

緑藻類に含まれるカロテノイド資源の調査

林 志菜野¹⁾, 川 越 大²⁾, 林 裕 一²⁾, 真 鍋 祐 樹¹⁾, 菅 原 達 也¹⁾¹⁾京大院農応用生物科学*, ²⁾岡部株式会社)

(受付 2018年8月31日, 受理 2018年10月9日)

Survey of carotenoids content in green algae

Shinano HAYASHI¹⁾, Masaru KAWAGOSHI²⁾, Yuichi HAYASHI²⁾,
Yuki MANABE¹⁾, Tatsuya SUGAWARA¹⁾¹⁾Division of Applied Biosciences, Kyoto University Graduate School of Agriculture²⁾OKABE Co., Ltd

Summary

Siphonaxanthin is a specific and unique carotenoid in marine green algae, such as *Caulerpa lentillifera* and *Codium cylindricum*. It has been reported that siphonaxanthin possesses significant biological activities. However, there are less information about the content and distribution of siphonaxanthin among green algae. In this study, we examined the content of carotenoids, especially siphonaxanthin, in 19 species of green algae. Siphonaxanthin and siphonein were detected in 11 species, and it was shown that their sampling depth is positively correlated with their siphonaxanthin content. By characterization of the carotenoid composition, algae examined in this study were classified into siphonaxanthin-rich, lutein-rich, and lutein-rich groups. The principle component analysis of each carotenoid content corresponded to the biological classification of the algae. Our results would possibly contribute the elucidation of siphonaxanthin biosynthesis pathway.

カロテノイドは黄、橙、赤色などを呈する天然の脂溶性色素である。高等植物や海藻で生合成されたカロテノイドは、クロロフィルの光合成を助ける補助色素として、さらには光合成によって生じる一重項酸素を消去する抗酸化物質としての働きを担っている。基本骨格として炭素数5のイソプレネン単位が8個鎖状に結合した炭素数40の左右対称な構造を有し、この構造にヒドロキシ基やケトン基、アレン基などが挿入されることで、自然界には750種類以上の多種多様なカロテノイドが存在している¹⁾。動物から植物、微生物にまで広く分布しており、動物を除くこれらの生物は多様なカロテノイド生合成経路を有している。生物のカロテノイド組成は、生合成経路の違いを反映しており、系統性のマーカーとしても用いられる²⁾。

近年、食品成分としてのカロテノイドが有する機能性に注目が集まっている。なかでも海洋生物に含まれるカロテノイドは、陸上植物に含まれるものと比較して特徴的な化学構造を有しており、強い生物活性を示すものが多い³⁾。海洋生物に含まれるカロテノイドは、主に藻類によって生合成される。藻類は一般的に緑藻、褐藻、紅藻の3群に大別されるが、その中でも浅所に生育する緑藻は、陸上の緑

色植物とカロテノイド組成が類似していることから、陸上植物の祖先群であると考えられている⁴⁾。多くの緑藻は浅所に生育するが、深所でも生育できるものも知られている。光を効率よく捕捉することが必要な深所性の緑藻類には、高等植物には含まれない特徴的なカロテノイドとしてシフォナキサンチンを有するものがある (Fig. 1)。シフォナキサンチンは、基本骨格にケトン基とヒドロキシ基を有し、シクロヘキセン環にヒドロキシ基を有する⁵⁾。これまでの研究により、シフォナキサンチンは血管新生抑制作用^{6,7)}、ガン細胞に対するアポトーシス誘導⁸⁾、肥満細胞分化抑制作用⁹⁾などの高い機能性を有していることが報告されており、その有効利用が期待されている。

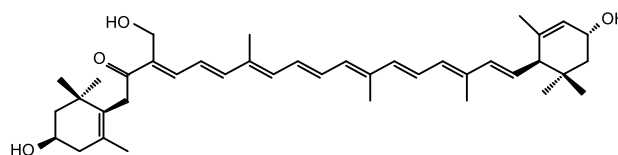


Fig. 1 Structure of siphonaxanthin

*所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

しかしながらシフォナキサンチンを含有している海藻資源は、海ブドウとして知られるクビレズタ (*Caulerpa lentillifera*) や三重県英虞湾周辺など一部地域で食用とされているナガミル (*Codium cylindricum*) やミル (*Codium fragile*) 以外にあまり知られていないことから、資源量は不明である。また、褐藻や紅藻と比較して、緑藻においては種間でのカロテノイド含有量の違いについての情報も乏しい¹⁰⁻¹²⁾。そこで本研究では、特にシフォナキサンチンに注目し、様々な緑藻類のカロテノイド含有量を調べた。

実験方法

1. 試料

2016年3月23日から2017年6月23日に、島根県隠岐郡海士町または熊本県天草市周辺海域で採取された緑藻19種を試料として用いた (Table 1)。

2. カロテノイド標準物質の調製

ネオキササンチン、ピオラキササンチン、ルテインはハウレンソウ (*Spinacia oleracea*) から、シフォナキサンチンはナガミル (*Codium cylindricum*) から抽出し、精製したものをを用いた¹³⁾。β-カロテンは和光純薬株式会社 (大阪) から購入したものをを用いた。

3. 試料からの脂質の抽出と LC/MS 分析

凍結乾燥後、粉砕した緑藻試料の粉末5 mgを精量し、水0.8 ml, メタノール2 ml, クロロホルム1 mlを加えて十分に攪拌した後、遮光して室温で10分間静置した。その後、クロロホルム1 mlと水1 mlを加え、1700×g, 4℃で10分間遠心分離し、下層 (クロロホルム層) を回

収した。残りの層にクロロホルム2 mlを加え、同様の抽出操作を2回繰り返して下層を集め、窒素乾固により溶媒を除去した。試料5 mgにつき HPLC用のメタノール1 mlに再溶解して、5 μLをPDAを備えたLC/MSに供した。それぞれのカロテノイドは保持時間、吸収スペクトルおよびMSスペクトルにより同定した。試料のカロテノイド含有量は、標準物質による検量線を用いて算出した。

分析条件

・ポンプ	LC-20AD (株式会社島津製作所, 京都)
・検出器 (PDA)	SPD-M20A (島津製作所) 検出波長範囲 250–600 nm (定 量には450 nmの吸収を用いた)
・検出器 (MS)	LCMS-2010 EV (島津製作所) 検出プローブ APCI インターフェイス温度 400℃ CDL温度 250℃ ヒートブロック温度 200℃ ネブライズガス流量 0.02 L/min
・カラム	TSKgel ODS-100Z 5 μm (2.0 mm ×25 cm) (東ソー株式会社, 山口)
・カラム温度	40℃
・移動相	A液: メタノール/水 (90:10, v/v) B液: メタノール/酢酸エチル (70:30, v/v) (共に0.1%酢酸アンモニウム含有)
・流速	0.2 mL/min

Table 1 Marine green algae examined in this study

No.	Species	Date	Depth(m)	Locality
1	<i>Chaetomorpha moniligera</i>	March 23, 2017	0.3	Amacho, Shimane
2	<i>Blidingia minima</i>	March 23, 2017	0.3	Amacho, Shimane
3	<i>Cladophora wrightiana</i>	April 7, 2017	10	Amacho, Shimane
4	<i>Microdictyon japonicum</i>	April 7, 2017	10	Amacho, Shimane
5	<i>Cladophora sp.</i>	April 7, 2017	10	Amacho, Shimane
6	<i>Cladophora sp.</i>	April 7, 2017	10	Amacho, Shimane
7	<i>Ulva pertusa</i>	April 7, 2017	10	Amacho, Shimane
8	<i>Chaetomorpha crassa</i>	April 7, 2017	10	Amacho, Shimane
9	<i>Codium spongiosum</i>	April 7, 2017	10	Amacho, Shimane
10	<i>Codium subtubulosum</i>	April 7, 2017	15	Amacho, Shimane
11	<i>Ulva compressa</i>	June 22, 2017	5	Amacho, Shimane
12	<i>Caulerpa okamurae</i>	June 22, 2017	1	Amacho, Shimane
13	<i>Codium cylindricum</i>	June 21, 2017	4	Amakusa, Kumamoto
14	<i>Codium subtubulosum</i>	June 21, 2017	4	Amakusa, Kumamoto
15	<i>Cladophora sp.</i>	June 15, 2017	15	Amacho, Shimane
16	<i>Caulerpa scalpelliformis var. scalpelliformis</i>	June 15, 2017	8	Amacho, Shimane
17	<i>Codium coactum</i>	June 23, 2017	10	Amakusa, Kumamoto
18	<i>Codium barbatum</i>	June 23, 2017	10	Amakusa, Kumamoto
19	<i>Codium fragile</i>	June 21, 2017	4	Amakusa, Kumamoto

- ・グラジエント条件 B液を0から5分までは0%, 5から20分までは0から100%, 20から35分までは100%, 35から40分までは100から0%, 40から45分までは0%で分析した。

4. 主成分分析

得られた19個の試料のカロテノイド含有量について、多変量解析ソフトSIMCA 13.0 (Umetrics, Sweden)を用いて主成分分析を行った。

結果

1. 緑藻試料のカロテノイド組成分析

それぞれの試料の乾燥重量当たりのカロテノイド含有量 (nmol/g) を Table 2, カロテノイド組成を Fig. 2 に示した。シフォナキサンチンとシフォネインはシオグサ目のチャシオグサ (*Cladophora wrightiana*, No. 3) とシオグサの一種 (*Cladophora sp.*, No. 15), ハネモ目ミル科のコブシミル (*Codium spongiosum*, No. 9), クロミル (*Codium subtubulosum*, No. 10, 14), ナガミル (*Codium cylindricum*, No. 13), ネザシミル (*Codium coactum*, No. 17), ヒゲミル (*Codium barbatum*, No. 18), ミル (*Codium fragile*, No. 19) およびイワツタ科のフサイワツタ (*Caulerpa okamurae*, No. 12) とクロキツタ (*Caulerpa scalpelliformis var. scalpelliformis*, No. 16) から検出された。藻体に含まれる全カロテノイド量に対するシフォナキサンチンの割合

としては、チャシオグサ (*Cladophora wrightiana*, No. 3) が45%と最も高かった。シフォナキサンチン含有して11種について、採取深度とシフォナキサンチン含有量の相関を調べたところ、正の相関 ($R = 0.5327, P < 0.05$) が認められた (Fig. 3)。

本研究で解析した19種の緑藻は、カロテノイド組成の特徴から、シフォナキサンチン型, ロロキサンチン型, ルテイン型の3つの型に分類できた。シフォナキサンチン型からは、ルテインは検出されてもわずかであり、ロロキサンチンは検出されなかった。一方、ロロキサンチン型 (ヒメアオノリ, *Blidingia minima*, No. 2; シオグサの一種, *Cladophora sp.*, No. 5, No. 6; ホソジュズモ, *Chaetomorpha crassa*, No. 8) からは、ルテインは検出されたものの、シフォナキサンチンは検出されなかった。ルテイン型 (タマジユズモ, *Chaetomorpha moniligera*, No. 1; アミモヨウ *Microdictyon japonicum*, No. 4; アナアオサ *Ulva pertusa*, No. 7; ヒラアオノリ, *Ulva compressa*, No. 11) からは、シフォナキサンチンとロロキサンチンともに検出されなかった。

2. 主成分分析

得られたカロテノイド組成について、主成分分析を行った。主成分得点の散布図を Fig. 4 に示した。第一主成分にはβ-カロテン, シフォナキサンチン, シフォネイン, ネオキサンチン, 9'-cis-ネオキサンチンが大きく寄与しており、寄与率は56%だった。第二主成分にはデオラキサンチン, ルテイン, ロロキサンチン, 9'-cis-ネオキサンチン

Table 2 Carotenoid contents among green algae

No.	Species	Siphonaxanthin	trans-Neoxanthin	9'-cis-Neoxanthin	Loroxanthin	Violaxanthin	Lutein	Siphonein	β-Carotene
nmol/g dry weight									
1	<i>Chaetomorpha moniligera</i>	ND	226 ± 35	150 ± 11	ND	85 ± 2	634 ± 11	ND	337 ± 8
2	<i>Blidingia minima</i>	ND	136 ± 37	48 ± 14	501 ± 83	15 ± 2	427 ± 66	ND	222 ± 40
3	<i>Cladophora wrightiana</i>	469 ± 29	291 ± 21	18 ± 2	ND	51 ± 4	ND	6 ± 1	206 ± 16
4	<i>Microdictyon japonicum</i>	ND	91 ± 13	55 ± 8	ND	21 ± 4	591 ± 134	ND	91 ± 34
5	<i>Cladophora sp.</i>	ND	58 ± 17	21 ± 11	338 ± 82	41 ± 7	79 ± 16	ND	52 ± 7
6	<i>Cladophora sp.</i>	ND	86 ± 6	33 ± 10	423 ± 84	73 ± 4	151 ± 23	ND	175 ± 38
7	<i>Ulva pertusa</i>	ND	22 ± 13	49 ± 1	ND	10 ± 4	157 ± 52	ND	42 ± 10
8	<i>Chaetomorpha crassa</i>	ND	68 ± 3	89 ± 4	462 ± 17	50 ± 5	90 ± 8	ND	78 ± 2
9	<i>Codium spongiosum</i>	150 ± 27	224 ± 27	55 ± 8	ND	5.5 ± 4.9	ND	162 ± 27	206 ± 35
10	<i>Codium subtubulosum</i>	176 ± 15	218 ± 16	67 ± 7	ND	1.8 ± 0.4	ND	189 ± 19	252 ± 31
11	<i>Ulva compressa</i>	ND	96 ± 22	ND	ND	2.2 ± 1.3	134 ± 66	ND	15 ± 5
12	<i>Caulerpa okamurae</i>	100 ± 11	53 ± 12	30 ± 10	ND	7.3 ± 2.2	ND	153 ± 17	59 ± 12
13	<i>Codium cylindricum</i>	105 ± 9	55 ± 34	31 ± 3	ND	ND	ND	92 ± 9	213 ± 21
14	<i>Codium subtubulosum</i>	34 ± 3	18 ± 2	6 ± 6	ND	ND	ND	34 ± 3	42 ± 1
15	<i>Cladophora sp.</i>	1028 ± 161	649 ± 190	272 ± 98	ND	20 ± 3	24 ± 3	947 ± 117	2254 ± 354
16	<i>Caulerpa scalpelliformis var. scalpelliformis</i>	52 ± 6	38 ± 15	8 ± 5	ND	7.9 ± 1.3	5.6 ± 0.6	227 ± 22	15 ± 14
17	<i>Codium coactum</i>	139 ± 8	65 ± 5	31 ± 2	ND	1.6 ± 0.4	ND	139 ± 9	214 ± 14
18	<i>Codium barbatum</i>	317 ± 53	172 ± 20	81 ± 13	ND	8.4 ± 0.4	14 ± 4	288 ± 45	372 ± 68
19	<i>Codium fragile</i>	374 ± 30	250 ± 15	104 ± 7	ND	6.1 ± 0.5	4.8 ± 1.1	283 ± 24	571 ± 15

(Means ± SD, n = 3)

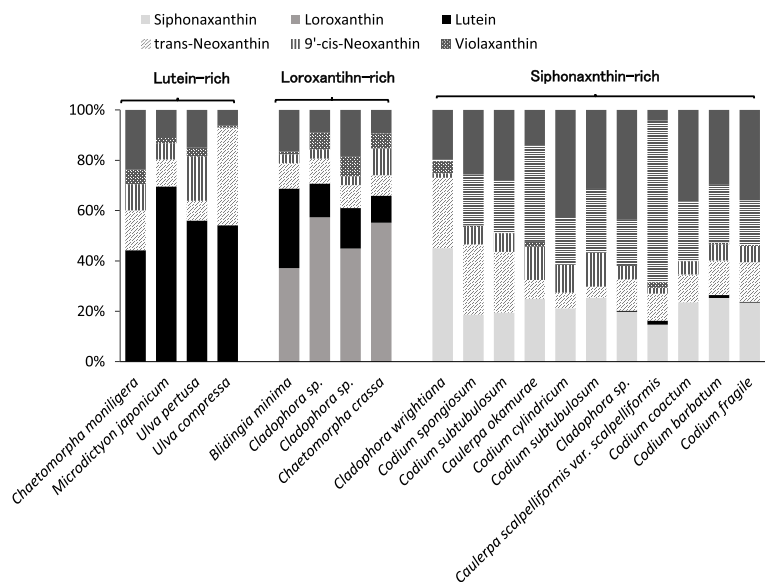


Fig. 2 Carotenoid compositions of green algae

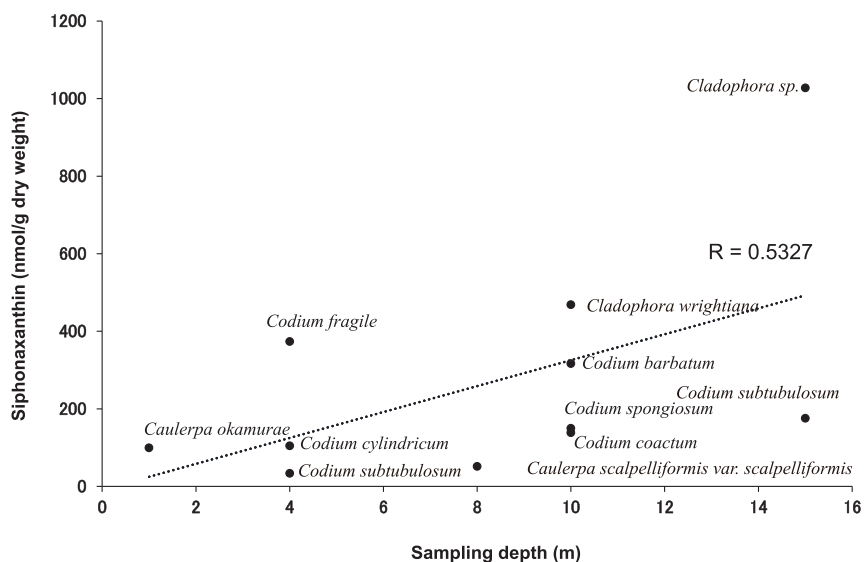


Fig. 3 Correlation between sampling depth and content of siphonaxanthin in green algae

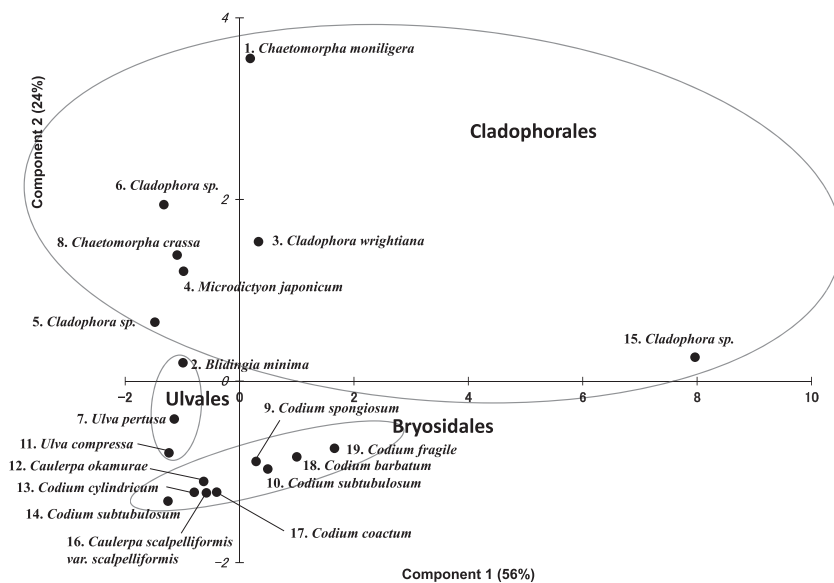


Fig. 4 Principle component analysis of carotenoid compositions in green algae

が大きく寄与しており，寄与率は24%だった。第二主成分までの累積寄与率は80%だったため，第二主成分までほぼ全体を説明することができた。また，主成分得点の散布図により試料を大きく3つのグループに分類することができ，グループ分けの結果は，試料の生物学的分類（シオグサ目，アオサ目，ハネモ目）と一致していた。

考 察

本研究で分析した緑藻試料のなかで，チャシオグサは，藻体に含まれる全カロテノイド量に対するシフォナキサンチンの割合が45%と最も高く，シフォナキサンチンの原料素材の一つとして有望と考えられた。これまでに，シフォナキサンチン含有量は生育深度と正の相関を示すことが報告されているが¹⁴⁾，本研究の結果からも採取深度とシフォナキサンチン含有量の正の相関が示された。したがって，より深い海域に生息する種の緑藻は，シフォナキサンチンの原料素材として，より有望である可能性も推測された。

藻体内における生合成経路として，その化学構造から，ルテインからロロキサンチンを経て，シフォナキサンチンが合成されることが推定されている。しかしながら，その生合成に関わる酵素は未だ同定されていない²⁾。本研究の結果から，ルテイン型の緑藻は，ルテインの19位を水酸化する酵素を欠損しており，ロロキサンチン型の緑藻は，ロロキサンチンの8位をケトカルボニル化する酵素を欠損していることが推定された。したがって本研究の結果は，カロテノイドの生合成経路と合成酵素の同定にも役立つと考えられた。

参考文献

- 1) Maoka, T. (2009) Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. *Arch Biochem Biophys*, 483, 191-195.
- 2) Takaichi, S. (2011) Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9, 1101-1118.
- 3) Maoka, T. (2011) Carotenoids in marine animals. *Marine Drugs*, 9, 278-293.
- 4) Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T., and Delwiche, C. F. (2001) The closest living relatives of land plants. *Science*, 294, 2351-2353.
- 5) Sugawara, T., Ganesan, P., Li, Z., Manabe, Y. and Hirata, T. (2014) Siphonaxanthin, a green algal carotenoid, as a novel functional compound. *Marine Drugs*, 12, 3660-3668.
- 6) Ganesan, P., Matsubara, K., Ohkubo, T., Tanaka, Y., Noda, K., Sugawara, T. and Hirata, T. (2010) Anti-angiogenic effect of siphonaxanthin from green alga, *Codium fragile*. *Phytomedicine*, 17, 1140-1144.
- 7) Ganesan, P., Matsubara, K., Sugawara, T. and Hirata, T. (2013) Marine algal carotenoids inhibit angiogenesis by down-regulating FGF-2-mediated intracellular signals in vascular endothelial cells. *Mol Cell Biochem*, 380, 1-9.
- 8) Ganesan, P., Noda, K., Manabe, Y., Ohkubo, T., Tanaka, Y., Maoka, T., Sugawara, T. and Hirata, T. (2011) Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *Biochim Biophys Acta*, 1810, 497-503.
- 9) Li, Z. S., Noda, K., Fujita, E., Manabe, Y., Hirata, T. and Sugawara, T. (2014) The green algal carotenoid siphonaxanthin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes and the accumulation of lipids in white adipose tissue of KK-Ay mice. *J Nutr*, 145, 490-498.
- 10) Matsuno, T. (2001) Aquatic animal carotenoids. *Fisheries Sci*, 67, 771-783.
- 11) Schubert, N., García-Mendoza, E., and Pacheco-Ruiz, I. (2006) Carotenoid composition of marine red algae 1. *J. Phyco*, 42, 1208-1216.
- 12) Haugan, J. A. (1994) Algal carotenoids 54. Carotenoids of brown algae (*Phaeophyceae*). *Bioch Syst*, 22, 31-41.
- 13) Manabe, Y., Hirata, T., and Sugawara, T. (2014) Suppressive effects of carotenoids on the antigen-induced degranulation in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells. *J. Oleo Sci*, 63, 291-294.
- 14) Raniello, R., Lorenti, M., Brunet, C. and Buia, M. C. (2006) Photoacclimation of the invasive alga *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* to depth and daylight patterns and a putative new role for siphonaxanthin. *Marine Ecology*, 27, 20-30.