

ノート

キタムラサキウニにおける遊離アミノ酸及び脂溶性色素の定量法の検討

紺野 智太*1・垂水 裕樹*1・鈴木 花*1

The quantitative method of free amino acid and fat-soluble pigment
of northern sea urchin *Mesocentrotus nudus*

Tomohiro KONNO*1, Yuki TARUMI*1, Hana SUZUKI*1

キーワード：キタムラサキウニ，磯焼け，遊離アミノ酸，脂溶性色素，エキネノン，β-カロテン

かつて宮城県沿岸北部はコンブ目アラメが主要な藻場を形成し、ウニやアワビなどの磯根資源に恵まれていた。しかし、東日本大震災による環境変化が一因と考えられるキタムラサキウニの大量発生が生じたことで藻場が崩壊し、「荒地地」や「磯焼け」とよばれる無節サンゴモ群落化への交代が進行し、その回復が課題となっている¹⁾。

キタムラサキウニは本県中部から北部の沿岸で漁獲される磯根資源として重要な位置を占めており、「海面漁業生産統計調査」²⁾及び「漁業産出統計」³⁾によれば、宮城県における2019年のウニ類の生産量は472t、生産金額は28,800万円である。しかし、磯焼けした漁場におけるウニは身入りが少ないことに加え、身色も悪く、商品価値は低いため、これらのウニを有効活用する方法が求められている。

上記の課題を解決するため、大量発生した身入りの少ないウニの効率的な駆除や、駆除したウニの人為的肥育技術の確立、その有効活用方法の研究として、平成30年度から令和2年度まで「食料生産地域再生のための先端技術展開事業のうち現地実証研究委託事業」宮城県・水産業分野「異常発生したウニの効率的駆除及び有効利用に関する実証研究」が実施された⁴⁾。

その研究の中で、ウニの人為的肥育試験については東北大学が実施し、本県は中課題2「ウニの人為的肥育方法」において、肥育試験前後のウニ生殖巣の遊離アミノ酸及び脂溶性色素の定量分析を行った。分析項目として、

呈味成分である「遊離アミノ酸」及び、見た目の鮮やかさに関与する「脂溶性色素」、特に「エキネノン」・「β-カロテン」について定量分析した。本報では、それらの定量法と定量結果について検討したので報告する。

材料と方法

1 サンプル

本分析に供したサンプルは、2019年度冬期（2019年11月から2020年2月まで）に、東北大学が肥育試験に供したキタムラサキウニ生殖巣（以下、ウニ）を使用し、試験区については表1のとおりとした。なお、肥育効果の検証のため肥育前のウニも本分析に供した。肥育を開始する前の「肥育前区」、ノリを特殊な方法で固形化した餌料（以下、「固形餌料」という。なお、固形化技術については特許出願中である）だけを給餌した「実験区」、冷凍マコンブだけを給餌した「対照区」の3試験区を設定した。サンプルの保管方法については、東北大学で生殖巣重量等を測定した後、凍結し、本分析に供するまで-30℃で冷凍保管した。

肥育試験に用いた固形餌料については、東北大学が製造したものが使用された。一般成分については表2のとおりである。

*1宮城県水産技術総合センター

表1 試験区一覧

試験区	飼料	分析サンプル数	
		遊離アミノ酸	脂溶性色素
肥育前区	-	21	5
実験区	固形飼料	15	15
対照区	冷凍マコンブ	15	15

表2 固形飼料の一般成分 (n=3, mean ± sd)

	(%)
水分	8.2 ± 1.0
粗タンパク	17.6 ± 0.4
粗脂肪	0.3 ± 0.0
灰分	10.2 ± 0.3
炭水化物	63.7 ± 1.2

2 遊離アミノ酸分析

(1) 遊離アミノ酸分析用サンプルの調製

遊離アミノ酸分析の前処理方法については、猪股の方法ほかを参考に次のように行った^{5,8)}。冷凍保管したウニを冷水解凍し、約1gを50ml遠沈管に精秤した。その遠沈管にトリクロロ酢酸水溶液を加えてガラス棒でホモジナイズした後、遠心分離 (0°C・21,100×g・5分) により除タンパクし、上澄みを採取する操作を合計3回繰り返した。トリクロロ酢酸水溶液を加える操作は「10%・6ml」を1回、「5%・3ml」を2回とした。次に100mlメスフラスコに超純水で希釈・定容後、0.45μmシリンジフィルターで濾過したものを1.5mlバイアルに充填し、高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC) 分析サンプルとした。

(2) HPLC分析

アジレント・テクノロジー株式会社製 (Agilent 1260 Infinity series) を用いた。

アミノ酸の誘導体化は、Agilent 1260 Infinityオートサンプラーの自動プレカラム誘導体化機能を用いた。OPA (o-フタルアルデヒド) で1級アミノ酸を誘導体化した後、逆相カラムで分離し、フォトダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器を用いて定量した。分析条件は表3、グラジエントは表4のとおりとした。

各遊離アミノ酸は、市販のスタンダードを用いた絶対検量線法により、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸

(Glu)、セリン (Ser)、ヒスチジン (His)、グリシン (Gly)、スレオニン (Thr)、アルギニン (Arg)、アラニン (Ala)、チロシン (Tyr)、バリン (Val)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe)、イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、リジン (Lys)、プロリン (Pro) を定量した。

なお、定量分析した結果はKruskal-Wallis検定後、有意差がある場合には2群ずつを比較するためPost-hoc検定及びSteel-Dwassの多重比較を行った。双方とも、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

表3 遊離アミノ酸分析におけるHPLC条件

カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18(3.0*100mm*2.7μm)
ガードカラム	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18(3.0*5mm*2.7μm)
カラム温度	40°C
サンプル温度	5°C
移動相	グラジエント分析 A) 20mM リン酸水素ナトリウム (12水) (pH7.6) B) アセトニトリル/メタノール/水 (5:5:1)
移動相流量	0.85ml/min
検出器	DAD 338.0nm;10nm, Ref390nm;20nm FLD Ex230nm, Em450nm
分析時間	23.50分

表4 HPLC分析における移動相のグラジエント

時間 (分)	移動相 A:B (v/v/v)
0	96 : 4
1.50	96 : 4
3.50	88.5 : 11.5
14.00	50 : 50
15.00	40 : 60
15.01	0 : 100
19.50	0 : 100
19.51	96 : 4
23.50	96 : 4

3 脂溶性色素分析

(1) 脂溶性色素分析用サンプルの調製

脂溶性色素分析の前処理方法については、島田ら⁹⁾の方法を参考に次のように行った。冷凍保管したウニを冷水解凍し、約3gを50ml遠沈管に精秤した。その遠沈管にアセトン15 mlを加えてガラス棒でホモジナイズした後、遠心分離 (0°C・21,100×g・5分) し、上澄みを採取した。同様に上澄み採取の操作を合計3回繰り返した。上澄みをナスフラスコに回収し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した後、乾固したものをヘキサンに転溶させ、

0.45 μ mシリンジフィルターで濾過し不溶画分を除去した。ヘキサン可溶画分を再度ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、乾固したものを1mlメスフラスコにtert-ブチルメチルエーテル（以下、MTBE）で定容し、ウニ脂溶性抽出物（HPLC分析サンプル）を得た。

(2) HPLC分析

アジレント・テクノロジー株式会社製（Agilent 1260 Infinity series）を用いた。分析条件は表5のとおりとした。エキネノン及び β -カロテン標品はcarotenatureから購入し、エキネノン標品はトランス型であり、構造式を図1に示した。

なお、定量分析した結果はKruskal-Wallis検定後、有意差がある場合には2群ずつを比較するためPost-hoc検定及びSteel-Dwassの多重比較を行った。双方とも、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

表5 脂溶性色素分析におけるHPLC条件

カラム	YMC Carotenoid(4.6*250mm*5 μ m)
カラム温度	25 $^{\circ}$ C
サンプル温度	5 $^{\circ}$ C
移動相	移動相A) MTBE 移動相B) メタノール 移動相C) 水
	A:B:C = 30:66:4(v/v/v)
移動相流量	1.0ml/min
検出器	DAD sig:460.0nm;10nm, Ref:off
分析時間	40分

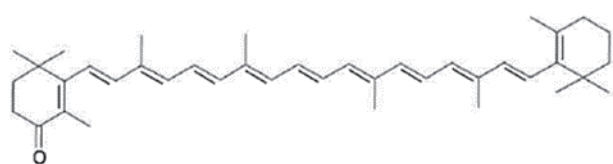


図1 エキネノン標品（トランス型）の構造式

(3) ウニ脂溶性抽出物におけるエキネノン光学異性体存在についての検討

(2) でサンプルを分析したところ、エキネノン及び β -カロテン標品とは異なるピークを示したことから、エキネノン光学異性体の存在について検討した。

結果

1 遊離アミノ酸分析

遊離アミノ酸定量分析の結果を表6及び図2に示した。全ての試験区において、甘味を呈するGlyが最も多く、次に苦味を呈するArgが多かった。肥育前に比べ肥育試験後では、Glyを除くすべての遊離アミノ酸で含有量が有意に増加した。次に、実験区と対照区を比較すると、実験区では遊離アミノ酸の含有量の合計が対照区に比べて有意に多かった。各遊離アミノ酸成分においては、甘味を呈するSer,Thr,Alaが有意に多かったが、苦みを呈するTyr,Val,Met,Phe,Ile,Leuも有意に多かった。対照区では旨味を呈するGluだけが有意に多かった。

表6 遊離アミノ酸定量分析の結果（肥育前区n=21, 実験区n=15, 対照区n=15, mean \pm sd, 異なるアルファベットは試験区間で有意差があることを示す ($p < 0.05$))

(mg/100g)	肥育前区	実験区	対照区
Asp	1 \pm 1 a	10 \pm 7 b	6 \pm 4 b
Glu	80 \pm 27 a	120 \pm 33 b	165 \pm 32 c
Ser	37 \pm 24 a	263 \pm 72 b	182 \pm 77 c
His	7 \pm 7 a	87 \pm 18 b	47 \pm 17 c
Gly	1,429 \pm 196 a	1,089 \pm 147 b	1,152 \pm 185 b
Thr	13 \pm 13 a	341 \pm 80 b	125 \pm 57 c
Arg	243 \pm 108 a	548 \pm 76 b	521 \pm 86 b
Ala	199 \pm 59 a	265 \pm 54 b	116 \pm 45 c
Tyr	52 \pm 33 a	536 \pm 96 b	309 \pm 95 c
Val	85 \pm 37 a	442 \pm 123 b	275 \pm 89 c
Met	15 \pm 9 a	111 \pm 23 b	77 \pm 28 c
Phe	13 \pm 8 a	182 \pm 46 b	131 \pm 52 c
Ile	31 \pm 18 a	256 \pm 57 b	161 \pm 59 c
Leu	36 \pm 22 a	481 \pm 107 b	296 \pm 109 c
Lys	142 \pm 70 a	218 \pm 52 b	215 \pm 41 b
Pro	2 \pm 2 a	72 \pm 21 b	30 \pm 16 c
合計	2,385 \pm 406 a	5,019 \pm 685 b	3,809 \pm 724 c

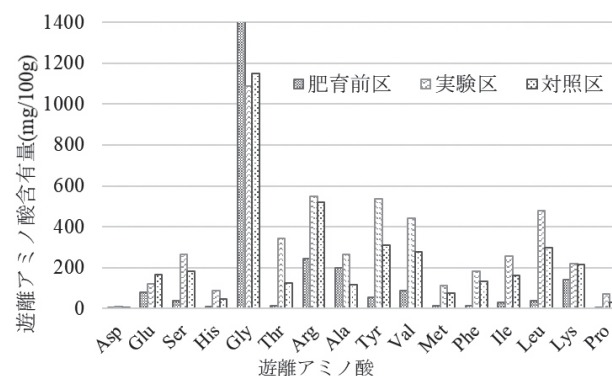


図2 遊離アミノ酸分析の結果

2 脂溶性色素分析

(1) ウニ脂溶性抽出物におけるエキネノン光学異性体存在についての検討

サンプルをHPLC分析に供したところ、図3のクロマトグラムが得られた。ここで、得られたクロマトグラムの主要なピークうち、リテンションタイム（以下、RT）が17.109, 20.276, 30.822をそれぞれピークA、ピークB、ピークCとした。サンプルと標品のRTを比較した（表7）ところ、ピークAはエキネノン標品、ピークCはβ-カロテンのRTと合致したため、ピークAはエキネノン、ピークCはβ-カロテンと推定した。最も大きなピークBは標品とは合致しなかったが、過去の報告^{6,7)}や本分析のピークB及びエキネノン標品（トランス型）の吸収スペクトル（図4及び図5）から、ピークBをシス型エキネノンであると類推し、定量分析を行った。なお、ピークBの定量分析では、便宜的にエキネノン標品で作成した検量線を用い定量した。

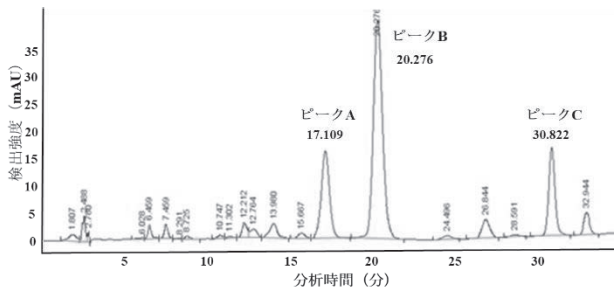


図3 ウニ脂溶性抽出物をHPLC分析に供した結果

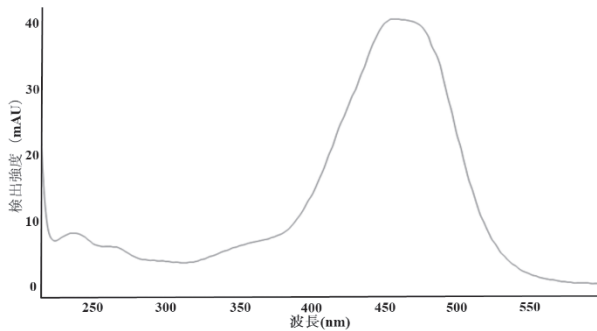


図4 ピークBの吸収スペクトル

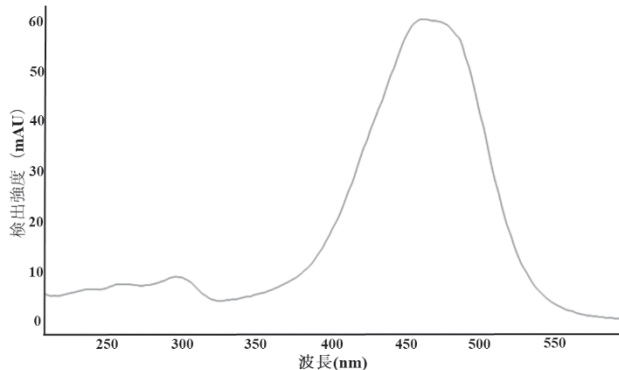


図5 エキネノン標品（トランス型）の吸収スペクトル

表7 ウニ脂溶性抽出物のRTとカロテノイド標品とのRT合致について

	RT	標品との合致
ピークA	17.109	エキネノン標品
ピークB	20.276	合致なし
ピークC	30.822	β-カロテン標品

(2) 脂溶性色素定量分析の結果

色素定量分析の結果を表8及び図6に示した。肥育前区と実験区を比較すると、全ての色素成分において、肥育前区の方が有意に多かった。実験区と対照区を比較すると、対照区の方がトランス型エキネノン・エキネノン合計・β-カロテンが有意に多かった。肥育前区と対照区を比較すると、全ての色素成分において有意差はなかった。

表8 脂溶性色素の定量分析の結果（肥育前区n=5, ノリ飼料区n=15, マコンブ区n=15, mean±sd, 異なるアルファベットは試験区間で有意差があることを示す (p<0.05)）

(µg/100g)	肥育前区	実験区	対照区
トランス型エキネノン	214 ± 192 a	52 ± 24 b	119 ± 56 a
シス型エキネノン	1244 ± 1227 a	302 ± 202 b	827 ± 478 ab
エキネノン合計	1459 ± 1413 a	354 ± 225 b	946 ± 533 a
β-カロテン	449 ± 441 a	145 ± 56 b	338 ± 156 a

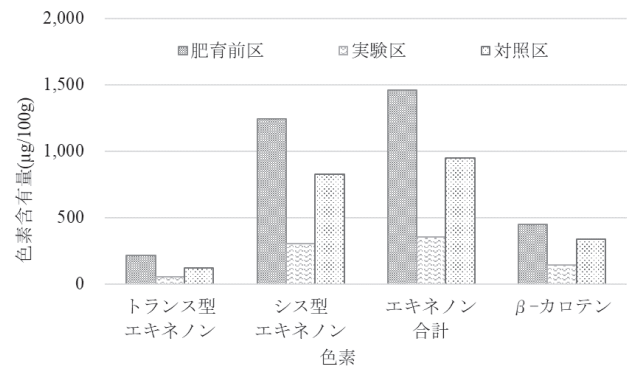


図6 脂溶性色素分析の結果

考 察

1 遊離アミノ酸分析

遊離アミノ酸分析の前処理方法(抽出方法)は75%v/vエタノール還流抽出法やトリクロロ酢酸法が知られている⁸⁾が、本分析ではトリクロロ酢酸法で行った。本報では報告していないが肥育試験前後のウニ200サンプル余りを分析しなければならないため、より簡便な前処理方法が必要であった。そこで、ウニ生殖巣は水分が多く、脂質含量が少ないことから、トリクロロ酢酸法が最適であると考えた。ホモジナイズについては、ウニ生殖巣がもろく細切しやすいことから、ホモジナイザーではなくガラス棒を使用することで、短時間かつ簡易的に前処理を行うことができた。今後ウニ以外の水産物への応用も検討することで、エタノール還流抽出法より時間が短く、作業工程の少ない前処理を行うことができると考えられる。

HPLC分析における課題として、分析によるカラム劣化の軽減が挙げられる。上記方法で抽出した分析サンプルは精製度合いが低く、目的とする物質以外の水溶性物質も抽出され、夾雑物としてカラムに詰まることが考えられる。ガードカラムやカラムの交換は高額であるため、夾雑物の詰まりが原因となる故障に対しては短時間かつ安価に夾雑物を除去する方法が必要である。また、移動相における水層がカラム内のシリカゲルの劣化を引き起こすため、分析回数が増えることでカラム内圧が上昇し、故障することが多々あった。水層使用によるシリカゲルの劣化については、本分析で使用したカラムではなく、シリカゲルの親水性がより向上したアジレント・テクノロジー株式会社製 Proshell HPH-C18(3*100mm*2.7 μ m)を用いることで、内圧が上昇しにくくなり、分析可能回数が多くなったため、ここで新メソッドとして報告する。条件は表9のとおりであり、移動相のグラジエントについて表4と変更はない。

遊離アミノ酸分析の結果について、対照区において旨味を呈するGluだけが有意に多く、苦味を呈するTyr,Val,Met,Phe,Ile,Leuが有意に少なかった。対照区でコンブを給餌したことで、コンブに含まれるGluがウニ生殖巣内に蓄積したことが考えられる。また、苦味を呈する各アミノ酸も減少したことから、実験区よりも苦味が少なく食味が改善されることも考えられる。吾妻らの報告⁹⁾では固形飼料はタンパク質が20%と豊富であり、ウニの身入りを改善する効果がある。以上のことから、固形飼料を与え生殖巣を肥大化させた後、マコンブを与え

ることで食味を改善する効果があると期待される。

表9 遊離アミノ酸分析における新メソッド

カラム	Agilent Poroshell HPH-C18(3.0*100mm*2.7 μ m)
ガードカラム	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18(3.0*5mm*2.7 μ m)
カラム温度	40°C
サンプル温度	5°C
移動相	グラジエント分析 A) 10mM 四ホウ酸ナトリウム・リン酸水素二ナトリウム水溶液(pH8.2) B) アセトニトリル/メタノール/水(4.5:4.5:1)
移動相流量	0.7ml/min
検出器	DAD 338.0nm;10nm, Ref390nm;20nm FLD Ex230nm, Em450nm
分析時間	23.50分

2 脂溶性色素分析

脂溶性色素の前処理方法については、試料の状態により千差万別であるが、本分析では島田ら⁶⁾の方法を参考に一部改変した。ウニ生殖巣は水分が豊富であるため、親水性のあるアセトンで抽出した。アセトンを用いることで、塩等の水溶性物質も一緒に抽出される。本分析では水溶性物質は不要であるため、分画する必要があり、それら水溶性物質を排除するためアセトン抽出物をエバポレーターで乾固した後、ヘキサンに転溶させることで脂溶性物質だけを得る方法に改変した。簡易的な方法であるものの、カロテノイド類と思われる黄色や橙赤色の色素成分の残りは確認されず、水溶性物質と考えられる白い結晶だけを排除することができたため、有効な方法であると考えられる。

ウニの主要な脂溶性色素はエキネノン及び β -カロテンである¹⁰⁾ことから、本分析ではピークBがエキネノン光学異性体であることを検討した。Rachelら⁷⁾の報告によれば、ヨーロッパムラサキウニの脂溶性色素を逆相カラムを用いたHPLC分析に供した結果、エキネノンにはシス型及びトランス型両光学異性体が存在し、RTにおける検出順についてはトランス型、次いでシス型エキネノンが確認された(図7)。また、島田ら⁶⁾の報告でも、ウニ塩辛に含まれる脂溶性色素において、シス型及びトランス型両光学異性体の存在について報告されている。以上から、今回のウニ脂溶性抽出物中にもエキネノン光学異性体が混在していると考えられた。本分析のピークB及びエキネノン標品(トランス型)の吸収スペクトルを図4及び図5に示し比較した結果、ピークBは標品同様460nm付近に極大吸収があり、エキネノンであると考えられる。また、図3及び図7よりエキネノンの検出順序か

ら、ピークBはシス型エキネノンであることが考えられる。以上のことから、本分析においてもウニ脂溶性抽出物中にはエキネノン光学異性体の存在が示唆され、ピークBをシス型エキネノンであると類推した。なお、ピークBを推定するために複数社からエキネノン標品を購入したが、標品でありながら光学異性体と考えられる複数のピークが確認されるものがあり、標品として使用できないものであった。同定のためには分画スキームを見直すだけでなく、質量分析等の当実験施設には無い分析機器も必要であることから、今後シス型エキネノンの正確な定量を行うためには、単離・精製法の確立が必要である。

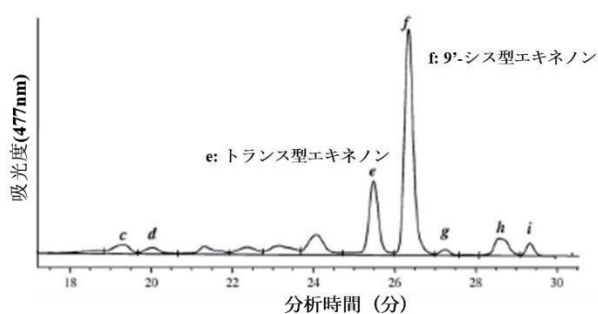


図7 Rachelら⁷⁾のウニ脂溶性色素HPLC分析の結果

脂溶性色素の定量分析について、標準偏差の値が大きくなり個体間のバラつきが大きい結果となった。この理由について、本分析に供したウニは見た目でも色味が大きく違うものもあり、個体差によるものであると考えられる。また、本分析では各個体における色素含有量を定量するため、抽出に用いたサンプルの量が少ないことも原因であると考えられる。日本食品標準成分表2015年版(七訂)¹¹⁾によれば、ウニ生殖巣は水分が約74%であり、脂質は4.8%と少なく、色素を十分抽出するためには、肥育したウニを個体ごとではなく、試験区ごとにプールし抽出することも必要である。

ウニ色素定量分析の結果について、肥育前区と実験区を比較すると、全ての色素成分の含有量は、実験区の方

が有意に少なく、固形飼料を給餌することで色素成分の含有量が減少することがわかった。その原因について、吾妻らの報告⁹⁾では固形飼料は生殖巣の肥大化を促進するとされているが、色素の生合成に関与する成分の含有量が少なく、生殖巣単位重量あたりでは減少したと考えられる。一方、色素含有量は少なくなったものの、固形飼料は明度を上昇させるとの報告もある⁹⁾ことから、色素含有量だけで色味の良さを一概に判断するべきではないと考えられる。今後色素の生合成や餌中の色素の蓄積等について詳細な研究が望まれる。

要約

東北大学が肥育したウニについて、遊離アミノ酸及び脂溶性色素の定量分析を行った。

- 1) 遊離アミノ酸分析について、前処理方法及び定量方法を検討した。分析結果について、全ての試験区において甘味を呈するGlyが最も多く、肥育前に比べ肥育試験後ではGlyを除くすべての遊離アミノ酸で含有量が有意に増加した。実験区と対照区を比較すると、対照区において旨味を呈するGluだけが有意に多く、苦味を呈するTyr,Val,Met,Phe,Ile,Leuが有意に少なかった。
- 2) 脂溶性色素分析について、前処理方法及び定量方法を検討した。ウニ脂溶性抽出物において、エキネノン光学異性体の存在が示唆された。分析結果については、全ての色素において、固形飼料を給餌した実験区で肥育前区と比べ有意に減少した。

謝辞

ウニサンプルの提供にあたり東北大学吾妻教授・猪股助教、遊離アミノ酸分析の手法指導にあたり国立研究開発法人水産研究・教育機構村田博士、各位より多大な御協力をいただいた。ここに厚く御礼申し上げます。

なお、本研究は「食料生産地域再生のための先端技術展開事業のうち現地実証研究委託事業(農林水産技術会議) 宮城県・水産業分野「異常発生したウニの効率的駆除及び有効利用に関する実証研究」により実施した。

参考文献

- 1) 吾妻行雄・遠藤光・高木聖実・堀越彩香・猪股英里・青木優和(2018) 志津川湾における地震後のアラメ群落の動態と新たな保全技術, 日本水産学会誌, **84** (6), 1074-1077.
- 2) 農林水産省(2021) 海面漁業生産統計調査, 令和元年漁業・養殖業生産統計確報
- 3) 農林水産省(2021) 海面漁業生産統計調査, 令和元年漁業産出額確報
- 4) 農林水産技術会議(2021) 食料生産地域再生のための先端技術展開事業, 農林水産技術会議ウェブサイト

https://www.affrc.maff.go.jp/docs/sentan_gijyutu/sentan_gijyutu.htm

- 5) 猪股英里 (2015) ウニ類の摂食、消化吸収および体部位への物質配分に関する研究, 博士論文, 東北大学
- 6) 島田和子・西山琴代・真木佐知子 (1990) うに塩辛の熟成貯蔵中におけるカロテノイドの消長について, 日本食品工業学会誌, **37** (9), 702-708.
- 7) Rachel C.Symonds, Maeve S.kelly, Catherine Caris-Veyrat and Andrew J.Young (2007) Carotenoids in the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Occurrence of 9'-cis-echinenone as the dominant carotenoid in gonad color determination, *Comparative Biochemistry and Physiology, PartB* 148, 432-444.
- 8) 中村洋監修 (2002) 分析試料前処理ハンドブック, 708-710, 丸善 (株), 東京
- 9) 吾妻行雄・猪股英里・細田俊輔・前田航平・堀拓磨・垂水裕樹・紺野智太 (2021) ウニ短期畜養における高タンパク質飼料の有効性, 日本水産学会誌, **87** (6), 694.
- 10) Yukio Agatsuma, Minoru Sato and Kazuya Taniguchi (2005) Factors causing brown-colored gonads of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus* in northern Honshu, Japan, *Aquaculture*, (249), 449-458.
- 11) 文部科学省 科学技術・学術審議会, 資源調査分科会 (2015) 日本食品標準成分表2015年版 (七訂), 148-149, 全国官報販売協同組合, 東京都