ヒラメの白化とリボフラビン含量との相関について

中 村 弘 二, 飯 田 遙

(1986 年 1 月 27 日受理)

Relationship between Albinism and Riboflavin Amount in Flounder *Paralichthys olivaceus*Koji Nakamura*¹ and Haruka Iida*¹

To elucidate the relationship between riboflavin content and body color (melanin content), albinic juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* were examined for riboflavin in the skin and muscle.

In the normal juvenile flounder, the riboflavin content reached 1,200 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in the black skin of the ocular side. The values obtained from the albinic individuals were less than one tenth of that of the normal ones; the more the degree of albinism, the smaller the amount of riboflavin. There was little difference between the albinic and the normal individuals as for riboflavin content in the blind side. The riboflavin content in the muscle of the normal individuals was roughly proportional to that in the skin and was higher in the ocular side than in the blind side.

In piebald individuals the riboflavin content of the skin was remarkably higher in the black part than in the white part.

It was confirmed by paper chromatography that all of the riboflavin in the skin of both the normal and the albinic individuals existed as free type.

From the above results, it seems that there is a close relationship between riboflavin content and body color (melanin content). As riboflavin is a photosensitive substance, melanin formation should be accelerated by its photosensitive action under the sun light.

未利用資源であるアロツナス *Allothunus fallai* の原料特性、とくに、アロツナスの灰青色筋肉色素を調べる機会を得て、この色素はメラニンであることをすでに明らかにした。^{*2} さらにその後の研究の結果、アロツナス筋肉にはメラニンばかりでなく、ビタミン B_2 (以後、リボフラビンと呼ぶ) が多量に認められ、しかも、メラニン量とリボフラビン量とは非常に高い相関を成していることを見出した。

動物の体表におけるこうしたメラニンとリボフラビンとの密接な相関については、すでに、古くから報告がある。^{1,2)} しかし、メラニンとリボフラビンが生理化学的にどのような関係にあるのかについてはほとんど知られていない。

一方、近年、増養殖上、メラニン生成異常に起因すると考えられるヒラメ、カレイの白化が大きな問題となっている。こうした白化にもリボフラビンが何らかの形で関与している可能性がある。そこで、ヒラメの幼魚を対象として、体色とリボフラビンとの間に、相関があるか

否か、さらに、リボフラビンがメラニン生成にどのような役割を果しているのかを検討する目的で本研究を行った。

試料と方法

試料 1985 年 10 月に岩手県栽培漁業センターで飼育されたヒラメ *Paralichthys olivaceus* の幼魚を凍結して研究室に運び分析に供した。

分析は 4 つの部位に分けて行なった。皮は有眼側と無眼側に分け、ていねいに筋肉を取り除き試料とした。筋肉部として、有眼側、無眼側のいずれも背側の筋肉を試料とした。

方法 抽出は、0.1~2 g 程度の試料から 3 ml の 80°C の熱水で 2 回抽出し、10 ml にメスアップし、分析に供した。

リボフラビンは、ルミフラビン蛍光法³⁾ によって測定した。

ヒラメの体表におけるリボフラビンの存在形態をペー

東海区水産研究所業績 B 第 759

*1 東海区水産研究所 (Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 5-5-1, Kachidoki, Chuo, Tokyo 104, Japan).

*2 中村弘二, 飯田遙, 徳永俊夫: 昭和 59 年度日本水産学会秋季大会 (仙台) 講演要旨集, p. 519.

Fig. 1. Photograph of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*
N: Normal individuals
A: Albinic individuals

Fig. 2. Photograph of piebald flounder
A: Black part of the ocular side
B: White part of the ocular side
C: Black part of the blind side
D: White part of the blind side

パークロマトグラフィーによって調べた。試料は熱水で抽出しフェノールに転溶後、再び水に転溶して濃縮した。これを東洋濾紙 No. 51 に塗布し、*n*-ブタノール：酢酸：水 (4:1:5) を溶媒として、約 20 cm (一夜) 展開した後、紫外線照射によって、リボフラビンの位置を確認した。

ビタミン A の定量 試料として、皮の場合、0.11～0.38 g、普通肉では 1～2 g を用い、クロロホルム：メタノール (2:1) で抽出し、減圧乾固した。これをケン化して、*n*-ヘキサン転溶後、乾固し、0.1 ml の、*n*-ヘキサンの溶解し、日立高速液体クロマトグラフ 635 形によって分析した。⁴⁾

結 果

試料としたヒラメを Fig. 1, 2 に示した。対照として、体色の濃い正常と思われるものを分析に供した。

Fig. 1 では、一番上に正常な個体、下になるに従って白化の程度がひどいものを置いた。頭が左に向いているものは表が有眼側、頭が右に向いているものは表が無眼側になっている。Fig. 2 は白黒まだら模様になっている個体を示し、白い部分と黒い部分とに分けて分析に供

した。

白化の程度は非常に個体差が大きく、また、正常と思われる個体でも体色の浅いものから真黒なものまで様々であった。そうした試料について、白い部分の占める面積から目視によって白化の程度を判定して、リボフラビン量の結果と共に Table 1 に示した。なお、飼料の組成、白化の出現率等については、本研究では検討していない。

正常と思われる個体の体表では、リボフラビンは有眼側に多く、無眼側では、著しく低かった。無眼側のみの値をみると、試料 No. 1, 3 では含量が高かったが、これは Fig. 1 に示したように、無眼側でも体表の黒化した個体があり、No. 1, 3 ではそういう黒化した部分が比較的大きかったためと思われる。一方、筋肉中の含量は、正常な個体では、有眼側の筋肉の方が無眼側の筋肉より高い値を示し、しかも、有眼側体表のリボフラビンが多いものは筋肉にも多い傾向を示した。

白化したヒラメでは、有眼側体表の含量は正常な個体の有眼側体表と比べて明らかに低く、しかも、白化の程度がひどくなるに従って、その含量も低下していた。とくに、No. 13 では、有眼側よりも無眼側の方が含量が

Table 1. Distribution of riboflavin in the skin and muscle of normal and albinic juvenile flounder

Sample No.	Degree of albinism*	Body weight (g)	Total length (cm)	Content of riboflavin ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			
				Ocular side		Blind side	
				Skin	Muscle	Skin	Muscle
1	+	6.30	8.5	1343.1	63.2	638.5	58.1
2	+	9.51	9.1	1328.8	85.5	180.4	47.0
3	+	15.13	10.5	1172.8	70.5	462.5	38.6
4	+	17.56	11.5	1105.8	49.2	135.7	47.4
5	+	15.07	10.7	1100.0	40.7	130.6	36.9
6	—	19.54	11.2	654.2	54.2	317.3	44.9
7	—	7.40	8.6	454.4	48.7	99.5	36.2
8	--	12.52	10.8	194.1	51.8	119.2	48.8
9	--	10.78	9.8	198.4	80.5	130.6	36.0
10	---	9.55	9.1	188.7	81.2	138.9	113.3
11	---	16.21	10.8	157.3	35.9	119.0	80.5
12	---	9.93	9.2	139.8	45.1	103.9	47.0
13	---	14.64	10.3	104.6	41.1	142.2	52.5

* Degree of albinism in the skin of the ocular side, +: normal color without white part, -: partial, --: over 50% of the whole skin, ---: whole.

Table 2. Distribution of riboflavin in the skin of piebald flounder

Sample No.	Degree of albinism*	Body weight (g)	Total length (cm)	Content of riboflavin ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)			
				Ocular side		Blind side	
				Black part	White part	Black part	White part
14	—	14.07	9.2	312.2	105.3	408.6	183.2
15	--	17.95	10.7	255.1	70.9	339.4	96.0
16	---	5.93	7.7	310.4	109.9	670.7	52.6

* See Table 1.

高く逆転していた。また、無眼側が黒化している個体 (No. 6) は、No. 1, 3 でみられたように、無眼側でもかなり高い値を示した。

とくに興味深いのは、上述のように正常な個体では、筋肉中の含量が無眼側より有眼側に多く、しかも、有眼側体表の含量が多いものは筋肉中の含量も多かった。これに対し、白化個体では、白化の程度がひどくなるにつれて、リボフラビン含量は有眼側より無眼側の方が高い傾向を示した。この原因については明らかでないが、白化個体ではリボフラビン代謝に異常があるのかもしれない。

白黒のまじったまだら模様の個体の白い体表部分と黒い体表部分各々の含量を測定した結果を Table 2 に示した。これを見ると、有眼側、無眼側で、同じ傾向が見られ、白い部分よりも黒い部分にリボフラビンが多く、また、同じ黒い部分でも、有眼側よりも無眼側の黒い部分の方が、含量が高かった。

リボフラビンは生体内で多様な形で存在するが、主として3つの形態、すなわち、遊離のリボフラビン、フラビンモノヌクレオチド (FMN)、フラビンアデニンジス

Fig. 3. Paper chromatography of free riboflavin and the extract obtained from flounder

1. Free riboflavin.
2. Extract obtained from the black skin of the ocular side of normal flounder.
3. Extract obtained from the white skin of the blind side of normal flounder.

Solvent: *n*-Butanol: Acetic acid: Water = 4:1:5

クレオチド (FAD) を取る。とくに, FMN, FAD は補酵素として生体内で重要である。ペーパークロマトグラフィーによると, 正常なヒラメの体表のリボフラビンは全て遊離の形として存在した (Fig. 3)。また, 白化したヒラメの体表のリボフラビンも同様に, 遊離のリボフラビンであった。

ビタミンAの定量によると, ビタミンAは, 体表, 筋肉とも痕跡程度にしか検出されなかった。こうした結果から, ヒラメ中のビタミンA含量は高いものではなく, また, 有限側, 無限側で大きな差がないものと考えられたが, 用いた試料が極めて少ないために, さらに詳細な検討が必要である。

考 察

ヒラメの体表のリボフラビンについては, 鷲野⁵⁾が, 無限側で 95 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 有限側で 2,460 $\mu\text{g}/100\text{g}$ と, 無限側より有限側に著しく多いことを示した。

本研究の結果でも, リボフラビン含量と体色 (メラニン含量) との間に, 明らかに密接な相関があることが認められた。

何故, メラニンを含む体表の黒い部分にリボフラビンが多いのかについては明らかではないが, メラニンによる光の遮蔽効果で, リボフラビンの光分解が抑制されるために, リボフラビンの蓄積が起こるといった単純な機構だけではなく, リボフラビンが, メラニン生成に関与している可能性がある。

リボフラビンとメラニンの相関については, 古くから知られているが, メラニン生成に対するリボフラビンの作用については, ほとんどわかっていない。しかし, 注目されるのは, Ito⁹⁾の報告で, 金魚にリボフラビン, ビタミンA, グルタチオン, ビタミンCなどを皮下注射して, 体表の黒化が起こるかどうかを調べ, リボフラビン, ビタミンA, およびグルタチオンが黒化を促進すると述べている。グルタチオンについては, チロシナーゼに含まれる Cu^{++} と結合することによってチロシナーゼ阻害を起こすことが良く知られている。従って, メラニン生成を促進するとは考えられないが, メラノサイト内での阻止作用, チロシナーゼ活性阻害以外の作用を有するか否かについては検討の必要がある。さらに, Ito⁹⁾は, 光は当然のことながら, 酸素や水温もまたメラニン生成に大きな影響を与えると述べている。リボフラビン, ビタミンAがいずれも光感物質, 光増感物質であり, こうした物質がメラニンと相関があることは非常に興味深い。

ところで, マダイの体表についてチロシナーゼ活性を調べたところ, 活性は認められなかった。^{*1} ヒラメについても現在検討中であるが, これまでのところ, マダイと同様にチロシナーゼ活性はかなり低いものと思われる。また, ヒラメの体表のリボフラビンが補酵素である FMN, FAD ではなく遊離の形であることからみて, メラニン生成にリボフラビンが関与している場合, 酵素作用ではなく, 別の作用に基づくと推測された。従って, リボフラビン, ビタミンAなど光感物質, 光増感物質がドーパキノン以降のメラニン生成までの自動酸化を促進している可能性が考えられる。

リボフラビンの光化学作用についてはかなり詳しく研究されており, アミン類, フェノール類の光酸化, オレフィン類の光重合などを起こすことが知られている。⁷⁾ これはフラビンの三重項が分子状酸素にエネルギーを渡し, 一重項酸素を生成することによる⁷⁾とされている。最近の研究では一重項酸素ではなく, O_2^- (スーパーオキシド) による⁹⁾とされている。メラニン生成の場合, ドーパキノンからメラニンへの重合の過程で酸素を要求することから, こうした反応性の高い一重項酸素やスーパーオキシドの存在がメラニン生成に影響を及ぼしていると考えられる。

ヒラメの白化の出現機構について, Seikai⁸⁾は, ヒラメ幼魚の餌生物について調べ, ある種のプランクトンに, 白化を抑制する効果があることを報告し, 白化が餌生物中のある種の成分によって引き起こされる可能性を示した。

最近, ヒラメ幼魚の白化について金沢^{*2}が詳細に検討し, ビタミンAの欠乏が白化に最も大きな影響を与えたとした。平尾¹⁰⁾も成魚のヒラメの体表のビタミンA分布を調べ, ビタミンA含量は無限側より有限側で2~3倍高いことを認めた。同時に, ビタミンAとリボフラビンとの間には一定の相関があることを示した。Ito⁹⁾もビタミンAとメラニンとの相関について報告しているが, 現在までのところ, ビタミンAのメラニン生成に及ぼす作用機構については全く不明である。本研究では, ヒラメ幼魚のビタミンA含量を測定したが, その含量は痕跡量で, 体色との相関を示す結果は得られなかったが, 前述のように多くの報告から, メラニン生成に関与している可能性があり, この点についてはさらに検討が必要である。

以上の結果から, 白化現象の発現には, 光感物質, 光増感物質であるリボフラビン, ビタミンA, ビタミンD, カロテノイド, とくにリボフラビンが重要で, リボ

*1 中村弘二, 飯田遙昭: 昭和60年度日本水産学会秋季大会 (鹿児島) 講演要旨集, p. 107.

*2 金沢昭夫, 手島新一, 山下昌彦, 高橋浩樹, 平川諒三郎: 昭和60年度日本水産学会秋季大会 (鹿児島) 講演要旨集, p. 110.

フラビンは、ドーパキノンからメラニンへの酸化、重合を促進し、こうして生成されたメラニンは、リボフラビンのような光分解し易い物質を光から保護する、といったフィードバック機構が存在することが推測された。白化ヒラメで認められたようなリボラビン等の光感物質、光増感物質の欠乏がどのようにして起こるのかは不明であるが、単純な餌中の含有量の不足だけでなく、魚体内のリボフラビン代謝の異常に起因することも考えられ、さらに詳細な研究が望まれる。こうした白化の発現は、幼魚期のごく限られた時期の餌成分の不足によりもたらされると考えられ、成長に伴って、白化はかなり回復するといわれている。従って、成育過程でのリボフラビンの挙動、季節的変動、また、白化に及ぼす他の要因などについても検討することが必要である。

本研究を進めるに当たり、試料のヒラメを提供して頂いた岩手県栽培漁業センター、並びに大槻観三博士に深謝致します。

文 献

- 1) 土屋靖彦: 水産化学, 恒星社厚生閣, 東京, 1972, p. 325.
- 2) 堀田一雄, 八木國夫: ビタミン, **2**, 200-210 (1950).
- 3) K. Yagi: in "Methods in Enzymology" (ed. by D. B. McCormick and L. D. Wright), Vol. 6, Academic Press, New York, 1971, p. 280.
- 4) 杉井麒三郎, 衣巻豊輔: 東海水研報, **108**, 39-46 (1982).
- 5) 鷺野栄万蔵: ビタミン, **6**, 948-951 (1953).
- 6) M. Ito: *Tohoku J. Exptl. Med.*, **55**, Supplement (I), 1-104 (1951).
- 7) 植木 厚: ビタミン学II, 東京化学同人, 東京, 1980, pp. 69-129.
- 8) 八木國夫, 錦見盛光: 代謝, **15**, 13-21 (1978).
- 9) T. Seikai: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1261-1267 (1985).
- 10) 平尾秀一, 山田充阿彌, 菊地 嶺: 日水誌, **21**, 454-457 (1955).