

池森雅彦*・新崎盛敏**： 海藻の光合成色素 I. 緑藻類と
海藻類に含まれるクロロフィルとカロチノイドの
二次元ペーパークロマトグラフィーによる分離

Masahiko IKEMORI* and Seibin ARASAKI**: Photosynthetic pigments in marine algae I. Two-dimensional paper chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from green algae and sea grasses.

海藻に含まれている光合成色素は、生育環境の差異や変化、また藻体の生長と生殖に伴って、陸上植物の場合とは非常に異なった量的及び質的变化を示すことが多い¹⁾²⁾。そこで、海藻に含まれている光合成色素の分離方法、特に筆者らが開発した二次元ペーパークロマトグラフィー及びセルロースパウダーカラムクロマトグラフィー、また、これらを使用して解明された、諸種の潮間帯藻に含まれている Chl. *a* と *b* との藻体の干出、漬水に伴う変化、深所産の緑藻に含まれている特異な光合成色素、海藻の生長と生殖に伴う光合成色素の量的及び質的变化などについて順次報告してゆきたい。

本報を草するに当たり、終始懇切なる御指導を賜った金沢大学理学部臨海実験所所長の井坂三郎教授に深甚なる感謝の意を表す。また、この実験の遂行中、多々御協力頂いた筑波大学臨海実験センターの横浜康継博士並びに材料の採集に御協力頂いた能登臨海実験所所員の新谷力氏と又多政博氏に深謝の意を表す。

1. 光合成色素の抽出、転溶、濃縮

植物体から光合成色素を抽出する際、陸上植物の場合には、80%アセトン中で葉をホモジナイズする方法が広く用いられており、また、沸騰水中に短時間葉を浸してから抽出を行うという方法もとられている。しかし後者のような方法を海藻に用いた場合には、クロロフィル系色素の変質が起りやすい¹⁾²⁾。例えば、ワカメなどの褐藻を15秒間沸騰水中に浸しただけでも、Chl. *a* が変質してフェオフィチン *a* が造られるし、フコキサンチンも少し分解してしまう¹⁾。光合成色素の抽出に際して、従来多くの研究者らによ

* 金沢大学能登臨海実験所 (927-05 石川県内浦町小本)

Noto Marine Laboratory, Kanazawa University, Ogi, Uchiura, Ishikawa, 927-05 Japan.

** 日本大学農獣医学部水産学科 (154 東京丸世田谷区下馬3-34-1)

Department of Fisheries, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Shimouma, Setagaya-ku, Tokyo, 154 Japan.

Bull. Jap. Soc. Phycol. 25: 58-66, 1977.

って広く用いられてきた抽出溶媒は、主に80%アセトン、90%アセトン、次いでメタノールである。色素の抽出溶媒に関し、種々の海藻について色々と検討してみた結果、80%アセトンあるいは無水アセトンを用いて抽出を行う場合には、藻体をよほど細かくホモジナイズしなければ、海藻、特に硬質の紅藻や褐藻から脂溶性色素を抽出することは困難である。そして、例えば、潮間帯に生育する乾燥した紅藻や褐藻 5g を攪りつぶすには、約1時間以上もホモジナイズを行わなければならないという極端な場合もあり、抽出液を冷却しながらホモジナイズを行っても、抽出されて来る色素が空気に長時間触れるため、色素の酸化を起し易い。ところで、溶媒に100%メタノールを使用すると、藻体をハサミで 3×3mm 角に細切して溶媒に浸すだけで、アセトン中ではホモジナイズ藻体を一週間以上においても完全に色素を抽出し得ない海藻種でも、約30分以内で殆んど全ての脂溶性色素を抽出することが出来た^{1,2)}。それゆえ、筆者らはメタノールを専ら抽出溶媒として使用している。

生重量 2g (緑藻) または 5g (紅藻, 褐藻) の藻体を濾過海水でよく洗ったのち、3×3mm 以下の大きさにハサミで細切し、摺合せ栓付き 100ml 容量の三角ラフスコ中で、20~50mg の塩基性炭酸マグネシウムを含む100%メタノール 50ml 中に 15~30 分間浸す。その間数回ラフスコを振って攪拌すると、色素の抽出が促進される。藻体に色素が残っている場合には、このような操作を数回繰り返す。殆んど海藻で、2~3回このような抽出を繰り返すと、全ての脂溶性色素を抽出することができる。抽出液を硝子フィルター (メッシュ No. 3) で濾過し、得られた濾液を分液漏斗に移し、等量のエチルエーテル (以後エーテルと略記する) を加え、これに 10% NaCl 液を色素抽出液の約 3 倍量加えて静かに振り、色素をメタノール・NaCl 液層からエーテル層へ転溶する。この色素を含むエーテル層を 3 倍量の 10% NaCl 液で 3~5 回洗って、エーテル層中に含まれているメタノールを除去する。この色素のエーテル溶液を、コマゴメピペットで吸引瓶に移し減圧濃縮する。濃縮が進むと、混入していた少量のメタノールと水が水滴状になって分離してくる。色素のエーテル溶液が 2~3ml になったとき濃縮を止め、少量のエーテルを加え、吸引瓶壁に付着している色素を再溶解する。このようにして得られた色素のエーテル溶液と水滴とは、さらにエーテルを加えても混合することはなく、2層に分かれている。色素のエーテル溶液のみを別の硝子瓶へ取り出し、数回少量のエーテルを加え、吸引瓶中に残っている色素を前記の硝子瓶へ移す。このようにして得た色素のエーテル溶液を再度減圧濃縮して 2~3ml にし、二次元ペーパークロマトグラフィー及びセルローズパウダーカラムクロマトグラフィーの試料にする。なお、色素抽出液の吸収スペクトルをエーテル以外の溶媒を用いて測定したい場合には、エーテルを減圧除去した後に、希望の溶媒を注加して色素を再溶解すれば、その吸収スペクトルを測定することができる^{1,2)}。

2. 二次元ペーパークロマトグラフィーに用いる展開溶媒と展開方法

a) 展開溶媒

ペーパークロマトグラフィーによって含まれているクロロフィル系色素とカロチノイド系色素を分離する際の展開溶媒としては、第一次の展開溶媒はプロパノールを含む石油エーテル、第二次の展開溶媒としては石油エーテルとクロロホルムの混液が、従来多くの研究者らによって推奨されて来た (LIND *et al.*³⁾, ANDERSON *et al.*⁴⁾, JEFFREY⁵⁾, STRAIN *et al.*^{6), 7)}, JEFFREY⁸⁾). しかし, STRAIN *et al.*^{6), 7)} がすでに指摘しているように、プロパノールを含む石油エーテルを展開溶媒として用いた場合には、展開中に色素、特にカロチノイド系色素が酸化あるいは変性しやすく、且つクロロフィル系色素も分解しやすくなる。それゆえ STRAIN *et al.*⁷⁾ は、一次元を1%の *n*-プロパノールを含む石油エーテル・エーテル (1:1, v/v) 混液で展開し、二次元を石油エーテル・クロロホルム (3:1, v/v) で展開することを推奨している。しかし筆者らは、でき得る限り色素類の分解や変性を防ぐ展開溶媒を探すと同時に、展開条件についても、幾つかの検討を行なってみた。その結果、展開溶媒として0.5%の *n*-プロパノールを含む *n*-ヘキサン・エーテル (70:30, v/v) 混液で第一次の展開を行い、ついで *n*-ヘキサン・クロロホルム (60:40, v/v) 混液で第二次の展開を行うと、多種類のクロロフィル系色素とカロチノイド系色素のそれぞれを迅速、且つ効果的に分離し得ることがわかった^{1), 2), 9)}。そしてこの方法では、第一次元の展開に要する時間は約2~5分、第二次元のそれも約3~6分であり、また、第一次元展開、第二次元展開共に、原点から5cmの距離まで展開すれば、良好な色素類の分離がみられた。ただし、試料中に Chl. *a*, *b*, *c*₁, *c*₂^{1), 10)} とは異なる極性の高い特異なクロロフィル系色素が多種類含まれている場合には、すでに報告したセルローズパウダーカラムクロマトグラフィー^{1), 2), 10), 20)} によらねば、これらの緑色色素類の分離は、良好な結果を得ることが困難であった。なお、光合成色素のセルローズパウダーカラムクロマトグラフィーに関しては、続報中に詳述したい。

b) 分離操作

二次元ペーパークロマトグラフィーの分離操作は、試料である色素のエーテル溶液を、2 μ lのマイクロピペットで濾紙 (東洋濾紙 KK 製, No. 51, 20 \times 20 cm) 上に10~20 μ l スポットし、約5分間風乾のち、冷暗室 (5 $^{\circ}$ C) に置いた摺り合せ蓋付の硝子製展開槽中で、第一次及び第二次の展開を行なった。第一次の展開槽中には *n*-ヘキサン・エーテル・*n*-プロパノール (70:30:0.5, v/v/v) 混液 200 ml を入れ、第二次の展開槽中には同じく 200 ml の *n*-ヘキサン・クロロホルム (60:40, v/v) 混液を入れた。この後、両展開槽中の展開溶媒を槽内でよく振とうしたのち約30分間静置し、展開槽内に各々の展開溶媒が充分飽和した条件下で、上記の二次元ペーパークロマトグラフィーを行なった。

c) 色素名の同定

この方法によって得られた二次元ペーパークロマトグラム上に展開された各々の光合成色素のスポットの同定は、以下のように慎重を期した。すなわち、後述のセルローズパウダーカラムクロマトグラフィーによって単離し、各々単離した分画の吸収スペクトルをマルチパーパス自記分光光度計（島津製 MPS-50L）とスプリットビーム自記分光光度計（日立製 124 型）で測定した後、クロロフィル系色素については SMITH and BENITEZ (1955) の論文¹¹⁾ と、カロチノイド系色素については GOODWIN の論文¹²⁾ とそれぞれ照合して色素名の同定を行なった各色素を、試料と混合して別に二次元展開し、ペーパークロマトグラム上の色素名の同定を行なった。シホナキササンチンとシホネインに関しては、YOKOHAMA *et al.*¹³⁾ の同定した試料を用いてスポットの同定を行なった。

以下、様々な生長期や生殖期にある緑藻類、海産種子植物、褐藻類、紅藻類、その他の藻類に含まれている光合成色素を、二次元ペーパークロマトグラフィーによって分離した際に得られるペーパークロマトグラムについて述べる。

3. アナアオサに含まれている光合成色素の分離方法に関する検討

若いアナアオサに含まれている色素を上述の方法で抽出、転溶、濃縮し、二次元展開すると、Fig. 1 のようなクロマトグラムが得られる。この図では、クロマトグラムの右上端から左下端の原点へかけて、 β -カロチン (β)、ルテイン (l)、ビオラキササンチン (v)、

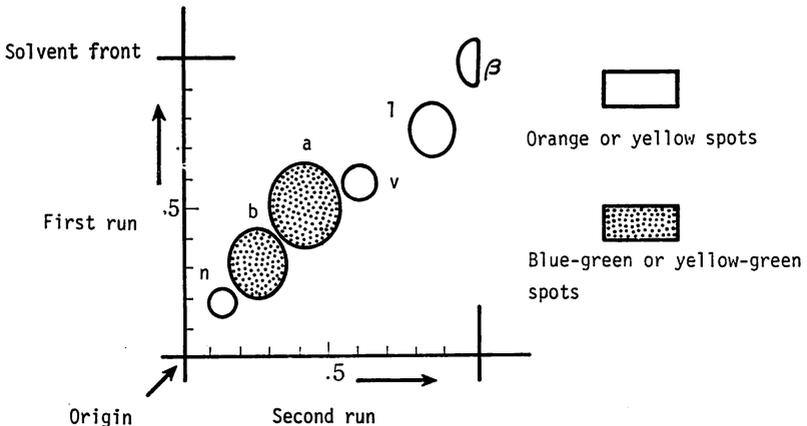


Fig. 1. Two-dimensional paper chromatogram of pigments in *Ulva pertusa*. Chromatographic solvent for first run is a mixture of n-hexane, diethylether and n-propanol (70:30:0.5, v/v/v), and that for second run is n-hexane and chloroform (60:40, v/v). Notations: β : β -carotene (orange), l: lutein (yellow), v: violaxanthin (yellow), a: chlorophyll a (blue-green), b: chlorophyll b (yellow-green), n: neoxanthin (yellow).

クロロフィル *a* (*a*, Chl. *a* と略記する), クロロフィル *b* (*b*, Chl. *b* と略記する), ネオキサンチン (*n*) のスポットが認められる。Fig. 1 に示した各色素の Rf 値は, 第一次展開時の Chl. *a* の Rf 値が 0.5, 第二次展開時のそれが 0.4 になるように展開した場合の Rf 値である。Chl. *a* の Rf 値が上記の値をとるように展開を行うと, 殆んど全ての脂溶性光合成色素を良好に分離することができる。

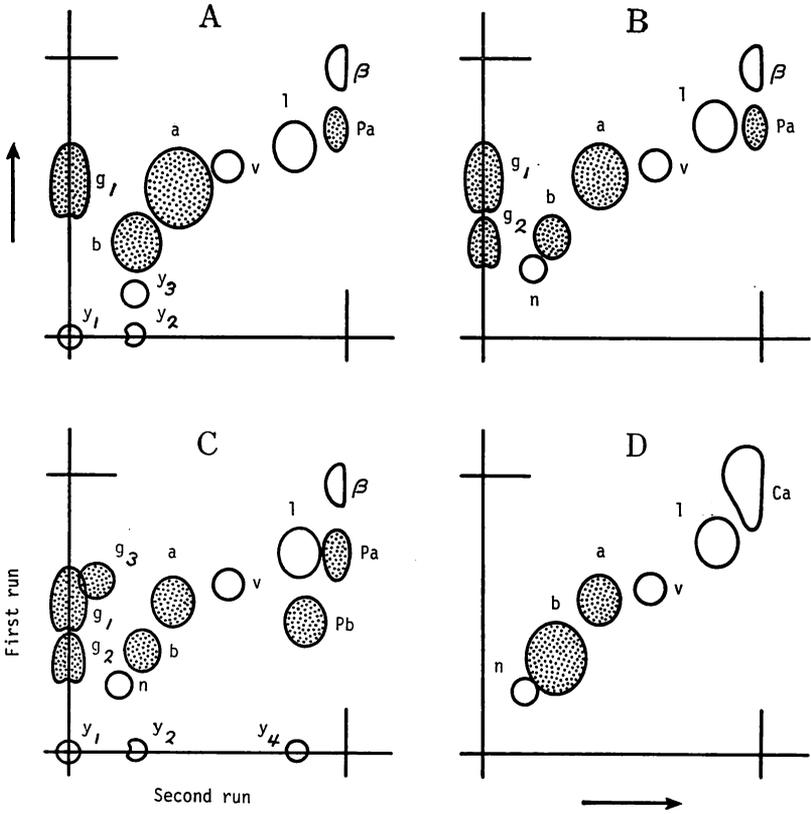


Fig. 2. Two-dimensional paper chromatograms of pigments in young (A, B and C) and fruiting fronds (D) of *Ulva pertusa*. Solvents for first run are 0.5% n-propanol in light petroleum ether in A and C, and a mixture of n-hexane, diethylether and n-propanol (70:30:0.5, v/v/v) in B and D, and that for second run is of n-hexane and chloroform (60:40, v/v) in all cases. Notations: β : β -carotene (orange), Ca: carotenes (orange), l: lutein (yellow), v: violaxanthin (yellow), y_1 , y_2 and y_3 : yellow spots (yellow), a: chlorophyll a (blue-green), b: chlorophyll b (yellow-green), Pa: pheophytin a (grey-green), Pb: pheophytin b (yellow-grey), g_1 , g_2 and g_3 : green spots (green or grey-green).

従来多くの研究者らによって報ぜられている方法に従って、0.8%の *n*-プロパノールを含む石油エーテルで第一次の展開を行ない、第二次を *n*-ヘキサン・クロロホルム (60:40, v/v) 混液で展開すると Fig. 2A に示した如く、前述の色素以外にフェオフィチン *a* (*Pa*) とクロマトグラムの左端に緑色スポット (*g*₁) が現われ、原点近くに3箇の黄色スポット (*y*₁, *y*₂, *y*₃) の認められる場合が数多くあった。クロマトグラムの左端に見られるこのような緑色スポット (*g*₁) は、濾紙に同じ試料をスポットしたのち、12時間冷暗所 (5°C) で濾紙を乾燥させた後、筆者らの考案した展開溶媒 *n*-ヘキサン・エーテル・*n*-プロパノール (70:30:0.5, v/v/v) 混液で第一次を、第二次を *n*-ヘキサン・クロロホルム (60:40, v/v) 混液で展開した場合も濃く現われ、Fig. 2B に見られる如くその数も緑色スポット *g*₁, *g*₂ と2種類に増える。このようなことからみると、Fig. 2A において第一次を 0.8% *n*-プロパノールを含む石油エーテルで展開した際に生じた緑色スポット *g*₁ は、第一次の展開時に *Chl. a* が酸化などによって変性したため生じたスポットではないかと推測される。また一方、濾紙に試料をスポットしたのち、24時間冷暗所で乾燥し、第一次を 0.8% の *n*-プロパノールを含む石油エーテルで展開し、第二次を *n*-ヘキサン・クロロホルム (60:40, v/v) 混液で展開した場合には、Fig. 2C に示した如く、フェオフィチン *a* (*Pa*) と *b* (*Pb*) の濃い緑灰色のスポットが現われ、同時に *Chl. a* と *b* 以外にも、クロマトグラムの左端に3種類の濃い緑色スポット *g*₁, *g*₂, *g*₃ が現われ、かつクロマトグラムの左右の下端には、カロチノイド系色素の酸化物ではないかと推測される3箇の黄色スポット *y*₁, *y*₂, *y*₄ が認められた。

このように、第一次を 0.8% *n*-プロパノールを含む石油エーテルで展開すると、STRAIN *et al.*⁶⁾ がすでに指摘している如く、カロチノイド系色素の酸化によって生じたのではないかと考えられる黄色スポットの数が増える傾向があり、またクロロフィル系色素の変性も起り易くなるようである。このように、ペーパークロマトグラフィーを行う際には、展開溶媒の選択によほどの注意を払わなければならないものと考えられる。以上の点から、筆者らの方法は、現在の所かなり確実、有効な光合成色素の二次元ペーパークロマトグラフィーと考えられるので、本報においては以後全て、第一次を *n*-ヘキサン・エーテル・*n*-プロパノール (70:30:0.5, v/v/v) 混液で、第二次を *n*-ヘキサン・クロロホルム (60:40, v/v) 混液で展開を行なった結果をあげる。

4. 緑藻の生殖に伴う光合成色素の変化

海藻の生殖に伴う光合成色素の変化が肉眼ではっきりと見分けられる種類の中にアナアオサとウスバアオノリがある。アナアオサやウスバアオノリでは、生殖部は藻体の縁辺部から順次造られてゆくが、生殖期に入ったこれらの藻体の縁辺部は、青緑色から橙黄色あるいは黄緑色の帯状に変色するので、栄養部 (非生殖部) の緑色と肉眼でも容易に区別することができる。すでに STRAIN¹⁴⁾ や HAXO and CLENDNING¹⁵⁾ らは、この

ように橙黄色や黄緑色あるいは褐緑色に変色したアオサ類の生殖部においては、栄養部に比べて Chl. *a*, *b* のみならず、カロチノイド系色素の含量や組成に大きな変化の起ることを報告している。そこで筆者らも、アナアオサの幼体と雄性配偶子を作っている成熟体の生殖帯を切り取り、その色素を比較してみた。Fig. 2D に雄性配偶子形成部から抽出した色素のペーパークロマトグラムを示す。Fig. 1 と Fig. 2D とを比較してわかるように、アナアオサの雄性配偶子形成部では、 β -カロチンと α -カロチン及び γ -カロチンの混合したスポットと老えられる¹⁴⁾カロチンのスポット (Ca) が濃く大きくなり、Chl. *a* のスポットが若い藻体に比べて小さく淡くなっていた。同様の結果は、セルローズパウダーカラムクロマトグラフィーで各々の色素分画を分離定量した場合にも得られ、アナアオサの生殖部では Chl. *a* の含量が減少し、カロチンの含量が著しく増加していた²⁾。

能登半島においては、初春の頃ウスバアオノリが繁茂する。このウスバアオノリは、アナアオサの場合と同様大略6日周期で生殖を繰り返しているの、若いウスバアオノリと橙黄色に変色した生殖帯を作っている成熟体の生殖部に含まれている光合成色素を比較してみた。Fig. 3A に示した如く、若いウスバアオノリに含まれている光合成色素の組成は、Fig. 1 に示した若いアナアオサのそれとほぼ同じであった。しかし、橙黄色に変色した生殖帯に含まれている色素のペーパークロマトグラム上には、Fig. 3の B と C に示した如く、 β -カロチン以外に γ -カロチンのスポットが現われる場合もあり、Chl. *a*, *b* 以外にフェオフィチン *a* (Pa) と *b* (Pb) のスポットが現われ、その上さらに3箇所或は4箇所の緑色スポット g_4 , g_5 , g_6 , g_7 が原点或は原点付近にはっきりと認められた。これらの極性の高い緑色スポット $g_4 \sim g_7$ に関して得られた幾つかの知見に関してはすでに報告した^{12), 21), 9), 16)}。これらの $g_4 \sim g_7$ に属する緑色色素は、Fig. 2の A, B, C で認められたような第一次の展開時に生じ易い Chl. *a*, *b* やカロチノイド系色素の変性物ではなく、抽出時の藻体にすでに含まれていたものと考えられる。というのは、幼体を生殖帯の場合と同様な方法で抽出して第一次の展開を行ない、これを12時間冷暗所に放置して第二次の展開を行なった場合には、クロマトグラムは Fig. 3D のようになった。これは Fig. 2C に示した場合と同様、第一次の展開を行なった後、濾紙を冷暗所に放置しておく、Chl. *a* は殆んど変化してクロマトグラムの左端に2箇の緑色色素のスポット g_1 , g_2 として現われ、また Chl. *b* も一部変化して、第二次の展開を行なっても殆んど移動しない緑色スポット g_2 になってしまう (Fig. 3D)。このような場合には、ルテイン、ピオラキサンチン、ネオキサンチンなどのカロチノイドのスポットも、酸化による変性のためであろうと推測されるが、消失してしまっている。ただし、このような場合でも Fig. 3の B や C に見られるような Rf 値をもつ緑色スポット $g_4 \sim g_7$ は認められなかった (Fig. 3D)。一方、ウスバアオノリの若い生藻体と成熟した生藻体の生殖帯の生藻体吸収スペクトルを、マルチパーパス自記分光光度計で測定した場合にも、

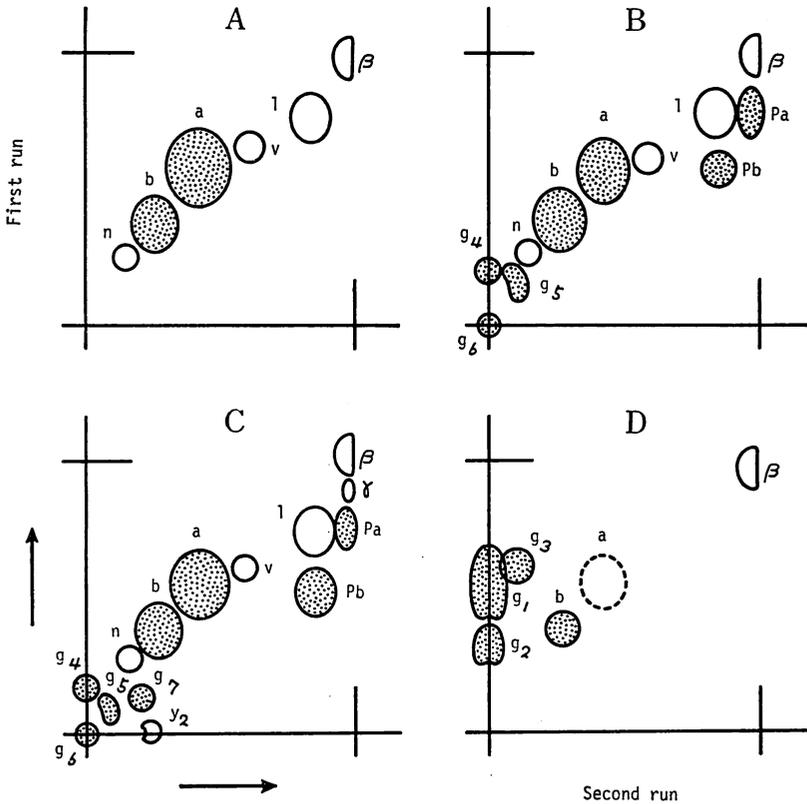


Fig. 3. Two-dimensional paper chromatograms of pigments in young (A) and fruiting fronds (B, C and D) of *Enteromorpha linza*. Solvent for first run is a mixture of n-hexane, diethyl ether and n-propanol (70:30:0.5, v/v/v), and that for second run is of n-hexane and chloroform (60:40, v/v). Notations: β : β -carotene (orange), γ : γ -carotene (orange), l: lutein (yellow), v: violaxanthin (yellow), n: neoxanthin (yellow), y_2 : yellow spot (yellow), a: chlorophyll a (blue-green), b: chlorophyll b (yellow-green), Pa: pheophytin a (grey-green), Pb: pheophytin b (yellow-grey), $g_1, g_2, g_3, g_4, g_5, g_6$ and g_7 : green spots (green or dark-green).

紫色光域～青色光域 (Soret 吸収帯) にかけて、クロロフィル系色素の変化に由来すると考えられる著しい吸収スペクトルの変化が認められた²⁾。このような data から考えて、Fig. 3 の B や C のクロマトグラム上で、原点或は原点付近に現われた極性の高い緑色スポット $g_4 \sim g_7$ は、色素の分析時に生じた artifact と考えるよりも、ウスバアオノリの成熟藻体の生殖帯において、クロロフィル系色素組成に何らかの変化が起るため生じた緑色スポットではないかと推測される。

5. 深所生の緑藻に含まれている光合成色素

上述のアナオサやウスバオノリ等は浅所産であるが、他の深所産緑藻属種中には、シホナキサンチンやシホネイン等のカロチノイドが含まれていることを、STRAIN¹⁴⁾、KLEINING and EGGER¹⁷⁾、RICKETTS¹⁸⁾らが報告している。これらのカロチノイドは、Siphonous algae に特異的なものとみなされていたが、最近、YOKOHAMA *et al.*¹⁸⁾は、

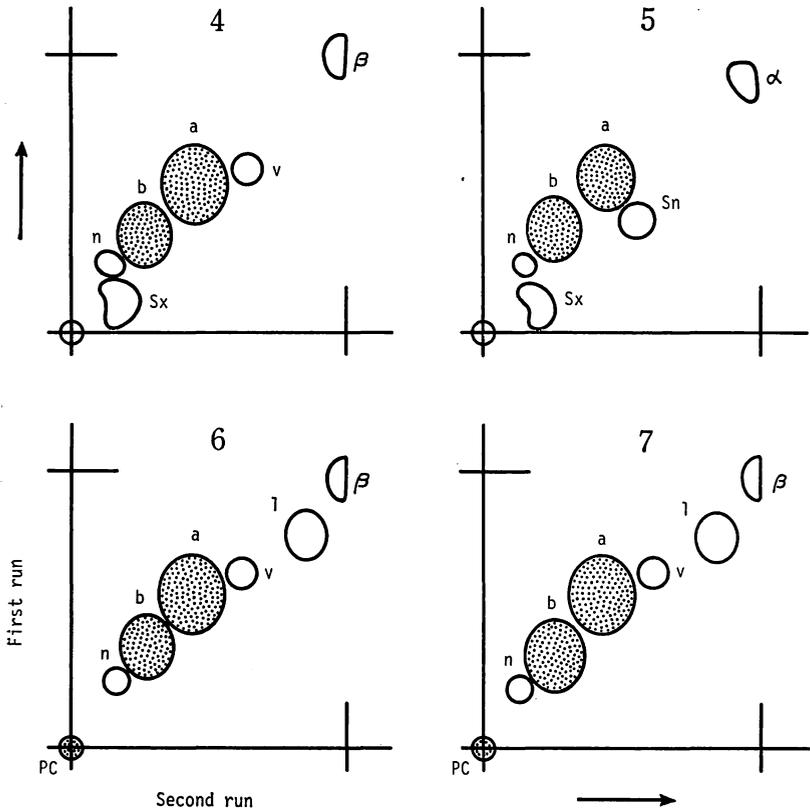


Fig. 4, 5, 6 and 7. Two-dimensional paper chromatograms of pigments in young fronds of *Ulva japonica* (Fig. 4), *Codium mamilloso* (Fig. 5) and in young leaves of *Zostera marina* (Fig. 6) and *Halophylla ovalis* (Fig. 7). Solvent for first run is a mixture of n-hexane, diethylether and n-propanol (70:30.05, v/v/v), and that for second run is of n-hexane and chloroform (60:40, v/v). Notations: β : β -carotene (orange), α : α -carotene (yellow), l: lutein (yellow), v: violaxanthin (yellow), n: neoxanthin (yellow), Sx: siphonaxanthin (orange), Sn: siphonein (orange), a: chlorophyll a (blue-green), b: chlorophyll b (yellow-green), PC: protochlorophyll? (yellow-green).

シホナキサンチンがアオサ属中の深所産種ヤブレグサにも含まれていることを見い出すと共に、このキサントフィルは生体内で 540 nm 付近の緑色光域に吸収帯を持ち、深所産緑藻にとって沿岸深所の緑色光を捕促する光合成色素として重要性をもつものと推論しており、筆者らもセルローズパウダーカラムクロマトグラフィーによってヤブレグサに含まれている光合成色素の分析を行なった結果、YOKOHAMA *et al.*¹³⁾と同様のシホナキサンチン類似のカロチノイド分画を得ると同時に、シホナキサンチンよりさらに強い緑色光～黄色光の吸光能力を持つカロチノイドとクロロフィル系色素の複合した数種の極性の非常に高い緑色素分画を得た (1973¹¹⁾)。なお深所産緑藻には、シホナキサンチンとそのエステルであるシホネインのうち、前者のみを含むもの (ヤブレグサ、チャシオグサ、タマゴバロニア等) と両者共に含むもの (ハネモ、ミル類等) との 2 型がある。そこで筆者らは、シホナキサンチンのみを含むものとして伊豆半島下田の水深 10 m 付近で採集したヤブレグサを、シホナキサンチンとシホネインを含むものとしてほぼ同じ深さで採集したタマミルを用いた。これらから色素を抽出し、二次元展開したペーパークロマトグラムは Fig. 4 と Fig. 5 に示すようなものであった。

Fig. 4 に見られるように、ヤブレグサには β -カロチン、ピオラキサンチン、Chl. a, Chl. b, シホナキサンチン (Sx) のスポットと原点に濃い橙色のスポットが認められ、ルテインのスポットは見られなかった。また *Siphonales* (クダモ目) に属するタマミルでは、Fig. 5 に示されるように STRAIN¹⁴⁾ がすでに報告している α -カロチン、シホネイン (Sn), Chl. a, Chl. b, ネオキサンチン、シホナキサンチン (Sx) と考えられるスポットがはっきりと認められ、 β -カロチンとルテイン及びピオラキサンチンのスポットは見られなかった。さらにタマミルの場合もまた原点に濃く橙色のスポットが認められた。これらの結果を、浅所産の緑藻や次に述べる海産種子植物での結果と比較すると、ヤブレグサにはルテインの代りにシホナキサンチンが含まれており、さらにタマミルでは β -カロチンとピオラキサンチンの代りに α -カロチンとシホネインが含まれていると考えられる。

6. 海産種子植物に含まれている光合成色素

浅所産の緑藻や深所産の緑藻と比較するため、主に水深 5 m 付近に生育しているアマモとウミヒルモについて、含まれている光合成色素の組成を調べてみた。Fig. 6 に種子植物単子葉綱ヒルムシロ科に属するアマモに含まれている色素のペーパークロマトグラムを示した。アマモに含まれている色素は、 β -カロチン、ルテイン、ピオラキサンチン、Chl. a, Chl. b, ネオキサンチンであり、原点にプロトクロロフィル (PC) と推定される黄緑色のスポットが認められる以外は、若いアナアオサやウスバアオノリの色素組成とほぼ同一であった。また、同じく海産種子植物でドチカガミ科に属し、生理学的には海藻の場合と同様、葉が光合成と栄養塩類の吸収とを兼ねている¹⁵⁾ウミヒルモに含ま

れている光合成色素の組成を調べてみた。Fig. 7に見られる如く、ウミヒルモもアマモの場合と同様、原点にプロトクロロフィル (PC) と推定される黄緑色のスポットが認められる以外は、浅所産の若い緑藻とほぼ同じクロマトグラムが得られた。このようにアマモもウミヒルモも、陸上植物の葉と大略同じ色素組成をもっていたが、これら海産種子植物にはゼアキサンチンのスポットは認められなかった。なお、原点に留まっている黄緑色のプロトクロロフィルと推定されるスポットの色素名は、セルローズパウダーカラムクロマトグラフィーにより、この色素を単離したのちでなければ現在の所はつきりとした判定を下し難い。(つづく)

Summary

Photosynthetic pigments obtained from seaweeds and sea grasses were analyzed by two-dimensional paper chromatography improved by the present author. Used materials were *Enteromorpha linza*, *Ulva pertusa*, *U. japonica* and *Codium mamilloso* in green algae and *Zostera marina* and *Halophylla ovalis* in sea grasses.

Preparation of pigments: Pigments were extracted in a small volume of absolute methanol containing a few grains of basic magnesium carbonate. After addition of an equal volume of diethylether and three fold excess of 10% sodium chloride solution in relation to the extract, the pigments were transferred into the ether layer by shaking gently in a separation funnel. The ether layer was removed and concentrated under a reduced pressure. The concentrate was applied to paper chromatography.

Paper chromatography: Two-dimensional paper chromatography was carried out at 5°C in the dark, using Toyo filter paper No. 51 (20×20 cm). The solvent for first run was a mixture of n-hexane, diethyl-ether and n-propanol (70:30:0.5, v/v/v), because it gave the best resolution of carotenes, lutein, pheophytins and chlorophylls among solvents employed so far. For second run, a mixture of n-hexane and chloroform (60:40, v/v) proved to be the best solvent system for obtaining clearly separated spots of violaxanthin, siphonein and siphonaxanthin from chlorophylls *a* and *b*. The spots were developed for about 5 min in each run and allowed to dry for a few minutes after each development.

Since the solvent ratio in both systems is very important for obtaining good separation of the pigments, the solvents were freshly mixed up each day. When this solvent system was employed, chlorophyll *a* formed a spot with Rf

value of about 0.5 in first run and 0.4 in second run. Most of spots were identified after Smith and Benitez's system for chlorophylls (1955) and Goodwin's system for carotenoids (1955). Several new spots were found on the chromatogram, whose characteristics will be reported in the following reports.

Results: In accordance with changes in growing stages and environmental conditions some remarkable differences in the composition of the pigment systems of the fronds were observed. In the case of *Ulva japonica* and *Codium mamilloso*, inhabitants in a deeper place, spots of siphonaxanthin, siphonein and new unidentified orange-green substances were obtained on the chromatogram. In young fronds of *U. pertusa*, β -carotene, lutein, violaxanthin, chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and neoxanthin were observed as independent spots (Fig. 1). The pigment composition of young fronds of *E. linza* was identical with that of *U. pertusa*. However, in the reproductive stage of the former, three new green pigments were observed (Fig. 3). In *U. japonica*, there was a new orange spot at the origin in addition to a distinguished spot of siphonaxanthin, although the spot of lutein disappeared (Fig. 4). In siphonalean algae *C. mamilloso*, siphonaxanthin, its ester, siphonein and α -carotene could be identified instead of β -carotene, lutein and violaxanthin, and the former seem to be substituents for the latter (Fig. 5).

The pigment compositions of leaves of sea grasses, *Zostera marina* and *Halophylla ovalis* were identical with those of leaves of terrestrial higher plants, although the spot of zeaxanthin was not detected in these sea grasses (Fig. 6 and 7).

引用文献

- 1) 池森雅彦 (1973) 生育環境ならびに生育度の相違に伴う海藻類の光合成色素の変化に関する研究 1. 金沢大学日本海域研究所報告 5: 25-87.
- 2) 池森雅彦 (1974) 生育環境ならびに生育度の相違に伴う海藻類の光合成色素の変化に関する研究 2. 金沢大学日本海域研究所報告 6: 1-46.
- 3) LIND, E. F., LANE, H. C. and GLEASON, L. S. (1953) *Plant Physiol.* 28: 325.
- 4) ANDERSON, J. M., BLASS, V. and CALVIN, M. (1960) In *Comparative Biochemistry of Phtoreactive Systems* (M. B. ALLEN, ed.). Acad. Press, New York: 15.
- 5) JEFFREY, S. W. (1961) Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochem. J.*, 80: 316-342.

- 6) STRAIN, H. H., SHERMA, J., BENTON, F. L. and KATZ, J. J. (1965) One-way paper chromatography of the chloroplast pigments of leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **109**: 1-15.
- 7) STRAIN, H. H., SHERMA, J., BENTON, F. L. and KATZ, J. J. (1965) Two-way paper chromatography of the chloroplast pigments of leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **109**: 16-22.
- 8) JEFFREY, S. W. (1968) Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta* **162**: 271-285.
- 9) 池森雅彦 (1969) 海藻に含まれている色素の二次元ペーパークロマトグラフィーによる分離. 金沢大学能登臨海実験所年報 **9**: 9-15.
- 10) JEFFREY, S. W. (1972) Preparation and some properties of crystallin chlorophyll c_1 and c_2 from marine algae. *Biochim. Biophys. Acta* **279**: 15-33.
- 11) SMITH, J. H. C. and BENITEZ, A. (1955) In *Modern Methods of Plant Analysis* (K. PAECH and M. V. TRACEY, eds.) **IV**, Springer, Berlin: 142
- 12) GOODWIN, T. W. (1955) In *Modern Methods of Plant Analysis III* (K. PAECH and M. V. TRACEY, eds.) Springer, Berlin: 272
- 13) YOKOHAMA, Y., KAGEYAMA, A., IKAWA, T. and SHIMURA, S. (1977) In press.
- 14) STRAIN, H. H. (1951) In *Manual of Phycology* (G. M. SMITH ed.) Waltham, Mass., U. S. A.: 243
- 15) HAXO, F. T. and CLENDENNING, K. A. (1953) Photosynthesis and phototaxis in *Ulva lactuca* gametes. *Biol. Bull.* **105**: 103-114.
- 16) 池森雅彦 (1970) 海藻に含まれている色素のクロマトグラフィーによる分離法について. JIBP/PM 研究業績報告 S44: 19-23.
- 17) KLEINING, H. and EGGER, K. (1967) Zur Struktur von Siphonaxanthin und Siphonein, den Hauptcarotenoiden siphonaler Grünalgen. *Phytochem.* **6**: 1681-1686.
- 18) RICKETTS, T. R. (1971) The structure of siphonein and siphonaxanthin from *Codium fragile*. *Phytochem.* **10**: 155-160.
- 19) IKEMORI, M. (1970) The relation of leaf age to the translocation of ^{14}C and ^{32}P in *Halophylla ovalis*. *Records Oceanogr. Works Jap.* **10**: 157-171.
- 20) 池森雅彦 (1973) 光合成色素と海藻の生産力. *海洋科学* **5**(2): 32-39; [(1976) 続・生物海洋学研究 (海洋科学編集部編): 48-55.]