

マグロ血合肉に含有されるセレンの化学種の同定

吉田 宗弘, 杉原 悟, 千原 優子, 近藤 真理子, 老川 典夫
(関西大学工学部生物工学科*)

Identification of Chemical Species of Selenium Contained in Dark Muscle of Tuna

Munehiro YOSHIDA, Satoru SUGIHARA, Yûko CHIHARA, Mariko KONDÔ, Tadao OIKAWA
*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University,
Yamate Suita, Osaka 564-8680, Japan*

Summary

Chemical species of selenium (Se) contained in dark muscle of tuna were analyzed. About one-third of Se in the dark muscle were soluble in 0.2 N HCl. The acid extract was found to contain Se mainly as an unknown low molecular weight compound when analyzed using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICPMS). A proteolytic enzyme digestion released several amounts of selenocystine from the dark muscle. In a Sephadex G-25 gel chromatography of trypsin digest of the dark muscle, Se was eluted separately into several specific fractions. These results indicate that Se in dark muscle of tuna are present mainly as a protein-bound selenocysteine and an unknown low molecular-weight compound.

食品中セレンの栄養有効性は種々の要因によって変動するため、食品中セレンの化学分析値と栄養有効性の間にはしばしば齟齬が生ずる¹⁾。魚肉は日本人の主要なセレン供給源であるが²⁾、含有されるセレンの栄養有効性は他の食品由来のセレンに比較して低いと信じられている^{3,4)}。魚肉中セレンの低栄養有効性の原因として、しばしば共存する水銀の影響が指摘されている¹⁾。しかし、水銀含有量が低い魚肉製品でも、含有セレンが低栄養有効性を示すと報告されており⁵⁾、魚肉中セレンの一部が栄養有効性の低い化学種である可能性も否定できない。

従来、食品中の微量セレンの化学種の同定には、化学試薬との反応性を検討するなどの間接的な手法が多く用いられてきたため、食品中セレンを化学種ごとに分別定量することは困難であった。近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離したセレン化合物を誘導結合プラズマ質量分析器 (ICPMS) で特異的に検出する手法が開発・普及しており、種々の食品に含有されるセレンの化学種の同定が可能となりつつある^{6,7)}。

本研究では、魚肉の中でもセレン含有量がきわめて高いマグロの血合肉について、その化学種の同定を HPLC-ICPMS を用いて試みた。

実験方法

1. 試料：新鮮なキハダマグロ (*Thunnus albacora*) の血合肉を津市内の小売店から購入し、実験に供した。また、この血合肉を既報⁸⁾と同様にアセトンおよびヘキサンで脱脂したものも試料とした。
2. 血合肉からのセレンの抽出と化学種の同定：血合肉 0.5 g に 0.2 N 塩酸 2 ml を加え、十分に摩り潰して均一にした後、遠心 (6,000 × g, 20 分) した。上清として得られた抽出液について、セレン濃度を測定するとともに、含有セレンの

*所在地：吹田市山手町 3-3-35 (〒564-8680)

化学種をHPLC-ICPMSで分析した。一方、血合肉0.5 gにSigma-Aldrich社の細菌由来プロテアーゼXIV 20 mgと水1.9 mlを加え、室温で16時間消化した。消化液に4 N塩酸0.1 mlを加えた後、遠心し、得られた抽出液について、同様にセレン濃度の測定と含有セレンの化学種の分析を行った。

3. 脱脂血合肉の消化試験：脱脂血合肉2 gに、10 mgの結晶トリプシンを含むトリス硝酸緩衝液 (pH 8.0, 50 mM) を加え、37°Cで7時間緩やかに振とうした。反応終了後、消化物を遠心分離 (6,000 × g, 20分) し、得られた上清の5 mlをSephadex G-25を充填したカラム (2φ × 40 cm) で5 mlずつ分画した。得られた各画分について、280 nmの吸光度とセレン濃度を測定した。

4. 測定

(1) **セレン濃度の測定：**血合肉と脱脂血合肉のそれぞれ約1 gに10倍量の濃硝酸を加え、湯浴中で固形物がなくなるまで加熱した。消化液を水で希釈し、0.20 μmのメンブレンフィルターでろ過後、直接ICPMS (島津, ICPM-8500) に噴霧してセレン濃度を測定した。血合肉の0.2 N塩酸抽出液は0.1 N硝酸で希釈した後、また脱脂血合肉のトリプシン消化物の分画液は直接、それぞれICPMSに噴霧してセレン濃度を測定した。

(2) **HPLC-ICPMS：**血合肉の0.2 N塩酸抽出液を野村化学製のDevelosil RP-AQUEOUSカラムを用いたHPLCにアプライし、溶出液を直接ICPMSに噴霧して質量数77, 78, および82のイオン粒子を検出した。HPLC-ICPMSの詳細は既報を参照されたい⁷⁾。

結果と考察

血合肉、および脱脂血合肉のセレン含有量は、それぞれ10.5 μg/gと14.8 μg/gであり、アセトン-ヘキサンによる脱脂操作によって含有セレンの32.8%が失われた。また、血合肉の0.2 N塩酸抽出液へのセレンの抽出率は、無処理の場合が35.8%、プロテアーゼ処理した場合が68.1%であった。アセトン-ヘキサンによる脱脂操作で失われたセレンと無処理血合肉からの塩酸抽出液への抽出率がほぼ一致したことから、本実験に用いたマグロ血合肉に関しては、含有セレンは、3分の1が低分子化合物、3分の2がタンパク質に結合した形態と推定できる。

Figure 1に血合肉の塩酸抽出液をHPLC-ICPMSで分析した結果を示した。無処理の血合肉では1種、プロテアーゼ処理した血合肉では2種のセレン化合物が塩酸抽出液中に存在していた。既知のセレン化合物 (セレン酸、亜セレン酸、セレノシスチン、トリメチルセレノニウム、Se-メチルセレノシステイン、セレノメチオニン) との比較により、プロテアーゼ処理血合肉の塩酸抽出液で認められたセレン化合物の1つはセレノシスチンであると同定できた。しかし、未処理血合肉にも認められたもう1種のセレン化合物は、既知のセレン化合物のいずれでもなく、未知のセレン化合物であると推定された。プロテアーゼ処理血合肉の場合のセレノシスチンと未知セレン化合物のピークの大きさがほぼ同じであること、プロテアーゼ処理により塩酸抽出液への抽出率がほぼ2倍になることから、プロテアーゼによりタンパク質から遊離して塩酸に可溶となったセレンの大部分はセレノシスチンであると判断できる。

Figure 2に、脱脂血合肉のトリプシン消化物をSephadex G-25で分画した結果を示した。280 nmの吸光度でみる限り、脱脂血合肉中タンパク質の相当部分はトリプシンによって断片化していると判断されたが、セレンは大部分が高分子の画分に、ごく一部が特異的な低分子性の画分に回収された。

セレン酵母では、セレンがセレノメチオニンの形態で非特異的にタンパク質中に結合している⁷⁾。われわれは、このセレン酵母を今回と同様に処理してSephadex G-25で分画すると、セレンがペプチド断片が溶出される範囲にほぼ一様に回収されることを認めている⁷⁾。脱脂マグロ血合肉のトリプシン消化物中のセレンがSephadex G-25クロマトグラフィーにおいてセレン酵母消化物とは異なる挙動を示すことは、血合肉中のセレンがセレン酵母とは異なり、特定のタンパク質の特定の部位に結合していることを示唆しているのかもしれない。細菌由来のプロテアーゼで処理するとセレノシスチンが血合肉から遊離することとあわせて考えると、マグロ血合肉にはセレンをセレノシステインの形態で含有する、何らかの機能を有する含セレンタンパク質が存在すると推察される。

今回の実験によって、マグロ血合肉中のセレンの相当部分は、タンパク質結合性のセレノシスチンであると同定で

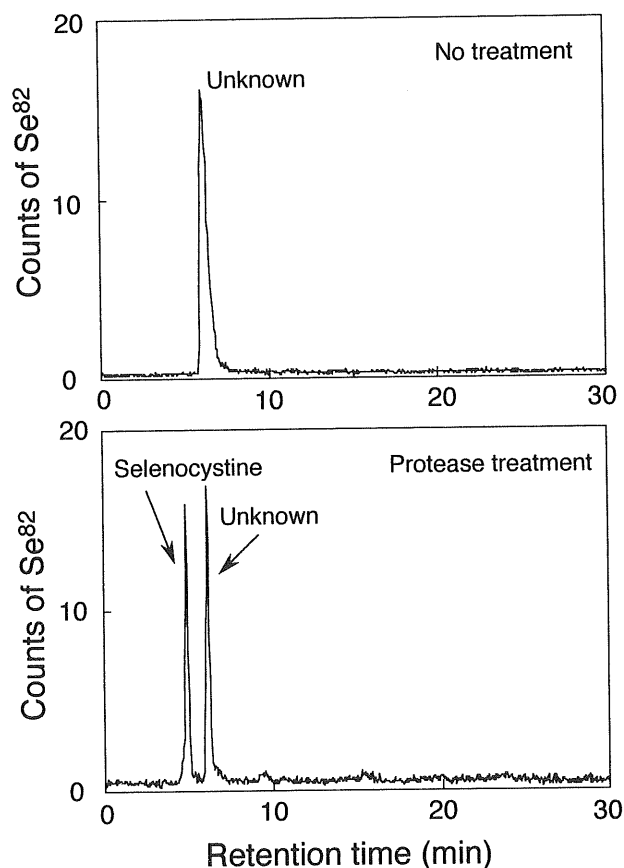


Figure 1 HPLC-ICPMS chromatograms obtained from 0.2 N HCl extracts of dark muscle of tuna.

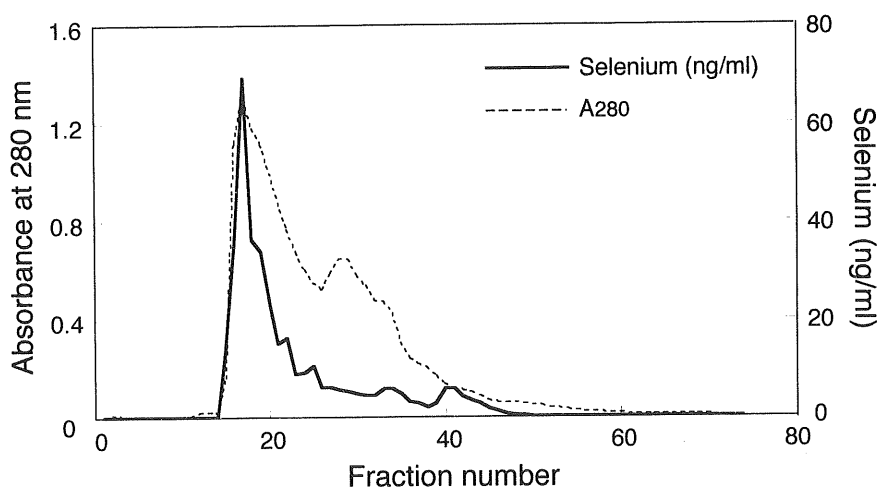


Figure 2 Elution pattern of trypsin digest of defatted dark muscle of tuna by Sephadex G-25 gel chromatography.

きた。セレンシスチンの栄養有効性が亜セレン酸と同程度であることから^{1,3)}、今回の結果は、先にわれわれが、脱脂マグロ血合肉中のセレンの栄養有効性が亜セレン酸と同程度に高いと認めたこと⁸⁾と矛盾しない。また、血合肉からアセトン-ヘキサンで除去される約3分の1の低分子性セレンの大部分は、今回検出した未知のセレン化合物であると考えられる。マグロ中のセレンの低有効性とこの未知の低分子性セレン化合物の関連について検討が期待される。

参考文献

- 1) 吉田宗弘 (2003) ミネラル事典, 朝倉書店, 東京: pp. 297.
- 2) 吉田宗弘, 安藤達彦, 舘 博 (1995) 食品と開発, 30 (10): 41.
- 3) Combs, G.F. Jr. and S.B. Combs (1986) The Role of Selenium in Nutrition, Academic Press, New York: pp. 127 - 177.
- 4) Yoshida, M., K. Iwami and K. Yasumoto (1984) J. Nutr. Sci. Vitaminol. 30: 395.
- 5) 吉田宗弘, 岩見公和, 安本教博, 岩井和夫 (1981) 農化, 55: 689.
- 6) Ip, C., M. Birringer, E. Block, M. Kotrebai, J.F. Tyson, P.C. Uden and D.J. Lisk (2000) J. Agric. Food Chem. 48: 2062.
- 7) Yoshida, M., S. Sugihara, T. Suenaga, C. Naito, K. Fukunaga and H. Tsuchita (2002) J. Nutr. Sci. Vitaminol. 48: 401.
- 8) Yoshida, M., M. Abe, K. Fukunaga and K. Kikuchi (2002) Food Additive Contam. 19: 990.