

生息水深の違いによる北海道南部産ダルスの組成変化

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 柚花 福田 莉央
2年 中村 響



【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「Hakuryo method」を確立させた。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ブに繁茂し、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ルン（PEB）に血圧上昇抑制等の健康機能性が示唆され、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は紫外線照射によって蛍光を示すため、ターゲットとして最適であった。

昨年度の生息水深の異なるダルス（水深0.2, 1.2 m）の調査により、ダルスに届く光強度がPE含有量に影響を及ぼす可能性が示唆された¹⁾。今年度は、サンプリング地点を3点に増やすことで（水深0.2, 1.3, 2.6 m）、生息水深の異なるダルス内のPE, PEB量をより詳細に調査することにした。さらにPEBは、光合成に関わるアンテナ色素という側面を持つことから、中心的役割を担う色素であるクロロフィルa（Chl a）も同時に定量することで、生息水深による光環境の違いにダルスがどのように適応しているか探れると考えた。本研究は、ダルスに含まれる複数成分の定量を実現させることで、生息水深の違いによってもたらされるダルスの組成変化を明らかにすることを目的とする。

【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。

【クロロフィルa (Chl a)】

クロロフィルの一種で、アンテナ及び、光合成の電子伝達反応に直接関わる反応中心として働く色素である。紫外線を照射すると赤色の蛍光を示す。

【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】

実験試料 ダルス採取 微粉末・上清試料

北海道大学白尻水産実験所に依頼し、2023年2月8日に北海道函館市白尻港付近の昆布養殖地、水深0.2、1.3、2.6 m地点のロープに繁茂している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院で凍結乾燥、超高速粉碎処理して頂き、それを試料とした。その試料1gを4°Cの暗所で一晩20 mLの水に浸漬させ、その上清を実験に用いた。



図2. ダルス葉体採取場所（北海道函館市白尻港付近）
（北緯41.94度、東経140.96度 2023年2月8日）

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

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¹⁾。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の展開溶媒には最も良好なスポットが観測されるメタノールを用い、薄層プレートには各水深の色素成分をキャピラリーで4 μL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）。さらに、相対的な定量比較を実施するため、水深2.6 m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, 4 μLと変え、Hakuryo methodを用いてPEB量とグレー値の関係を調査した。

実験 II Hakuryo method を用いた Chl a 測定

ダルス微粉末試料0.5 gに5 mLのエタノールを加え、4°Cの暗所で一晩浸漬することでChl aを抽出した。TLCは、ヘキサン：石油エーテル：アセトン：酢酸エチル=6:3:4:3に酢酸を2%添加したものを展開溶媒とすることにした（図3）。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）。さらに、相対的な定量比較を行うため、水深2.6 mのChl aを用いて検量線を作成した。TLCへの滴下量を1, 2, 3 μLと変え、Hakuryo methodで測定した。

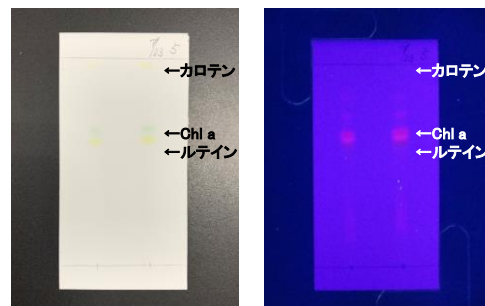


図3. 水深2.6 m採取ダルス内のChl aのTLC画像
（右スポット2 μL, 左スポット3 μL）

【実験結果】

実験 I 新たなプロトコールを用いて水深0.2、1.3、2.6 mで採取した微粉末から、148, 92, 108 mgの乾燥試料を採取することができた（図4）。これより、水深2.6 mを基準とすると1.37:0.85:1となり、乾燥試料をPEとみなすと、水深0.2 m>2.6 m>1.3 m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、全てにおいて良好なPEBの赤い蛍光スポットが確認された（図5）。

さらに、各地点のMean Gray Valueを10回測定した平均値であるMean AVEも求めたが、関係は同様であった（表1）。

次に、検量線に用いる水深2.6 mの1, 2, 3, 4 μLのMean AVEを求めたが、そのCVは0.6%以内であり、安定した値が得られた（表2）。その値を用いて作成した検量線は、決定係数R²が0.9937と良好であった（図6）。この検量線の式に各水深のMean AVEを代入し、水深2.6 mのPEB滴下量に換算すると、5.07, 3.41, 3.90 μLであることからPEB量比は1.30:0.87:1となった。

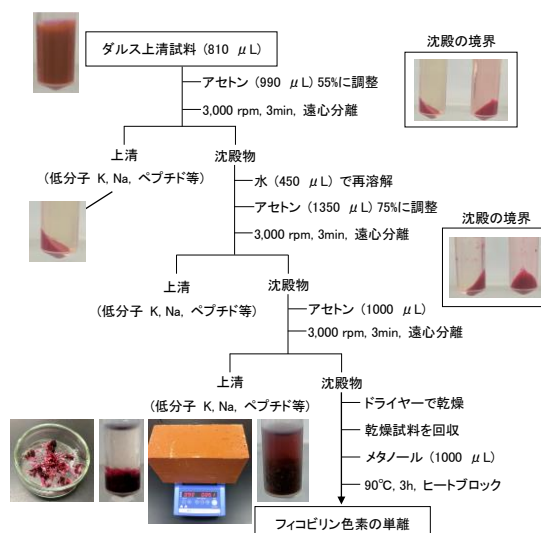


図4. 色素成分 PEB 単離のプロトコール（2023年）

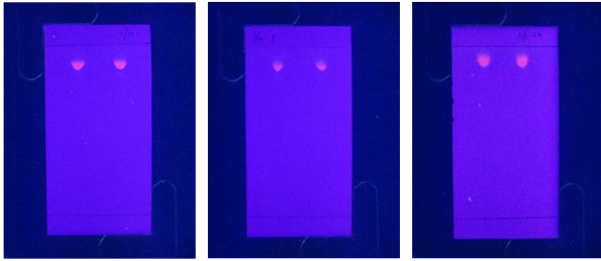


図 5. PEB の TLC 画像 (4 μL)
(左:水深 0.2 m, 中央:水深 1.3 m, 右:水深 2.6 m)

表 2. PEB の Mean Gray Value (n=10)
(水深 2.6 m 1, 2, 3, 4 μL)

(μL)	1	2	3	4
Mean AVE	156.50	159.69	162.64	164.85
SD	0.62	0.95	0.67	0.64
CV (%)	0.40	0.59	0.41	0.39

表 1. PEB の Mean Gray Value (n=10)
(水深 0.2, 1.3, 2.6 m 4 μL)

depth (m)	0.2	1.3	2.6
Mean AVE	168.12	163.48	164.85
SD	0.99	0.66	0.64
CV (%)	0.59	0.40	0.39

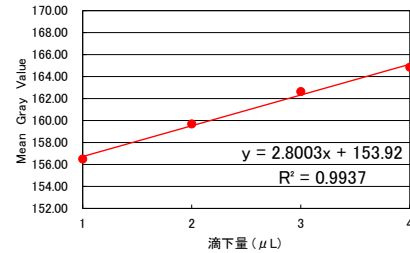


図 6. PEB 滴下量と Mean Gray Value の関係 (n=10)
(水深 2.6 m)

実験 II Hakuryo method によって Chl a の Mean Gray Value を 10 回ずつ測定し、その平均値を求めたところ、水深 1.3 m > 2.6 m > 0.2 m であることが分かった (表 3)。

次に、検量線に用いる水深 2.6 m の 1, 2, 3 μL の TLC から Mean AVE を求めたが、その CV は 0.4% 以内であり、安定した値が得られた (表 4)。その値を用いて作成した検量線は、決定係数 R^2 も 0.9901 と良好であった (図 7)。この検量線の式に各水深の Mean AVE を代入し水深 2.6 m の Chl a 滴下量に換算すると、1.80, 3.65, 2.95 μL であることから量比は 0.61:1.24:1 となった。

表 3. Chl a の Mean Gray Value (n=10)
(水深 0.2, 1.3, 2.6 m 3 μL)

depth (m)	0.2	1.3	2.6
Mean AVE	136.56	139.27	138.24
SD	0.45	0.21	0.46
CV (%)	0.33	0.15	0.33

表 4. Chl a の Mean Gray Value (n=10)
(水深 2.6 m 1, 2, 3 μL)

(μL)	1	2	3
Mean AVE	135.31	137.02	138.24
SD	0.53	0.21	0.46
CV (%)	0.39	0.15	0.33

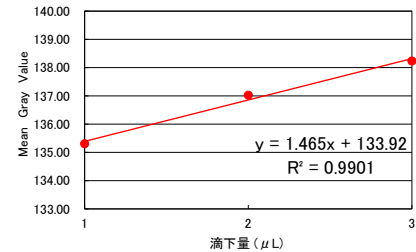


図 7. Chl a 滴下量と Mean Gray Value の関係 (n=10) (水深 2.6 m)

【考察・結論】

初めて Hakuryo method による複数成分の定量を実現させ、生息水深の異なる 3 地点のダルスに含まれる PE, PEB, 及び Chl a 量を相対的に明らかにすることに成功した (図 8)。PE, PEB 量は最も浅いダルスが他の 2 地点と比較して 1.3 倍以上と明らかに多いことから、光強度が強い環境下では増加することが昨年と同様に示されたといえる。しかし 2.6 m > 1.3 m の結果は、単に光強度のみで含有量が決定されるわけではないことを示している。これまでの一連の研究より、栄養循環も重要な要因であったことから¹⁾、可能性の一つとして 2.6 m 地点が 1.3 m よりロープの弛みが大きく、揺れやすい環境であるため、栄養塩の供給が促されたことが考えられる。

また Chl a 量は、1.3 m のものが最も多く、全ての地点において PE, PEB 量と負の相関関係が見られた。光合成における光化学反応は、主に Chl a が関与する光化学系 I と PE, PEB 等による光化学系 II によって行われる。シアノバクテリアや紅藻では、この二つの系の反応量比が光条件によって変動することが報告されている²⁾。これは、色素合成を調整することにより、環境の変化に適応していることを示している。

本研究により、北海道南部産ダルスの体内においても、水深による光強度の変化に応じて PE, PEB 量と Chl a 量を調節し、光の利用効率を高める仕組みが存在する可能性が示唆された。

【参考文献】

- 第66回日本学生科学賞 (2022) ダルスのPE量に光が与える影響
- 村上 明男 (2013) 電子授受反応を主導する光合成色素, 生物工学会誌 第91巻, p376-380

【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。

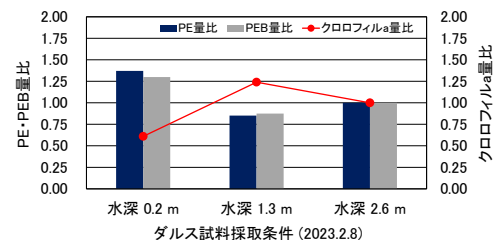


図 8. PE, PEB, Chl a 含有量の相対比較
(水深 2.6 m 基準) (水深 0.2, 1.3, 2.6 m)