

# ウバガイ *Pseudocardium sachalinense* の 赤色色素に関する研究

The study on red color of Sakhalin surf clam, *Pseudocardium sachalinense*

伊藤裕才、相村奈津子、竹内園実、鈴木ゆりか

Yusai ITO, Natsuko SUGIMURA, Sonomi TAKEUCHI, Yurika SUZUKI

## 1. 緒言

ウバガイ (*Pseudocardium sachalinense*) は、軟体動物の二枚貝綱異歯亜綱バカガイ上科バカガイ科ウバガイ属の二枚貝である。水産物としてはホッキガイ (北寄貝) という別名で広く流通している。ウバガイは冷たい海域を好み、日本においては関東以北から北海道にかけて生息している。ウバガイの殻の形は三角形に近い卵型で、最大で 10cm 近くまで成長する。殻は厚く、色は成貝で茶色～灰黒色になる。ウバガイの寿命は 30 年以上とも言われており、その長寿からウバガイ (姥貝) の名がついたと言われている。食用とされる部分は主に肉厚な足部(斧足)である。斧足は白色だが、その先端部は若干青みがかった灰色を呈している。興味深いことに、灰色の部位は加熱されると赤色に変色する。この赤色はやや桃色 (ピンク色) を帯びており、鮮やかな赤色を呈した加熱ウバガイのむき身は、魚介食材中でも一際目を引く存在である。近年は生食用ウバガイの流通も盛んであり、刺身や寿司のネタとして親しまれている。

軟体動物を含む無脊椎動物の色素は多種多様であるが、加熱で発色する例として、イカやタ

コの頭足類とエビやカニの甲殻類の 2 つが代表的である<sup>1)</sup>。イカやタコの赤色素はトリプトファンから合成されるオンモクローム類であり、外套膜表皮の顆粒細胞 (色素細胞) に含まれている。加熱すると顆粒細胞は弛緩して拡散し、さらに熱変性したタンパク質から色素が遊離して外套膜全体が赤色に染まる。甲殻類の赤色素はカロテノイドのアスタキサンチンが主成分であり、組織中でタンパク質と非共有結合してカロテノプロテインとして存在している。カロテノプロテインは青色を呈するが、加熱することによってタンパク質が熱変性し、アスタキサンチンが遊離して本来の赤色に戻る<sup>2)</sup>。

二枚貝には特徴的な色素をもつものが存在する。軟体動物の呼吸色素は銅が配位した青色のヘモシアニンが一般的であるが<sup>1)</sup>、アカガイの呼吸色素は鉄ポルフィリンを補欠分子団とするエリトクロルオリンであるため、アカガイの血液は赤い<sup>3)</sup>。そのため体全体が赤色を呈している。バカガイの斧足はカロテノイドのフコキサンチンの誘導体を含むために橙色を呈している<sup>4)</sup>。ムール貝やカキからは、これらの貝に特徴的なカロテノイドのミチロキサンチンが報告されている<sup>5)</sup>。

ウバガイは東北から北海道にかけての特産物であり、加熱で変色した鮮やかな赤色が最大の特徴である。この桃色がかった赤色は、天然の赤色素としては珍しい色調であり、もし色素が同定されれば天然着色料としても魅力がある。しかしながら、ウバガイの赤色の化学的性状および色素形成のメカニズムについて、筆者らが知る限りこれまでに報告はない。そこで今回、ウバガイの赤色素の同定を目的に研究を行ったので報告する。

## 2. 実験

試料：生食用ウバガイ（ホッキガイ）は市場にて購入した。産地は全て北海道であった。

試薬：各種有機溶媒（メタノール、エタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド）、アンモニア水（28% 溶液）、水酸化ナトリウム、および塩酸は和光純薬（株）の特級品を用いた。ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）は Biorad 社製を用いた。トリブシンは Sigma-Aldrich 社製の豚膵臓由来を用いた。エチレンジアミン 4 酢酸・2 ナトリウム（EDTA・2Na）は同仁化学研究所（株）製を用いた。使用した水は全て蒸留水を用いた。

含水メタノールによる抽出：ウバガイ（4 匹分）の斧足先端部の表面から灰色部位のみを、解剖ナイフを用いて採取した。得られた部位（27.4 g）に 50% メタノール（30mL）を加えて 8000 rpm で 3 分間 ホモジナイズした。得られた灰色の懸濁液を発色試験に供した。

発色試験：試液 1mL をガラス試験管に取り 100℃ で湯浴した。これとは別にエタノール、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドを各 1mL ずつ加えた。またこれとは別に、塩酸、0.1M 塩酸、6M 水酸化ナトリウム水溶液、0.5M 水酸化ナトリウム水溶液、アンモニア水を各 1mL ずつ添加した。

弱アルカリ条件による抽出：ウバガイ（3 匹

分）の斧足先端部の表面の灰色部位のみを、解剖ナイフを用いて採取した。得られた部位（13.6 g）に 2.8% アンモニア水溶液（15mL）を加えて 8000 rpm で 10 分間 ホモジナイズした。得られた橙色の懸濁液をガラス遠沈管に移し、3000rpm で 10 分間遠心分離を行った。得られた橙色の上澄みを試液として発色試験およびトリブシン処理に供した。

トリブシン処理：弱アルカリ条件で得られた抽出液を 0.1M 塩酸によって pH6.8 まで中和した。中和した試液 10mL をプラスチック製遠沈管に採取して約 5mg のトリブシンを添加した後、50℃ の湯浴中で 60 分間加温した。そののち、アンモニア水を添加して発色試験を行った。

## 3. 結果

市場で購入した生食用ウバガイを試料とした。斧足先端部の灰色の濃度は固体によって差異があった（図 1）。灰色の先端部を切り離して煮沸した蒸留水に投じると、先端部は数秒のうちに鮮やかな赤色に変化した。個体別に比較したところ、灰色が濃いほど赤色も濃くなった（図 1）。つまり、灰色の色素が加熱によって赤色に変化したことが明確になった。斧足部の切断面を観察したところ、赤色化している部位は、斧足の片側の表面だけであることがわかった（図 2）。

続いて、この赤色素を単離すべく、赤色に変化した部位を解剖ナイフで採取し、メタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ピリジン、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドの各種有機溶媒に浸漬して色素の抽出を試みた。しかし、色素はいかなる溶媒にも溶出しなかった。続いて各種酸アルカリ溶液（0.1M 塩酸、28% アンモニア水溶液、0.1M 水酸化ナトリウム溶液、アンモニア水、2% 塩酸 / メタノール溶液、2.8% アンモニア / メタノール溶液）を用いて抽出を試みたが、色素は溶出されなかった。色素が溶出しない理



図1 (上) 生食用ウバガイの斧足。先端が灰色を呈している。灰色の濃度には個体差があり、左の試料が最も濃く、右の試料が最も薄い。(中) 採取した斧足の先端部。並びは上の図の個体と同じである。(下) 加熱により赤色に変色した先端部。並びは上の図と同じである。灰色が濃い個体ほど赤色も濃いことを示している。

由として、斧足部の表面が加熱によってゴム状に変性し、溶媒の浸透を妨げたためと推測された。そこで加熱前の斧足から先端部を採取し、50%メタノール水溶液中でホモジナイズして灰色の懸濁液を得た。懸濁液を加熱した結果、懸濁液はすみやかに赤色に変色した(図3)。この懸濁液に酢酸エチルおよびジエチルエーテルを加えて色素抽出を試みたが、色素は抽出されなかった。これとは別に、加熱前の灰色の懸濁液に0.1M塩酸を添加したところ、懸濁液は加熱したときと同様に赤色に変色した(図3)。またアンモニア水および0.5M水酸化ナトリウム溶液を添加しても懸濁液は赤橙色に変色し、



図2 赤色に変色した斧足の先端部。片側の表面だけが変色していることがわかる。

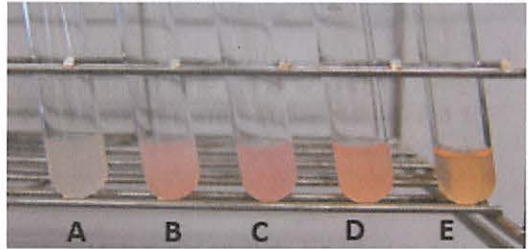


図3 50%メタノールで斧足をホモジナイズして得られた懸濁液の発色実験。A) 対照液(水を添加)、B) 加熱、C) 0.1M塩酸を添加、D) 2.8%アンモニア水を添加、E) 0.5M水酸化ナトリウム水溶液を添加。

さらに懸濁液は溶解して溶液となった(図3)。これらの結果から赤色化は加熱だけでなくpHの変化によって誘起されることが明らかとなった。また、色素はアルカリ溶液に可溶であることも明らかになった。さらに加熱前に懸濁液に水と混合可能な有機溶媒であるアセトニトリル、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドを添加しても懸濁液は赤色化した。このことから有機溶媒も変色を誘起することが判明した。

斧足のホモジナイズが加熱、pHの変化、有機溶媒の添加によって変色したことから、変色にはタンパク質の変性が変色に大きく関わっていることが示唆された。そこで、タンパク質の構造変化の影響について検討するために、界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を懸濁液に添加した。SDSを添加した時点で懸濁液は黄橙色を呈したが、すみやかに無色となった。無色となった試液は加熱しても赤色に変化せず、またアルカリ溶液やジメチルホルム



図 4 弱アルカリ条件 (pH9.7) の赤色の抽出液 (右) を中和した際の色の变化。中性 (pH6.8) で灰色となり (中央)、弱酸性 (pH2.7) で再び赤色となる (左)。

アミドを添加しても赤色化することはなかった。つまり SDS によってタンパク質の立体構造が大きく変化すると、酸や有機溶媒を加えても変色しないことが判明した。この結果から色素形成にはタンパク質の立体構造が重要であることが強く示唆された。

これまでは色素がアスタキサンチンのような低分子有機化合物であることを想定して中性の含水メタノールで抽出を行っていたが、色素がタンパク質と強く関わっていることが示唆されたことから、色素タンパク質の可溶化を目的として、抽出溶媒を弱アルカリ溶液 (希釈したアンモニア水) に変更した。2.8% アンモニア水溶液を用いて斧足部をホモジナイズしたところ、橙色の懸濁物が得られた。この懸濁物の遠心分離を行った結果、赤橙色の上澄み液を得ることができた。遠心分離後の残渣が黄白色であったことから、赤色素に関わるタンパク質は上澄み液に抽出されたと判断した。この弱アルカリ性の抽出液を 0.1M 塩酸によって中和し、色の变化を観察した。興味深いことに、中性域 (pH6.8) に達したところで、溶液は赤色から灰色へと変化した (図 3)。さらに塩酸の添加を続けて酸性域 (pH2.7) に移行した結果、溶液は再び赤色へと変化して懸濁した (図 4)。つまり、色素タンパク質は中性では灰色であるが、pH が弱酸性または弱アルカリ性に傾くことで

赤色素に変化することが示された。また中性の試液にアンモニア水を添加して、再び弱アルカリ性にした結果、試液は赤色に戻った。この結果から pH 条件による色の变化は可逆的であることが判明した。続いて中性に中和した試液にジメチルスルホキシドを添加した。その結果、溶液は予想通りに赤色に変化した。pH の変化と同様に、有機溶媒によるタンパク質の構造変化が色素形成を導いたと考えられた。

これまでの結果から、加熱、有機溶媒、pH の変化によって抽出液の色の变化が示された。しかしながら、色素化した試液に有機溶媒を添加しても遊離体の色素は抽出されなかった。甲殻類のカロテノタンパク質の場合、カロテノイドはタンパク質に非共有結合しているため、加熱や pH の変化でカロテノイドが遊離する。しかしウバガイの場合、色素は共有結合のような強固な結合でタンパク質に結合している可能性が考えられた。加熱や有機溶媒による色の变化とも併せて、pH による色の变化が可逆的であったことから、タンパク質の構造変化が色の变化に重要な因子であることが強く示唆された。そこで中性の抽出液をタンパク質分解酵素であるトリプシンで処理してタンパク質の分解を試みた。反応後の抽出液にアンモニア水を添加したが、赤色への変色は観察されなかった。本結果および上で述べた SDS の添加による実験結果から、タンパク質の構造を大きく変化した場合、もはや加熱などの刺激を与えても赤色には変色しないことがわかった。もしカロテノイドのような色素化合物が存在するならば、タンパク質構造の大きな変化や切断によって色素は遊離してくると思われるが、ウバガイではそのような結果は得られなかった。

色素化合物以外の可能性としてタンパク質に配位した金属イオンによる発色が考えられた。例えば、軟体動物の呼吸色素であるヘモシアニンは銅を配位しており、酸素と結合することで青色を呈する<sup>1)</sup>。そこで、中性に調整した抽出液にエチレンジアミン 4 酢酸・2 ナトリウ

ム (EDTA・2Na) を添加し、金属イオンをキレートによって除去することを試みた。しかしながら、EDTA・2Na 添加後の試液にアンモニア水を添加したところ反応液は赤色に変色した。このように今回の実験からは赤色の正体を明らかにすることはできなかった。

#### 4. 考察

エビやカニの甲殻類の青～赤色の体表色素はアスタキサンチンを主とするカロテノイドがタンパク質と非共有結合したものである。加熱することでタンパク質が変性し、カロテノイドが遊離することで赤色化する。ウバガイの場合も、加熱することで灰色から赤色に変化することから、甲殻類と同様にカロテノプロテインが関与しているのではないかと推測して実験を開始した。しかしながら、赤く変色したウバガイの斧足部からは、いかなる色素の遊離も確認できなかった。さらには、抽出液の変色は、加熱だけでなく、pH の変化や有機溶媒の添加によっても起きることが確認された。pH の変化による色調の変化は可逆的であり、中性では無色を示し、弱酸性および弱アルカリ性で赤色に変色した。興味深いことに強アルカリ性では赤色を維持したが、強酸性では色素の変化は観察されず、加熱しても強アルカリ性にしても赤色には変色しなかった。これらの結果から、変色にはタンパク質の構造変化 (変性) が大きく関わっていることが示唆された。つまり斧足部には色素化合物が存在せず、タンパク質自身が変性によって色素構造を構成するのではないかという仮説が持ち上がった。

そこで抽出液を界面活性剤 SDS で処理したのちに、強アルカリ溶液を添加した。このとき抽出液は赤く変色しなかった。タンパク質分解酵素のトリプシンで抽出液の処理を行った場合も SDS と同様の結果が得られた。すなわち、タンパク質の三次元構造が大きく破壊されると、もはや変色しないことが判明した。カロテ

ノイドのような色素化合物が存在するならば、色素は SDS やプロテアーゼの影響を受けず、タンパク質の変性で遊離してくることが考えられる。これらの結果は、ウバガイの斧足の赤色は色素化合物によるものでなく、タンパク質そのもの、またはタンパク質の強固に結合した何かであることを強く示唆している。

現段階で灰色から赤色への可逆的な発色メカニズムを推測するのは難しい。しかしながら、タンパク質にキレートされた金属イオンが発色に関わっている可能性が考えられた。配位子にキレートされ錯体を構成した金属イオンは、配位子の種類や錯体の立体構造によって様々な色調を示す。そのため、ウバガイにおいてはタンパク質の変性によって錯体の構造が変化し変色しているのではという仮説がたてられた。タンパク質が金属に配位する例は数多く知られており、メタロチオネインのように重金属を特異的に複数配位するタンパク質も知られている<sup>9)</sup>。またヘムタンパク質のヘム中のポルフィリンのように、金属を配位するためのリガンドがタンパク質内に存在している可能性もある。金属による発色の仮説に従えば、弱アルカリ性や弱酸性条件における変色の可逆性は、タンパク質の立体構造の可逆変化で説明でき、さらに強酸添加で変色しなかった事象は、低い pH における金属イオンの脱離によって説明が可能である。この仮説を確かめるべく、抽出液にキレート剤の EDTA を添加し、その後にアルカリ溶液を添加して色の変化を観察した。残念ながら EDTA を添加した試験液は、対象と同じく赤色に発色した。しかしながら EDTA が全ての金属をキレートできるわけではない。今後は他のキレート剤や他の条件を用いて仮説の検証を行っていきたい。

斧足部の灰色の濃さは個体間で差異があることが知られている (図 1)。この差異は産地に依存するとも言われている。つまり、斧足先端部における灰色の濃度はウバガイの生息環境が大きく関わってくることも推測される。例えば、

ウバガイが生息環境に依存して特異な無機物を濃縮している可能性も考えられる。濾過生物である二枚貝はある特定の無機イオンを海水から生態濃縮することがよく知られている。今後は生態環境を含めた様々な方面から色素の正体を探る検討を進めていきたい。

参考文献

- 1) 梅鉢幸重：「動物の色素：多様な色彩の世界」, 内田老鶴圃, 東京, 2000.
- 2) S.Okada,S.A.Nur-E-Borhan,K.Yamaguchi : Fisheries Science, 60, 213, (1994).
- 3) H. Furuta, A. Kajita : Biochemistry, 15, 917 (1983).
- 4) T. Maoka, Y. Fujiwara, K. Hashimoto, N. Akimoto : J. Agric. Food Chem., 55, 1563 (2007).
- 5) T. Maoka : Mar. Drugs, 9, 278 (2011).
- 6) P. Coyle, J. C. Philcox, L. C. Carey, A. M. Rofe : Cellular and Molecular Life Sciences, 59, 627 (2002).