

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07577

研究課題名(和文) 亜熱帯産紅藻類に含まれる感染症媒介性双翅目昆虫に対する新規誘引物質に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the subtropical red alga-originating new attractant against infection-mediated insects belonging to the Diptera

研究代表者

浅川 学 (Asakawa, Manabu)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：60243606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄県石垣島において海洋生物に含まれる有用生理活性物質を探索中、干潮時露出するリーフに分布する紅藻類マクリ *Digenea simplex* に双翅目昆虫セトウミユスリカ *Clunio setoensis* が誘引される特異な現象を発見した。本研究では、この特異な現象に焦点を当て、感染症媒介性衛生害虫の安全で効果的な誘殺駆除剤の開発に関する基礎データとして、誘引効果が期待されるグルタミン酸骨格を有する興奮毒性アミノ酸の含有量を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：On the reefs along the coast of Ishigaki Island, Okinawa Prefecture Japan, a unique phenomenon is observed in which insects *Clunio setoensis* belonging to the Diptera are attracted to the red alga *Digenea simplex*. The study is aimed at obtaining basic data on development of the pest insect attracting exterminator. Attempts were made to estimate the free amino acid compositions of red and brown algae. In the extract purified from the 75% EtOH extract by Sep-Pak C18 cartridge, total amount of free amino acids was estimated to be 238.4 ± 78.5 mg/100g of dry matter. The content of kainic acid was 114.0 ± 28.6 mg/100g of dry matter ($n=6$) and occupying 49.8 ± 9.7 % of the total. The content of alanine (35.9 ± 22.4 %), glutamic acid (28.5 ± 21.3 %) and γ -aminoadipic acid (20.6 ± 8.7 %) followed in the order of the amounts as the main components. On the other hand, kainic acid was not detected in four species of red algae and three species of brown algae at all.

研究分野：海洋生物資源化学

キーワード：紅藻類 マクリ セトウミユスリカ カイニン酸 アミノ酸アナライザー グルタミン酸 誘引作用
石垣島

1. 研究開始当初の背景

2014年、双翅目吸血昆虫(ヤブカ属)により媒介され、主に熱帯(亜熱帯)地域で流行するウイルス感染症であるデング熱の症例が、東京を中心に日本各地で多数報告され、大きな社会問題となった。この様な社会情勢を背景として、防疫(検疫)の観点から拡散する衛生害虫の駆除が再認識され、特に、感染症媒介性衛生害虫に対する安全で効果的な誘殺駆除剤の開発が急務とされている。この様な社会背景のもと、本研究は立案・実施された。

2. 研究の目的

沖縄県石垣島周辺海域において有用生理活性物質を含む海洋生物を探索中、干潮時に出現する沿岸のリーフ(reef)に分布する海藻(紅藻類)に無数の双翅目昆虫(5mm程度の大きさ)が誘引される特異な現象を偶然に発見した。本研究は、この特異的な現象に検討を加え、地球温暖化や社会のグローバル化に伴う防疫(検疫)の観点から拡散することが危惧される衛生害虫の誘殺駆除剤を開発するための基礎データを入手することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 試料の採取

干潮時に露出する沖縄県石垣島川平湾沖のリーフに分布する海藻及びその海藻表面に誘引される双翅目昆虫を採取した。

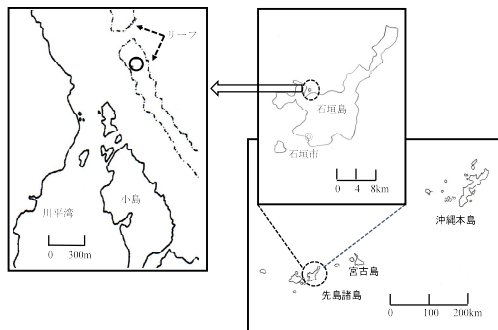


図1 沖縄県石垣島川平湾沖リーフ
：試料の採取地点

(2) 試料の同定

本海藻は、その形態学的特徴から紅藻類マクリ(海人草: *Digenea simplex*)と同定された(図2)。

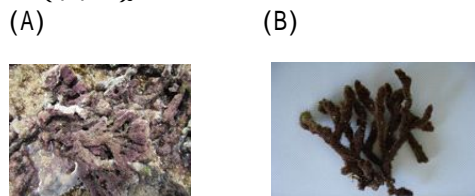


図2 沖縄県石垣島川平湾沖のリーフに分布する紅藻類マクリ *D. simplex* (A) とその乾燥藻体(B)

マクリに特異的に誘引される双翅目昆虫は、極めて短い跗節(A)、異常に短い触角先端節(B)及び非常に単純化した交尾器などの特徴から河合幸一郎教授(広島大学大学院生物圏科学研究科)によりセトウミユスリカ *Clunio setoensis* Tokunaga, 1933と同定された(図3)。

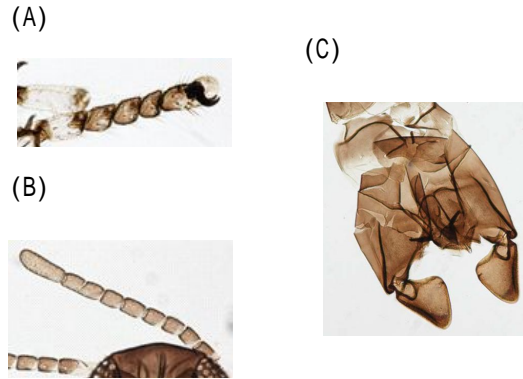


図3 セトウミユスリカ *Clunio setoensis*
(A) 跗節 (B) 触角先端節 ()
(C) 雄交尾器 ()

セトウミユスリカは口が退化しており、マクリを直接摂取する可能性は非常に少ないと考えられるが、一方で、海藻に含まれる特有な成分を餌として海藻表面を舐めることで体内に取り入れている可能性がある。そこで、誘引物質の検討に際し、マクリに含まれる遊離アミノ酸組成に検討を加えた。

(3) 遊離アミノ酸組成の検討

ミキサーで粉碎したマクリの乾燥藻体粉末(0.5g)を採取し、75%エタノール(EtOH) 50mlを用い、沸騰水浴中で20分間エキスの還流抽出を行った。抽出後、遠心分離にて上清を得た。この操作を3回繰り返し、最後に、得られた上清を合一し、エキス抽出液とした。この抽出液を減圧濃縮し、濃縮乾固した後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用蒸留水5mlに溶解した。このようにして得られた溶液を遊離アミノ酸分析のための試料溶液調製法(桑野ら1984)に準じて以下のように処理した。即ち、メタノール(MeOH)(A)10mlで2回、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)(B)10mlで1回、最後にA:B=1:4の溶液10mlで順次洗浄することにより活性化したSep-Pak Plus C18 Environmental Cartridgeに上述のようにして調製した海藻エキス抽出溶液を負荷した後、カートリッジをMeOH:0.1%TFA(3:7)の溶液5.0mlで2回(溶出液)、MeOH:0.1%TFA(3:7)10mlで1回(溶出液)処理し、得られた溶出液を合一した。さらに、このようにして得られたアミノ酸群溶液を減圧濃縮した後、アミノ酸アナライザーで用いるサンプリングバッファー(1stバッファー)2.0mlに溶解し、クロマトディスク(0.45µm)でろ過した後、1.0mlをオートサンブラ

一用バイアルに入れ、そのうちの 50 μ l をアミノ酸アナライザー (JEOL JLC-500/V2) に導入した (標準生体アミノ酸分析法)。

一方、リーフ上にはマクリの他、数種の海藻が確認されるが、マクリにのみセトウミユスリカが特異的に誘引される。そこで、リーフに分布するマクリ以外の数種海藻の遊離アミノ酸組成についても検討を加えた。即ち、干潮時に、沖縄県石垣市川平湾沖のリーフでマクリ及びその周辺に生育する紅藻類4種 (エダウチイシモ *Mesophyllum erubescens*、ハイカニノテ *Amphiroa foliacea*、パピラガラガラ *Dichotomaria papillata*、ガラガラ *Tricleocarpa cylindrica*)、褐藻類3種類 (ラッパモク *Turbinaria ornata*、フタエモク *Sargassum myriocystum*、オキノウチワ *Padina japonica*) を採取した。これらの海藻は採取後すぐに、広島大学大学院生物圏研究科 (海洋生物資源化学研究室) に冷蔵状態で空輸するとともに、一部を天日乾燥し、これら海藻に含まれる遊離アミノ酸組成を同様に検討した。なお、分析に使用したカイニン酸 (kainic acid) 標準溶液は、カイニン酸一水和物 (和光純薬) を HPLC 用蒸留水に溶解し、クロマトディスク 0.2 μ m でろ過した溶液を使用した。この標準液を適宜、HPLC 用蒸留水で希釈し、50 μ l をアミノ酸アナライザーに導入し、検量線の作成を行った。

(4) 興奮神経活性アミノ酸の精製・単離

マクリに含まれる遊離アミノ酸をアミノ酸アナライザーにより分析したところ、ヒドロキシプロリン (保持時間 Retention time: $R_t=15.36$ min)、プロリン ($R_t=39.53$ min) 以外に著量の成分 ($R_t=35.13$ min) が確認され、溶出位置から興奮神経活性アミノ酸であるカイニン酸の存在が考えられたため、本成分の単離を試みた。

抽出・精製

ミキサーで粉砕したマクリの乾燥藻体に3倍量の蒸留水を加え、室温で一晩攪拌抽出を行った。さらに、遠心分離によって得られた上清を減圧濃縮し、得られたこの粗抽出液を透析チューブ (3500 cutoff) に入れ、蒸留水にて透析を行った。次いで、透析外液を減圧濃縮し、活性炭カラムクロマトグラフィーを行った。即ち、十分に水洗したクロマトグラフィー用活性炭 (Wako) を充填したガラスカラム (50 \times 370 mm) に試料を添加し、カラム体積の3倍量の蒸留水で水洗後、酢酸酸性メタノール (pH3.05) により目的成分を溶出させた。

分取カラムクロマトグラフィー

により得られた酢酸酸性メタノール画分を濃縮後凍結乾燥し、得られた乾燥粉末 (0.72 g) に蒸留水 (5.0 ml) を加え、夾雑物を遠心分離やフィルター処理により除去した。次いで、得られたこの水溶液を用いて

主成分であるカイニン酸などのグルタミン酸骨格を母核とする一連の関連物質の分取精製を試みた。即ち、ウルトラパック ODS カラム ($\phi 26 \times 300$ mm, Yamazen) を用いた。移動相は、1% 酢酸 - 5% アセトニトリルを用い、流量 0.5 mL/min、5.0 mL / 画分で分取精製を行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

において得られた各画分の成分組成を HPLC によって分析した。カラムは LiChroCART 125-4 カラム (Purospher RP-18e, Merck) を、移動相はメタノール:リン酸緩衝液 (トリメチルアミン含有: pH2.5): ラウリル硫酸ナトリウムを 110 mL:90 mL:0.5 g で混合したものをを用いた。なお、流速は 0.8 mL/min で、カラムの温度は 40 $^{\circ}$ C に保持し、波長 210 nm における吸光度を紫外可視分光光度計で測定した。この際、カイニン酸標品として、精製標品 (11.09 μ g/ μ l) を用いた。

(5) 双翅目昆虫誘因モデル実験

マクリへのセトウミユスリカの特異的誘引現象について検討した。即ち、ガラスシャーレに 0.2 g の脱脂綿球を等間隔になるようにおき、蒸留水、により得られた精製画分 (0.14 mg/ μ l) をそれぞれ 0.5 mL ずつ含ませた。そこに (一時的に麻酔した) セスジユスリカ () 8 匹を入れ、蓋をして、数日観察した。もう一つのガラスシャーレには、蒸留水と画分を含ませた脱脂綿を置き、セスジユスリカ () 9 匹を入れて数日観察した。なお、本実験で使用したセスジユスリカ *Chironmus yoshimatsui* は、河合幸一郎教授 (広島大学大学院生物圏科学研究科) より分与された。

4. 研究成果

(1) セトウミユスリカの誘引現象について
カイニン酸標準液の検量線を図4に示す。0.67 μ g から 12 μ g の範囲で良好な直線 ($r^2 = 0.999$) が得られたため、カイニン酸の定量を本検量線に基づいて行った。

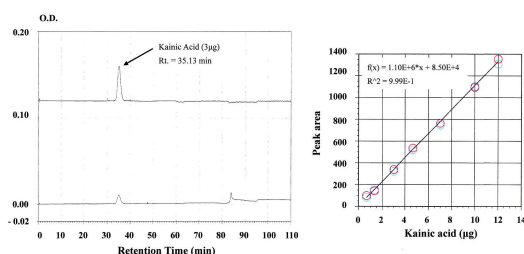


図4 カイニン酸の検量線

マクリに含まれる遊離アミノ酸の組成をアミノ酸アナライザーで分析した際のクロマトグラム (図5) に示す。マクリには、グルタミン酸骨格を含む複素環化合物であり、

興奮神経(毒性)活性アミノ酸の一種であるカイニン酸が主成分として 100 g 乾燥藻体あたり、 114.0 ± 28.6 mg (最高値 152 mg、最低値 89.2 mg)、グルタミン酸が副成分として 28.5 ± 21.3 mg 含まれていることが明らかとなった。その他、 α -アミノアジピン酸 (20.6 ± 8.7 mg) 及びアラニン (35.9 ± 22.4 mg) がそれぞれ検出された。カイニン酸と同様のイミノ酸であるプロリンも検出されたが、ヒドロキシプロリンは検出されなかった。また、カイニン酸、グルタミン酸は、総遊離アミノ酸 (238.4 ± 78.5 mg/ 100 g 乾燥藻体) の 59.8 % を占める主成分であった。

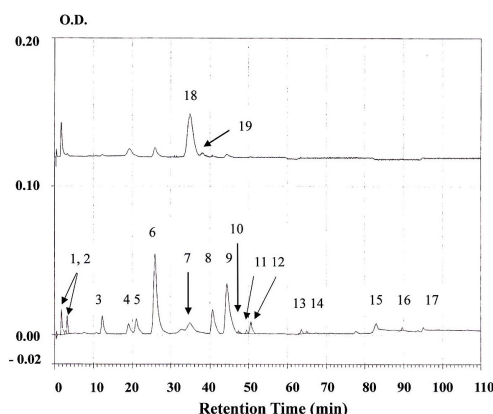


図5 マクリに含まれる遊離アミノ酸組成 (アミノ酸アナライザーにより得られたクロマトグラム)

1:P-Serine, 2:Taurine, 3: Aspartic acid, 4:Threonine, 5:Serine, 6:Glutamic acid, 7: α -aminoadipic acid, 8:Glycine, 9:Alanine, 10:Citrulline, 11: α -aminobutyric acid, 12:Valine, 13:Isoleucine, 14:Leucine, 15:Ammonia, 16:Ornithine, 17:Lysine, 18:Kainic acid, 19:Proline

カイニン酸が検出されたのはマクリのみで他の供試した海藻のいずれからもカイニン酸は検出されなかった。また、興奮神経(毒性)活性アミノ酸に分類されるグルタミン酸の含量もマクリに比べると少なく、グルタミン酸の総遊離アミノ酸に占める割合も、マクリ以外の紅藻類、褐藻類では低い値を示した。他方、マクリに含まれる遊離アミノ酸の分析では、ヒドロキシプロリン、カイニン酸、プロリンの保持時間 (Rt) はそれぞれ 15.36 min、35.13 min、39.53 min であり、これら3成分をアミノ酸アナライザーで明瞭に分離分析することができ、マクリに含まれ、双翅目昆虫に対する誘因活性が期待できる興奮神経(毒性)活性アミノ酸及び遊離アミノ酸組成が明らかとなった。

一方、今回の研究では、リーフに分布するマクリにおいて確認されたセトウミユスリカの特異的な誘引現象を *in vitro* で明瞭に再現することはできなかったが、セスジユス

リカをモデル生物とすることにより誘引現象を示唆する結果は示された。また、本研究により双翅目昆虫に対する誘引現象を簡易的に調べるため、人工繁殖が可能なセスジユスリカを用いる実験系を構築したことにより、衛生害虫に対する誘引物質のスクリーニングが可能となった。

以上、衛生害虫の誘引駆除剤開発に関する基礎的なデータが得られたことにより、地球温暖化や社会のグローバル化に伴い蔓延が危惧される衛生害虫の誘引駆除剤開発研究の展開が期待された。

(2) 本研究課題遂行中に偶然明らかとなった生理活性物質に関する新たな知見

石垣島沿岸において干潮時露出するリーフ上で海藻を採取中、潮だまり(タイドプール)において、これまでその毒性や毒成分組成が全く明らかにされていないヒョウモンダコ属オオマルモンダコ *Hapalochlaena lunulata* を偶然に採取することができ、その後の研究で毒性や毒成分組成の詳細を明らかにすることができた。近年、フグ毒テトロドキシンを後部唾液腺に含み猛毒とされるヒョウモンダコ属タコの分布が温帯海域にまで拡大しており、今後、この種の本邦における分布や毒性、毒成分組成など研究の展開が期待された。

<引用文献>

桑野和民、谷丸恵美子、酒巻千波、津久井亜紀夫、三田村敏男、緑茶中の遊離アミノ酸分析のための試料の全処理方法、東京家政大学紀要、24巻、1984、41-43

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

M.Asakawa, M.Fujii, S.Tomano, S.Ohtsuka, M.Yamauchi, K.Umezaki, K.Kaneko, T.Matsumoto, Toxicity and toxins of the greater blue-ringed octopus *Hapalochaena lunulata* from Ishigaki Island, Okinawa Prefecture, Japan, J. Forensic Toxicol. Pharmacol., 5, 査読有, 2017, p.69, doi: 10.4172/2325-9841-C1-006

浅川 学、麻痺性貝毒の不思議、milsil[ミルシル]、査読有、9巻、2016、8-10

大塚 攻、梶 智就、西川 淳、西田周平、浅川 学、田角聡志、水産学に必要な不可欠な形態学、分類学 - 特にバイオミメティクスとの関係から、遺伝、査読有、69巻、2015、398-404

[学会発表](計4件)

M.Asakawa, M.Fujii, S.Tomano, S.Ohtsuka, M.Yamauchi, K.Umezaki, K. Kaneko, T.Matsumoto, Toxicity and toxins of the greater blue-ringed octopus *Haplochaena lunulata* from Ishigaki Island, Okinawa Prefecture, Japan, 10th Global Summit on Toxicology & Applied Pharmacology, Jul.21-22, 2017, Doubletree By Hilton Hotel Chicago-North Shore Conference Center, Chicago, IL, USA

M.Asakawa, Toxicity and Detection Methods, International Conference on Food Science and Engineering, Oct.18-19, 2016, Sunan Hotel, Surakarta, Indonesia (Invited Lecture)

浅川 学、笥野哲史、山内望由季、松本拓也、大塚 攻、沖縄県石垣島産ヒョウモンダコ属オオマルモンダコの毒性と毒成分の検討、第 112 回日本食品衛生学会学術講演会、2016 年 10 月 27 日～2016 年 10 月 28 日、函館国際ホテル

浅川 学、畑菜央子、沖縄県石垣島産ツムギハゼの毒性、平成 27 年度日本水産学会秋季大会、2015 年 9 月 22 日～2015 年 9 月 25 日、国立大学法人東北大学農学部

〔図書〕(計 1 件)

M.Asakawa, G.G.Delan, M.B.Quilantang, K.Ito, Chapter 24. Paralytic Shellfish Poison (PSP)-Producing Dinoflagellate and PSP-Infested Organisms, Springer, Marine Protists Diversity and Dynamics (Ed. by S.Ohtsuka, T.Suzaki, T.Horiguchi, N.Suzuki, F.Not), 2015, pp567-596

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 学 (Manabu Asakawa)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号：60243606

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()