

Kingyo, 道

月刊
金魚道

2019年4月号

vol.
160

- 金魚の履歴書
らんちゅう飼育を科学する(2)
- 金魚讃歌
細密画家 陳景全の
金魚アートの世界 PartII
- 金魚品評会報告
第12回
中日本トサキン愛好会品評大会
- 金魚養殖マニュアル
ランチュウ中心
金魚の飼育と繁殖(70)
- 金魚愛好家訪問
愛知県豊橋市
上名 良治さん
- 観賞魚専門店紹介
静岡県浜松市
メダ力屋 猫飯
- 金魚トピックス
東京農業大学第一高等学校
生物部 魚類 研究レポート
キンギョの鮮やかな赤の源
～アオコのどの色素が
キンギョを赤くするのか～
- 金魚品評会報告
第41回
国際らんちゅう品評大会
- 金魚品評会報告
第48回
静岡県金魚品評大会
- 金魚品評会報告
第25回
金魚日本一大会

4月の誕生金魚
琉金／キャリコ



東京農業大学第一高等学校
生物部 魚類 研究レポート

この研究は、2018年、東京農業大学第一高等学校の生物部魚類班の部員たちの実験によって得られた結果をまとめたものです。金魚の鮮やかな赤い色は何によって促進されるのか、仮説を立て、実験を重ねて彼らなりの結論を導き出した上、更なる展望・問題提起がなされています。

キンギョの鮮やかな赤の源 ～アオコのどの色素がキンギョを赤くするのか～

奥田勝也、相部杏、橋川慧、湯浅堅心、齋藤綺香、井上朋広

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分かっている。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的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に研究を行った。

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。



図2 水で飼育したアオコが発生したもの（実験区A）では赤色の濃さが異なる（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なる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。

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。

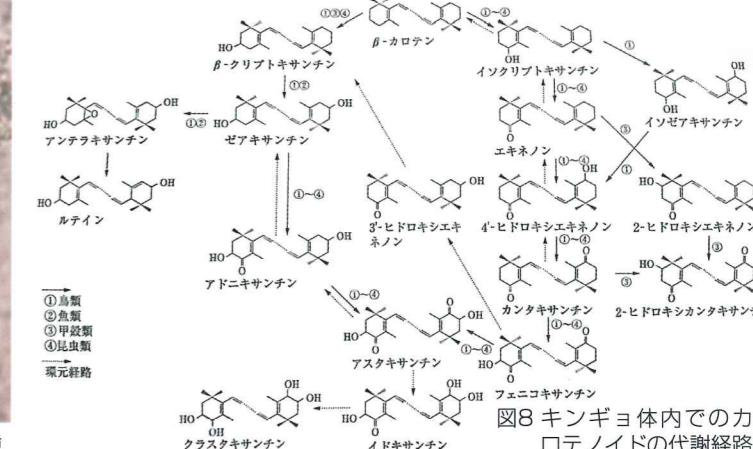
先行研究⁴⁾では、アスタキサンチンを含む飼料を色わり中のキンギョに与えても体色は色素を含まない飼料をえたキンギョと変わらないが、カロテノイドに富む飼料を与えたところ体色が色素を含まない飼料を与えたキンギョと比べ赤色が濃くなることが分かっている。しかし具体的にキンギョを赤くする色素は判明していない。



図3 緑藻類 セラナストルム (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

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⁾。



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、③①②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、の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、分光光度計で調べて餌に混ぜる為には、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、まずパストールリ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。

パストールリピペットを用いたカラムクロマトグラフィー法



手順①
パストール
リピペットの
先端を折
り、先端に
脱脂綿を詰
める
→ 脱脂綿
図9

手順② パストー
ルリピペットにシ
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 → 気泡
がないようにす
る
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、採取可
能まで展開液
を注ぎ続ける
図12 → 色素
が分かれてい
く
図13

図14

結果 パストールリピペットを用いて、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。



キンギョの鮮やかな赤の源

～アオコのどの色素がキンギョを赤くするのか～

エコノカラムを用いた

カラムクロマトグラフィー法

基本的にはパスト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ト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、少しづつ注ぎ、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。

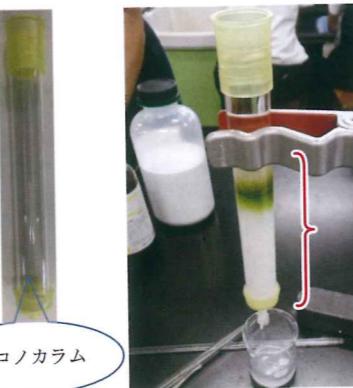


図15

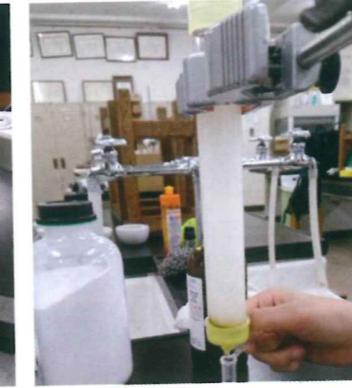


図16 色素が分かれていく

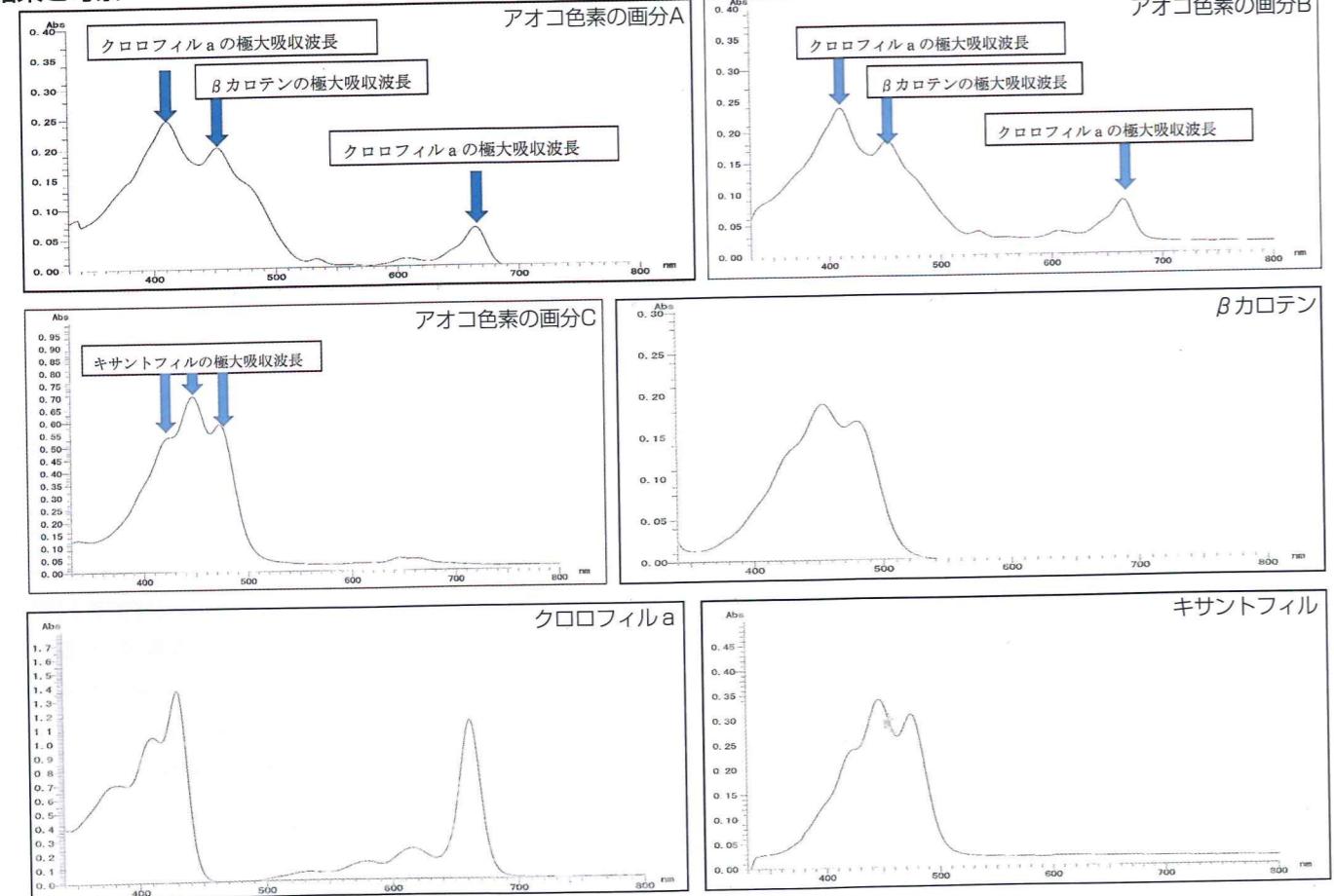


図17 色素を採取する

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。

結果と考察

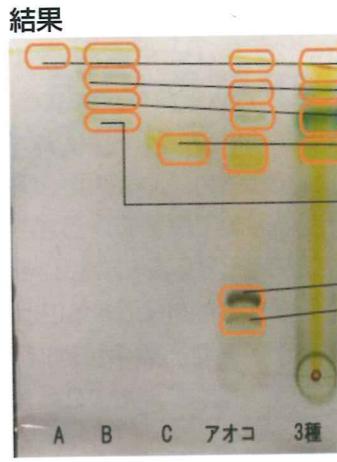


考察 画分Cにはキサントフィルが含まれると考えられる。画分Aと画分Bにはクロロフィルaと β カロテンが含まれると考えられる。しかし、画分AとBではエコノカラムから出てきた時間は同じではなく、またエコノカラム中で移動している間の色も異なった。そのため、次に薄層クロマトグラフィーを用いて調査を行うことにした。

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。

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 Cserháti⁵⁾の論文を参考にし、各色素と照らし合わせた。



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

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1回の展開でどれも量を均一にするため、毎回1gのアオコを5mL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、4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になつたものは展開が止まり、カラム内にとどまつたので、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。

$$\beta\text{カロテンの濃度}(\mu\text{g/mL}) = -1.292 \times (A475) + 3.698 \times (A492) + 0.131$$

$$\text{クロロフィルaの濃度}(\mu\text{g/mL}) = 12.25 \times (A663.6) - 2.55 \times (A646.6)$$

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: $-1.292 \times 0.18 + 3.698 \times 0.08 + 0.131 = 0.19428 \mu\text{g/mL}$

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。

$$0.19428 \mu\text{g/mL} \times 5 = 0.9714 \mu\text{g/mL}$$

1度の展開で採取できる色素の溶液の量は約5mLなので、 $0.9714 \mu\text{g/mL} \times 5 \text{mL} = 4.857 \mu\text{g}$
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: $12.25 \times 0.85 - 2.55 \times 0.5 = 9.1375 \mu\text{g/mL}$

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。

$$9.1375 \mu\text{g/mL} \times 5 = 45.6875 \mu\text{g/mL}$$

1度の展開で採取できる色素の溶液の量は約5.5mLなので、 $45.6875 \mu\text{g/mL} \times 5.5 \text{mL} = 251.28125 \mu\text{g}$
よって、1度の展開で採取できる色素の量は約251.28125 μg である。

▶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。

$$\text{画分Cの}\beta\text{カロテン濃度: } -1.292 \times 0.70 + 3.698 \times 0.59 + 0.131 = 1.40842 \mu\text{g/mL}$$

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60mLなので、 $1.40842 \mu\text{g/mL} \times 60 \text{mL} = 84.5052 \mu\text{g}$

よって、1度の展開で採取できる色素の量は約84.5052 μg である。

キンギョの鮮やかな赤の源 ～アオコのどの色素がキンギョを赤くするのか～

(前ページの)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2mg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、0.1mg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分ほどで食べられる量である2gの餌を1日分として与え、約40日間実験を行った。

結果





 図20 褐色前のキンギョ
 図21 実験区1 色素を与えない区
 図22 実験区2 画分Aを与えた区
 図23 実験区3 画分Bを与えた区
 図24 実験区4 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6 βカロテンの効果を調査

実験内容 実験5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。

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)より低くなかった。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。

結果



図25 実験区5の褐色後のキンギョ

実験区 5 の R/G 値
1.32

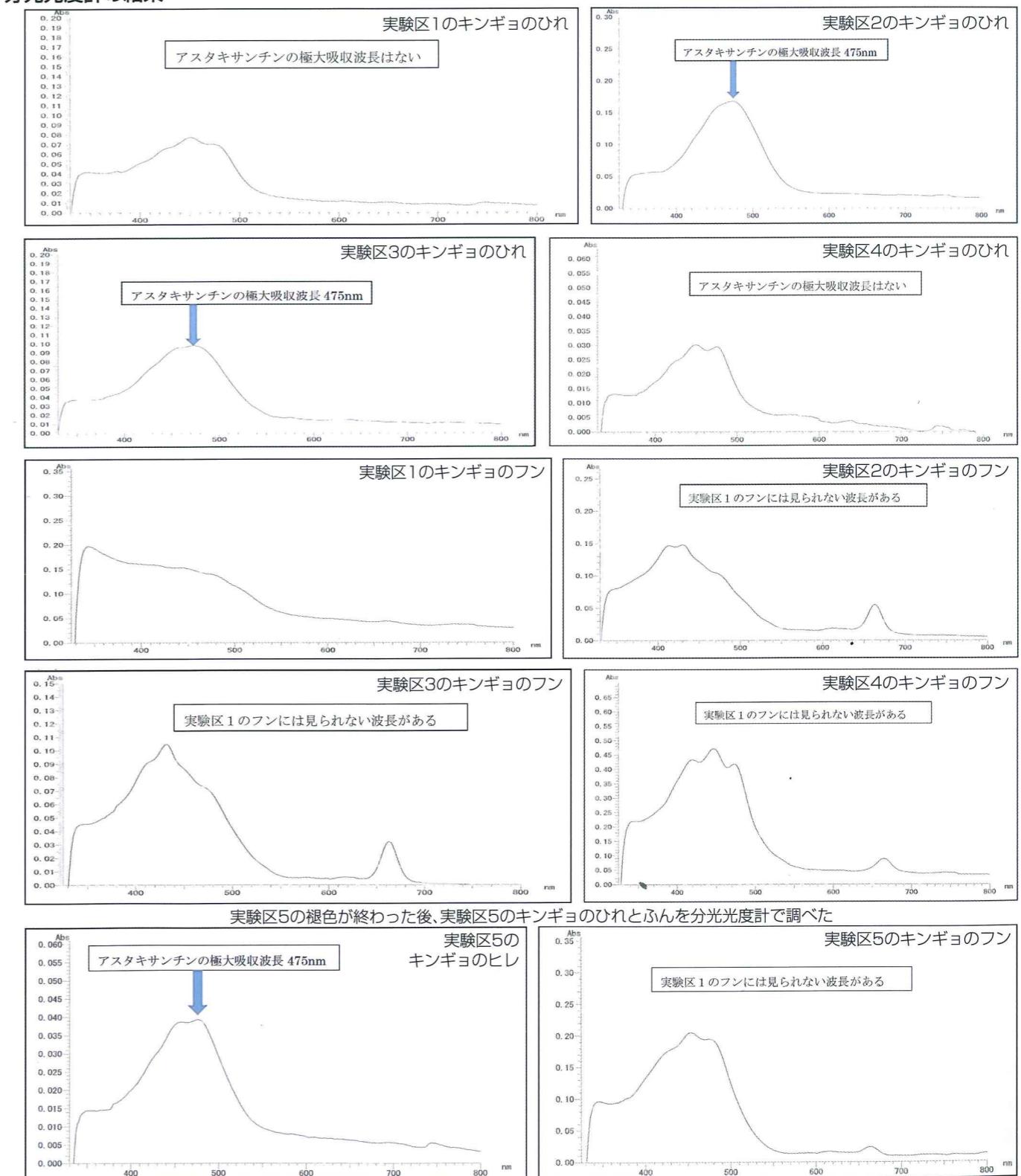
実験7 実験5、6に用いたキンギョのひれとふんに含まれる色素の調査

～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5、6のキンギョから少量切り取った尾びれと実験5、6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. Sessa³⁾によるとアスタキサンチンのアセトン中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

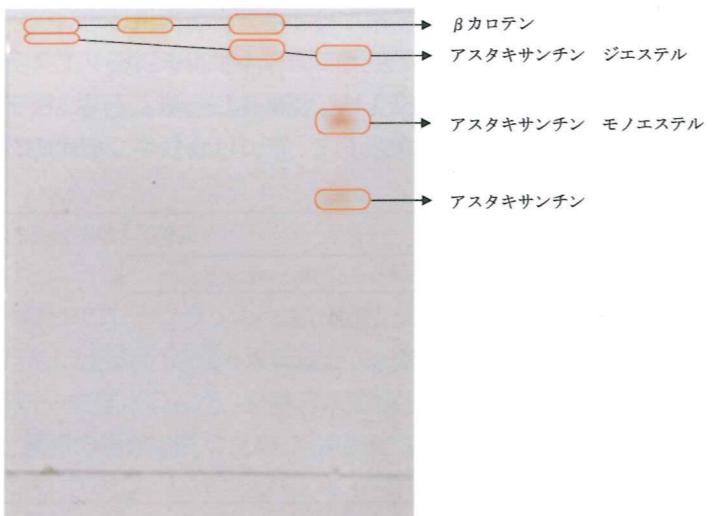
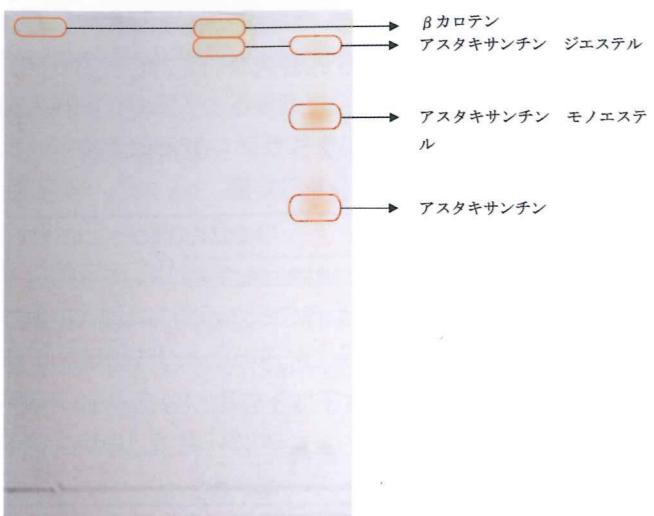




キンギョの鮮やかな赤の源

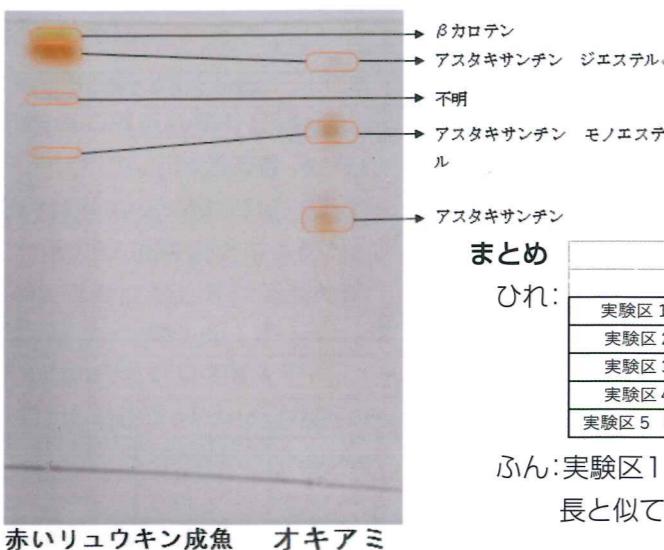
～アオコのどの色素がキンギョを赤くするのか～

薄層クロマトグラフィー法の結果



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

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



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

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

赤いリュウキン成魚 オキアミ

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1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。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つたのではないか。

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つた、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つ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つた。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るおり、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るおり、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に混ざつてしまつ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つた。

今回の実験で最も濃くなつた実験区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分かる。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つた。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、白くなつた金魚が多かつた。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つ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つ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

- 高市真一 (2006)「カロテノイド その多様性と生理活性」裳華房
- 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.
- 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.
- 平尾秀一・小沢聰子・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.
- Tibor Cserháti(2006)「Liquid Chromatography of Natural Pigments and Synthetic Dyes, Volume 71」Elsevier
- 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> (2018年9月29日)
- 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)
- 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つ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つ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つた株式会社キヨーリンの皆様に感謝の意を表します。