Overgrowth of microalgae in the eutrophicated coastal waters causes well-known “red tide”. In many relatively closed coastal waters, shallow lagoons and estuaries, mass development of macroalgal biomass has been observed. The most characteristic species of these macroalgae in the eutrophic Japanese coasts are the green algae *Ulva* spp. The mass occurrences of *Ulva* spp. result in the formation of so called “green tide”. We are interested in the reasons why *Ulva* spp. become the predominant species in these eutrophicated waters.

Two important factors of mass development of *Ulva* spp. are topographical elements and biological characteristics of these algae. While, a growth of microalgae is not observed in the coast where the mass of *Ulva* spp. is developed. We, therefore, assumed that *Ulva* spp. inhibit the growth of microalgae by chemical means. This speculation was proved by the following experiments. When *Ulva* sp. was cultured with *Heterosigma akashiwo* or *Prorocentrum minimum*, isolated from a red tide, the growth of microalgae was significantly inhibited. The same inhibition of microalgal growth was observed by the broth or the ethyl acetate extract of the broth cultured *Ulva* sp.

For the isolation of bioactive substances, the assay method using 24-well plastic plates were developed. The active fractions cause the morphological change of algal cells within 30 min, and after a short time, destruction of cells and leak of protoplasm were detected. The broth of *Ulva* sp. was extracted with ethyl acetate followed by *n*-butanol. The butanol extract showed the strongest activity and was subjected to bioassay-guided separation by high-performance liquid chromatography (HPLC). The inhibition of microalgal growth is revealed to be initiated by several compounds, since the activity was detected in the different fractions separated by HPLC. One of these active compounds was isolated and measured the proton nuclear magnetic resonance spectrum. Unfortunately, the spectrum was not good enough to elucidate the structure because of insufficient amounts isolated. The analysis of the structure is now in progress.