海藻のクロロフィルに関する研究—III

褐藻類のクロロフィルcについて

広田 望・松本いづみ

(1980年1月8日受理)

Studies on Chlorophyll of Marine Algae—III

Chlorophyll c of Brown Sea-weed

Nozomu HIROTA* and Izumi MATSUMOTO*

Chlorophyll a and c in twelve species of brown algae were extracted with acetone and determined spectroscopically according to the formula of JEFFERY *et al.* Chlorophyll c was found to be over 100 mg/100 g dry basis in the frond of *Undaria pinnatifida*, *Sargassum fulvellum* and *S. confusum*, but far lower in the rest of the species examined. Molar ratio of chlorophyll c to chlorophyll a ranged 1.89~9.73 by the species and the part of the bodies examined. Chlorophyll c in dried *Undaria pinnatifida* in the market was higher in highly graded products but lower or absent in ordinary and low graded products.

An experiment was carried out to purify chlorophyll c from fresh *Undaria*. A black precipitate acquired after cellulose column chromatography was further chromatographed with polyethylene column and elutriated with acetone and pyridine giving two substances considered to be chlorophyll c_1 and c_2 , respectively.

クロロフィルcは高等植物、緑藻、ミドリムシなどに含まれるクロロフィルbと同様、クロロフィルaと共に光合成反応に関与する色素であるが、褐藻類のほか主として水中に生育する珪藻類、黄色鞭毛藻類、渦鞭毛藻類、褐色鞭毛藻類などに広く含有されていることが知られている。これは水中では比較的赤色光よりも黄色光の影響を受けやすい環境にあり、500~600 nmに吸収極大を有するクロロフィルcが、この範囲に吸収の弱いクロロフィルaの光合成反応における補助色素として陸上植物や緑藻類のクロロフィルbと同様の役割を果すものと考えられている^{1,2)}。

前報³⁾において、生鮮および乾燥ワカメからTLCによつて分離したクロロフィルcの吸収スペクトルおよび吸収極大値の位置は両者ともほぼ類似していることを述べたが、本研究においては褐藻類のクロロフィルcの含量、ワカメ乾燥品の品質とクロロフィルc含量との関係、生鮮ワカメの葉体からクロロフィル c_1 と c_2 の分離などについて実験を行なったのでその結果について報告する。

実験方法

試料および色素の抽出 試料は神奈川県安浦海岸産の

養殖ワカメのほかはいずれも天然の褐藻類を使用した。ワカメについては葉体、中肋、めかぶの各部を分離したのち、ただちに凍結し他の褐藻類はそのまま凍結保存した。また乾燥ワカメは市販品を用いた。

色素の抽出はほぼ前報³⁾と同様の方法で行なつたが、磨砕後（乾燥品は冷水で膨潤後磨砕）クロロフィルcの活性を除くため初回は100%アセトンにより、2回目からは80%アセトンを用い残渣からの抽出液が無色になるまで抽出を繰り返す。最後はエーテルを用いて抽出した。これらの抽出液を合し色素をエーテルに移行させ無水硫酸ナトリウムで脱水後 N_2 気流中でエーテルを駆逐し、90%アセトンで定容した。

クロロフィルaおよびクロロフィルcの定量 一定容とした色素の90%アセトン溶液について664および630 nmの吸光度を測定し、JEFFREYら⁴⁾の方法により算出し無水物100 g中のmg数で表わした。

粗クロロフィルcの分離 生鮮ワカメの葉体から抽出した色素液をJEFFREY⁴⁾の方法に準じて行なつた。すなわち、色素の石油ベンジン溶液をセルロース (Merck, Art 2331) カラム (6.7×30 cm) に吸着させ、0.5% n-プロパノールを含む石油ベンジン (b.p. 50~80°C) で展開し、カロチン、クロロフィルa、キサントフィルを流

* 昭和女子大学家政学部生活科学科 (Department of Home Life Science, Showa Women's University, 7-57, Taishido 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo 154).

Table 1. Contents of chlorophyll a and chlorophyll c of phaeophyceae

Species	Locality of collection	Date of collection	Chlorophyll a (mg/100 g anhydrous)	Chlorophyll c (mg/100 g anhydrous)	Molar ratio a:c
<i>Undaria pinnatifida</i>	Yasuura	January (1979)			
Fronde			1035.7	101.5	6.82
Sporophyll			325.4	39.5	5.60
Mid rib			235.6	27.9	5.72
<i>Sargassum fulvellum</i>	Hakui-Taki	March (1979)			
Fronde			1230.4	109.0	7.73
Utricle			516.7	81.2	4.35
<i>Sargassum confusum</i>	Hakui-Taki	March (1979)			
Fronde			543.6	190.3	1.89
Utricle			500.8	86.5	3.94
<i>Sargassum patens</i>	Hakui-Shibagaki	March (1979)			
Fronde			206.6	18.9	7.45
Utricle			162.3	18.7	5.87
<i>Coccophora langsdorffii</i>	Hakui-Shibagaki	March (1979)			
Fronde			352.9	25.2	9.63
Utricle			67.1	4.7	9.38
<i>Sargassum ringgoldium</i>	Katsuura	April (1979)	272.5	24.4	7.60
<i>Sargassum thunbergii</i>	Hakui-Shibagaki	March (1979)	301.3	74.2	2.79
<i>Podina arborecens</i>	Katsuura	April (1979)	191.3	13.5	9.73
<i>Pochydictyon coriaceum</i>	Katsuura	April (1979)	311.9	24.8	8.51
<i>Heterochloraria abietina</i>	Katsuura	April (1979)	426.6	45.3	6.45
<i>Eisenia bicyclis</i>	Katsuura	April (1979)	105.1	7.90	9.08
<i>Ecklonia cava</i>	Katsuura	April (1979)	153.3	13.3	7.82

出した。ついで 2% *n*-プロパノールを含む石油エーテル (b.p. 30~70°C) の少量を流し残留する微量のフコキサンチンを流去させたのち、セルロースに吸着しているクロロフィル c (C_1 , C_2 の混合物) を 5% メタノールを含むエーテルで狭いバンドに濃縮させた。次にセルロースをカラム管から N_2 気流を通して押出したのちクロロフィル c 帯を分離し、5% メタノールを含むエーテルで処理してセルロースからクロロフィル c を抽出した。このクロロフィル c の溶液を N_2 気流中で少量に濃縮し、5~10 倍量の冷石油ベンジン (b.p. 50~80°C) を加え -20°C で放置して生じた黒色沈殿 (粗クロロフィル c) を遠心して分離した。

次にクロロフィル c の黒色沈殿をアセトンに溶かしたのちポリエチレン粉末 (Merck, Art 7422) によるカラムクロマトグラフィーにより 100% アセトン、エーテル・メタノール (8:2, v/v), ピリジンを用いて、クロロフィル C_1 と C_2 の分離を行なった。

結果および考察

褐藻類のクロロフィル a およびクロロフィル c の含量色素の抽出液から吸光度を用いてクロロフィル c 量を求める方法については PARSON 及び WASLEY により計算式が提出されているが、本実験では 90% アセ

ン溶液からクロロフィル c ($C_1 + C_2$) を求める JEFFREY らの式によつて算出した。試料として用いた褐藻類 12 種についてクロロフィル a およびクロロフィル c の含量を測定した結果は Table 1 に示すとおりである。ただしワカメについては葉体、中肋、めかぶを、ホンダワラ属の 4 種については葉体および気胞をそれぞれ測定した。その結果、クロロフィル a の含量はワカメおよびホンダワラ *Sargassum fulvellum* の葉体部に多く、それぞれ無水物 100 g 中 1000 mg 以上を示しており、また一般に葉体部は葉体以外の部分より多量に存在している傾向がみられた。

次にクロロフィル c の含量はクロロフィル a に比し少量であるが、その含量はワカメ、ホンダワラ、フシスジモク *S. confusum* の葉体部に多く、ついでホンダワラの気胞に比較的多く存在していた。クロロフィル a とクロロフィル c とのモル比 (a : c) についてはフシスジモク葉体の 1.89、同気胞の 3.94、ウミトラノオ *S. thunbergii* の 2.79 などはその比率が低くクロロフィル a に対する c の割合が高いが、スギモク *Coccophora langsdorffii* の葉部 (9.63)、気胞 (9.38)、ウミウチワ *Podina arborecens* の 9.73、アラメ *Eisenia bicyclis* の 9.08、サナダグサ *Pochydictyon coriaceum* の 8.51 などほぼクロロフィル a に対する c の割合が低いことを示した。

Table 2. Contents of chlorophyll a and chlorophyll c in dried "Wakame" products

Quality of specimens	Produced districts	Colour of acetone ext.	Chlorophyll a (mg/100 g)	Chlorophyll c (mg/100 g)
Superior	Sanriku	Brilliant green	449.1	43.8
Superior	Naruto	Brilliant green	395.6	34.5
Superior	Naruto	Brilliant green	357.3	39.9
Superior	Naruto	Green	296.4	50.9
Superior	Naruto	Brilliant green	257.6	34.9
Superior	Sanriku	Brown-green	363.5	30.7
Superior	Naruto	Green	310.9	31.8
Ordinary	Naruto	Green	287.7	0
Ordinary	—	Brown-green	278.1	12.9
Ordinary	Naruto	Yellow-green	258.2	0
Ordinary	Sanriku	Yellow-green	217.8	3.96
Ordinary	Sanriku	Yellow-green	245.1	18.8
Ordinary	Naruto	Yellow-green	243.1	0
Ordinary	—	Yellow-green	230.9	18.2
Inferior	—	Brown-yellow	202.6	0
Inferior	—	Light brown	133.9	12.3
Inferior	—	Light yellow	127.6	0
Inferior	Hokkaido	Yellow-green	103.6	18.9
Inferior	Sanriku	Light yellow	93.3	5.3
Inferior	Hokkaido	Light brown	60.3	2.0

JEFFREY⁹⁾は藻類7種属、42種目に含まれるクロロフィルaとcのモル比についてまとめた結果、主要カロチノイドとしてペリジンを含む渦鞭毛藻類におけるcの割合が最も高く、1.6~1.8を示すのが普通にみられたが、褐藻類では2~5.5(平均3.55)であつたとしている。今回の実験においては一般にクロロフィルaに対するクロロフィルcの割合が低い結果が得られた。

乾燥ワカメの品質とクロロフィルcの含量 色素液の抽出は試料0.5gを細切後実験方法の項に記したようにしてクロロフィルcを測定した。結果はTable 2に示すとおりであるが、比較のためクロロフィルaも測定した。この結果、品質良好な試料は普通品および品質不良品に比してクロロフィルcの含量はクロロフィルaと同様多く、普通品および不良品の中にはその存在の認められないものもみられた。前報¹⁰⁾において乾燥ワカメの色彩的な品質の良否はクロロフィルaの含量と関係があり、品質の良好なもののクロロフィルaの含量の大きいことを指摘したが、今回の実験でクロロフィルcにもその傾向がみられたもののクロロフィルaに対して量的に少ないことから、それほど明確とはいえないようである。

粗クロロフィルcのポリエチレンカラムクロマトグラフィー 生鮮ワカメの色素抽出液から得られた粗クロロフィルcの黄色沈殿物をアセトンに溶かし、ポリエチレンカラム(2×28cm)で分離溶出させた結果をFig. 1に示す。この結果、アセトン、エーテル・メタノール

(8:2, v/v)、ピリジンによる溶出区分にそれぞれピークが出現した。これらのピークについてそれぞれの溶媒をN₂気流で駆逐したのちピリジンおよびアセトン(1%ピリジンを含む)に溶解し、可視部における吸収スペクトルを求めた結果はFig. 2に示すとおりである。これらの3溶出区分のスペクトルはそのパターンが互いに類似しており、ピリジン溶液においては463~465.5 nm(I)に強い吸収部を有し、593~596 nm(II)および640 nm付近(III)に弱い吸収部を有することからいずれもクロロフィルcであることは明らかであるが、Table 3に示すようにその吸収極大値の位置および各ピークにおける吸光度の比(I/III, II/III)に差異がみられた。すなわち、アセトン溶出区分では463 nm(I), 593~594 nm(II), 640 nm(III)に吸収極大値を示し、ピリジン溶出区分の465.5 nm(I), 595~596 nm(II), 640~641 nm(III)に対し特に(I), (II)に差がみられた。またエーテル・メタノール(8:2, v/v)溶出区分ではアセトンおよびピリジン溶出区分の各極大値の中間的な値を示した。

次に同一溶出区分の各ピークの吸光度比を比較すると、アセトンならびにピリジン溶出区分ではI/IIIはそれぞれ9.95, 12.5と後者が大きな値を示している。またII/IIIはアセトン溶出区分が0.88と、593~594 nmに比し640 nmの吸収が大きいのに比し、ピリジン溶出区分では1.28と長波長側(640~641 nm)のピークが小さいことを示していた。なおエーテル・メタノール溶

Fig. 1. Polyethylene column chromatography of crude chlorophyll c separated from the intact frond of *Undaria pinnatifida*.

Fraction volume: 5 ml, flow rate: 2 ml/min. Stepwise elution with I~III. I: 100% acetone, II: diethyl ether-methanol (8:2, v/v), III: pyridine.

Fig. 2. Absorption spectra of chlorophyll c in pyridine separated by polyethylene column chromatography.

The symbols (A, B and C) are as in Fig. 1.

Table 3. Absorption maxima and band ratio of chlorophyll c fractions in different solvents separated by polyethylene column chromatography from intact frond of *Undaria pinnatifida*

Fraction No.	Developed solution	Solvent	Absorption maxima (nm)			Ratio at peaks	
			I	II	III	I/III	II/III
5~7	Acetone	Pyridine	463	593~594	640	9.95	0.88
45~46	Diethyl ether, methanol (8:2)	Pyridine	463~464	594	640~641	11.07	1.14
77~78	Pyridine	Pyridine	465.5	595~596	640~641	12.5	1.28
5~7	Acetone	100% acetone (1% pyridine)	447.1	579.8	630	7.89	0.69
		90% acetone (1% pyridine)	446.6~447	579.8	631~631.5	6.76	0.65
45~46	Diethyl ether, methanol (8:2)	100% acetone (1% pyridine)	450.5	581.5	630	6.91	0.99
		90% acetone (1% pyridine)	447	580	632	7.24	0.85
77~78	Pyridine	100% acetone (1% pyridine)	449	581~582	631.5	7.55	0.93
		90% acetone (1% pyridine)	448.7	581	632	7.76	0.91

出区分については吸収極大値の場合と同様アセトン、ピリジン両区分の中間的な値を示したが、むしろピリジン溶出区分に近く II/III は 1.14 と、594 nm より 640~641 nm の吸光度が大きい値を示した。

一方、100% アセトン (1% ピリジン含有) を溶媒として同様、溶出区分の吸収極大値ならびに吸光比 (I/III, II/III) を比較すると、吸収極大値はピリジン溶出区分がアセトン溶出区分に比し 447.1→449 nm, 579.8→581~582 nm, 630→631 nm と僅かながら長波長側に移行しており、90% アセトン (1% ピリジン含有) についてもほぼ同様の傾向がみられた。また II/III の吸光比につ

いては 100% アセトンによるアセトン溶出区分の 0.69 に対し、ピリジン溶出区分の 0.93 と差がみられ、また 90% アセトンの場合にも前者の 0.65 に対し後者の 0.91 と異なる値が得られた。しかし、I/III については 100% アセトンおよび 90% アセトンともアセトン溶出区、ピリジン溶出区の間で大差はみられなかった。

クロロフィル c は DOUGHERTY ら¹³⁾によつて珪藻類から最初に結晶状で分離されたが、それは構造の異なる 2 種の混合物であつた。ついで JEFFREY¹²⁻¹⁴⁾ は吸着体にポリエチレン粉末を用い、TLC を行なうことによりクロロフィル c を c_1 , c_2 の 2 成分に分離しエーテル、

アセトン、メタノールを溶媒とした際の吸収極大値とその吸光比が異なることを認めている。また STRAIN ら¹⁵⁾はこの c_1 , c_2 が化学的に異なる化合物であることを示し, c_1 は Mg-tetradecahydro-pheoporphyrin a_5 monomethyl ester であり, c_2 は Mg-hexadecahydro-pheoporphyrin a_5 monomethyl ester で両者とも C-7 にアクリル酸残基を有していることを明らかにした。すなわち c_1 はポルフィリン環の C-4 にエチル基の結合したものであり, c_2 はビニル基の結合したものであるが, その他にこれらの変性物も存在することが知られている⁹⁾。

池森¹⁶⁾はオキナウチワの抽出色素を粉末汙紙カラムクロマトグラフィーで分離しエーテル・メタノール (8:2, v/v) で展開するとクロロフィル c_1 と c_2 が分離されることをみており, また JEFFREY⁹⁾ は褐藻類, 珪藻類, 鞭毛藻類などからクロロフィル c_1 および c_2 を分離し, 吸収極大値および極大値の吸光比をビリジン, 100% アセトンおよび 90% アセトン溶液で求めた結果を報告しているが, c_1 についてはビリジン溶液中その吸収極大値 (nm) は 461.5 (I), 593.2 (II), 639.6 (III) であり, その吸光比は I/III=9.6, II/III=0.87 を示し, c_2 については同溶液で 466.0 (I), 597.3 (II), 641.5 (III), I/III=14.45, II/III=1.32 であつたとしている。これらの数値を今回の実験と比較すると, Fig. 1 のアセトン溶出区分 (A) はクロロフィル c_1 に, ビリジン溶出区分 (C) はクロロフィル c_2 に近い値を示した。またエーテル・メタノール溶出区分 (B) は, その吸光比からクロロフィル c_2 に近い成分のものと考えられるが, あるいはいづれかの変性物とも推定され, なお今後検討を要する。

おわりに本研究を遂行するに当たり試料の採集に協力さ

れた日本大学大学院奈良修氏, 実験に協力された本学竹山恵美子助手ならびに卒論学生清塚裕子, 熊谷美保子, 鈴木澄子, 中条真美, 三宅由紀子の諸嬢に厚く感謝する。

文 献

- 1) H.H. STRAIN: *Science*, **112**, 161-164 (1950).
- 2) R.C. DOUGHERTY, H.H. STRAIN, W.A. SVEC, R.A. UPHAUS, and J.J. KATZ: *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2826-2833 (1970).
- 3) 広田 望: 日水誌, **44**, 1009-1014 (1978).
- 4) J. BARRET and S.W. JEFFREY: *Plant Physiol.*, **33**, 44-47 (1964).
- 5) S.W. JEFFREY and G.F. HUMPHREY: *Biochim. Physiol. Pflanz.*, **167**, 191-194 (1975).
- 6) S.W. JEFFREY: *Biochim. Biophys. Acta*, **279**, 15-33 (1972).
- 7) T.R. PARSON and J.D.H. STRICKLAND: *J. Mar. Res.*, **21**, 155-163 (1963).
- 8) J.W.F. WASLEY, W.T. SCOTT, and A.S. HOLT: *Can. J. Biochem.*, **48**, 376-383 (1970).
- 9) S.W. JEFFREY: *J. Phycol.*, **12**, 349-354 (1976).
- 10) 広田 望: 日水誌, **44**, 1003-1007 (1978).
- 11) R.C. DOUGHERTY, H.H. STRAIN, W.A. SVEC, R.A. UPHAUS, and J.J. KATZ: *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5037-5038 (1966).
- 12) S.W. JEFFREY: *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 271-285 (1968).
- 13) S.W. JEFFREY: *Nature*, **220**, 1032-1033 (1968).
- 14) S.W. JEFFREY: *Biochim. Biophys. Acta*, **177**, 456-467 (1969).
- 15) H.H. STRAIN, B.T. COPE, G.N. McDONALD, W.A. SVEC, and J.J. KATZ: *Phytochemistry*, **10**, 1109-1114 (1971).
- 16) 池森雅彦: 金沢大学日本海城研究所報告, **6**, 16-20 (1974).