

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 27 日現在

機関番号：32608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350116

研究課題名(和文)イカやタコなど頭足類の表皮中に含まれる赤色素の着色料としての実用化へ向けた研究

研究課題名(英文)The study on the red pigments in outer skins of Cephalopoda

研究代表者

伊藤 裕才 (ITO, YUSAI)

共立女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：40435706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：軟体動物頭足類(イカやタコ)の表皮色素胞は黄色から紫色までの様々な色素を含んでいる。これらの色素は着色料として利用できる可能性があるが、色素成分はオンモクローム類であること以外は不明である。そこで主にスルメイカを対象に表皮から色素を抽出し、それら全成分を分析するHPLC分析法を開発した。分析の結果、黄色、赤色、紫色といった複数の色素の観測に成功した。さらにスルメイカ抽出液から紫色色素をクロマトグラフィーによって単離精製した。組成分析の結果、紫色色素は硫黄原子を含んでいることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The nanostructured color granules in outer skins of cephalopoda such as squids and octopus contains variety of pigments, which are candidates of new natural food dye. Though, the pigments of cephalopoda are known to be ommochrome type compounds, there is few report about the chemical nature of ommochrome pigments of cephalopoda. Therefore, we extracted the pigments from the raw skins of Japanese flying squid and invented the HPLC method to analyse all pigments. As a result, the extract contained yellow, red, and purple pigments in the extract. We purified the purple pigment by sequential chromatography. The mass analysis of the purple pigment strongly suggested that the molecular formula of the pigment contained sulfur atoms.

研究分野：天然物化学

キーワード：オンモクローム 頭足類 スルメイカ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、消費者は合成着色料よりも天然着色料を好む傾向にある。これは「天然由来は安全」という認識によるものである。しかしながら、天然着色料の基原生物はカビから昆虫まで多岐に渡り、食材として一般には口にしない生物が基原であることも多い。また天然着色料の多くは抽出物のままであり、色素以外の副成分が多く含まれている。そのため天然着色料を長期的に摂取することで、これら副成分が健康に影響を与える可能性が指摘されている。このような背景から、食経験が担保された食材を基原とする着色料の開発を求める声が高まってきている。

現在、カニやエビ等の節足動物の甲羅の赤色素であるアスタキサンチンが天然着色料として利用されている。そこで、同じ無脊椎動物であり、かつ食経験も豊富なイカやタコなど頭足類の表皮の赤色素も新しい着色料の素材になりえるのではなからうかと研究代表者は考えた。イカやタコなど頭足類は、我々日本人にとって極めて身近な食材であり、長い食経験からその安全性は保障されている。また、イカやタコ表皮における赤色の色調は、加熱調理しても維持されることから、色素は熱に極めて安定であると考えられる。これらの観点から、イカやタコなど頭足類の色素は着色料として十分な機能をもち、また実用化の現実性を持っていると考えられた。さらに、イカの可食部は主に外套筋と腕部であるため、水産加工工場において表皮は内臓と共にもっぱら廃棄されている。よって色素の材料には事欠くこともないと考えられる。

イカやタコの表皮色素は無脊椎動物の体表色素の1つであるオンモクローム群と考えられている。オンモクロームはトリプトファンを原料に3-ヒドロキシキヌレニンを経由して生合成される色素である。これまでに、オンモクロームは主に昆虫の体表および眼の色素として研究報告されてきた。オンモクロームは紫外可視吸収スペクトルから「オマチン」「オミン」「オミジン」に分類されている。しかしながら、これまでに構造決定されたオンモクロームは、オマチン類のみである。昆虫の眼や鱗粉の色素である xanthommatin およびその類縁体の rodommatin と ommatin-D の3つだけが構造決定されている。昆虫の眼や神経節に存在するといわれる赤色～紫色の「オミン (ommin)」は、報告から50年以上たった現在でも構造は不明のままである。粗精製のオミンの酸加水分解物からシステインが検出されたことから、硫黄が含まれていることが示唆されている。

オンモクローム色素の構造決定がこれまでに達成されなかった理由は、色素が中性の水溶液や有機溶媒に不溶であるため、クロマトグラフィーによる精製が難しいという点があげられる。それゆえ、イカやタコ等の頭足類の色素についても、色素の構造や種別間

の色素組成の差についての情報は殆どない。イカやタコに特有の赤紫色はオミン類ではないかとの推測もなされているが、分析や単離に成功していない詳細は不明である。オンモクロームは表皮の色素胞に含まれており、頭足類においては擬態だけではなく種間の信号にも使われており生態学的な観点からも大変興味深い。

## 2. 研究の目的

本研究は、赤色～紫色を呈するイカ及びタコ表皮色素を新しい着色料として利用すべく、色素の化学的性質および有効性に関しての知見を高めることを目的とした。特に未解明のままである表皮色素の化学構造の情報を得ることを第一の目的とした。

## 3. 研究の方法

試料：頭足類の生の試料は全て市場で購入した。試料として用いた頭足類は、スルメイカ、ヤリイカ、ケンサキイカ、アオリイカ、コウイカ、マダコ、ミズダコの7種であった。これら試料は冷凍することなく、購入後すみやかに表皮の採取を行った。

試薬：水は MilliQ 水を用いた。有機溶媒および酸溶液は特級を用いた。HPLC の移動相は HPLC 用純水および HPLC 用有機溶媒を用いた。

①色素の抽出：各頭足類試料から表皮を採取し、アセトンに浸漬して表面の粘液物質を除去した。続いてメタノールに浸漬して水溶性物質を除去した。このとき表皮から色素の漏出は一切観察されなかった。続いて、試料を塩酸/メタノール(2:98)溶液またはトリフルオロ酢酸(TFA)/メタノール(1:99)に浸漬し、ゆるやかに攪拌しながら常温で1～3時間色素の抽出を行った。抽出液から表皮試料を取り除いた後、必要であれば5000 rpmで10分間遠心分離を行うことで残渣を除去し、濃赤色の色素粗抽出液を得た。

## ②粗抽出液の LC/MS 分析

粗抽出液を、逆相カラムを用いた LC/MS で分析した。分析条件は以下の通りである。LC/MS 条件：カラム：Cosmosil 5C18-MSII (4.6 i.d. × 150 mm, nacalai tesque 社製)、移動相：A 液= 0.1%ギ酸水溶液、B 液=アセトニトリル 0.1%ギ酸入り溶液、グラジエント条件：B 液の濃度 10%→(2%/min)→70%、カラム温度：40℃、流量：0.5ml/min、試料注入量：10μl、検出器：PDA:100～600 nm、ESI-MS 条件：キャピラリー電圧：3kV、コーン電圧：30 V、ソース温度：120℃、脱溶媒温度：350℃、脱溶媒ガス流量：400 L/hr、コーンガス流量：50 L/h

## ③粗抽出液の HPLC 分析

粗抽出液を、逆相カラムを用いた HPLC で分析した。分析条件は以下の通りである。HPLC 本体として Waters Alliance、検出装置に

Waters PDA 2695, 解析ソフトには MassLynx (Waters)を用いた。

HPLC 条件: カラム:Cosmosil 5C18-MSII (4.6 i.d. × 150 mm, nacalai tesque 社製)、移動相: A 液=1%TFA 水溶液:、B 液=アセトニトリル 1%TFA 入り溶液、グラジエント条件: B 液の濃度 10%→(2%/min)→50%、カラム温度:40℃、流量:1 ml/min, 試料注入量:10 μl, 検出器:PDA:100~600 nm、

#### ④粗抽出液のイオンペア分析

HPLC 条件: カラム:Cosmosil 5C18-MSII (4.6 i.d. × 150 mm, nacalai tesque 社製)、移動相: A 液 20mM リン酸二水素ナトリウム・2H<sub>2</sub>O/10mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム (pH2.1 に調製) B 液 アセトニトリル 80% /A 液 20%、グラジエント条件: B 液の濃度 15%→(3%/min)→100%、カラム温度:40℃、流量:0.5ml/min, 試料注入量:10μl, 検出器:PDA:100~600 nm

#### ⑤抽出液の分画と紫色素の単離

抽出液に水を1:4の割合で加えたのち、10%メタノールで安定化させた ODS オープンカラム (直径4cm 樹脂10 cm) に負荷した。その後、カラムを水で洗浄し、続いて0.1%TFA 入り 50%メタノール溶液で黄色色素を溶出した。続いて0.1%TFA 入り 100%メタノール溶液で洗浄し、再び水で洗浄後、1%アンモニア入り 10%メタノール溶液で溶出した。続けて1%アンモニア入り 20%メタノール溶液で溶出を行った。紫色素は1%アンモニア入り 30%メタノール溶液で溶出した。紫色素の溶出のタイミングを目視で確認して色素を集めた。得られた紫色素画分はロータリーエヴァポレーターを用いて減圧濃縮し、アンモニアが完全に除去した。中性となった色素画分を別の ODS オープンカラムに負荷し、メタノールで洗浄後、色素を0.1%TFA 入りメタノール溶液で溶出した。得られた色素画分をガラス試験管に入れ、遠心エヴァポレーターで減圧乾固した。

### 4. 研究成果



図1: アオリイカ表皮の色素胞

#### ①表皮色素の採取と色素胞の観察

表皮は新鮮な生体から採取した。採取した表皮はデジタルマイクロスコープを用いて観察した。その結果、イカの表面には多数の色素胞が存在し、色素胞ごとに色調が違うこ

とが観測された(図1)。色素胞の差異は、含まれているオンモクロームの種類、もしくはオンモクロームの酸化還元状態による差異と示唆された。特にスルメイカの場合、背面部は紫色が濃く、それ以外の部分は黄色~褐色の色素胞が多いことがわかった(図2)このように色素胞は、イカの種類や部位で差異があり、それが種特有の色調を生み出すことが改めて確認された。



図2: スルメイカ表皮の色素胞(背側)

#### ②抽出法の検討

採取した表皮はアセトンとメタノールに浸漬して表面を洗浄した。その後、塩酸入りメタノール溶液で抽出を行った。強酸性溶媒を避けるべく、他の極性および非極性溶媒を用い、pH を変化させながら抽出を試みたが、色素の抽出には至らなかった。特に酸性メタノール溶液によるメチルエステル化を防ぐため、メタノールの代わりにアセトニトリルを抽出溶媒に用いたが、色素は酸性化したアセトニトリル溶液には抽出されなかった。結果として強酸入りメタノール溶液のみが抽出溶媒に適していることが判明した。酸にTFA を用いると黄色や赤色色素が優先的に抽出された。そこで、紫色素を得る際には、TFA 入りメタノールで抽出した後に、紫色色素を抽出すべく塩酸入りメタノール溶液で抽出を行った。抽出は色素胞の状態を目視で確認しながら行ったが、常温下で1~数時間以内に色素の大半は抽出された。抽出液は-20℃で保存された。このとき色素の成分変化はHPLC 分析によって観測されなかった。

#### ③HPLC 分析法の検討

オンモクローム色素の研究が発展しない最大の理由は分析方法が確立していないことによる。オンモクロームの多くは中性の溶媒に不溶であり、強酸入りのアルコール類やアルカリ性の水溶液にのみ溶解する。それゆえ、常法である中性や弱酸を基本とする分析方法ではオンモクロームの分析は達成されていない。最初の HPLC 分析には溶媒としては0.1%ギ酸入りメタノールまたはアセトニトリルの含水溶液を選択してグラジエント溶出を行った。これはLC/MS 分析に用いることができる溶媒である。このとき色素は450~460nm 近辺に極大吸収をもつ2つのピークだけが観測された。同条件におけるLC/ESI-MS 分析を行った結果、得られたイオンピークの

情報から、この2つのピークは、昆虫ですで見ついている代表的なオンモクロームである xanthommatin およびその脱カルボン酸類縁体の decarboxyxanthommatin であることが強く示唆された。両物質の市販標品は存在せず、また NMR 解析は行っていないため、完全な同定に至っていないが、可視部吸収スペクトルの比較から両物質は xanthommatin 類であることは間違いないと考える。両物質はトンボ類の婚姻色であることが近年報告されている。

赤色～赤紫色の試料を HPLC に導入したにも関わらず、黄色の xanthommatin しか検出されないことが大きな疑問であった。可能性は、注入した色素が本条件では溶出せずにカラムに残留していることであった。そこで、試料前処理用の Sep-Pak<sub>C18</sub> カートリッジを用いて、色素の溶出挙動を調べた結果、2つの理由が判明した。1つは xanthommatin の酸化還元による色の遷移である。Xanthommatin は還元状態で赤色、酸化状態で黄色になることが知られている。抽出時の強酸性のメタノール溶媒中では、色素胞内での酸化還元状態が維持されていると言われている。しかし、水を添加すると色素の酸化が進行し、含水の移動相を利用した HPLC 分析では、酸化した黄色の xanthommatin のみが溶出し検出されたと考えられる。実際、抽出液に水を加えると、赤色だった抽出液は瞬時にして黄色味が強くなることが観察された。2つ目の理由は、移動相の酸性度が低すぎるため色素が溶出しないということである。表皮からの抽出には、強酸性の塩酸入りメタノール溶液を用いている。Sep-Pak カートリッジによる溶出実験の結果、メタノール溶液で全ての色素をカートリッジより溶出するには、塩酸を1%またはトリフルオロ酢酸(TFA)で0.5~1%の濃度で添加する必要があることがわかった。しかしながら、強酸条件は機器を痛める結果につながりかねない。そこで、まずイオンペア試薬を移動相に添加して分析を行った。その結果、ギ酸入り移動相では溶出しなかった赤色～赤紫色の色素の溶出が確認された。イオンペア試薬のよる分析は有効であることがわかったが、溶媒の調整に手間がかかり、分取条件の検討には不適切である。そのため TFA 濃度を高めて色素を溶出することを検討した。TFA を用いる条件は LC/MS 分析には使えないが、分取条件を検討するために揮発性の高い強酸として TFA を用いることにした。HPLC 分析で通常用いる TFA の濃度 (0.05~0.1%) の含水メタノールおよび含水アセトニトリルの移動相では色素は溶出しなかった。そこで TFA 濃度を1%まで上げ含水アセトニトリル溶液を移動相としたとき、イオンペア試薬を使ったときと同様に複数の色素が溶出した (図3)。本条件は機器およびカラムに負担をかけるため機器の洗浄が欠かせないが、オンモクロームのルーチン分析には適していると判断した。よって、今後オンモクロ

ーム色素の分析を行う際には本法を用いることとした。本方法によるスルメイカ、ヤリイカおよびケンサキイカの HPLC チャートを図3に示した。このうち主要な色素の紫外可視部吸収スペクトルを図4に示した。

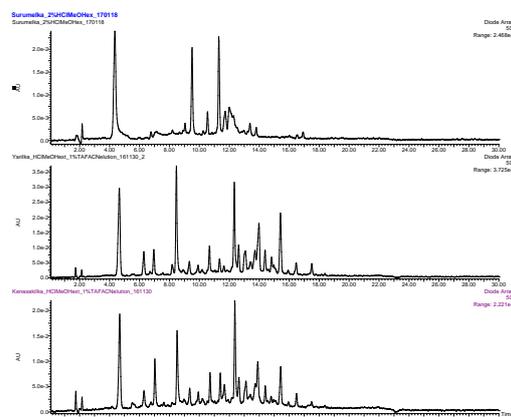


図3：スルメイカ (上)、ヤリイカ (中)、ケンサキイカ (下) 抽出液の HPLC チャート (移動相に含水アセトニトリルを用いて TFA を1%濃度で添加した)

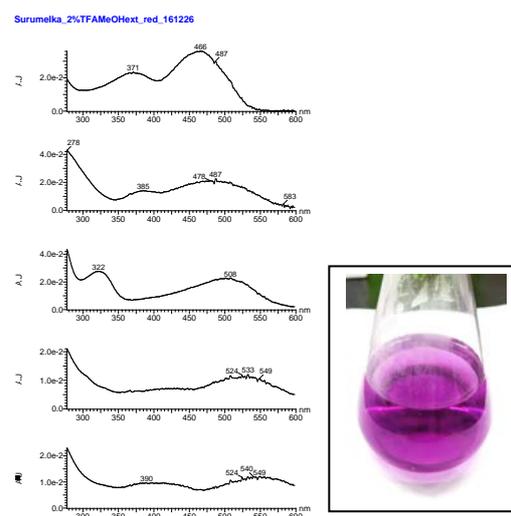


図4：スルメイカ表皮抽出液中の色素の吸収スペクトル (最上段が xanthommatin、最下段が紫色素)

右写真は紫色素の粗画分。

#### ④色素の分画と紫色素の単離精製

抽出で得られた粗抽出液から色素の分画を行った。ここでは、紫色素の構造決定を最終目標として色素の単離精製を行った。抽出液は、より紫色素を含んでいる塩酸メタノール溶液による抽出液を用いた。抽出液の極性を高めるために水を加えた後、逆相のオープンカラムに付した。このとき色素は全量カラム上部に保持された。カラムを水で洗浄した後、TFA 酸性の 50%メタノール溶液を流した結果、黄色色素が溶出した。本黄色色素画分を HPLC 分析した結果、xanthommatin および decarboxyxanthommatin と思われる色素が溶出したことが判明した。メタノール濃度を増

加させると、続いて赤色素および紫色素が溶出されるが、メタノール濃度を厳密にコントロールしても紫色素だけを選択的に溶出させることができなかったため、酸性メタノール溶媒による溶出は断念した。再び水でカラムを洗浄後に、1%アンモニア含有含水メタノール溶液で溶出を行った。アルカリ性溶媒による逆相カラムの溶出は一般的には行われないが、弱アルカリ性にすることで水溶性が高まるオンモクローム色素の性質を利用して溶出を行った。10~20%メタノール濃度では赤色および桃色の色素が溶出した。続いて30%にメタノール濃度をあげた結果、紫色素が溶出したので、目視で色素を回収した(図4)。回収した紫色素の画分を減圧下で濃縮し、アンモニアを完全に除去した。中性状態のまま-20℃で保存すると色素は沈殿した。そこで冷蔵する前の中性の色素画分を最終精製のために逆相のオープンカラムに付し、メタノールで溶出すると赤色素が溶出した。後に0.1%TFA入りメタノール溶液で紫色素を溶出した。本画分のHPLC分析の結果、色素はほぼ純品であることが判明した(図5)。最終的に色素は遠心エヴァポレーターによってガラス管内で乾固した。スルメイカ試料(1杯)から紫色素を約0.5mg得ることができた。

Surumeika\_2%TFAMeOHet\_2%HCIBMeOH\_ODS\_30%MeOH%NH3\_purple\_191227

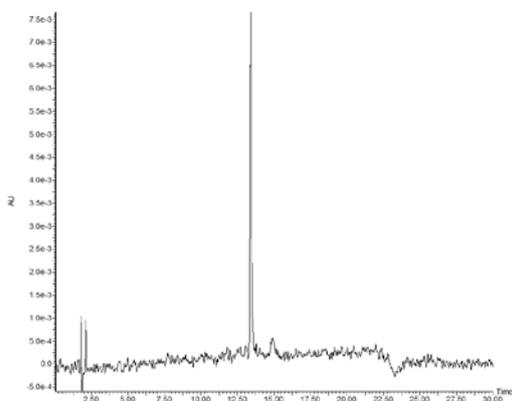


図5:単離した紫色素のHPLCチャート(検出500nm)

本色素の分子量および分子組成についての情報を得るために、分子量測定を外部委託した。FAB-MS分析では明確な分子イオンピークは得られなかったが、100%ギ酸を用いたフローインジェクション法によるESI-MS分析では、陰イオンモードでの分析時にイオンピークが観測され、分子量は600~700程度と観測された。また高分解能スペクトルから予想される分子組成には、硫黄原子の存在が強く示唆された。これは昆虫のオミン粗生成物における加水分解物中のシステイン含有の結果と一致する。よって今回分離された紫色素はオミン類であることが強く示唆された。

TFAを用いたHPLC分析法の開発により、イカ表皮から抽出された色素群について詳細なクロマトグラムを得ることができた。これまでにHPLCによるオンモクローム分析法は殆ど報告されていないため、本方法によって

オンモクローム研究は大きく飛躍すると考える。また、スルメイカ表皮の抽出液を分画した結果、黄色色素であるxanthommatin類の存在を確認した。さらに540nmに極大吸収をもつ紫色素の単離精製に成功した。分子量分析から本物質は硫黄原子を含む構造未決定のオミン色素であることが示唆された。

今回の研究では残念ながらNMRを用いた構造決定には至らなかったが、今回確立された方法を用いて色素を大量精製し、長年謎とされてきたオミン類および頭足類のオンモクローム色素の組成について結着をつけ、色素の有効利用の道を探りたいと思う。

## 5. 主な発表論文等 特になし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 裕才 (Yusai Ito)

共立女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：40435706