

## ニセクロナマコ生殖巣の色素成分について

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	376
掲載ページ	p. 513-517
発行年月	1971年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ニセクロナマコ生殖巣の色素成分について\*

松野隆男・伊藤隆之・広田さち子

(1970年11月20日受理)

Gonadal Pigments of the Sea-cucumber, *Holothuria leucospilota*

Takao MATSUNO, Takayuki ITO, and Sachiko HIROTA\*\*

It is observed that ovaries and testes of the sea-cucumber, *Holothuria leucospilota*, become deep pink and milky orange respectively during its reproductive season and these gonadal pigments were investigated. The pigments of both the testes and the ovaries were extracted by the method shown in Fig. 1 and their petroleum ether solutions gave closely similar pigment patterns to each other by the thin-layer chromatographic method. The results show that the gonadal colors are due to the presence of carotenoid pigments. Petroleum ether solution of the gonads was chromatographed on an alumina column and separated into seven fractions. They were identified to be  $\beta$ -carotene, echinenone, canthaxanthin, zeaxanthin, astaxanthin, astacene and an unidentified pigment by physical and chemical methods. The content of each pigment was determined for both sexes. Ovaries contained about 10 ppm of carotenoids and testes 3 ppm. The principal carotenoid in the ovaries was astaxanthin which amounted to over 70% of the total pigments and in the testes were observed to be canthaxanthin (35%) and astaxanthin (30%).

ウニ、ナマコ、ヒトデ、クモヒトデ、ウミユリなどが属する棘皮動物の色素に関しては主として melanin, porphyrin, naphthoquinone, carotenoid などが知られている。ナマコ類の色素についてはムラサキクルマナマコ, *Polycheira rufescens* の body wall の色素として naphthoquinone 誘導体の namakochrome<sup>4)</sup> が、また亜北極性の赤色ナマコ, *Psolus fabrichii* および *Cucumaria lubrica* の体壁の主色素成分として astaxanthin が報告されているのみである。

先に著者らは熱帯性のナマコの一種ニセクロナマコ, *Holothuria leucospilota* の精巣および卵巣の色素主成分として keto-carotenoid である astaxanthin<sup>2)</sup> を結晶として分離証明した。Astaxanthin は全色素の 70% 以上をしめているが、このほかに微量に存在する色素成分については報告してなかつた。今回これらの微量成分を明らかにしたので報告する。

## 試 料

試料は2回にわたつて和歌山県串本海岸で採集した。第1回目は1969年6月29日でニセクロナマコ90匹より精巣130g、卵巣220gをえた。第2回目は7月29日に採集し60匹より精巣98g、卵巣108gをえて試料とした。この時期はニセクロナマコの産卵期に一致し卵巣には卵が充満していて鮮やかなピンク色をしている。

## 実験および結果

色素の抽出 精巣および卵巣の色素はそれぞれ Fig. 1 にしたがって抽出した。

\* 本研究は昭和45年4月日本水産学会年会で発表した。

\*\* 京都薬科大学 (Kyoto College of Pharmacy, Yamashina, Higashiyama-ku, Kyoto, Japan)

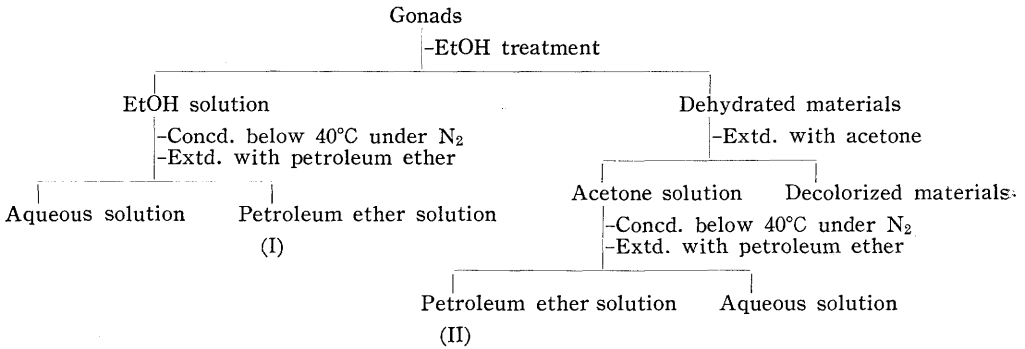


Fig. 1. Extraction of the pigments from *H. leucospilota*.

濃赤色を呈する色素の石油エーテル抽出液について Carr-Price 反応は陽性であつたので carotenoids の存在を推察した。エタノールで脱水の際えられた少量の色素の石油エーテル溶液 (I) はアセトン抽出によつてえられる生殖巣色素の大部分が溶存している石油エーテル溶液 (II) に合併して実験に供した。精巣卵巣の色素の石油エーテル抽出液を 3 種の溶媒系 A: ベンゼン-エーテル-メタノール (17:2:1), B: クロロホルム-無酢 (25:1), C: ベンゼン-石油エーテル-アセトン (10:2.5:2) を用いて薄層 chromatography で比較したところ精巣卵巣とも全く同一の色素パターンを示した。ちなみにその結果を Fig. 2 に示す。

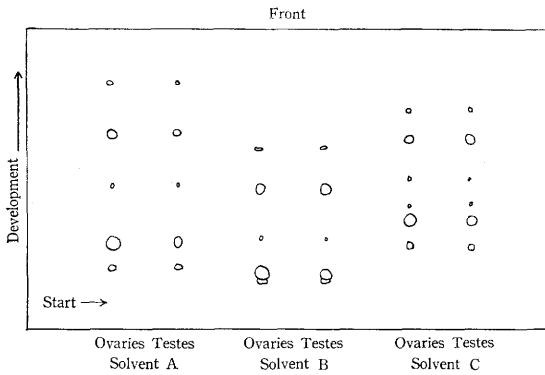


Fig. 2. Thin-layer chromatograms of the pigments on silica gel G.

- Solvent A: benzene-ether-methanol (17:2:1)
- Solvent B: chloroform-acetic anhydride (25:1)
- Solvent C: benzene-petroleum ether-acetone (10:2.5:2)

**精巣色素抽出液の column chromatography** 吸着剤としては Woelm の中性 Alumina (activity grade 1), column は 9 mm×80 mm を用いた。展開はアセトン-石油エーテル (2:98) (Fr. 1), アセトン-石油エーテル (4:96) (Fr. 2), アセトン-石油エーテル (8:92) (Fr. 3), アセトン-石油エーテル (30:70) (Fr. 4), アセトン-石油エーテル (50:50) (Fr. 5), HOAc-エーテル (5:95) (Fr. 6), KOH-90% メタノール (15:85) (Fr. 7) の順に溶出し、それぞれの Fraction (Fr.) を Fr. 1~7 とした。

**卵巣色素抽出液の column chromatography** 吸着剤は Woelm の中性 Alumina (activity grade 1), column は 9 mm×90 mm を用いて精巣の場合と全く同様にして展開溶離をおこない Fr. 1~Fr. 7 までをえた。

各 Fraction の石油エーテル溶液における可視部の吸収スペクトル曲線は Fig. 3 のごとくである。

Fr. 1 acetone-petroleum ether (2:98) 溶出部  $\beta$ -carotene

Fig. 3 に示すごとく石油エーテル中での吸収スペクトルは Fr. 1  $\lambda$  max (425), 449, 475 m $\mu$ , 標品の  $\beta$ -carotene (427), 449, 476 m $\mu$  で  $\lambda$  max, 形状ともに  $\beta$ -carotene に一致し石油エーテルと 90% メタノールとの partition test では Fr. 1 は  $\beta$ -carotene と同様完全に epiphasic であつた。また 10% KOH-エタノールにて常法によりケン化後も薄層 chromatography で変化を認めなかつた。以上のことから Fr. 1 は  $\beta$ -carotene と推定されたので Merck の  $\beta$ -carotene の標品と薄層で co-chromatography をおこなつた。

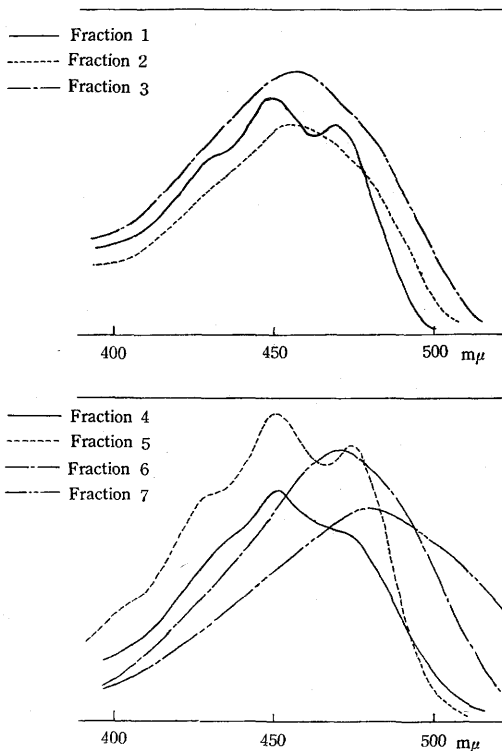


Fig. 3. The absorption spectra of each fraction in petroleum ether.

また還元生成物について allylic OH 活性テスト<sup>3)</sup>をおこなったところ薄層 chromatography で明らかに Rf 値の変化が認められたので二重結合に共役する carbonyl 基の存在がたしかめられたことになる。よつて Fr. 2 を echinenone と推定して市販生ウニよりえた標品の echinenone<sup>4)</sup> と column で co-chromatography により分離しても band 1 個のみを与えたので echinenone の存在を確認した。

#### Fr. 3 acetone-petroleum ether (8:92) 溶出部 canthaxanthin

Fr. 3 の石油エーテル溶液は同量の 90% メタノールと partition test をおこなうと 9:1 の割合で epiphasic である。またその可視部吸収スペクトルは  $\lambda_{\max}$  および形状ともに canthaxanthin のそれとよく似ていることを認めた。常法によりケン化後変化を認めなかつた。Fr. 2 の場合と同様に  $\text{NaBH}_4$  による carbonyl 基の還元反応をおこない反応生成物の可視部吸収スペクトルは  $464 \text{ m}\mu$  における吸収 band は消失して  $\lambda_{\max} 449, 477 \text{ m}\mu$  に吸収極大を与えた。そこで生成したアルコール性 OH の位置をしらべるためにまた還元生成物について Fr. 2 の場合と同様にして allylic OH 活性を認めた。よつて Fr. 3 は canthaxanthin であることがわかつた。

#### Fr. 4 acetone-petroleum ether (30:70) 溶出部

薄層 chromatography で検討した結果なお混合物であることを認めたので再 column chromatography をおこなつたが微量のため精査できなかった。

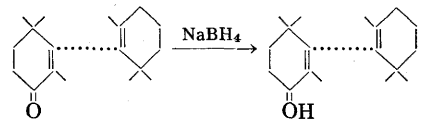
#### Fr. 5 acetone-petroleum ether (50:50) 溶出部 zeaxanthin

Partition test は石油エーテル-80% メタノールでは 8:2, 石油エーテル-85% メタノールでは 6:4, 石油エーテル-90% メタノールでは 1:9 を示した。すなわち石油エーテル-90% メタノールで 1:9 の分配結

ころ分離せず one spot を与えたので  $\beta$ -carotene と同定した。

#### Fr. 2 acetone-petroleum ether (4:96) 溶出部 echinenone

Fr. 2 の石油エーテル溶液は同量の 90% メタノールと partition test をおこなうと完全に epiphasic である。常法により KOH-エタノールにてケン化後も変化を認めなかつた。その UV 吸収スペクトルは keto-carotenoid に特有の single band を与え echinenone の文献値と非常によく一致している。carbonyl 基の存在をたしかめるために還元して対応するアルコールに導く実験をおこなつた。すなわち試料を 95% エタノールに溶解し  $\text{NaBH}_4$  を加えて  $\text{N}_2$  で置換後 1 夜冷蔵庫に保存すると溶液の色は反応後には最初の橙赤色から黄色に変化する。薄層 chromatography で検討すると Fr. 2 は完全に変化していることをその Rf 値から認めえた。また  $\text{NaBH}_4$  による還元後の吸収スペクトルは還元反応前の single band から  $\beta$ -carotene の吸収曲線に似た triple band に変化した。



果ではほとんど hypophasic であることがわかる。また allylic OH 活性テストでは陰性であつた。さらに可視部吸収スペクトル測定の結果 zeaxanthin が推定されたので山口<sup>5)</sup>の方法により“そてつ” *Cycas revoluta* の実から zeaxanthin を単離しこの標品と比較の結果 zeaxanthin と同定した。

#### Fr. 6 HOAc-ether (5:95) 溶出部 astaxanthin

妻木らの方法<sup>6)</sup>にしたがってイトマキヒトデから抽出分離した astaxanthin の標品と co-chromatography (薄層) の結果分離せず one spot を与えた。可視部吸収スペクトルの  $\lambda_{max}$ , 形状ともにイトマキヒトデからえられた astaxanthin の標品のそれらによく一致した。また Fr. 6 をピリジンに溶解し  $N_2$  気流中アルコール性 KOH を作用するとテトラカリウム塩を生成して赤色の溶液が青藍色に変化し、これに空気を導入すると酸化されて再び赤色の溶液 (astacene) となつたので以上の事実より Fr. 6 は astaxanthin であることは確実である。

#### Fr. 7 KOH-90% メタノール (15:85) 溶出部 astacene

これは色素の抽出, 分離, 精製の過程で astaxanthin が変化して二次的に astacene になつたものと思われる。

#### ニセクロナマコ精巢, 卵巣の色素含量

1) 試料 精巢 98 g, 卵巣 108 g

2) 方法 試料から抽出した色素の石油エーテル溶液について精巢, 卵巣ともに2回に分けて中性 Alumina (Woelm) (activity grade 1) で吸着 chromatography をおこない Fr. 1~7 に分別した。各 Fraction を一定量の石油エーテルに溶かし可視部吸収スペクトルを測定し, 一方標品の  $\beta$ -carotene 結晶一

Table 1. The amount of each pigment in testes and ovaries.

Testes	I		II		Average	
	ppm	%	ppm	%	ppm	%
$\beta$ -Carotene	0.14	4.6	0.18	5.8	0.16	5.2
Echinenone	0.13	4.3	0.16	5.2	0.15	4.9
Canthaxanthin	1.07	35.2	1.05	34.0	1.06	34.2
Unknown	0.19	6.2	0.22	7.1	0.20	6.5
Zeaxanthin	0.52	17.1	0.54	17.5	0.53	17.3
Astaxanthin	0.61	20.1	0.68	22.0	0.65	21.2
Astacene	0.38	12.5	0.26	8.4	0.32	10.4
Total	3.04		3.09		3.07	

Ovaries	I		II		Average	
	ppm	%	ppm	%	ppm	%
$\beta$ -Carotene	0.12	1.1	0.18	1.8	0.15	1.5
Echinenone			0.09	0.9	0.04	0.4
Canthaxanthin	1.57	15.1	2.10	20.8	1.84	18.0
Unknown	0.27	2.6	0.28	2.8	0.27	2.6
Zeaxanthin	0.35	3.4	0.45	4.4	0.40	3.9
Astaxanthin	5.96	57.5	5.39	53.3	5.68	55.4
Astacene	2.11	20.3	1.62	16.0	1.87	18.2
Total	10.38		10.11		10.25	

定量を石油エーテルに溶かした溶液の吸光度と試料のそれとを比較して定量した。

3) 結果 ニセクロナマコの卵巣には 10.4 ppm の carotenoid 色素が含まれそのうち 70~80% が astaxanthin でしめられている。10~20% が canthaxanthin で残り 10% に他の carotenoid 色素すなわち  $\beta$ -carotene, echinenone, zeaxanthin などが含まれている。精巣には 3 ppm の色素が含まれ主色素成分は canthaxanthin で 35% におよぶ。卵巣の main の色素成分である astaxanthin は精巣ではかなり少なく 32% であつた。

## 考 察

従来、棘皮動物の色素として melanin, carotenoid, porphyrin, naphthoquinone などが報告されている。著者らはニセクロナマコの body wall から毒素 (saponin) を抽出する関係上ニセクロナマコの開腹に際して生殖期には濃いピンク色の卵巣と薄い橙色をした精巣が観察されるが、これらの色素成分に関心をもつて研究したわけであるが外観からも推察されるごとく実験結果からも卵巣の carotenoid 色素は精巣に存在する量の約 3 倍強で構成色素成分としてのパターンは全く同一であつた。それらは  $\beta$ -carotene, echinenone, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin などよりなつていることが今回の研究の結果明らかにされた。そして卵巣の主色素成分は astaxanthin であり、精巣の主色素成分は astaxanthin と canthaxanthin であることが明らかにされたわけである。また一方ではニセクロナマコの精卵巣の主成分である astaxanthin は甲殻類には普遍的な carotenoid であり、また魚類ではホウボウ、タイ類などの赤魚の皮、サケ類の肉、卵などの主色素成分でもあるが、今回の実験によりこれが棘皮動物のニセクロナマコの生殖巣からも見出されてこのものが動物界に広く分布する carotenoid 色素であることが示された。

ヒトデ類の外皮の carotenoid 色素に関する研究結果から主成分は astaxanthin (50~80%) とされている。一方同じ棘皮動物のうちで生殖巣の carotenoid に関してはウニ類の一種 *Parocentrotus lividus* の生殖巣および数種の日本産ウニ生殖巣の carotenoid 色素<sup>4,7,8)</sup>が研究されいづれも主成分が echinenone であると報告さたている。ヒトデおよび今回われわれがおこなつたナマコ類の一種ニセクロナマコの carotenoids がウニ類の echinenone よりもより polar な xanthophyll である astaxanthin を主色素成分として含有していることは比較生化学の上からも興味あるものと思われる。

## 要 約

1. ニセクロナマコの精卵巣の色素は carotenoid 系であり色素のパターンは全く同一であり主色素成分は卵巣では astaxanthin (70%), 精巣では astaxanthin (30%) と canthaxanthin (35%) であつた。なおこのほかに副成分として  $\beta$ -carotene, echinenone, zeaxanthin の存在を認めた。

2. 精卵巣に含有の各 carotenoid 色素を定量の結果全色素としては卵巣には約 10 ppm, 精巣には 3 ppm 含有されていることがわかつた。

## 文 献

- 1) T. MUKAI: *Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ., Ser. C*, 3, 29~33 (1958).
- 2) T. MATSUNO, T. ISHIDA, T. ITO, and A. SAKUSHIMA: *Experientia*, 25, 1253 (1969).
- 3) E. C. GROB and R. P. PFLUGSHAUP: *Helv. Chim. Acta*, 45, 1592~1598 (1962).
- 4) 三輪勝利: 北海道区水産研報 31, 73~87 (1966).
- 5) 山口 勝: 九大理 (化学) 2, 31~34 (1954).
- 6) 妻木徳一・山口 勝・川崎 博・向井俊彦: 日化 75, 605~606 (1954).
- 7) M. D. NICOLA and T. W. GOODWIN: *Exptl. Cell Research*, 7, 23~31 (1954).
- 8) Gail GALASKO, J. HORA, T. P. TOUBE, B. C. L. WEEDON, D. ANDRÉ, M. BARBIER, E. LEDERER, and V. R. VILLANUEVA: *J. Chem. Soc. C*, 1264~1265 (1969).