キンギョの鮮やかな赤の源

アオコのどの色素が金魚を赤くするのか

東京農業大学第一高等学校　生物部魚類

奥田勝也　相部杏　橋川慧　湯浅堅心　齋藤綺香　井上朋広

目次

概要説明 p3

研究目的 p4

先行研究 p5

実験１ p7

実験２ p11

実験３ p14

実験４ p15

実験５ p19

実験６ p20

結論 p30

まとめ・今後の展望 p30

参考文献 p 31

謝辞 p 32

◦概要説明

キンギョの稚魚は、はじめは黒いがやがて褪色してアスタキサンチンなどの色素により鮮やかな赤になる。昨年度までの研究で、稚魚が赤くなるにはアオコが発生している水で飼育するとよいことが分かった。今年度は、アオコに含まれるどの色素が稚魚をより赤くしたのか調査を行った。

アオコに含まれるさまざまな色素を分離するために、カラムクロマトグラフィー法によって移動相ごとに色素を採取し、餌と混ぜてキンギョの稚魚に与えた。先行研究では、キンギョはβカロテンを体に取り込むと、それをアスタキサンチンに変えることがわかっている。ルテインをアスタキサンチンに変えることができないことも分かっている[1)]。今回行った実験の結果ではβカロテンを含むと考えられる画分を与えた個体のひれから抽出した色素の波長のデータと、薄層クロマトグラフィーのRf値は、アスタキサンチンのものと一致した。ルテインなどのキサントフィルと考えられる色素を与えた個体からはアスタキサンチンは検出できなかった。

しかし、色変わり後に体色の赤が最も濃くなった個体は、βカロテンのみを与えた実験区のものではなく、カラムクロマトグラフィー法で一番目に抽出する画分を与えたものであった。本研究では、稚魚の褪色において赤色を濃くする色素の所在を明らかにした。

◦研究目的

キンギョにはさまざまな品種があるが、赤い品種の魚は生まれたときから赤い色がついているわけではなく、色変わりをして赤い色になる。この赤い色の正体はルテインやアスタキサンチンやアスタキサンチンがエステル化したものであることが分かっている[2)]。キンギョの観賞価値を左右するものの１つに、体色がある。特に、リュウキンなどの赤い品種の場合は赤が濃いほうが、観賞価値があるとされる。しかし、自宅で生まれたキンギョの稚魚を透明な飼育水で育てると、色変わりが完了した個体の体色が、市販されている一般の赤い個体の色に比べ薄かった。また、部で見学した養殖池では、キンギョはアオコが発生した環境で飼育されていた。そこで、色変わりが完了するまでの期間にアオコを摂取することが、赤い個体を育て上げるのに効果があると考え、具体的にアオコに含まれるどのような色素がキンギョの赤色に影響しているのかを調べるため研究を行った。

リュウキンの褪色（色変わり）の様子

図１　琉金の褪色の様子

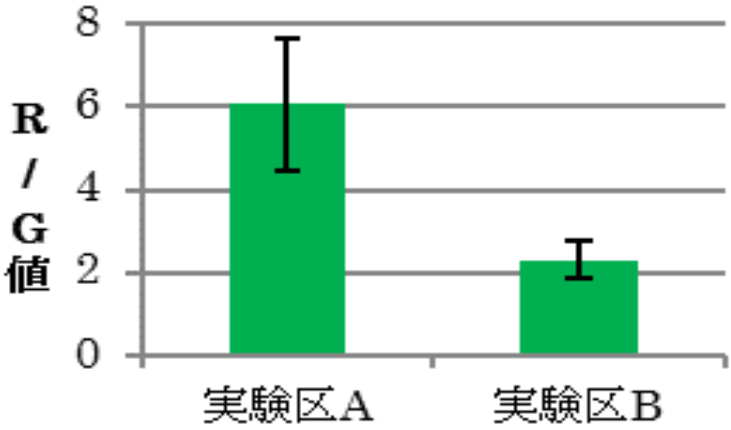
◦先行研究及びこれまでの私たちの研究で分かっていること

これまでの私たちの研究で、同じ親から生まれたリュウキンの稚魚を用いてアオコが含まれている水で色変わりが完了するまでの期間キンギョを飼育すると、透明な水で育てているものに比べ、赤色が濃くなることが分かった。

アオコが発生した飼育水で飼育したもの･実験区 A と透明な水で飼育したもの・実験区 B では赤色の濃さが異なる

図 2　左：実験区 A　　右：実験区 B

次に、画像編集ソフトを用いて、RGB 値を測定し、赤色の濃度の目安とされる[3] R/G 値を算出した



各リュウキンの R/G 値の平均を用いて t 検定を行ったところ、有意差があることが認められ、実験区 A のリュウキンのほうが実験区 B のリュウキンに比べて赤色が濃いことが分かった。

R/G 値の平均と標準偏差

またアオコには下図の 5 種類の植物プランクトンが多く含まれていた。

図 3

図 4

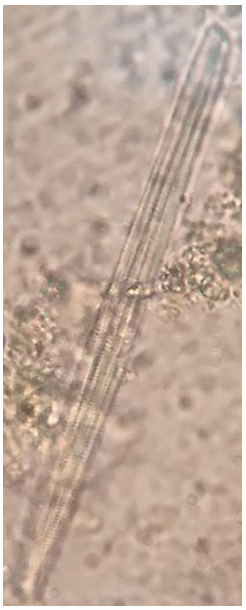


図 7

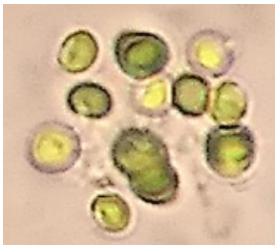


図 5

図 6

図 3 緑藻類　セレナストルム（*Selenastrum*）

図 4 緑藻類　クンショウモ（*Pediastrum duplex*）

図 5 緑藻類　ウェステラ（*Westella botryoides*）

図 6 緑藻類　イカダモ（*Desmodesmus quadricauda*）

図 7 珪藻類の一種

先行研究[4]では、アスタキサンチンを含む飼料を色変わり中のキンギョに与えても体色は色素を含まない飼料を与えたキンギョと変わらないが、カロテノイドに富む飼料を与えたところ体色が色素を含まない飼料を与えたキンギョと比べ赤色が濃くなることが分かっている。しかし具体的にキンギョを赤くする色素は判明していない。

また、キンギョの体内でのカロテノイドの代謝経路も明らかになっている[1]。

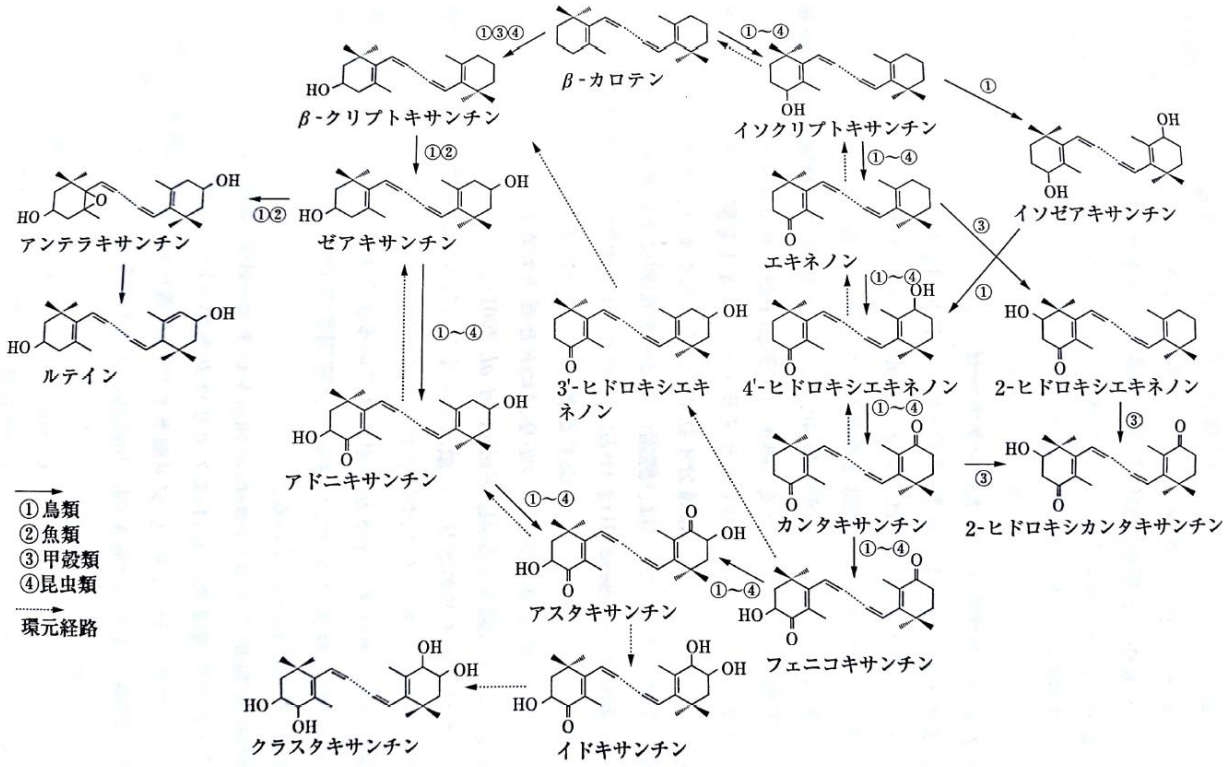


図８　キンギョ体内でのカロテノイドの代謝経路

そこで、今回の研究では、

①　アオコの色素の分離
②　アオコ色素の分光光度計による測定、薄層クロマトグラフィーでの調査
③　①②の結果をもとに餌を作成し、キンギョ稚魚に与え体色変化を調査

①～③を行うことで、アオコのどの色素がキンギョ稚魚を赤くしているのか明らかにすることにした。

◦実験１　アオコに含まれる色素を分けて取り出す

　アオコに含まれている色素を分光光度計で調べたり、餌に混ぜる為には色素を溶媒に溶かしたまま展開し、色素を取り出す必要があるので、まずパスツールピペットを用いてカラムクロマトグラフィー法の練習を行った。

パスツールピペットを用いたカラムクロマトグラフィー法

手順①　パスツールピペットの先端を折り、先端に脱脂綿を詰める

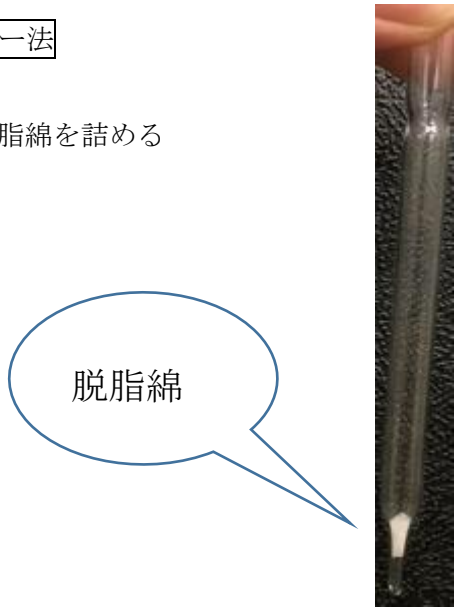


図 9

手順②　パスツールピペットにシリカゲルを詰め、石油エーテル:アセトン＝7:3 の展開液を入れ、シリカゲルに染み渡らせる。この際細い棒を用いて、シリカゲル中をかき混ぜ空気を抜き、シリカゲル中の条件を均一にするようにした。

図 10

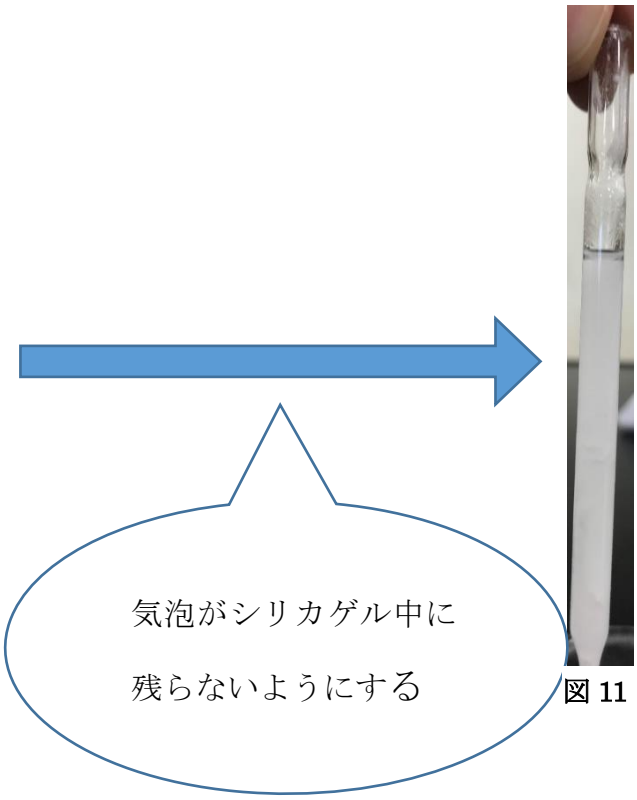


図 11

手順③　アオコの色素の抽出液が展開されていく際、真っ直ぐ流れていくように、ゆっくりと抽出液を注ぐ。抽出液が染み渡ったら、展開液を注ぎ、色素が展開され、採取できるまで展開液を注ぎ続ける

図 12

図 13

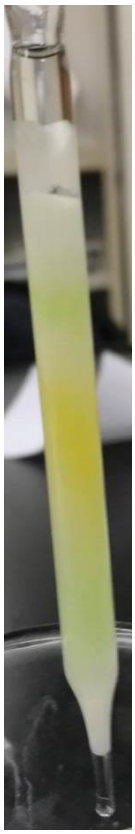


図 14

・結果

パスツールピペットを用いて、カラムクロマトグラフィー法の練習を行い、実験の中で石油エーテルとアセトンの比率を変えることで色素がきれいに展開されやすくなることが分かり、いくつかの比率を試し、石油エーテル:アセトン＝2:1 の展開液を使用するときれいに色素が分かれやすいことが分かった為、展開液を石油エーテル:アセトン＝2:1 に変更した。

エコノカラムを用いたカラムクロマトグラフィー法

基本的にはパスツールピペットを用いたカラムクロマトグラフィー法と手順は変わらないが、展開液を石油エーテル:アセトン＝2:1 に変更し、エコノカラムはパスツールピペットに比べ大きいので、シリカゲルと展開液を 1 度に全て注ぐのではなく、少量ずつ注ぎ、ガラス棒で空気を抜くようにした。最初に採取できた移動層を画分 A とし、以降採取できたものを画分 B、C とした。

図 15

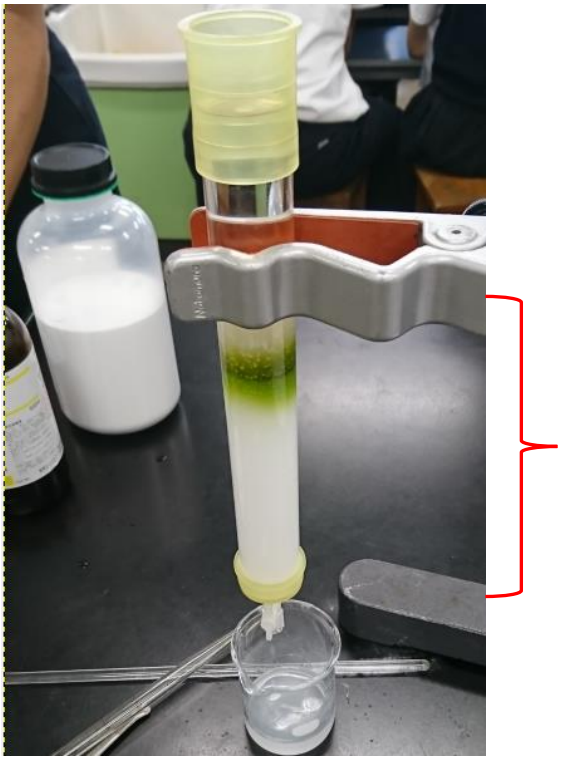


図 16

図 17

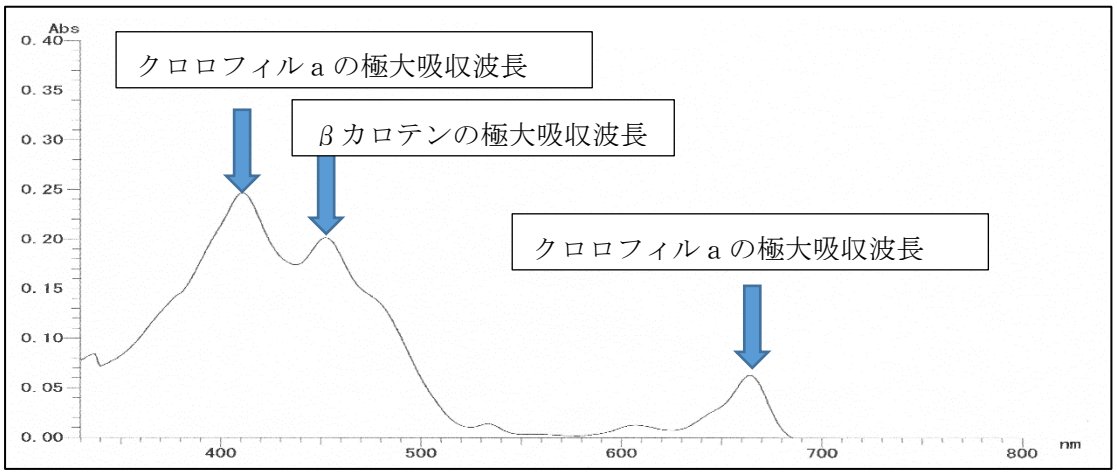
実験２　分光光度計を用いた、抽出した色素の吸収スペクトルの測定

方法　まずアオコから抽出されると考えられた市販の色素（βカロテン・クロロフィルａ・キサントフィル）の吸収スペクトルを測定し、実験１で抽出したサンプルとの比較を行う。

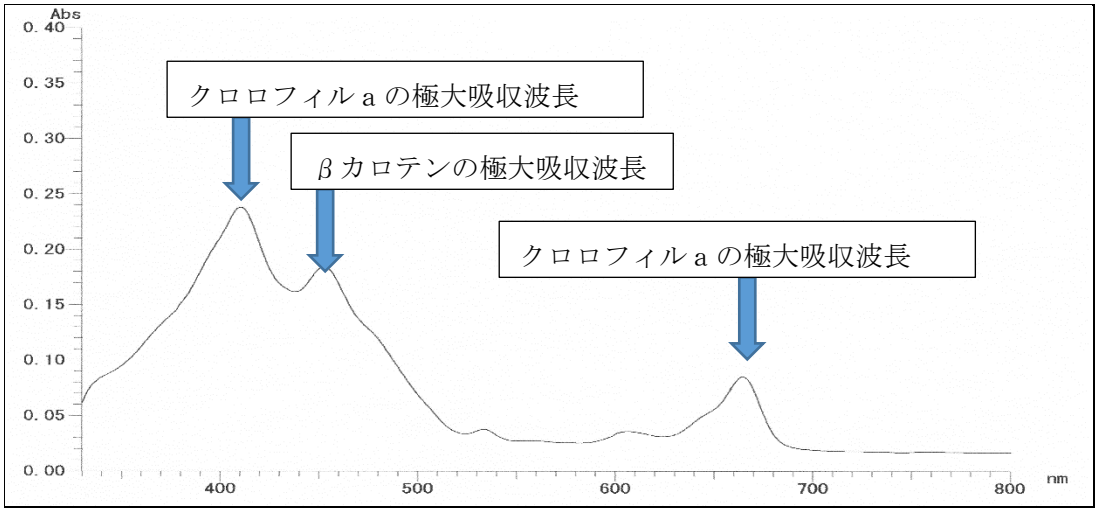
＊分光光度計は東京農業大学の武田先生からお借りした

図 18　分光光度計

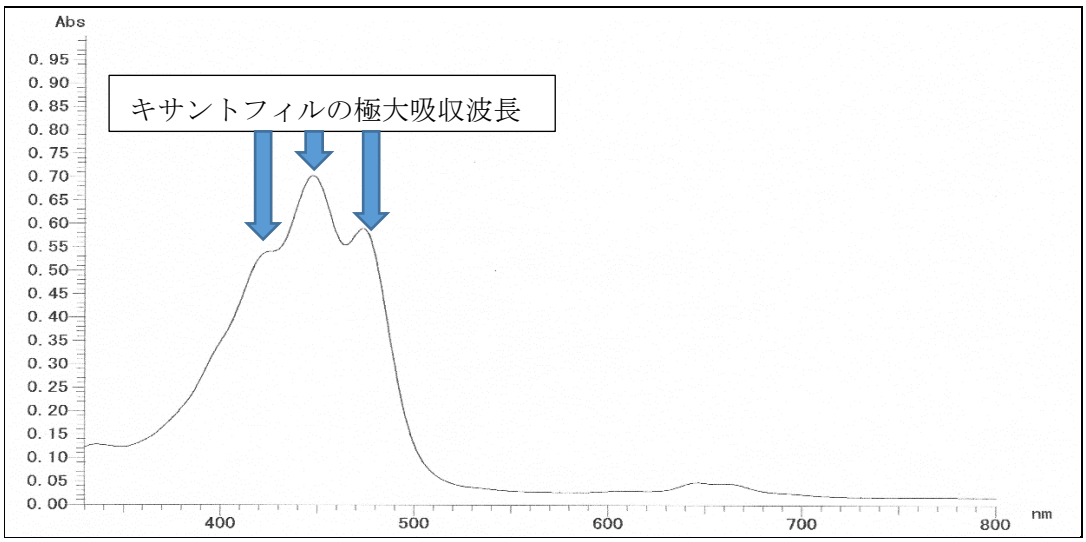
・結果と考察



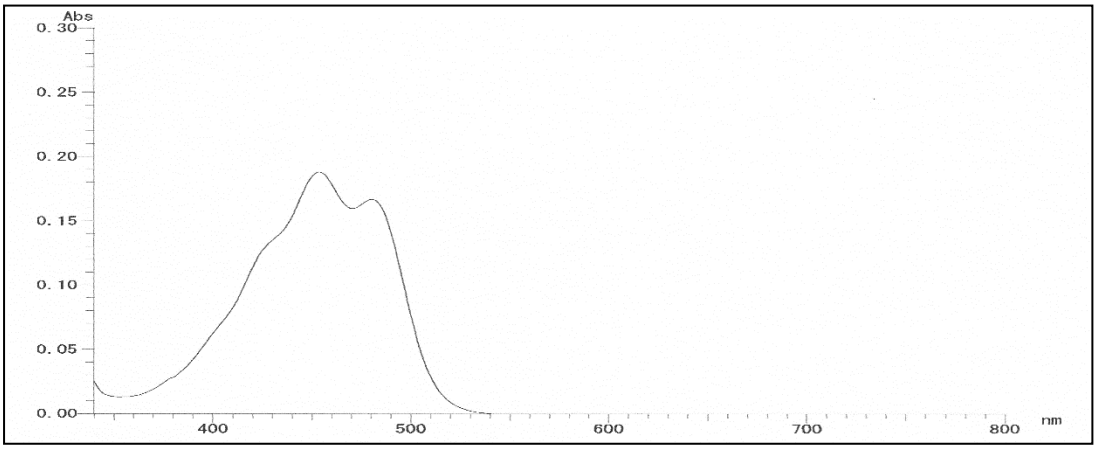
アオコ色素の画分Ａ



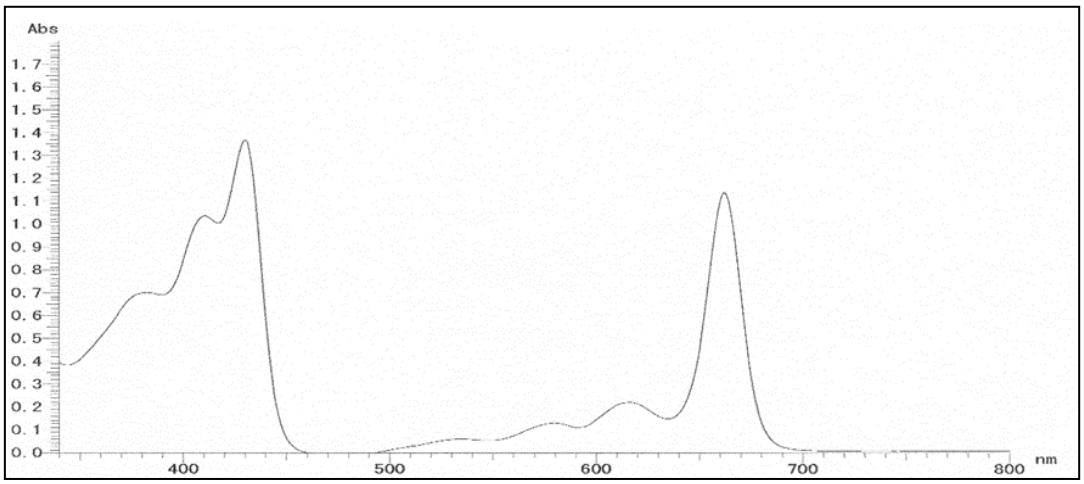
アオコ色素の画分Ｂ



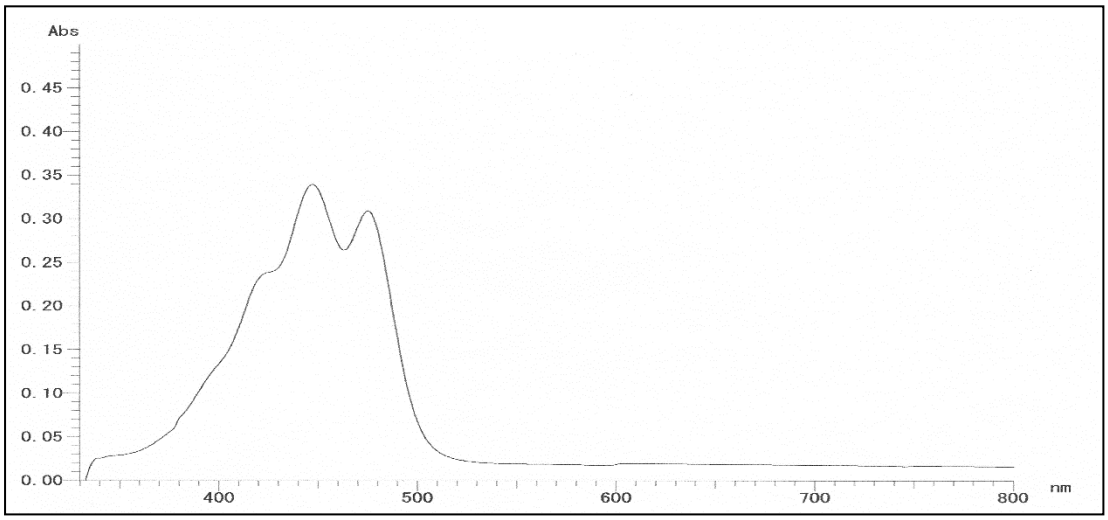
アオコ色素の画分Ｃ



βカロテン



クロロフィル a



キサントフィル

・考察

画分 C にはキサントフィルが含まれると考えられる。画分 A と画分 B にはクロロフィル a と β カロテンが含まれると考えられる。しかし、画分 A と B ではエコノカラムから出てきた時間は同じではなく、またエコノカラム中で移動している間の色も異なった。そのため、次に薄層クロマトグラフィーを用いて調査を行うことにした。

実験 3　薄層クロマトグラフィー法を用いて、アオコに含まれている色素の調査

・実験方法

TLC プレートの下側に鉛筆で線を引きその線上に左からアオコ色素の画分 A，画分 B，画分 C，展開していない抽出しただけのアオコ色素，β カロテン・クロロフィル a・キサントフィルを混ぜた溶液を展開した。

・結果

色素名	Rf 値
β カロテン	0,99
不明	0,93
クロロフィル	0,85
キサントフィル	0,71
不明	0,74
不明	0,25
不明	0,14

・考察

実験 2 と実験 3 の結果から、アオコの画分 A はβカロテン，画分 B はクロロフィル，画分 C はキサントフィルであると分かった。Rf 値については、Tibor Cserháti[5] の論文を参考にし、各色素と照らし合わせた。

◦実験４　色素の抽出及び飼料づくり

実験２のエコノカラムを用いたカラムクロマトグラフィー法の手順で色素の抽出を行った。この際一回の展開でとれる量を均一にするため、毎回 1g のアオコを 5 mℓのアセトンを溶媒にして抽出することとした。

この色素を分光光度計で調べ吸光度の数値から色素の濃度を割り出し、飼料に混ぜる色素の溶液の量を決めた。

また、四番目以降にカラム内で分離した画分 D，E（アオコの薄層クロマトグラフィー実験で Rf 値が 0.25 と 0.14 になったもの）は展開が止まり、カラム内にとどまったので、飼料作りには使用しないことにした。

それぞれの色素の濃度の求め方の式は日本光合成学会[6)]と農研機構[7)]の論文を参考にした。

βカロテンの濃度(μg/mℓ)＝－1.292×(A475)+3.698×(A492)＋0.131
クロロフィル a の濃度(μg/mℓ)＝12.25×(A663.6)－2.55×(A646.6)
注) (A475), (A492) ,(A663.6),(A646.6)はそれぞれ 475nm,492nm,663.6nm,646.6nm の吸光度である。

‣画分 A について

画分 A は実験 2、3 よりβカロテンであることが分かっているので、βカロテンの濃度を求める式を利用した。
画分 A のβカロテン濃度：－1.292×0.18+3.698×0.08＋0.131＝0.19428 μg/mℓ
画分 A はアセトンで 5 倍に希釈して分光光度計で吸光度を調べたので、濃度はこの結果の 5 倍となる
0.19428 μg/mℓ×5＝0.9714 μg/mℓ
1 度の展開で採取できる色素の溶液の量は約 5 mℓなので
0.9714 μg/mℓ×5 mℓ＝4.857 μg
よって、1 度の展開で採取できる色素の量は約 4.857 μgである。

‣画分 B について

画分 B は実験 2、3 よりクロロフィル a であることが分かっているので、クロロフィル a の濃度を求める式を利用した。
画分 B のクロロフィル濃度：12.25×0.85－2.55×0.5＝9.1375 μg/mℓ
画分 B はアセトンで 5 倍に希釈して分光光度計で吸光度を調べたので、濃度はこの結果の

5 倍となる

9.1375 μg/mℓ×5＝45.6875 μg/mℓ

1 度の展開で採取できる色素の溶液の量は約 5.5 mℓなので

45.6875 μg/mℓ×5.5 mℓ＝251.28125 μg

よって、1 度の展開で採取できる色素の量は約 251.28125 μg

‣画分 C について

画分 C は実験 3 よりキサントフィルであることが分かっているが、濃度を求める式が見つからなかった。キサントフィルはβカロテンと吸光度曲線がほとんど同じなので性質が似ていると考え、βカロテンの濃度を求める式を利用した。

画分 C のβカロテン濃度：－1.292×0.70+3.698×0.59＋0.131＝1.40842 mg/mℓ

画分 C はアセトンで希釈せずに分光光度計で吸光度を調べたので、濃度はこの結果の通りである。

1 度の展開で採取できる色素の溶液の量は約 60 mℓなので

1.40842 μg/mℓ×60 mℓ＝84.5052 μg

よって、1 度の展開で採取できる色素の量は約 84.5052 μg

計算結果より一度の展開で採取できる色素の量が分かった。

混ぜる色素の比率は松野隆男・松高寿子・永田誠一の論文[2)] を参考に 10g の餌に 2 mgの餌を混ぜることにしたが、画分 A は 1 度の展開で採取できる量が少なく、多くの量を採取することが難しかった為、10g の餌に対し、0.1 mgの色素を混ぜた。

よって 1 度の展開で採取できる色素に混ぜる餌の量は以下のとおりである。

画分 A:約 0.47g

画分 B:約 1.26g

画分 C:約 0.42g

‣実験用飼料の作り方

実験用の飼料に使う金魚の餌は色素が含まれていないことを薄層クロマトグラフィー法で確認した育成用の餌を使用した。

手順①餌がアセトンや石油エーテルで変性することを防ぐために、色素の溶液を冷蔵庫に入れ乾燥させ、薬品をとばす。

手順②すり潰した餌をそれぞれの色素と混ぜ、色素と餌が均一に混ざるよう、少量の水で練った。

手順③完成した飼料を 2g ずつチューブに入れ、色素の変性と飼料の腐敗を防ぐため、冷凍庫に入れ保存した。

◦実験５　キンギョの稚魚を用いた色揚げの実験

・実験内容，方法

同時期に同じ親から生まれたリュウキンという種類のキンギョの稚魚を用いて、アオコから採取した３つの画分の中のどの色素がキンギョの色揚げに効果があるのかを調べた。

実験に用いたキンギョの数は色変わり中のまだ体色が黒いキンギョが 20 匹である。

色変わり中のまだ黒いリュウキンの稚魚を５匹ずつ、４つの実験区に分け、（実験区１は色素を与えない対照区、実験区 2～4 はそれぞれ画分 A～C を別々に与えた）稚魚５匹が 30 分ほどで食べきれる量である 2g のえさを１日分として与え、約 40 日間実験を行った。

実験開始時と終了時にキンギョの稚魚の写真を撮り、スマートフォンアプリで稚魚の頭・尾びれの付け根・中央の尾びれの先端の３か所の R/G 値の平均を求めた。

なお、写真に関しては照明や明るさはすべて等しくした。

・結果

図 20　褪色前のキンギョ

飼料を与え続けて

図 21　実験区 1

図 22　実験区 2

図 23　実験区 3

図 24　実験区 4

色素を与えていない区	画分 A を与えた区	画分 B を与えた区	画分 C を与えた区

R/G 値の結果は

実験区 1	実験区 2	実験区 3	実験区 4
1.22	1.43	1.36	1.25

・考察

　この結果から、実験区 2 の個体が最も赤くなったことが分かり、アオコの画分 A がキンギョの赤い色素の合成に強く関係していると言える。

◦実験 5　β カロテンの効果を調査

・実験内容

実験 4 でアオコ色素の画分 A が最もキンギョを赤くしたので、画分 A に含まれると考えられる β カロテンを試薬として購入し、それを混ぜた餌でも同様の効果があるのかを調べた。画分 A に含まれていると考えた β カロテン量よりも、松野隆男・松高寿子・永田誠一の論文[2)] を参考に画分 A の 20 倍の量が含まれるように餌に混ぜた。実験には色変わり中のまだ体色が黒いキンギョを 5 匹用いた。これを実験区 5 とした。

・結果

図 25　実験区 5 の褪色後のキンギョ

実験区 5 の R/G 値
1.32

・考察

実験区 2 よりも、与えた β カロテンの量は 20 倍であるが、R/G 値は 1.32 であり、実験区 2 の個体のもの（R/G 値は 1.43）より低くなった。カラムクロマトグラフィー法で一番初めに抽出できる画分の β カロテン以外の色素が、赤を濃くするのではないか。

◦実験６　実験４・５に用いたキンギョのひれとふんに含まれる色素の調査

～与えた色素は体内でどのような色素を生成したのか。色素は確かに体内に取り込まれているのか　～

・実験内容，方法

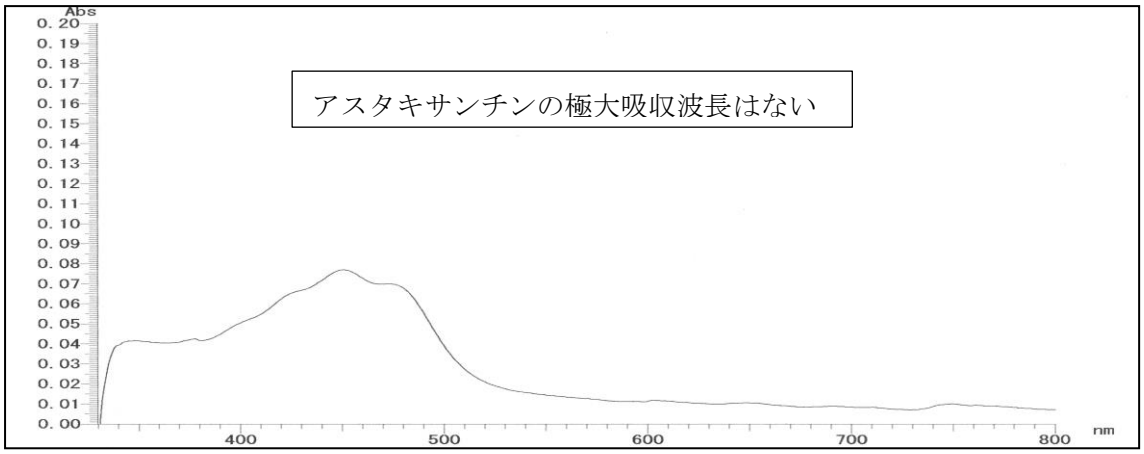
体色変化が終わった実験 4，5 のキンギョから少量切り取った尾びれと実験 4，5 のキンギョが出したふんに含まれる色素をアセトンで抽出し分光光度計と薄層クロマトグラフィー法で調べた。

Chhorn Lim、 David J. Sessa[8)] によるとアスタキサンチンのアセトン中での吸収波長の極大は 475nm であり、このことを参考に分析した。

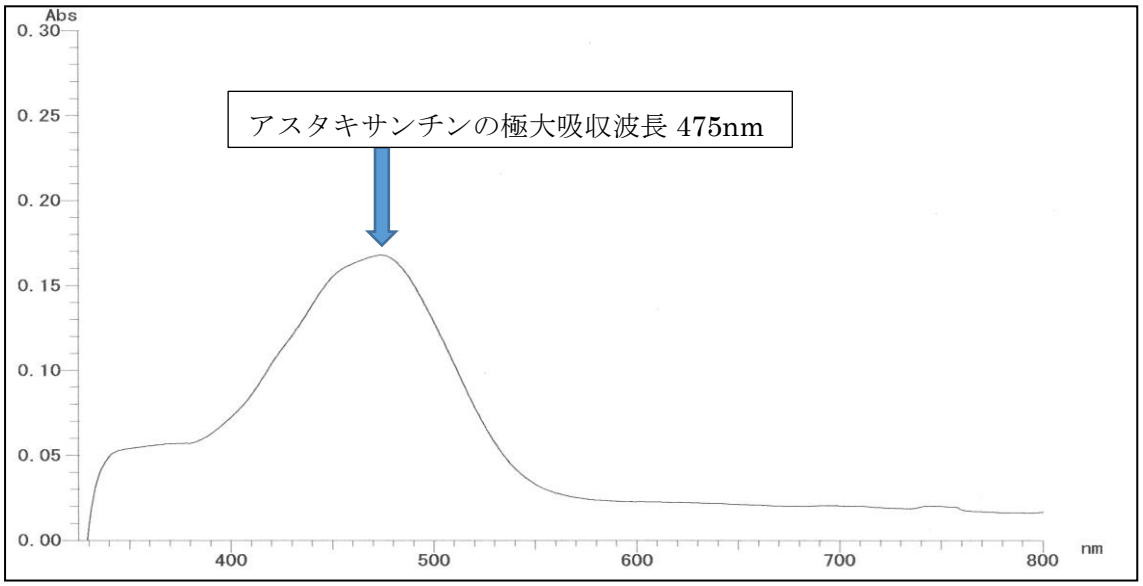
また、東京農業大学の武田教授からオキアミを提供していただき、これを薄層クロマトグラフィー法で比較対象に用いた。オキアミにはアスタキサンチン、アスタキサンチン　モノエステル、アスタキサンチン　ジエステルが含まれており、これらの Rf 値について教授していただいた。展開液の組成は、石油エーテル:アセトン＝2:1 である。

これまでの実験の比較対象として、赤いリュウキン成魚のひれについても薄層クロマトグラフィーの実験を行った。

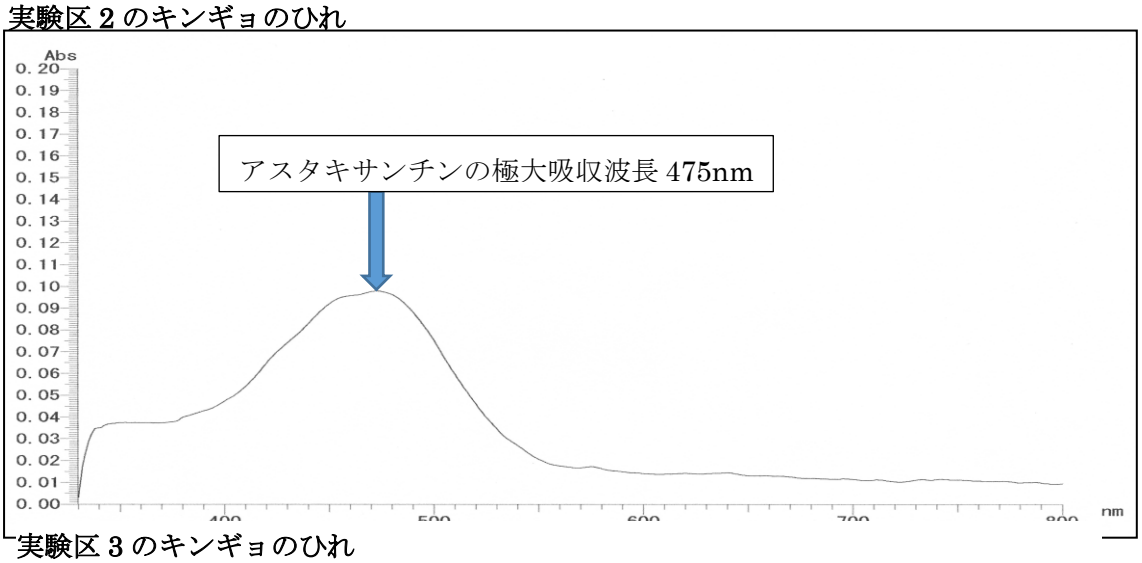
‣分光光度計の結果



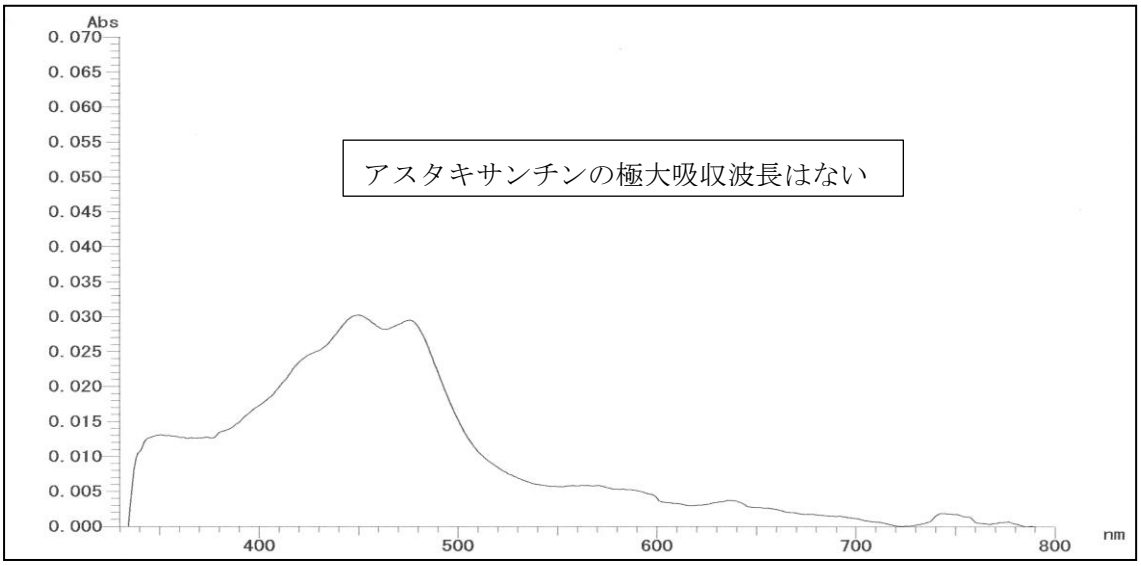
実験区 1 のキンギョのひれ



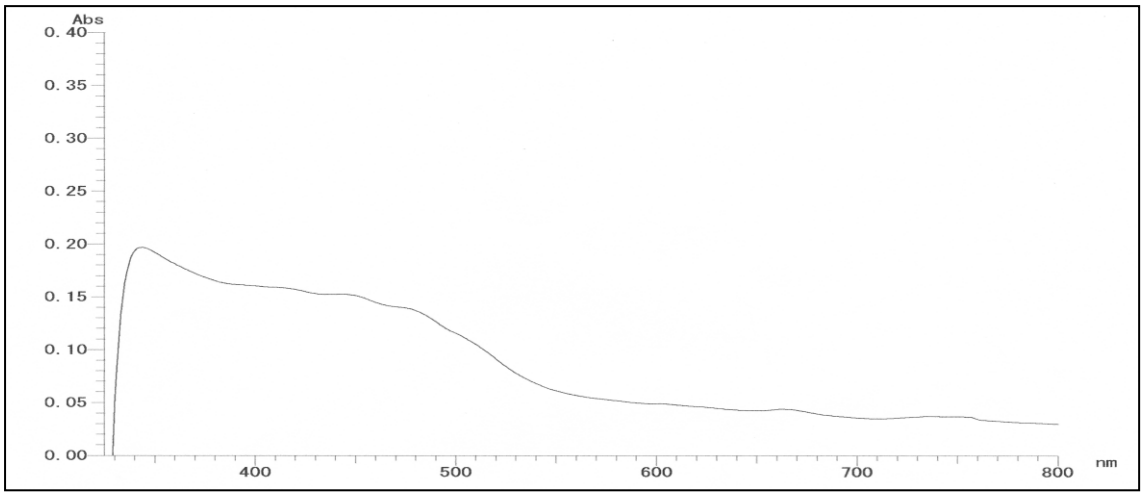
実験区 2 のキンギョのひれ



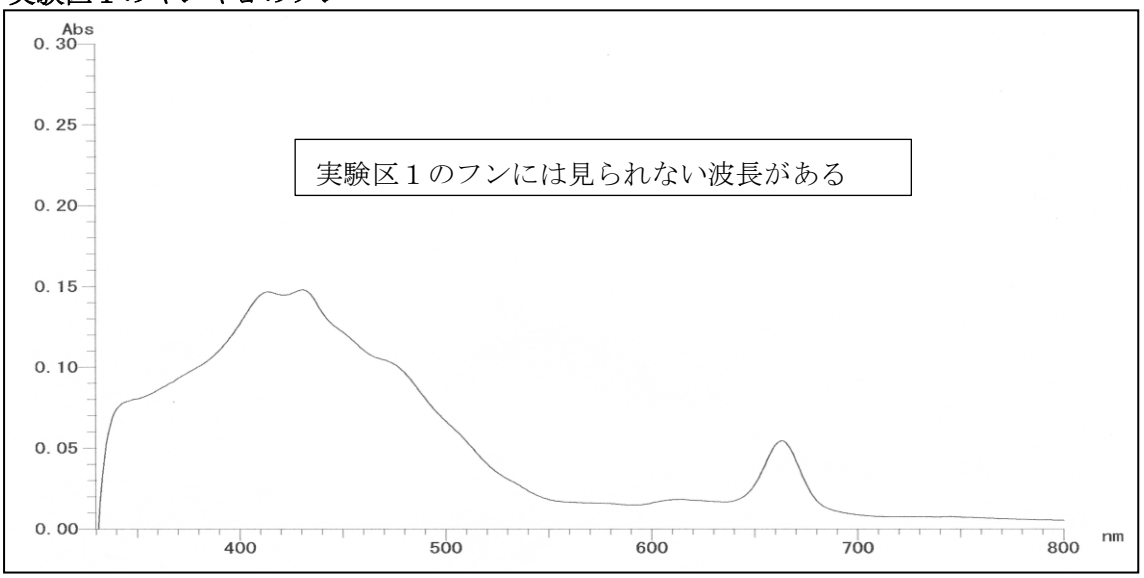
実験区 3 のキンギョのひれ



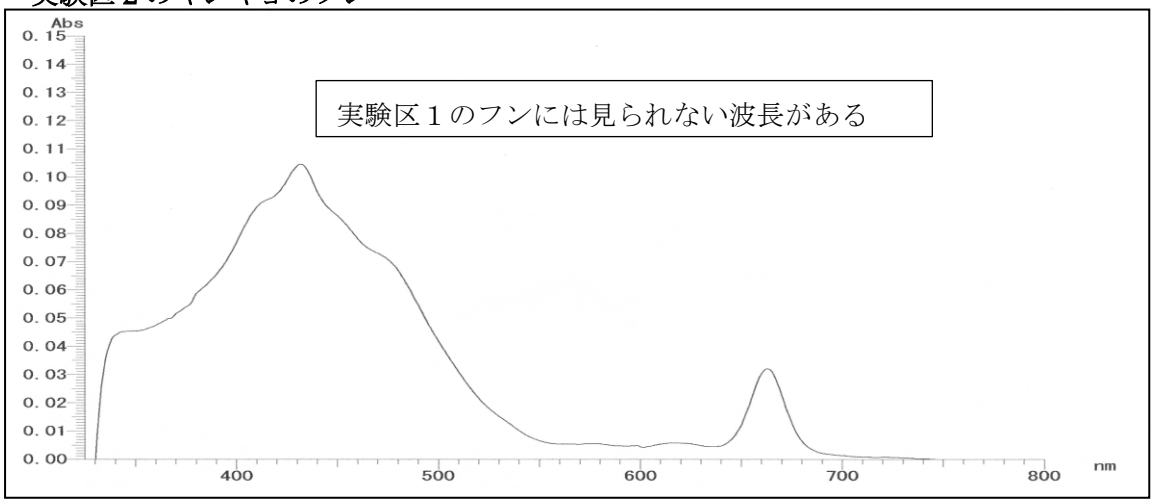
実験区 4 のキンギョのひれ



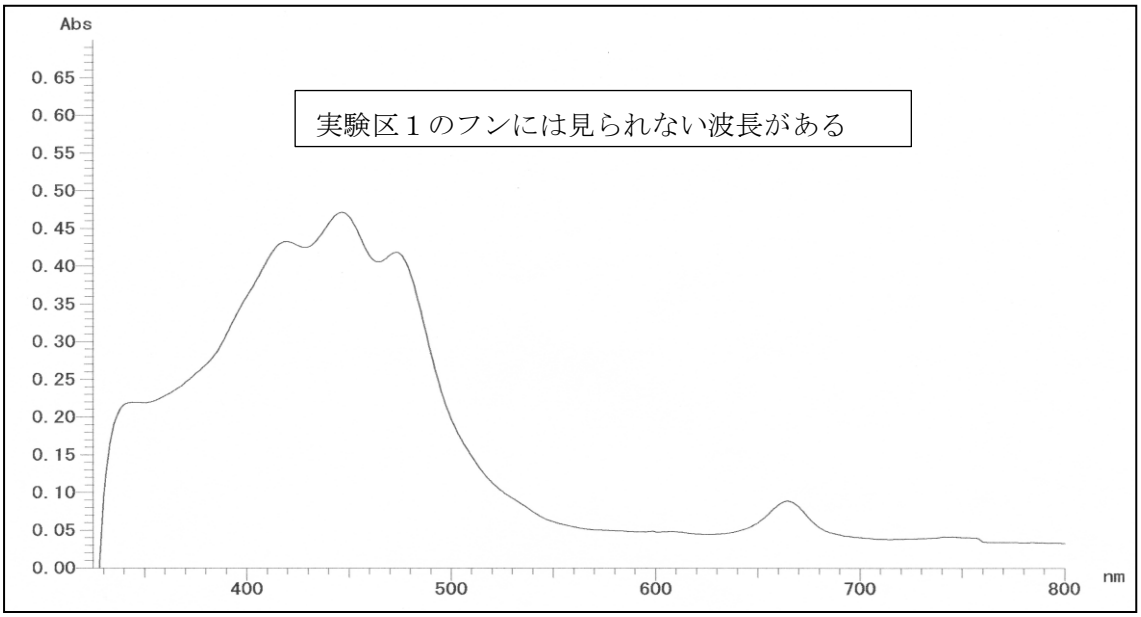
実験区１のキンギョのフン



実験区２のキンギョのフン

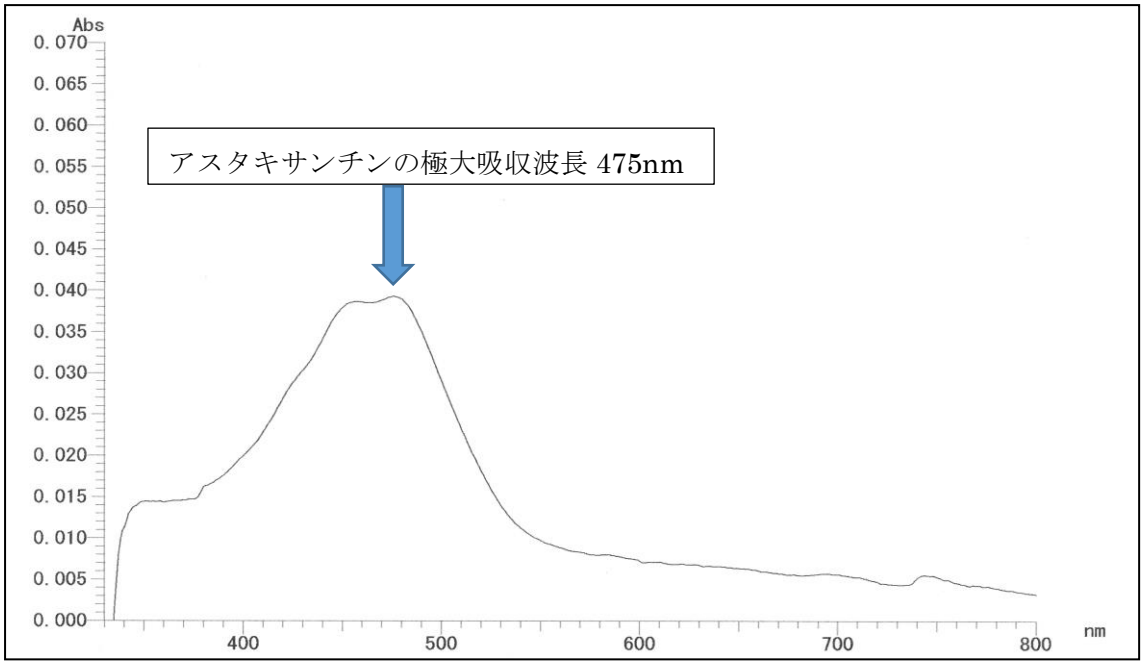


実験区３のキンギョのフン

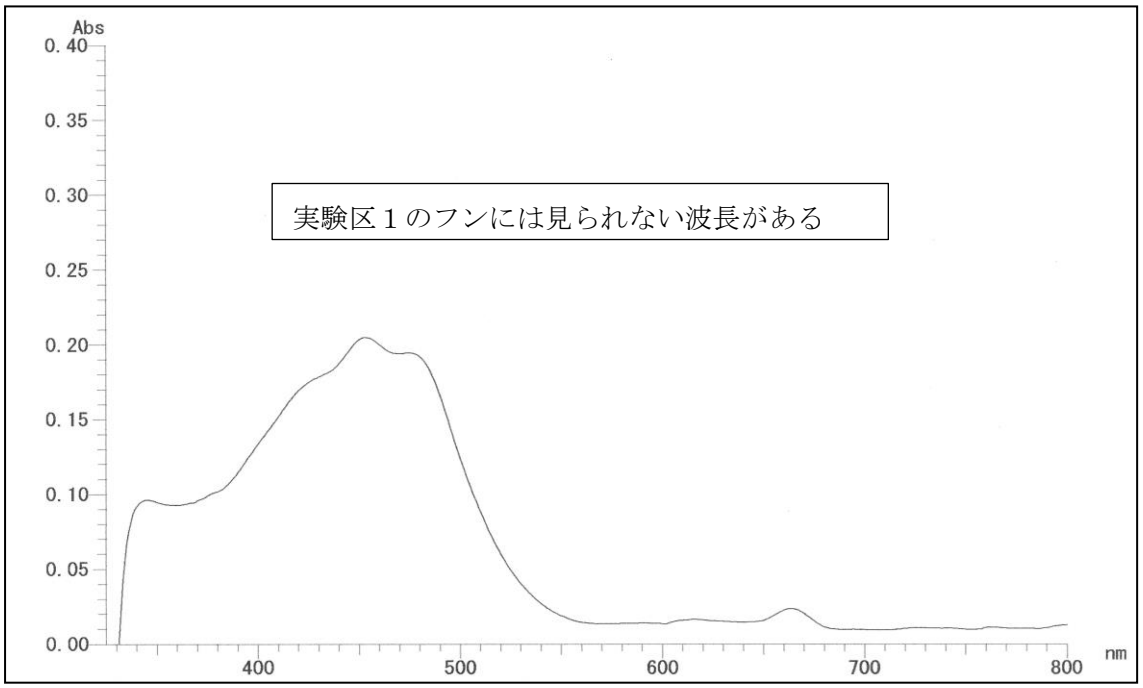


実験区４のキンギョのフン

実験区５の褪色が終わった後、実験区５のキンギョのひれとふんを分光光度計で調べた

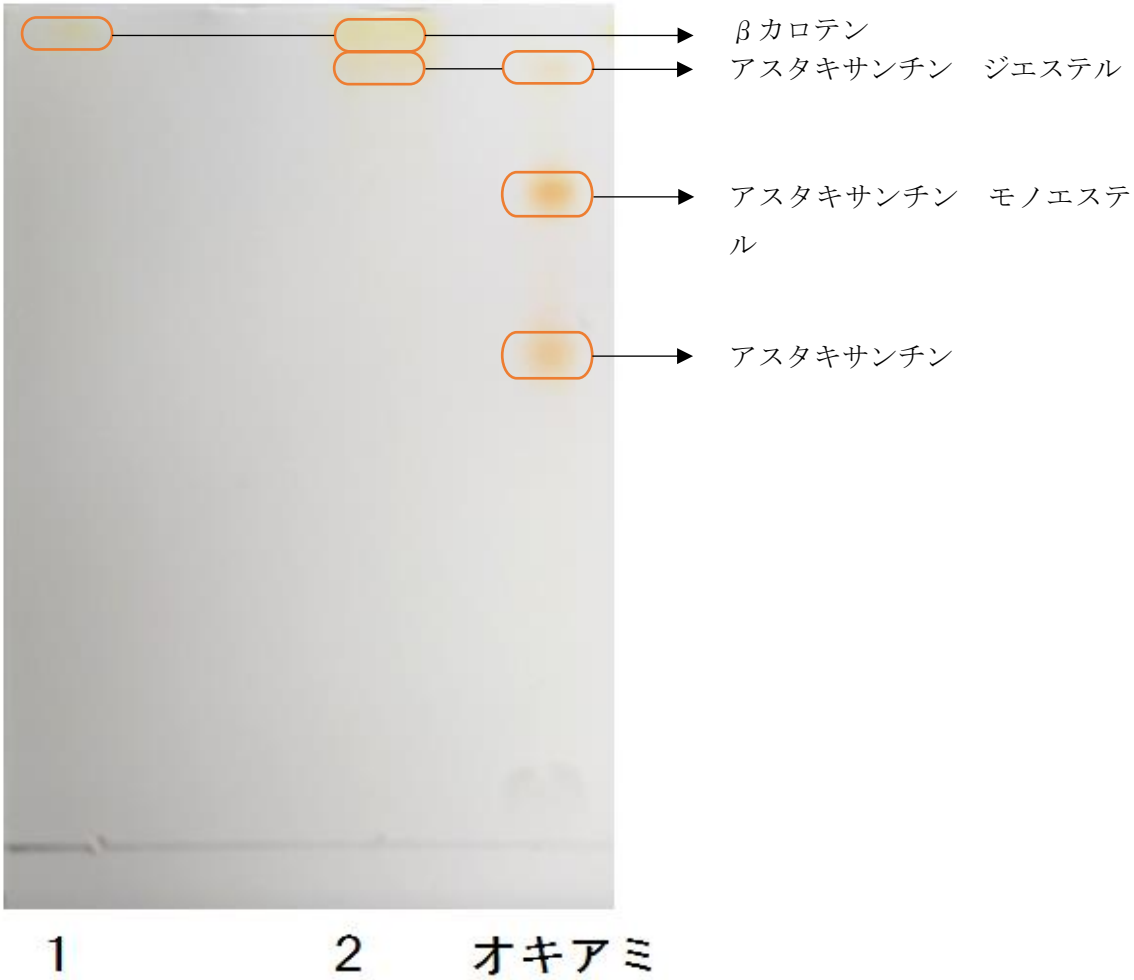


実験区５のキンギョのヒレ

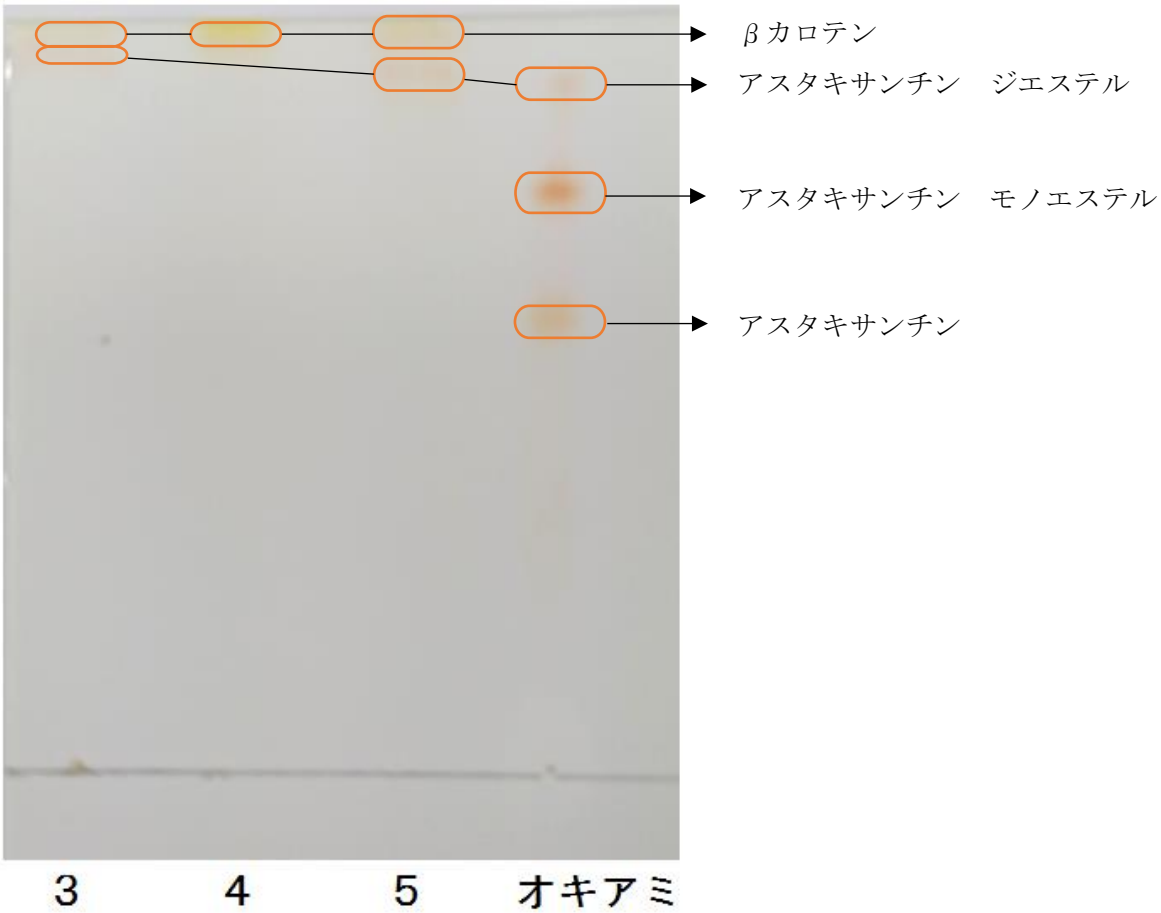


実験区５のキンギョのフン

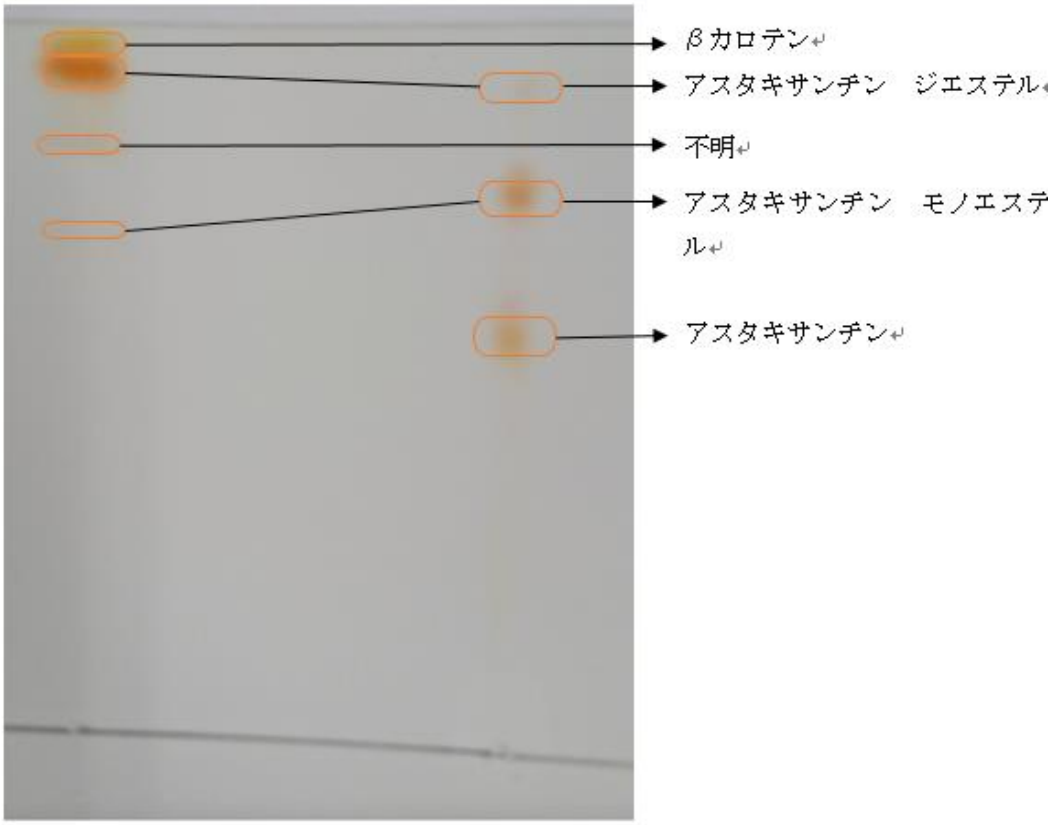
‣薄層クロマトグラフィー法の結果



個体 / バンド	1	2	オキアミ	βカロテン
①	0.98	0.98	0.92	0.98
②		0.94	0.79	
③			0.60	



個体 バンド	3	4	5	オキアミ
①	0.98	0.98	0.98	0.93
②	0.94		0.93	0.78
③				0.64



赤いリュウキン成魚　　オキアミ

個体 / バンド	赤いリュウキン成魚	オキアミ
①	0.98	0.93
②	0.94	0.78
③	0.82	0.59
④	0.72	

まとめ

ひれ

	分光光度計　データ	薄層クロマト　データ		R/G値
	アスタキサンチン	βカロテン	アスタキサンチン類	
実験区１（色素無添加）	無	有	無	1.22
実験区２（画分A添加）	有	有	有	1.43
実験区３（画分B添加）	有	有	有	1.36
実験区４（画分C添加）	無	有	無	1.25
実験区５（βカロテン添加）	有	有	有	1.32

ふん

実験区１と実験区２～５の波長は異なる。実験区５はβカロテンの波長と似ている

・考察

キンギョのひれの色素の吸光度曲線と薄層クロマトグラフィーの結果より、実験区 2, 3, 5 のキンギョのひれにはβカロテンとアスタキサンチン　ジエステルが含まれるが実験区 1，4 のキンギョのひれにはβカロテンしか含まれていないと分かった。

βカロテンを与えていない実験区 1，3，4 のキンギョのひれにβカロテンが含まれていた理由は、まず実験区 3 に関してはカラムクロマトグラフィー法で画分 A と画分 B を完全に分離することができず、画分 A の主成分であるβカロテンが画分 B に混ざってしまったからだと思われる。そのため、実験 5 において体色が赤くなったのではないかと考える。次に実験区 1，4 に関しては実験区の清掃を行ってから、次の清掃を行うまでの間に、発生してしまったアオコを微量なりとも食べてしまったからだと思われる。

また、キサントフィルの一つであるルテインはアスタキサンチンに生成されないことが分かっている[1)]。実験区 4 に含まれるキサントフィルと考えられる色素にはルテインが含まれており、それを与えたところでアスタキサンチンは生成されなかったのではないか。

実験区 2，3，5 のキンギョのひれにアスタキサンチン　ジエステルが含まれていた理由はキンギョの体内でβカロテンが代謝されアスタキサンチンに変化したためだと考えられる。しかし、実験区 1，4 のキンギョのひれにはアスタキサンチン　ジエステルは含まれていなかった。これはβカロテンを摂取はしていたものの、その量が少なく、アスタキサンチンに変化しなかった、もしくはアスタキサンチンに変化した量が少なく、薄層クロマトグラフィー法では検出できなかったためだと考えられる。

また、キンギョのふんについては、薄層クロマトグラフィーでは色素の違いを見ることはできなかった。しかし、ふんの色素の吸光度曲線では明確な違いを見ることができた。実験区 2，実験区 3 のキンギョは 665nm にはっきりと波ができており、これはアオコ色素の画分 A，画分 B の吸光度曲線と一致する。また、実験区 4 のキンギョも 665nm にはっきりと波ができており、これは画分 C の吸光度曲線とは完全に一致しないが、これは画分 B が画分 C に混ざってしまったからだと考えられる。しかし、実験区 5 のキンギョは 665nm にはっきりと波はできておらず、このことは、実験 2 で得られたβカロテン単体の吸光度曲線と一致する。これらのことより、実験 5 においてキンギョは餌と共に色素を食べていたことが明らかになった。

今回の実験で最も濃くなった実験区 2 の個体であるが、赤いリュウキン成魚の薄層クロマトグラフィーの結果と比べるとアスタキサンチンの量は少ないことがわかる。まだまだ、目的とする効果は得られていない。

◦結論

今回行った研究により、アオコから抽出したβカロテンを主成分とする画分 A を含んだ飼料を褪色中のキンギョの稚魚に与えることで金魚の赤色が最も濃くなると分かった。また、βカロテン単体を画分 A の約 20 倍の濃度にして与えてもキンギョはほとんど赤くならなかった。このことからβカロテンには金魚を赤くする効果があるが、その効果を最も強く持つのはアオコ色素の画分 A に含まれるβカロテンとは異なる色素である。

◦今後の課題・展望

今回の実験では 1 つの実験区で 5 匹の褪色中のキンギョを育てたが、全く赤くならず、白くなった金魚が多かった。これは今回使用した稚魚の親が両親ともに赤と白が混ざった模様の個体であり、そもそも赤くなるという遺伝子を持っていなかったからだと考えられる。次回は稚魚の親は両親ともに白がなく完全に赤色のキンギョを使用し、遺伝的に赤色になる稚魚を使用したい。

また、カラムクロマトグラフィー法の回数を重ねて、さらに多くの画分 A を採取し、餌に与え、その効果を見ていきたい。今回は画分を単独で与えたが、次はそれぞれの画分を混ぜて与えることもしてみたい。ただ、アオコは大量生産が難しく最終的には金魚を赤くする色素を野菜等の大量に確保できるものから採取し、キンギョを赤くする餌の開発を現実的なものとしたい。

◦参考文献

１）高市真一　（2006）「カロテノイド　その多様性と生理活性」裳華房

２）松野隆男・松高寿子・永田誠一（1981）キンギョにおけるルテインおよびゼアキサンチンのケトカロテノイドへの生体代謝　日本水産学会誌,**47** 巻 **5** 号,605-611.

３）豊澤 里早, 高島 聖和, 村上 徹, 山岡 到保, 角田 出（2007）ラビリンチュラの経口投与によるキンギョの体色改善　日本海水学会誌,**61** 巻 **4** 号,235-240.

４）平尾秀一・小沢聡子・末永靖子（1963）魚類のカロチノイド色素に関する研究Ⅱ　キンギョの体色変化に対する飼料カロチノイドの影響　日本水産学会誌,**29** 巻,382 -386.

５）Tibor Cserháti（2006）「Liquid Chromatography of Natural Pigments and Synthetic Dyes, Volume 71」elsevier

６）クロロフィル定量法　日本光合成学会
http://photosyn.jp/pwiki/index.php?%E3%82%AF%E3%83%AD%E3%83%AD%E3%83%95%E3%82%A3%E3%83%AB%E5%AE%9A%E9%87%8F%E6%B3%95
（2018 年 9 月 29 日）

７）ニンジンに含まれるα-カロテンとβ-カロテンの簡易分別定量法　農研機構
http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/vegetea/2006/vegetea06-16.html
（2018 年 9 月 29 日）

８）Chhorn Lim、 David J. Sessa(1995)「Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture」aocs press

◦謝辞
ご多忙の中、本研究に終始暖かくご指導してくださった生物部顧問の川澄太一先生、また分光光度計を貸して下さった東京農業大学武田晃治教授、キンギョの餌を提供して下さった株式会社キョーリンの皆様に感謝の意を表します。