

## グミの含有する忌避物質に関する研究

松井 繁明<sup>1</sup>・塚本 彩子<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>研究部・<sup>2</sup>長崎大学工学部)

福岡県玄界島沖で採取したグミ *Cucumaria echinata* をサンプルとして、2006年11月～'07年10月の各月、ウサギ赤血球に対する溶血活性を全個体と各部位（内包水、内臓、生殖腺、体皮）ごとに測定した。塩分処理による溶血活性の変化や刺激による溶血活性の変化について検討した。硫酸アンモニウム、塩化ナトリウムのそれぞれで溶血性物質の塩析を行い、両者の抽出液について溶血活性を比較した。溶血活性は、生殖腺が最も高く次いで体皮、内臓に活性が見られたが、内包水にはほとんど活性が見られなかった。生殖腺の溶血活性は、10月に最高値78.4%を示し、成熟に伴い忌避物質を増加させ食害防止に寄与していると考えられた。塩分処理を行った個体については特に溶血活性の低下が見られなかったが、海水中へ溶血成分の溶出がみられ捕食との関係が示唆された。また、刺激により溶血成分が海水中へ放出されることが分かった。塩析試験の結果、硫酸アンモニウムにより簡易にグミから溶血成分を抽出できることが明らかになった。

キーワード：グミ，福岡湾，溶血活性，忌避物質

'89年に九州北部海域の小呂島周辺で大量発生したグミは、分布域を変化させながらも発生を継続し、漁業に多大な影響を及ぼしている<sup>1)2)</sup>。特に近年は、沿岸域へ分布が拡大し、漁業に与える影響がより深刻化している<sup>3)</sup>（図1）。グミは水温、塩分の適応範囲が広く、飢餓耐性が高い等、環境への適応能力が優れている。また、マナマコと比較して産卵数は少ないものの、幼生の斃死率がきわめて低く、捕食者もほとんど認められていない。グミを捕食する生物としては、ヤツデヒトデ、ヤツシロガイ等わずか数種が報告されているのみである<sup>4)</sup>。

捕食者が少ないという特性は、グミが溶血活性や細胞

毒などを示す防御物質（忌避物質）を有することに起因している。そこで本研究では、グミを捕食者から防御し大量発生の原因となると考えられる忌避物質について、CEL-IIIを含む溶血性物質に着目しその局在性、溶血活性の季節変化について検討するとともに、昨年度までの研究で明らかになった塩分処理後のグミの被捕食率の増加について、その機構を明らかにする。加えてグミの有効利用を検討するために個体から溶血成分の簡易な抽出方法を検討した。

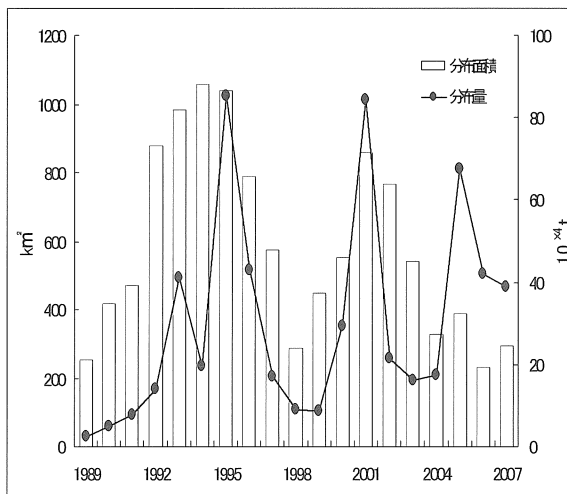


図1 分布量と分布面積の経年変化

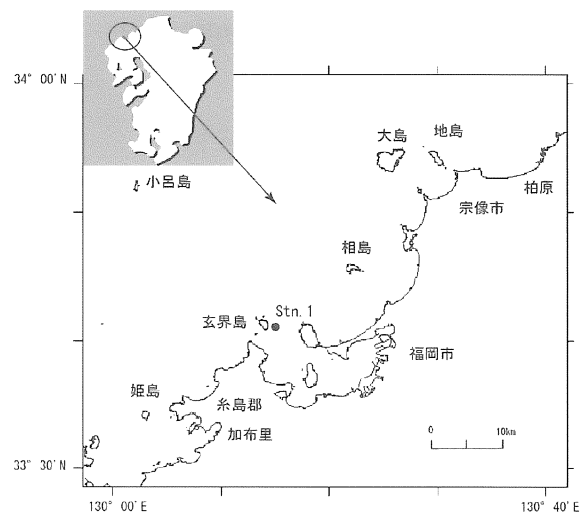


図2 調査地点

## 方 法

グミの分布密度が高く周年で安定した採取が可能な、玄界島北西海域Stn. 1を調査点とし、'06年11月～'07年10月まで毎月、グミ桁網<sup>3-5)</sup>によりサンプリングを行った(図2)。採取したグミは研究室に持ち帰り、解剖用はさみ等で各組織ごとに分離し-30℃で保存した。また、卵、精子が成熟し雌雄の判別が可能な9、10月については、顕微鏡下で雌雄を判別し、生殖腺を卵巣と精巣に分離して溶血活性を測定し比較した。

### 1. 溶血活性の測定

サンプルを解凍後、各組織ごとに2.0g採取し、5倍量のトリス緩衝生理食塩水(TBS)を加えホモジナイザーを用いて、全個体、体皮は1～2分間、内臓、生殖腺は30秒間破碎した。TBSはあらかじめ10倍量(Tris12.1g + NaCl8.76g + 蒸留水900ml → HClでpHを7.8に調節)に調整しておいた溶液を測定時に10倍希釈して使用した。破碎後、各サンプル10mlを高速冷却遠心分離機(KUBOTA7936)で10000r.p.m, 4℃, 10分間遠心分離し、上澄みを各組織の抽出液とした(図3)。グミの各組織の抽出液をTBSで50倍希釈したもの100μlを、あらかじめ調節した同量の10%(v/v)RRBC溶液(ウサギ赤血球溶液)と混合して室温で30分間インキュベートした。インキュベート後10000r.p.m, 4℃で5分間遠心分離し、上澄み100μlをTBSで20倍希釈し、分光光度計(日立U-3500)を使い540nmでの吸光度測定を行った(図4)。RRBC溶液(株式会社日本バイオテスト研究所製ウサギ保存血)は、遠沈管に採取した保存血に適量のTBSを加え懸濁させた後3000r.p.m, 4℃, 5分間遠心分離し、上澄みを取り除く作業を数回

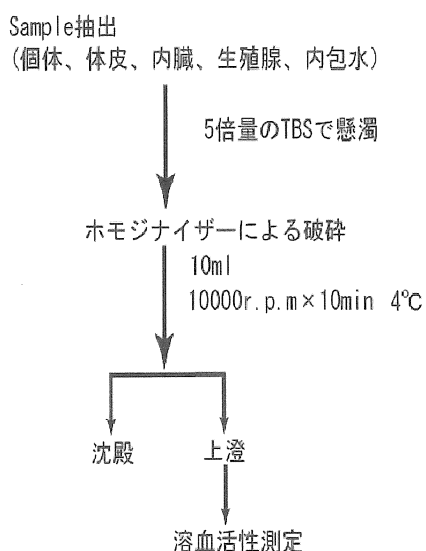


図3 溶血活性測定方法(前処理)

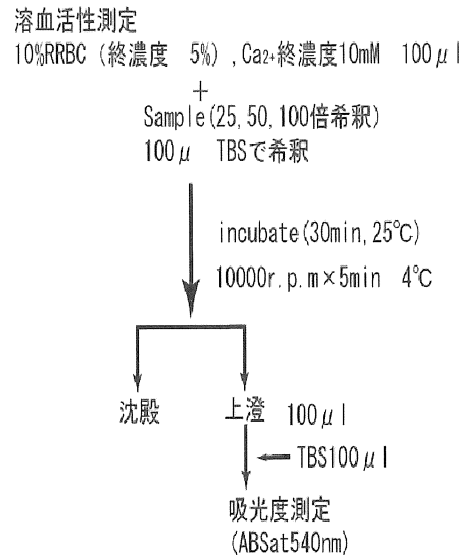


図4 溶血活性測定方法

繰り返し、沈降した赤血球にTBSを加えて10%(v/v)に調整した。NC(ネガティブコントロール)はTBSとRRBCの混合液を、PC(ポジティブコントロール)はTBSとRRBCの混合液にTritonX-100を1%(v/v)加えたものを用いた。測定結果はPCに対する割合  

$$\text{溶血活性}\% = (\text{Sample} - \text{NC}) / (\text{PC} - \text{NC}) \times 100\%$$
で表した。

### 2. 塩分処理による溶血活性の変化

10月19日に採取したグミ(体長185±2.14mm, 重量1.01±0.36g)を100個体づつ2試験区に分け、片方の試験区に飽和食塩水による塩分処理<sup>9)</sup>を行った。塩分処理を行なった試験区の個体は約5分後、生殖腺、内臓の露出を確認した後、取り上げて二次濾過海水で軽く洗浄し、全個体2gをサンプルとした。対照区として塩分処理を行わない全個体も同様に2g採取し、両サンプルについて抽出液を25, 50, 100倍に希釈して溶血活性を測定した。また、塩分処理したサンプルについては、処理後海水で洗浄した個体10gを500mlのビーカーに収容し400mlの海水を加え溶液中の溶血活性を0, 5, 10, 30, 60, 120分経過時に測定した。

### 3. 溶血活性の経時変化

物理的な刺激によるグミの海水中への忌避物質の放出を検討するために、10月19日に採取したグミを使い実験を行った。500mlビーカーにグミ10g(10～11個体)を収容し400mlの2次濾過海水を加え、片方の試験区はスターラーで攪拌しグミにスターラーが接触して物理的な刺激を与える状態とした。対照区は外的な刺激が加わらない状態で静置した。採水はマイクロピペットを使い、0, 5, 10, 30, 60, 120分経過時に100μl採取した。対照区は、採水時に濃度が均一となるようにガラス棒で軽く

攪拌した。採水したサンプルは、同量の10%RRBC溶液を加え溶血活性を測定した。

#### 4. 塩析による溶血性物質の分離

グミ個体から簡易に溶血成分を抽出することを目的として塩析試験を行った。通常用いられる硫酸アンモニウムに加えて、塩分処理による溶血成分の変化を検討するために塩化ナトリウムによる塩析を行った。

グミ 1 kg に TBS 1.5 l を加えてミキサーで粉砕、濾過しグミ体液を採取した。グミ体液を 8000 r.p.m, 4℃ で 20 分間遠心分離し、上澄を TBS に対して透析膜（三光純薬製セルロースチューブ）を使い精製し、グミ組織抽出液とした。グミ組織抽出液 500 ml を 8000 r.p.m, 4℃ 15 分間遠心分離し、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> または、NaCl を飽和状態になるまで加えた。4℃ で 1 時間攪拌し、8000 r.p.m, 4℃ で 20 分間遠心分離し上澄みを除いた。沈殿物を少量の蒸留水で懸濁し TBS に対して一晩透析した。さらに、8000 r.p.m, 4℃ で 15 分間遠心分離後、沈殿を除いたものを溶血性物質抽出液とした（図 5）。抽出液と沈殿後の上澄みを平底 96 穴シャーレーに移し倍々に希釈したものに等量の 5% RRBC 溶液を加えて溶血活性を測定した。活性は最大希釈率の逆数として示した。

## 結果

### 1. 溶血活性の測定

溶血活性の各組織別経月変化を図 6 に示す。組織ごとの溶血活性は生殖腺が最も高く次いで体皮、内臓で、グミが含有する内包水にはほとんど活性が見られなかった。溶血活性の季節変化をみると生殖腺は測定開始した

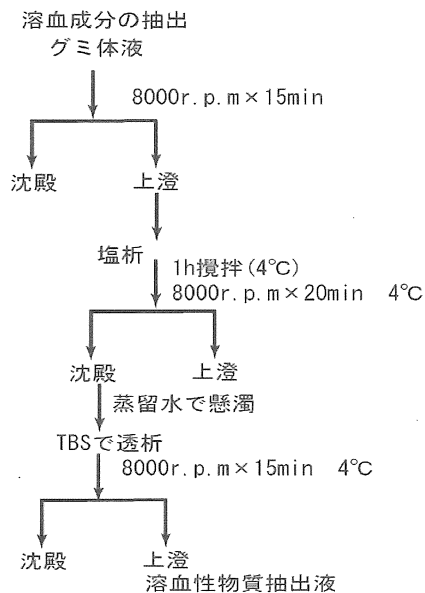


図 5 溶血成分の抽出方法

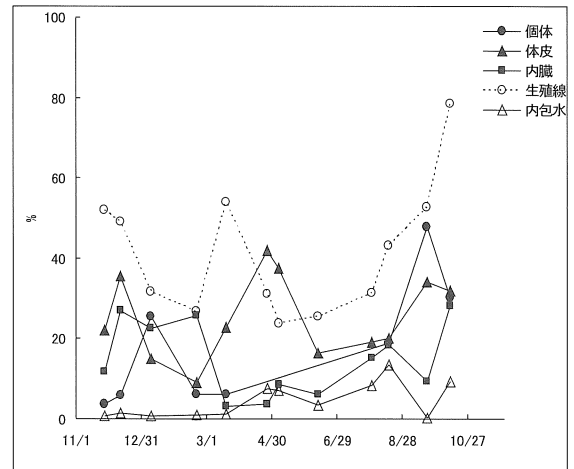


図 6 溶血活性の経月変化

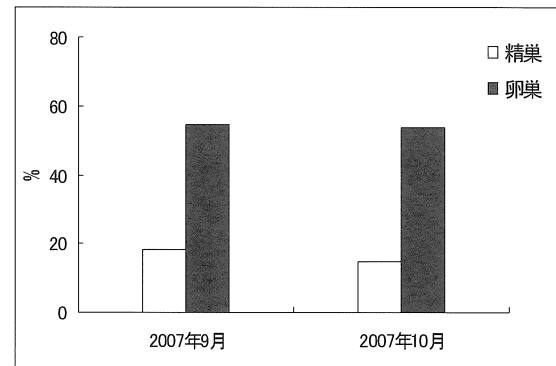


図 7 生殖腺の溶血活性

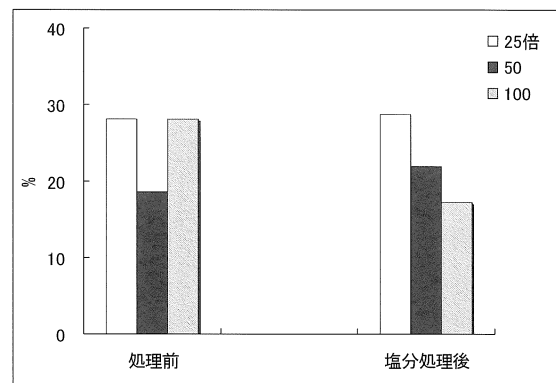


図 8 塩分処理による溶血活性の変化

11月には52%と高くその後減少する傾向を示し、3月に一旦上昇したがその後再び減少し、5月に最低値23.7%を示した。8月までは大きな変化は見られず比較的低い値で推移したが、その後急激に上昇し10月の測定では最高値78.4%を示した。体皮は12月から2月にかけて減少傾向を示し2月に最低値9.1%を示した。その後上昇し4月末の測定で41.8%を示した。その後、6月にかけて減少し8月までは大きな変化はなかったが、9月に上昇し最

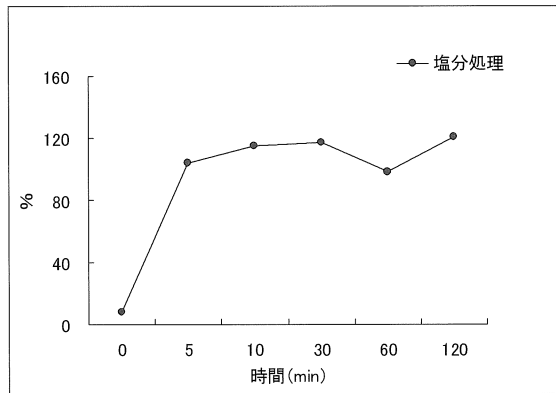


図9 塩分処理後の溶血活性の経時変化

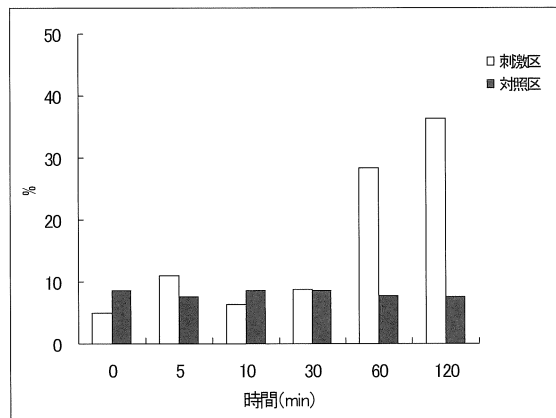


図10 物理的な刺激による溶血活性の変化

高値49.3%を示した。内臓は12月～3月にかけて20%以上で推移したがその後減少し、6月までは大きな変化は見られず8～11月にかけて若干上昇する傾向を示した。

生殖腺を精巣、卵巣に分けてみると9月、10月のいずれも卵巣が53～54%と精巣の14～18%の約倍近い値を示した(図7)。

## 2. 塩分処理による溶血活性の変化

通常の個体と塩分処理をした個体の溶血活性を比較すると25, 50倍希釈では通常個体と塩分処理を行った個体に大きな差は見られなかった(図8)。100倍希釈では、通常個体が28.09%, 塩分処理個体が17.26%と処理した個体の活性が低い傾向がみられた。処理後の個体を海水に収容した試験区では開始時は活性がほとんどみられなかったが5分後から急激に上昇し120分後まで100%を上回る活性を示した(図9)。

## 3. 溶血活性の経時変化

物理的な刺激によるグミの海水中への忌避物質の放出は、開始時から30分まではいずれの試験区も10%以下の低い活性を示し、対照区(刺激を与えなかった試験区)では120分後まで活性の変化は見られず10%以下で推移

した。スターラーによる刺激を与えた試験区は60分後にかけて活性が上昇し120分後には36.3%まで上昇した(図10)。

## 4. 塩析による溶血性物質の分離

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を使って塩析した試験区では、塩析後の上澄みにほとんど活性がみられず、最終の抽出液では128倍希釈した溶液まで活性がみられた。これに対してNaClを使った試験区では、塩析後の上澄みに、64倍希釈まで高い活性がみられ、反対に最終の抽出液にはほとんど活性が見られなかった。また、塩析後の沈殿は、ほとんど起こらなかった。

## 考 察

グミの溶血活性は生殖腺が最も高く、生殖腺の経月変化は4～8月に低く10月に最も高い値を示している。これは、グミの形態から見ると、夏眠が始まる6月から夏眠中の8月まで溶血活性が低く、夏眠中に徐々に増加し産卵期前に最も高くなっている。こうした、溶血活性の推移は産卵時に外敵から卵を防御するためと考えられる。今回の実験で卵巣と精巣では、成熟が進み精子、卵が明確に判別できる時期では明らかに卵巣に活性が高いことが明らかになった。また、夏眠期に貝殻や砂を体に付着させ、互いに固着するのは成熟のために活性を落すの<sup>4)</sup>に加えて、溶血活性が低下し防御機能が低下するために食害防止の目的もあるのではないかと考える。

昨年度までの研究で塩分処理した個体は被捕食率が上がることから、内包水が体外に排出されて溶血活性が低下し忌避効果が薄れるのではないかと考えていた<sup>6)</sup>。しかし、今回の結果では塩分処理直後の個体は溶血活性の低下がみられず(図8)、また、内包水に溶血活性がほとんど見られないことから(図6)上記の仮説は否定される。一方、塩分処理後しばらくすると海水中の溶血活性が著しく上昇することが明らかになった(図9)。これは、塩分処理により体外に露出した生殖腺や体皮からの溶出によると考えられる。グミを冷凍し生殖腺が破壊されるとドリップ中の溶血活性が著しく上昇することも同様の理由に因る。換水を行わない今回の実験設定では溶血活性が上昇したまま保たれたが、実際の漁場では、溶出した溶血成分は移流拡散し溶血活性は低下する。このため忌避効果が薄れ捕食率が上昇すると考えられる。溶血活性の経時変化の実験から、通常でもグミは海水中に溶血成分を溶出させているが、物理的な刺激により溶血活性を増加させることが明らかになった(図10)。グミの海水中への溶血成分の溶出は、サンプリングしたグミを水槽に移したときに水面が泡立つことや、底曳網等で混獲した魚が衰弱、斃死することからも推察される。

塩析による溶血性物質の分離については、今回の実験でNaClによる塩析効果はほとんど無く抽出は困難であるが、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ では効果的な塩析が可能で、簡易に溶血成分の分離、抽出が可能であることが明らかになった。グミには4種類のレクチンCEL-I～IVが存在し、そのうちのCEL-IIIはヒト、及びウサギ赤血球にたいして強い溶血作用があり培養細胞に対しても強い毒性を有することが明らかになっている<sup>78)</sup>。今回の方法では溶血成分全体の抽出を行うため、こうしたレクチン以外の溶血成分も抽出している。畠山らは、抽出物中にはCEL-III由来の高分子量画分と低分子量の溶血性画分あり、低分子溶血成分がサポニンである可能性を指摘している<sup>7)</sup>。グミの体内にあるこれらの忌避物質が総合的にグミの外敵に対する生体防御機構に重要な役割をはたしていると考えられる。グミの溶血成分については個々のレクチンについて構造や溶血活性の発現機能の詳細な研究がなされている<sup>78)</sup>。しかし、今回行った簡易な抽出方法の開発や溶血活性を持った総合的な成分の利用については検討されていない。今後は抽出された溶血成分の魚介類の対する影響と忌避効果について明らかにするとともに水産分野での利用を検討する必要がある。また、今回行った溶血活性の研究は今後グミを利用する基礎資料として活用できると考える。例えば、グミの餌料としての利用を考える場合、溶血活性が低く生殖腺が比較的発達している夏眠期直後の個体の利用や塩分処理や凍結によって溶血活性を低下させるなどの方法が検討される。

## 文 献

- 1) 山本千裕ら：福岡県筑前海で見られたグミ (*Cucumaria echinata*) の異常発生について、福岡水試研究報告, 37-42 (1990).
- 2) 金沢孝弘ら：筑前海におけるグミの分布域 (1982～'92年), 福岡水試研究報告第18号, 69-72 (1992).
- 3) 吉田幹英ら：グミ分布域の変遷と環境について、福岡県水産海洋技術センター研究報告, 第13号, 77-85 (2003).
- 4) 杉野浩二郎ら：グミ生態に関する研究—夏眠行動と発生に関するいくつかの知見—, 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 第11号, 71-75 (2001).
- 5) 田中義興ら：福岡県筑前海におけるハスノハカシパンの異常発生について、福岡水試研究報告, 199-201 (1982).
- 6) 松井繁明ら：グミの防除に関する研究—塩分処理によるグミ駆除技術の開発—, 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 第15号, 77-85 (2005).
- 7) T. Hatakeyama, T. Suenaga, S. Eto, T. Niidome, and H. Aoyagi, J. Biochem. 135, 65-70 (2004).
- 8) T. Hatakeyama, H. Kohzaki, H. Nagatomo, and N. Yamasaki: Purification and characterization of four  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. Journal of Biochemistry (J. Biochem.) 209-214 (1999).