

海洋生物におよぼす紫外線の影響 その4. ダルスが放出した紫外線吸収物質

矢部和夫¹・牧野 愛²・鈴木 稔²

¹北海道東海大学工学部海洋開発工学科(005-8601 札幌市南区南沢5条1丁目1-1)

²北海道大学大学院地球環境科学研究科物質環境科学専攻(060-0813 札幌市北区北10条西5丁目)

K. Yabe¹, M. Makino² and M. Suzuki²: The influence of ultraviolet irradiation on marine organisms.

4. The secretion of UV-absorbing substances from *Palmaria palmata*. Jpn. J. Phycol. (Sôru) 46: 167-172.

UV-irradiation induced secretion of UV-absorbing substances from living frond of most red algae into seawater. These substances from red algae might defend the other organisms in coastal ecosystems from UV radiation. One of these substances from *Palmaria palmata* was purified by using repeated active carbon column chromatography. 1H-NMR (D2O) spectrum of this substance was the same as that of a mycosporine-like amino acid "palythine" from *Chondrus yendoi*.

Key Index Words : *Palmaria palmata*-red algae-UV-absorbing substance-palythine

¹Department of Marine Sciences and Technology, School of Engineering, Hokkaido Tokai University, Sapporo, Hokkaido 005-8601 Japan.

²Division of Material Science, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-0813 Japan.

クロロフルオロカーボン等による成層圏オゾン層の破壊が現実となり、このため成層圏オゾン層の変動にリンクした太陽紫外放射の地表への到達、特にUV-Bの増加およびそれに伴う生物への悪影響が出始めている(Sivalingam and Nishizawa 1990, Karentz *et al.* 1991, Karentz 1992, 1994a)。また、太陽からの紫外線の海洋の生態系にあたる影響に対する海洋生物の耐性機構については、Karentz(1994-b)によってまとめられている。地表に到達する波長別紫外域日射観測業務は、1990年1月1日から気象庁観測部高層課オゾン層解析室において開始された(伊藤ら1991)。また1990年10月からは、太陽紫外UV-B放射計の開発により(Furusawa *et al.* 1990)、屋外連続測定も可能となった。さらに、佐々木(1996)の理論計算では、現在のオゾン全量の320DUを基準とした場合、290nm付近のUV-B放射は、オゾンが10%減少すると3倍に、20%減少すると約10倍に増加すると推算されている。海水中に透過する紫外線の測定は、近年測定機器の開発により正確な測定が行わ

れるようになった。1997年8月に北海道厚岸湾内での測定で、空中紫外線量を100%とした場合、水深1mにおける305, 320, 340, 380nmの紫外線量はそれぞれ8.63, 41.0, 48.7, 68.4%であった(齊藤, 私信)。我々は、このような自然の光環境の中において、沿岸の生態系が維持されるためには何らかの化学物質が太陽の紫外線をカットするフィルターの役割をしているのではないかと考え、各種海藻類に健康線ランプからの紫外線を照射してみた。その結果、紅藻類では光合成活性の低下に伴って320から360nm付近に吸収極大を有する紫外線吸収物質を放出する種類が多く存在することを認めた(矢部ら1997)。海洋生物に存在するこれらの紫外線吸収物質に関する化学的な研究は、1950年代の終わり頃からはじまった。その本体の化学的追究が行われ、抽出・精製・単離の方法、さらにその化学構造等については、1980年代に入り各種機器分析により多数決定された。これらの紫外線吸収物質は紫外域の310nmから360nmに吸収極大を有する一連の化合物で、サンゴ

(Shibata 1969), 無脊椎動物(Ito and Hirata 1977, Takano *et al.* 1978a, 1978b, Karentz *et al.* 1991), 魚卵(Patrick and Peter 1980), 紅藻類(辻野・斉藤 1961, Tsujino *et al.* 1978, 1980, 矢部ら 1980, 1987, 1988)等の海洋生物中に10数種類あまり存在することが明らかにされた。これらの物質は, cyclohexenone 環の側鎖にアミノ酸が結合した形の一連の紫外線吸収物質mycosporine-like amino acids (Favre-Bonvin *et al.* 1976, Arpin *et al.* 1977)であることが明らかにされた。Mycosporine-like amino acidsは水溶性の物質で, 紫外域の310nmから360nmに吸収極大を有するという事は, UV-BやUV-Aの波長域と同じ波長領域である。しかし, これらの物質の細胞中の存在位置, 前駆体, 代謝等についてはこれまで何も分かっていない。また, これらの物質と太陽の紫外線との関係についての生態学的研究は, 近年盛んに行われるようになってきた。本実験では, 紫外線照射により忍路産の紅藻ダルスが放出した紫外線吸収物質を活性炭を使用して精製し, 各種の方法により主成分の同定を試みた。

材料と方法

試料

1996年10月から1997年3月にかけて北海道小樽市忍路湾内で採取したダルス(*Palmaria palmata*)を使用した。採取した藻体を, 滅菌した人工海水で繰り返し洗浄して附着物を取り除いた後, 10℃の恒温室内で通気した状態で保ち, 直ちに実験に供した。

人工海水

マリンアートフォーミュラ(千寿製薬製)を使用し, オートクレイブで120℃で40分滅菌したものを, 恒温室内で10℃まで冷却して使用した。

紫外線照射

藻体の湿重量50g当たり1lの人工海水を加えた容器に藻体が十分に水に浸るようにした後, 落下細菌その他の汚染を避けるため市販のポリ塩化ビニリデンシートで覆い, 直上20 cm位置からToshiba健康線ランプ(FL-20E)1本および白色蛍光灯2本の光(80 mmol・m²・s⁻¹)を照射した。この条件では1時間当たりのDUVの値は約350 Jm⁻²となる。海水中に放出される紫外線吸収物質の測定は上記の条件で2時間照射を行った後に, 直ちに海藻類が浸っていた海水の400-200 nmの吸光度を測定した。この時点でDUVの値は札幌における日積算値の最大値の約700 Jm⁻²の値となる。さらに, 12時間10℃の暗所に放置した後再び紫外線吸収物質の測

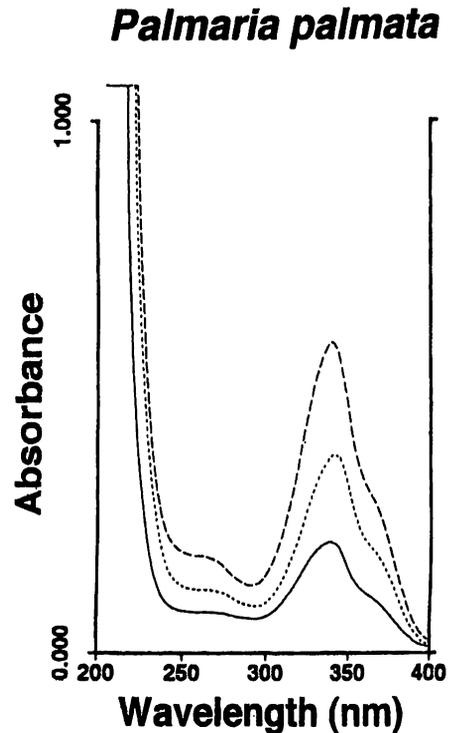


Fig. 1 UV-absorbing spectra of seawater (1l) in which algal frond (50g wet wt.) was cultured and irradiated with UV-A, B for 1hour (350 Jm⁻²), 2hours (700 Jm⁻²), 3hours (1050 Jm⁻²).

— 1hour (350 Jm⁻²)
 - - - 2hours (700 Jm⁻²)
 - · - 3hours (1050 Jm⁻²)

定を行った。同じ条件でToshiba健康線ランプの光のみを照射しないものをコントロールとした。

照射光の紫外域のスペクトル分布はスペクトルラジオメーターPGD-25C(日本分光製)を用いて測定した。また, 被検海水の紫外部の吸収スペクトルは日立U-3210型スペクトロフォトメーターを用い, 波長400-200 nm間の吸光度を測定した。

活性炭クロマトグラフィー

活性炭(和光純薬製)をガラスカラム(30X250 mm)に充填して用いた。放出された紫外線吸収物質を含む3lの海水を30gの活性炭を通過させ, 紫外線吸収物質を吸着させた。流出液中の塩素イオンを硝酸銀反応で, また同じく糖類をフェノール-硫酸反応(阿武・瀬野1963)で測定し, 両者が検出されなくなるまで十分に水洗いを行った。紫外線吸収物質の溶出には60%メタノールを用いた。回収した溶出液のうち320 nmに吸収

極大を有するフラクションのみを集め、減圧40℃以下で濃縮した。以上の操作を数回行って集めた試料を、再び活性炭カラムクロマトグラフィーによって分画し、紫外線吸収物質を精製した。

ペーパークロマトグラフィー

ろ紙はADVANTECのNo.50を使用し、(A) *n*-ブタノール：エタノール：水 (9：1：10, v/v), (B) *n*-ブタノール：酢酸：水 (4：1：5, v/v), (C) イソプロピルアルコール：水 (8：2, v/v), を溶媒とし上昇法で展開した。ペーパー上の紫外線吸収物質のスポットの位置の確認は、健康線ランプ(FL-20E)とフィルター(UVD-25)を使用した紫外線照射(辻野ら 1979)で行った。また、ペーパー上のアミノ酸の確認は0.25%ニヒドリンの60%アセトン溶液による呈色反応で行った。

アミノ酸の分析

試料を封管中6N-HCl, 105-110℃で24時間加水分解した。その後、標準試料(味の素製)を用いて、ペーパークロマトグラムで検討した。

核磁気共鳴スペクトル

試料をD₂Oに溶かし、内部基準にアセトンを用いてJEOLJNM-EX-400(400 MHz)で¹H-NMRを測定した。

DUV値

生物に与える各波長別の影響度を表わす作用スペクトルには気象庁の採用しているACGIH(米国政府衛生学会議)のDamagingUV (DUV)値を用いた。基準とした紫外線量は、気象庁が発表している札幌における

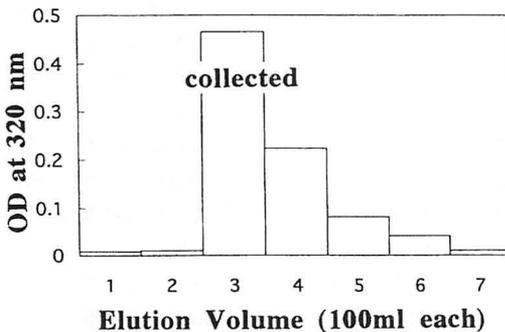


Fig.2 UV-absorption spectra of 60% MeOH fraction which were eluted from active carbon. The numbers show the fraction of 60% MeOH, respectively.

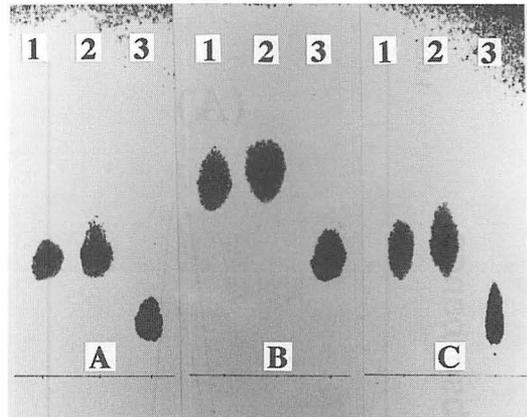


Fig.3 Paper partition chromatogram.

- 1. palythine from *Chondrus yendoii*
 - 2. UV-absorbing substance from *Palmaria palmata*
 - 3. shinorine from *Chondrus yendoii*
- Solent (v/v): (A) BuOH : EtOH : H₂O = 9 : 1 : 10
 (B) BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 1 : 5
 (C) isopropanol : H₂O = 8 : 2
- Development: Ascending
 Detected light source: FL-20E+UVD-25

DUV値の日積算値の最大値である700 Jm⁻²とした。使用した健康線ランプの波長別エネルギーを測定し、この波長別エネルギーに、DamagingUVの作用スペクトルの荷重をかけて波長積分し、DUVのエネルギー値を求めた。本実験で照射した紫外線量はDUV値700 Jm⁻²とした。

結果と考察

今回の実験では、札幌におけるDUVの日積算値の最大値の紫外線量を健康線ランプを用いて、紅藻ダルスに照射し、ダルスから放出される紫外線吸収物質の種類と量の検討を試みた。Fig.1に健康線ランプの照射時間によるダルスから放出される紫外線吸収物質の変化をスペクトル図で示した。1時間、2時間、3時間と照射時間が長くなると、紫外線吸収物質の放出量が多くなることが認められた。はじめに、2時間紫外線照射後12時間後までに海水中に放出された紫外線吸収物質の精製・単離を目指した。藻体50gから海水11中に放出された紫外線吸収物質の量を、320 nmに吸収極大を有するエゾツノマタ(*Chondrus yendoii*)のpalythineの分子吸光係数(log_e=4.55)から概算すると、その濃度は約0.02 mMとなることが分かった。

次に、健康線ランプからの紫外線、即ち人工光源からのUV-Bの照射によって、多くの紅藻類から放出さ

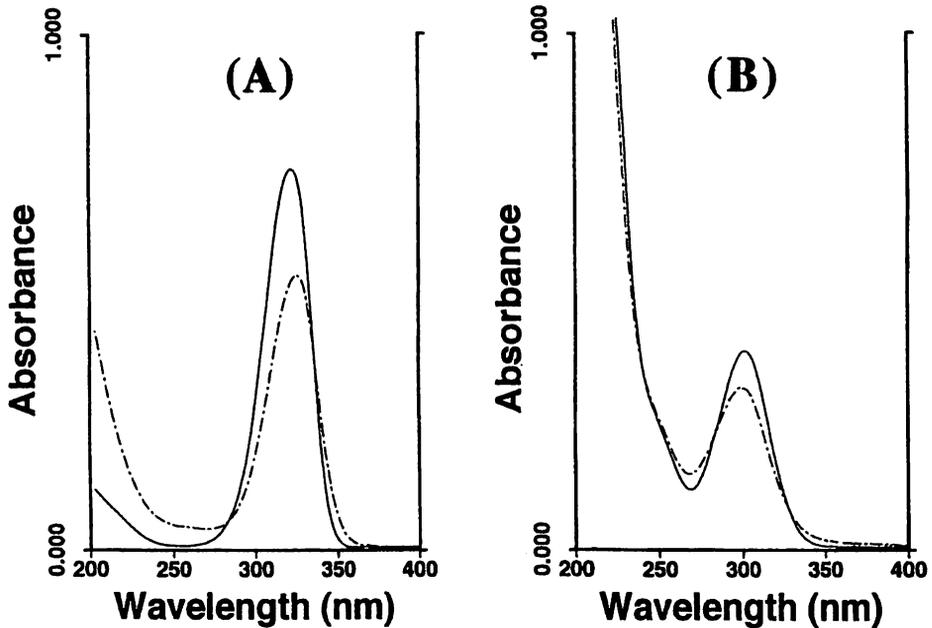


Fig.4 UV-absorbing spectra of palythine (λ_{max} 320 nm) and its derivative (λ_{max} 297 nm) which were isolated from *Chondrus yendoi* and UV-absorbing substance and its derivative from *Palmaria palmata*.

————— *Chondrus yendoi*.
 - - - - - *Palmaria palmata*.

れた紫外線吸収物質はペーパークロマトグラフィーのスポットの確認で数種あることが分かった。また、ダルスが海中に放出した紫外線吸収物質の示す吸収極大の位置は340 nm 付近にあり、さらにダルスは数種類の紫外線吸収物質を同時に放出していることをペーパークロマトグラフィーで確認した。そこで、ダルスが海水中に放出した紫外線吸収物質を、活性炭を用いたカラムクロマトグラフィーを繰り返し行って精製した。紫外線吸収物質は活性炭から60%メタノールで溶出された。この溶出された60%メタノールフラクションの溶出図を Fig.2 に示した。活性炭でのクロマトグラフィーを繰り返し行った結果、320 nm 付近に吸収極大を有するフラクションは、ペーパー上で単一となったので、標準としてエゾツノマタから結晶として単離した palythine と shinorine を用いて、3種の溶媒でペーパークロマトグラフィーを行った。その結果、主成分と思われる紫外線吸収物質は palythine と同じ位置に移動することが確認された (Fig.3)。またこの物質は、1%の水酸化ナトリウム水溶液中に1時間、40℃で放置するときに吸収極大の位置が297 nm に移動した (Fig.4)。これはエゾツノマタの palythine をアルカリ性溶液中に放置したとき、glycine と aminocyclohexenone ができる反応であ

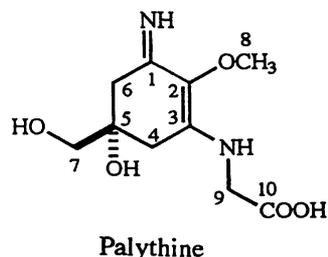
り (Tsujino *et al.* 1978)、これは Ito and Hirata (1977) が Mycosporine-Gly を水中で加熱して glycine と不安定な β -diketone を得た反応と同じと考えられる。ダルスから単離した紫外線吸収物質を 6 N HCl で加水分解した後のアミノ酸は glycine のみが確認された。

さらに、この物質の化学構造の確認のために $^1\text{H-NMR}$ の測定を行った。その結果、 δ 2.62 と 2.65 に cyclohexenone 環上のメチレンプロトンが各々 $J=17.6\text{Hz}$ で 2H 分 AB quartet に、 δ 3.39 に 3H 分メトキシル基のシグナルが singlet に、 δ 3.39 と 3.85 に 2H 分それぞれヒドロキシメチレン基、およびカルボキシル基と窒素原子に挟まれたメチレン基の singlet が観察された。これらのシグナルの値をすでに化学構造が決定されている標準として用いたエゾツノマタの palythine の値と比較したところ、両者は良く一致した (Table 1)。これらの結果より、ダルスから放出された紫外線吸収物質の主成分の一つは palythine であることが明らかになった。今後さらに、精製・単離の方法を改良することによりダルスより放出される他の紫外線吸収物質を単離することができるものと思われる。palythine は約30年前に紅藻類 (Tsujino *et al.* 1978) ばかりではなく、イワスナギンキャク (Takano *et al.* 1978) からも分離されているが、そ

Table 1 ¹H-NMR data (400MHz) and chemical structure of palythine from *Chondrus yendoii* and UV-absorbing substance from *Palmaria palmata*.

<i>Chondrus yendoii</i>		<i>Palmaria palmata</i>
C	δ	δ
1		
2		
3		
4	2.62(2H, AB q, J=17.6)	2.62(2H, AB q, J=17.6)
5		
6	2.64(2H, AB q, J=17.6)	2.65(2H, AB q, J=17.6)
7	3.39(2H, s)	3.39(2H, s)
8	3.47(3H, s)	3.46(3H, s)
9	3.85(2H, s)	3.85(2H, s)
10		

Measured in D₂O; int. stand. acetone (2.05ppm)



の生態的役割については、いまだに良く理解されていない。

今回の結果を生態学的に見ると、紅藻類に紫外線を照射することによって紫外線吸収物質 mycosporine-like amino acids の放出が行われるということは、310 から 360 nm に吸収極大を有する数種類の紫外線吸収物質を放出することにより紅藻類は自らおよび自らの周りの沿岸域の生態系を太陽の紫外線、特に UV-B, A から守るフィルターとして保護しているのではないかと考えられる。しかし、現場の海水中での紫外線吸収物質の分布や濃度に関する調査は行ってないので、これらの予想は今後の課題として残されている。

謝辞

本研究を行うに当たり、適切な御助言をいただいた東海大学総合科学技術研究所・佐々木政子教授に心より御礼申し上げます。

引用文献

Arpin N., Favre-Bonvin J. and Thevend S.1977. Structure de la mycosporine 2, nouvelle molecule, isolee de Botrytis cinera. Tetrahedron Letters No.10, 819-820 .
 阿武喜美子・瀬野信子 1963. 糖類の分離, 分析. 実験化学講座 23 丸善, 東京, pp. 433.
 Favre-Bonvin, J., Arpin N.and Brevard N.1976. Structure de la mycosporine(P-310). Can. J. Chem. 54, 1105-1113.
 Furusawa, Y., Suzuki, K. and Sasaki, M. 1990. Biological and Dosimeters for Monitoring Solar UV-B Light. J. RADIAT. RES. 31:189-206.
 伊藤朋之・上野丈夫・梶原良一・下道正則・上窪哲郎・伊藤真人・小林正人 1991. 地上到達紫外線量の監

視技術の開発 — オゾン層変化に伴う地上到達紫外線量の変化のスペクトル観測による評価—
 Journal of Meteorological Research Vol.43, No.5.
 Ito, S. and Hirata, Y.1977. Isolation and Structure of Mycosporine from The Zonithid Palythoa tuberculosa. Tetrahedron Letters No.28, 2429-2430.
 Karentz, D.1992. Prevention of Ultraviolet Radiation Damage in Antarctic Marine Invertebrates. Stratospheric Ozone Depletion/UV-B Radiation in the Biosphere:Global Environmental Change, Vol.18:175-180.
 Karentz, D.1994-a. Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of working group on bacteria and phytoplankton. Advances in Limnology 43: 31-69.
 Karentz, D.1994-b. Ultraviolet Tolerance Mechanisms in Antarctic Marine Organisms. Antarctic Research Series. Volume 62, 93-110.
 Karentz, D., McEuen, F.S., Land, M. C.and Dunlap, W.C. 1991. Survey of mycosporine-like amino acids compounds in Antarctic marine organisms : potential protection from ultraviolet exposure. Marine Biology 108:157-166.
 Kobayashi, J., Nakamura, H. and Hirata, Y.1981. Isolation and structure of a UV-absorbing substance 337 from the ascidian *Halocynthia roretzi*. Tetrahedron Letters No.22, 3001-3002.
 Patrick, T. G. and Peter, A. P. 1980. Gadusol, A Metabolite from fish eggs. Tetrahedron Letters No.21, 4043-4044.
 佐々木政子 1996. 光環境と UV. 照明学会誌 80(1):18-23.
 Shibata, K.1969. Pigments and a UV-absorbing substance

- in corals and a blue-green algae living in the Great Barrie Reef. *Plant and Cell Physiol.* 10:325-335.
- Sivalingam, P.M. and Nishizawa, K.1990. Ozone hole and its correlation with the characteristic UV-absorbing substance in marine algae. *Jpn. J. Phycol.* 38:365-370.
- Takano, S., Uemura D. and Hirata Y.1978a. Isolation and structure of a new amino acid, palythine, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Letters* No.26, 2299-2300.
- Takano, S., Uemura D. and Hirata Y.1978b. Isolation and structure of two new amino acid, palythanol and palythene, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Letters* No.49, 4909-4912.
- Tsujino, I., Yabe, K., Sekikawa I. and Hamanaka N.1978. Isolation and structure of a mycosporine from the red alga *Chondrus yendoi*. *Tetrahedron Letters* No.16, 1401-1402.
- Tsujino, I., Yabe, K. and Sekikawa I.1980. Isolation and structure of a new amino acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi*. *Bot. Mar.* 18 : 65-68 .
- 辻野勇・斉藤恒行 1961. 海藻の特殊成分の研究 I. 紅藻に特有な紫外線吸収物質の存在について. 北大水産彙報 12 (1), 49-58.
- 辻野勇・矢部和夫・櫻井正俊 1979. 紅藻に存在する 358 nm 付近の吸収物質(Z成分)について. 北大水産彙報 30(1), 100-108.
- 矢部和夫・関川勲・辻野勇 1980. 紅藻カレキグサより 333-334 nm 吸収物質(Y物質)の単離とその化学構造. 北教大紀要 30, 271-278.
- 矢部和夫・関川勲・辻野勇 1987. 紅藻フクロフノリより 333-334 nm 吸収物質 shinorine の単離とその化学構造. 北教大紀要 38(1)11-15 .
- 矢部和夫・関川勲・辻野勇 1988. 海藻の特殊成分の研究 XIX: フジマツモ Y 成分の誘導体 日本水産学会講演要旨集 p.209.
- 矢部和夫・牧野愛・鈴木稔 1997. 海洋生物におよぼす紫外線の影響 2. 紫外線が潮間帯産海藻の光合成および紫外線吸収物質放出に与える影響. 藻類 45: 157-162.

(Received July 15 1998, Accepted Sept. 11 1998)