リンク走査による藻類カロテンの解析

Structure Analysis of Algal Carotenes by Linked Scanning Methods

辻本和雄*・大橋 守*・堀 輝三^{a)}・渡辺正勝^{b)}

Kazuo TSUJIMOTO, Mamoru OHASHI, Terumitsu HORI, and Masakatsu WATANABE

(平成3年9月25日受理)

Carotenes extracted from a green alga, *Bryopsis maxima*, were determined to consist of α -carotene as a major fraction of more than 99% by means of B/E constant linked scanning, HPLC with a $\text{Ca}(\text{OH})_2$ column and the absorption spectrum. The linked scanning showed the fragmentation characteristic of α -carotene, whose reaction has been well-documented as retro Diels-Alder fragmentation.

1. 結 言

藻類には、原核生物の藍藻類、真核生物の紅藻類や緑藻類などがある。管状藻オオハネモ (*Bryopsis maxima*) は緑藻類であるが、その生育場所が本州福島県～千葉県に限定され、ハネモ属植物としてはおそらく世界で最も大形の種類である。生物学的特徴として、1個の藻体が通常数十センチメートルの大きさに達する管状体である。体内には仕切りがないため、藻全体が巨大な一細胞からできているように見える。しかし細胞質は多数の核を含むため、多核管状体である。生殖期になると巨視的藻体からは運動性器官である鞭毛をもった配偶子が放出される。配偶子は眼点 (Eye-spot) といわれるオレンジ色の点状小器官をもつ。この眼点を電子顕微鏡で観察すると¹⁾、図1に見られるように、数十個以上の顆粒が層をなして葉緑体包膜の直下に集まったものであることがわかる。その直径は約 4 μm である。一般にこのような眼点が動物の眼と同じような挙動をするか

どうかについては今までよく知られていない。最近、中西らは単細胞緑色鞭毛藻であるクラミドモナス (*Chlamydomonas*) の光走性の光受容色素がロドプシンの一種であることを、その変異株とレチナールアナログを用いた実験から提唱している²⁾。

レチナール生合成の出発物質はカロテンであるが、多くの動物はカロテンを自らの生体内で合成をすることができない。そこで、それを外部から摂取することにより充足しなければならない。食物としての海藻はカロテン類色素の摂取源として海産動物にとって極めて重要であると考えられる。

他の海藻と同様に、オオハネモの栄養期藻体はクロロフィルとともに多くのカロテノイドを含んでいる。ところが、オオハネモのカロテノイドの化学構造に関する確立した研究は今まで皆無に近い。本研究では、オオハネモの藻体に含まれるカロテンの分析を、質量分析を用いて行った。

一般に藻類の色素はクロロフィル系、カロテン

* 電気通信大学電子物性工学科 (調布市調布ヶ丘 1-5-1)

University of Electro-Communications (1-5-1 Chofugaoka, Chofu, Tokyo 182, Japan)

^{a)} 筑波大学生物科学系 (茨城県つくば市天王台 1-1-1)

University of Tsukuba (1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan)

^{b)} 岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 (岡崎市明大寺町西郷中 38)

National Institute for Basic Biology (38 Nishigounaka, Myoudaijichou, Okazaki, Aichi 444, Japan)

図1. オオハモネの雌性配偶子の電子顕微鏡像。
写真最下部の一層の黒い顆粒層が眼点である。

系そしてキサントフィル系の化合物を含んでいる。これらの系統の化合物はシリカゲル薄層クロマトグラフィーによっておおまかに分離できる。しかし詳しい化学構造に関する情報はこの方法によっては得られない。例えば、カロテンについて、簡単に単離できるカロテンフラクションには数種類のカロテンが含まれる。それらの分子量は同じ

であるため、質量分析的には、分子イオンを見る限り区別できない。ところがマスペクトルにおけるフラグメンテーションをみるとカロテンの種類の違いが認められる。以下、特別なカラムを用いた HPLC による分離とあわせて、カロテンの化学的な構造解析について報告する。

2. 実験

2.1 装置

質量分析には日立製 M-80B 二重収束質量分析計を EI イオン源で用いた。イオン化にはインビーム法を用いた³⁾。電子加速電圧 70 V、電子電流 100 μ A、イオン加速電圧 3.0 kV、イオン化室温度 180°C、試料加熱温度 240°C で行った。リンク走査に関しては、プレカーサーイオンを m/z 536 とし MI スペクトルを測定した。

カロテン分析用の HPLC には日本分光製 Trirotar を用い、カラムには $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を充填したものを用いた⁴⁾。溶出液は 0.5% アセトン-ヘキサンを用い、流速は 1.0 ml/min、440 nm で可視光検出をした。またマルチ瞬間測光には(株)日立製作所製 L-3000 を使用した。

2.2 生物材料と抽出操作

オオハネモは茨城県の大洗海岸で冬期干潮時の夜に採集したものを用いた。約 3 ml の蒸留水とともに藻体すべてをヒスコロンで粉碎して、約 3 ml のメタノール-ジクロロメタン (1:2 容積比) を加え、30 秒間超音波振盪して抽出した。この懸濁液を 12,000 rpm、5°C で超遠心分離して、ジクロロメタン層を分離した。抽出物には多量のクロロフィルが存在していたので、小さなシリカゲルカラムクロマトグラフィーで 20% エーテル-ヘキサン溶液を展開剤として用いて、クロロフィルより早く流出する部分を集めた。この流出分は黄色を呈し、シリカゲルを充填剤とする HPLC では移動液を 5% エーテル-ヘキサン溶液とすると保持時間の短いところにカロテノイドに対応するピークを認めることができた。

3. 結果および考察

得られた脂溶性部分のインビーム EI スペクト

リンク走査による藻類カロテンの解析

図2. ジクロロメタンメタノールの混合溶媒での抽出物のインビーム EI スペクトル.

図3. 抽出物の m/z 536 の B/E 一定のリンク走査スペクトル.

ルを図2に示す。 m/z 536 はカロテンの分子イオンピークに対応する。通常、インビームスペクトルはプロトン化分子を示すことが多いが、気化しにくく、プロトン親和力の小さい炭化水素分子ではイオン-分子間反応により MH^+ を生成しにくく、分子イオンを示したものと考えられる。なお通常の EI 法ではカロテンの分子イオンを得るために 300°C 近く試料を加熱する必要がある。

m/z 514 に対応する化合物はカロテン類では考えられない。藻体を含まない空試験でもジクロロメタン層にこの化合物は含まれることから、おそらく遠沈管の材質であるポリアロマの可塑剤に

由来するものと考えられる。この混合物から純粋な m/z 536 のフラグメントイオンを知るため、B/E 一定のリンク走査を行なって娘イオンを検出した。そのスペクトルを図3に示す。

m/z 480, 444, 388 のピークは $[M-56]$, $[M-92]$, $[M-148]$ の各イオンに対応する。また m/z 514 にはピークが見られないことから、 m/z 514 はカロテンの分子イオンである m/z 536 からのフラグメントイオンではないことも推察でき、不純物に基づくという先の結果と一致している。

カロテノイドの EI 質量分析の研究は古くから行なわれており、Johannes らによって、共役系

の長さを, [M-92] と [M-106] のイオン強度比から求める方法が提出されている⁵⁾. 実際には, インビーム EI 法だけでなく通常の EI 法を用いても, この比の値から共役系の二重結合の数を求めると, 測定ごとに値が異なり, α -カロテンか β -カロテンかを区別する因子とはなりにくいことがわかった.

既知化合物の表と高分解能質量分析 ($536.4393 \Delta = 1.1 \text{ mu}$) の結果から, m/z 536 を与える可能性のあるカロテン系の分子式は $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ と決めることができる⁶⁾. その中で, 共役系の両端の構造は β , ϵ , ψ の形をとるのが一般的である (図 4). この末端の構造が両方とも β 型である β -カロテンは

図 4. 可能なカロテンの末端構造.

多くの植物中に存在することが知られている. したがってこのオオハネモから得られたカロテン類も β -カロテンである可能性は高いと考えられる. そこで, 標品の β -カロテンについて B/E: 一定リンク走査を行ったところ, 図 5 に示すような結果を得た. これを図 3 と比較すると m/z 480 や m/z 388 のピークが見られないことが一見してわかる. そこで, これらの二つのピークを詳しく解析してみると, m/z 480 は [M-56] に相応することがわかる. これは分子イオンからイソプテンが脱離したことを意味すると考えられる. そのフラグメンテーションは, 末端の ϵ 型に見られる Retro Diels-Alder 反応が考えられ, 図 6 に示すような機構で解裂するものと予想される. また m/z 388 のピークは [M-148] に対応し, 分子イオンからトルエンとイソプテンの両方の脱離が考えられる⁵⁾. いずれにしても, ϵ 型の末端を有するカロテノイドの分子イオンのフラグメンテーションは Retro Diels-Alder 反応生成物であるイソプテンの脱離を伴うことが特徴として挙げられる. したがって, この分子の二つの末端の少なくとも一つは ϵ 型であると結論できる. 他端については 3 種類の可能性があるが, ψ 型であるならば, [M-69] のフラグメンテーションが起り, m/z 467 にピークが観測できるはずである⁷⁾. ところが図 3 から明らかなように, m/z 467 にはピーク

図 5. β -カロテンの m/z 536 の B/E 一定のリンク走査スペクトル.

は観察されず、むしろ、 $[M-15]$ に対応する m/z 521 のピークが観測された（整数表示のため図3には m/z 520 と 522 のピークが観測された）。後者のピークは ϵ 型には観測されず、 β 型には観測されることが知られているので、末端は β, ϵ 型のカロテンであると推察できる⁷⁾。このカロテンは α -カロテンと言われている。そこでこのことを確認するために標品の B/E 一定のリンク走査を行った。

α -カロテンのリンク走査のスペクトルを図7に示す。オオハネモから単離したカロテンのリンク走査スペクトルである図3と比較すると、 m/z 520, 480, 444 と 388 のピークに関して類似したスペクトルを示す。したがって、単離したカロテンは以前に考えられてきた β -カロテンではなく⁸⁾、 α -カロテンであると推察できる。

さらに単離したカロテンが α -カロテンであることを確かめるため、カロテン留分の HPLC 分析と吸収スペクトルを調べた。 α -カロテンと β -カ

ロテンとの分離には一般にはアルミナのカラムを用いて HPLC 分析が行えると言われているが⁹⁾、完全な分離は困難であることがわかった。そこで、小山らによって報告されている水酸化カルシウムカラムを用いた⁴⁾。このカラムはこの種のカロテンの分離に極めて有効であることがわかった。オオハネモから得たカロテン留分と市販の全トランス α -及び β -カロテンの HPLC を図8に示す。図から明らかなように、オオハネモに含まれるカロテンはほとんど α -カロテンであるとの結論を得た。

フォトダイオードアレイを用いて HPLC 留分の吸収スペクトルを調べると、図9のスペクトルが得られた。この吸収極大値は一般に知られている α -カロテンのスペクトルのピーク値と一致し、 β -カロテンと比較するとスペクトルの形は類似するがピーク値は 5~6 nm 短波長であることから β -カロテンではないことが明らかである。

以上のことにより、(1) オオハネモの中に含まれるカロテンは β -カロテンではなく α -カロテンであることがカロテンの EI リンク走査スペクトルを基礎にして、そのフラグメンテーションにおける Retro Diels-Alder 反応の特徴を見ることによって容易に判別でき、(2) HPLC とその吸収スペクトルよりカロテンの組成と種類を決定できるとの結論が得られた。

図6. Retro Diels-Alder 反応によるフラグメンテーション

図7. α -カロテンの m/z 536 の B/E 一定のリンク走査スペクトル。

図8. オオハモネから得たカロテン留分の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ カラムを用いた HPLC (上段). 同じカラムを用いて, 全トランスの α と β カロテンの混合物の HPLC (下段). 8.3分と 17.2分の保持時間を持つ溶出分は全トランス α と β カロテンにそれぞれ対応する.

図9. オオハモネのカロテン留分の HPLC における最大ピーク (保持時間 8.3 分) の吸収スペクトル.

謝 辞 この研究に当たり, 関西学院大学の小山 泰教授から $\text{Ca}(\text{OH})_2$ カラム充填剤の供与を受け, 有益な議論をいただいた. また, 文部省科学研究費の補助金 (60430007) を受け, さらに, 基礎生物学研究所大型スペクトログラフ共同利用 (88-521; 89-508) 実験ができた. ここに感謝の意を表す.

文 献

- 1) J. D. Dodge, "The Fine Structure of Algal Cells", Academic Press, London, New York, 1973.
- 2) K. W. Foster, J. Saranak, N. Patel, G. Zarilli, M. Okabe, T. Kline, and K. Nakanishi, *Nature*, **311**, 756 (1984).
- 3) M. Ohashi, K. Tsujimoto, and A. Yasuda, *Chem. Lett.*, 439 (1976).
- 4) Y. Koyama, M. Hosomi, A. Miyata, H. Hashimoto, K. Nagayama, T. Kato-Jippo, and T. Shimamura, *J. Chromatogr.*, **439**, 417 (1988).
- 5) B. Johannes, H. Brzezinka, and H. Budzikiewicz, *Org. Mass Spectrom.*, **9**, 1095 (1974).
- 6) O. Straub, "Carotenoids", O. Isler, ed., Birkhauser, Basel and Stuttgart, 1971.
- 7) M. E. Rose, "IUPAC Carotenoid Chemistry and Biochemistry", G. Britton and T. W. Goodwin, eds., Pergamon, Oxford, 1982, pp. 167~174.

- 8) 西澤一俊・千原光雄,「藻類研究法」, 共立出版, 東京, 1979, p. 705.
- 9) 上野順土,「ビタミン学実験法 [I] 脂溶性ビタミン」, 日本ビタミン学会編, 東京化学同人, 東京, 1983, p. 38.

Keywords

Carotene

Green alga

Bryopsis maxima

B/E constant linked scanning

Retro Diels-Alder reaction