

スルメイカ表皮色素の分析

The analysis of pigments in the outer skin of Japanese flying squid,
Todarodes pacificus

塚本友美¹、山口友希¹、三谷ゆりか¹、伊藤裕才¹

Tomomi TSUKAMOTO, Yuki YAMAGUCHI, Yurika MITANI, Yusai ITO

1. 緒言

頭足類の1種であるイカ類は、世界中で食されている水産物である。平成22年の資料では、日本におけるイカの購入数量は1人当たり年間0.8kgとあり、サケ(0.9kg)に次いで第2位となっている¹⁾。イカ類の年間漁獲量のうち、最も多い割合を占める種は、スルメイカ(*Todarodes pacificus*)である。その他にも、ヤリイカ(*Loligo bleekeri*)、ケンサキイカ(*Loligo edulis*)、アオリイカ(*Sepioteuthis lessoniana*)、ホタルイカ(*Watasenia scintillans*)、コウイカ(*Sepia esculenta*)などが食されている。しかし近年、スルメイカは記録的な不漁に陥っており、大幅な価格高騰を招いている。

イカ類やタコ類等の頭足類は、体表の色を瞬時に変化させることができる。この変化は、捕食者から身を隠すためや、獲物に近づくための擬態であるだけでなく、異性へのアピール等の信号としても使われる。この色調変化は、表皮上層にちりばめられた多数の色素胞(chromatophore)と、その下層に分布する分光反射板の虹細胞(iridocyte)によるものである。色素胞はそれぞれが固有の色調を持っており、黄色、赤色、褐色、赤紫色、暗紫色等の多彩な色調を観察することができる。色素胞は色素粒を満した柔軟な袋であり、袋の周りには筋繊維が放射状に付随している。筋繊維が収縮

すると、色素胞は引き伸ばされて薄い板状に広がる。結果的に色素胞は平たく拡張されて色が際立つようになる。逆に筋繊維が弛緩すると、色素胞は収縮して点状となり、ほとんど目立たなくなる。イカを加熱すると表皮が赤紫色に変化するが、これは筋繊維の熱変性による色素胞の拡張および色素の遊離によるためと考えられている²⁾。エビやカニなどの甲殻類も加熱した際に赤くなるが、これは殻に存在するカロテノプロテイン複合体から赤色素のアスタキサンチンが遊離するためであり、イカの加熱による色調変化はこの類ではない³⁾。

イカ類の表皮に存在する色素は、オンモクローム類(ommochrome)と考えられている。オンモクロームはトリプトファンの酸化によって生成する色素であり、イカ類に限らず昆虫を含む多くの無脊椎動物に見られる。オンモクローム類は、吸収波長からオマチン類(ommatine)、オミン類(ommine)、オミジン類(ommidine)に分類されている。オマチン類としてはキサントオマチン(xanthommatin)がよく知られている(図1)。トリプトファンからのキサントオマチンの合成経路は、次のように解明されている⁴⁾。まずL-トリプトファンのピロール環がtryptophan 2,3-dioxygenase (EC 1.3.11.11)によって開裂し、L-フォルミルキヌレニン(forylkynurenine)となる。次いで、L-フォルミルキヌレニンはarylformamidase (EC 3.5.1.9)

1 家政学部食物栄養学科 食品衛生学研究室

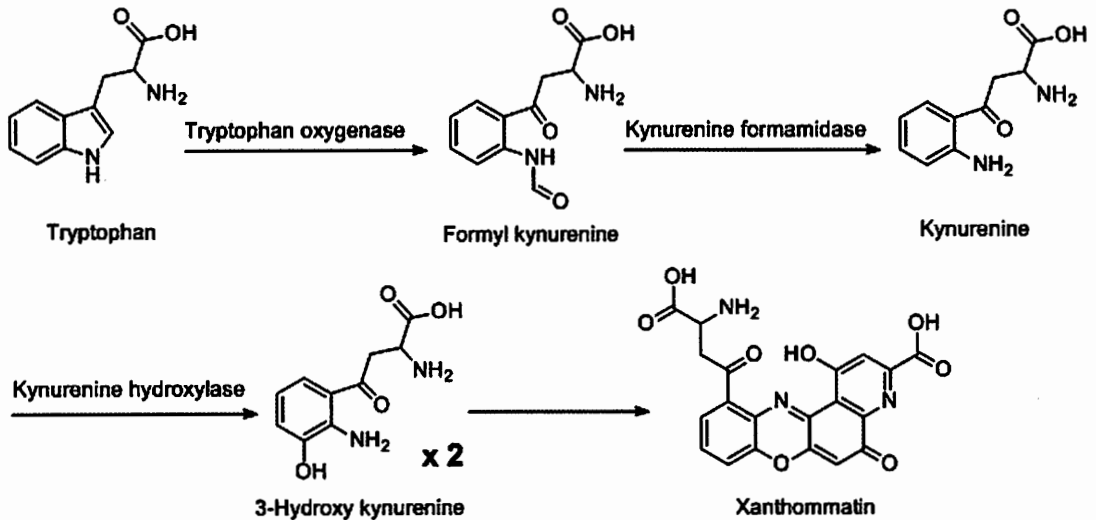


図1 キサントオマチンの生成経路

によって加水分解されて HCOOH を放出し、L-キヌレニン (L-kynurenine) となる。続いて、kynurenine 3-monooxygenase (EC1.14.13.9) によって生成した 3-ヒドロキシキヌレニンの 2 分子が酸化的に縮合する。その際に、1 分子の側鎖がピリジン環を形成して 3,4-pyridinophenoxazin 構造を取り、キサントオマチンとなる。興味深いことに、キサントオマチンは酸化状態では黄色を呈するが、還元状態 (ジヒドロキサントオマチン) では赤色を呈する (図2)。この可逆的な色調変化は、生体内で制御されており、キサントオマチン還元酵素 (xanthommatin reductase) によって触媒されることが報告されている⁵⁾。その一例として、赤とんぼ (ナツアカネやアキアカネ) の雄に特

有の赤色は、雄に優位に発現する還元酵素によって生じたジヒドロキサントオマチンであることが判明している⁶⁾。キサントオマチン以外のオマチン類としては、ロドマチン (rhodommatin) とオマチン D (ommatin D) が知られている (図2)。ロドマチンは、ジヒドロキサントオマチンの 2 位の水酸基にグルコースが結合したものであり、またオマチン D は同じく 2 位に硫酸基が結合したものである。両物質とも、2 位の修飾によって還元型の構造を維持するため、酸化還元による色の変化なく常に赤色を呈する。オミン類としては、赤紫から紫色を呈するオミン A (ommin A) が挙げられる。オミン A の存在はタンパク質との複合体として報告されているが、オミン A 自身の単離精製および構造は解明されていない。限定的な化学分解の結果から、オミン A には硫黄原子が含まれていることが示唆されている⁴⁾。

イカ類のオンモクローム研究としては、Bolognese らによるコウイカ類からのキサントオマチンの分離と構造決定が報告されているが⁷⁾、イカ類を含む頭足類における色素の化学的研究は乏しい。イカ表皮の色素胞は多彩な色

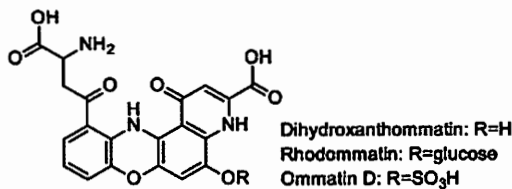


図2 キサントオマチン類の構造

調を呈しているため、キサントオマチン類以外にも未同定の色素が数多く存在することが推察される。これら赤紫～紫色の色調は大変鮮やかであり、染料および食品用の天然着色料の基材として魅力的である。焼イカや煮イカで見られるように、表皮の色素は熱処理しても退色しないため、オンモクローム類は熱に安定であることが示唆される。また、イカ類は人類に長らく食されてきた食材であるため、安全性は高いことが推察される。そこで本研究では、イカ表皮色素の天然着色料としての応用を最終目的とし、その基礎的知見として、日本で最も漁獲高の多いスルメイカを対象に表皮色素の分析を行ったので報告する。

2. 実験

試料：生食用スルメイカは鮮魚店で購入された。産地は特定しておらず、購入日によって様々であった。

試薬：実験に使用した有機溶媒（アセトニトリル、アセトン、メタノール）、塩酸、トリフルオロ酢酸、およびアンモニア水（28%）は和光純薬工業社製の特級品を用いた。オープンカラム用の樹脂として YMC-GEL ODS-A（12nm、株式会社ワイエムシ社製）を用いた。また、水は全て蒸留水を用いた。

装置：逆相 HPLC は Waters Corporation 社製のものを用いた（Waters2695 Separations Module, Waters2996 Photodiode Array Detector）。

イカ表皮色素の抽出：スルメイカ試料の胴部より表皮を採取した。イカ 1 杯の表皮に対してアセトン 100 mL に浸漬した。続いてメタノール 100 mL に浸漬した。その後、2%TFA 含有メタノール溶液 200 mL に 1 時間浸漬して橙色の抽出液を得た。さらに、2%塩酸入りメタノール溶液 200 mL に 4℃下で 1 日浸漬し、赤紫色の抽出液を得た。

抽出液の逆相 HPLC 分析：逆相カラムは、COSMOSIL 5 C₁₈-MS-II（4.6ID×150 mm、

nacalai tesque 社製）を用い、カラム温度は 40℃に設定した。溶離液 A として 1%TFA 水溶液、溶離液 B として 1%TFA 含有アセトニトリル溶液を用いた。溶離液の総量は 1 mL/min とした。グラジエント条件は、溶離液 B を 20 分間で 10%～50%まで上昇させた。サンプル注入量は 10 μ L とした。溶出した成分の紫外部および可視部の吸収スペクトルを PDA によって 220 nm～800 nm の範囲で記録し、色素の検出波長は 500 nm を用いた。

色素成分の分画：ガラス製オープンカラム（直径 33 mm）に、メタノールで膨潤させた ODS 樹脂を高さ 15 cm ほど充填した。続いてメタノール、50%メタノール水溶液、25%メタノール水溶液、12.5%メタノール水溶液、各 200 mL を流してカラムを安定化させた。蒸留水で 4 倍希釈した抽出液を静かに負荷し、色素を樹脂上部に保持させた。蒸留水 200 mL で洗浄した後、メタノール 200 mL で黄色素を溶出させた。続いて 1%TFA 含有 50%メタノール水溶液 200 mL で橙色素を溶出した後、再び蒸留水 200 mL でカラムを洗浄した。さらに、1%アンモニア含有 20%メタノール水溶液 200 mL で赤色素、1%アンモニア含有 30%メタノール 200 mL で紫色素を溶出した。

3. 結果

採取したスルメイカ表皮をアセトンとメタノールで洗浄後、2%塩酸メタノール溶液を用いて色素抽出を行った。その結果、濃赤色の抽出



図3 イカ表皮からの色素の抽出（左）および抽出後の表皮（右）

液を得ることができた(図3)。このとき抽出前に表皮表面に観察されていた色素胞は、ほぼ消失していることが観察された(図3)。しかし、2%塩酸メタノール溶液は水を含むため、抽出過程で酸加水分解を引き起こす可能性が考えられた。そこで、塩酸の代わりにTFAを使用して抽出を試みた。2%TFA含有メタノール溶液によって色素抽出を行うと、黄色～橙色素が優先的に抽出され、表皮に赤～紫色系の色素胞が残留していることが観察された。続いて、色素が残留した表皮を2%塩酸メタノールに浸漬して抽出した結果、色素胞は消失して赤紫色の抽出液を得ることに成功した。また、メタノールの代わりにアセトニトリルを用いての抽出も試みたが、色素は全く抽出されなかった。これは、メタノールとアセトニトリルの細胞への浸透性の違いによると推察された。これらの結果から、イカ表皮の色素は、強酸性メタノールでの抽出が最も適当であり、使用する強酸の種類で色素成分の粗分画が可能であることがわかった。

次に、逆相HPLCによる色素分析の条件検討を行った。LC/MSでの分析を想定し、弱酸であるギ酸含有の溶離液を用いたが、興味深いことにこの条件では黄色素しか溶出しなかった。黄色素は主に2つのピークが観測され、ともに極大吸収は460 nm近辺に観察された。そこで、黄色以外の赤や紫の色素を溶出させるために、移動相を強酸性にすることにした。まず、溶離液Aを0.1%TFA水溶液、Bを0.1%TFA含有アセトニトリル溶液とし、抽出液の分析を行った。しかし、この分析条件でも黄色素以外の色素は溶出しなかった。そこでさらにTFA濃度を上げ、1%濃度の移動相を用いて分析すると、抽出液中の多様な色素の溶出に成功した。Sep-Pak C18カートリッジを用いた小規模の溶出実験においても、1%ギ酸や0.1%TFAを添加した含水アセトニトリル溶液では黄色素以外溶出できないことが確認された。グラジエント条件は、当初溶離液Bを10～100%まで20分間で上昇する条件で行ったが、色素は10分以内

で全て溶出してしまい、以降ピークを確認できなかったため、20分間で10～50%まで上昇させることにした。

このように決定した逆相HPLC分析条件で、2%TFA含有メタノール抽出液と2%塩酸メタノール抽出液をそれぞれ分析した結果、2%TFA含有メタノール溶液による抽出では波長465 nm (1) や484 nm (3) に極大吸収をもつ黄色素が主要色素として溶出し、さらに508 nm (4) や550 nm (6) に極大吸収をもつ赤及び紫色素も低極性側に溶出した。一方2%塩酸メタノール溶液による抽出液中には、2%TFA含有メタノール抽出液と比較して、黄色素よりも550 nm (6)の紫色素を多く含むことが確認された(図4)。

続いて、ODS樹脂を用いたオープンカラムによる色素分画の方法を検討した。カラムを安定化させた後、赤紫色の2%塩酸メタノール抽出液を蒸留水で希釈して負荷した。そこへ、1%TFA含有50%メタノール水溶液を流すと黄色～橙色素が溶出し、赤や紫色素はカラムに留まった。さらに色素を溶出させるべくメタノールの濃度を上昇させて溶出を行ったが、複数の色素成分が同時に溶出してしまい、分画することはできなかった。そこで、弱塩基性溶媒としてアンモニア含有メタノール溶液による溶出を試みた。上記の通り色素を負荷して1%TFA含有50%メタノール水溶液で橙色素を溶出した後、蒸留水でカラムを洗浄・中和してから1%アンモニア含有20%メタノール水溶液、続いて1%アンモニア含有30%メタノール水溶液を用いて色素の溶出を行った。その結果、1%アンモニア含有20%メタノール水溶液で赤色素を溶出、1%アンモニア含有30%メタノール水溶液で紫色素を溶出することに成功した。このように有機溶媒の濃度だけでなく、酸と塩基を使い分けることで、色素成分を色ごとに分画することに成功した。

スルメイカ表皮色素の分析

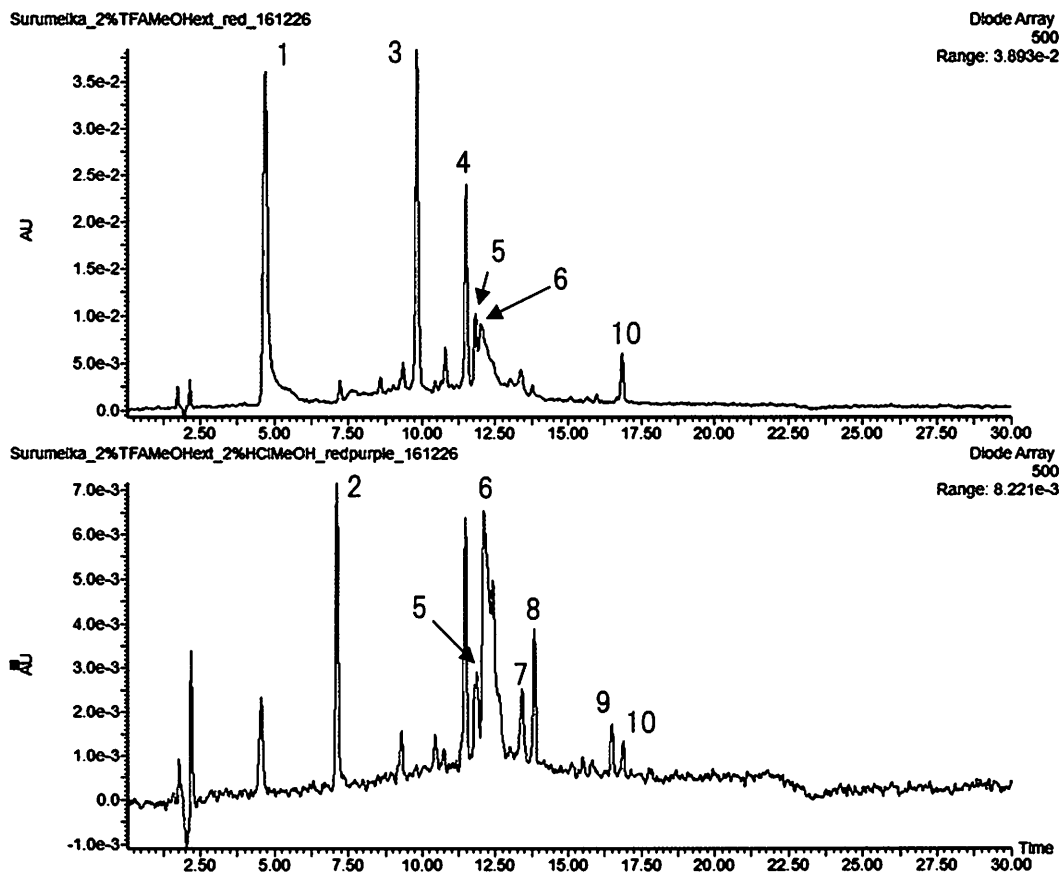


図4 抽出液の逆相 HPLC チャート (検出波長 500 nm)。2%TFA 含有メタノール溶液による抽出液(上)、2%塩酸含有メタノール溶液による抽出液(下)。各ピークの極大吸収波長(nm)、1:465, 2:449, 3:484, 4:508, 5:525, 6:550, 7:550, 8:520, 9:500, 10:550

4. 考察

清澄な抽出液を得るためには、アセトンとメタノールによるスルメイカ表皮の洗浄が非常に重要であった。この操作が不十分であると抽出液が濁ってしまい、カラム分画での支障となる。よって、表皮表面のぬめりが完全になるまで、念入りに表皮を洗浄する必要があった。

表皮からの色素抽出は、添加する酸を選択することで色素の溶出順をコントロールし、色素成分を粗分画できることが判明した。酸の濃度

を上げたり、硫酸を用いるなどして酸性度を高くすれば抽出時間は短縮されるが、抽出中に表皮そのものが溶解したり、色素成分が分解して退色することがしばしば観察された。本研究で試した2%塩酸メタノールでは、表皮に色素胞を残さず透明な抽出液を得ることができ、さらに HPLC 分析の結果、本条件による抽出液の色素成分は、数日間の冷蔵保存中においてもほとんど変化が観察されなかったため、抽出過程における色素成分の分解や変性は少ないと考えられる。

逆相 HPLC 分析において、0.1%ギ酸および 0.1%TFA を添加した弱酸性アセトニトリル溶液では、黄色の色素のみが溶出し、赤や紫の色素を溶出することができなかった。イカ表皮の色素はオンモクローム類と考えられているが、先行研究として Riou らは、ハナクモ体表中のオンモクロームの HPLC 分析において、イオンペア試薬である 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを溶離液に添加して分析を行っている⁸⁾。我々も同様の分析方法で色素を溶出することに成功したが、色素の単離精製時のイオンペア試薬の残留や、カラムや機器への負担考え、揮発性の TFA を溶離液に 1%添加し、TFA を酸性条件と共にイオンペア試薬の役割として用いることで色素の溶出を行った。その結果、500 nm 近辺に極大吸収を持つ赤色素および 540 nm 近辺に極大吸収をもつ紫色色素の溶出が、黄色色素より低極性側で観察された。高極性で溶出した黄色色素は、キサントオマチン類と考えられる。成分の特定はこれからだが、今後のオンモクローム研究に有用な分析法と考えられる。

最後に逆相オープンカラムを用いて色素の分画を行った。このとき、キサントオマチンと考えられる黄色色素は溶出し、カラム上部には赤～紫色の色素が保持された。有機溶媒の濃度を上げることで、順次赤～紫色色素の溶出を試みたが、酸性条件では色素を明確に分画できなかった。そこで、1%アンモニア濃度の塩基性の含水メタノール溶媒で色素の溶出を行った結果、赤色素と紫色色素を分画できた。一般的にオンモクローム類は、塩基性なら水に、酸性なら有機溶媒に溶解しやすい特徴を持つが、赤色素や紫色色素はキサントオマチン類よりその傾向が強いと言える。黄色色素は、スペクトル形状からキサントオマチン類と推定されるが、赤色素や紫色色素の構造は不明である。これらは構造不明のオミン類である可能性が考えられた。今後は各色素の単離精製方法をさらに検討し、マススペクトルや NMR スペクトルを用いて構造分析を進めていきたい。

参考文献

- 1) 水産庁：水産白書 (2010)
- 2) 那須敬二、奥谷喬司、小倉通男：イカ-その生物から消費まで- (三訂版)、成山堂書店 (2002)
- 3) 松野隆男：エビ・カニはなぜ赤い-機能性色素カロテノイド-、成山堂書店、9 (2004)
- 4) 梅鉢幸重：動物の色素、内田養鶴園、176&184 (2000)
- 5) P. Santoro, G. Parisi : *Insect Biochem.*, 17,635 (1987)
- 6) R. Futahashi, R. Kurita, H. Mano, T. Fukatsu : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 12626 (2012)
- 7) A. Bolognese, R. Liberatore, G. Riente, G. Scherillo : *J. Heterocyclic Chem.*, 25, 1247 (1987)
- 8) M. Riou, J.-P. Christidès : *J. Chem. Ecol.*, 36, 415 (2010)