

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和7年度 研究分担報告書

既存添加物の成分組成に関する研究

既存添加物スピルリナ色素の定量評価の基礎検討

研究分担者 井之上浩一 立命館大学薬学部 臨床分析化学研究室 教授

研究要旨 スピルリナ色素は、第10版食品添加物公定書においてスピルリナ (*Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*)) の全藻から得られた、フィコシアニンを中心とするものと定義されている。フィコシアニンは青色の発色団を分子内に有するタンパク質で、食用色素として用いられ、その抗酸化活性や神経保護作用からスーパーフードとしても近年着目されており、今後、安全性確保のため、より適切な成分規格を策定していく必要がある。公定書には確認試験として、定性手法が定められている。昨年度の研究において、主成分であるフィコシアニンに着目し、その発色団の構造を酵素消化法によって解析した。本消化法により、スピルリナ色素で良好なピークを認めた一方で、その精密質量を計測した場合、フィコシアノビルンとは約2 Da異なる分子量となり、正確な構造同定までには至らなかった。本年度の研究では、この違いが測定処理時に発生したものか、サンプル自体の特性かを解析する目的で、トリプシン消化による消化を試みた。得られた試料は液体クロマトグラフィー-高分解能質量分析装置で測定し、フィコシアノビルン結合シーケンスを確認することができた。

研究協力者

高山卓大 立命館大学薬学部 助教

A. 研究目的

スピルリナ色素 (*Spirulina color*) は、第10版食品添加物公定書(以降、公定書)において「本品は、スピルリナ (*Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*)) の全藻から得られた、フィコシアニン(PYC)を主成分とするものである。デキストリン又は乳糖を含むことがある。」と定義されている¹⁾。PYCは青色の発色団を分子内に有するタンパク質(分子量30 kDa)で、発色団は分子量600 Da程度の低分子フィコシアノビルン(PCB)である²⁾。スピルリナ色素は食用色素として用いられる他、近年、PYCが抗酸化作用、神経保護作用さらには抗がん作用を有することが報告され^{3,4)}、スピルリナ色素を含有する製品がスーパーフードとしても商業的に注目さ

れている。公定書にはスピルリナ色素の確認試験として、定性試験法に規格が存在する。一方で、その含有量評価は色価測定に留まっており、より正確な定量評価法が求められる。

そこで本研究では、定性・定量分析可能な理化学機器である高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に基づくスピルリナ色素の測定法の開発を目指した。定性・定量の対象物質としては、スピルリナ色素の主成分であるPYCとした。令和6年度の検討において、4種(スピルリナ色素2種、クチナシ青色素及びバタフライピー色素(チョウマメ色素))の市販青色素に関して、アミノ酸1残基レベルまで酵素消化を行う手法を検討した。すなわち、PCB結合型Cysレベルまで酵素消化を行い、そのピークの吸収波長と精密質量を計測した。その結果、スピルリナ色素製品1種において検出波長620 nm(PYCの極大吸収領域)で選択的に検出される

ピークが観測され、特に保持時間 6 分付近に高強度なピークを得た。この成分のもののアイソトピックな m/z は 706.2921 $[M+H]^+$ であり、PCB で予測される m/z 708.3066 よりも約 2 Da 小さく検出された。PCB はジヒドロビリベルジンを経て、不飽和炭素が還元されて得られるものとされており、上記の結果からは処理中に酸化が生じた可能性が示唆され、その判別が付けられなかった。そこで今年度の検討としては、PYC 含有製剤について、温和な条件下でトリプシン消化を行い、LC-四重極飛行時間型質量分析計 (QToF/MS) を用いてペプチドシーケンス解析を実施した。PYC の配列情報と照らし合わせ、PCB 結合断片の配列について詳細に解析した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

スピルリナ色素には市場より購入したものをを用いた。

アセトニトリル(HPLC 用), メタノール(HPLC 用), ギ酸(LC/MS 用, 約 99%), トリフルオロ酢酸(TFA, LC/MS 用), 尿素(試薬特級)及び重炭酸アンモニウム(試薬特級), Tris HCl(試薬特級)は富士フイルム和光純薬社製のものをを用いた。ジチオスレイトール(DTT, 試薬特級)及びヨードアセトアミド(IAA, 試薬特級)はナカライテクス社製のものをを用いた。トリプシン消化にはカートリッジ製である MonoSpin Trypsin を採用し、GL Sciences 社から購入した。消化後の脱塩には同社製の MonoSpin C18 をを用いた。本研究に用いた超純水は、全て Milli-Q EQ7000 system (Merck 社製)にて精製したものをを用いた。

B-2) 装置

電子天秤：メトラー製 METTLER ML303/52

遠心分離機：日立工機社製 Himac CF15RN

HPLC 装置：

Waters 社製 ACQUITY UPLC H-Class plus

ポンプ：Quaternary Solvent Manager

オートサンプラー：Sample Manager FTN-H

フォトダイオードアレイ検出器：PDA eλ
Detector

QToF/MS 装置：

Waters 社製 Xevo G2 XS

イオン化条件：エレクトロスプレーイオン化
ポジティブモード

測定モード：MSE モード

B-3) 酵素消化法

還元的アルキル化に用いる試薬の調製

溶解溶液 1：50 mmol/L 重炭酸アンモニウム-
2 mol/L 尿素溶液を超純水により調製した。

DTT 溶液：溶解溶液 1 を用いて DTT の 50
mmol/L 溶液を調製した。

IAA 溶液：溶解溶液 1 を用いて IAA の 50
mmol/L 溶液を調製した。

還元的アルキル化未実施検体（未還元）：1
mg/mL の PYC 溶液（50 mmol/L 重炭酸アンモニウム-
2 mol/L 尿素にて溶解）を調製し、400 μ L
を消化に供した。

還元的アルキル化実施検体（還元）：4 mg/mL
の PYC 溶液（溶解溶液 1 にて溶解）を調製し、
100 μ L を分取した。そこに DTT 溶液 25 μ L を
加えて、37°C で 30 分間反応させた。その後、
IAA 溶液の 75 μ L を加えて、遮光下で 37°C、30
分間反応させた。得られた溶液を 50 mmol/L の
重炭酸アンモニウム溶液で希釈し、全量を消化
に供した。

酵素消化条件

MonoSpin Trypsin にて下記のプロトコールに
従い実施

平衡化：50 mmol/L の重炭酸アンモニウム溶
液 500 μ L を通液（2000 $\times$ g, 1 分間）

試料ロード：2000 $\times$ g, 1 分間

反応：37°C で 60 分間

溶出：50 mmol/L の重炭酸アンモニウム溶液
500 μ L（サンプル溶液）を通液（2000 $\times$ g, 1 分
間）

MonoSpin C18 にて脱塩

脱塩条件

平衡化：アセトニトリル 200 μ L 及び 0.1%TFA

200 μ L を通液 (各 2300 $\times$ g, 1 分間)
保持: サンプル溶液 200 μ L に 0.1%TFA を 600 μ L 添加して全量をチャージ (2300 $\times$ g, 2 分間)
洗浄: 0.1%TFA の 200 μ L を通液 (2300 $\times$ g, 3 分間)
溶出: 60%アセトニトリル溶液の 200 μ L を通液 (2300 $\times$ g, 2 分間)
溶出液を濃縮乾固し, 5%アセトニトリル溶液の 100 μ L で再溶解し, 測定サンプルとした。

B-4) HPLC 分離分析

粉末の対象試料は超純水により溶解し, 400 μ g/mL までアセトニトリル/超純水(10/90, V/V)にて希釈した。移動相には, A 液: 0.1 vol%ギ酸水溶液/B 液: 0.1 vol% ギ酸アセトニトリルを使用し, 以下に示すグラジエント条件にて, 18.5 分の分析を行った。

カラム: Accura Triart Bio C18(2.1 $\times$ 100 mm, 1.9 μ m, YMC 社製)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

流速: 0.4 mL/min

還元的脱アルキル化の必要性に係る検討時のグラジエント条件 B% (min): 10(0)-10(0.5)-80(15)-98(15.1)-98(16)-10(16.1)-10(18.5)

本解析時のグラジエント条件 B% (min): 5(0)-5(0.5)-40(45)-98(45.1)-98(46.5)-5(46.6)-5(50)

検出波長: 620 nm

注入量: 5 μ L

C. 結果及び考察

C-1) トリプシン消化断片の LC-MS 解析

スピルリナ色素含有製品 A を用いて, 酵素消化に関する検討を行った。PCB はシステイン(Cys)に結合した状態で PYC 中に保持されていると知られている (図 1)。図 2 に, *Arthrospira platensis* 由来の PYC に関するアミノ酸配列を示した (UniProt より取得)。PYC のアミノ酸配列の中には, PCB 非結合型 Cys が α 鎖で 1 個, β 鎖で 2 個存在することが分かる。これらがジスルフィド結合を形成している可能性が考えら

れたため, 還元的アルキル化の必要性を検討する目的でその有無を比較した。結果, 得られた HPLC-UV 及びトータルイオンクロマトグラムを図 3-(a)及び(b)に示す。また, 図 3-(c)には検出されたペプチド断片に関して, その絶対イオン強度の相関を還元的アルキル化の有無でまとめた。いずれにおいても大きくクロマトグラムのパターンは変わっておらず, 各イオンのイオン強度は $R^2=0.97$ でほぼ相関していた。また, 未消化の PYC はその溶出位置にピークを認めなかった。以上の結果から, 還元的アルキル化の有無は消化効率に大きな影響を及ぼさないと考えられた。従って, サンプル固有の特性を検出することを期待し, 次の解析を実施した。

図 4-(a)及び(b)には, 保持を増加させた系にて LC-PDA 及び LC-QToF/MS 分析を行った結果を示す。検出波長 620 nm において溶出時間 25 分及び 30 分周辺に二つの主ピークを認め, それぞれ対応する位置に MS クロマトグラム上のピークを検出した。この関連イオンの抽出クロマトグラム及びMSスペクトルを図 5-(a)及び(b)に示す。25 分周辺のイオンは $[M+H]^+$ のモノアイソトピック m/z で 935.4476 に検出された。30 分周辺のイオンは $[M+H]^+$ のモノアイソトピック m/z で 1250.6126 に検出された。いずれのイオン種も 3 価までのイオンが良好に検出された。それぞれのピークをデコンボリューションし, MS/MS 解析を行った結果を図 6-(a)及び(b)に示す。これらのペプチドには, 共通して m/z 587.2851 のフラグメントイオンが認められ, これは PCB に由来するフラグメントイオンの m/z に相当すると考えられた。アミノ酸配列の b/y 帰属を行った結果を図 7-(a)及び(b)に示す。

以上の結果から, 昨年度の検討で考えられたジヒドロビリベルジンは, 強酸性を含む過激なタンパク消化条件による前処理において生じた可能性が考えられた。一方で, 本年度開発した温和なトリプシン消化による方法では, 既報にそぐわない結合位置に PCB として検出されることが明らかとなった。

D. 結論

本研究では、市販のスピルリナ色素に含まれる色素タンパク質が PYC であり、その発色団が PCB の構造をとっていることを確認する目的でトリプシン消化による解析を実施した。その結果、LC 分析においては検出波長 620 nm で 2 本の特徴的なピークが観察され、ESI-positive モードで m/z 935.4476 及び m/z 1250.6126 のイオンを与えた。発色団のフラグメントイオンは m/z 587.2851 として認められ、これは PCB の理論値と近似した値をとった。以上から、昨年度認められたジヒドロビリベルジンに由来すると考えられるピークは、強酸性を含む過激なタンパク消化条件による前処理において生じた可能性が考えられた。以上から、これらの断片を指標とすることで、スピルリナ色素含有製品に関する高度な定性分析が可能と考えられる。

一方で、以下の課題は依然として解決する必要がある。

①PYC は生物性タンパク質であるため、その種や株の差によっては PCB 結合領域周辺のアミノ酸配列が異なる可能性がある。現状のターゲット同定では、これらの差に対応することが出来ない。

②市販のスピルリナ含有製品は、ビタミン類をはじめとして他にも多数の成分を含む。これらが混入している状態で、PYC 由来断片を高感度に測定できるか不明である。

以上を検証する目的で、① m/z 587 を識別イオンとしたプロダクトイオンスキャンによるスクリーニング解析法の開発、②市販のスピルリナ含有製品への適用可否及び高感度化に向けた前処理条件最適化を引き続き実施していく予定である。

E. 参考文献

- 1) 第9版食品添加物公定書, 厚生労働省 (2017).
- 2) Schram BL, Kroes HH. Structure of phycocyanobilin. *Eur J Biochem.*, 1971; 30:

581-594.

- 3) Ashaolu TJ, Samborska K, Lee CC, Tomas M, Capanoglu E, Tarhan Ö, Taze B, Jafari SM. Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications. *Int J Biol Macromol.*, 2021; 193: 2320-2331.
- 4) Park WS, Kim HJ, Li M, Lim DH, Kim J, Kwak SS, Kang CM, Ferruzzi MG, Ahn MJ. Two Classes of Pigments, Carotenoids and C-Phycocyanin, in Spirulina Powder and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 2018; 23: 2065.
- 5) Zhang G, Huang G, Xiao L, Mitchell AE. Determination of advanced glycation endproducts by LC-MS/MS in raw and roasted almonds (*Prunus dulcis*). *J Agric Food Chem.*, 2011; 59: 12037-46.

F. 研究業績

1. 学会発表等
なし
- 2-1. 論文発表等
なし
- 2-2. 総説
なし
- 2-3. 単行本
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

フィコシアニン: $\alpha\beta$

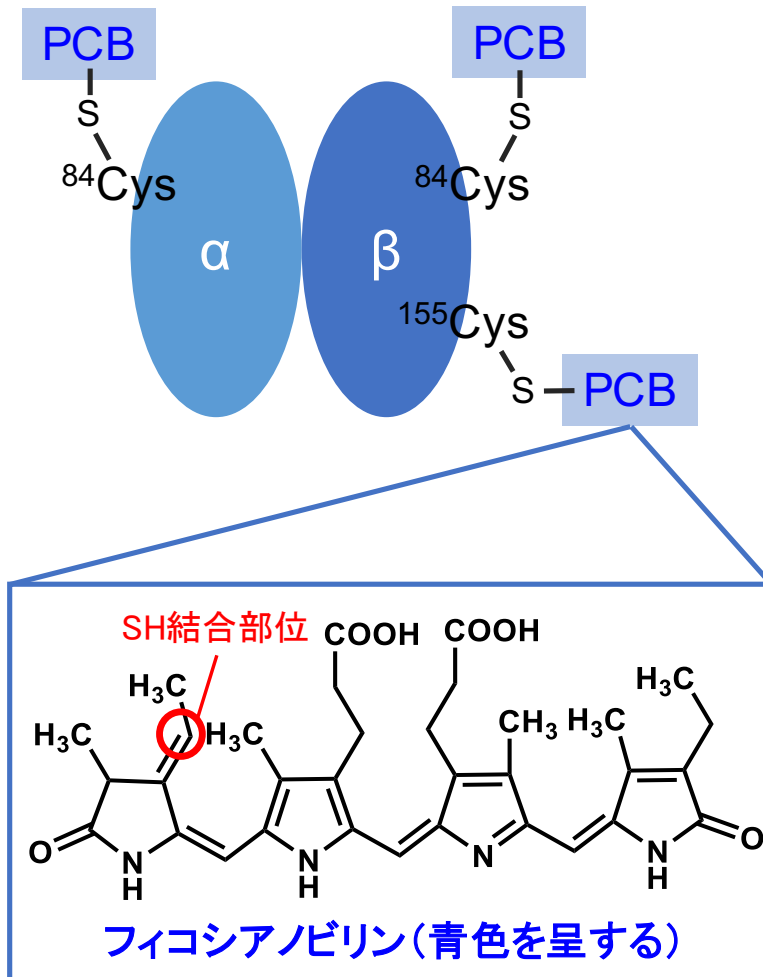


図 1. 分析対象物質 PYC の構造

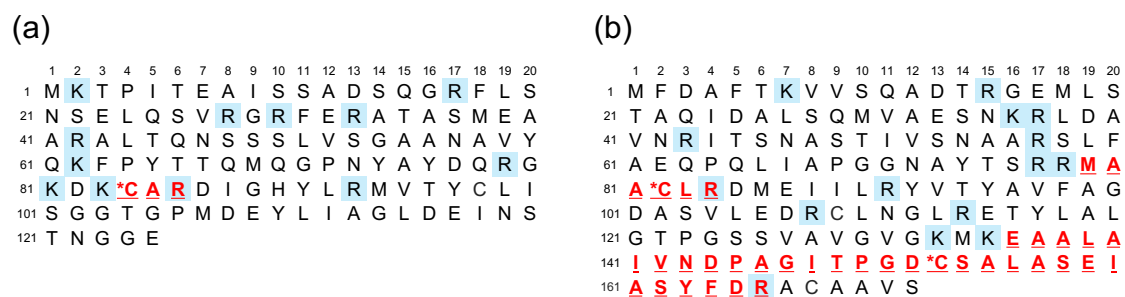


図 2. PYC のアミノ酸配列

(a) α 鎖(Q6RX70), (b) β 鎖(P72508). いずれも *Arthrospira platensis* 由来. *: PCB 結合が知られている Cys 残基, 青ハイライト: トリプシン消化の対象アミノ酸, 赤字: PCB 結合位を含む消化ペプチド

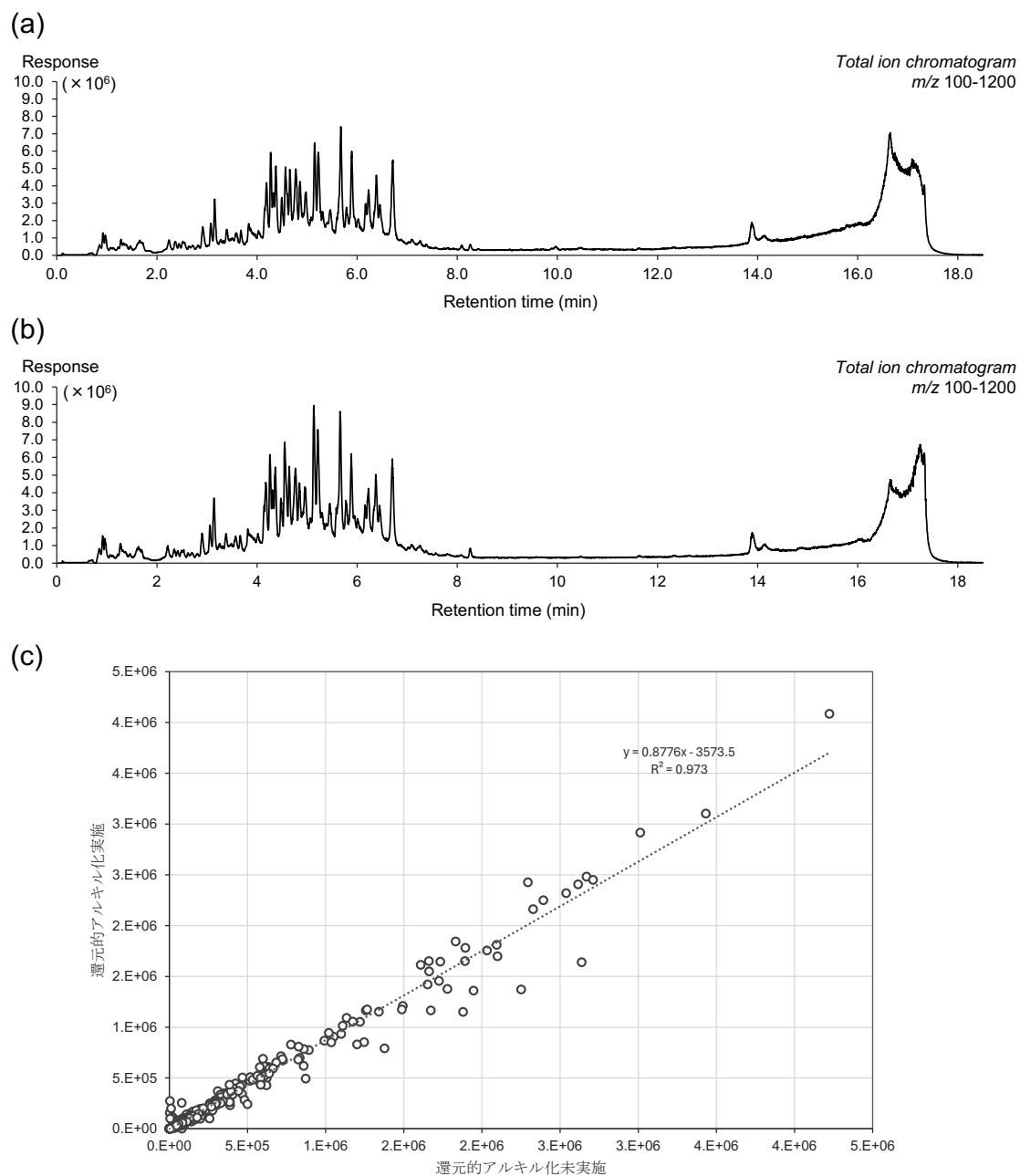


図 3. トリプシン消化断片のトータルイオンクロマトグラム及び MS 解析結果

(a) 還元的アルキル化ありのクロマトグラム

(b) 還元的アルキル化未実施のクロマトグラム

(c) ピーク強度の相関性図

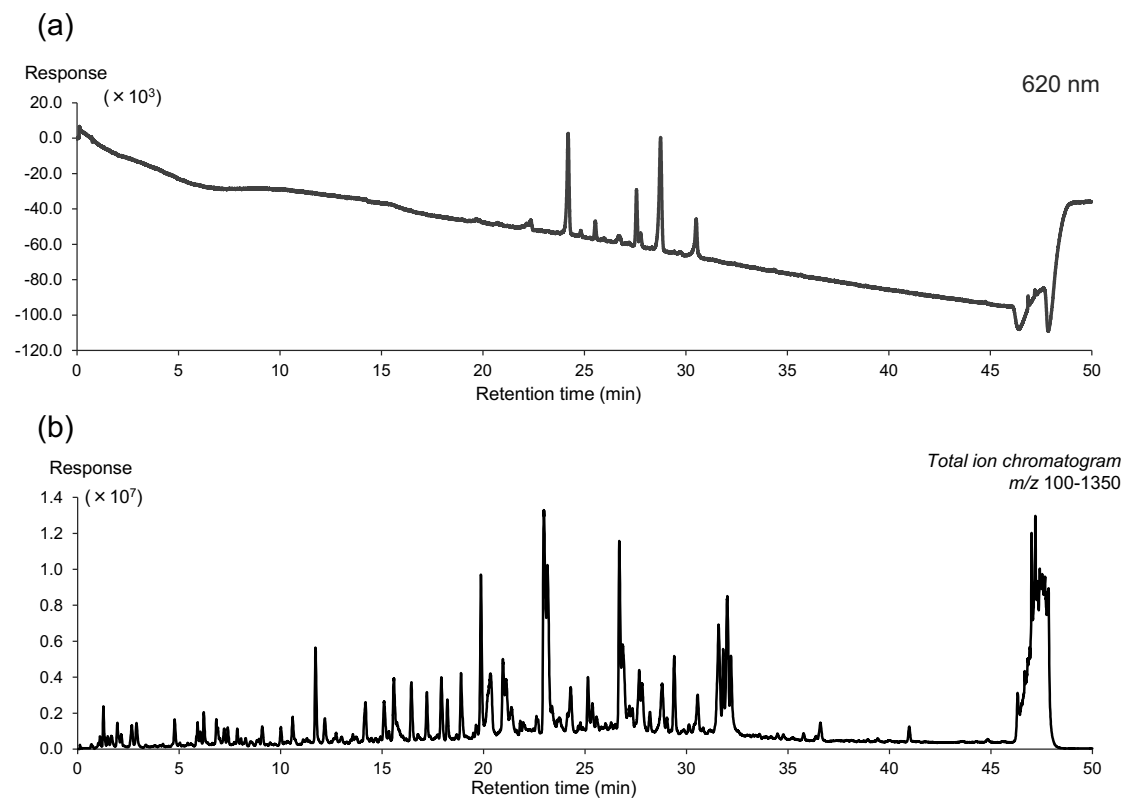


図 4. ペプチドシーケンス解析に供したクロマトグラム

(a) HPLC-UV のクロマトグラム (検出波長 620 nm)

(b) トータルイオンクロマトグラム

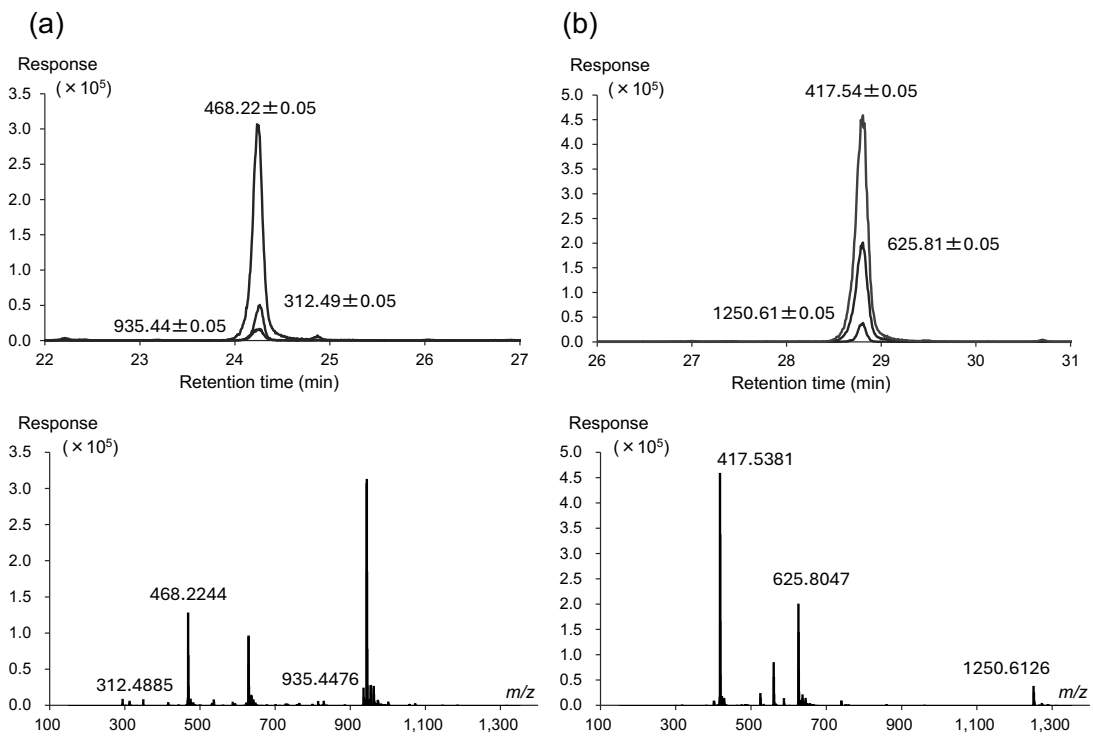


図 5. PCB 結合断片の抽出イオンクロマトグラム及び MS スペクトル

(a) $C_{PCB}LR$ 配列の結果

(b) $MAAC_{PCB}LR$ 配列の結果

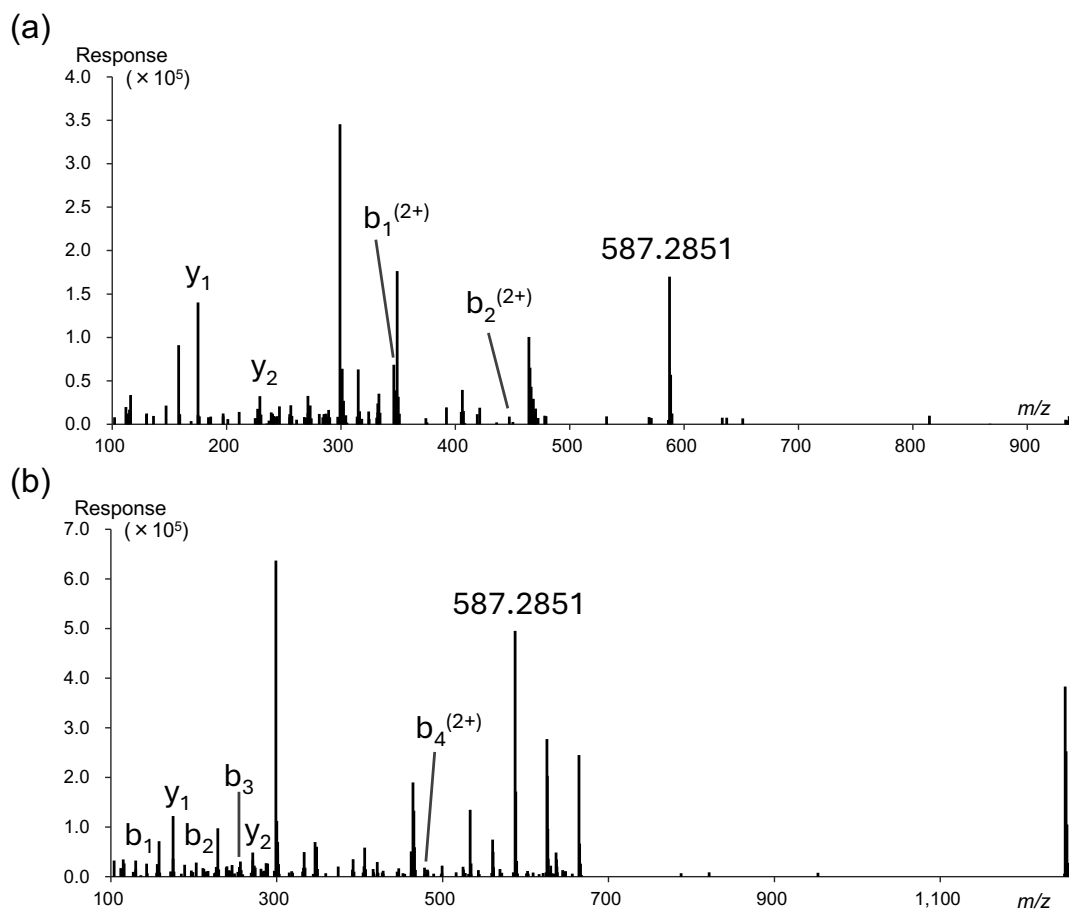


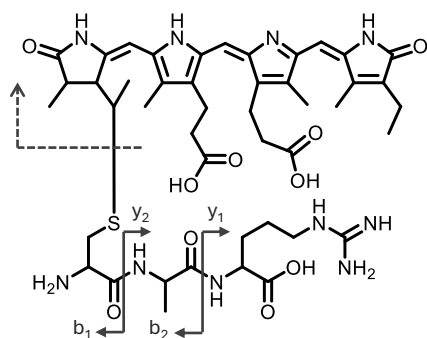
図 6. PCB 結合断片の MS/MS スペクトル

(a) $C_{PCB}LR$ 配列の MS/MS スペクトル

(b) $MAAC_{PCB}LR$ 配列の MS/MS スペクトル

MSDIAL (ver 230923.01)によりデコンボリューションを行い出力

(a)



(b)

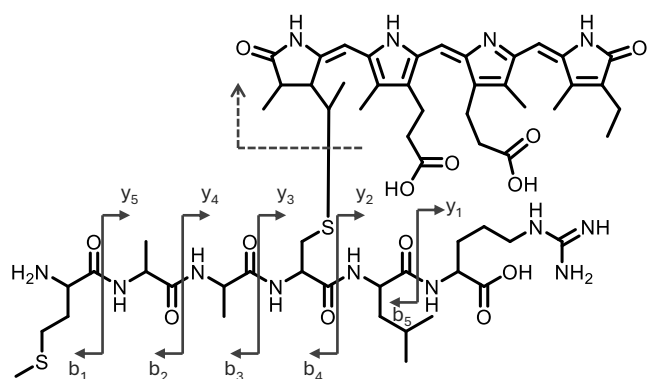


図 7. PCB 結合断片のペプチドシーケンス解析

(a) C_{PCB}LR 配列

(b) MAAC_{PCB}LR 配列

点線は PCB フラグメントに相当し、理論値は 587.2869