

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780147
 研究課題名（和文） 海洋付着生物幼生の検出を目的としたマルチ蛍光プローブの開発
 研究課題名（英文） Development of multi-fluorescence labeled probes for detection of marine fouling organism larvae
 研究代表者
 北野 克和（KITANO YOSHIKAZU）
 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授
 研究者番号：10302910

研究成果の概要：

フジツボ類、イガイ類などの海洋付着生物幼生の個体数を容易に把握できるシステム開発に応用できるマルチ蛍光プローブ化合物の開発を行うために、様々な蛍光プローブ化合物を合成し、フジツボキプリス幼生に対する作用について蛍光顕微鏡下で観察を行った。その結果、フジツボキプリス幼生検出システム開発に必要なと思われる各種官能基や、蛍光基について、また付着阻害活性発現に関して多くの新たな知見を得るに至った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：海洋付着生物、フジツボ、イガイ、蛍光プローブ、トリアジン、イソニトリル

1. 研究開始当初の背景

(1) フジツボ、イガイなどの海洋付着生物は、発電所の冷却システム、漁網、および船底などに付着し、様々な被害を与えている。これら生物の被害を防ぐ一つの方法として、付着防除剤などの薬品を海中に投与することが行われているが、その対策のために多大なコストがかかっている。しかしながら、海洋生

物の出現状況を把握しないで薬品を使用することが多く、実際には海洋生物がいない場合にも薬品を投与していることもあり、使用している薬剤の大部分が無駄になっている場合が多くある。これは、対策コストの増大だけでなく、海洋汚染の原因の一つにもつながることから、海洋生物の出現状況を把握することは極めて重要な技術である。

(2) (1)に記述のように、海洋付着生物は多くの海洋構築物に対して様々な被害を与えている。これら生物の防除には、従来有機スズ化合物や、亜酸化銅化合物を含む防汚塗料が主に使われてきた。しかしながら、有機スズ系防汚塗料は、様々な環境汚染が明らかになり日本国内では全面的に使用が禁止され、世界的にも使用禁止の方向で協議が進められている。また、亜酸化銅系防汚塗料についてもその蓄積による環境への影響が問題視されはじめ、近年多くの環境汚染に関する報告がある。そのため、新たなコンセプトに基づく“環境にやさしい”付着防除剤の開発が強く望まれている。そのような背景から、申請者はこれまでに“環境にやさしい”付着防除剤の開発を目指した一連の研究を行い、多くのイソニトリル化合物に有効な付着阻害活性があることを明らかにし、現在も引き続き実用化へ向けた様々な検討を行っている。またそれとともに、付着阻害活性発現メカニズムの解明を目的とした研究を行い、ある種のイソニトリル基を有する化合物がタテジマフジツボキプリス幼生の油給部分に特異的に取り込まれることを見出した。

(3) この付着阻害活性発現メカニズムの解明を目的とした研究は、蛍光プローブ化合物を用いて行われたが、蛍光顕微鏡の観察下において、キプリス幼生の油給部分に蛍光標識化合物が特異的に取り込まれたことから作用部位を特定した。そしてこの特異的な取り込みは、他の数種のプランクトン存在下でもフジツボキプリス幼生のみ起きたことから、種特異的であることが示唆された。ここで、海洋付着生物対策の一つの重要な技術として、海洋付着生物幼生の個体数の簡易検出システムの開発がある。これは、(1)にも記述しているように極めて重要な技術である。これまでに申請者は、蛍光標識化合物を用いて海洋付着生物の個体数把握に利用するための検討を行い、数種類の有望な蛍光プローブを得た。しかしながら、これまでに創製された蛍光プローブ化合物は、一種類の蛍光分子しか有していなく取り込み率が悪い場合には、フジツボ類のキプリス幼生の自家蛍光の波長と重なり区別が困難な状況になることがあり、また水溶性が低いことから、海水を使用した場合にはキプリス幼生への取り込みに時間がかかるなどのいくつかの問題点があった。

2. 研究の目的

(1) 1に記述のように、海洋生物の出現状況を把握することは、付着生物対策の一つの方法として、極めて重要な技術である。今回の申請では、これまでの研究の発展として、複

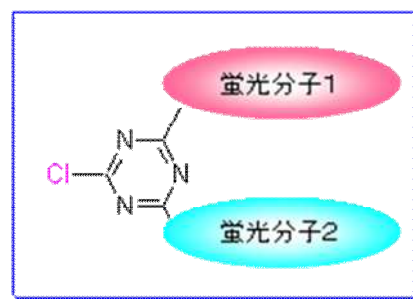
数の蛍光分子を有し、なおかつ海洋付着生物幼生と相互作用する、または取り込まれる海洋付着生物検出のためのマルチ蛍光プローブ化合物の開発を目的とした。

(2) 特に今回の申請では、代表的な海洋付着生物であるフジツボ類に作用するマルチ蛍光プローブ化合物の開発を目的とした検討を行うこととした。

3. 研究の方法

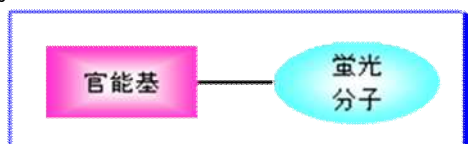
(1) 研究方法としては、まず、複数の蛍光分子を含み、なおかつ将来的に修飾可能な部位を有する蛍光標識化合物を創製することとした。そして、得られた知見をもとに、様々な官能基を修飾した蛍光プローブ化合物を創製してフジツボ類、幼生との相互作用について観察することとした。また相互作用が観察された場合には、その後付着生物幼生の付着・変態が誘引、または忌避されるのかなどの行動についても観察することとした。

(2) トリアジン骨格を基盤とした2種類の蛍光分子を有する化合物の創製：複数の蛍光分子を単一の化合物に導入するためにトリアジン骨格を利用した。この理由としては、トリアジン化合物は、環状の炭素原子上に容易に選択的な修飾をすることが可能であるからである。具体的には、下図のようにトリアジン環に、蛍光分子1と蛍光分子2、それと将来的に修飾可能な部分として塩素(-Cl)が結合した化合物を合成した。蛍光分子としては、ダンシル誘導体、フルオレスセイン誘導体、NBD誘導体などを利用した。そして、蛍光スペクトルを測定するとともに、蛍光顕微鏡下での発色を観察した。



(3) 各種官能基、またはペプチドが修飾された蛍光プローブ化合物の創製：蛍光官能基としてダンシル基を有する蛍光プローブ化合物を創製し、海洋付着生物幼生との相互作用

を観察した。導入する官能基、または構造(ペプチドなど)については、新たな知見を得ることを目的としてある程度ランダムに行った。



(4) 合成した蛍光プローブ化合物について、タテジマフジツボキブリス幼生との相互作用を蛍光顕微鏡により観察した。相互作用の観察については、基本的には海水中で付着生物幼生と蛍光プローブ化合物を混合することによって行った。また、相互作用が確認されたプローブ化合物について、付着試験を行い付着阻害活性、および毒性について観察した。

4. 研究成果

(1) トリアジン環を基本骨格として、5-(ジメチルアミノ)ナフタレンスルホニル(ダンシル)誘導体、フルオレスセイン誘導体、7-クロロ-4-ニトロベンゾフラン(NBD)誘導体を蛍光官能基として有する化合物の合成を検討した。その結果、ダンシル基、NBD基を導入した化合物の合成が比較的容易であり、蛍光顕微鏡下での発色も良好であることが観察された。また、同一分子内にダンシル基とNBD基を有するトリアジン環化合物を合成したところ、蛍光顕微鏡下で、複数のフィルター使用条件下で良好な蛍光が観察されることが明らかになった。また、本化合物を分光蛍光光度計により、励起波長と蛍光波長を分析したところ、複数の励起波長、および蛍光波長の存在が確認された。さらには、蛍光の効率を大きくするために、トリアジン環を樹木状に展開した、同一分子内により多くの蛍光官能基を有する化合物の合成を検討した。しかしながら、分子量があまり大きくなりすぎると各種有機溶媒への溶解性が低下し、合成効率が悪くなることが示唆された。

(2)(1)の結果より、蛍光官能基としては、ダンシル基、NBD基が望ましいこと、また分子の大きさとしては、トリアジン環が一つの化合物が望ましいことが示唆された。

(3) 炭素が約10の炭化水素鎖を連結部分として、様々な各種官能基と、5-(ジメチルアミノ)ナフタレンスルホニル(ダンシル)誘導体を基本蛍光官能基として有する蛍光プローブ化合物の合成を行った。そして、合成

した各種蛍光プローブを用いて、フジツボキブリス幼生に対する作用を観察した。その結果、従来では、イソニトリル基を有する場合のみに特異的な蛍光が観察されていたが、アルコール、エーテル、エステル、ハロゲンなど他の官能基を有する場合にも、化合物によっては、キブリス幼生内の油球部分に蛍光が観察されることが明らかになった。特に、アルコール、エーテルの場合には、イソニトリル化合物と同等の強い蛍光が観察された。また、ハロゲン原子を有する蛍光プローブ化合物の観察の結果、昨年度の成果と同様に、分子量が大きくなるほど、蛍光の強度が弱くなり、分子量の大きさが油球への取込みに影響していることが示唆された。なお、蛍光強度と付着阻害活性に関して考察したところ、付着阻害活性の強さと、油球での蛍光強度に相関があることが示唆された。

(4) 今後、他の生物種との取込みの差の比較等を検討することによって、本研究の成果が海洋付着生物幼生検出システム開発に応用されることが期待される。

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)

[学会発表](計4件)

北野克和、「蛍光プローブ化合物を用いたフジツボのキブリス幼生に関する生物有機化学的研究」、2009年度日本付着生物学会研究集会、平成21年3月31日、東京(品川)

北野克和、“Structure-activity relationship studies toward anti-barnacle activity and bio-organic studies for understanding the mechanism of the action of anti-fouling active compounds with fluorescence-labeled probes”、Current Topics on Barnacle Biology、平成20年8月1日、神戸

北野克和、“Bio-organic studies for understanding the mechanism of the action of antifouling active compounds with fluorescence-labeled probes”、The 14th International Congress on Marine Corrosion and Fouling、平成20年7月28日、神戸

北野克和、「蛍光プローブ化合物によるフジツボキブリス幼生付着阻害活性発現機構の解明」、日本農芸化学会2008年度大会、平成20年3月28日、名古屋

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北野 克和 (KITANO YOSHIKAZU)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究
院・准教授
研究者番号：10302910

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし