

受賞者総説

バフンウニの苦味成分に関する研究

(平成 13 年度日本水産学会賞奨励賞受賞)

村田 裕子*

水産総合研究センター中央水産研究所

Studies on a novel bitter amino acid, pulcherrimine in the sea urchin gonads

YUKO MURATA*

National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Kanagawa 236-8648, Japan

バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) は、日本沿岸に広く分布し、主に福井県以南の日本海沿岸および九州地方で漁獲されている。¹⁾ 味なウニの一種とされ、すでに食用部分である生殖巣の呈味成分組成について明らかにされている。²⁾

一方、東北地方では、バフンウニはほとんど漁獲対象とされていない。その主な理由は生殖巣にしばしば強い苦味を有するためとされている。本研究では、福島県いわき地方に生息する個体を対象とし、苦味の発現頻度を調べた結果、苦味が成熟した卵巣に特有なものであることに着目し、卵巣から新規含硫アミノ酸 pulcherrimine [4S-(2'-carboxy-2'S-hydroxy-ethylthio)-2R-piperidinecarboxylic acid] を単離・構造決定した。さらに、pulcherrimine (Pul) の分析方法を開発し、生殖巣中の含量とその季節変化、さらに Pul の味覚生理学的特性について検討した。本稿ではこれらの成果について概説する。

1. いわき地方に生息するバフンウニ生殖巣の苦味の発現頻度と季節変化

福島県いわき地方ではバフンウニは強い苦味を有するといわれ、漁獲対象になっていない。そこで、苦味の発現頻度を調べるために、成熟期である3月にいわき地方の海岸において、バフンウニの大きさ、雌雄の数、苦味の有無について調査を行った。その結果、苦味は成熟した卵巣に特有なものであることが明らかになった。³⁾ 一般にウニは生殖周期を有する⁴⁻⁷⁾ ことから、苦味も成熟過程において増減すると考えられる。そこで、いわき地方において1998年11月から1999年11月までの間、3ヶ月おきにバフンウニ100個体について大きさ、性

別、生殖巣の成熟の有無、苦味の有無について調査を行った。その結果、11月から2月までは成熟が進み、雌雄の判別が容易であり、卵巣のほとんどに苦味があった。一方、5月、8月は、未成熟で雌雄の判別の困難な個体が多く苦味のない卵巣もみられた。このようにいわき地方では成熟個体数に季節変化は見られたが、成熟個体がほぼ周年にわたってみられた。⁸⁾

2. バフンウニ生殖巣の苦味成分の構造と苦味の閾値

バフンウニ卵巣 628 g を 80% エタノールで3回抽出を行い、減圧濃縮後エーテル-水分配を行い水溶性画分を得た。この画分に抽出残渣を20% メタノールで3回抽出を行って得られた抽出物を合わせ減圧濃縮を行った。この水溶性画分について、ODS カラムクロマトグラフィー、Sephadex G-10 によるゲルろ過、逆相 HPLC などによって苦味化合物の精製を行い、30 mg の苦味化合物を単離した。⁹⁾ 単離された苦味化合物について HRFAB-MS、元素分析により分子量および分子式を検討した結果、分子量 249、分子式 $C_9H_{15}O_5NS$ であることを明らかにした。⁹⁾ つぎに、各種 NMR (一次元 1H , ^{13}C , 2次元 H-H COSY, HMQC, HMBC) により、化学構造 (平面構造) を解析した。⁹⁾ 本化合物は3つの不斉炭素を有するため、8種類の立体異性体の存在が考えられる。そこで、NOESY、キラル HPLC、改良 Mosher 法により Pul の立体構造について検討した。^{9,10)} これらの結果から、バフンウニの苦味成分は 4S-(2'-carboxy-2'S-hydroxy-ethylthio)-2R-piperidinecarboxylic acid (Fig. 1.) であることが明らかになった。この化合物は新規の含硫アミノ酸であることから、バフンウニの学名にちなんで pulcherrimine (Pul) と命名した。⁹⁾

* Tel : 81-45-788-7657. Fax : 81-45-788-5001. Email : betty@affrc.go.jp

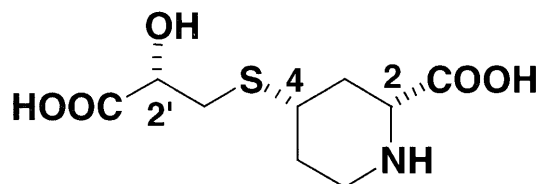


Fig. 1. バフンウニ卵巣から単離された新規含硫アミノ酸 pulcherrimine.

Pul の閾値を 3 点識別法により調べたところ、検出閾値は 0.17 mM, 認知閾値は 0.34 mM であった。¹¹⁾ 本物質の検出閾値は塩酸キニーネ (0.03 mM), 塩酸ストリキニーネ (0.0016 mM), フェニルチオ尿素 (PTC, PTC に対して味盲でない人で 0.02 mM)¹²⁾ などに比べるとはるかに高いが, 他の苦味アミノ酸と比較するとバリン (L-Val) が 4.16 mM, ロイシン (L-Leu) が 6.45 mM, イソロイシン (L-Ile) が 7.41 mM である¹³⁾ ことから, アミノ酸の中では本物質は閾値が低い方であることがわかった。また, Pul を苦味のない未成熟個体の生殖巣エキスに添加したところ苦味効果が発現することを確認した。¹¹⁾

3. Pulcherrimine の定量

アミノ酸のラベル化剤である Dabs-Cl (dimethylaminoazobenzenesulphonyl chloride) を用いて Pul を Dabsyl 化し, Dabs-Pul として逆相 HPLC での分析が可能であった。¹⁴⁾ この方法を用いて, 成熟期である 1998 年 11 月の試料について, 苦味の強さと Pul 含量を調べた。成熟卵巣では平均 1.37 mg/100 g の Pul が含まれていた, 一方, 精巣には苦味がなく, Pul は検出されなかった。生殖巣の苦味の強さと Pul 含量との間に有意な相関関係がみられた。¹⁴⁾ 1998 年 11 月から 1999 年 11 月まで, 3 ヶ月ごとにいわき地方のバフンウニ生殖巣中の Pul を定量した。その結果, 卵巣中の Pul 含量は個体間でばらつきが見られるものの, 含量の少ない雌は 8 月に多く, 2 月に少ないことがわかった。また, Pul 含量の最も高いのは, ほとんどの個体が成熟期である 2 月であった。このことから, 卵巣中の Pul 含量と雌個体の成熟段階との間には密接な関係があることが示唆された。⁸⁾

4. マウスにおける pulcherrimine の味覚生理学的特性の行動学的解析

味覚生理学の分野においてマウスはよく用いられている。¹⁵⁾ 特に近年, マウスの遺伝学の発展に伴い, 味覚領域においても甘味受容体の発見と, その遺伝学的解析が進むなど¹⁶⁾ 味覚の受容・神経伝達機構の研究が急速に進展している。¹⁷⁾ 本研究ではマウスの味覚生理学実験で

よく用いられている条件づけ味覚嫌悪学習実験を用いて Pul の味覚生理学的特性を調べた。条件づけ味覚嫌悪学習実験とはマウスなどの動物にある味物質を一定量摂取させた後, LiCl を腹腔内投与するなど, 内臓不快感を起こさせると, その動物は摂取した物質の味と内臓不快感との関係を学習 (記憶) し, 以後, その味物質と味覚類似性の高いものほど強い忌避行動を起こすという現象を用いた実験である。¹⁸⁻²¹⁾ まず, 種々の味物質に対する味覚感受性はマウスでは系統差がみられるため,²²⁻²⁴⁾ C57BL/6 と BALB/c の 2 系統のマウスを用いて本化合物に対する行動閾値を比較した。すなわち, 濃度 4 mM のものでマウスに条件づけを行い, 0.03 mM から 4 mM までの Pul に対するリック数 (マウスが 10 秒間になめる回数) を調べた。その結果, 苦味を識別できる最低濃度 (行動閾値) は C57BL/6 では 1 mM, BALB/c では 0.1 mM と系統差が見られた。²⁵⁾ 次にこれら 2 系統のマウスに対して 4 mM Pul およびその他 15 種類の呈味物質で条件づけを行い, 種々の苦味物質に対する汎化パターンから味覚の類似性を調べた。その結果, Pul は PTC や MgSO₄ などの含硫苦味化合物と味覚類似性が高く, 食用のバフンウニの苦味に関与している L-Val などの苦味アミノ酸とは異なる苦味を有することがわかった。^{21,25)} また, 味刺激変換機構においてイノシトール 3 リン酸 (IP₃) が関与するといわれるスクロースオクタアセテート, 安息香酸デナトニウム, ストリキニーネ (これらは苦味物質)^{26,27)} も Pul と味覚類似性が高いことが示唆された。²⁵⁾

5. 今後の展望

本研究から, バフンウニの苦味の本体は Pul であることが明らかとなった。さらに, いわき地方では, 周年, この物質を多量に含む成熟個体が多く存在することが, 漁獲を困難にしている原因であると結論づけられた。これには, 養殖等で成熟をコントロールすることが苦味のないウニの生産を可能にすると考えられる。Pul の発見により, バフンウニなど苦味を有するウニの有効利用にも可能性が出てきた。Pul の発現機構 (生合成か, 餌由来か) の解明が次の課題である。今後はバフンウニの有効利用を目的とした応用的, 現場対応的な研究と Pul をはじめとしたウニの呈味成分の味覚機能の解明を目的とした基礎的な研究の両面から進めていきたいと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 終始御指導を賜った京都大学大学院農学研究科坂口守彦教授に心からお礼を申し上げる。また, 味覚嫌悪学習実験に際し, 御指導を賜った九州大学大学院歯学研究院二ノ宮裕三教授に厚くお礼

申し上げる。Pul の構造決定には、静岡県水産試験場佐田紀子博士、ウニの成熟度判定には養殖研究所鶴沼辰哉研究員にご協力いただき、深謝申し上げます。さらにバフンウニ試料採取にご協力いただいた福島県水産試験場および福井県水産試験場の関係各位に厚く感謝する。本研究は中央水産研究所利用化学部素材化学研究室において行ったものである。当研究室をはじめ、中央水産研究所利用化学部の皆様からご協力、ご助言をいただいた。ここに厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 今井利為. 本州中部におけるウニ類の増殖に関する研究. 神奈川県水産試験場論文集, 第6集, 神奈川県水産試験場, 1995; 1-90.
- 2) 小俣 靖. ウニのエキス成分に関する研究—Ⅳ. エキス構成々分の呈味性. 日水誌 1964; **30**: 749-756.
- 3) 村田裕子, 山本達也, 金庭正樹, 桑原隆治, 横山雅仁. バフンウニ生殖腺の苦味の発現頻度. 日水誌 1998; **64**: 477-478.
- 4) 松井 魁. ウニの増殖, 日本水産資源保護協会, 東京. 1966; 1-103.
- 5) Fuji A, Studies on the biology of the sea urchin. I. Superficial and histological gonadal changes in gametogenic process of two sea urchins, *Strongylocentrotus nudas* and *S. intermedius*. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 1960; **11**: 1-14.
- 6) Fuji A, Studies on the biology of the sea urchin. III. Reproductive cycle of two sea urchins, *Strongylocentrotus nudas* and *S. intermedius* in southern Hokkaido. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 1960; **11**: 49-57.
- 7) 川名 武. バフンウニの増殖に就いて. 水産研究誌 1938; **33**: 104-116.
- 8) Murata Y, Yokoyama M, Unuma T, Sata NU, Kuwahara R, Kaneniwa M. Seasonal changes of bitterness and pulcherrimine content in gonads of green sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* at Iwaki in Fukushima Prefecture. *Fish. Sci.* 2002; **68**: 184-189.
- 9) Murata Y, Sata NU. Isolation and structure of pulcherrimine, a novel bitter-tasting amino acid, from the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*) ovaries. *J. Agric. Food Chem.* 2000; **48**: 5557-5560.
- 10) Sata NU, Kuwahara R, Murata Y. Synthesis of all isomers of pulcherrimine, a bitter principle in the sea urchin ovary. *Tetrahedron Lett.* 2002; **43**: 115-1183.
- 11) 村田裕子, 坂口守彦, 佐田(潮)紀子, 桑原隆治, 金庭正樹, 大原一郎. バフンウニ由来のアミノ酸 pulcherrimine の苦味について. 日本味と匂学会誌 2000; **7**: 615-618.
- 12) Pfaffmann C, Bartoshuk LM, McBurney DH. Taste Psychophysics. In: Beidler LM (ed) *Handbook of Sensory Physiology* Vol. 4. Part 2. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. 1971; 75-101.
- 13) Schiffmann SS, Sennewald K, Gagnon J. Comparison of taste qualities and thresholds of D- and L- amino acids. *Physiol. Behav.* 1981; **27**: 51-59.
- 14) Murata Y, Sata NU, Yokoyama M, Kuwahara R, Kaneniwa M, Oohara I. Determination of a novel bitter amino acid, pulcherrimine in the gonad of the green sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Fish. Sci.* 2001; **67**: 341-345.
- 15) ニノ宮裕三. 味覚受容・神経情報伝達機構解明への遺伝的アプローチ. 神経研究の進歩 1999; **43**: 674-681.
- 16) Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJP, Zuker CS. Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell* 2001; **106**: 381-390.
- 17) Lindemann B. Receptors and transduction in taste. *Nature* 2001; **413**: 219-225.
- 18) Garcia J, Kimmeldorf D, Koelling RA. Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 1955; **122**: 157-158.
- 19) Nachman M. Learned aversion to the taste of lithium chloride and generalization to other salts. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1963; **56**: 343-349.
- 20) Archer T, Sjoden P-O Positive correlation between pre- and postconditioning saccharin intake in taste-aversion learning. *Anim. Learn. and Behav.* 1979; **7**: 144-148.
- 21) 村田裕子, 佐田(潮)紀子, ニノ宮裕三, 金庭正樹, 桑原隆治, 横山雅仁. バフンウニ卵巣中に含まれる苦味物質について. 日本味と匂学会誌 1999; **7**: 615-618.
- 22) Lush IE. The genetics of tasting in mice. I. Sucrose octaacetate. *Genet. Res.* 1981; **38**: 93-95.
- 23) Lush IE. The genetics of tasting in mice. VI. Saccharin, acesulfame, dulcin and sucrose. *Genet. Res.* 1989; **53**: 95-99.
- 24) Bachmanov AA, Tordoff MG, Beauchamp GK. Intake of umami-tasting solutions by mice: a genetic analysis. *J. Nutr.* 2000; **130**: 935S-941S.
- 25) Murata Y. Studies on a novel bitter amino acid, pulcherrimine in the green sea urchin gonads. PhD Thesis, Kyoto University, Kyoto, 2001.
- 26) Spielman AI, Huque T, Nagai H, Whitney G, Brand JG. Generation of inositolphosphate in bitter taste transduction. *Physiol. Behav.* 1994; **56**: 1149-1155.
- 27) Spielman AI, Nagai H, Sunavala G, Dasso M, Breer H, Boekhoff I, Huque T, Whitney G, Brand JG. Rapid kinetics of second messenger production in bitter taste. *Am. J. Physiol.* 1996; **270**: C926-C931.