

海洋深層水で栽培した海藻中の有用成分の分析

照屋正映、市場俊雄

沖縄県海洋深層水研究所において久米島沖水深 612m から取水している海洋深層水を利用して栽培したフロリダ産オゴノリ属の海藻 *Gracilaria tikvahiae* McLachlan の腸内細菌叢への影響について、腸内悪玉菌に対する抗菌活性を指標としてその有効成分の抽出および分析技術の開発を行った。その結果、海藻のメタノール抽出エキス中の三つの分画において成分を単離し、腸内悪玉菌に対する抗菌活性を確認した。

1 はじめに

沖縄県海洋深層水研究所では、海洋深層水の特徴である窒素、リンなどの栄養塩類が豊富であるという「富栄養性」を利用して、紅藻の一種であるフロリダ産オゴノリ属の海藻 *G. tikvahiae* の陸上栽培技術を確立している。さらに、本種オゴノリの栽培技術の移転も行われており、研究所に隣接する敷地には平成 16 年に深層水を利用した海藻の養殖場が完成し、その一角で本種オゴノリの栽培が行われている。本種オゴノリは米国ハワイ島でも深層水を利用して栽培が行われており、キムチや海藻サラダの材料として使われているところである。

琉球大学医学部の本種オゴノリに関する実験において、深層水で栽培された本種オゴノリをマウスに給餌したところ、腸内細菌叢への影響について悪玉菌の増殖が抑制される傾向が見られた。しかし、その活性成分の分

離・分析についての研究は行われていない。

オゴノリ属海藻中の成分に関しては、モサオゴノリ (*Gracilaria coronopifolia*) から Malyngamide M、カタオゴノリ (*Gracilaria edulis*) から Polycavernoside 類などが報告されている (図 1)。

また、紅藻類由来の抗菌性物質としては、モロイトグサ (*Polysiphonia morrowii*) からプロモフェノール類の 5-Bromo-3,4-dihydroxybenzaldehyde、クロソゾ (*Laurencia intermedia*) からテルペノイドの laurinterol、isolaurinterol が、タマイタダキ (*Delisea fimbriata*) からは Fimbrolide 類などが報告されている (図 2)。

本研究では、腸内悪玉菌に対する抗菌活性を指標として、本種オゴノリの有用成分の分離・分析を行った。

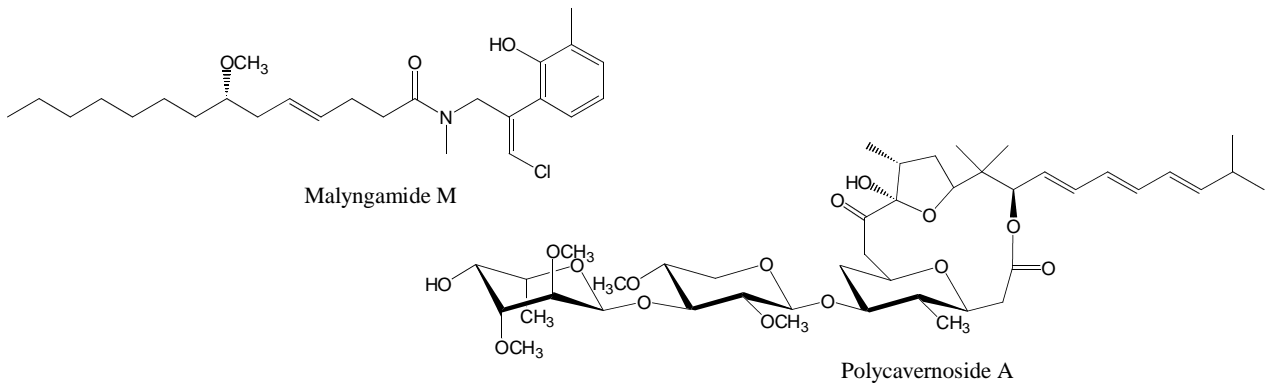


図 1 オゴノリ属海藻中の成分

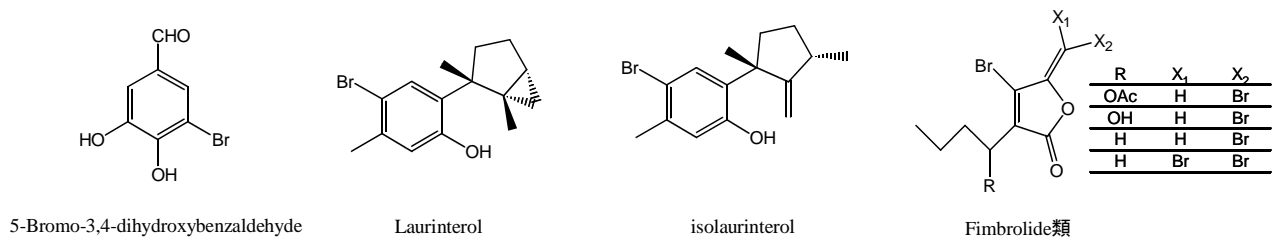


図 2 紅藻類由来の抗菌性物質

2 実験方法

2-1 装置

乾燥オゴノリの粉碎には、IKA の MF10 ベーシック(メッシュサイズ：1.0mm) を用いた。

オゴノリ抽出物の分析には、Waters の高速液体クロマトグラフィー装置 Alliance (送液部：2690、検出器：996、データ処理：Millennium³²) を用い、カラムとしては Waters の Symmetry C18 (4.6mm × 100mm、3.5 μ m) 及び Symmetry C8 (4.6mm × 100mm、3.5 μ m) を用いた。

成分の粗分離には YMC の ODS-AM120-S50 (50mm × 300mm ガラス中圧カラム) を用い、また、成分の粗分画における吸引液体クロマトグラフィーには、MERCK の Silica gel 60 (63-200 μ m) を用いた。精製には Waters の高速液体クロマトグラフィー装置 (送液部：600E、検出器：UV9486、データ処理：Millennium³²) とカラムとして Waters の Symmetry C18 (19mm × 150mm、7 μ m) または Symmetry C18 (19mm × 300mm、7 μ m) を用いた。

構造決定では、日本電子の核磁気共鳴装置 (NMR) JNM-LA400 及び質量分析装置 (MS) JMS-700、Perkin Elmer のフーリエ変換赤外吸収スペクトル装置 (IR) Spectrum 2000 Explorer を使用した。

2-2 試薬及び試料

沖縄県海洋深層水研究所より供給された乾燥オゴノリは粉碎機にて粉碎した後、ポリプロピレン製の保存容器で抽出を行うまで室温保存した。

抽出溶媒にはエタノール (関東化学、一級)、脱イオン水 (上水を蒸留後脱イオン)、メタノール (関東化学、特級) を用いた。

クロマトグラフィー用の溶媒としては、メタノール (関東化学、特級) は 0.45 μ m メンブレンフィルターで濾過したもの及び超純水 (上水を蒸留、脱イオン後 0.20 μ m メンブレンフィルター濾過) を使用した。酢酸は和光純薬工業の特級試薬を、n-ヘキサン、n-ブタノールは関東化学の特級試薬を、酢酸エチルはナカライテスクの特級試薬を用いた。

2-3 深層水栽培オゴノリ中の抗菌活性画分の分析

粉碎した乾燥オゴノリ 160g をフッ素加工されたポリエチレン製容器に 50%エタノール 800mL を抽出溶媒として加えたもの 4 本を、超音波浴槽で 37、1 時間抽出を行った。抽出後、1,000rpm、20 で 30 分間遠心分離を行った後、上清を減圧下でエタノール除去した。得られた抽出物を酢酸エチル/水で分液して酢酸エチル抽出物 (0.810g) を得た後、さらに n-ブタノール/水で分

液を行いブタノール抽出物 (3.360g)、水抽出物 (178.26g) を得た。得られた三つの抽出物の腸管内嫌気性菌に対する抗菌試験を行ったところ、酢酸エチル抽出物、ブタノール抽出物両方に抗菌活性が認められたので、収量の多かったブタノール抽出物に対して粗分離を行った。なお、抗菌試験は琉球大学医学部にて行った。

表 1 HPLC 分析条件

カラム	Waters Symmetry C18
溶媒	90%メタノール
流速	1mL/min
カラム温度	30
検出	190-600nm でのマックスプロット

粗分離は、C18 の中圧カラムを用いて行った。粗分離後、各フラクションに対して抗菌試験を行い、活性のあったフラクションを集めて分取 HPLC により精製を行った。精製後、各フラクションに対して抗菌試験を行い、活性のあったフラクションに対して表 1 に示す条件で HPLC 分析を行った。(図 3)

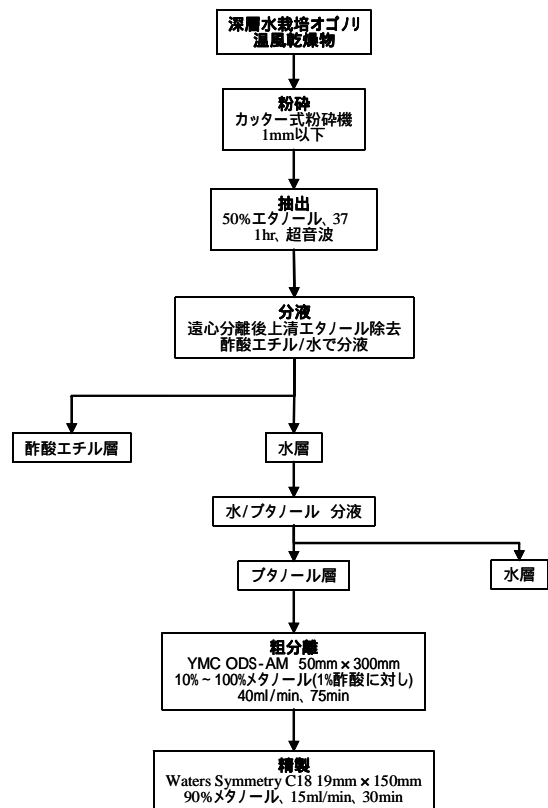


図 3 深層水栽培オゴノリ中の抗菌活性画分分析スキーム

2-4 深層水栽培オゴノリ中の抗菌活性成分の大量分離

2 - 3 節の HPLC 分析結果より得られたクロマトグラムのピークを指標として、以下に示す方法で抗菌活性成分の大量分離を行った。

抽出は、粉碎した乾燥オゴノリ 1.3kg をステンレス製容器に入れ、抽出溶媒としてメタノール 13L を加えて 3 日間室温で静置した。

抽出後、上清を減圧下でメタノール除去した後、残渣をヘキサン/メタノールに溶解させ析出した塩を濾過により取り除いた。濾液を減圧下で溶媒除去した後、酢酸エチル/ヘキサン/メタノール/水 (7:4:4:3) で再抽出し、HPLC 分析により目的ピークの確認された上層を減圧下で溶媒除去することにより抽出物を得た。(図4)

2 - 5 深層水栽培オゴノリ中の抗菌活性成分の分析・同定

2 - 4 節で得た抽出物を C18 の中圧カラムを用いて粗分離を行い、得られたフラクションに対して表2に示す条件で HPLC 分析で目標のピークを確認し、また、抗菌試験で活性の確認も行った。(図4)

表2 HPLC 分析条件

カラム	Waters Symmetry C18
溶媒	80%メタノール
流速	1mL/min
カラム温度	30
検出	190-400nm でのマックスプロット

しかし、再抽出物はメタノールへの溶解性が悪く、粗分離の際の HPLC カラムへの試料導入が困難であることから、再抽出物の吸引液体クロマトグラフィーによる粗分画を行った。すなわち、抽出物を n-ヘキサンに溶

解させた後、MERCK の Silica gel 60 (63-200 μ m) カラムに吸着させた。カラムを n-ヘキサンで洗浄した後、表3に示す溶媒条件で n-ヘキサンから酢酸エチル、メタノールへ濃度を変えて吸着物を溶出させた。(図4)

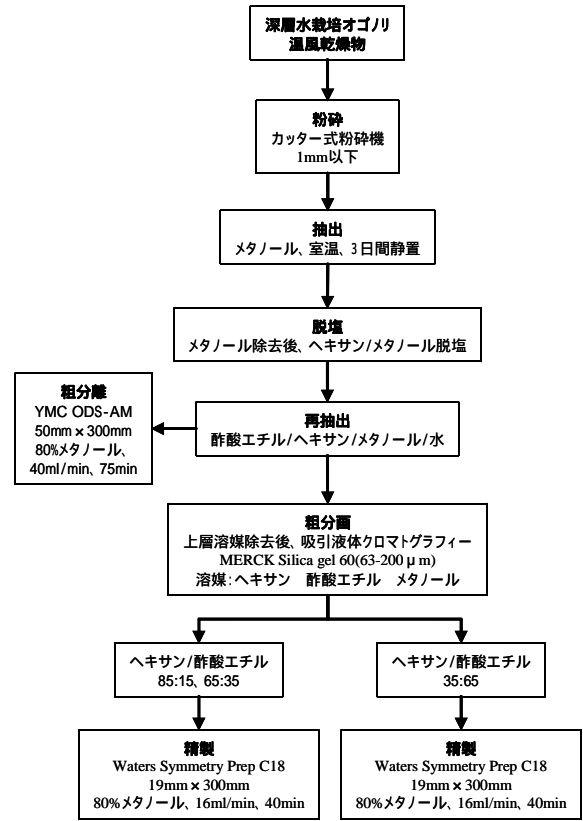


図4 深層水栽培オゴノリ中の抗菌活性成分分離・分析スキーム

表3 吸引液体クロマトグラフィー溶媒条件

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n-ヘキサン	100	97.5	85	65	35	-	-	-	-
酢酸エチル	-	2.5	15	35	65	100	90	50	-
メタノール	-	-	-	-	-	-	10	50	100

表4 HPLC 分析条件

カラム	Waters Symmetry C8
溶媒	80%メタノール
流速	1mL/min
カラム温度	30
検出	190-400nmでのマックスプロット

溶出させた各フラクションに対して表4に示す条件でHPLC分析を行い、目的のピークのあったフラクションを分取HPLCにより精製し、HPLC分析によりn-ヘキサン：酢酸エチル（35:65）フラクションから成分1（24.3mg）を、n-ヘキサン：酢酸エチル（85:15、65:35）フラクションから成分2、3をそれぞれ10.9mg、13.0mgずつ得られたことを確認した。（図2）

得られた各成分については抗菌試験で活性の確認を行い、また、NMRスペクトル、IRスペクトル、MSスペクトルによる分析を行った。

3 実験結果及び考察

3-1 深層水栽培オゴノリ中の抗菌活性画分の分析

精製後、抗菌活性試験において活性が強かったフラクションのHPLC分析では、図3に示すようなクロマトグラムが得られた。しかし、精製後に得られた試料量がわずかであったことから、図中矢印で示すピークを指標にして2-4及び2-5節で述べた方法で活性成分の大量分離を行った。また、酢酸エチル、n-ブタノールなどでの分液結果などから、活性成分が比較的疎水性の強い成分であることが予想されたので、抽出溶媒をメタノールに変更して大量分離を行った。

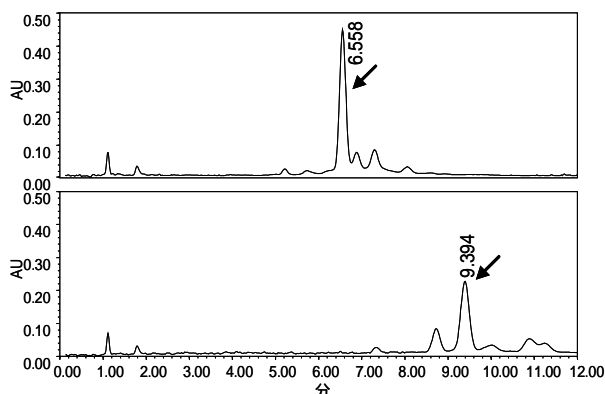


図3 活性が強かったフラクションのクロマトグラム

3-2 深層水栽培オゴノリ中の抗菌活性成分の大量精製及び分析・同定

粗分離に用いた再抽出物のHPLC分析クロマトグラムを図4に示す。粗分離後の抗菌試験では図中矢印で示す成分1、2、3に活性が確認された。

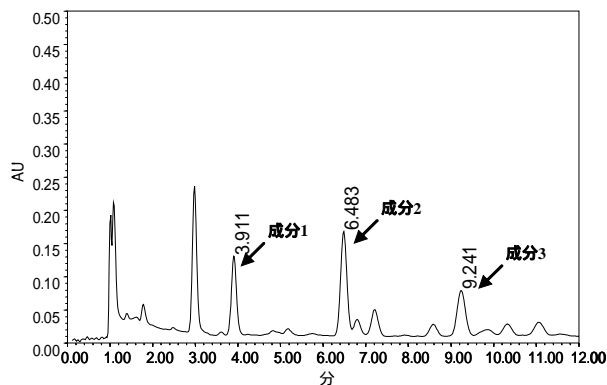


図4 再抽出物のクロマトグラム

しかし、2-5節でも述べたように、再抽出物のメタノールへの溶解性が悪く、試料導入が困難であることから、吸引液体クロマトグラフィーによる粗分画を行い、HPLC分析で目的ピークの確認された画分を分取HPLCにて精製を行い、成分1、2、3を単離した。抗菌試験の結果では、成分2が最も活性が強く、成分1、3は弱い活性が見られた程度であった。

単離した3成分について¹³C NMRスペクトル分析を行った結果を表5に、IRスペクトルの結果を図5に示す。いずれの成分も¹³C NMRより炭素数が20個であることがわかり、ジテルペンかエイコサノイドが考えられる。しかし、メチル基炭素のピークが一つしかないことからジテルペンの可能性はほとんどないと思われる。また、172ppm付近のピークからカルボニル炭素があることもわかる。成分1のMSスペクトル測定(FABMS, glycerol, positive ion)では分子量336という結果が得られており、このことから成分1の分子式はC₂₀H₃₂O₄となり、不飽和度は5であり、124 ~ 136ppmのメチン炭素ピークより3つの二重結合があることがわかり、このことからこのカルボニルは環状であることがわかる。これは、IRスペクトルの1735cm⁻¹、1250 ~ 1050cm⁻¹付近の吸収からエステルまたは6員環以上のラク톤の存在が見られることと一致する。その他には、3つの成分ともHPLC分析においてUV領域に極大吸収が見られなかったことから、独立した二重結合が成分1および成分3では3つ、成分2では4つ存在することがわかる。また、73 ~ 76ppm付近のC-O結合炭素による3つのピークから水酸基が2つあることがわかる。

これらのことから、活性成分は図6に示すような、同じ紅藻類の*Constantinea simplex*に含まれるエイコサノイドであるConstanolactone類に類似した構造を持つものと考えられる。

表5 各ピークの¹³C NMR ケミカルシフト

	成分1	成分2	成分3
1	172.509 (C)	171.990	171.999
2	136.786 (CH)	133.002	133.356
3	131.858 (CH)	132.155	131.760
4	130.295 (CH)	131.348	131.348
5	126.297 (CH)	129.826	125.960
6	125.696 (CH)	126.823	124.569
7	125.013 (CH)	126.272	123.977
8	76.301 (CH)	124.561	77.206
9	75.511 (CH)	124.191	72.763
10	73.849 (CH)	77.206	64.519
11	34.885 (CH ₂)	72.689	34.655
12	31.422 (CH ₂)	64.503	31.479
13	31.183 (CH ₂)	34.655	31.150
14	30.031 (CH ₂)	31.158	30.048
15	29.159 (CH ₂)	30.015	29.233
16	27.119 (CH ₂)	26.033	27.152
17	26.741 (CH ₂)	25.482	26.033
18	24.231 (CH ₂)	23.836	23.828
19	22.487 (CH ₂)	20.554	22.545
20	14.005 (CH ₃)	14.244	14.046

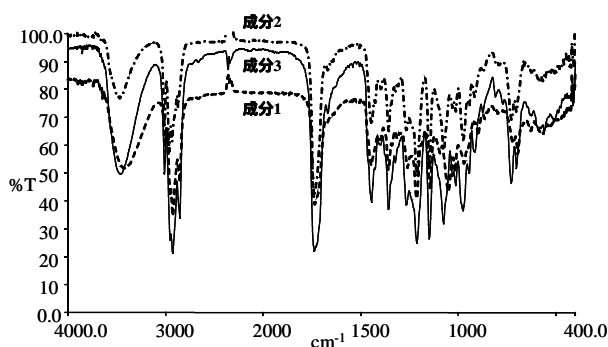


図5 各成分のIR スペクトル

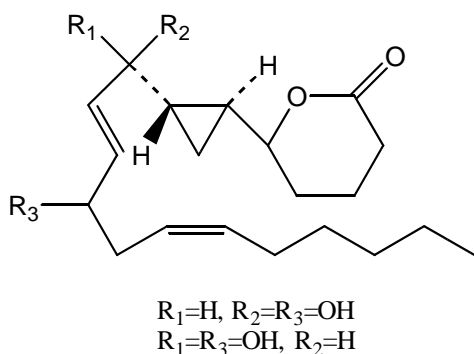


図6 Constanolactone 類

4 おわりに

腸内悪玉菌に対する深層水栽培オゴノリの抗菌活性成分として3つの成分を単離し、その活性を確認することができた。また、単離した成分について NMR スペクトル、IR スペクトル、MS スペクトル分析を行うことにより部分的ではあるが構造を決定することができた。しかし、その全体構造を決定するまでには至らなかった。特に、一番活性の強かった成分2については満足な MS スペクトルが得られておらず、また、水酸基の位置、二重結合の位置についても特定できていない。今後は、活性成分を大量に単離し、化学修飾等を行うことによって構造決定を行っていくことが必要と考えられる。また、そのためには効率的な単離法を今後検討する必要がある。

謝辞

本研究は平成 14 年度補正沖縄産学官共同研究推進事業に採択された『沖縄海洋深層水の生理効果の検証と機能性資源としての開発』の中のサブテーマとして行いました。本共同研究事業に参加できる機会を与えていただいたプロジェクトリーダーの真栄平房子琉球大学医学部教授をはじめ以下の共同研究者の方々、および研究管理・コーディネートを行っていただいた(財)南西地域産業活性化センターの方々に感謝いたします。

小田 利春 コーラルバイオテック(株)取締役業務部長
 高嶺 房枝 琉球大学医学部助教授
 島田 勝政 琉球大学医学部教授
 大城 吉秀 琉球大学医学部助手
 須藤 裕介 沖縄県海洋深層水研究所研究員
 渡具知 豊 (有)渡具知代表取締役社長

参考文献

- 1) 海藻利用の化学 山田信夫著(2000)成山堂書店
- 2) 藻類研究法 西澤一俊、千原光雄編集 共立出版
- 3) 海藻の生化学と利用 日本水産学会編 恒星社厚生閣刊
- 4) Dictionary of Natural Products on CD-ROM CHAPMAN & HALL
- 5) 沖縄県海洋深層水研究所特別報告 第1集 87-154 (2001)
- 6) みどりいし (6) 4-8 (1995)
- 7) Dale G. Nagle, William H. Gerwick, *Tetrahedron Letters*, 31, 21, 2995-2998(1990)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。