

助成番号 0649

## イオン組成を調節した人工海水浸漬によるスルメイカ表皮色素胞の発色制御と超鮮度スルメイカの保存技術に関する研究

今野 久仁彦

北海道大学大学院水産科学研究院

**概要** 水揚げ直後のスルメイカの体色は、表皮にも透明感があり他の魚同様見た目に綺麗だが、時間が経つにしたがって赤黒く変化し、わずか1日程度で最大に達した後、徐々に薄れて白濁してしまう。このため、体色は肉質同様、鮮度を評価する上で極めて重要な要素の一つである。イカ類の体色は、柔軟な袋状の構造をしている色素胞が周りに付随している放射状筋繊維によって収縮・拡張することによって変化する。

死後空气中で保存した際のスルメイカは、不可逆的に発色、退色をする。本研究では、イカを空气中ではなく、人工海水に浸漬したときの体色変化に与える種々のミネラルの影響について検討し、どのミネラルが、発色制御の重要因子なのかについて検討した。

死後のイカでも、L-Glu(興奮)と GABA(鎮静)の作用が認められ、しかも、可逆的であることから、細胞はまだ生きてることが示された。また、ATP 含量が維持されていることから、ATP を再生産していることが確かめられた。

空気保存と対照的に、人工海水にイカを保存しておけば、4-5 日間、発色も退色もせずに保持できることが分かった。この、人工海水に含まれている各種ミネラルのうち、特定のミネラル(K, Mg, Ca)だけ取り除いた液に浸漬し、発色に対する影響を調べた。すると、Mg 除去の影響はほとんど変化が認められなかった。K 除去の影響は貯蔵初期の急激な退色を引き起こしたが、貯蔵とともに回復した。Ca の除去は急激な退色を引き起こした。すなわち、浸漬中に最初に状態を維持させていたのは Ca の作用であることが結論された。しかも、この見かけ上の退色現象は、浸漬液に Ca を含む溶液に再浸漬することで、回復したので、色素細胞が機能を失ったためではないことが確認された。

これらの結果から、海水から Ca を除いた組成の溶液に浸漬することで、生きていた状態の、発色する前のイカ表皮の状態を再現できることが分かった。そして、目的に応じて、Ca の入っている溶液に移せば、発色させることができる。この技術を使うことで、生きたままの色素細胞の発色を人為的に制御できると考えられる。

### 1. 研究目的

水揚げ直後のスルメイカの体色は、表皮にも透明感があり他の魚同様見た目に綺麗だが、時間が経つにしたがって赤黒く変化し、わずか1日程度で最大に達した後、徐々に薄れて白濁してしまう。このため、体色は肉質評価以上に、鮮度を評価する上で極めて重要な要素の一つであるとともに、流通しているイカの価格決定に大きな影響を及ぼす要因でもある。

生きていた時のイカは、刺激や興奮によって、瞬時にかつ可逆的に体色を変化させる。このようなイカ類の体色は、色素胞が収縮・拡張することによって変化する事が知られている<sup>1)</sup>。イカの色素胞は、表皮の1層目と2層目の間、または2層目の内部に存在する色素粒を満たした柔軟な袋状の構造をしており、その周りに付随している放射状筋

繊維が収縮すると色素胞が引っ張られて薄い板状に広がり、弛緩すると色素胞が収縮するとされている。このような変化は、視覚の刺激に基づいて、神経系が制御しているといわれている<sup>2)</sup>。一方、断頭により即殺したイカについても、しばらくの間は、表皮を指で突付くと明らかに色素胞が動く様子が観察される。このことは、個体として死に至ったイカでも、細胞活動が一定期間継続していることを示唆している。

死後空气中で保存した際のスルメイカは、生息時と異なり不可逆的に体色が変化し、一度白くなったものが赤黒く戻ることはない(ここでは、死後保存中に赤黒く体色が変化することを発色と表現する)。このような保存中におこる体色変化が、生息時のような可逆的な神経制御によっておこっているものなのか、あるいは死後変化のような不可

逆的なものなのかは明らかにされていない。

本研究では、イカ体色を生きたまま保持するため、人工海水に浸漬する方法の可能性を探った。さらに、浸漬によりかなり長い期間、色素細胞は刺激に反応したので、この体色を決定する人工海水中に含まれている種々のミネラルを特定した。

## 2. 研究方法および研究材料

### 2.1 実験材料

スルメイカは、当日漁獲された生きた試料を活魚車で実験室へ運び、断頭により即殺し、その後の実験に使用した。

### 2.2 イカ浸漬液(人工海水)組成と浸漬処理

イカを保存する環境は5°Cの低温庫中(空气中保存)あるいは同じ温度の人工海水に浸漬して保存した。実験に用いた人工海水は、イカ等張液の組成として Florey らが報告した、500 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 10 mM グルコース, 10 mM HEPES (pH 7.0)からなる組成とした<sup>3)</sup>。また、人工海水に含まれる各種ミネラルの作用を知るため、組成から、Ca, Mg, K などを除いたり、濃度を変化させた。Ca, Mg, K の濃度を変えた場合は、NaCl 濃度を増減させて浸透圧が変わらないように調整した。さらに、色素胞の運動を見るため、これら海水に活性化因子としての L-Glu や弛緩因子としての GABA を加えた。

### 2.3 発色率の測定方法

発色率の測定は、色見本(Toyo 94 Color Finder1050, CF155, 東洋インキ)とともに、外套膜試料をバットに載せ、デジタルカメラで静止画情報を記録し、この情報をパーソナルコンピュータへ取り込んで Photoshop Ver7.0(Adobe Systems, Inc.)により二階調化する方法で行った。すなわち、観察視野面積に対する色素胞面積の割合を百分率として求め、発色率(%)として表した<sup>4)</sup>。結果は何れも6個体の平均値で示した。

### 2.4 色素胞の運動性の測定方法

浸漬貯蔵した実験材料より、表皮がついたままの外套膜を得、およそ3 cm 角の試料を切り出した。これらを50 mM の L-Glu あるいは GABA を含む海水に浸漬させ、その後の変化を測定した。

色素胞の拡張作用を観察する場合は、試料の切り出しによって一部の色素胞の拡張がおこるため、採取した試験片をイカ等張液に20分間浸漬して色素胞活動を安静

化させたものを試験に供した。また、色素胞の収縮作用を観察する場合は、L-Glu を含む試験溶液に20分間浸漬することによって色素胞を拡張させたものを使用した。

## 3. 実験結果

### 3.1 保存中のイカの体色変化

初めに、即殺後のスルメイカの外殻膜を5°Cの低温で空气中保存した時の発色率の経時的な変化を追跡し、図1に示した。即殺直後の発色率は、50%程度であったが、保存開始と共に上昇し、24時間後には80%近くまで増加した。その後は、一方的に減少を続け、5日目には、退色が終了し、ほぼ0%となった。

この変化は、目視による観察結果と良く一致していたことから、今回行った発色率の測定は、客観性の高い評価方法であると判断した。なお、拡張指数についても同様に、目視による観察結果と測定値の推移が良く一致するものであることを確認している。

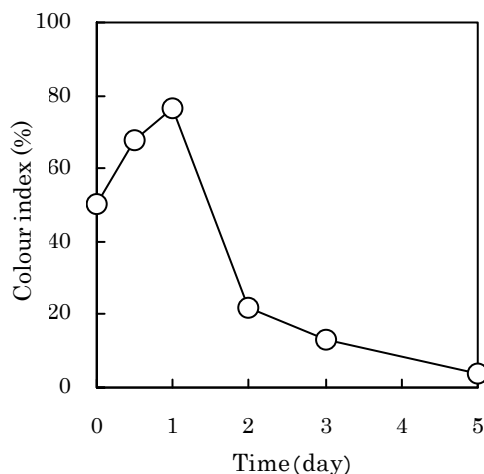


Fig. 1 Change in the colour index of beheaded squid when stored at 5°C.

### 3.2 海水に含まれるミネラルの影響

イカが生きているときは海水に接触している。そこで、海水に含まれている様々なミネラルが色素胞の発色にどのような影響を与えるのかを知るため、Ca, K, Mg など天然海水の主要ミネラルについて検討した。なお、基準とした濃度は、Ca:10 mM, Mg:12 mM, K:10 mMとした。イカをそれぞれのミネラルの濃度を変えた人工海水に浸漬し、浸漬直後の色素胞の反応を比較した。すなわち、それぞれの濃度が発色にどのような影響を及ぼすかを検討した。

結果を図2に示した。Ca の場合は濃度ゼロでも発色のレベルは低かったが、濃度を上げていくと、次第に低下した(図2A)。一方、Mg の場合は濃度ゼロで発色が著しい点の特徴であったが、濃度上昇と共に、Ca と同じように発色率は低下した(図2B)。一方、K については、濃度ゼロでは高い発色率を示していたものが、濃度が 10 mM まででは低下し、その後、20 mM で再上昇するという複雑な動きを示した(図2C)。

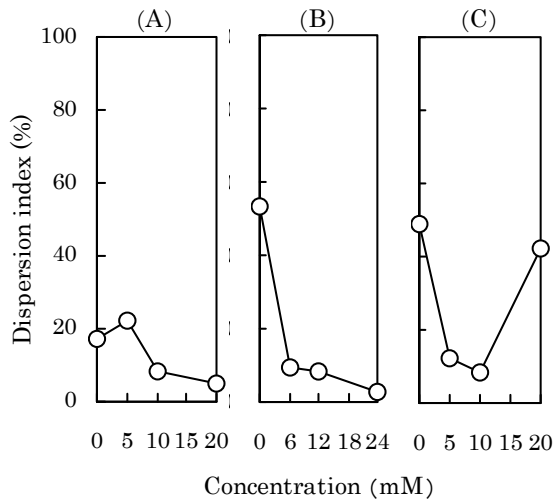


Fig. 2 Effect of (A) Ca, (B) Mg and (C) K concentration on the dispersion index.

### 3.3 神経伝達物質の影響

理由は別として、イカ表皮の色素胞はミネラル濃度に固有の反応をした。生息時の色素胞活動は、神経刺激によって制御され<sup>1)</sup>、神経刺激を伝達するものには、アセチルコリン、ドーパミン、ノルアドレナリンなどの他、アミノ酸系のものが存在することも知られている。アミノ酸系の神経伝達物質では、L-Glu が興奮性を示すことや、GABA が抑制性を示すことなどが報告されており<sup>5)</sup>、イカを含む頭足類においても、L-Glu が神経伝達物質としての役割を担っていることがわかっている<sup>2), 6), 7)</sup>。しかし、神経伝達物質が死後の個体に対しても神経興奮を誘導し、運動などの組織機能を発現させるかは、確認されていない。また、発色のような、死後のイカの保存中におこる性状変化に、神経支配が関与するかどうかといった知見は見当たらない。ここでは、イカの高鮮度保持への応用の見地から、可食性の物質である神経伝達物質として、アミノ酸系の L-Glu と GABA を選択し、これらが死後のイカの色素胞活動にどのような影響を与えるかを検討した。

L-Glu の発色作用について検討した結果を図3Aに示した。濃度を 50 mM まで変化させて浸漬したところ、10 mM ではほとんど効果が認められず、30 mM では 10 分から 20 分にかけて緩やかに色素胞の拡張がおこった。更に濃度を上げた 50 mM の場合は顕著で、浸漬後 5 分で拡張指数が 40%まで上昇し、それ以降 20 分までその値を維持する様子が示された。次に、GABA の収縮作用を見るために、50 mM の L-Glu を含む試験溶液に 20 分間浸漬して十分な発色を促した後、0~50 mM の GABA を含む試験溶液に浸漬した時の結果を図3Bに示した。この場合、GABA を 10 mM 以上含む時に拡張指数の低下がおこり、50 mM に浸漬すると瞬時に収縮することが認められた。

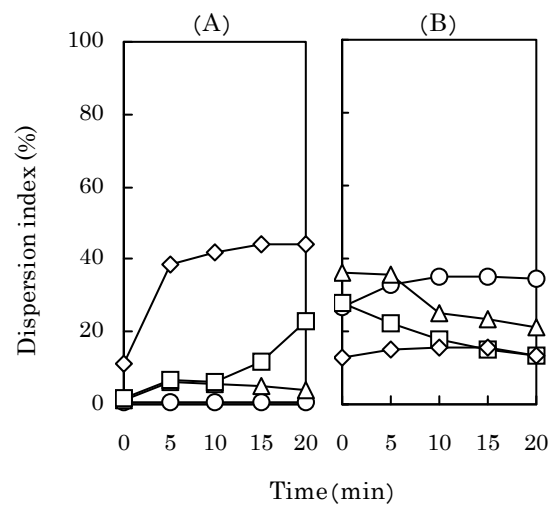


Fig. 3 Effect of L-Glu(A) and GABA(B) on the dispersion index.

(○) 0 mM, (△) 10 mM, (□) 30 mM, (◇) 50 mM.

### 3.4 神経伝達物質の影響(可逆性)

50 mM の GABA あるいは L-Glu を含む試験溶液に試験試料を浸漬し、20 分毎に試験溶液を入れ替えて色素胞の挙動を観察した(図4)。GABA への浸漬で発色率はほぼゼロになったが、L-Glu に浸漬することによって速やかに発色し、60%程度の発色率に達した。再度、GABA に浸漬すると 20 分程度で、またゼロになった。その後、GABA に再浸漬するとまた収縮したことから、この反応は可逆的なものであることが確認された。なお、この反応は、少なくとも三反復させることができたが、L-Glu による発色のレベルは次第に低下し、一回目は 60%であったものが、二回目では 40%に、三回目では 35%にまで低下した。

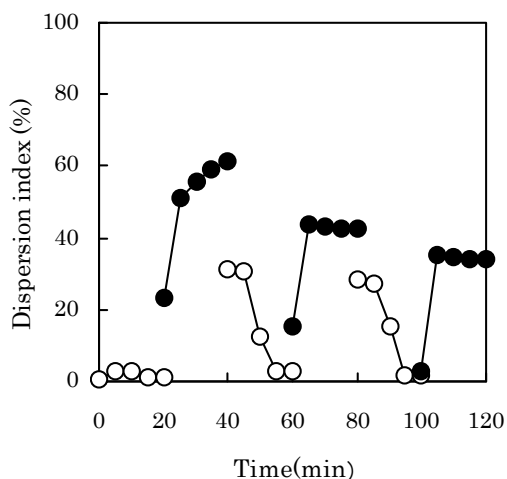


Fig. 4 Reversibility of color development when treated with GABA and L-Glu. (○) 50 mM GABA, (●) 50 mM L-Glu.

### 3.5 種々のミネラル組成の人工海水に浸漬中の発色

図2の結果は、ミネラル組成の異なる人工海水に浸漬した場合の、短時間の反応を調べ、通常海水に含まれている濃度では発色は起こらないことを示した。ここでは、その後、長期間保存した場合の変化を追跡した。いろいろなミネラル組成の液に浸漬保存したときの、発色の様子を追跡した(図5)。

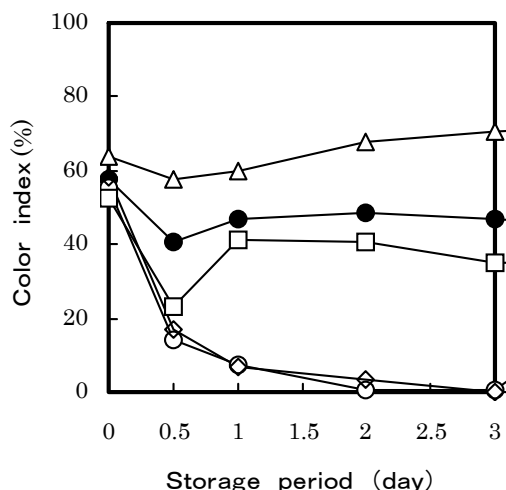


Fig. 5 Effect of mineral composition on the color development. (●) Standard solution, (○) without Ca, (△) without Mg, (□) without K, (◇) Na alone.

その結果、Caを10 mM、Mgを12 mM、Kを10 mM含む標準人工海水に浸漬した場合、3日の保存期間を通して発色率に大きな変化は見られなかった。一方、標準人工海水からCaを除いた場合は、半日、1日で一方的に発

色率が減少し、2日目にはほぼ0%になった。Mgを除いた場合の発色率は、保存期間を通して大きな変化はなかったが、標準人工海水に浸漬したものよりも高い値で推移し、保存後期でやや上昇する傾向にあった。Kを含まない場合は、保存開始から0.5日にかけて一旦急速に低下したが、その後1日目にかけて等張液に浸漬したものに近いレベルまで増加し、以降3日目まで著しい減少がないまま推移した。また、NaClのみの場合もCaを除いた場合と同じ経過をたどった。この結果から、塩水中のミネラル組成が表皮色素胞の拡張収縮運動に大きな影響を与えることが明らかとなった。特に、Caの濃度が色素胞の運動の活性化、抑制に関与していることが示された。

### 3.6 種々濃度のCaを含む人工海水に浸漬したときの発色率の変化

続いて、色素胞の運動制御に必要なCaの有効濃度を明確にするため以下の検討を行った。予め5℃に冷却したCa濃度の異なる標準人工海水にイカ外套膜を浸漬して、5℃で浸漬貯蔵した時の発色率の変化を測定した(図6)。

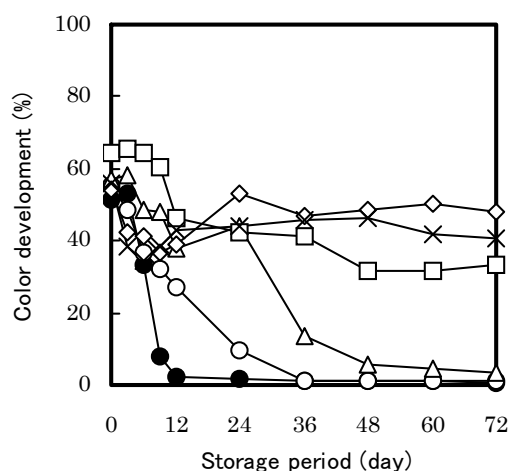


Fig. 6 Effect of calcium concentrations on the color development. (●) Solution contained 1 mM EGTA, (○) no Ca added, (△) 0.1 mM Ca, (□) 0.5 mM Ca, (◇) 1 mM Ca, (×) 10 mM Ca added.

標準人工海水を調製する試薬には、特級品を使用しているが、夾雑物として微量のCaが存在する場合がある。そこで、Mgと結合せず、Caを選択的にキレートするグリコールエーテルジアミン四酢酸(EGTA)を加え、完全にCaを取り除いた場合も調べた。その結果、浸漬直後ではほとんど差がなかったが、EGTAを添加し、Caを除いた場合は保存後から発色率が低下し、10-12 hr後にはほぼ0%と

なった。一方、EGTAもCaも加えなかった場合は、保存開始時から徐々に発色率が減少したが、低下速度はEGTA添加の場合より緩慢で、36 hr後に発色率がほぼ0%となった。すなわち、人工海水中には、微量のCaが含まれていたことが推定された。添加Ca濃度が0.1 mMの場合も、保存3 hr後から徐々に発色率は減少し、72 hr後には、発色率がほぼ0%となった。Ca添加の濃度が0.5 mM以上では10 mMまで、あまり、Ca濃度の違いによる違いは認められず、3日にわたる期間、一定のレベルを維持していた。このことから、保存・輸送時に使用するCa濃度を調整することによって、保存中の体色を積極的に制御できることが明らかとなった。すなわち、1 mM程度のCaを添加することで、高いレベルを維持することができることが明らかとなった。

### 3.7 Caによる発色率の変化の可逆性

Ca濃度を下げ、発色率の低下したものは、いわゆる鮮度が悪くなって、白色化したものと同じであれば、かえって商品価値を激減させていることになる。もし、この発色率低下した色素胞が、その後Caを加えることで可逆的に発色が起こるのであれば、この発色率が低下した状態は、死後、色素胞が発色する前の段階に相当するかもしれない。そこで、一旦Caを含まない浸漬液に浸漬させ、発色率を低下させた後、Caを十分含む浸漬液に戻したときに、可逆的に再上昇するかどうかを調べた(図7)。

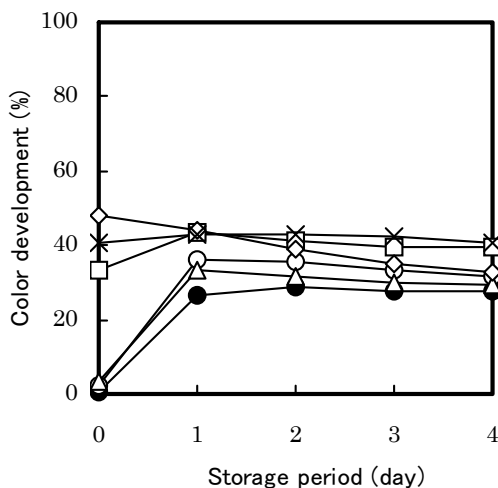


Fig. 7 Reversible recovery of color development treated with EGTA. (●) EGTA treated sample was soaked in solution contained 10 mM Ca. Other samples once soaked for 72 hr in the solutions containing (○) 0 mM, (△) 0.1 mM, (□) 0.5 mM, (◇) 1 mM, and (×) 10 mM Ca.

もし、色素胞の運動機能が保持されたままであれば、Caを含む浸漬液に浸漬しなおせば、回復が期待される。図6で用いた様々な濃度のCaに72 hr浸漬した試料を、Caを十分含む標準人工海水へ再浸漬した。その結果、著しい発色率の減少が観察されたEGTA添加区、Ca無添加区、0.1 mM Ca添加区でも、再浸漬によって再び発色率が増加した。しかし、最初からCaが入っていた場合より、多少値は低かった。Ca濃度の調整によって発色率が減少したのは、色素細胞の運動に関わっているタンパク質などの変性によっておこったものではなく、色素胞の運動機能がCaによって制御されていたことによって引き起こされた反応であることが示された。それゆえ、まだ、表皮の色素胞が発色していないイカとして、保存できることが分かった。

### 4. 考察

生鮮スルメイカは、保存中にダイナミックに体色が変化する。スルメイカの体色に対する関心は、産業的にも高いが、死後の体色変化のメカニズムに係わる知見は、十分に得られていない。

今回、スルメイカの表皮の色素胞活動に対する金属イオンの影響を検討したところ、海水中の濃度の2倍のKが存在すると、色素胞の拡張が促進されることが示された(図2C)。一般に、哺乳類では、KがNaと拮抗しつつ相補的な働きをして神経機能を正常に保っているといわれており、神経生理学の分野では、化学的刺激を与える際の物質としてKが多用されている<sup>8)</sup>。また、斉藤、武野は、漁獲直後の発色をおこしていないイカを、Kを含む溶液へ接触させることによって赤澄色化させる技術を開発している<sup>9)</sup>。これらのことから、今回認められた結果は、軟体類であるイカにおいても、Kが剥皮した表皮に存在する神経の興奮を誘導することによって、色素胞の運動機能発現をもたらしたものと考えられた。CaやMgにはKのような急激な反応は認められなかったが、長時間保持した貯蔵実験から、Caに非常に強い作用があることが示された(図5)。

死後においても、体色変化が神経支配されているのかを探るため、L-GluとGABAが死後のイカの色素胞活動に及ぼす作用を検討した。その結果、L-GluやGABAによってそれぞれ、色素胞の拡張と収縮が誘導されること(図3)、その作用が可逆的な反応であること(図4)がわかった。一般に、神経伝達物質の作用は、勿論可逆的な生体反応であることに加えて、濃度依存的で<sup>10)</sup>、持続性に

乏しい<sup>11)</sup>という特性を有すると考えられている。このことから、今回認められた、L-Glu や GABA による色素胞の拡張・収縮現象は、神経伝達物質としての作用によっておこっていることが推察されるとともに、死後の体色変化の少なくとも一部に神経支配の影響があることを予想させるものである。

空気保存と対照的に、人工海水にイカを保存しておけば、4-5 日間、発色も起こさず、退色もせずに保持できることが分かった。また、イカ皮には生命活動に必須の ATP が、死後減少することなしに、存在していた。このことは、その細胞が生きており、ATP を再生産していることを推定させるものであった。この、人工海水に含まれている各種ミネラルのうち、どのミネラルが色素胞の活動に重大な影響を及ぼしているのか、あるいは、活動維持のための最低のミネラル組成は何かについて研究した。すなわち、人工海水から、特定のミネラルだけ取り除き、その液に浸漬し、発色に対する影響を調べた。すると、Mg 除去の影響はほとんど変化が認められなかった。K 除去の影響は貯蔵初期の急激な退色を引き起こしたが、貯蔵とともに回復した。Ca の除去は急激な退色を引き起こした。すなわち、浸漬中に色が変わらなかったのは Ca の作用であることが結論された。この見かけ上の退色現象は、浸漬液に Ca を含む溶液に再浸漬することで、回復したので、色素細胞が機能を失ったためではない。これらの結果から、海水から Ca を除いた組成の溶液に浸漬することで、生きている状態の、

発色する前のイカ表皮の状態を再現できることが分かった。そして、目的に応じて、Ca の入っている溶液に移せば、発色させることができる。この技術を使うことで、生きたままの色素細胞の発色を人為的に制御できると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 奈須敬二, 奥谷喬司, 小倉通男共編著, イカ—その生物から消費まで—(成山堂書店), 33~67(1991)
- 2) 奈須敬二, 奥谷喬司, 小倉通男共編著, イカ—その生物から消費まで—(成山堂書店), 251~294(1991)
- 3) E. Florey, F. Dubas, and R. T. Hanlon: *Comp. Biochem. Physiol.*, 82C, 259~268 (1985)
- 4) 吉岡武也: 学位論文(北海道大学), (2003), 6~7
- 5) 新生化学実験講座 11—神経生化学—(東京化学同人), 319~321(1990)
- 6) P. L. R. Andrews, J. B. Messenger and E. M. Tansey: *Proc. R. Soc. Lond.*, B213 93~99 (1981)
- 7) J. B. Messenger, C. J. Cornwell, and C. M. Reed: *J. Exper. Biol.* 200, 3043-3054 (1997)
- 8) 小野富男: 生化学第 76 巻, 1560~1565 (2004)
- 9) 斉藤博子, 武野潔: 特開平 5-123099
- 10) E. Florey: *Comp. Biochem. Physiol.*, 18, 305-324 (1966)
- 11) 小野寺加代子, 竹内昭: 蛋白質 核酸 酵素, 第 35 巻, 734~742 (1990)

No. 0649

## Regulation of Color Development of Squid Skin Melanophore by Changing Ion Composition of Artificial Sea Water

Kunihiko Konno

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

### Summary

Skin color is the most sensitive index to know the freshness of squid. Skin color of squid gradually increases and decreases during its storage in air. In the present study, attempts were made to keep the chromatophores of squid skin active after death by soaking in artificial sea water. Especially mineral essential for keeping the activity was studied. Chromatophores of dead squid still responded to L-Glu, and GABA in the artificial sea water. The former developed the color and the latter suppressed the color development. Suppressed color development by GABA was reversibly recovered upon addition of L-Glu. Such reversible response to L-Glu and GABA was kept unchanged for several days. When stored in sea water, color development level was kept unchanged for up to 5 days. Exposure of the samples stored to air induced color development as observed with fresh squid. Thus, soaking in the sea water was the excellent method to keep the activity of chromatophores after death. Important minerals for keeping chromatophores active were studied by elimination test. Removal of Mg did not change the profile. Removal of K slightly affected the profile. However, removal of Ca significantly reduced color level disappeared in 1 day storage. To understand the importance of Ca in controlling color development, studies were performed by varying Ca concentrations in the artificial sea water. A complete removal of Ca by adding EGTA, Ca specific chelator, enhanced the reduction of color index. Ca higher than 1 mM was required to keep the color level. Reduced color index by treated with EGTA was reversibly recovered by soaking in the solution containing 10 mM Ca.