

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710258

研究課題名(和文) サンゴ-海草混合群落の形成に関する活性物質の解明

研究課題名(英文) Study of compounds that influence facultative symbiosis between coral and seagrass

研究代表者

照屋 俊明 (TERUYA, TOSHIAKI)

琉球大学・教育学部・准教授

研究者番号：90375428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄県備瀬海岸のサンゴ礁池で観測されるエダコモンサンゴとリュウキュウスガモの混合群落の形成に関する化合物を探索するため、リュウキュウスガモ抽出物がエダコモンサンゴ幼生に対してどのような影響を与えるのか検討した。また、コントロール実験として、ココビミドリイシの隠蔽種 *Acropora* sp. 1 幼生を用いた。その結果、リュウキュウスガモ抽出物からエダコモンサンゴ幼生に対して毒性を示すカフェ酸を単離した。また、カフェ酸は 0.0018 mg/ml～0.18 mg/ml の濃度ではエダコモンサンゴ幼生に対して影響を示さないが、*Acropora* sp. 1 幼生の形態を変化させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined compounds that influence facultative symbiosis between coral *Montipora digitata* and seagrass *Thalassa hemprichii*, which can be seen near Bise on the west coast of Okinawa Island. *Acropora* sp.1 was used as a control. We evaluated the influence of a crude extract of seagrass *T. hemprichii* against coral larvae. The seagrass *T. hemprichii* was directly harvested in Okinawa Prefecture. A crude organic extract of this material was subjected to bioassay-guided (toxicity against coral larvae) fractionation by solvent partition, ODS-HPLC, to yield caffeic acid. Morphological changes of larvae of *Acropora* sp.1 were induced by exposure to 0.0018 mg/ml-0.18 mg/ml caffeic acid. On the other hand, no morphological changes of larvae of *M. digitata* were induced at same concentration.

研究分野：海洋天然物化学

科研費の分科・細目：生体分子科学・生物分子化学

キーワード：リュウキュウスガモ エダコモンサンゴ 混合群落 ココビミドリイシ

1. 研究開始当初の背景

沖縄県備瀬海岸では海草類リュウキュウスガモとエダコモンサンゴが混在する。リュウキュウスガモの生物量は、両種が共存する混合群落の方が海草単一群落より高く、エダコモンサンゴの生物量は、海草がほとんどない底質地帯より混合群落の方がはるかに高いことから、両種は相関関係にある。同所的に生息する場合、一般には光と定着基質を巡り競争関係にあるとされるサンゴと海草で、共生関係が見いだされたのは初めてのことである。この共生関係は、両種の生存にとって必要条件とはなっていない任意共生であるが、両種が混合群落を形成することで、サンゴ同士の種間および海草同士の種間競争を排除して空間を独占できることは大きな利益である。本研究は、両種が混合群落を形成する際に関与する活性物質を明らかにすることが目的である。

2. 研究の目的

同時性雌雄同体種であるエダコモンサンゴは胃腔内で親から褐虫藻が感染した卵と精子が形成され、それらが体外へ放出され受精、発生してプラヌラ幼生となる。プラヌラ幼生は数日から数か月間浮遊幼生期を過ごし、着底、変態を経て成体になる。成体サンゴは移動することが出来ないため、備瀬海岸で観察されるリュウキュウスガモと、エダコモンサンゴの混合群落の形成には、エダコモンサンゴの浮遊幼生が深く関わっていると考え、リュウキュウスガモ抽出物がエダコモンサンゴ幼生に対してどのような影響を与えるのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) エダコモンサンゴ成体と幼生の飼育

エダコモンサンゴの産卵期に沖縄県本部町備瀬崎よりエダコモンサンゴを採集し、瀬底研究所施設屋内にある海水オーバー・フロー水槽で飼育した。採卵方法はサンゴ成体をすべて水槽から別の容器に移し替え、他の個体と受精させる方法を用いた。産卵が起こった場合、受精した胚をコマセバケツに取り、その日のうちに研究室に持ち帰った。その後別の容器に移し替えることで密度を低くし、水温 27~28 に保ち培養した。飼育海水は濾過海水を用いることとし、毎日交換した。

(2) エダコモンサンゴ幼生を用いた生物活性試験

生物活性試験には同一条件で飼育したエダコモンサンゴ幼生を用いた。リュウキュウスガモ抽出物、および分離したリュウキュウスガモ抽出物をガラスシャーレに添加し、溶媒を完全に蒸発させ、そこに濾過海水と浮遊幼生を入れた。その後 27~28 で培養し、24 時間毎に実態顕微鏡によりサンゴ幼生の状態を観察した。

(3) 毒性物質の単離

リュウキュウスガモは沖縄県本部町備瀬崎で海中に出ている葉のみを採集し、メタノールで抽出した。抽出物を各種溶媒分配、クロマトグラフィーで分離した画分についてエダコモンサンゴ幼生に対する作用を検討したところ、エダコモンサンゴ幼生に対して毒性を示すカフェ酸を単離した ($LD_{99}=0.4$ mg/mL)。

(4) リュウキュウスガモに含まれるカフェ酸の季節変動

2011 年 12 月~2012 年 12 月まで毎月、大潮の時期にリュウキュウスガモを採集し同一条件でカフェ酸を抽出・分離し、定量した。

(5) コクビミドリイシ隠蔽種 *Acropora digitifera* 成体と幼生の飼育

A. sp. 1 の生体サンゴは沖縄県本部町備瀬崎で採集し、エダコモンサンゴ成体と同様に飼育した。採卵方法、幼生の飼育についてもエダコモンサンゴ幼生と同様に行った。

(6) *A. sp. 1* を用いた生物活性試験

ポリスチレン製のウェルプレートにリュウキュウスガモより単離したカフェ酸を添加し、溶媒を完全に蒸発させ、濾過海水と浮遊幼生を入れた。その後 27~28 で培養し、24 時間毎に実態顕微鏡によりサンゴ幼生の状態を観察した。

4. 研究成果

受精してから 48 時間飼育したエダコモンサンゴ幼生に対するリュウキュウスガモ抽出物の影響を検討したところ、エダコモンサンゴ幼生に対して致死活性を示す化合物が含まれていることが明らかとなった。各種クロマトグラフィーを用いて分離、精製を進めた結果、毒性物質としてカフェ酸を単離した ($LD_{99}=0.4$ mg/ml)。リュウキュウスガモに含まれるカフェ酸の季節変動について調べたところ、サンゴの産卵期である 5 月~9 月の間のカフェ酸の含有量はリュウキュウスガモ 100 g あたり 0.8~15 mg であるのに対し、4 月は 100 g あたり約 170 mg 含まれることが明らかとなった。単離したカフェ酸は 0.4 mg/ml でエダコモンサンゴ幼生に対して致死活性を示し、それより低い濃度ではエダコモンサンゴ幼生に影響を示さないことが明らかとなった。また *A. sp. 1* 幼生に対するカフェ酸の作用を詳細に検討したところ、0.018 mg/ml ~ 0.18 mg/ml (1×10^{-4} M ~ 1×10^{-3} M) で *A. sp. 1* の形態を変化させることが明らかとなった。カフェ酸は 0.4 mg/ml 以下の濃度でエダコモンサンゴ幼生に対して影響を示さないのに対し、*A. sp. 1* 幼生に対しては、その形態を変化させる作用を示すことから、異なる種のサンゴ幼生に対するカフェ酸の作用が顕著に異なることが明らかとなった。今回用いたエダコモンサン

ゴ幼生は褐虫藻を有し、*A. sp.1* 幼生は褐虫藻を持たないことから、カフェ酸のサンゴ幼生に対する作用の違いは褐虫藻の有無に関係している可能性がある。さらに濃度 5×10^{-3} M のカフェ酸の作用により、*A. sp.1* 幼生の外胚葉が剥離し、外胚葉と内胚葉が分離することが明らかとなった。サンゴを含む刺胞動物は二胚葉性で、外胚葉と内胚葉の2層からなり、これらの間には中膠と呼ばれる細胞外マトリックスが存在する。中膠は膠原繊維で構成されており、外胚葉と内胚葉を連結している。今回の実験で外胚葉と内胚葉が分離したことから、中膠が消失した可能性が示唆された。また実際に中膠は観察されなかった。

エダコモンサンゴとリュウキュウスガモが相利関係にあることや、異なる種のサンゴ幼生に対するカフェ酸の作用が顕著に異なることを考えると、カフェ酸はエダコモンサンゴ幼生だけでなく、他のサンゴ幼生や付着生物に対する防御物質として機能していることが推察できるが、今後さらなる詳細な生物活性試験が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1. Fargesin, a component of Flos Magnoliae, stimulates glucose uptake in L6 myotubes
Choi, S-S.; Cha, B-Y.; Choi, B-K.; Lee, Y-S.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Nagai, K.; Woo, J-T. *Journal of Natural Medicines*, **2013**, 67, 320-326. (査読有)
2. Bisebromoamide, an extract from *Lyngbya* species, induces apoptosis through ERK and mTOR inhibitions in renal cancer cells
Suzuki, K.; Mizuno, R.; Suenaga, K.; Teruya, T.; Tanaka, N.; Kosaka, T.; Oya, M. *Cancer Medicine*, **2013**, 2, 32-39. (査読有)
3. Apoptosis-inducing activity of the actin-depolymerizing agent aplyronine A and its side-chain derivatives
Ohno, O.; Morita, M.; Kitamura, K.; Teruya, T.; Yoneda, K.; Kita, M.; Kigoshi, H.; Suenaga, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23, 1467-1471. (査読有)
4. Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice
Lee, Y-S.; Cha, B-Y.; Choi, S-S.; Choi, B-K.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Nagai, K.; Woo, J-T. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2013**, 24, 156-162. (査読有)
5. Honokiol and magnolol stimulate glucose uptake by activating PI3K-dependent Akt in L6 myotubes
Choi, S-S.; Cha, B-Y.; Lee, Y-S.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Nagai, K.; Woo, J-T. *BioFactors*, **2012**, 38, 372-377. (査読有)
6. Fargesin improves lipid and glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet-induced obese mice
Lee, Y-S.; Cha, B-Y.; Choi, S-S.; Harada, Y.; Choi, B-K.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Nagai, K.; Woo, J-T. *BioFactors*, **2012**, 38, 300-308. (査読有)
7. Effects of veraguensin and galgravin on osteoclast differentiation and function
Asai, M.; Lee, J-W.; Itakura, Y.; Choi, B-K.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Cha, B-Y.; Ohnishi, M.; Yamaguchi, A.; Woo, J-T. *Cytotechnology*, **2012**, 64, 315-322. (査読有)
8. Isolation and structures of biselyngbyasides B, C, and D from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp., and the biological activities of biselyngbyasides
Morita, M.; Ohno, O.; Teruya, T.; Yamori, T.; Inuzuka, T.; Suenaga, K. *Tetrahedron*, **2012**, 68, 5984-5990. (査読有)
9. Biselyngbyaside, isolated from marine cyanobacteria, inhibits osteoclastogenesis and induces apoptosis in mature osteoclasts
Yonezawa, T.; Mase, N.; Sasaki, H.; Teruya, T.; Hasegawa, S.; Cha, B-Y.; Yagasaki, K.; Suenaga, K.; Nagai, K.; Woo, J-T. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2012**, 113, 440-448. (査読有)
10. Allelopathy of red pine: Isolation and identification of an allelopathic substance in red pine needles
Kato-Noguchi, H.; Fushimi, Y.; Tanaka, Y.; Teruya, T.; Suenaga, K. *Plant Growth Regulation*, **2011**, 65, 299-304. (査読有)
11. Two potent allelopathic substances in cucumber plants
Kato-Noguchi, H.; Le, T. H.; Teruya, T.; Suenaga, K. *Scientia Horticulturae* (Amsterdam, Netherlands), **2011**, 129, 894-897. (査読有)
12. Honokiol enhances adipocyte differentiation by potentiating insulin signaling in 3T3-L1 preadipocytes
Choi, S.; Cha, B-Y.; Iida, K.; Sato, M.; Lee, Y-S.; Teruya, T.; Yonezawa, T.; Nagai, K.; Woo, J-T. *Journal of Natural Medicines*, **2011**, 65, 424-430. (査読有)
13. Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling
Yonezawa, T.; Lee, J-W.; Hibino, A.; Asai, M.; Hojo, H.; Cha, B-Y.; Teruya, T.; Nagai, K.; Chung, U-l; Yagasaki, K.; Woo, Je-Tae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2011**, 409, 260-265. (査読有)

14. *N,N*-diphenethylurea isolated from Okinawan ascidian *Didemnum molle* enhances adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells
Choi, S-S.; Cha, B-Y.; Kagami, I.; Lee, Y-S.; Sasaki, H.; Suenaga, K.; Teruya, T.; Yonezawa, T.; Nagai, K.; Woo, J-T. *Journal of Antibiotics*, **2011**, *64*, 277-280. (査読有)
15. Artepillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells
Choi, S-S.; Cha, B-Y.; Iida, K.; Lee, Y-S.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Nagai, K.; Woo, J-T. *Biochemical Pharmacology*, **2011**, *81*, 925-933. (査読有)
16. Revised structure and structure-activity relationship of bisbromoamide and structure of norbisbromoamide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp.
Sasaki, H.; Teruya, T.; Fukazawa, H.; Suenaga, K. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 990-994. (査読有)
17. Harmine, a β -carboline alkaloid, inhibits osteoclast differentiation and bone resorption in vitro and in vivo
Yonezawa, T.; Hasegawa, S.; Asai, M.; Ninomiya, T.; Sasaki, T.; Cha, B-Y.; Teruya, T.; Ozawa, H.; Yagasaki, K.; Nagai, K.; Woo, J-T. *European Journal of Pharmacology*, **2011**, *650*, 511-518. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 車炳允、浅井みどり、照屋俊明、米澤貴之、金 静、永井和夫、禹濟泰
高脂肪食誘導肥満マウスにおけるシークワサーエキスの抗肥満効果
日本農芸学会 2014 年度大会 (川崎)
2014.3.28
2. 照屋俊明、米澤貴之、間瀬直美、佐々木宏明、末永聖武、車炳允、禹濟泰、永井和夫
破骨細胞の機能に対する Biselyngbyaside の作用
第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会 (那覇) 2013.6.1
3. 大野修、佐名恭平、照屋俊明、清水史郎、末永聖武
海洋微細藻類由来新規チアゾール化合物 tomuruline の構造と生物活性
日本化学会第 93 春季年会 (横浜)
2013.3.25
4. 森田真布、大野修、照屋俊明、佐々木宏明、末永聖武
海洋産マクロリド Biselyngbyaside 類の構造と生物活性
日本化学会第 93 春季年会 (横浜)
2013.3.25
5. 森田真布、大野修、照屋俊明、佐々木宏明、末永聖武

海洋シアノバクテリア由来のマクロリド biselyngbyolide B の単離と構造
日本化学会第 93 春季年会 (横浜)
2013.3.25

6. 鈴木一司、秋山、聡史、鳥居原英輔、照屋俊明、大野修、末永聖武
アクチン脱重合活性物質レイジスポンジオリド A の合成研究
日本化学会第 93 春季年会 (横浜)
2013.3.25
7. 末吉康佑、中野義勝、井口亮、照屋俊明
リュウキュウスガモ抽出物が付着生物幼生に与える影響について
日本化学会第 92 春季年会 (横浜)
2012.3.26
8. 鈴木一司、秋山、聡史、鳥居原英輔、深澤英吾、照屋俊明、大野修、末永聖武
アクチン脱重合活性物質 Reidispongiolide A の合成研究
第 54 回天然有機化合物討論会 (世田谷)
2012.9.18
9. 森田真布、大野修、照屋俊明、末永聖武
海洋シアノバクテリア由来の新規マクロリド Leptolyngbyolide 類の生物活性
日本化学会第 92 春季年会 (横浜)
2012.3.27
10. 森田真布、大野修、照屋俊明、末永聖武
海洋シアノバクテリア由来のマクロリド Biselyngbyaside 類の単離と構造
日本化学会第 92 春季年会 (横浜)
2012.3.27
11. 鈴木一司、鳥居原英輔、秋山、聡史、照屋俊明、大野修、末永聖武
アクチン脱重合活性物質レイジスポンジオリド A の合成研究
日本化学会第 92 春季年会 (横浜)
2012.3.27
12. 森田真布、大野修、照屋俊明、北将樹、木越英夫、北村和大、平田邦生、末永聖武
海洋シアノバクテリア由来の新規マクロリド Biselyngbyaside 類の構造と生物活性
第 53 回天然有機化合物討論会 (大阪)
2011.9.27

〔図書〕(計 1 件)

1. Toshiaki Teruya, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga:
Bioactive Compounds from Okinawan Marine Cyanobacteria.
Se-Kwon Kim (Ed.), Marine Pharmacognosy:Trends and Applications, CRC Press, pp. 21-26 (2012).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照屋 俊明 (TOSHIAKI TERUYA)

琉球大学・教育学部・准教授

研究者番号：90375428

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし