藻類におけるカロチノイドの比較生化学—II.

モツレミルのカロチノイドとそれらの生合成**

片 山 輝 久

(1966 年 3 月 9 日受理)

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY OF CAROTENOIDS IN ALGAE—II.
ON CAROTENOIDS IN *CODIUM INTRICATUM*
AND THEIR BIOSYNTHESIS

Teruhisa KATAYAMA*

Besides α -carotene, β -carotene, siphonaxanthin and neoxanthin, the existence of ϵ -carotene, lutein, zeaxanthin, tataxanthin, prolycopene like compound, phytofluene like compound, and phytoene like compound was confirmed as the constituents of carotenoids in *Codium intricatum*.

To study the biosynthesis of carotenoid in *Codium*, 2-C¹⁴-mevalonic acid was injected to the plant. After incubation for 48 hours in sea water, the carotenoids were extracted, and xanthophyll fraction was separated from carotene one by partition coefficient and each of them was submitted to thin layer chromatography. After development, a sheet of X-ray film (Fuji X-ray film, medical) was placed on contact with the thin layer chromatoplate, subsequent development of the film showed the black band on the film corresponding to the exact shape and location of each compound on the thin layer chromatogram. The result showed that 2-C¹⁴-mevalonic acid was incorporated into siphonaxanthin, neoxanthin, phytoene like compound and phytofluene like compound, therefore, it was assumed that the carotenoids in *Codium* would be synthesized in the almost same way as in land plants.

藻類のカロチノイドについては STRAIN¹⁾ の研究があるが、主として sugar column を用いて *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus bifulgatus*, *Scenedesmus brasiliensis* に α -carotene の存在を確認し、*Siphonales* に α -carotene, siphonaxanthin, neoxanthin の存在を確認している。KRINSKY ら²⁾ は *Euglena gracilis* のカロチノイドをアルミナを充填剤とするカラムクロマトグラフィーを用い β -carotene, γ -carotene など 11 種類のカロチノイドを分離確認している。

一方カロチノイドの生合成については、mevalonic acid がステロール、スクアレン、テルペンの前駆物質であることが明らかにされて^{3,4,5,6)}以来、陸上植物の前駆物質もまた mevalonic acid であることが明らかにされた^{7,8,9,10,11)}。

藻類については、STELLE ら¹²⁾は *Euglena gracilis* に 2-C¹⁴-mevalonate, 2-C¹⁴-acetate, 4-4'-C¹⁴- β -di-methylacrylic acid を用いカロチノイドの生合成をみ、いずれも前駆物質であることを明らかにしている。ANDERSON ら¹⁰⁾は 2-C¹⁴-mevalonic acid は *Chlorella* のカロチノイドの前駆物質ではないと報告している。

* 鹿児島大学水産学部 (Faculty of Fisheries, University of Kagoshima, 470, Shimoarata, Kagoshima.).

** 本研究は昭和 40 年 11 月 28 日京都において、NSF、日本学術振興会支援のもとに開催された "The Symposium on Carotenoid Biosynthesis", U. S. -Japan Seminar において講演した "Biosynthesis of Carotenoids in Algae and their Metabolism in Fish" の一部である。

一方海藻類のカロチノイドの前駆物質についてはまだその報告をみない。著者はモツレミルのカロチノイドを分離確認すると共にカロチノイドの前駆物質を明らかにし、また藻類のカロチノイドと魚類のカロチノイドの相互関係¹³⁾をも解明する目的をもつて本研究に着手し、ミルのカロチノイドを薄層クロマトグラフィーにかけ、同一吸着剤を充填剤とするカラム・クロマトグラフィーにかけた結果を比較検討して、siphonaxanthin, neoxanthin, α -carotene, β -carotene の他 ϵ -carotene, lutein, zeaxanthin, polycopene 様物質, taraxanthin, phytoene 様物質, phytofluene 様物質の存在を確認し、また 2-C¹⁴-mevalonic acid を用い 48 時間培養後カロチノイドを抽出し、mevalonic acid のカロチノイドへの転移をみるに、mevalonic acid はミルのカロチノイド生合成の前駆物質であることを明らかにし得たのでここに報告する。

実験および結果

試料よりカロチノイドの抽出 カロチノイドの抽出は既報¹⁴⁾と全く同一の方法を用いた。すなわち鹿児島県桜島海岸に繁茂するミル 300 g をアセトンにて抽出し、石油エーテルに転溶して 10% 苛性ソーダ・メチールアルコールにて鹼化後再び石油エーテルに転溶し、脱水後窒素の気流中で減圧下に濃縮した。carotene 区と xanthophyll 区を分別するため、90% メチールアルコールで飽和した石油エーテルと、石油エーテルにて飽和した 90% メチールアルコールにて抽出し¹⁵⁾、無極性化合物である carotenes を石油エーテル層に、有極性基をもつ xanthophylls をメチールアルコールにて抽出した。

Xanthophyll 区の薄層クロマトグラフによる分離確認 xanthophyll 区はカラムクロマトグラフによ

Fig. 1. Thin layer chromatography of xanthophyll fraction.

Adsorbent: Microcell C.

Developing solvent: 15% Acetone in petroleum ether.

り分離する際に用いる充填剤¹⁶⁾と全く同一の microcell-C を硝子板上に塗り chromatoplat を既報¹⁷⁾と全く同様な方法で調製した。15%アセトン・石油エーテルを展開溶媒として薄層クロマトグラフにより Fig. 1 の如き結果を得、同一吸着剤を充填剤とするカラム・クロマトグラフで分離するより分離能がよく、かつ各 band の溶出も容易であつた。

1. Siphonaxanthin: band No. 1 より抽出後分光光度計により吸収曲線を求めると Fig. 2, Table 1 の如き結果を得、文献値¹⁾とよく一致し siphonaxanthin であることを確認した。本物質の構造、融点その他の化学的性質についての報告はみられない。

2. Neoxanthin: band No. 2 を抽出後分光光度計により吸収曲線を求めると、Fig. 3 の如き結果を得、濃塩酸を添加すると約 18m μ の shift を生じ epoxide 1 コを有し Table 2 の如き結果を得、ほうれん草より得た neoxanthin と同時にクロマトグラフにより分離しても band 1 コのみで neoxanthin の存在を確認した。

Fig. 2. Characteristic absorption curves of No. 1 band.
Solvent: petroleum ether, n-hexane in ethanol (1:4).

Table 1. Spectral characteristics of No. 1 band.

No. of band	λ max. Solvent	λ max. (m μ) in	
		Petroleum ether	n-Hexane in ethanol
1		481, 452, 428	447
Pure Siphonaxanthin ¹⁾		481, 452, 426	—

Table 2. Spectral characteristics of No. 2 band.

No. of band	λ max. Solvent	λ max. (m μ) in		
		Ethylether	Ethylether (after adding hydrochloric acid)	shift
2		470, 442, 417	448, 424, 399	18
Pure neoxanthin ¹⁸⁾		468, 440, 417	450, 423, 400	17

Fig. 3. Characteristic absorption curves of No. 2 band.

Solvent: ethylether.

3. Taraxanthin: **band No. 3** を抽出後 n-ヘキサン, 二硫化炭素, クロロホルム, ベンゼンを溶媒として, それぞれ別々に分光光度計により吸収曲線を求めると, **Table 3** の如く, taraxanthin の文献値とよく一致し¹⁸⁾ taraxanthin であることを明らかにした。

4. Violaxanthin: **band No. 4** を抽出後分光光度計より吸収曲線を求めると **Table 4** の如き結果を得, 濃塩酸を加え分光光度計により吸収曲線を求めると 39 mμ の shift を生じ epoxide 2 コを有し¹⁷⁾, ホウレン草より得た violaxanthin と microcel-C を吸着剤として混合クロマトグラフを行つても単一の band のみを得たので violaxanthin の存在を確認した。

5. Lutein, zeaxanthin: **band No. 5** を抽出後, hyflo-supercel celeit : magnesium oxide (2 : 1) を吸着剤とし¹⁷⁾, 25% アセトン・石油エールを展開剤とする薄層クロマトグラフを行なつて 2 コの spots を得た。橙黄色の spot を抽出し n-ヘキサン, クロロホルム, 二硫化炭素を溶媒として, それぞれ別々に分

Table 3. Spectral characteristics of No. 3 band.

No. of band	λ max.	λ max. (mμ) in			
	Solvent	n-Hexane	Carbon disulfide	Benzene	Chloroform
3 Pure taraxanthin ¹⁸⁾		446, 472	443, 470, 500	434, 450, 483	433, 453, 480
		443, 473	441, 469, 501	—	—

Table 4. Spectral characteristics of No. 4 band.

No. of band	λ max.	λ max. (mμ) in		
	Solvent	Ethylether	Ethylether (after adding hydrochloric acid)	shift
4 Pure violaxanthin ¹⁷⁾		422, 442, 470	382, 403, 428	38
		417, 440, 469	381, 403, 429	37

Table 5. Spectral characteristics of No. 5 band.

No. of band	λ max.	λ max. (m μ) in		
	Solvent	n-Hexane	Carbon disulfide	Chloroform
1		420, 446, 476	445, 475, 506	430, 457, 487
Pure lutein ¹⁸⁾		420, 447, 477	445, 475, 508	429, 456, 487

光光度計により吸収曲線を求めると **Table 5** の如き結果を得、既往の文献値¹⁸⁾と一致し、ホウレン草より得た lutein と混合クロマトグラフを行なつても単一の band を得 lutein の存在を確認した。一方赤色の spot を溶出し physalis cups (ホボズキの実) より得られた zeaxanthin と混合クロマトグラフを行なつても単一の band を得、zeaxanthin の存在を確認した。

Carotene 区の薄層クロマトグラフによる分離確認 carotene 区はカラム・クロマトグラフにより、分離する際に用いる充填剤である hyflo-supercel : magnesium oxide (2 : 1) を吸着剤とし、2.5% アセトン・石油エーテルを展開剤として薄層クロマトグラフ¹⁷⁾により **Fgi. 4** の如き結果を得た。

1. β -Carotene: **band No. 1** を抽出後 n-ヘキサン、クロロホルム、ベンゼン、二硫化炭素をそれぞれ溶媒として別々に分光光度計により吸収曲線を求めると **Table 6** の如き結果を得、既往の文献値¹⁸⁾とよく一致し、合成した純 β -carotene と混合クロマトグラフを行なつても単一の band を得、 β -carotene の存在を確認した。

Fig. 4. Thin layer chromatography of carotene fraction.

Absorbent: Hyflo-supercel: magnesium oxide (2 : 1).

Developing solvent: 2.5% Acetone in petroleum ether.

2. Prolycopene 様物質: **band No. 2** を抽出後 n-ヘキサン, クロロホルム, ベンゼン, 二硫化炭素を溶媒として, それぞれ別々に分光光度計により吸収曲線を求めると **Fig. 5** の如き結果を得, **Table 7** の如く prolycopene の文献値¹⁸⁾ とよく一致し, prolycopene 様物質の存在を明らかにした。

3. α -Carotene: **band No. 3** を抽出後 n-ヘキサン, クロロホルム, ベンゼン, 二硫化炭素を溶媒として, 別々に分光光度計により吸収曲線を求めると **Table 8** の如き結果を得, α -carotene の既往の文献値¹⁸⁾ とよく一致し, また人参より抽出して得られた純 α -carotene と混合クロマトグラフを行なつても単一の band を得 α -carotene であることを確認した。

4. ϵ -Carotene: **band No. 4** を抽出後 n-ヘキサン, クロロホルム, ベンゼン, 二硫化炭素を溶媒として, 別々に分光光度計により吸収曲線を求めると, **Fig. 6** の如き結果を得, **Table 9** の如く最近その存在

Fig. 5. Characteristic spectral absorption curves of No. 2 band.

Solvents: n-hexane, charbon disulfide, chloroform, benzene.

Table 6. Spectral characteristics of No. 1 band.

No. of band	λ max. Solvent	λ max. (m μ) in			
		n-Hexane	Carbon disulfide	Benzene	Chloroform
6	Pure β -carotene ¹⁸⁾	425, 451, 479	450, 482, 513	461, 487	465, 492
		435, 451, 482	450, 485, 520	—	466, 497

Table 7. Spectral characteristics of No. 2 band.

No. of band	λ max. Solvent	λ max. (m μ) in			
		n-Hexane	Carbon disulfide	Benzene	Chloroform
2	Pure prolycopene ¹⁸⁾	442, 470	471, 499	453, 482	456, 484
		443.5, 470	469.5, 500.5	453.5, 484	455.5, 485

Fig. 6. Characteristic spectral absorption curves of No. 4 band.
Solvents: n-hexane, carbon disulfide, chloroform, benzene.

Fig. 7. Characteristic spectral absorption curves of F_1 band.

Fig. 8. Characteristic spectral absorption curves of F_2 band.

Table 8. Spectral characteristics of No. 3 band.

No. of band	λ max.	λ max. (m μ) in			
	Solvent	n-Hexane	Carbon disulfide	Benzene	Chloroform
3	Pure α -Carotene ¹⁸⁾	420, 444, 473	475, 507	435, 458, 488	457, 487
		420, 555, 475	477, 510	—	454, 485

Table 9. Spectral characteristics of No. 4 band.

No. of band	λ max.	λ max. (m μ) in			
	Solvent	n-Hexane	Carbon disulfide	Benzene	Chloroform
4	Pure ϵ -Carotene ¹⁹⁾	416, 440, 470	441, 467, 481	425, 450, 481	424, 450, 481
		415, 439, 469	—	425, 451, 482	—

Table 10. Spectral characteristics of F₁ band.

No. of band	λ max.	λ max. (m μ) in
	Solvent	n-Hexane
F ₁	Pure phytofluene ¹⁸⁾	330, 348, 368
		332, 348.5, 368

Table 11. Spectral characteristics of F₂ band.

No. of band	λ max.	λ max. (m μ) in
	Solvent	n-Hexane
F ₂	Pure phytoene ¹⁸⁾	275, 286, 298
		275, 285, 296

Fig. 9. Radioautographs of thin layer chromatograms.

が藻類に確認された ϵ -carotene の文献値¹⁹⁾とよく一致し、 ϵ -carotene の存在を確認した。

5. Phytofluene 様物質: **band F₁** を抽出後 n-ヘキサンを溶媒として分光光度計により吸収曲線を求めると **Fig. 7, Table 10** の如き結果を得 phytofluene の既往の文献値¹⁸⁾とよく一致し phytofluene 様物質であることを明らかにした。本物質は無色にして蛍光を発す。

6. Phytoene 様物質: **F₂ band** を抽出後 n-ヘキサンを溶媒として分光光度計により、**Fig. 8, Table 11** の如き結果を得、phytoene の既往の文献値¹⁸⁾とよく一致し、アルミナを吸着剤とし 0.5% エチールエール・石油エールを展開剤として精製後、人参より得た純 phytoene と同一カラムを用い混合クロマトグラフを行なつても単一の band を得、phytoene 様物質であることを確認した。本物質は無色にして蛍光を発す。

ミルにおける 2-C¹⁴-mevalonic acid のカロチノイドの転移 常法により調製した¹⁷⁾ 中性の 2-C¹⁴-mevalonic acid 約 12 cc を 270g のミルの藻体に注射し、天然の汙過海水中に通気しながら 48 時間室内にて培養後、前述の抽出方法と全く同一方法を用い、カロチノイドを抽出して carotene 区と xanthophyll 区に分画した。carotene 区と xanthophyll 区は別々に薄層クロマトグラフにより、展開後 X-線フィルム (*Fuji X-ray film*) を密着して 3 週間暗室に放置後現像した。その結果は **Fig. 9** の如く、siphonaxanthin, neoxanthin, Phytofluene 様物質, phytoene 様物質に転移していることを明らかにした。

考 察

ミルのカロチノイドとして siphonaxanthin, neoxanthin, α -carotene, β -carotene の他 ϵ -carotene, lutein, zeaxanthin, violaxanthin, prolycopene 様物質, taraxanthin, phytoene 様物質, phytofluene 様物質の存在を明らかにした。

陸上植物の terpene 化合物の生合成は Henning⁵⁾ の他 Leinen²⁰⁾, Bloch²¹⁾, Folkers²²⁾, Pojak²³⁾ らにより明らかにされ、陸上植物のカロチノイドの合成は次の如く考えられている。

ミルにおいても 2-C^{14} -mevalonic acid を藻体に注射後 48 時間培養すると, neoxanthin, siphonaxanthin, phytoene 様物質, phytofluene 様物質に転移していることをラジオオートグラフによつて明らかにしたゆえ, ミルのカロチノイドの生合成も陸上植物のカロチノイドの生合成とほぼ同一の過程を経ているものと推定される。

要 約

1. ミルのカロチノイドを抽出して, siphonaxanthin, neoxanthin, α -carotene, β -carotene の他 ϵ -carotene, lutein, zeaxanthin, violaxanthin, taraxanthin, prolycopene 様物質, phytoene 様物質, phytofluene 様物質の存在を明らかにした。

2. ミル藻体に 2-C^{14} -mevalonic acid を注射後 48 時間培養してカロチノイドを抽出し薄層クロマトグラフにより展開後ラジオオートグラフにより, siphonaxanthin, neoxanthin, phytoene 様物質, phytofluene 様物質に転移していることを明らかにした。したがつてミルのカロチノイドの生合成は陸上植物のカロチノイドの生合成とほぼ同一の過程を経ていることを推定した。

本研究の進展に当り貴重なる mevalonic acid dibenzylethylenediamine salt 2-C^{14} を御恵賜つたカルホルニヤ大学の C. O. CHICHESTER 教授に感謝の意を表す。また本研究に協力された本学部野下晴夫氏に謝意を表す。

文 献

- 1) H. H. STRAIN: *Chloroplast Pigments and Chromatographic Analysis*, 1~179, (1958). *Thirty-second annual priestley lectures, The Pennsylvania State University*.
- 2) N. I. KRNSKY, T. H. GOLDSMITH: *Arch. Biochem. Biophys.*, **91**, 271~279 (1960).
- 3) P. A. TAVORMIA, M. H. GIBBS, J. W. HUFF: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4498~4501 (1956).
- 4) B. H. AMDUR, H. RILLING, K. BLOCH: *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2650 (1957).
- 5) U. HENNING, E. M. MOSLEIN, F. LYNEN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **83**, 259~267 (1959).
- 6) L. A. WITTING, J. W. PORTER: *J. Biol. Chem.*, **234**, 2841~2846 (1959).
- 7) G. A. THOMPSON, A. E. PURCELL, J. BONNER: *Plant Physiol.*, **35**, 678~682 (1960).

- 8) A. E. PURCELL, G. A. THOMPSON, J. BONNER: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1081~1084 (1959).
- 9) E. A. SHNEOUR, I. ZABIN: *J. Biol. Chem.*, **234**, 770~773 (1959).
- 10) D. G. ANDERSON, D. W. NORGARD, J. W. PORTER: *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 68~77 (1960).
- 11) G. D. BRAITWAITE, T. W. GOODWIN: *Biochem. J.*, **76**, 5~10 (1960).
- 12) W. J. STEELE, S. GURIN: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2778~2785 (1960).
- 13) 片山輝久・池田伸義・原田喜代子: 本誌, **31**, 947~952 (1965).
- 14) 片山輝久: 本誌, **60**, 436~439 (1964).
- 15) E. J. PETRACEK, L. ZECHMEISTER: *Anal. Chem.*, **28**, 1484~1485 (1956).
- 16) 片山輝久: **26**, 本誌, 814~817 (1960).
- 17) 片山輝久: 本誌, **30**, 440~443 (1964).
- 18) T. W. GOODWIN: "Carotenoids" a chapter in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* edited by K. PEACK, M. V. TRACEY, Springer-Verlag, Berlin, (1955).
- 19) D. J. CHAPMAN, F. T. HAXO: *Plant and Cell Physiol.*, **4**, 57~63 (1963).
- 20) F. LYNEN, B. W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNIG, E. M. MOSLEIN: *Angew. Chem.*, **71**, 657~662 (1959).
- 21) H. C. RILLING, K. BLOCK: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1424~1432 (1960).
- 22) K. FOLKERS, C. H. SHUNK, B. O. LINN, F. M. ROBINSON, P. E. WITTEICH, J. W. HUFB: *Ciba Foundation Symposium on "Biosynthesis Terpenes and Sterols."* (1959).
- 23) G. POPJACK: "Biosynthesis of squalene and of cholesterol from mevalonic acid" a chapter in "The Biosynthesis of Terpenes and Sterols," *Ciba Foundation Symposium*, (1959).