

## 三種の無脊椎動物における カロチノイド-蛋白質複合体の存在

中川平介・藤田純二

広島大学水畜産学部水産学科

1978年4月28日 受理

### Presence of Carotenoid-protein Complex in certain Invertebrates

Heisuke NAKAGAWA and Junji FUJITA

*Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,  
Hiroshima University, Fukuyama*

(Figs. 1-6, Tables 1-2)

水産動物のカロチノイドに由来する色素として、色素胞へ沈着した遊離のカロチノイド、カロチノイド-蛋白質複合体、及びサンゴ等に見られる様な石灰質に沈着して結合しているもの等<sup>1),2)</sup>がある。このうちカロチノイド-蛋白質複合体はカロチノプロテインと呼ばれる成分とカロチノイド-リポ蛋白質複合体と呼ばれる成分があり、特に前者はパラエティ-に富んだ色調を呈し、水産動物の体色に大きな役割を果す成分として知られている。

CHEESMAN *et al.*<sup>3)</sup>はカロチノイド-蛋白質複合体の広範囲に及ぶ動物における分布をリストアップし、その中でカロチノプロテインを加熱や有機溶媒、蛋白質変性剤との接触による色調の変化の有無から同定している。本報において、三種の動物におけるカロチノイド-蛋白質複合体の分布を調べる目的で、同様の手法を用いて研究を行った。

### 材料及び方法

**実験材料** アカテガニ, *Sesarma haematocheir*, は笠岡市神島で採集し、分析まで-20℃に貯蔵した。使用に際し、解凍し、甲殻を粉碎して試料とした。バフンウニ, *Hemicentrotus pulcherrimus*, 及びイトマキヒトデ, *Asterina spectinifera*, は福山市仙酔島沖で潜水により採取し、バフンウニは卵巣を、イトマキヒトデは表皮を試料とした。

**カロチノイド-蛋白質複合体の抽出** アカテガニの甲殻は粉碎器で碎き、CECCALDI & ALLEMANDの方法<sup>4)</sup>に従い、0.6 M硫酸で暗所に3日間放置して抽出した。バフンウニ、イトマキヒトデの試料は、

0.6 M 硫酸と共にワーリングブレンダーで10分間ホモジナイズした後、3日間暗所に保ち抽出した。各々の抽出液は10,000 rpm 15分間遠心分離して固形物を除き、上澄液はさらに濾過した。濾液に固形硫酸を50%飽和となるように加え、生じた沈澱を10,000 rpm 15分間遠心分離して集めた。沈澱を水にとかしさらに30%飽和硫酸に不溶の成分は殆んど無色であるため除去した。溶解、塩析の操作を2度繰り返し最後に沈澱を0.03 M pH 7.3 のリン酸緩衝液又は0.06 M pH 8.6 のペロナール緩衝液に溶解し、透析した後以下の実験の試料とした。

**カロチノイド-蛋白質複合体の加熱** カロチノイド-蛋白質複合体の加熱前後の物理化学的性状をみるため、緩衝液に溶解した蛋白質溶液を試験管中で100°C、10分間加熱した後、急冷し、沈澱を遠心分離して除き、上澄みを50%飽和硫酸で塩析し試料とした。

**吸収スペクトル** カロチノイド-蛋白質複合体の可視部の吸収スペクトルはpH 7.3のリン酸又はpH 8.6のペロナール緩衝液に溶解して、島津自記分光光度計QV-50により測定した。

**セルロースアセテート電気泳動** 緩衝液に溶かしたカロチノイド-蛋白質複合体を透析後、セルロースアセテート膜（セパラックス、富士フィルム社製）に塗布して電気泳動を行った。定電流で1 mA/cm, 60分間通電した。

**カロチノイドの抽出** 組織のカロチノイド組成分析のため、アセトンを加えカロチノイドを抽出した。抽出液に石油エーテル（b.p. 40-60°C）と水の混合液（1:1）を倍量加え、カロチノイドを石油エーテルに移行させ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、石油エーテルを窒素気流下で除去し、試料とした。カロチノイド-蛋白質複合体に含まれるカロチノイドはクロロホルム・メタノール（1:1 v/v）で抽出し、得たカロチノイドはただちに石油エーテルに移行させ薄層クロマトグラフの試料とした。

**カロチノイドの薄層クロマトグラフィー** 石油エーテルに溶かしたカロチノイドをシリカゲルG（E. Merck社製）の薄層に塗布し、*n*-ヘキサン・酢酸エチル（85:15 v/v）混液を展開溶媒として分離した。カロチノイド組成の算出は、展開後クロマトグラムを自記濃度計、オズマーデンストメーター82（明日香工業社製）を用いた。カロチノイドの同定は、前報<sup>5),6)</sup>の薄層クロマトグラムの $R_f$ 値を参考にして行った。

## 結 果

1. **アカテガニ** アカテガニの甲殻は缺脚部が特に赤く、無色に近い部分もあり、全甲殻の0.6 M硫酸抽出物はわずかに赤味を帯びている程度であって、可視部の吸収スペクトルもFig.1に示す如く、435 nm附近にわずかな肩が認められる程度である。加熱した場合も肉眼的に顕著な色の変化は認め難いが、吸収スペクトルでは明瞭に475 nmに最大吸収の移行が認められた。

色素蛋白質をpH 7.3のリン酸緩衝液に溶かし、セルロースアセテート電気泳動を行うとFig.2の様に淡橙色の色素が一成分認められた。加熱処理によって易動度の減少が認められた。

甲殻のアセトン抽出物を薄層クロマトグラフィーで分離すると約8成分のカロチノイド成分が認められた。カロチノイド-蛋白質複合体のカロチノイドとしてアスタキサンチンの他に量において優る $R_f$  0.4のキサントフィルが1成分認められた。甲殻のカロチノイド組成をTable 1に示した。アカテガニ甲殻に含まれるカロチノイド-蛋白質複合体の最大吸収は、補欠分子族カロチノイドの有機溶媒中での最大吸収帯より短波長域にあり、加熱によりそれが475 nmに移行することから考えて、この成分はカロチノプロテインであろう。

2. **バフンウニ** 卵巣から0.6 M硫酸で抽出した色素は30%飽和硫酸に対し不溶の成分、及び50%飽和溶液に可溶の成分も多く存在したが、色調、吸収スペクトル、電気泳動易動度等においても30%飽和硫酸可溶、50%飽和溶液不溶の成分と全く異なることがなかった。Fig.3に色素のリン酸緩衝液中にお

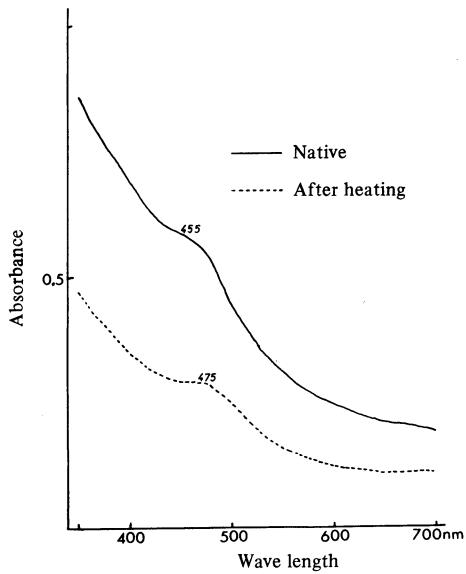


Fig. 1 Absorption spectra of the crude carotenoid-protein complex extracted from the exoskeleton of crab, *Sesarma haematocheir*, in 0.05 M phosphate buffer pH 7.3. The heating was carried out at 100°C for 10 min.

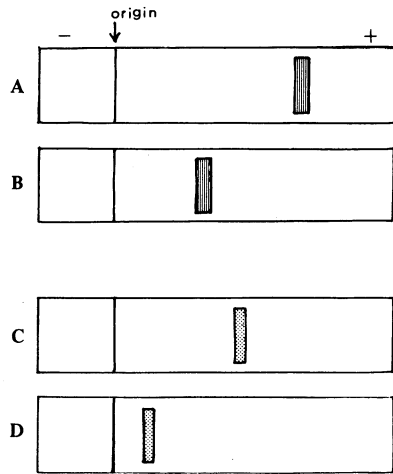


Fig. 2 Cellulose acetate electrophoretic diagrams of the crude carotenoid-protein complexes extracted from the exoskeleton of crab, *Sesarma haematocheir* (A and B) and from the ovaries of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* (C and D). Run in 0.05 M phosphate buffer pH 7.3. Current: 1mA/cm width for 60 min. Color: vertical lines, faint orange; dots, yellow. A and C: native, B and D: after heating at 100°C for 10 min.

Table 1. Carotenoid composition of crab exoskeleton, *Sesarma haematocheir*.

No.	R <sub>f</sub> value	Color	Composition (%)	Identification
1	0.96	Yellow	2.6	β-carotene
2	0.88	Yellow	25.7	
3	0.68	Red	20.6	Astaxanthin-ester
4	0.54	Orange	15.0	
5	0.33	Yellowish orange	7.9	
6	0.18	Orange	14.5	
7	0.04	Orange	8.4	β-doradexanthin (?)
8	0.03	Orange	5.3	Astaxanthin

ける吸収スペクトルを示した。可視部の最大吸収は460nmにあり、他に425, 490nmに肩がみられる、所謂、微細構造を示した。加熱することによりかなりの蛋白質が不溶化し、可溶部の吸収スペクトルは加熱前のものの様に明瞭ではなく、わずかに425, 475, 500nmに肩が認められた。加熱前の最大吸収がわずかではあるが加熱後のそれより短波長側にある点は、アカテガニの場合と類似している。

電気泳動的挙動では黄色のカロチノイド-蛋白質複合体は一成分しか認められなかった。加熱処理によって可溶部の色素は小さい易動度を示した。結果は Fig. 2 に示した。

卵巣のカロチノイドは薄層クロマトグラフィーで8成分に分離した。そのうちの主な成分はエキネノンであった。この成分は還元、ケン化前後の性状、吸収スペクトル、epoxide-テスト、分配テスト等によって同定した。卵巣に含まれている8成分のカロチノイドの内、6成分のカロチノイドが蛋白質との複合体を形成して存在することをみた。薄層クロマトグラムをFig.4に示した。この複合体にはカロチノイドのみならず、かなりの脂質が含まれ、又、加熱によっても最大吸収波長に大きな変化がなかったことから考えて、カロチノイドはリポ蛋白質の脂質

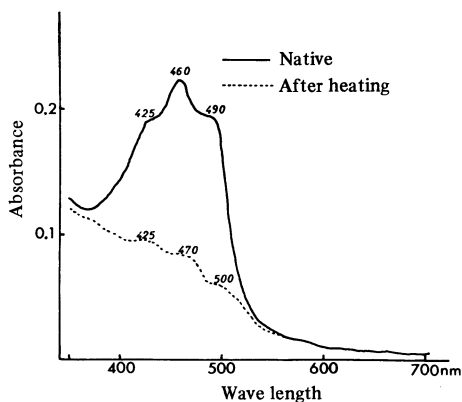


Fig. 3. Absorption spectra of the crude carotenoid-protein complex extracted from the ovary of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, in 0.05 M phosphate buffer pH 7.3.

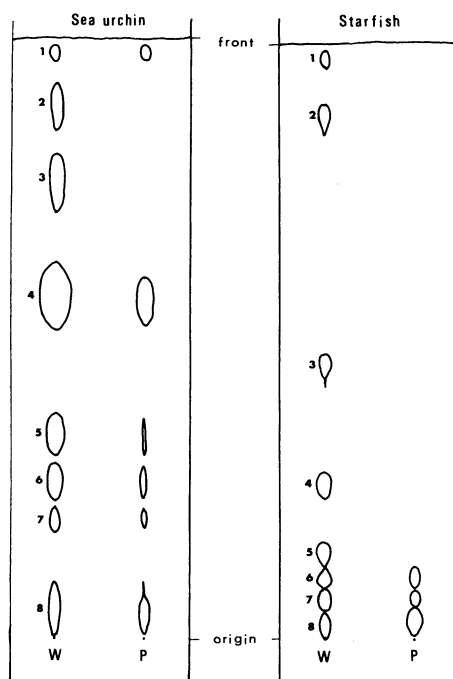


Fig. 4. Thin-layer chromatograms of carotenoids of the ovary of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* and of the integument of starfish, *Asterina pectinitera*.

Silicagel G, *n*-hexane-ethylacetate (85:15 v/v).

W: whole carotenoid from the organism.

P: prosthetic group carotenoid extracted from the carotenoid-protein complex.

Table 2. Carotenoid compositions of sea urchin ovary and starfish integument

No.	Sea urchin ( <i>H. pulcherrimus</i> )				Starfish ( <i>A. spectinitera</i> )			
	Rf value	Color	Composition (%)	Identification	Rf Value	Color	Composition (%)	Identification
1	0.98	yellow	0.6	$\beta$ -carotene	0.94	Faint yellow	0.6	
2	0.87	Faint yellow	0.9		0.84	Faint yellow	3.6	
3	0.74	Faint yellow	12.1		0.68	Orange	3.6	Astaxanthin-ester
4	0.56	Orange	70.5	Echinenone	0.26	Orange	12.3	
5	0.34	Faint yellow	0.6		0.12	Yellowish orange	14.8	
6	0.26	Faint yellow	1.8		0.11	Orange	65.1	Astaxanthin
7	0.19	Faint yellow	0.7		0.08	Orange		
8	0.06	Yellow	12.8		0.05	Orange		

に溶けた状態で存在する、所謂、カロチノイド-リポ蛋白質と考えられる。Table 2 に卵巣のカロチノイド組成を表示した。

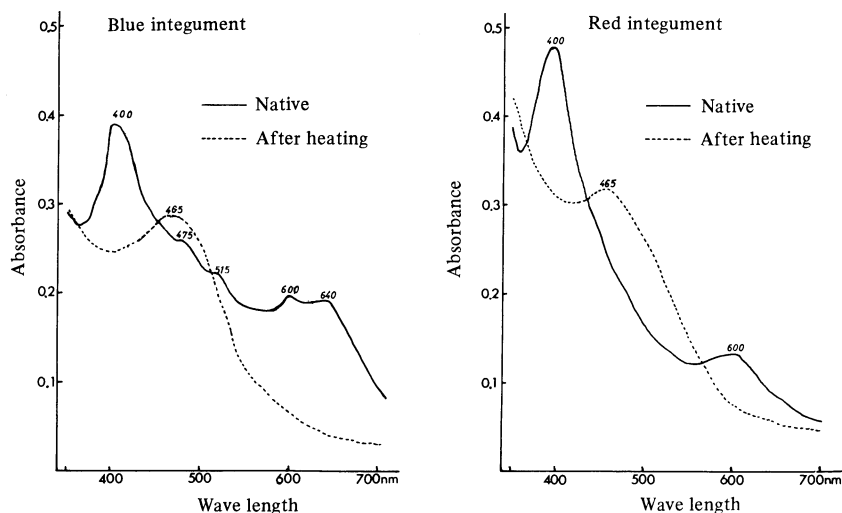


Fig. 5. Absorption spectra of the crude carotenoid-protein complexes extracted from the blue and the red parts of starfish integument, *Asterina pectinitera*, in 0.06M phosphate buffer pH 8.6.

**3. イトマキヒトデ** 表皮の大部分は青く、中に鮮明な赤い斑点がある。表皮のうち青い部分と赤い部分をそれぞれ鋏で別けて、0.6 M 硫酸で色素を抽出した。それぞれの部分に含まれる色素の吸収スペクトルを Fig.5 に示した。赤い表皮から得た色素は 400nm に大きな吸収があり、他に 600nm にみられるが、一方青い表皮に含まれていた色素では 400nm の他に小さい吸収が 475, 515, 600, 640nm にあり複雑である。しかしながら両者とも加熱処理を行うと、465nm に吸収が移り両者に差は認められなくなった。

Fig.6 はセルロースアセテート電気泳動像である。泳動にはペロナール緩衝液を用いた。分離状態は良くないが、青い表皮より得た色素は易動度の早い順に、黄色、緑色、青色、及び赤色の成分が認められた。一方、赤い表皮から得たものでは黄色の成分を除く成分が認められ、それぞれの色の表皮の色素は数成分の混合物であることを認めた。加熱処理を行うと、吸収スペクトルの場合と同様、両者は区別出来ない単一の易動度の遅い赤い成分となった。

又、カロチノイド組成においても赤と青の表皮では全く差がなく、Fig.4 の様に 8 成分が含まれる。そのうち蛋白質と結合しているものは R<sub>f</sub> 値の低い 3 成分のキサントフィル類であった。R<sub>f</sub> 値から 1 成分はアスタキサンチンと考えられるが、他の 2 成分については不明である。

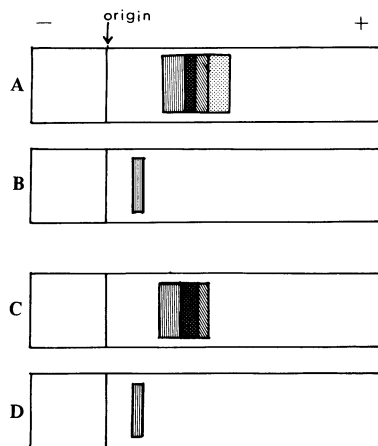


Fig. 6. Cellulose acetate electrophoretic diagrams of the crude carotenoid-protein complexes extracted from the blue and the red parts of starfish integument, *Asterina pectinitera*, in 0.06 M veronal buffer pH 8.6.

**A:** Native carotenid-protein complex from the blue integument.  
**B:** After heating of A  
**C:** Native carotenid-protein complex from the red integument.  
**D:** After heating of C.  
 Color: vertical lines, red; cross lines, blue; diagonal lines, green; dots, yellow.

## 考 察

カロチノイド-蛋白質複合体の動物界における分布については CHEESMAN *et al.*<sup>3)</sup>, ZAGALSKY<sup>7)</sup> によって詳しく述べられ、そのうち甲殻類のカロチノプロテインに関する研究が圧倒的に多い。しかしながら、カロチノイドの存在は甲殻類以外の無脊椎動物においても認められていることから種々の色調に及ぼすカロチノイド-蛋白質複合体の役割もかなり大きいものと考えられる。

アカテガニは赤い甲殻を有し、赤いカロチノプロテインの吸収スペクトルは不明瞭ではあるが 455 nm 附近に吸収をもち、加熱することにより 475 nm となる。本成分を精製すればこの傾向はさらに明瞭となるであろう。一般に、カロチノイドは蛋白質と結合して、所謂、深色現象を示す場合が多く報告されているが、逆の現象を呈する例を報告したものは割合少なく、アカテガニ甲殻のカロチノプロテインはその少ない例の一つであろう。松野・渡辺<sup>8)</sup> はアカテガニのカロチノイドのケン化後の分析で  $\beta$ -ドラデシンが全体の約 50% を占めるということから、甲殻中では  $\beta$ -ドラデキサンチン、及びそのエステルとして存在する可能性もあろう。故にカロチノプロテインのカロチノイドの薄層クロマトグラムに表われた未同定の成分は、吸収スペクトルからみても  $\beta$ -ドラデキサンチンとも考えられるが詳細な分析は行っていない。

パフウニ卵巣に含まれるカロチノイド-蛋白質複合体は加熱によっても吸収スペクトルの大きな変化は認められなかったことから、他の動物の卵のリポ蛋白質と同様、カロチノイドはリポ蛋白質の脂質部分に溶けた形で存在すると考えられる。

イトマキヒトデの表皮から抽出したカロチノプロテインは数成分の混合物であることが電気泳動像から推定出来る。特に、青い表皮から抽出した成分の吸収スペクトルは極めて複雑であって、赤い表皮から抽出したカロチノプロテインより多くの成分を含んでいることが予想される。しかしながら、両者の加熱後の最大吸収は 465 nm であることから、全てのカロチノプロテインが共通のアポ蛋白質部分を有することも考えられる。同様の現象はアメリカザリガニ, *Procambarus clarki*, の甲殻から抽出したカロチノプロテインでもみられた<sup>9)-11)</sup>。補欠分子族カロチノイドの薄層クロマトグラフィーで、3成分のキサントフィル類が認められたが、これらのうち2成分は未同定である。TANAKA & KATAYAMA<sup>12)</sup> は3種のヒトデより 7, 8-didehydroastaxanthin を検出していることから、未同定の成分はこの成分に相当することも考えられる。現在までカロチノプロテインの補欠分子族カロチノイドとして同定されたものはアスタキサンチンの他には同エステル<sup>13)</sup>、及びカンタキサンチン<sup>14)-18)</sup> であるが、カロチノイドの構造上、 $\beta$ -イオン環に 4,4'-ケト基が存在すれば蛋白質との結合が可能であるから、その条件を満たすケトカロチノイドであれば複合体を形成する可能性も充分考えられる。

カロチノイドの生理的役割については、未だ明らかではないが、カロチノプロテインの生理的役割のうち普遍的なものとしては、カロチノイドと蛋白質双方の化学的・物理的安定化、光線からの保護用フィルター、及び背地適応が主なものとされる。我が国における水産動物の体色は商品価値、食欲との関連で重要な意味を有し、又、増養殖においても一大関心事である。カロチノイドの関わる赤や黄色の体色の強さについては、これまで主としてカロチノイド総量との関連のみ論じられてきたが、カロチノイドは蛋白質との結合によりあらゆる色調を呈することが可能で、場合によっては無色を呈することも可能であるとされている<sup>3)</sup>。故に体色改善を行うにはカロチノプロテインの分布を明らかにし、その影響も考慮する必要がある。等脚類 *Idothea* やミジンコの類の場合の如く<sup>14), 15), 19)</sup>、環境や光が色調決定のための重要な要因であることも無視出来ない。

## 要 約

3種の無脊椎動物のカロチノイド-蛋白質複合体を抽出し、吸収スペクトル、セルロースアセテート電

気泳動, 補欠分子族カロチノイドの分析を行った。又, 加熱前後の物理化学的性状の変化を調べた。

1) アカテガニ甲殻から得た赤い色素は455nmに吸収をもち, アスタキサンチン他を補欠分子族とするカロチノプロテインである。加熱すると吸収極大は475nmに移り, 電気泳動易動度も減少した。

2) バフンウニ卵巣の色素は黄色のカロチノイド-リポ蛋白質複合体であって, 加熱すると電気泳動易動度の減少がみられたが, 最大吸収波長には大きな変化は認められなかった。カロチノイドの組成は, 卵巣のカロチノイド組成にはほぼ等しく, エキネノンの他に数成分のカロチノイドが認められた。

3) イトマキヒトデの表皮の赤い部分と青い部分から抽出した色素は数種のカロチノプロテインの混合物であって, 赤い表皮から得たものは400と600nmに最大吸収を有し, 青い表皮から得たものは400nmに大きな吸収をもち, 他に475, 515, 600, 640nmにも小さな吸収が認められた。それぞれの色素を加熱すると, 最大吸収は465nmに移り, 電気泳動的にも単一の成分となった。補欠分子族カロチノイドとしてアスタキサンチンの他に未同定の2成分のキサントフィルを認めた。

## 引用文献

- 1) FOX, D. L. and WILKIE, D. W. : *Comp. Biochem. physiol.*, **36**, 49-60 (1970).
- 2) FOX, D. L. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **43B**, 919-927 (1972).
- 3) CHEESMAN, D. F., LEE, W. L., and ZAGALSKY, P. F. : *Biol. Rev.*, **42**, 132-160 (1967).
- 4) CECCALDI, H. J. and ALLEMAND, B. H. : *Rec. Trav. Stat. Mar. End. Bull.*, **35**, 3-7 (1964).
- 5) NAKAGAWA, H., KAYAMA, M., YAMADA, H., and ASAKAWA, S. : *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **13**, 1-13 (1974).
- 6) NAKAGAWA, H., and KAYAMA, M. : *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **14**, 49-60 (1975).
- 7) ZAGALSKY, P. F. : *Pure & Appl. Chem.*, **47**, 103-120 (1976).
- 8) 松野隆男, 渡辺哲夫 : 日本水産学会誌 **40**, 767-774 (1974).
- 9) NAKAGAWA, H., KAYAMA, M., and ASAKAWA, S. : *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **10**, 61-71 (1971).
- 10) NAKAGAWA, H., KAYAMA, M., and ASAKAWA, S. : *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **11**, 129-139 (1972).
- 11) NAKAGAWA, H., KAYAMA, M., and ASAKAWA, S. : *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, **12**, 21-30 (1973).
- 12) TANAKA, Y. and KATAYAMA, T. : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 807-812 (1976).
- 13) CHEESMAN, D. F. and PREBBLE, J. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **17**, 929-935 (1966).
- 14) LEE, W. L. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **18**, 17-36 (1966).
- 15) LEE, W. L. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **19**, 13-27 (1966).
- 16) GILCHRIST, B. M. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **24**, 123-147 (1968).
- 17) LEE, W. L. : *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **10**, 1-27 (1972).
- 18) ZAGALSKY, P. F. and GILCHRIST, B. M. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **55B**, 195-200 (1976).
- 19) GREEN, J. : *Proc. Roy. Soc., B*, **147**, 392-401 (1957).

## SUMMARY

Carotenoid-protein complexes were extracted with 0.6 M ammonium sulfate from the exoskeleton of crab, *Sesarma haematocheir*, from the epidermis of starfish, *Asterina spectinitera*, and from the ovaries of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. These pigmented proteins were salted out by ammonium sulfate fractionation. The absorption

spectra at visual region, the electrophoretic behavior on a cellulose acetate film, and the prosthetic group carotenoid composition of the proteins were determined successively. The results are as follows.

1) A faint red protein of the crab exoskeleton was determined as a carotenoprotein having an absorption maximum in visual region at 455 nm in phosphate buffer pH 7.3. Heated at 100°C for 10 min., it yielded a shift of the absorption maximum to 475 nm accompanied by a decrease in electrophoretic mobility. Carotenoid analysis by silicagel thin-layer chromatography showed the presence of astaxanthin and another xanthophyll component as the prosthetic group of the carotenoprotein.

2) The pigment obtained from the sea urchin ovaries was a kind of lipoprotein with yellow color. The absorption spectrum of the carotenoid-lipoprotein complex was similar to that of the acetone extract from the ovaries. While the heating caused a decrease of electrophoretic mobility of the lipoprotein, the color and absorption maxima remained unchanged. The carotenoid composition of the pigment somewhat resembled that of the whole extract with acetone from the ovaries.

3) In the starfish, the pigmented protein was separately extracted from the blue and the red parts of epidermis. The carotenoproteins extracted from both parts were a mixture of various pigmented carotenoproteins. The carotenoproteins in the red epidermis showed the absorption maxima at 400 and 600 nm. And those extracted from the blue epidermis showed absorption maxima at 400, 600, 640 nm with small peaks at 475, 515 nm. However, after heating these carotenoprotein became undifferentiated in absorption spectra and electrophoretic behavior. Carotenoid analysis showed the presence of astaxanthin and two other unidentified xanthophylls as the prosthetic group of these carotenoproteins.