赤潮原因プランクトン，*Chattonella marina* に存在する活性酸素消去物質に関する研究

金　大景[*1]，小田　達也，村松　毅

Radical Scavengers in Red Tide Phytoplankton, *Chattonella marina*

Daekyung KIM[*1], Tatsuya ODA, Tsuyoshi MURAMATSU

Chattonella marina (*C. marina*), a harmful red tide phytoplankton, has been known to produce reactive oxygen species (ROS) under the normal physiological conditions. In this study, we found that *C. marina* has potent radical scavengers against superoxide anion (O_2-) and hydrogen peroxide as its own cellular components. The radical scavenging activity of the aqueous extracts from *C. marina* was examined by several assay systems. The extracts showed the strong scavenging activity against O_2- generated enzymatically by xanthine oxidase/hypoxanthine system. Furthermore, O_2- generated by *C. marina* and *Heterosigma akashiwo* were also effectively scavenged by the extracts in a concentration-dependent manner, and in the presence of **100** μg/ml of the extracts, O_2- levels in these red tide flagellate cell suspensions became undetectable levels. Consistent with these results, the growth inhibition of *Vibrio alginolyticus* caused by *C. marina* or *H. akashiwo* was significantly suppressed by the extracts with similar extent of catalase and superoxide dismutase. The extracts showed partial scavenging activity against hydrogen peroxide at the concentration at which O_2- was almost completely scavenged, suggesting that relatively O_2- specific scavengers may exist in the extracts. Dialysis and gel-filtration experiments suggested that relatively low molecular weight compounds present in the extracts may be responsible for the radical scavenging activity.

Key words: Red tide plankton, *Chattonella marina*, Radical scavengers, Reactive oxygen species.

活性酸素は植物や動物の多くの生体反応に伴い産生されることが知られている。最近，この活性酸素がヒトにおける感染症あるいは老化や癌化などの多くの疾病に関与していることが明らかとなってきた。[1-4] このような背景において，赤ワインやカカオ中のポリフェノール類，あるいは緑茶中の渋みの成分であるカテキン類に活性酸素を消去する作用が見出され，これら抗酸化作用物質を含む食物が健康食品として注目されている。　一方，我々はこれまでの赤潮に関する研究において，多くの養殖魚，特にブリに対して強い魚毒性を示す赤潮原因プランクトン，シャットネラ(*Chattonella marina*)が通常の培養条件下において大量の活性酸素を産生放出することを見出した。[5-9] さらに，シャットネラは海洋より分離されたビブリオ菌に対して顕著な増殖抑制作用を示し，その作用は活性酸素消去酵素であるスーパーオキサイドデスムターゼ(SOD)とカタラーゼの添加によってほぼ完全に消失することを見出した。[8] これらの研究結果はシャットネラが細胞外に外界の生物に対して毒性を発現しうるレベルの活性酸素を放出することを示すものである。事実，活性酸素産生能が著しく低いシャットネラ株はブリに対する毒性も弱いことを見出している。[10] また，シャットネラの活性酸素産生は対数増殖期に最も高くなること，SODやカタラーゼ存在下ではその増殖が著しく抑制されることから，シャットネラにとって活性酸素産生は分裂増殖に必要な反応であると推定される。[11] いずれにしろ，シャットネラは活性酸素を介した魚毒性を発現する一方，自らが産生する活性酸素に対する何らかの耐性機構を有しているはずである。 この様な観点から本研究では，シャットネラ細胞内における活性酸素消去活性物質の存在の有無について検討した。

実験方法

シャットネラは植物プランクトンであることからその培養は比較的容易で，温度，照度，湿度を一定にコントロールできるグロースキャビネット内で，ビタミン類を含む海水主体の培地（ESM培地）中で12時間サイクルの光照射下で26℃で培養し，対数増殖期の細胞を主に実験に用いた。シャットネラからの粗抽出物質の調製は，以下の手順で行った。シャットネラを２－５ℓレベルで大量培養後，遠心分離によりシャットネラ細胞を集め，凍結乾燥により濃縮後，再び少量の蒸留水に懸濁し，不溶性物質を遠心分離により除去した。得られた可溶性物質を凍結乾燥し，これを粗抽出画分とした。粗抽出物質の部分精製は，Bio Gel P-10によるカラムクロマトグラフィーによるゲル濾過により行った。なお，本実験では特に活性酸素産生能が高いシャットネラ・マリーナ株を用いた。[7] 本シャットネラ株は1985年に鹿児島湾で赤潮を形成した際，分離され，以後継代培養されてきたものである。活性酸素消去活性はキサンチンオキシダーゼ/ヒポキサンチン系により発生させたスーパーオキサイドに対する消去能によ

＊1長崎大学大学院生産科学研究科　（〒852-8521　長崎市文教町1-14）

り測定した。本測定法においては，スーパーオキサイドに特異性が高い化学発光試薬で，ルシフェリン誘導体であるMCLA (2-methyl-6- (p-methoxyphenyl) -3,7-dihydroimidazo [1,2-a]pyrazin-3-one) を用い，終濃度で５μg/mlでシャットネラ細胞浮游液あるいはキサンチンオキシダーゼ/ヒポキサンチン系に添加した時の化学発光をルミノメーターで測定し，その発光パターンあるいは30秒間の積算値に対する抗酸化様物質等の添加による影響を調べた。[8] その他，シャットネラ自身及びシャットネラと同じラフィド藻類に属する赤潮プランクトン，ヘテロシグマ・アカシオ(*Heterosigma akashiwo*)の活性酸素産生に対するシャットネラ抽出物質の影響も調べた。[8]　海洋細菌，*Vibrio alginolyticus*は本研究室にて分離培養維持されている株を用いた。２%グルコースを含むESM培地に本菌を接種し，一夜31℃で培養した後，シャットネラ培養浮游液にシャットネラ細胞数の約1.5-2倍の数の細菌を添加し，シャットネラの培養条件下で一定時間培養した。その後，培養液の一部をMuellar Hinton寒天培地にて混釈，続いて31℃で培養し，形成されたコロニー数により生菌数を推定した。シャットネラ抽出物等の影響を調べる場合は，シャットネラ細胞浮游液に予めこれらサンプルを添加後，細菌を添加した。[7] なお，スーパーオキサイドの検出には主に，ルシフェリン誘導体であるMCRAを用いた化学発光法により行った。[8] また，過酸化水素の検出は蛍光物質であるPHPAを用いた蛍光分光学的方法により行った。[8]

実験結果及び考察

１．シャットネラ抽出物の活性酸素に対する消去作用

(1) キサンチンオキシダーゼ/ヒポキサンチン系での解析

キサンチンオキシダーゼ/ヒポキサンチン系で酵素的にスーパーオキサイドが産生される系にスーパーオキサイド特異的化学発光プローブであるMCLAを添加すると，持続的な化学発光のパターンが得られた。この反応系に100 μg/mlのシャットネラからの粗抽出物を添加したところ，スーパーオキサイドはほぼ完全に消去され，本抽出物存在下ではESM培地のみでの非特異的化学発光のレベルまでに低下した（Fig. 1)。

(2) シャットネラ・マリーナ及びヘテロシグマ・アカシワの活性酸素産生に対するシャットネラ抽出物の影響

シャットネラ・マリーナは通常の培養条件下で常にスーパーオキサイドを産生しており，対数増殖期のシャットネラ細胞浮游液においては，産生されたスーパーオキサイドによる顕著な化学発光が観察される。このシャットネラ培養系に100 μg/mlのシャットネラ抽出物を添加したところ，その特異的化学発光はほぼ完全に消失した（Fig. 2A)。シャットネラ・マリーナと同様，ラフィド藻類に属する赤潮原因プランクトンで，活性酸素産生が知られているヘテロシグマ・アカシワについても同様な結果がえられた（Fig. 2B)。これらラフィド藻類が産生するスーパーオキサイドに対するシャットネラ抽出物の消去作用は図３Aに示す如く濃度依存的で，100 μg/mlの濃度でほぼ100%消去されることがわかった。一方，シャットネラ・マリーナ及びヘテロシグマ・アカシワはスーパーオキサイドの他，過酸化水素も同時に産生放出している。[5] そこで，これらラフィド藻類が産生する過酸化水素に対するシャットネラ抽出物の

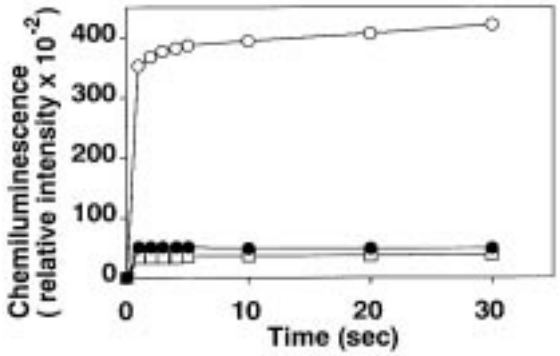


Fig. 1 Effects of the extracts from *Chattonella marina* on the chemiluminescence response in xanthine oxidase/ hypoxanthine system.
MCLA (final 5 μg/ml) was added to xanthine oxidase/hypoxanthine system in ESM medium, and then chemiluminescence responses due to the superoxide anion generated by xanthine oxidase/hypoxanthine system were measured in the presence (●) or absence (○) of the extracts from *Chattonella marina*. (□) ; ESM medium alone.

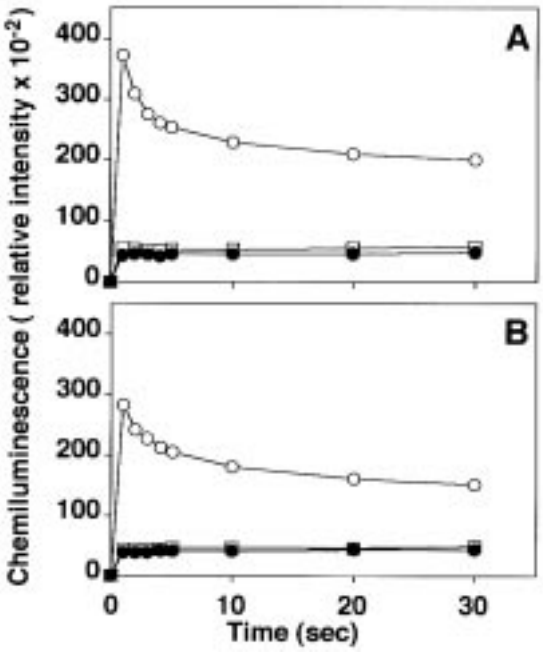


Fig. 2 Effects of the extracts from *Chattonella marina* on the chemiluminescence response in *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*.
Chemiluminescence responses in *Chattonella marina* (A) or *Heterosigma akashiwo* (B) cell suspension were measured in the presence (●) or absence (○) of the extracts from *Chattonella marina*. (□) ; ESM medium alone.

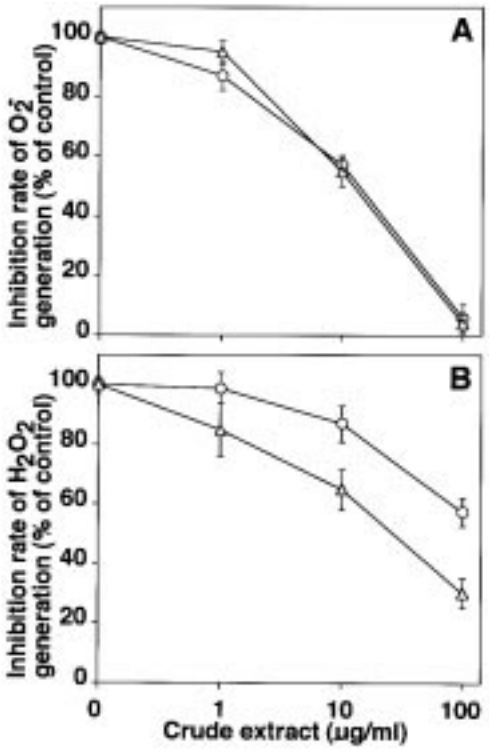


Fig. 3 Effects of the extracts from *Chattonella marina* on the superoxide anion (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2) levels produced by *Chattonella marina* or *Heterosigma akashiwo*. The O_2 (A) and H_2O_2 (B) levels in *Chattonella marina* (○) or *Heterosigma akashiwo* (△) were measured in the presence of indicated concentrations of the extracts from *Chattonella marina*. The value in the absence of the extracts was taken as 100%.

影響について調べた結果，Fig. 3Bに示す如く，濃度依存的消去作用が認められたが，スーパーオキサイドに対する作用に比べ，弱いことがわかった。シャットネラ抽出物の過酸化水素に対する消去作用についてさらに明らかにするため，一定濃度の過酸化水素に対する効果を調べた。表1に示す如く，カタラーゼの強い消去作用に対して，シャットネラ抽出物では部分的消去活性であることが確認された。

Table 1. Effect of the extracts from *Chattonella marina* on the level of hydrogen peroxide in ESM medium.

	Concentration of H_2O_2 (μM)
None	7.39 ± 0.05
+ *C. marina* extracts (100 μg/ml)	4.14 ± 0.04
+ Catalase (200 U/ml)	0.10 ± 0.02

2．シャットネラ・マリーナ及びヘテロシグマ・アカシワのビブリオ菌増殖抑制作用に対するシャットネラ抽出物の影響

シャットネラ・マリーナあるいはヘテロシグマ・アカシワの細胞浮游液に海洋細菌であるビブリオ菌を添加すると，細菌の増殖は著しく抑制されるが，その効果は活性酸素消去酵素であるカタラーゼあるいはスーパーオキサイドジスムターゼ添加でほぼ完全に消失することを見出している。[7] 従って，これらのラフィド藻類は少なくとも本ビブリオ菌に対して活性酸素を介した毒性を発現しうると考えられる。そこで，シャットネラ抽出物のこれらラフィド藻類の海洋細菌ビブリオ菌増殖抑制作用に対する影響について調べた。本ビブリオ菌はラフィド藻の培養液中（ESM培地）で増殖可能であり，ESM培地に接種した本菌は培養時間に伴い増殖する。これに対し，シャットネラあるいはヘテロカプサ細胞浮遊液に接種されたビブリオ菌の増殖はFig. 4A及びB に示す如く，顕著に抑制されている。この様なビブリオ菌に対する作用はシャットネラ抽出物添加でほぼ完全に消失した（Fig. 4）。同様な抑制作用はSOD及びカタラーゼ添加によっても観察されたことから，本抽出物はこれら酵素に匹敵する活性酸素消去能を有しているといえる。これらの結果から，シャットネラをはじめとするラフィド藻類による赤潮から養殖魚等を防御する手段として本物質を利用できる可能性が示唆された。

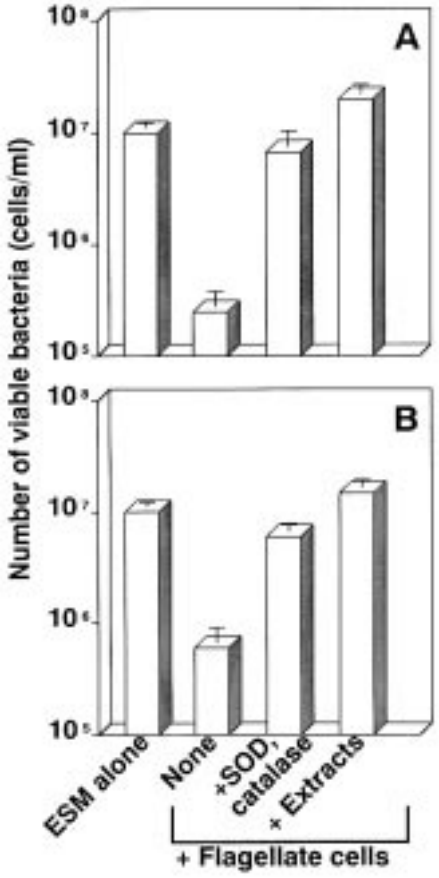


Fig. 4 Effects of the extracts from *Chattonella marina* on the bacterial growth inhibition caused by *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*.
Vibrio alginolyticus (10^5 cells/ml) were inoculated into *Chattonella marina* (A) or *Heterosigma akashiwo* (B) cell suspension. After 7 h incubation in the presence of the extracts from *Chattonella marina* (100 μg/ml) or SOD (200 U/ml) + catalase (500 U/ml), or the absence of these agents, the numbers of viable bacteria were measured by colony formation assay. First column shows the number of viable bacteria in ESM medium alone.

３．シャットネラ抽出物中の活性酸素消去作用を担う物質の分子量に関する解析

スーパーオキサイド消去酵素として知られているSOD様活性（スーパーオキサイドから過酸化水素への変換）は本抽出物質中には認められなかった。さらに，本抽出物を24時間蒸留水に対して透析後，透析内液に残存する物質をシャットネラ細胞浮遊液に添加し，スーパーオキサイドレベルに対する影響を調べたところ，ほとんど無効であった。この結果は，シャットネラ細胞抽出物質中に存在するスーパーオキサイド消去活性を担う物質は生物界に広く存在する酵素SODではなく，比較的低分子の抗酸化様物質であることを強く示唆するものである。本抽出物をBio Gel P-10によるゲル濾過に供したところ図６に示す溶出パターンが得られた。各フラクションの一部をシャットネラ細胞浮遊液に添加し，そのスーパーオキサイド消去活性を調べたところ，かなり遅れて溶出された低分子画分にのみ活性が認められ，最初に溶出された最も大きなピークには活性は認められなかった。さらに，活性が認められた画分を回収濃縮後，凍結乾燥に供したが，秤量できる量の物質を得ることはできなかった。従って，シャットネラ細胞抽出物中に存在する活性酸素消去物質として有効な成分は非常に微量に存在する低分子量化合物あることがわかった。今後，本物質の化学的分析等，さらに研究を進めていくことで，その幅広い有用性が見出せるものと考えられる。すなわち，活性酸素は我々人間の老化や癌などの様々な疾病に関与していることが明らかにされていることから，本実験で見出した抗酸化物質を医薬品あるいは健康食品や機能性食品として開発しうる可能性もあると考えられる。また，先に述べた様に，シャットネラ赤潮から養殖魚を防除する手段としての利用法も今後の研究により見出せるものと期待できる。

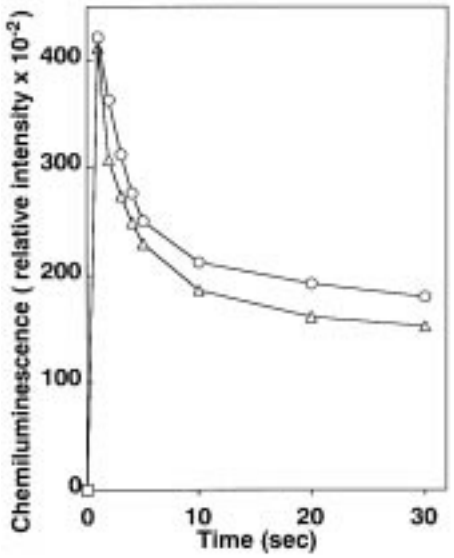


Fig. 5 Effects of dialysis on the superoxide scavenging activity of the extracts from *Chattonella marina*.
Chemiluminescence responses in *Chattonella marina* cell suspension was measured in the presence (△) or absence (○) of the extracts from *Chattonella marina*, which were dialyzed against **1** L of distilled water for **24** h and then lyophilized.

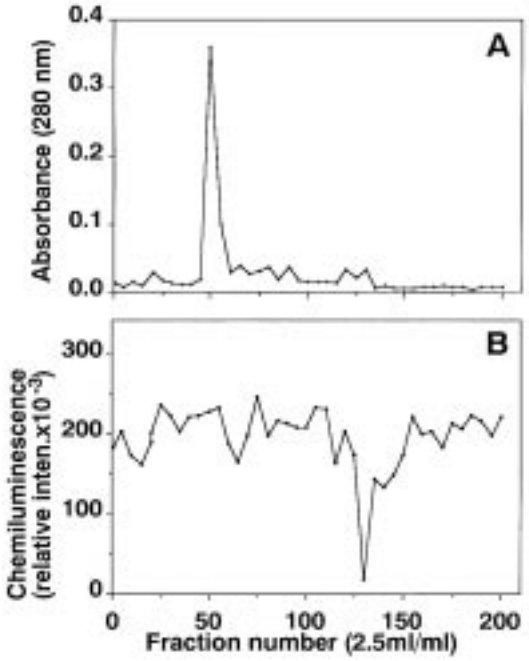


Fig. 6 Gel-filtration of the extracts from *Chattonella marina* through a column of Bio-Gel P-**10**.
One ml of solution of the extracts from *Chattonella marina* (**1** mg/ml in distilled water) was applied to a column (**2** X **20** cm) of Bio-Gel P-**10** which was previously equiriblated with distilled water. The elusion pattern (A) was followed by absorbance at **280** nm. The aliquate of each fraction was added to *Chattonella marina* cell suspension and the superoxide scavenging activity was examined similar way as in Fig. **3** (B).

ヘテロシグマ・アカシオ細胞から同様な方法により抽出物を調製し，その活性酸素消去活性について調べた結果，シャットネラ抽出物と類似な活性物質の存在が確認された。従って，共通した生化学的性質である活性酸素産生能を有するラフィド藻類はいずれも活性酸素消去物質を有していると推定される。

要　　約

赤潮原因プランクトン，シャットネラ細胞から水溶性低分子活性酸素消去物質が得られた。本物質はプランクトン細胞中に極微量含まれており，特にスーパーオキサイドに対して特異性を有していた。本物質の添加によりシャットネラ及びヘテロシグマから産生放出される活性酸素はほぼ完全に消去され，ビブリオ菌に対するこれらラフィド藻類の毒性も阻害された。以上より，本物質は赤潮毒性から養殖魚を防御する手段としての有効性が示唆された。今後のさらなる研究によりその機能性食品や医薬への幅広い応用が大いに期待できるものと考えられる。

謝　　辞

本研究の一部は科学研究費補助金（金　大景に対する特別研究奨励費）により遂行された。

参考文献

1）Oda, T., Akaike, T., Hamamoto, T., Suzuki, F., Hirano, T., and Maeda, H., Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer conjugated SOD. Science, **244**, **974-976** (**1989**).

2）Dean, R. T., Free radicals, membrane damage and cell-mediated cytolysis. Br. J. Cancer, **55**, **39-45** (**1987**).

3）Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J., **219**, **1-14** (**1984**).

4）Johnson, K. J., Fantone, J. C., and Kaplan, P. A., In vivo damage of rat lungs by oxygen metabolites. J. Clin. Invest., **67**, **983-993** (**1981**).

5）Oda, T., Ishimatsu, A., Takeshita, S., and Muramatsu, T., Hydrogen peroxide production by the red tide flagellate *Chattonella marina*. Biosci. Biotechnol. Biochem., **58**, **957-958** (**1994**).

6）Oda, T., Akaike, T., Sato, K., Ishimatsu, A., Takeshita, S., Muramatsu, T., and Maeda, H., Hydroxyl radical generation by red tide algae. Arch. Biochem. Biophys., **294**, **38-43** (**1992**).

7）Oda, T., Ishimatsu, A., Shimada, M., Takeshita, S., and Muramatsu, T., Oxygen-radical-mediated toxic effects of the red tide flagellate *Chattonella marina* on *Vibrio alginolyticus*. Mar. Biol., **112**, **505-509** (**1992**).

8）Oda, T., Nakamura, A., Okamoto, T., Ishimatsu, A., and Muramatsu, T., Lectin-induced enhancement of superoxide anion production by red tide phytoplankton. Mar. Biol., **131**, **383-390** (**1998**).

9）石松惇，小田達也，赤潮プランクトンーシャットネラによる活性酸素の産生と毒性発現機構。化学と生物，32，352－354（1994）。

10）Ishimatsu, A., Oda, T., Yoshida, M., and Ozaki, M., Oxygen radicals are probably involved in the mortality of yellowtail by *Chattonella marina*. Fisheries Sci., **62**, **836-837** (**1996**).

11）Oda, T., Moritomi, J., Kawano, I., Hamaguchi, S., Ishimatsu, A., and Muramatsu, T., Catalase- and superoxide dismutase-induced morphological changes and growth inhibition in the red tide phytoplankton *Chattonella marina*. Biosci. Biotechnol. Biochem., **59**, **2044-2048** (**1995**).