

研究成果報告書

研究課題名「網羅的代謝物解析によるホヤの生態制御物質の探索」

北海道大学大学院水産科学研究院 教授 酒井隆一

目的

噴火湾において外来種であるヨーロッパザラボヤ (*Ascidella aspersa*) が大量に繁殖し、ホタテガイ養殖に甚大な被害を与えており生態学的研究が進められている。ホヤの成分については古くから盛んに研究されており、多くの化合物がホヤから見出されているが、その生理的意義は不明なものが多い。本研究では、ホヤの生態に関連する分子を見出し、ホヤの化学生態学的知見を得るとともに、養殖ホタテガイに付着するヨーロッパザラボヤの駆除法を開発する研究の基盤を整備することを目的とした。

方法

函館沿岸に生息するヨーロッパザラボヤおよびシロボヤモドキ (*Cnemidocarpa irene*) を対象に研究を行った。採集したホヤを水槽で飼育し、幼生・卵・精子など各ライフステージの試料を準備した。

1. ヨーロッパザラボヤを解剖し、被囊・筋膜・内臓・卵・精子をそれぞれ2-プロパノールで抽出後、水/ブタノールにより溶媒分画し、水溶性成分と脂溶性成分を得た。また、卵と精子を人工授精させることで幼生を得た。幼生についても各組織と同様に抽出物を調製した。高速液体クロマトグラフィー/高分解能質量分析 (LC/MS) 装置を用いて各抽出物に含まれる代謝物の網羅的分析を行った。次に各抽出物のヨーロッパザラボヤ幼生の変態に対する影響を調べ、生物検定の結果と LC/MS 解析の結果から、幼生の変態を促進する抽出物に特異的な代謝物を探索した。化合物の同定は LC/MS 分析の保持時間、分子式、MS/MS スペクトルを標品と比較することで行った。

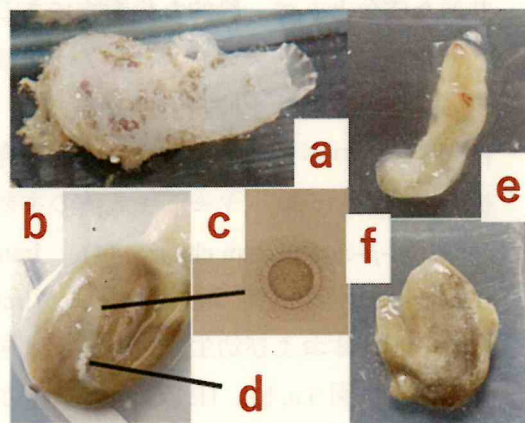


図 1. ヨーロッパザラボヤの各組織
(a: 解剖前, b: 被囊除去後, c: 卵, d: 精子, e: 筋膜, f: 内臓)

2. シロボヤモドキは目視による体組織の識別が困難であったため、解剖による卵・精子の採取はできなかったが、飼育中に孵化幼生を確認したため採取した。成体・幼体・幼生の各ライフステージの 50%メタノール抽出物を調製し、LC/MS 分析およびフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を用いた HPLC 分析を行った。シロボヤモドキの血液は蛍光を示すが¹、血球の成分分析は行われていなかった。そこで血液を血漿と血球に分離・抽出し、同様に HPLC および LC/MS 分析に供した。



図 2. 世代別シロボヤモドキ
(a: 成体, b: 幼体, c: 幼生)

結果

1. ヨーロッパザラボヤの組織別抽出物の LC/MS 解析を行ったところ、内臓に未知物質 **1**、**2**、卵および幼生に未知物質 **3** が多く含まれることを見出した。これらの化合物は分子式および MS/MS スペクトルから **1**、**2** は硫酸アルカン、**3** は

Methyl-phosphorylcholine であると推定した (図 3)。硫酸アルカン (**1**、**2**) はヨーロッパ産のホヤより細胞毒性物質として報告されている²。また、類似の硫酸アルカンがマボヤ中腸線に特異的な抗菌物質として見出されており、消化機能に関与すると推察されている³。卵および幼生に含まれる **3** はアメリカムラサキウニの卵より見出されている⁴。その生理機能は不明であるが、今回の

結果から水産生物の卵に一般的な成分である可能性が考えられる。現在、化合物 **1-3** の分離精製・構造解析を進めている。次に、各組織抽出物の幼生の変態に対する影響を調べたところ、筋膜・内臓・精子の水溶性成分に活性が見られたため、これらの抽出物に特異的な成分を探索した。その結果、共通な成分として一般的な代謝物であるベタイン類 (ホマリン、カルニチン、デオキシカルニチン、グリシンベタイン、コリン) とアミノ酸であるイソロイシン、タウリンを見出した。これらの化合物の変態促進活性を検討中である。

2. 世代別にシロボヤモドキに含まれる代謝物を網羅的に分析した結果、シロボヤモドキ成体の主要成分である *N*-methyl- β -carbolinium chloride (**4**)、 irenecarboline A (**5**)、 1,3,9-trimethyl-8-oxoisoguanine (**6**)¹、 irenepter-in D (**7**)⁵ の含有率が幼体および幼生においては大きく異なることを見出した (図 5 a, b)。HPLC 分析では幼体抽出物に化合物 **4-6** は検出されなかったが、より高感度な LC/MS 分析において微量ながら検出された。一方で **7** は LC/MS 分析においても検出されなかった。また、血漿と血球の成分分析の結果、ホマリン (**8**) および **4-6** は血漿に、**7** は血球に多く含まれることを見出した (図 5 c, d)。以上の結果から、**7** はホヤの成長とともに血球細胞が形成されていく過程で生合成されるものと思われる。これらの二次代謝物のホヤにおける生理機能について検討を進めている。

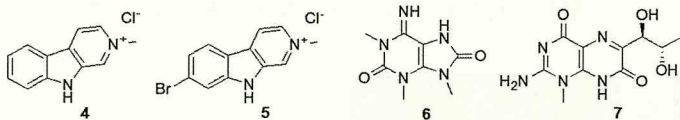


図 4. シロボヤモドキに含まれる主要二次代謝物

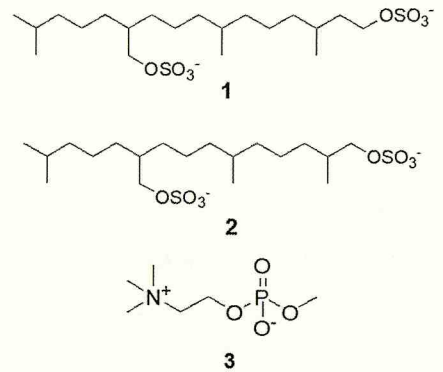


図 3. ヨーロッパザラボヤに含まれる未知代謝物の推定構造。

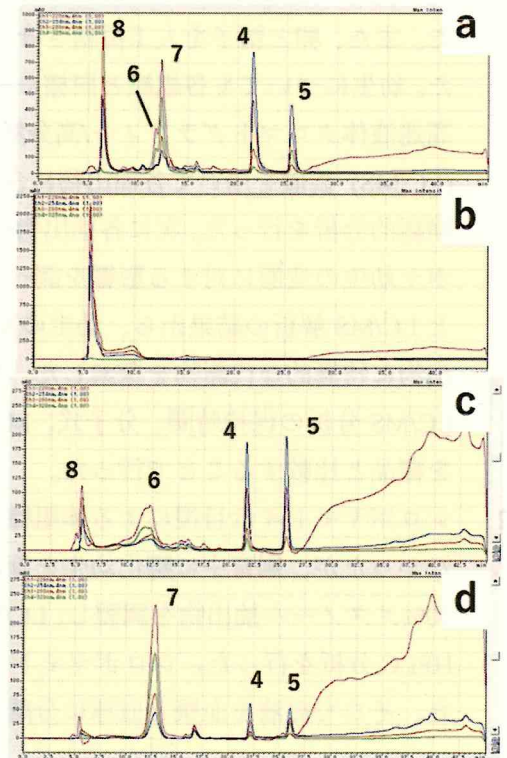


図 5. シロボヤモドキ抽出物の HPLC クロマトグラム (a: 成体, b: 幼体, c: 血漿, d: 血球)

[1] Y. Tadokoro *et al.* *ACS Omega* **2017**, 2, 1074-1080. [2] A. Aiello *et al.* *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 219-221. [3] S. Tsukamoto *et al.* *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1606-1609. [4] B. S. Szwergold *et al.* *Biochem. Bioph. Res. Com.* **1990**, 172, 855-861. [5] 論文投稿準備中。