

藻類の光合成色素の簡単な定性分析法

片山舒康*・平田 徹**・倉島 彰***・太齋彰浩****・横浜康継****

*東京学芸大学生物学科 (184 東京都小金井市貫井北町4-1-1)

**山梨大学教育学部生物学教室 (400 山梨県甲府市武田4-4-37)

***東京水産大学藻類学研究室 (108 東京都港区港南4-5-7)

****筑波大学下田臨海実験センター (415 静岡県下田市5-10-1)

Katayama, N., Hirata, T., Kurashima, A., Dasai, A. and Yokohama, Y. 1994. A simplified procedure for qualitative analysis of photosynthetic pigments from algal materials. Jpn. J. Phycol. 42: 71-77.

Although thin-layer chromatography is a very convenient method for analysis of fat-soluble pigments such as chlorophylls and carotenoids, the procedure for preparing a pigment solution as a sample for chromatography has been rather complicated because of the necessity of transferring the pigments extracted in methanol or acetone to diethyl ether. In the present study, direct extraction of the pigments from a raw algal material by diethyl ether was examined in order to simplify the sample preparation procedure.

An adequate amount of plant materials, such as 3-4 cm² or 0.1-0.2 g algal fronds, was cut into small pieces with scissors. The frond pieces were ground in a mortar together with 0.2-0.3 g of dried silica gel powder, and the powder of the ground material and silica gel was then scraped out of the mortar and put into a disposable micro test tube of 2 ml in capacity. About 0.5 ml of diethyl ether was added, and the powder and ethyl ether in the test tube were mixed well. After letting the contents of the test tube settle for a few minutes, the upper ethyl ether layer was removed and was used as the sample for thin-layer chromatography.

In the case of the thin-layer chromatography of each pigment solution, a 20 × 20 cm Merck Silica Gel 60 plastic sheet, cut into 40 pieces of 1 × 10 cm, was used for thin-layer plates, and a test tube of 13 cm in length and 17.5 mm in diameter was used for a developing chamber. Almost all the major pigments from green, brown and red algae could be separated on this thin-layer plate using a mixture of petroleum ether (B. P. 30-60°C) and acetone in 7 : 3 (v/v) as a developing solvent.

The procedure devised in the present study is applicable to research work of algal taxonomists and biology laboratories at the secondary school level.

Key Index Words: brown algae—carotenoids—chlorophylls—extraction—green algae—red algae—thin-layer chromatography.

Nobuyasu Katayama, Department of Biology, Tokyo Gakuei University, Koganei, Tokyo, 184 Japan; Tetsu Hirata, Department of Biology, Faculty of Education, Yamanashi University, Takeda 4-4-37, Kofu, Yamanashi, 400 Japan; Akira Kurashima, Laboratory of Phycology, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo, 108 Japan; Akihiro Dasai and Yasutsugu Yokohama, Shimoda Marine Research Center, University of Tsukuba, Shimoda 5-10-1, Shizuoka, 415 Japan.

藻類を含む光合成植物の高次分類群の名には色を表わす文字が多く使われていることから、植物体の色彩が光合成植物の重要な分類形質になっていることがうかがえる。実際、植物の体色を構成する光合成色素の組成は、光合成植物の門および綱レベルの分類群を

特徴づけ、また各綱内でほとんど変わらない安定した形質となっている。それゆえ、ある藻類の色素の分析は、その藻類の門あるいは綱レベルの分類群への帰属を決定する際の有力な手段となりうるはずである。ところが、操作が煩雑なために、藻類の色素の分析が分類学者自身によって行なわれることは、これまでほとんどなかった。

クロロフィルあるいはカロテノイドなどの脂溶性色素は、メタノールやアセトンなどの有機溶媒で簡単に

下田臨海実験センター業績 No. 566. 本研究は文部省科学研究費補助金総合研究 (A) 課題番号 04305006 および一般研究 (B) 課題番号 05454600 による研究の一部である。

* Correspondence.

抽出できるのだが、変性を避けるためにできるだけ光や酸素にさらさず、しかも低温で抽出・分離を行なうべきであるとされていた。このようなことが、多くの研究者にこれらの色素の分析を敬遠させていたように思われる。しかし、種々の緑藻の色素組成を調べてきた著者の一人横浜 (Yokohama *et al.* 1977, Kageyama and Yokohama 1978, Yokohama 1981, 1983, Yokohama *et al.* 1992) は、室内灯を点じた常温の室内で酸素を断つことなしに抽出その他の操作を行なって得た色素溶液を用いても、セルロースあるいはシリカゲル薄層クロマトグラフィーによる色素組成の判定にはほとんど支障のないことを知った。それでもなお、分離のよい薄層クロマトグラフィーのためには、煩雑な分液操作によって試料の色素溶液を得る必要があった。藻体からの色素の抽出は、水との親和性の大きいメタノールやアセトンなどを溶媒として用いて行なわれる。揮発性の高いエチルエーテルなどは水との親和性が極めて小さいために、これまで、水を含んだ植物体からの色素の抽出に直接用いられることはなかった。しかし、クロマトグラフィーを行なうためには、揮発性の高いエチルエーテルなどへ色素を移さなければならない。その操作が分液である。

最近になって、我々は、インスタント味噌汁の具などに使用されているホウレンソウやネギなどの凍結乾燥品からはエチルエーテルで色素を容易に抽出でき、またその抽出液を用いて良好なクロマトグラムが得られることを見いだした。そこで、試みにツバキの生葉を乾燥剤のシリカゲル粉末とともに磨砕した後にエチルエーテルを加えて攪拌したところ、かなり濃厚な色素溶液が得られ、これを直接試料としたシリカゲル薄層クロマトグラフィーの結果も従来の方法によって得られた色素溶液を試料とした場合と変わらないことが判明した。

本報文は、藻体、シリカゲル粉末およびエチルエーテルをできるだけ少量用いた色素の抽出法とその抽出液を用いた簡単なシリカゲル薄層クロマトグラフィーを紹介するものである。この方法は藻類の分類学を専攻する研究者に役立つばかりでなく、高校などの生徒実験にも容易に応用できるため、生物教育の改革に貢献しうるものと期待される。

材料および方法

本研究では手軽に入手できる肉眼的な海産の紅藻、褐藻および緑藻と、比較のために種子植物の緑葉を用

いたが、微細藻類では遠心分離後あるいはグラスファイバーフィルターで濾過した後に本方法による色素の抽出が可能である。紅藻はムカデノリ (*Grateloupia filicina*)、褐藻はアカモク (*Sargassum horneri*)、緑藻は浅所型のアナアオサ (*Ulva pertusa*) と深所型のサキブトミル (*Codium contractum*) を用いた。これらの海藻は静岡県下田市の鍋田湾で採集し、同湾に面した筑波大学下田臨海実験センターに運んで分析に供した。また、種子植物としてツバキ (*Camellia japonica*) の葉を同センター構内で採集して用いた。

実験に用いた器具は、1試料につき、ハサミ1、葉さじ大小各1、乳鉢および乳棒各1、プラスチック製のエッペンドルフ試験管(容量2ml)1、同試験管用スタンド(発泡スチロールなどに孔をあけた手製のもの)1、コマゴメピペット2、試験管(長さ13cm、外径17.5mm)とシリコン栓各1、試験管立て1、塩化ビニール毛細管*1であり、薬品等は抽出溶媒としてのエチルエーテル、展開溶媒としての石油エーテル(沸点30-60°C)とアセトンの体積比7:3の混液および藻体の磨砕および脱水のための乾燥用シリカゲル粉末である(Fig. 1)。シリカゲル薄層プレートにはMerck社のSilica Gel 60プラスチックシートを用いた。このプレートは縦横それぞれ20cmの正方形であるが、これをガラス板の上に裏返して乗せ、カッターナイフで切り分けて使用した。実際に使用するプレート片は、高さを10cmとし、幅は同時に展開する試料数に合わせて変えたが、1試料のみを展開する場合は1cmとした。色素の展開はシリカゲルの塗布された方向に沿って行なったほうが良好な結果が得られるので、まず、1辺20cmのプレートをシリカゲル塗布方向に直交する線で二等分するように切断した後、目的に応じた幅の小片に切り分けるようにした。シリカゲルの塗布方向は、それに沿った両縁にのみ幅1mm足らずのシリカゲルの欠けた部分が見られることから判別される。プレート片を切り分ける作業は、1cm刻みの方眼紙を裏に貼ったガラス板を下敷きにするることによって、容易かつ正確に行なうことができる。なお、この作業に先立って10×20cmのプレートの長辺の一方から2cmの位置と他方から1cmの位置に鉛筆で薄く線を引いておくと、切断後の小プレートの原点と終点の目印となる。

* 外径約3mm、内径約1mmの塩化ビニール毛細管を長さ10cmほどに切り、その中央をアルコールランプで熱して引き伸ばしたあとに水冷し、カッターナイフで切断して2本にしたものである。

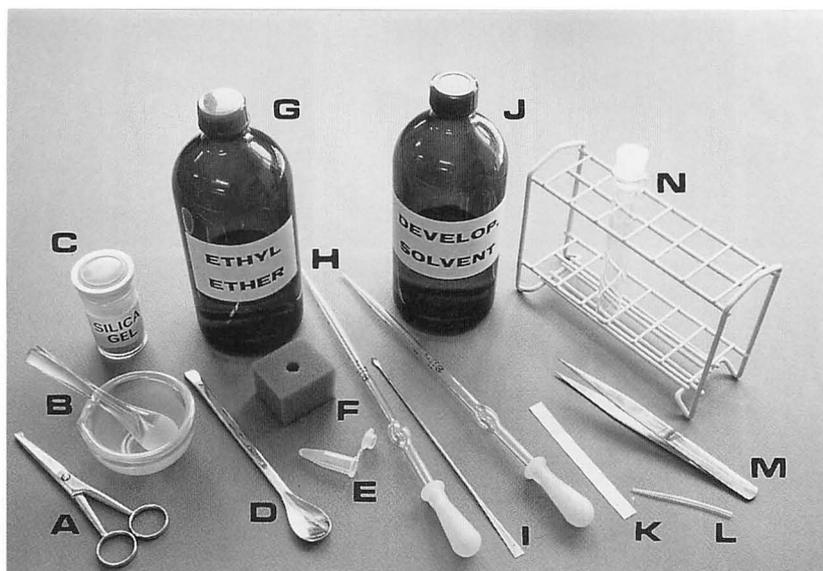


Fig. 1. A complete set of tools and reagents used in the extraction and thin-layer chromatography of pigments from plant material. A, scissors; B, mortar and pestle; C, powdered and dried silica gel; D, spoon; E, disposable plastic micro test tube; F, holder for the micro test tube; G, diethyl ether; H, pipettes; I, small spoon; J, developing solvent constituted of petroleum ether (30–60°C) and acetone (7 : 3, v/v); K, silica gel thin-layer plate of 10 cm × 1 cm cut from a plastic sheet of Merk Silica Gel 60 thin-layer plate of 20 cm × 20 cm; L, capillary tube of polyvinyl chloride resin; M, tweezers; N, test tube of 13 cm in length with silicone plug and test tube rack.

藻体の試料としては、アナアオサの場合 3–4 cm² の藻体片を切り取って用い、他の藻もこれに準じた量の藻体片を用いた。陸上植物のツバキの葉は、単位面積あたりの色素含量が多く、2 cm² ほどの葉片で十分であった。表面の海水をペーパータオルで除いた藻体片、あるいは葉片をはさみで刻んで乳鉢に入れ、0.2–0.3 g のシリカゲル粉末とともに磨砕した (Fig. 2 の 1–4)。ここで用いるシリカゲル粉末は、乾燥剤として用いる青色のシリカゲルビーズを卓上粉砕器あるいは大型の乳鉢で砕いてから電気乾燥器で十分乾燥させたものである。シリカゲル粉末は、試料の水分を除去する目的で使用したのであるが、試料の磨砕剤と磨砕した試料の回収を容易にする増量剤の役割も兼ねている。

磨砕した試料とシリカゲルの混合物を乳鉢の内面から薬さじで削り取って薬包紙の上に集めた後、プラスチック製のエッペンドルフ試験管に移し、エチルエーテル約 0.5 ml を加えて小薬さじでよく攪拌し、数分間放置した後生じてくる上清をクロマトグラフィーの試料として用いた (Fig. 2 の 5–11)。以上の抽出操作はおよそ 5 分ほどで完了する。上清の量および色素濃度は、用いた藻体片や葉片の色素含量およびシリカゲル粉末やエチルエーテルの量によってさまざまとなるが、濃度がかなり低い場合でも、原点への試料の滴下

を 10 回あるいは 20 回というように多数繰り返すことによって、十分な量の色素を原点に添着することができる。

薄層プレートの原点に試料を滴下する前に、展開槽に展開溶媒を注入しておき、あらかじめ展開槽内を展開溶媒の蒸気で飽和させておいた。これは、色素の分離のよいクロマトグラムを得るためである。10 cm × 1 cm のプレート片を用いる場合、展開槽には長さ 13 cm、外径 17.5 mm の試験管を用い、これにあらかじめ約 0.5 ml の展開溶媒を注入し、シリコン栓で密閉しておく。プレートの下から 2 cm の位置を原点とし、そこへ塩化ビニール毛細管で試料を滴下し、ただちにプレートを展開槽内の壁に立てかけた (Fig. 2 の 12–15)。この時、プレートの上端をピンセットでつまんで、展開槽内の展開溶媒の液面にプレート片の下端が達したあたりでピンセットから放すようにした (Fig. 2 の 14)。プレート片を高い位置から落下させると、展開溶媒の液面が乱れて、展開初期に溶媒前線が斜めとなり、各色素の展開像が傾くことが多いからである。溶媒前線がプレートの上端から 1 cm の位置に達したときにプレートを展開槽から取り出すようにしたが、それまでに要する展開時間は、室温により多少異なったが、15 から 18 分であった。

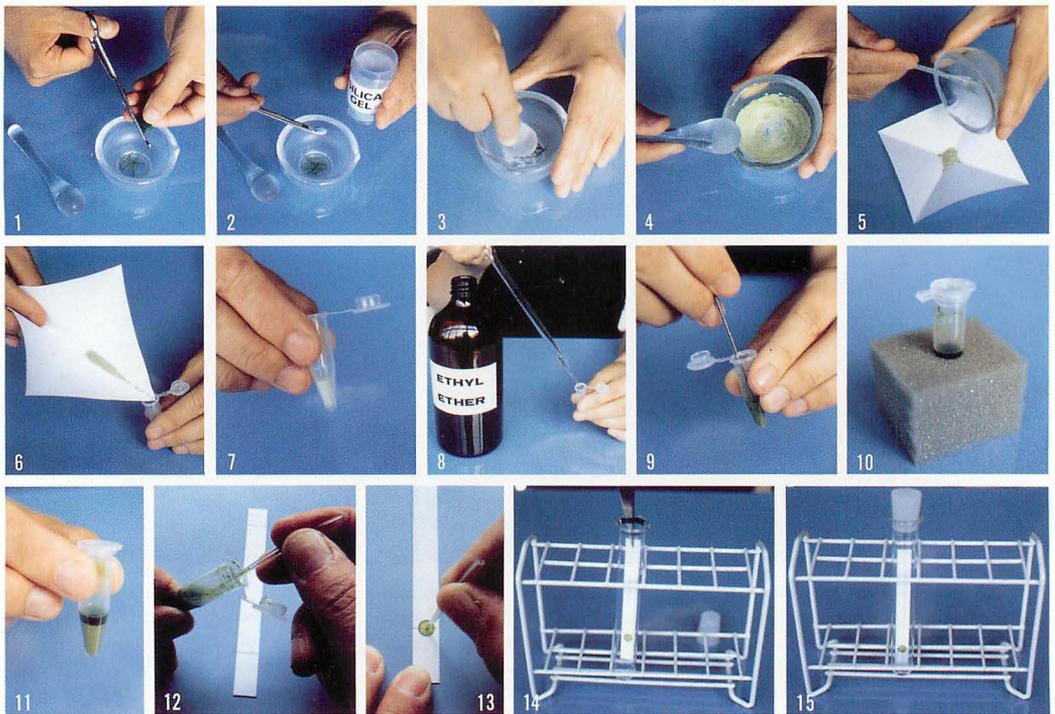


Fig. 2. Procedures of the extraction and thin-layer chromatography of pigments from plant material. (1) A frond piece with the excess seawater wiped off with tissue paper is cut into small pieces and put into a mortar. (2) Dried silica gel powder of 0.2–0.3 g is added in the mortar. (3–4) Frond pieces are ground up together with silica gel powder. (5) The powder of the ground material and silica gel is scraped out of the mortar using a spoon and put on a powder paper. (6–7) The powder is then put into a disposable micro test tube. (8) Diethyl ether of about 0.5 ml is poured into the micro test tube. (9) The powder and diethyl ether are mixed well using a small spoon. (10–11) The micro test tube is left to stand in a holder for a few minutes, and the contents separate into two layers. (12–13) A small volume of the upper layer, the ethyl ether layer, is repeatedly put on the point marked on the thin-layer plate 2 cm far from the lower end using a capillary tube. (14–15) The thin-layer plate is put into a test tube containing the developing solvent of about 0.5 ml, and the test tube is sealed by a silicone plug.

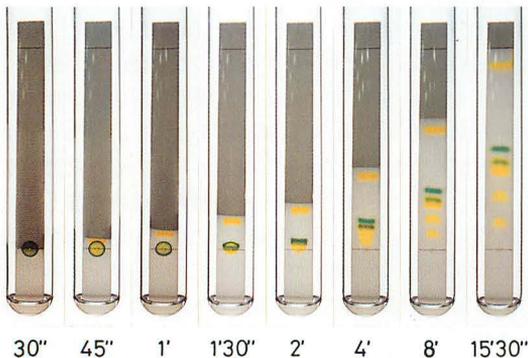


Fig. 3. The time course in the development of pigments from *Ulva pertusa* on a silica gel thin-layer plate. The number on the foot of each test tube indicates the time since the plate was put into the test tube. The temperature was about 20°C.

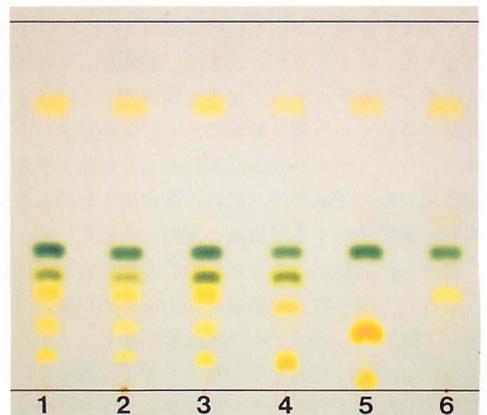


Fig. 4. Silica gel thin-layer chromatograms of pigments extracted by the ordinary method from a terrestrial plant *Camellia japonica* (1) and those extracted with the simplified procedure from *Camellia japonica* (2), a shallow-water type green alga *Ulva pertusa* (3), a deep-water type green alga *Codium contractum* (4), a brown alga *Sargassum horneri* (5) and a red alga *Grateloupia filicina* (6).

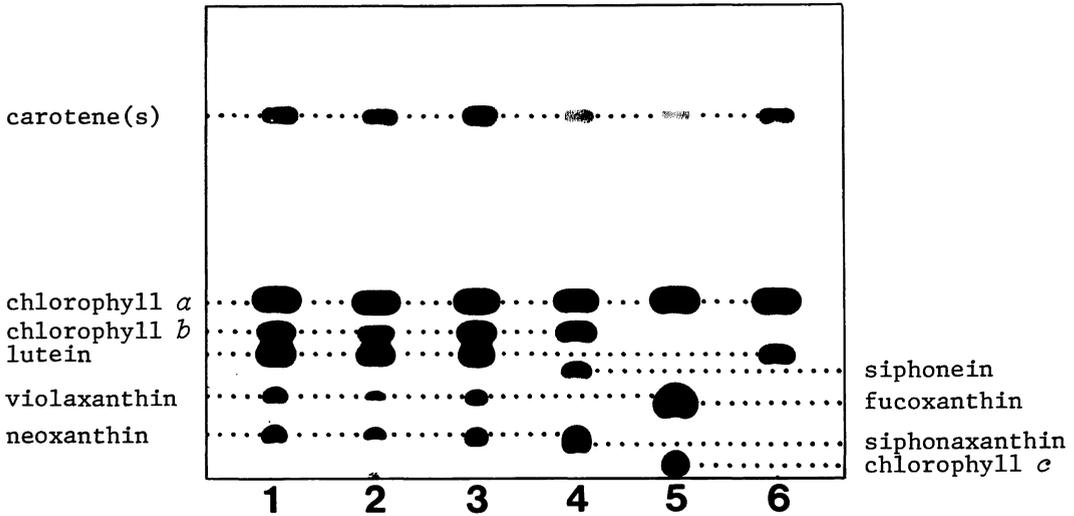


Fig. 5. A positive picture printed from a negative film on which the thin-layer chromatograms shown in Fig. 4 were printed. For other explanations, see Fig. 4.

以上のような簡便法によって調製した試料によるクロマトグラフィーの結果を著者らが従来用いていた方法 (Yokohama *et al.* 1977, Kageyama and Yokohama 1978, Yokohama 1981, 1983, Yokohama *et al.* 1992) による結果と比較するため、弱光下での氷冷したメタノールによる抽出とそれに続く分液によって得たツバキの緑葉の色素のエチルエーテル溶液も用いてクロマトグラフィーを行なった。

クロマトグラムはリバーサルフィルムによるカラー写真またはサクラグラフィックアートフィルムによるモノクロ画像として記録した。カラー写真として記録する場合には、蛍光灯を光源としたライトボックスに展開の終わったプレートを乗せ、ライトボックスの余白部分を黒ラシャ紙で覆い、カメラの絞りを露出計の指示より2段階開いて接写した。また、モノクロ画像にして記録する場合には、プレートのシリカゲル膜面を下向きに乗せて露光したサクラグラフィックアートフィルムを現像して、これをネガとして印画紙に焼き付けた。

結 果

アナアオサの藻体片から簡便法によって得られた色素のエチルエーテル溶液を試料とし、10 cm × 1 cm のシリカゲル薄層プレート片上で、石油エーテルとアセトンの 7:3 (v/v) 混液を展開溶媒として用いたクロマトグラフィーにおける色素の展開の様子を経時的に追

った結果を Fig. 3 に示す。展開時の室温はおよそ 20°C であったが、プレート片の下端を展開溶媒に浸してから15分30秒で上端から 1 cm の位置に溶媒前線の達したことがわかる。また、原点と溶媒前線との間の 7 cm の展開区間に上から黄色のカロテン、青緑色のクロロフィル a、黄緑色のクロロフィル b、黄色のルテイン、ビオラキササンチン、ネオキササンチンの少なくとも 6 種の色素の分離していることが認められる。なお、図には明瞭でないが、これらのほカルテインとビオラキササンチンの間にアンテラキササンチンのごく薄いスポットが認められた。

ツバキの緑葉から従来の方法で得られた色素のエチルエーテル溶液と、ツバキの緑葉、アナアオサ (浅所型緑藻)、サキプトミル (深所型緑藻)、アカモク (褐藻) およびムカデノリ (紅藻) の 5 種の材料から簡便法で得られた色素のエチルエーテル溶液を試料として、同一のシリカゲル薄層プレート上で展開して得られたクロマトグラムのカラー写真を Fig. 4 に、モノクロ画像を Fig. 5 に示す。ツバキの緑葉から従来の方法によって得られた試料と簡便法によって得られた試料との間には、クロマトグラムに明瞭な差は認められないことがわかる (Fig. 4 の 1, 2)。また、浅所型緑藻アナアオサのクロマトグラム (Fig. 4 の 3) はツバキの緑葉のもの (Fig. 4 の 2) と同一であるのに対して、深所型緑藻サキプトミルのクロマトグラム (Fig. 4 の 4) はツバキやアナアオサと異なっており、ルテインとビオラキササンチンをほとんど欠き、橙色に近いシホネイン

とシホナキサンチンのスポットが認められる (Fig. 5 の 1-4)。褐藻アカモクのクロマトグラム (Fig. 4 の 5, Fig. 5 の 5) はクロロフィル *b* を欠き、原点のすぐ上にクロロフィル *c* の緑黄色のスポットが認められる。橙色に近い濃厚なスポットは褐藻の主要なキサントフィルであるフコキサンチンである。その上部に接してピオラキサンチンのスポットが存在しているが、判別は困難である。しかし、展開後のプレートを塩酸の蒸気にさらしたり空气中に放置したりすると、ピオラキサンチンは青色に変化することから、その存在を知ることができる。紅藻ムカデノリの場合 (Fig. 4 の 6) は、カロテンおよびクロロフィル *a* 以外にクロマトグラム上に認められる色素はルテインだけである (Fig. 5 の 6)。紅藻はこれらのほか、赤色のフィコエリトリンと青色のフィコシアニンおよびアロフィコシアニンを含有しているが、それらは有機溶媒に溶けない色素たんぱく質であるため、クロマトグラム上には現われない。クロマトグラム上のクロロフィルおよびカロテノイドのスポットは、常温下で空气中にさらしておく急速に褪色するが、プレートをポリ袋に入れて冷凍庫内に保存したところ、1年を経過しても褪色はほとんど認められなかった。

考 察

5分以内に抽出が終了するという今回開発した極めて簡単な方法で、ツバキの緑葉から調製した色素溶液を試料としたシリカゲル薄層クロマトグラムは、従来の煩雑な方法で調製した色素溶液を試料としたものと差は認められなかった (Fig. 4)。浅所型緑藻および深所型緑藻の色素のクロマトグラムも著者らによる従来の結果と全く同じであった。また、褐藻および紅藻のクロマトグラムにおいても、従来知られている主要な色素はすべて明瞭に認められた。従って、本方法は藻類の分類のための主要色素の分析に適していると言えよう。更に、クロマトグラムを Fig. 5 のようにモノクロ画像として記録する方法は、大量のクロマトグラムを短時間で記録し、保存する安価で簡便な方法と言える。

高等学校生物のほとんどの教科書に、ペーパークロマトグラフィーによる緑葉の色素の分析法が実験項目として載っている。しかし、いずれの方法でも教科書に図示されているような鮮明なクロマトグラムはとうてい得られない。それゆえ、その実験の結果は生徒に失望感を与え、ひいては生物学さらには科学全般に対

する不信感を招きかねない。本論文で報告した方法は、現在の高校の授業で採用されているどの方法よりも簡便である。更に、この方法によって得られるクロマトグラムは、ペーパークロマトグラフィーのものとは比較にならないくらい鮮明である。

現行の高校の授業のように色素分析の対象を陸上植物の緑葉に限れば、インスタント味噌汁の具になっているハウレンソウなどの凍結乾燥品を利用するのが最も簡便な方法となる。しかし、陸上植物は多様な光合成植物の中の緑色植物門の一部を占めているにすぎない。光合成植物の多様性を理解するためにも藻類の色素の分析はきわめて効果的であるといえる。本研究で用いたような海藻類の紅藻、褐藻、浅所型および深所型緑藻と陸上植物の緑葉とで色素組成を比較すると、浅所型緑藻のみが陸上植物と全く同一であることがわかり、陸上植物の祖先が浅所型緑藻であったことが容易に納得できる。Barghoorn and Schopf (1965) によれば、緑藻は10億年前には出現していたとされるが、Berkner and Marshall (1965) によって約6億年前までは致死量の紫外線が水深 5-10 m まで到達していたとされているので、約6億年前まで緑藻はすべてシホナキサンチンを含有する深所型であったと考えられる (横浜 1981, 1982a, 1982b, 1985, Yokohama *et al.* 1992)。つまり、シホナキサンチンやシホネインという光合成色素を含まない鮮緑色の浅所型緑藻は、約6億年前以後に深所型緑藻の子孫として出現したということになる。さらに約4億年前に浅所型緑藻が上陸して陸上植物になったために、陸上植物の葉はすべて緑色であり、浅所型緑藻と同一の色素組成を有するものと理解されるのである。

Fig. 4 および Fig. 5 に示した海藻4種と陸上植物1種のクロマトグラムについて言えば、約6億年以上前に存在していたのは右側の3つのタイプつまり紅藻、褐藻および深所型緑藻に見られるものだけということになる。深所に卓越する緑色光を捕獲する光合成色素として、紅藻はフィコエリトリンを褐藻はフコキサンチンをそれぞれ含有している。赤色の色素たんぱく質であるフィコエリトリンは有機溶媒に溶出しないため、これが紅藻のクロマトグラム上に現われることなく残渣中に残る。色素を抽出した後の小試験管内の残渣が赤く着色していることから、それは理解されるであろう。褐藻のキサントフィルであるフコキサンチンは、クロマトグラム上に極めて濃厚な橙黄色のスポットを形成している。遊離状態では450 nm 付近の青色光を吸収するこの色素は、生体内ではたんぱく質と

結合して 540 nm 付近の緑色光を吸収する状態で存在していることが確認されている (Anderson and Barret 1979)。ただ、フコキサンチンの結合したたんぱく質は他にクロロフィル *a* および *c* の分子とも結合した色素たんぱく質複合体としてのみ得られるため、生体内のフコキサンチンの呈する色は確認できない。

深所型緑藻を特徴づけるキサントフィルであるシホナキサンチンも、そのエステルであるシホネインとともに、褐藻のフコキサンチンと全く同様な色調の橙色のスポットをクロマトグラム上に形成する。遊離のときには 450 nm 付近に吸収極大を有するこれらの色素が生体内では 540 nm 付近に吸収極大を有する状態で存在し、緑色光を捕獲する光合成色素として機能していることは、横浜とその共同研究者によって見いだされた (Yokohama *et al.* 1977, Kageyama *et al.* 1977, Kageyama and Yokohama 1978)。その後、シホナキサンチンがクロロフィル *a* および *b* とともにたんぱく質に結合した色素たんぱく質複合体が単離されるなど、他の研究者 (Anderson 1983, 三室ら 1991) による知見をあわせて、シホナキサンチンとシホネインが、褐藻のフコキサンチンときわめてよく似た挙動を示すと考えられるようになった。しかし、深所型緑藻は褐色を呈することはなく、それらの多くは海松 (みる) 色と呼ばれるオリーブグリーンに近い褐色がかかった暗い緑色を呈するにとどまっている。これは、褐藻の場合、フコキサンチンが分子比でクロロフィル *a* の 60% 前後も含まれているうえ、クロロフィル *c* が黄色に近い色彩を呈するのに対して、深所型緑藻の場合には、シホナキサンチンの量あるいはシホナキサンチンとシホネインの総量がクロロフィル *a* の 30% 前後しかないうえ、緑色を呈するクロロフィル *b* がクロロフィル *a* に近い量で存在しているためと考えられる。

陸上の光合成植物の葉が全て緑色であるのに対して藻類の体色が多様であることを認識することは、現在深刻化しつつあるオゾン層の破壊という地球規模での環境問題の本質を理解することにつながる。原始大気中に存在しなかった分子状酸素が海中の藻類の光合成によって大気中に蓄積し、その結果形成されたオゾン層の紫外線遮蔽効果が藻類自身の浅所化とそれに引き続く上陸を可能にしたのであり、浅所化の過程で暗緑色の深所型緑藻から陸上植物の祖先となる鮮緑色の浅所型緑藻が出現したと考えられるからである。本報文が基礎的な藻類の分類学的研究とともに、生物教育お

よび環境教育に役立てられれば幸いである。

引用文献

- Anderson, J. M. 1983. Chlorophyll-protein complexes of a *Codium* species, including a light-harvesting siphonaxanthin-chlorophyll *a/b*-protein complex, an evolutionary relic of some Chlorophyta. *Biochim. Biophys. Acta* **724**: 370-380.
- Anderson, J. M. and Barret, J. 1979. Chlorophyll-protein complexes of brown algae: P700 reaction centre and light-harvesting complexes. *Chiva Foundation Symp.* **61**, Chlorophyll organization and energy transfer in photosynthesis, 81-104.
- Barghoorn, E. S. and Schopf, J. W. 1965. Microorganisms from the late Precambrian of Central Australia. *Science, N.Y.* **150**: 337-339.
- Berkner, L. V. and Marshall, L. C. 1965. On the origin and rise of oxygen concentration in the earth's atmosphere. *J. Atmos. Sci.* **22**: 225-261.
- Kageyama, A., Yokohama Y., Shimura, S. and Ikawa, T. 1977. An efficient excitation energy transfer from a carotenoid, siphonaxanthin to chlorophyll *a* observed in a deep-water species of chlorophycean seaweed. *Plant Cell Physiol.* **18**: 477-480.
- Kageyama, A. and Yokohama, Y. 1978. The function of siphonein in a siphonous green alga *Dichotomosiphon tuberosus*. *Jpn. J. Phycol.* **26**: 151-155.
- 三室 守・伊藤 繁・岩城雅代. 1991. 光化学と分光計測. 第11講 生体系における光化学過程. 分光研究 **40**: 302-315.
- Yokohama, Y. 1981. Distribution of the green light-absorbing pigments siphonaxanthin and siphonein in marine green algae. *Bot. Mar.* **24**: 637-640.
- 横浜康繼 1981. 海産緑藻における緑色光吸収色素, その生態的意義と系統的意義. *藻類* **29**: 209-222.
- 横浜康繼 1982a. 海藻の謎. 三省堂, 東京.
- 横浜康繼 1982b. 海産緑藻におけるルテインとその誘導体の分布. *藻類* **30**: 311-317.
- Yokohama, Y. 1983. A xanthophyll characteristic of deep-water green algae lacking siphonaxanthin. *Bot. Mar.* **26**: 45-48.
- 横浜康繼 1985. 海の中の森の生態. 講談社, 東京.
- Yokohama, Y., Kageyama, A., Ikawa, T. and Shimura, S. 1977. A carotenoid characteristic of chlorophycean seaweeds living in deep coastal waters. *Bot. Mar.* **20**: 433-436.
- Yokohama, Y., Hirata, T., Misonou, T., Tanaka, J. and Yokochi, H. 1992. Distribution of green light-harvesting pigments, siphonaxanthin and siphonein, and their precursors in marine green algae. *Jpn. J. Phycol.* **40**: 25-31.

(Received November 17, 1993; Accepted January 6, 1994)

