

北海道南部産ダルス内の健康機能成分量に環境が与える影響

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

3年 佐々木 泰斗 田辺 秀
2年 澤山 ゆき子
1年 高橋 柚花 福田 莉央



【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を進め、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ピリン (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り、色素を簡単に単離する独自の手法を考案し、Hakuryo method を用いた相対的定量を可能にした。さらに3カ年の継続的調査の結果、海面水温ならびに海波の状態がダルス内の PE、PEB 含有量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組成、成育状況を決定付ける要因であることを明らかにした³⁾。

今年度は、これまでの採取地点である臼尻港近場に加えて、臼尻港から約900m沖合の昆布養殖地の外側を囲むロープとその内側で昆布と共にロープに繁茂するダルスについてもサンプリングして実験に用いた。本研究は、異なる3地点で採取したダルスに含まれる PE、PEB 量を明かし、生育環境がダルスの健康機能成分量に与える影響を調査することで、ダルスの生育に適する環境についても考察する。

【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。



図1. 海中のダルス

【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、その色素である PEB は赤色の蛍光を示す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。スポットのグレイ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イ値）を用いて解析する。

④検量線による定量

グレイ値をもとに検量線を作成し、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 ダルス葉体微粉末・上清試料

北海道大学臼尻水産実験所と昆布養殖を行っている方に依頼し、2021年3月のほぼ同じ日程で北海道函館市臼尻港付近の3地点でダルス葉体を採取して頂いた（図2）。葉体は北海道大学水産科学研究所で凍結乾燥、超高速粉碎処理により微粉末化して頂き、それを試料とした（図3）。試料1gを4℃の暗所で一晚20mLの水に浸漬させた。その後、3000rpmで10分間遠心分離し、その上清を実験に用いた。

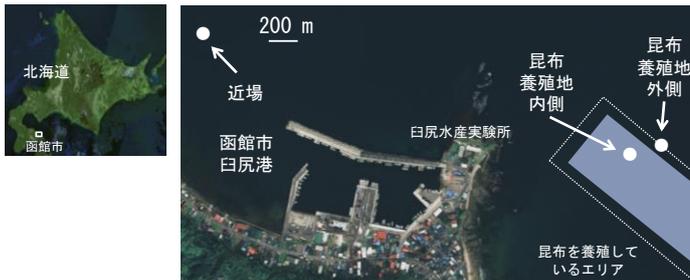


図2. ダルス葉体採取場所（北海道函館市臼尻港付近）
（臼尻港近場 北緯41.94度, 東経140.94度 2021年3月25日,
昆布養殖地外 北緯41.94度, 東経140.96度 2021年3月25日,
昆布養殖地内 北緯41.94度, 東経140.96度 2021年3月23日）

国土地理院ウェブサイト
(<https://maps.gsi.go.jp>) 編集

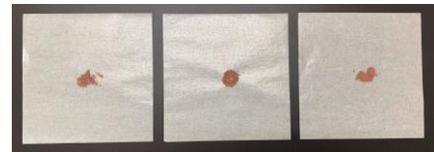


図3. ダルス葉体 微粉末試料
（左: 臼尻港近場, 中央: 養殖地外, 右: 養殖地内）

実験 I Hakuryo method を用いた PEB 測定

オリジナルプロトコールに従い、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Mean Gray Valueを測定した。TLCの展開溶媒は、これまでの研究と同様、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、そこに各地点の色素成分をキャピラリーで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

相対的な定量比較を実施するため、臼尻港近場で採取したダルスに含まれる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Mean Gray Value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、アセトン添加量を第1工程時は50%、第2工程時は60%に調製すると沈殿することが分かった。これより、2021年度ダルス試料用の色素単離プロトコールを完成させることができた（図4）。

アセトンによる加溶媒沈殿によって臼尻港近場、養殖地外、養殖地内それぞれ98, 112, 85mgの乾燥試料を採取できた。臼尻港近場を基準とすると1:1.14:0.87となり、乾燥試料をPEとみなすと養殖地外>臼尻港近場>養殖地内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、全て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5）。

合わせて各地点のRf値を10回測定し、平均値を示した（表1）。表にはAVE:全地点の平均値、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。

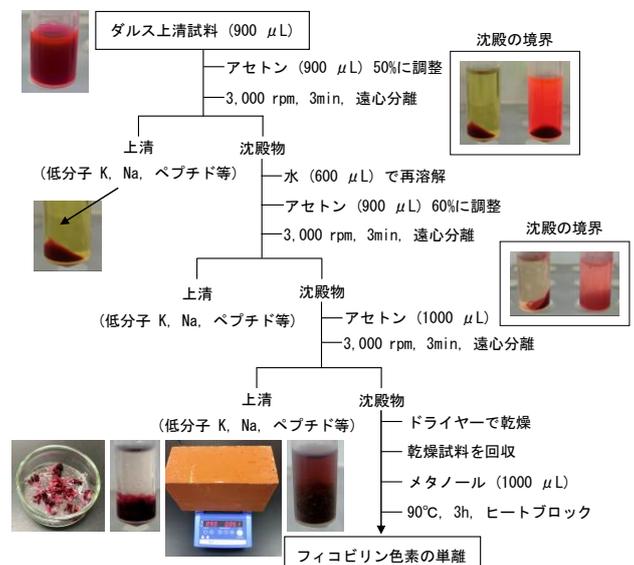


図4. 色素成分PEB単離のプロトコール（2021年）

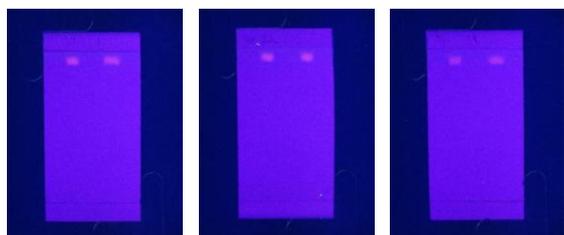


図5. PEBのTLC画像(4 μL)
(左: 臼尻港近場, 中央: 養殖地外, 右: 養殖地内)

表1. PEBのRf値(n=10)
(臼尻港近場, 養殖地外, 養殖地内 4 μL)

	a (cm)	b (cm)	Rf
臼尻港近場	7.50	8.00	0.94
養殖地外	7.50	8.00	0.94
養殖地内	7.49	8.00	0.94
AVE	7.50	8.00	0.94
SD	0.00	0.00	0.00
CV (%)	0.06	0.00	0.06

表2. PEBのMean Gray Value(n=10)
(臼尻港近場, 養殖地外, 養殖地内 4 μL)

point	nearby	outside nursery	inside nursery
Mean AVE	162.49	164.08	160.77
SD	0.55	0.78	0.66
CV (%)	0.34	0.48	0.41

さらに、各地点の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、162.49, 164.08, 160.77となり、3地点の比較の結果、PEB含有量もPEと同様、養殖地外>臼尻港近場>養殖地内となった。

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0.8%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0.9972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6)。

表3. PEBのMean Gray Value(n=10)
(臼尻港近場 1, 2, 3, 4 μL)

(μL)	1	2	3	4
Mean AVE	153.36	156.78	159.77	162.49
SD	0.60	1.23	1.23	0.55
CV (%)	0.39	0.78	0.77	0.34

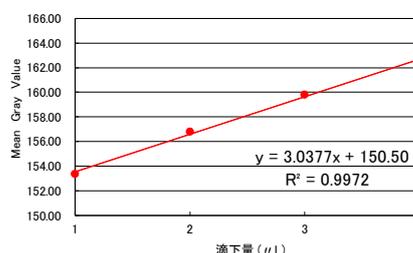


図6. PEB滴下量とMean Gray Valueの関係(n=10)(臼尻港近場)

【考察・結論】

実験Ⅱで得られた検量線 $y = 3.0377x + 150.50$ に表2のMean AVEをそれぞれ代入し臼尻港近場のPEB滴下量に換算すると、3.95, 4.47, 3.38 μLとなる。これより、PEB量比は1:1.13:0.86となり、異なる3地点で採取したダルスに含まれるPE、PEB量を相対的に明らかにすることに成功した(図7)。

私達は昨年までの結果やダルスの成長に必要な養分循環の観点から、適度な海波が得られやすい沖合で採取されたダルス内のPE、PEB量が多くなると考えていた。さらに、臼尻水産実験所の方から「例年3月になると近場のダルスは色落ちするが、沖合のものは変化が少ない」という助言も頂いていたため、養殖地内、外共に近場より多くなるとも考えていた。しかし養殖地外に関しては、研究成果や助言を裏付けるものであったが、養殖地内は調査した3地点の中で最も含有量が少なく、その量は外の76%にとどまる結果となった。

そこで、私達は養殖地内のダルスの生育環境に注目した。養殖地内外の位置は200m程しか離れておらず、無機的条件の相違はほとんどない。よって、内の含有量が抑えられた要因として「ダルスと養殖昆布が共存する環境」が挙げられ、ダルスと昆布の相互作用によって海中の養分を取り合い、ダルス内のPE、PEBの形成が進まなかったと考えられる。これは環境要因、取分け生物的要因がダルスに大きな影響を与えることを示唆している。このように、無機的要因に加え、他生物との競合等に代表される生物的要因もダルスの生育や組成に大きく関与することが明らかとなった。

本研究より、環境要因によってダルス内の健康機能成分量に差異が生じることが示され、その含有量より、養分循環が行われ、且つ他の生物との競合がない環境がダルスの成育に適していると結論付ける。

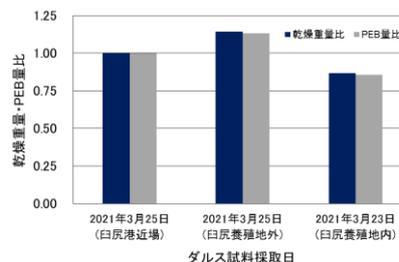


図7. PE, PEB含有量の相対比較(臼尻港近場基準)
(臼尻港近場, 養殖地外, 養殖地内)

【参考文献】

1. 第55回全道高校理科研究発表大会(2016) ビタミンCの定量
2. 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
3. 第45回全国高校総合文化祭 自然科学部門(2021) 北海道南部産ダルスに含まれる健康機能成分

【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。