

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580280

研究課題名(和文) 亜熱帯域に生息する有毒甲殻類に含まれる高機能性新規構造多糖類に関する研究

研究課題名(英文) Structural polysaccharide newly prepared from the toxic crab inhabiting subtropical areas

研究代表者

浅川 学 (Asakawa, Manabu)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：60243606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：キチンは直鎖型の構造アミノ多糖類であり、幅広い生物相に分布していることから、地球上で最も豊富に分布する機能性バイオマス資源とされている。そこで、亜熱帯海域に生息するヤシガニ甲殻から新たにキチンを調製し、その諸性状を明らかにするとともに、新素材としての可能性を探るため、様々なゲルを調製しその物性についても検討した。本キチンは、機器分析の結果から、 β -型キチンであると考えられたが、その特徴的な網目構造から、強い強度を有し、さらに、キトサンホルムアルデヒドゲルにおいても、エビやカニ由来のキチンから調製される同様のゲルに比べ、強度の強いゲルが得られることから環境に優しい新素材としての期待が持たれた。

研究成果の概要(英文)：Chitin is one of the most abundant biopolymers on the Earth. In this research, chitin was purified from the exoskeleton of coconut crabs *Birgus latro* in Ishigaki Island, Okinawa prefecture, Japan and their characters were examined by some instrumental analysis. In scanning electron microscopy (SEM) analysis, the surface image of this chitin shows network structure. In infrared (IR) spectrophotometry analysis, the C=O stretching (amide I) band at 1622-1667 cm^{-1} appeared. CP/MAS ^{13}C -NMR can easily distinguish between two types of chitin because of differing spectral appearances in the region of ring carbons (110-50 ppm); one shows six well-defined resonances. Six resonance lines at 104.300(C1), 83.459(C4), 76.026(C5), 73.694(C3), 61.306(C6) and 55.476(C2) ppm are clearly shown. Gel strength of chitosan-formaldehyde gel from coconut crabs is 6 times stronger than that of chitosan-formaldehyde gel prepared from chitosan standard.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：ヤシガニ キチン キトサン 構造多糖類 固体NMR 走査電子顕微鏡 IR X線回折

1. 研究開始当初の背景

キチンは、N-アセチル D-グルコサミンが β (1-4) 結合した直鎖型の構造アミノ多糖類であり、菌類、植物から動物にわたる幅広い生物相に分布していることから、地球上で最も豊富かつ多機能なバイオマス資源とされ、これまで多くの機能が報告されている。また、キチンは、そのほとんどが水産加工場などで多量に廃棄物としての排出されるカニ、エビなどの甲殻類外骨格を原材料として工業的に製造されており、その機能を含めた諸性状もこれらの原材料から精製されたキチンを用いて調べられている。しかしながら、その幅広い分布様式から明らかなように、様々な生息環境に適応した海洋生物には、これまでにない未知の構造・機能をもつキチンなどの多機能性構造多糖類の存在が容易に考えられ、基礎研究から多機能性バイオマテリアルの開発などの応用展開までその可能性は無限に広がるが、海洋生物を対象とした多機能性構造多糖類の探索研究は進展していないのが現状である。この点が、本研究開始当初の背景となった。

2. 研究の目的

亜熱帯域産有毒甲殻類を対象として高機能性バイオマテリアルを探索中、沖縄県で散発的な食中毒原因にもなっているオカヤドカリ科ヤシガニ *Birgus latro* 甲殻にズワイガニ甲殻などに主成分として含まれるキチンとはその諸性状が異なる新素材としての可能性を秘めた高機能性構造多糖類の存在が示唆された。本研究では、機能性成分としての本化合物の諸性状を明らかにするとともに、バイオマテリアルとしての可能性に検討を加えることを目的としている。

3. 研究の方法

1) 試料

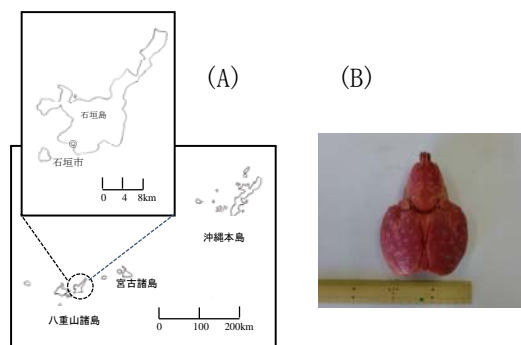


図 1. 沖縄県石垣島 (A) およびヤシガニ *Birgus latro* 甲殻 (廃棄物) (B)

2011 年～2013 年にかけて、沖縄県石垣島石垣市 (図 1 A) において加熱調理後に廃棄物として排出されるヤシガニ甲殻 (図 1B) を回収した。次いで、流水中で夾雑物などを十分に水洗して除去し、乾燥させたものを以下に述べるキチン精製の試料とした。

2) キチンの精製

上記ヤシガニ乾燥甲殻を小型ミルで粉碎し均一化した甲殻細片 2290g からキチンの精製を試みた。すなわち、この細片の全量を充分量の 6% 塩酸により脱灰し、次いで、乾燥物 (496 g) の除タンパク (4% NaOH, 105°C / オイルバス) を行った。さらに、水洗・乾燥することにより粗キチン (417g) を得た。最後に、0.5% 過マンガン酸カリウム及び 0.1% シュウ酸による脱色を行い、水洗・乾燥することにより精製キチン粉末 (324 g) を得た。このようにして得られたヤシガニ甲殻由来精製キチンの構造情報を固体核磁気共鳴吸収スペクトル (Solid-State NMR) 測定を中心とする各種機器分析 (X 線回折分析、赤外線吸収スペクトル測定、表面構造観察) により得た。なお、機器分析における比較標準試料としてキチン (ナカライテスク) を使用した。

3) キトサンの調製

2) において調製したキチンに 50% NaOH 水溶液を加え、油浴 (140°C、1 時間) 中で脱 N-アセチル化を進行させ、粗キトサンを調製した。次に、10% 酢酸を添加してこの粗キトサンを溶解させ、不溶物を除去し溶解液に 2N NaOH を滴下させてキトサングルを作成し、これを洗浄、乾燥させて精製キトサンを調製した。

4) キトサン-ホルムアルデヒドゲルの調製およびゲル強度の測定

3) により精製したキトサンを細切後、10% 酢酸を加え十分に溶解させた。これに 35% ホルムアルデヒド水溶液を加え、軽く振とうさせた後、室温で放置し、ゲル化させた。一方、キトサン標準品 (ナカライテスク) より同様にキトサン-ホルムアルデヒドゲルを調製し、そのゲル強度をヤシガニ由来の同ゲルと比較した。なお、ゲル強度の測定は、レオメーター (RT-2002J, RHEOTECH) により行った。

5) 機器分析

5-1) 表面組織構造観察

精製キチン粉末を用いて、その表面組織構造を電界放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM; 日立 S-5200) により観察した。

5-2) 赤外線 (IR) 吸収スペクトル

精製キチンの赤外線吸収スペクトルを FT-IR 6300 (JASCO) を用い、全反射測定法

(Attenuated Total Reflection: ATR 法) により測定した。

5-3) X線ディフラクトメトリー

精製キチン粉末を耐食性アルミ製チップに埋め込み、試料水平型 X 線回折装置 (Rigaku Corporation) を用いて、粉末 X 線ディフラクトメトリーを行った。

5-4) 核磁気共鳴 (NMR) 吸収スペクトル

精製キチン粉末を用いて、固体 NMR 分析法により ^{13}C -NMR スペクトルの測定を試みた。NMR スペクトルの測定は、JEOL ECA600 を用い、CP/MAS 法 (4mm プローブ) により、室温条件下で行った。

4. 研究成果

ヤシガニ甲殻由来精製キチンの表面組織を電解放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM; 日立 S-5200) により観察したところ、キチン標品には見られない特徴的な細かな網目構造 (ϕ 5.00 μm 程度) が観察された (図 2)。この特徴的な網目構造は、これまでの多くの生物体より精製されるキチンには観察例がないユニークな表面構造であり、ヤシガニ甲殻由来キチンが物理的強度の点において、他の生物体由来のキチンに比べて優れたバイオ素材であることが推測される。

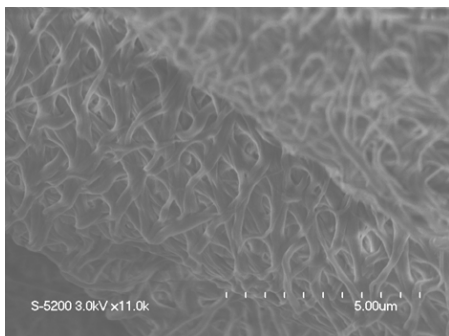


図 2. ヤシガニ甲殻より精製したキチンの電解放出型電子顕微鏡による表面構造観察

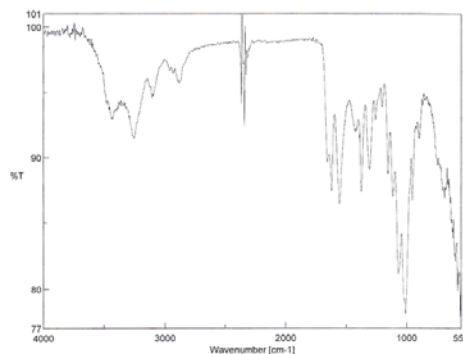


図 3. ヤシガニ甲殻より精製したキチンの赤外線吸収スペクトル (ATR 法)

一方、赤外線吸収スペクトルにおける吸収パターン (図 3) は、 α 型キチンに類似して

おり、特徴的なアミド I の吸収 ($1667, 1556\text{cm}^{-1}$; doublet) が認められた。さらに、X 線ディフラクトメトリー (図 4) の結果からも本精製キチンが α 型の構造であることが示唆された。

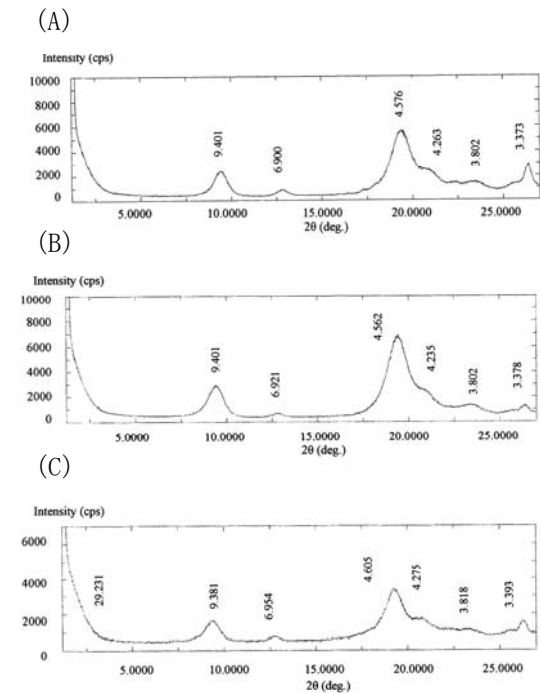


図 4. キチンの X 線回折スペクトル

(A) : ヤシガニ甲殻由来キチン (B) :
ズワイガニ由来キチン (C) : キチン標品

キチンはほとんどの溶剤に対して難溶性であることから、固体 NMR 分析法により ^{13}C -NMR スペクトルを測定し、その化学構造に検討を加えた。NMR スペクトルの測定は、JEOL ECA600 (日本電子) を用い、4mm CP MAS プローブにより、室温条件下で行った。

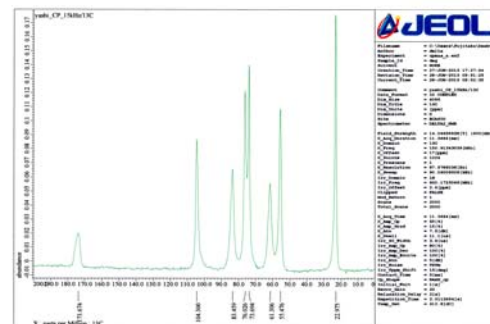


図 5. ヤシガニ甲殻より精製したキチンの solid-state ^{13}C -NMR スペクトル (CP/MAS 法)

その結果、23ppm 付近 (22.975ppm) に N-アセチルグルコサミン構造由来の特徴的な N-アセチルメチル基 (N-COCH₃) の鋭い吸収が観測され、さらに、174ppm 付近 (173.674ppm)

にもアセチルカルボニル基由来と思われるカルボニル炭素(C=O)の吸収が観測された(図5)。また、 α 型キチンの特徴であるC-3、C-5のシグナルの分離が確認された。なお、各炭素の帰属は以下の通りである(表1)。

表1. ヤシガニ甲殻由来キチンの solid-state ^{13}C -NMR スペクトルデータ (ppm)

CH ₃	22.975	C-5	76.026
C-2	55.476	C-4	83.456
C-6	61.306	C-1	104.300
C-3	73.694	C=O	173.674

ところで、ヤシガニ甲殻由来キチンおよびキチン標準品よりそれぞれ調製した N-アセチルキトサンのゲル強度は、それぞれ 408gf、440gf でほぼ同等であったが、アリリデン化することによりヤシガニ由来のキトサン-ホルムアルデヒドゲルのゲルは、キチン標準品由来のものに比べて、約 6 倍の強度(1504gf)を示した。

ヤシガニ甲殻由来キチンは、 α -キチンの一種であると考えられるが、その物理的な構造(特徴的な細かな網目構造; 図2)から強い強度を有し、さらに、キトサンホルムアルデヒドにおいても、エビやカニ由来のキチン標準品から調製される同様のゲルに比べ、強度の点で優れていることから、環境に優しい新素材としての期待が持たれた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. M. Asakawa, T. Noguchi, Food Poisonings by Ingestion of Cyprinid Fish, *Toxins*, 6, 査読有, 2014, pp539-555, 10.3390/toxins6020539
2. 門田信幸, 日比野由衣, 高岡直也, 浅川学, 成田弘子, 野口玉雄, 富山湾魚津補助港のトゲモミジガイの食性, 富山の生物(富山県生物学会誌), 52 巻, 査読有, 2013, pp101-104
3. 浅川学, 身の回りに潜む海洋生物毒と健康危機管理, 食品衛生学雑誌, 54 巻, 査読有, 2013, pp233-236
4. H. Kajihara, SC. Sun, AV. Chernyshev, HX. Chen, K. Ito, M. Asakawa, SA. Maslakova, JL. Norenburg, M. Strand, P. Sundberg, F. Iwata, Taxonomic Identity of a Tetrodotoxin-Accumulating Ribbon-worm *Cephalothrix simula* (Nemertea: Palaeonemertea): A Species Artificially

Introduced from the Pacific to Europe, *Zoological Science*, 30, 査読有, 2013, pp985-997

5. M. Asakawa, K. Ito, H. Kajihara, Highly Toxic Ribbon Worm *Cephalothrix simula* Containing Tetrodotoxin in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, *Toxins*, 5, 査読有, 2013, pp376-395, 10.3390/toxins5020376
6. 浅川学, 野口玉雄, コイの喫食による特異的食中毒について, *FOODS & FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN*, 217 巻, 査読有, 2012, pp304-309

[学会発表] (計 3 件)

1. 浅川学, 岡崎翔太, 藤高 仁, 前田 誠, 村上 圭, 真島彩香, 畑 菜央子, 吉武由喜子, 沖縄県石垣島産ヤシガニ由来キチンの構造情報, 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 2014 年 3 月 27 日~2014 年 3 月 31 日, 国立大学法人北海道大学 水産学部
2. 真島彩香, 畑 菜央子, 岡崎翔太, 高岡直也, 岸本和雄, 吉武由喜子, 大塚 攻, 浅川学, 南西諸島産数種海藻におけるアミノ酸組成について, 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013 年 3 月 29 日~2013 年 3 月 30 日, 国立大学法人東京海洋大学 海洋科学部
3. 岡崎翔太, 高岡直也, 真島彩香, 岸本和雄, 吉武由喜子, 大塚 攻, 浅川学, アミノ酸アナライザーによるカイニン酸の分析について, 平成 24 年度日本水産学会秋季大会, 2012 年 9 月 14 日~2012 年 9 月 17 日, 独立行政法人水産大学校

[図書] (計 1 件)

1. M. Asakawa, Y. Shida, K. Miyazawa, T. Noguchi, Instrumental Analysis of Tetrodotoxin, *INTECH, CHROMATOGRAPHY* (Ed. by L. de Azevedo Calderon), 2012, pp245-270, <http://dx.doi.org/10.5772/48668>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川学 (MANABU ASAKAWA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号: 60243608