



Title	カロテノイドの分析
Author(s)	高市, 真一
Citation	低温科学, 67, 347-353 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/39165">http://hdl.handle.net/2115/39165</a>
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 5. 色素の分析 d
File Information	67-050.pdf



[Instructions for use](#)

## 5. 色素の分析

### d. カロテノイドの分析

高市 真一<sup>1)</sup>

光合成生物にとってカロテノイドの存在は必須であり、多種多様なカロテノイドがある。光合成生物の分類群ごとに特有なカロテノイドもある。本章ではカロテノイドの抽出、精製、同定などの方法を解説する。

### Analysis of Carotenoids in Phototrophic Organisms

Shinichi Takaichi

Presence of carotenoids in phototrophic organisms is essential for light-harvesting and photoprotection, and around 150 kinds of carotenoids are found in these. Some specific carotenoids are only found in specific groups. In this chapter, the methods for extraction, analysis, purification and identification are explained.

#### 5.d.1 はじめに

光合成生物にとってカロテノイドの存在は必須であり、光合成における機能が解明されつつあるが、まだ不明な点も多い。クロロフィルに比べて多種多様なカロテノイドが存在する。即ち、自然界には750種類以上のカロテノイドが知られているが<sup>1)</sup>、光合成に関与するカロテノイドは生合成中間体を含めて150種類くらいと思われる<sup>2)</sup>。主要なカロテノイドとして、陸上植物の葉緑体にはほぼ共通して $\beta$ -カロテン、ルテイン、ピオラキサンチン、9'-シス・ネオキササンチンと微量成分として $\alpha$ -カロテン、ゼアキササンチン、アンテラキササンチンがある。藻類は多種多彩で、微細藻類を中心に系統性の再検討がなされていて、一部の藻類では分析が充分でない。 $\beta$ -カロテンとゼアキササンチンがほぼ共通して主成分である。クリプト藻の $\alpha$ -カロテンとアロキササンチン、黄緑藻のジアジノキササンチンとジアトキササンチン、珪藻や褐藻やハプト藻のフコキササンチン、渦鞭毛藻のペリジニン、真正眼点藻のピオラキサンチン、ユーグレナ藻のジアジノキササンチンと9'-シス・ネオキササンチンなど分類群に特有なカロテノイドの存在も知られている。以上のカロテノイドは両側の末端基が $\beta$ あるいは $\epsilon$ 末端基である。原核光合成生物はさらに多様なカロテノイドを持つ。シアノバクテリアは $\beta$ -カロテンとその水酸化あるいはケト化した誘導体とミクソール配糖体、紅色細菌はメトキシ化した非環状カロテノイド、緑色硫黄細菌と緑色糸状細菌は $\gamma$ -カロテン誘導体、ヘリオバクテリアは炭素数30のカロテ

ンを主成分とする<sup>2)</sup>。代表的なカロテノイドの構造式を図1に示した。

本章ではカロテノイドの抽出、分析、精製、機器分析による同定の方法などの一般的な解説をする。詳しくは“カロテノイド：その多様性と生理活性”高市編、裳華房(2006)<sup>2)</sup>を参照して欲しい。また生物材料ごとの事例に関しては“Methods in Enzymology, vol. 213”<sup>3)</sup>、“Carotenoids, vol. 1A”<sup>4)</sup>などを参照して欲しい。個々のカロテノイドの構造式や性質などは上記“カロテノイド”<sup>2)</sup>あるいは“光合成事典”<sup>5)</sup>、“Carotenoids, Handbook”<sup>1)</sup>、生理活性脂質データベース<sup>6)</sup>のカロテノイド部門などを参照して欲しい。

#### 5.d.2 抽出<sup>2-4)</sup>

新鮮な生物材料を使うことが望ましいが、材料を保存する場合はできるだけ低温に保存した方がよい。また抽出後は異性化や分解を受け易くなるので、生物材料のまま保存する方がよい。カロテノイドは光あるいは温度による異性化、酸素による酸化、重合、分解などを受けやすく、また酸あるいはアルカリにより化学構造の変化が起こることもある。できるだけ弱光の所で実験をおこなう。試料は低温で保存する、また窒素置換後、密栓をして酸素にふれないようにする、などの注意が必要である。さらに有機溶媒は人の健康に害を及ぼすのでドラフトなどの換気施設の中で操作しなければならない。特にクロロホルムなどハロゲン化合物は他の有機溶媒よりも人体に対する毒性が高いため、できれば他の有機溶媒に置き換えた方がよい。

1) 日本医科大学生物化学教室(日本医大・生物)

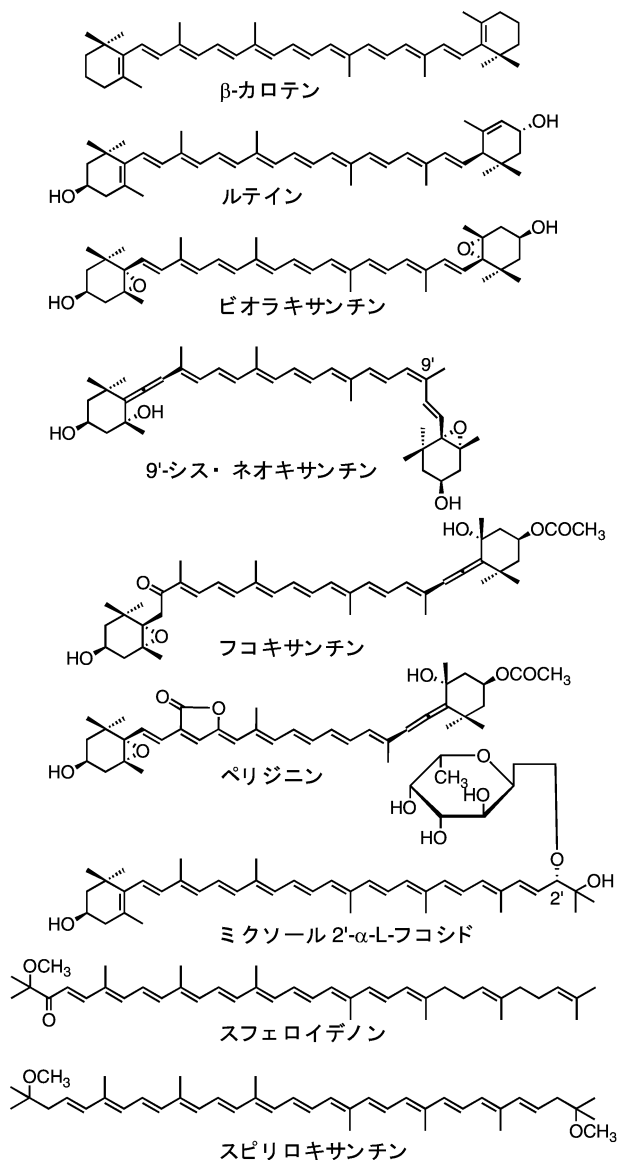


図1：代表的なカロテノイドの構造式。

生物材料ごとに抽出方法は千差万別である。生物材料は水分を含んでいるので、前もって水分を減少させ、抽出には水と混ざる有機溶媒を用いる。一般にはメタノール、アセトン、アセトン/メタノール(7:2)、クロロホルム/メタノール(1:2)などがよく用いられ、色がなくなるまで抽出を数回繰り返す。凍結乾燥した生物材料の場合は、材料の保存性がよく抽出しやすいこともあるが、時に有機溶媒により細胞壁成分が固化して有機溶媒が浸透しにくくなることもあり、このときは湿った状態に戻すと抽出しやすくなることもある。有機溶媒中で超音波あるいは乳鉢などによる破碎をすると抽出の効率上がる。抽出溶媒の体積を増やし、抽出回数を多くすると抽出の効率は上がるが、その反面、抽出液の体積が多

くなりその後の処理がしにくくなる。生物材料によっては有機酸などの酸性物質、あるいは塩基性物質を多量に含み、また抽出用クロロホルムは塩酸を含むことがあるので、濃い緩衝液を少量入れて pH 変化を防ぐと良い。

抽出液に多量の水分が含まれる場合は、抽出液にヘキサン、次いで水を加えて、ヘキサン層と含水有機溶媒層に分離させると、カロテンおよび低極性キサントフィルはヘキサン層に含まれ、体積の減少、水分と夾雑物の除去をすることができる。酢酸エチル層と水層に分配する方法もある。水分が少ないときは直接ロータリーエバポレーターで有機溶媒を除去する。エタノールを加えて、水とエタノールの共沸を利用すると水分を除去しやすい。

有機溶媒での抽出により、カロテノイドばかりでなく、中性脂質、リン脂質、糖脂質、キノン、膜タンパク質、クロロフィルなど脂溶性物質も抽出されてくる。ただし光合成生物では脂質類に対してカロテノイド含量が多いので、多くの場合、そのまま分析できる。脂質類の妨害が問題となるときは、ケン化(アルカリ分解)により除くことができる。抽出物をエタノールあるいはジエチルエーテルに溶かし、60% (w/v) 水酸化カリウム水溶液を1/10 容入れ、気相を窒素置換し、暗所、室温で4-6時間あるいは60°Cで20分放置する。その後、等量のジエチルエーテルあるいはヘキサン、次いで塩化ナトリウム溶液を入れると二層に分離する。カロテノイドは有機溶媒層に残るが、脂質はグリセリンと脂肪酸塩に、クロロフィルはクロロフィリドとフィトールに加水分解して水層に移動する。ただし花卉やある種の藻類などにはカロテノイド脂肪酸エステル、ある種の光合成細菌にはカロテノイド配糖体脂肪酸エステルがあり、これらのカロテノイド誘導体はケン化により脂肪酸を失うので注意が必要である。またフコキササンチンやペリジニンなどのアセチル基も外れてしまう。

### 5.d.3 分析方法<sup>2)</sup>

陸上植物の葉緑体、既にカロテノイドが同定されている生物、近縁種のカロテノイドが同定されている生物、などは、フォトダイオードアレイ検出器(PDA)を接続し、逆送系カラムを装着した高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を使用すると、溶出時間と吸収スペクトルからカロテノイドをほぼ同定できることがある。ただし分光光度計に較べてPDAは、波長分解能が低くまた1-2 nmの波長のズレはおこる可能性はある。

逆送系カラムはシリカゲルにオクタデシルシラン基

(ODS, C<sub>18</sub>)を結合させたものであり、多用されている。最近ではC<sub>30</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>2</sub>などの製品もあり、C<sub>30</sub>はシス体の分離に便利である。各メーカーから多種類の製品が出ていて、製品毎にC<sub>18</sub>の結合割合、残存水酸基の処理方法、残存シリカの割合などが異なるため、性質に差異がある。少量の中極性から高極性溶媒に溶かしたカロテノイドは、カロテノイドの炭化水素部分と吸着剤の炭化水素部分との疎水結合により吸着し、初めに高極性成分が、最後にカロテンが溶出してくる。共役や非共役二重結合の数が多いほど早く溶出する。カラムの種類あるいは溶出溶媒を変えると、溶出時間が大きく変わることがある。まずは文献と同じカラムと同じ溶出条件を用い、必要に応じて条件を変更するとよい。溶出時間は、カラムの汚れ具合や温度などにも大きく影響を受け、多少の変動がみられることがある。粗抽出液では脂質などの影響で精製物と溶出時間が異なることがある。そのため文献値との比較ではなく、既知のカロテノイドと比較対照した方がよい。

緑葉、シアノバクテリア、紅色細菌のHPLC分析例を最後に示した。

#### 5.d.4 吸収スペクトル<sup>2,7)</sup>

カロテノイドの吸収スペクトルの形および吸収極大波長は、共役二重結合の数、 $\beta$ 末端基の数、溶媒に依存する。従って吸収スペクトルよりこれらの数を推定できる。共役二重結合の数が多いほど吸収極大波長は長波長になり、共役二重結合系が同じカロテノイドでは水酸基やエポキシ基などの有無、例えば $\beta$ -カロテンとゼアキササンチン、は吸収スペクトルに影響を与えない。表1にメタノール(HPLC溶媒, PDA測定)中の代表的なカロテノイドの吸収極大波長をまとめた。また環状構造をもたない鎖状カロテノイド、共役二重結合の数が3のフィトエンから13のスピリロキササンチン、の吸収スペクトルを図2に示した。鎖状カロテノイドは3つの吸収極大波長が明瞭であるが、 $\beta$ 末端基の数が1, 2個と増えると極大ピークがブロードになる(図3)。一般に溶媒の分極率が低い*n*-ヘキサンより高い二硫化炭素の方が吸収スペクトルが長波長シフトするので(図4)、カロテノイドの吸収スペクトルを示すときは、必ず溶媒の種類を明記しなければならない。また共役したカルボニル基(ケト基, アルデヒド基)を持つカロテノイドは、吸収スペクトルが一つの幅広い形であるが、カルボニル基をNaBH<sub>4</sub>で還元すると吸収スペクトルはピークをもつ形に変化する。また色

表1: 種々のカロテノイドのメタノール中での吸収極大波長<sup>2)</sup>。

<i>N</i>	<i>N<sub>p</sub></i>	<i>N<sub>r</sub></i>	吸収極大波長 (nm)				%III/II	% <i>D<sub>B</sub></i> / <i>D<sub>I</sub></i>	カロテノイド
3	3	0	(276)	284	(294)			フィトエン	
5	5	0	254	329	346	365	85.0	10.1	フィトフルエン
7	7	0	295	377	398	422	95.0	5.2	$\xi$ -カロテン
			295	374	395	419	89.9	11.1	非対称 $\xi$ -カロテン
8	8	0	309	397	419	446	97.7	5.8	シフォナキササンチン還元型
9	9	0	328	413	436	465	90.2	6.8	ニューロスボレン
			326	415	436	466	89.9	5.0	ピオラキササンチン
10	10	0	344	427	452	482	78.5	10.6	スフェロイデン
11	11	0	360	442	468	499	68.7	9.2	リコペン
12	12	0	372	454	480	513	65.2	10.7	アンヒドロロドビブリン
13	13	0	385	464	492	524	63.8	14.1	スピリロキササンチン
9	8	1	324	(405)	426	451	52.4	6.0	$\beta$ -ゼアカロテン
10	9	1	335	(422)	442	471	61.2	5.6	$\alpha$ -カロテン
			335	(422)	443	470	61.7	5.3	ルテイン
11	10	1	346	(436)	457	485	30.4	13.5	$\gamma$ -カロテン
			350	(437)	459	488	45.5	7.4	クロロバクテン
12	11	1	361	(446)	468	499	46.2	17.4	バクテリオルピキササンチン
13	12	1	379	(463)	484	516	40.7	13.0	トルレン
11	9	2	341	(429)	449	475	24.6	5.4	$\beta$ -カロテン
			341	(427)	448	475	27.4	5.7	ゼアキササンチン
			341	(425)	448	475	30.9	9.9	ノストキササンチン

*N*, 共役二重結合の数; *N<sub>p</sub>*, ポリエン鎖中の *N*; *N<sub>r</sub>*, 共役  $\beta$  末端基の数;  $N = N_p + N_r$   
HPLC に接続したフォトダイオードアレイ検出器 (PDA), 室温で測定した。PDA の波長分解能 (波長間隔 1.3 nm) のため 1-2 nm の差異がでることがある。吸収極大波長は吸収スペクトルの微分から求め、カッコ内は吸収の肩を示す。

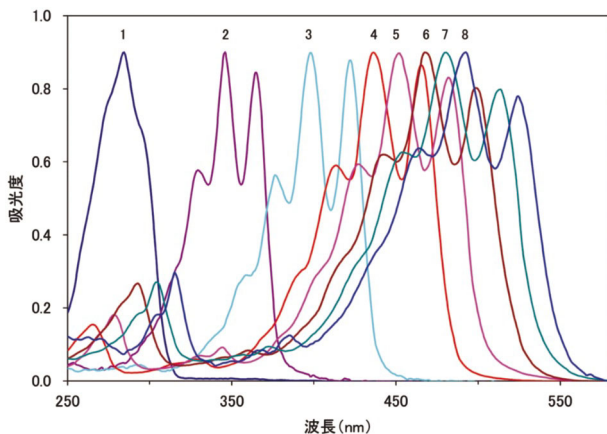


図2：非環状カロテノイドのメタノール中での吸収スペクトル。括弧内に共役二重結合の数を示した。1：フィトエン(3)，2：フィトフルエン(5)，3： $\epsilon$ -カロテン(7)，4：ニューロスポレン(9)，5：スフェロイデン(10)，6：リコペン(11)，7：ロドビプリン(12)，8：スピロロキサンチン(13)。

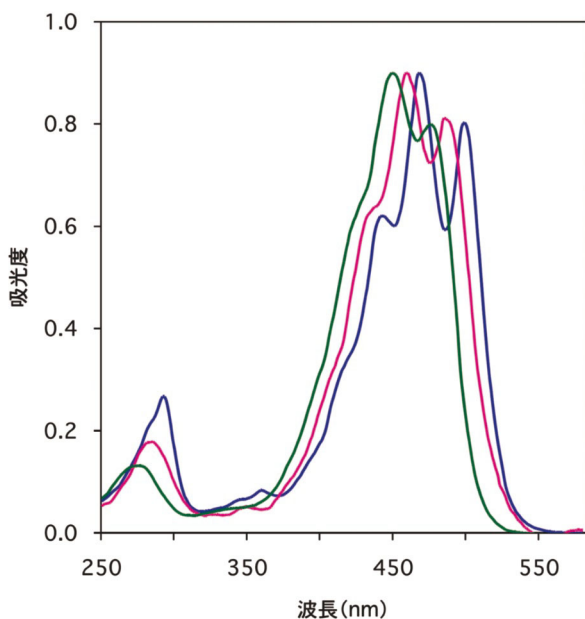


図3：吸収スペクトルに対する $\beta$ 末端基の数の影響。メタノール中の $\beta$ -カロテン(緑)， $\gamma$ -カロテン(赤)，リコペン(青)の吸収スペクトル。

素タンパク複合体に結合すると、カロテノイドの吸収スペクトルは長波長にシフトすることが多い。

同じ共役二重結合系をもつカロテノイドは同一溶媒中ではほぼ同じ分子吸光係数である。一方、同一カロテノイドでも溶媒により吸収極大波長ばかりでなく分子吸光係数も異なることが知られている。これらは Davies & Köst<sup>8)</sup>、Britton<sup>9)</sup> にまとめられているが、多数の論文のデータをまとめたため、測定精度の違いなどのため一部の値に差異が見られる。その中から代表的なカロテノイドの分子吸光係数を表2にまとめた。一般に粗抽出液の

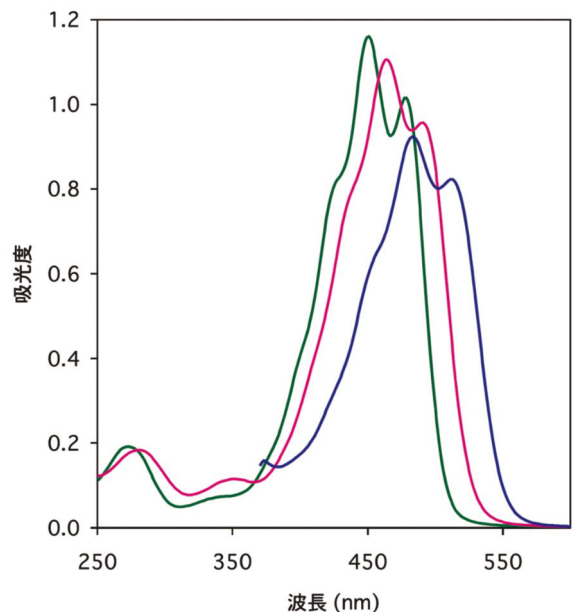


図4：種々の有機溶媒中での $\beta$ -カロテンの吸収スペクトル。濃度は同一：*n*-ヘキサン(緑)，クロロホルム(赤)，二硫化炭素(青)。

ようなカロテノイド混合物あるいは未知カロテノイドを定量するときは、吸収極大波長において  $E^{1\%} = 2500$  あるいは  $\epsilon = 140 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を使用する。試料の吸光度が1であると、約  $4 \mu\text{g/ml}$  あるいは約  $7 \mu\text{M}$  に相当する。また HPLC を用いて簡便的に各カロテノイドを定量するときは、HPLC 各ピークの吸収極大波長における分子吸光係数が同一と仮定し、そこから求めた量を比較することもできる。

#### 5.d.5 分離精製<sup>2-4)</sup>

分離精製はいくつかの方法を組み合わせで行う。抽出物を有機溶媒と水へ分配することや、乾固後、有機溶媒で再抽出することにより一部の夾雑物を除去できる。次に各種クロマトグラフィーの組合せで分離精製をする。このとき順相系(シリカゲルなど)と逆相系( $C_{18}$ など)の吸着剤の両方を用いた方がよい。HPLC あるいは薄層クロマトグラフィー(TLC)からの分取、カラムクロマトグラフィーによる分離を行う。DEAE-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィーを使用すると、カロテノイドはヘキサン/アセトン混液で溶出し、カロテノイド配糖体はアセトン濃度を上げると溶出し、(バクテリオ)クロロフィルはアセトン/メタノール混液で溶出する。(バクテリオ)クロロフィルや極性脂質の除去に有効である<sup>10)</sup>。粗抽出液中のカロテノイドは脂質など夾雑物の影響で、精製されたカロテノイドとクロマトグラ

表2：種々のカロテノイドの種々の有機溶媒中での分子吸光係数の例<sup>2)</sup>。

カロテノイド	溶媒	$\lambda$	$\epsilon$	溶媒	$\lambda$	$\epsilon$	溶媒	$\lambda$	$\epsilon$
フィトエン	H	286	50						
$\xi$ -カロテン	H	400	138						
ニューロスポレン	P	438	147						
ビオラキサンチン	Et	441	150	B	454	134			
スフェロイデン				B	465	157			
リコペン	P	472	185	B	487	181			
アンヒドロロドビプリン	P	482	153						
スピロロキサンチン	H	493	152	B	510	147			
$\gamma$ -カロテン	H	462	148						
$\alpha$ -カロテン	H	446	146	C	456	130	CS <sub>2</sub>	477	117
ルテイン	Et	445	145	B	458	127	CS <sub>2</sub>	475	123
$\beta$ -カロテン	H	451	135	C	465	129	CS <sub>2</sub>	484	108
ゼアキサンチン	Et	450	145						
フコキサンチン	H	449	105				CS <sub>2</sub>	478	134
ペリジニン	Et	472	84	C	470	81			

$\lambda$ ：吸収極大波長(nm),  $\epsilon$ ：分子吸光係数(mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), B：ベンゼン, C：クロロホルム, CS<sub>2</sub>：二硫化炭素, Et：エタノール, H：ヘキサン, P：石油エーテル。

フィーでの挙動が異なることがある。また一般にカロテノイドは精製が進むほど不安定になり、異性化や分解などがおこりやすくなるので注意を要する。

### 5.d.6 同定<sup>2)</sup>

一般的にカロテノイドを同定するには、①既知カロテノイドとの HPLC 溶出時間あるいは TLC 移動度の一致、②吸収スペクトルの一致、③質量数の決定、の3点が最低限必要である。カロテノイドによってはこれだけで同定できる場合と、不可能な場合がある。ただし近縁生物の持つカロテノイドとの比較、生合成経路なども考慮すると可能性が絞られてくることもある。

新規カロテノイドあるいは既知カロテノイドの化学構造を正確に決定するには次のデータを必要とする。①吸収スペクトルから共役二重結合系の構造を決定する。②クロマトグラフィーでの挙動から極性基を推定する。③質量分析で分子イオンから質量数を決定する。④質量分析のフラグメンテーションパターン、極性基の化学的な検出などから極性基の種類と数を決定する。⑤<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR を測定する。⑥必要ならば CD スペクトルから立体構造を決定する。

#### 5.d.6.1 質量分析<sup>2,11)</sup>

質量分析では分子イオンから質量数を決定でき、さらにフラグメントイオンの解析により分子構造を推定できる。近年発達した FAB 法, FD 法などソフトなイオン化法を用いると分子イオンを得やすい。さらに HPLC とオンラインで接続した LC/MS として用いられるイオン化法もある。主に質量数決定に用いられる。また磁場型

装置を用いて高分解能質量を測定すると、カロテノイドの正確な分子式(分子を構成する炭素, 水素, 酸素の各々の数)を決定できるので、新規化合物の同定には高分解能質量分析は欠かせない。

#### 5.d.6.2 核磁気共鳴<sup>2,12)</sup>

核磁気共鳴 (NMR) は <sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C の化学シフトを測定することにより、有機物の化学構造について最も多くの構造情報を与える測定法であり、カロテノイドの化学構造決定には必須の測定である。最近は測定のソフトなどの改良により、<sup>1</sup>H-NMR や <sup>13</sup>C-NMR 一次元測定のみならず各種の二次元 NMR スペクトルも容易に測定できるようになった。また天然存在比 1.1% の <sup>13</sup>C も濃縮せずに測定できる。通常は重クロロホルムに溶かす。試料が微量な時は残存溶媒や水分に由来するシグナルの影響を受けやすいので、前もって十分に乾燥させる必要がある。脂質は紫外吸収を持たないので、精製したときに夾雑物として残りやすいので脂肪酸のシグナルには注意が必要である。

カロテノイドは中央の共役二重結合が長いので、左右非対称構造のカロテノイドの場合、例えばルテイン (図 1 参照)、左半分の構造に由来する NMR スペクトルと右半分に由来する NMR スペクトルは、お互いに影響せず両者を足しあわせたスペクトルになる。Englert は多数の半分の構造の NMR データをまとめた<sup>12)</sup>。このデータと測定データを比較して同定することができる。

#### 5.d.6.3 円偏光二色性<sup>2,13)</sup>

不斉炭素をもち立体異性の存在する有機物は左右の円偏光に対するモル吸収係数が異なり、これを円偏光二色性 (CD) という。カロテノイドは不斉炭素を末端原子団

にもつと紫外領域 (200-400 nm) の CD は相当な強度を示すので、不斉炭素の立体構造を決めることができる。一方、可視領域 (350-550 nm) では一部のカロテノイドを除いて CD は強度が非常に弱い。一般に溶媒としてジエチルエーテル/イソペンタン/エタノール (5:5:2) を用いる。

### 5.d.7 分析例

緑葉, シアノバクテリア, 紅色細菌の色素を C<sub>18</sub>-HPLC で分析した例を示す<sup>2)</sup>。

緑葉から色素を抽出するときは、液胞にある有機酸などによるカロテノイドのエポキシ基の構造変化を防ぐため、1 M Tris-HCl (pH 8.0) 1/10 容を加えて酸性化を防ぐと良い。乳鉢にアセトンあるいはアセトン/メタノール (7:2) を加えて葉を破碎し、色素を 2-3 回抽出する。葉緑体の場合は有機溶媒を加えただけでも抽出できる。ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を除く。残った水分はエタノールを加えると蒸発させやすい。ホウレンソウ粗抽出色素の C<sub>18</sub>-HPLC 溶出を図 5 に示した。一般にルテインとゼアキササンチンは構造式が似ているために分離しにくい。キサントフィルサイクルのカロテノイドを研究するのでないときは、1 時間くらい暗所に放置して、ゼアキササンチンとアンセラキササンチンがビ

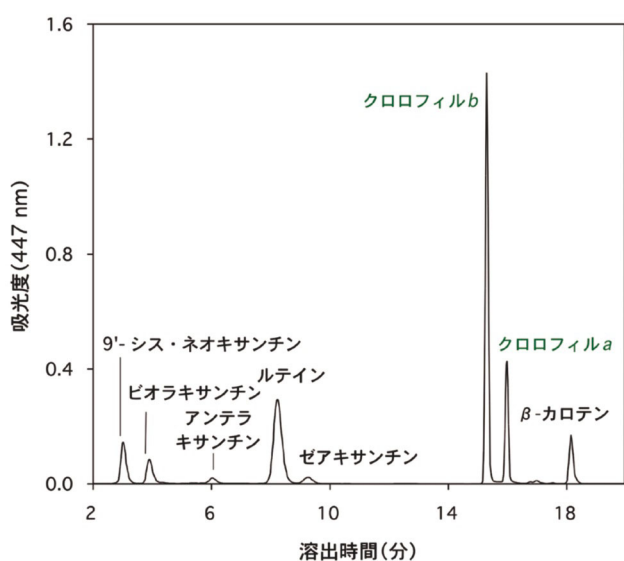


図 5: 緑色植物の色素の C<sub>18</sub>-HPLC 分析例。ホウレンソウ葉の粗抽出色素; 光照射によりキサントフィルサイクルのアンセラキササンチン, ゼアキササンチンが増加する条件に置き, 抽出した。カラム: ノバパック C<sub>18</sub> (RCM タイプ, ウォーターズ), 溶出溶媒: 0-8 分; 1.75% メタノール, 1.75% ジクロロメタン, 1.75% 水, 94.75% アセトニトリル; 8-20 分; 50% アセトニトリル, 50% 酢酸エチル (2.0 ml/分)。

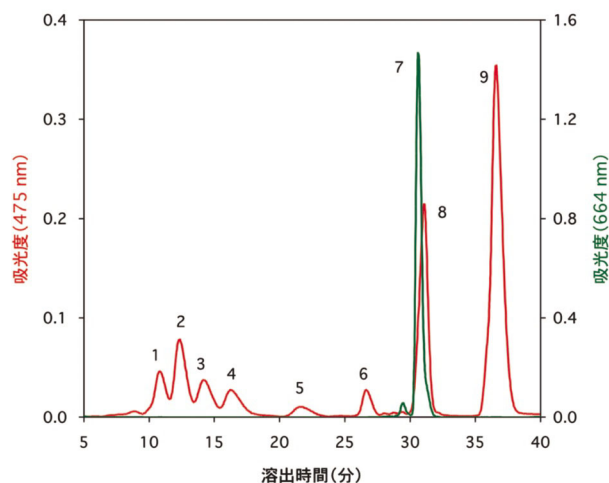


図 6: シアノバクテリアの色素の C<sub>18</sub>-HPLC 分析例。ノストック・コミュニー M-13 の粗抽出色素。カラム:  $\mu$  ボンダパック C<sub>18</sub> (RCM タイプ, ウォーターズ), 溶出溶媒: 0-20 分; 90% メタノール; 20-40 分; 100% メタノール (2.0 ml/分)。1: 2-ヒドロキシ・ミクソール 2'-フコシド, 2: ノストキササンチン, 3: ミクソール 2'-フコシド, 4: カロキササンチン, 5: ゼアキササンチン, 6: カンタキササンチン, 7: クロロフィル a, 8: エキネノン, 9:  $\beta$ -カロテン。

オラキササンチンに戻ってから抽出した方がよい。葉緑体の色素は既に知られているので、溶出順と吸収スペクトルから同定できる。

シアノバクテリア<sup>10)</sup> や紅色光合成細菌の沈澱菌体にアセトン/メタノール (7:2) を約 5 倍容加え, 超音波破碎し, 遠心分離して色素抽出液を得る。沈澱からもう 1-2 回同様に抽出する。ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒及び水分を除く。粗抽出色素の C<sub>18</sub>-HPLC 溶出パターンを図 6, 7 に示した。

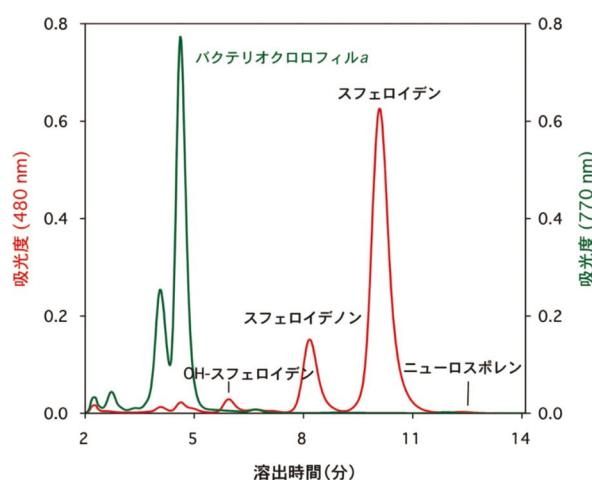


図 7: 光合成細菌の色素の C<sub>18</sub>-HPLC 分析例。紅色光合成細菌ロドバクター・スフェロイデスの粗抽出色素。カラム:  $\mu$  ボンダパック C<sub>18</sub> (RCM タイプ, ウォーターズ), 溶出溶媒: メタノール (1.8 ml/分)。

カロテノイドの蛍光，ラマン，カロテノイドシフトなど物理化学的性質は各章を参照して欲しい。カロテノイド生合成経路の解析には二つの方法がある。生合成経路の後の方の遺伝子・酵素，例えば $\beta$ -カロテン・ケトラーゼ (CrtO, CrtW)，の性質は遺伝子破壊株を作成して蓄積するカロテノイドと合成できないカロテノイドを分析する<sup>14)</sup>。生合成経路の始めの方の遺伝子・酵素，例えば $\beta$ -カロテン・ヒドロキシラーゼ (CrtR)，は大腸菌 (カロテノイドを合成できない) に基質を合成する遺伝子を導入し，さらに調べたい遺伝子を導入して，遺伝子発現により生産されたカロテノイドを分析する<sup>15)</sup>。

## 参考文献

- 1) G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, (ed.), Carotenoids, Handbook, Birkhäuser, Basel, 2004.
  - 2) 高市真一編, 「カロテノイド: その多様性と生理活性」, 裳華房, 2006.
  - 3) L. Packer, (ed.), Methods in Enzymology, vol. 213: Carotenoids, Part A: Chemistry, Separation, Quantitation, and Antioxidation, Academic Press, San Diego, 1992.
  - 4) G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, (ed.), Carotenoids, vol. 1A: Isolation and Analysis, Birkhäuser, Basel, 1995.
  - 5) 日本光合成研究会編, 「光合成事典」, 学会出版センター, 2003.
  - 6) 生理活性脂質データベース <http://lipidbank.jp/>
  - 7) S. Takaichi, Photosynth. Res. **65** (2000) p.93.
  - 8) B. H. Cavies, H.-P. Köst, CRC Handbook of Chromatography: Plant Pigments, vol. I, Fat-Soluble Pigments, ed. H.-P. Köst, CRC Press, Boca Raton, 1988.
  - 9) G. Britton, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkhäuser, Basel, 1995, p.13.
  - 10) S. Takaichi, M. Mochimaru, T. Maoka, Plant Cell Physiol. **47** (2006) p.211.
  - 11) C. R. Enzell, S. Back, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkhäuser, Basel, 1995, p.261.
  - 12) G. Englert, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkhäuser, Basel, 1995, p.147.
  - 13) R. Buchecker, K. Noack, Carotenoids, vol. 1B: Spectroscopy, ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Birkhäuser, Basel, 1995, p.63.
  - 14) M. Mochimaru, H. Masukawa, S. Takaichi, FEBS Lett. **579** (2005) p.6111.
  - 15) T. Makino, H. Harada, H. Ikenaga, S. Matsuda, S. Takaichi, K. Shindo, G. Sandmann, N. Misawa, Plant Cell Physiol. **49** (2008) p.1867.
- 注) Carotenoids, Vol. 1A, 1B は絶版であるが, Caro Nature から入手できる。