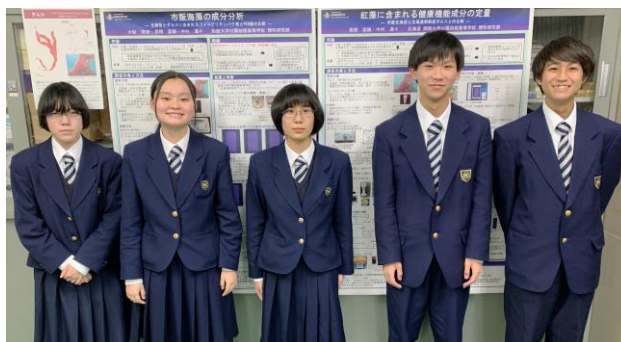


北海道南部産ダルスに含まれる健康機能成分の傾向

— 3ヶ年のデータからPE・PEB含有量の変化要因を探る —

函館大学附属柏稜高等学校 理科研究部
Hakodate Univ. HAKURYO High School Science Club

3年 高橋 菜楠 中村 凜々
2年 佐々木 泰斗 田辺 秀
1年 澤山 ゆき子



【はじめに】

本研究部は、2011年より食品や飲料中に含まれる微量成分の定量法について検討してきた。その中でターゲットとなる成分の蛍光や発色強度を利用して定量するオリジナル法「Hakuryo method」を確立させた¹⁾。

2017年からは、紅藻の一種である「ダルス」に含まれる成分分析に着手することにした。北海道南部産ダルスは昆布の養殖ロープに繁茂し、光を遮ることから廃棄されていた。しかし近年、ダルス内の主要フィコビリタンパク質であるフィコエリスリン (PE) 及び、その色素成分フィコエリスロビリン (PEB) に①血圧、血糖値上昇抑制作用 ②老化原因物質の消去 といった健康機能性が示唆され²⁾、スーパーフードとして注目されるようになった。さらに PEB は紫外線によって蛍光を示すため、測定ターゲットとして最適であると考えた。これまでの研究によって色素を簡便に単離する独自の手法を考案することで Hakuryo method を用いた相対的定量を可能にし、海面水温との相関性を明らかにした³⁾。

本研究では、2020年1, 2, 3月のダルス試料を用いてPE及び、PEB含有量の経月調査を実施する。これより、2018年から3ヶ年分のデータが蓄積され、長期的な視点でダルスに含まれる健康機能成分の傾向を明らかにすることができる。さらに、本研究の結果と北海道大学臼尻水産実験所によるダルス採取地点の詳細な沿岸観測データを比較することで、その変化の要因を探る。

写真提供
北海道大学 安井 肇 先生



図1. 海中のダルス

【ダルス (*Palmaria palmata*)】

ダルスは紅藻の一種で、ダルス目ダルス科に分類される。高さは5~30 cmで北海道、本州北部太平洋岸に分布する(図1)。体は膜状で、形はくさび形や扇形、帯形など様々である。

【フィコビリタンパク質】

フィコビリタンパク質は、シアノバクテリアや灰色藻、紅藻、クリプト藻などの真核藻類に広く含まれており、光エネルギーの捕集や光適応など、光合成に関わる様々な機能を持つ。ダルスに含まれる主要成分はPEで、その色素は赤色の蛍光を示すPEBである²⁾。

【薄層クロマトグラフィー (TLC)】

薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography : TLC) は、ガラスやアルミニウムシートにシリカゲルを薄く塗布したプレートを用いて行うクロマトグラフィーである。試料をスポットし、プレート下部を展開溶媒に浸すことで、シリカゲルへの吸着能の差により混合物を分離・同定する方法である。

【ImageJ】

アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で開発されたオープンソースで、パブリックドメインの画像処理ソフトウェアである。http://imagej.nih.gov/ij/よりダウンロードすることができる。画像処理及び解析機能が豊富であり、主に医用や生化学の分野で活用されている。

【Hakuryo method】

①ターゲットをTLCで展開

ターゲットに合わせた展開溶媒を用いて、複数成分の中から分離させる。

②スポットの蛍光を画像記録

TLCによって得られたスポットに、開発したオリジナル定量装置を用いてUV照射を行い、スポットの蛍光をカメラで記録する。

③ImageJでの画像解析

ImageJによって画像ファイルをグレースケール化し、Image>Adjust>Thresholdで画像調整する。スポットのグレー値を同条件で解析できるように環境を整え、測定する。その際、この定量装置において最も有効なMean Gray Value（選択枠内の平均グレー値）を用いて解析する。

④検量線による定量

グレー値をもとに標準検量線を作成し、その関係より定量する。また、試料に含まれる成分は多様であるため、標準添加法を用いて定量を行う場合もある。

【実験方法】

試料調製 ダルス上清試料

北海道大学臼尻水産実験所で採取後、凍結乾燥、超高速粉碎処理して頂いたダルス葉体（2020年1月14日、2月13日、3月17日 北海道函館市臼尻）微粉末を試料とした（図2）。試料1gを4℃の暗所で一晩20mLの水に浸漬させた。その後、3000rpmで10分間遠心分離し、その上清を用いた。

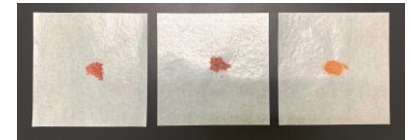


図2. ダルス葉体 微粉末試料
(2020年1, 2, 3月 北海道函館市臼尻)

実験Ⅰ Hakuryo method を用いた PEB 測定

オリジナルプロトコルに従い、色素成分を単離する³⁾。アセトンによる加溶媒沈殿を行うが、試料によって条件が異なる場合があるため、再検討した。その後、Hakuryo methodを用いてグレー値を測定した。TLCの展開溶媒は、昨年度の研究と同様、最も良好なスポットが観測されるメタノールを用いた。展開槽内部は、展開溶媒の蒸気で飽和させた。薄層プレートは、端から10mmの位置を原点とし、そこに各月のPEBをキャピラリーで4μLずつスポットした。また、TLCは実験時の温度や湿度等の外的要因による影響が想定されるため、全ての実験を10回繰り返し、平均化したデータを数値として用いた（n=10）。

実験Ⅱ Hakuryo method を用いた PEB 検量線

各月のグレー値では、相対的な定量比較ができないため、色素抽出が最も良好であった2月ダルス試料のPEBを用いて、検量線を作成した。TLCへの滴下量を1, 2, 3, 4μLと変え、実験Ⅰと同様にHakuryo methodを用いてPEB量とグレー値の関係を調査した。

【実験結果】

実験Ⅰ 採取年によりダルスの組成は異なる可能性があるため、沈殿条件を再調査したところ、アセトン添加を第2工程時は75%に調製すると沈殿することが分かった。これより、2020年度ダルス試料用の色素単離プロトコルを完成させることができた（図3）。

アセトンによる加溶媒沈殿によって1, 2, 3月それぞれ118, 148, 103mgの乾燥試料を採取することができた。

これより、重量比は最も量の多い2月を基準とすると0.80:1:0.70となり、乾燥試料をPEとみなすと経月変化は2月>1月>3月であることが分かった。

その後、加メタノール単離反応を行い、色素成分を用いてTLCを行った結果、全月のプレートにおいて、良好なPEBの赤い蛍光スポットを確認することができた（図4）。

合わせて各月のRf値を10回測定し、平均値を示した（表1）。表にはAVE:全月の平均値、SD:標準偏差、CV:変動係数の結果も合わせて示した。AVEに対するCVは0.06%と極めて良好で、分離に成功していると判断できる。

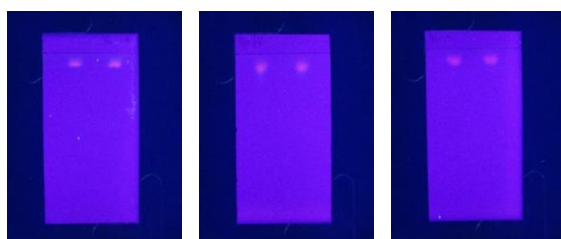


図4. PEBのTLC画像（1, 2, 3月 4μL）

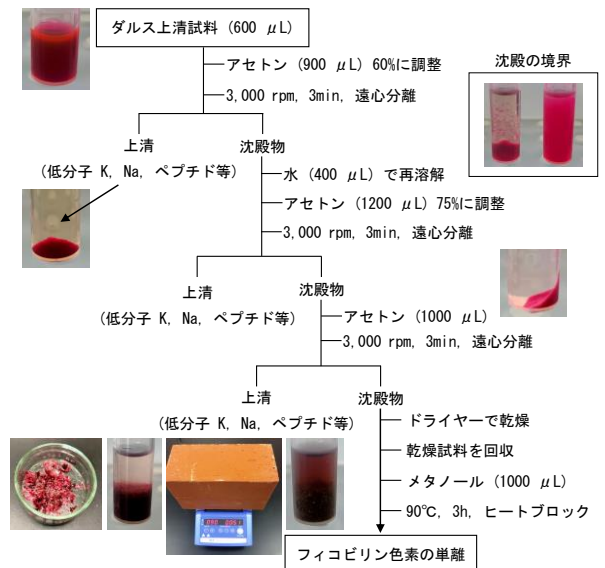


図3. 色素成分PEB単離のプロトコル（2020年）

表1. PEBのRf値（n=10）（1, 2, 3月 4μL）

	a (cm)	b (cm)	Rf
1月	7.58	8.00	0.95
2月	7.58	8.00	0.95
3月	7.59	8.00	0.95
AVE	7.58	8.00	0.95
SD	0.00	0.00	0.00
CV (%)	0.06	0.00	0.06

さらに、各月のMean Gray Valueを10回測定した平均値をMean AVEとして示した(表2)。結果、164.35, 166.48, 163.28となり、2020年におけるダルス内PEB量の経月変化は、PEと同様に2月>1月>3月となった。

実験Ⅱ 実験Ⅰと同様に赤い蛍光スポットが観測され、Rf値よりPEBと同定した。

さらに、求めたMean AVEのCVは0.9%以内であり、安定した値が得られた(表3)。その値を用いて作成した検量線は、決定係数R²も0.9981と良好であったため、定量に用いることができると判断した(図5)。

表2. PEBのMean Gray Value (n=10) (1, 2, 3月 4 μL)

month	1	2	3
Mean AVE	164.35	166.48	163.28
SD	1.22	1.45	1.53
CV (%)	0.74	0.87	0.94

表3. PEBのMean Gray Value (n=10) (2月 1, 2, 3, 4 μL)

(μL)	1	2	3	4
Mean AVE	157.59	160.76	163.86	166.48
SD	0.77	1.07	1.10	1.45
CV (%)	0.49	0.67	0.67	0.87

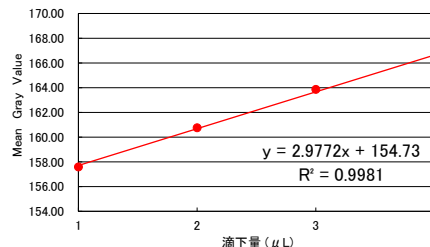


図5. 2月PEB滴下量とMean Gray Valueの関係 (n=10)

【考察・結論】

実験Ⅱで得られた検量線 $y = 2.9772x + 154.73$ に表2のMean AVEをそれぞれ代入し2月のPEB滴下量に換算すると、3.23, 3.95, 2.87 μLとなる。これより、PEB量比は0.82:1:0.73となり、ダルス内に含まれるPE、PEB量の3ヶ年の推移が明らかとなった。

これらの結果をもとに含有量に変化する要因を考察していたところ、函館市臼尻地区で昆布養殖を行っている方から話を聞く機会を得た。その方から、①海藻は1月から本格的に成育するが12月の気象状況が重要 ②海藻に必要な養分が循環するためにはある程度の波が必要 という経験に基づく助言を頂いた。

そこで昨年は実施していなかった12月分の海面水温についても調査することにした。これまでは、気象庁のHPを参考にしていましたが、今年度からは臼尻水産実験所と連携していたため、ダルス採取地点の詳細な沿岸観測データを頂くことができた。そこから各年の12~3月の平均海面水温を求め、そのグラフをPE、PEBの経月変化に重ねた(図6, 7, 8)。

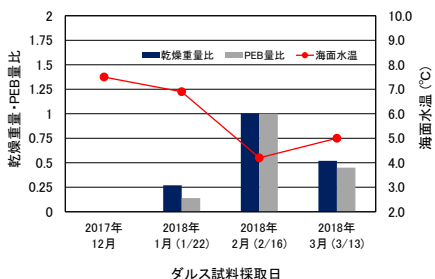


図6. 2018年冬期のPE, PEBの経月変化(2018年2月基準)と平均海面水温

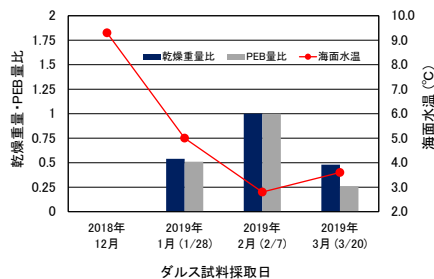


図7. 2019年冬期のPE, PEBの経月変化(2019年2月基準)と平均海面水温

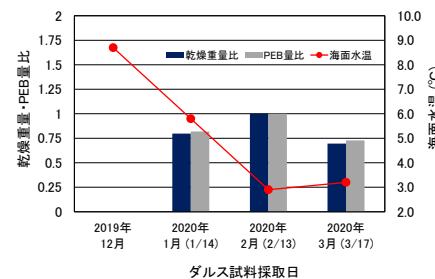


図8. 2020年冬期のPE, PEBの経月変化(2020年2月基準)と平均海面水温

その結果、2018年の傾向は他年と明らかに異なり、12~1月の海面水温の変化が-0.6°Cと著しく小さいことが分かった。さらに、1月のPE、PEB量も極端に少ないため、海波の状態も調べた。沿岸観測データでは海波の状態を6段階で記録しているが、その中から波の無い状態(aaとa)である凪日数をカウントしたところ、12月が13日と突出して多いことが明らかとなった(図9)。

これより2018年初冬は海面水温の低下が鈍く、さらには凪の日数も多いという条件が重なり、健康機能成分PE、PEBも形成されなかったと考えられ、昆布養殖を行っている方の経験則を裏付ける結果となった。3ヶ年の研究より、海面水温ならびに海波の状態がダルス内の組成に大きな影響を与え、特に初冬(12~1月)の気象状況がダルスの成育状況を決定付ける要因の一つであると結論付ける。

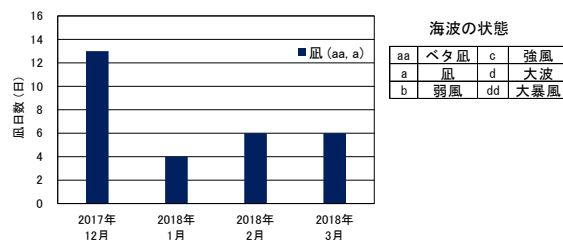


図9. 2018年冬期の凪日数

【参考文献】

- 第55回全道高校理科研究発表大会(2016) ビタミンCの定量
- 岸村 栄毅(2015) ダルスのタンパク質成分について, 第305号北大同窓会誌 親潮, p5-6
- 第58回全道高校理科研究発表大会(2019) 北海道南部産ダルスに含まれるフィコビリタンパク質とPEBの定量

【受賞にあたって】

この度は日本化学会北海道支部奨励賞という名誉ある賞を頂くことができ、部員一同大変嬉しく思っております。今後もこの受賞を励みに、なお一層研究に邁進していきたいと考えております。有難うございました。