

令和元年度伊藤光昌氏記念学術助成金(研究助成)成果報告書

研究課題番号	H31-R6
研究課題名	アスタキサンチンの異性体組成による海産小型遊泳性エビ類の生理・生態・食物網構造の同時評価
研究代表者	宗林 留美
所属・職 (または学年)	静岡大学理学部・准教授

アスタキサンチンは、エビや鮭などに含まれる赤い色素で、カロテノイドの一種である(図1)。アスタキサンチンはいくつもの生理機能を有し、紫外線により体内に発生した一重項酸素の除去や、代謝により発生した活性酸素による脂質の過酸化の抑制、代謝や卵形成の促進が知られている。しかし、甲殻類、魚類、鳥類などの動物は、アスタキサンチンを一から合成することができず、餌から得たカロテノイドの官能基を酵素により修飾してアスタキサンチンに変換する。

その際、3位と3'位の不斉炭素に結合する-OH基の角度により、アスタキサンチンは、3S, 3S'(S体)と3R, 3R'(R体)の鏡像異性体および3R, 3S'または3S, 3R'のメソ体に分かれる(図1)。一方、アスタキサンチンは、イソプレン単位を骨格として有するため、理論上は様々な幾何異性体が存在し得るが、天然には全*trans*型が最も多く、次いで9-*cis*型と13-*cis*型が比較的多い。鏡像異性体およびメソ体が光や熱に対して比較的

安定であるのに対し、幾何異性体は容易に変化することが先行研究で示されている。これらから、アスタキサンチンについて幾何異性体を調べることでエビ類などの生息環境や行動様式といった生態的履歴を、鏡像異性体およびメソ体を調べることで餌を推定できるのではないかと考えた。

しかし、天然試料でアスタキサンチンの鏡像異性体とメソ体を幾何異性体ごとに分けて定量した例はこれまでにない。申請者らは、鏡像異性体を分けるためのキラルカラムを用いた高速液体クロマトグラフ(HPLC)による予備実験で、全*trans*型と13-*cis*型のS体が分離できないことを確認しており、本助成金によりフラクションコレクターを導入することで、一段階目の分析で全*trans*型、9-*cis*型、13-*cis*型を分取し、それぞれを二段階目の分析にかけることにより、エビ類におけるアスタキサンチンの異性体情報の完全取得を目指した。しかし、半年に渡ったメーカーの受注停止と4か月に及んだメーカーによる性能確認

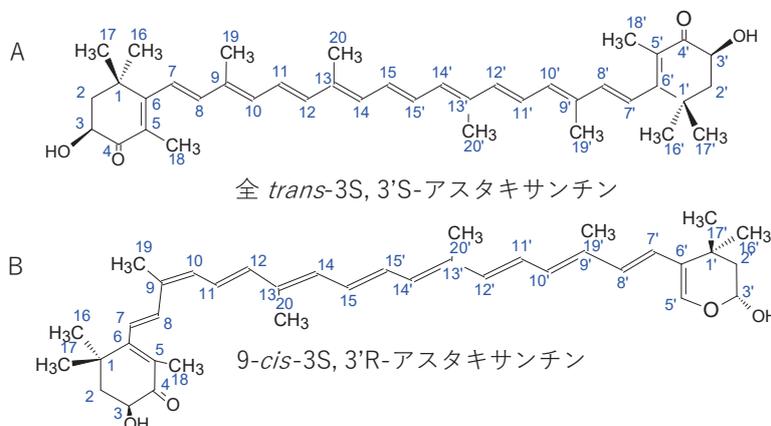


図1. アスタキサンチンの異性体の例

によりフラクションコレクターの導入が3月初旬になったため、本報告書では現在までに得られた途中成果を記載する。

(1) 前処理による影響の評価

エビ類のアスタキサンチンは脂肪酸エステルとして存在するものが多く、精度よく定量するには脱エステル化が必要であるが、この操作には加熱を伴う。また、エビを超音波破碎してアスタキサンチンを抽出する際にも熱が発生することから、これらの前処理によりアスタキサンチンの分解や幾何異性体の変化が生じる可能性がある。そのため、全 *trans* 型アスタキサンチンの精製標品に対して前処理を行って影響を調べたところ、①超音波破碎によるアスタキサンチンの分解が5%に留まったのに対して、②コレステロールエステラーゼを加えて37°Cで45分加温して脱エステル化することで55%が分解、③4%が13-*cis*型に変化、④9-*cis*型には変化しない、⑤超音波破碎による13-*cis*型への変化は同処理での全 *trans* 型の残存率と正の相関 (Student の *t* 検定, $p < 0.05$) があることがわかった (図2) (小澤ほか, 2019年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会)。予備実験では、駿河湾の小型エビ類のアスタキサンチンに占める13-*cis*型の割合が $4.4 \pm 2.8\%$ だったことから、前処理による13-*cis*型への変化はエビのアスタキサンチン幾何異性体比に

大きく影響することが明らかになった。この変化を補正する方法として、⑤を利用し、超音波破碎後にエビ試料を二分割し、片方はそのまま、もう片方は既知量の全 *trans* 型標品を添加して脱エステル化を行い、両者における全 *trans* 型の量の差を添加量で割った値 (添加した全 *trans* 型標品の残存率) から補正する方法を考案した。

(2) HPLC とフラクションコレクターを用いたアスタキサンチン異性体の二段階分離

HPLC に C18 カラムを適用して全 *trans* 型、9-*cis* 型、13-*cis* 型のアスタキサンチンを分離し、それぞれを含む溶離液をフラクションコレクターで順次分取すると全 *trans* 型の量が多いためフラクションコレクターを介して *cis* 型の画分に全 *trans* 型が混入した。そのため、試料を二分して、最初の分析で *cis* 型を分取し、2回目の分析で全 *trans* 型を分取することで混入の影響を低減できることを確認した。得られた各画分は、溶離液に用いたメタノールとアセトニトリルを含んでおり、次に行う鏡像異性体とメソ体の分離に使用するヘキサンと混溶しないことから、窒素ガスを吹き付けてこれらの溶媒を蒸発させ、ごく少量のアセトンに溶解することで、鏡像異性体とメソ体の分離・検出が可能になった。先行研究によるアスタキサンチンの鏡像異性体とメソ体の分析では、S 体、R 体、メソ体の吸光係数を同一であると仮定

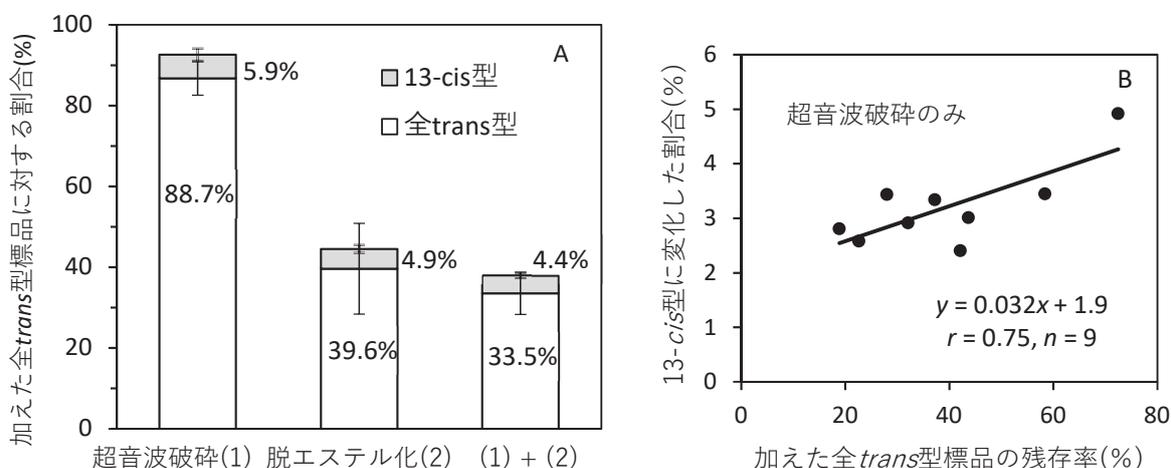


図2. 全 *trans* 型アスタキサンチン精製標品に対する前処理による影響

して、475 nm における吸光度から求まるそれぞれのピーク面積の比を互いの量比としている。本研究では、全 *trans* 型の S 体標品を入手できたので、より正確に異性体の量を求めることが可能となった。現在、採集した駿河湾の小型エビ試料の前処理を行い、分析を行っている。