



Title	クロロフィルおよびクロロフィル代謝経路中間体の抽出・定量法
Author(s)	田中, 亮一
Description	3章 単離・精製・活性測定 5. 色素の分析 a
Relation	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
Citation	低温科学, 67, 315-325
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39162
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-047.pdf



5. 色素の分析

a. クロロフィルおよびクロロフィル代謝経路中間体の抽出・定量法

田中 亮一¹⁾

植物および藻類からのクロロフィルとその代謝中間体の抽出・定量法について解説する。特に、有機溶媒による色素の抽出方法と吸光光度計および HPLC を用いてこれらの色素を定量する方法について、具体的な手順と注意点を詳述する。

Analysis of chlorophyll and its metabolic intermediates

Ryouichi Tanaka

Methods for the analysis of chlorophyll and its metabolic intermediates are presented. In particular, the HPLC method developed by Zapata et al. [Marine Ecology-Progress Series 195 (2000) p.29] and its application to the analysis of various intermediate molecules of chlorophyll metabolism are described in detail.

5.a.1 はじめに

クロロフィルは、図 1 に示したクロリン環をもつテトラピロール化合物である。chlorophyll *a*, *b*, *c*, *d* などの種類が知られている（図 1 参照：例外的に chlorophyll *c1*, *c2*, *c3* はクロリン環の代わりにポルフィリン環を持つ）。陸上植物は、このうち、chlorophyll *a* および chlorophyll *b* を合成する。我々にとって最もなじみ深く、研究対象となる頻度が高いのがこの 2 つの色素であろう。

従って、本稿では、まず、chlorophyll *a* および chlorophyll *b* の抽出・定量法を解説する（2 章）。初めて光合成色素を扱う読者を想定して、できるかぎり、詳細な手順を記述した。

3 章では、さまざまな代謝中間体の定量法について述べた。4 章では、HPLC を用いて、chlorophyll *a*, *b* だけでなく、その他のクロロフィルとその代謝中間体を定量する方法について述べている。4 章でも、2 章と同様に、色素の抽出についての注意事項を記載しているが、

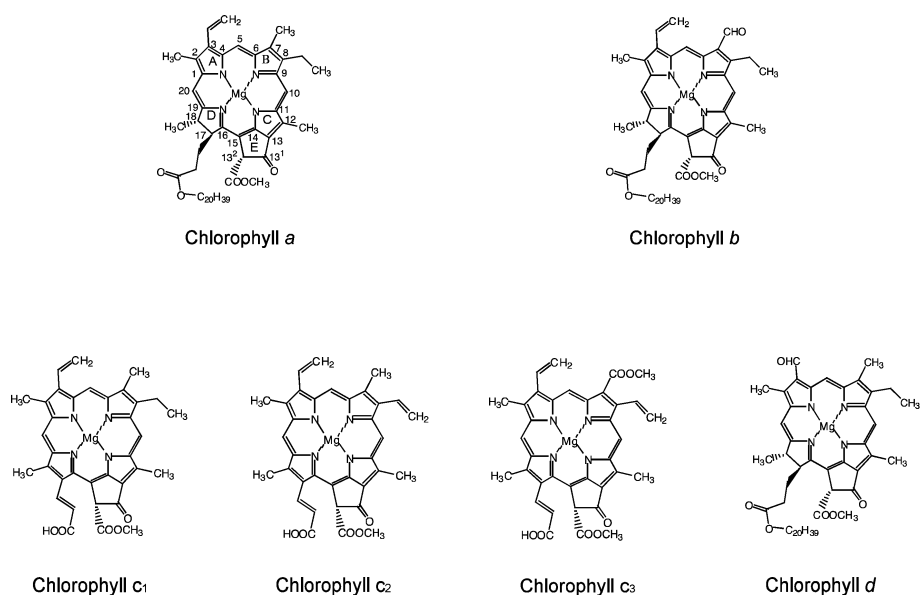


図 1：クロロフィル類の構造

Chlorophyll *a* の構造式上に、IUPAC の命名法に基づいた炭素原子の位置番号とピロール環の名前を示した。

1) 北海道大学・低温科学研究所

4章では、HPLCでの色素の分離を想定した色素の抽出方法を述べており、いくつか記載の異なる箇所があるので注意していただきたい。基本的に、ほとんどのクロロフィルとその代謝中間体の定量の際には、まず、HPLCによる色素の分離が必要になる。続いて、クロロフィル類は吸光度計で、主要な代謝中間体は蛍光光度計を用いて定量する。筆者らの研究室では、Zapata ら¹⁾の開発した方法を一部改変して用いている。本稿では、主に被子植物のクロロフィルと代謝中間体の分離と定量を例にとって解説するが、基本的に、これ以外の生物のクロロフィルも同様の方法で分離、定量することが可能である。

5.a.2 chlorophyll *a* および chlorophyll *b* の抽出と定量

5.a.2.1 chlorophyll *a* および chlorophyll *b* の抽出

陸上植物からの chlorophyll *a* および chlorophyll *b* の抽出には、acetone を用いる。Methanol, *N,N'*-dimethylformamide などを用いることも可能²⁾である。methanol は、クロロフィル類を化学修飾しやすい、また、抽出液中での光合成色素の消失を招きやすいとされているが³⁾、methanol を用いた抽出方法もいくつか報告されている^{2,4)}。Porra らは、20% (v/v) の 2.5 mM リン酸バッファー (pH 7.8) を加えた 80% acetone で色素を抽出する方法も紹介している。²⁾

被子植物の葉の場合、まず、乳鉢に葉と適量の acetone^{※1}を加えて、すりつぶす。葉がやわらかく、量が少ない場合は、乳鉢の代わりにガラス製のホモジナイザーなども便利である (図 2 A)。また、試料の数が多い場合は、ShakeMaster (バイオメディカルサイエンス) などの多検体用破砕機を使うことができる (図 2 B)。ShakeMaster を使用する場合、試料をステンレスビーズ、acetone とともに 2 ml の丸底のマикроチューブに入れ、さらに付属のアルミ製容器 (図 2 C) に入れて、1 分ほど震盪する。

^{※1} Chlorophyll *a* の 80% acetone 中におけるモル吸光係数 (663.6 nm: $L \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) は 76.8 である 2) R. Porra, W. Thompson and P. Kriedemann. *Biochim Biophys Acta* **975** (1989) p.384. ある生物の 1 g あたりのクロロフィル量を大雑把に 1 μmol と見積もれば、試料 10 mg から 1 ml の 80% acetone で chlorophyll *a* を抽出すると、663.6 nm の吸光度は、 $0.01 \mu\text{mol} \times 76.8 = 0.768$ となる計算である。つまり、大体 1 mg から 10 mg 程度の試料から 1 ml の 80% acetone でクロロフィルを抽出すれば、吸光度は 0.08~0.80 程度におさまる、ということになる。文献等から、試料中のクロロフィル量が予測し、抽出に用いる溶媒の量を決めるとよい。

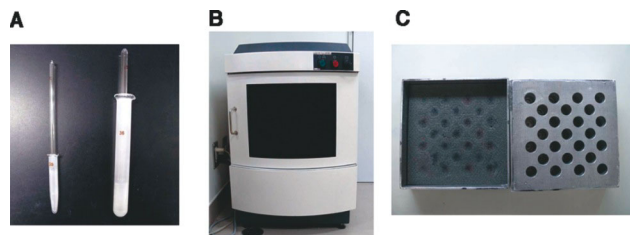


図 2: ガラス製ホモジナイザーと多検体用破砕機

1. ガラス製ホモジナイザー, 2. 多検体用破砕機 ShakeMaster, 3. ShakeMaster 付属のアルミ製容器 (破砕中にチューブのふたが開かないように、筆者は固めのスポンジをふたの裏に貼付けている。)

上記の方法で、組織が十分につぶし、攪拌した後、懸濁液を植物組織ごと遠心チューブに移す。約 10,000 x g で 5 分程度遠心し、上清を別なチューブに移す。再度、acetone を組織に加え、組織から完全に緑色が抜けるまで、攪拌と遠心を繰り返す。上清を一本のチューブに集め、上清の量を量しておく。なお、クロロフィル類は光、高温、酸素に弱い。極力、光を避けるにこしたことはない。しかし、よほど正確な定量が必要な場合、また、微量な試料を扱っている場合を除いて、通常の実験室の照明下で抽出操作を行っても構わない。ほとんどの場合、急激にクロロフィルが分解することはない。

5.a.2.2 吸光度計による chlorophyll *a* および chlorophyll *b* の定量

上述の抽出液に、最終的にアセトン濃度が 80% になるように水または 2.5 mM リン酸バッファー (pH 7.8) を加える。植物の生葉は、およそ 90% 程度の水分を含んでいるので、大量の試料を用いた場合は、試料からの持ち込みの水分も計算に入れるとより正確である。

吸光度計で測定する際には、スクリーキャップ付きの石英またはガラスのキュベットを使うとよい。測定中の有機溶媒の蒸発を防ぐことができる。

chlorophyll *a* および chlorophyll *b* のモル吸光係数は、いくつかの研究室から報告されているが^{2,5,6)}、この中で、原子吸光法により、クロロフィルの定量をおこない、モル吸光係数を求めた Porra らの係数²⁾が最も信頼性が高いと言われている。663.6 nm (chlorophyll *a* の吸収極大波長) および 646.6 nm (chlorophyll *b* の吸収極大波長) を測定し、以下の式によって、80% アセトン中における chlorophyll *a* (式 1)、および chlorophyll *b* (式 2) の濃度を求める。このとき、750 nm における吸光度をバックグラウンドとして、663.6 nm および 646.6 nm から差し引いておく。

$$\text{Chlorophyll a}(\mu\text{g/ml})=12.25\times A^{663.6}-2.85\times A^{646.6} \quad (\text{式 1})$$

$$\text{Chlorophyll b}(\mu\text{g/ml})=20.31\times A^{646.6}-4.91\times A^{663.6} \quad (\text{式 2})$$

chlorophyll *a* と chlorophyll *b* の分子量はそれぞれ 893.48 と 907.46 であるので、モル濃度が必要な場合は、この数値を用いて換算する。

5.a.3 クロロフィル代謝中間体の種類と性質

クロロフィル代謝は、厳密に考えると、代謝経路がヘムと分岐する Mg-protoporphyrin IX から始まると言えるが(図 3)、実際の研究でクロロフィル代謝を扱う際は、グルタミン酸から始まるテトラピロール化合物に共通の代謝経路まで含めて調べることが多い。そこで、本稿では、クロロフィルとヘムの共通の代謝経路(図 3 参照: グルタミン酸から protoporphyrin IX まで)も含めて解説する。

この章では、まず、クロロフィル(ヘム)代謝経路を概観し、代謝中間体の特徴について解説する。また、本稿では詳しく紹介していない代謝中間体の定量法について、随時、引用文献を挙げた。

グルタミン酸から 5-アミノレブリン酸(ALA) テトラピロール合成経路の出発物質はグルタミン酸またはグルタミル-tRNA である。(一部の光合成生物には例外もある⁷⁾。)図 3 を見れば明らかなように、ALA までの中間体は、ピロール構造を持たないので、これ以降の物質とは検出方法が異なる。ALA を検出するためには、ethylacetoacetate と ALA を反応させてピロール環を形成させた後、Ehrlich 試薬を用いて検出する^{8,9,10)}。Ehrlich 試薬にはもともと水銀が含まれているが、水銀を除いても使用可能である⁹⁾。

通常は、多くの生物の細胞内においては、ALA の蓄積量はごくわずかである。これは、ALA がすぐに代謝されて、テトラピロール化合物に変換してしまうからだと思われる。細胞にレブリン酸を与えると、ALA の代謝が阻害され、ALA が蓄積する。多くの研究では、レブリン酸を処理した後に蓄積する ALA の量を ALA の合成活性と見なしている。植物の葉においては、このように測定された ALA の合成活性は、クロロフィルの合成活性とよく相関している。シロイヌナズナの場合、レブリン酸を処理する時間が 90 分を超えると、ALA の分解が起こる可能性があるので、レブリン酸の処理は 90 分以内にとどめておいた方がよい。30 分、60 分、90 分というように、いくつかの処理時間を試し、処理時間と ALA 蓄積量が

比例している範囲で、ALA 合成活性を測定する必要がある。

Chlorella においては、レブリン酸処理によって ALA が細胞外に排出されるとの報告がある¹¹⁾。藻類において、ALA 合成活性を測定する際には注意が必要であろう。

ALA の前駆体である glutamate-1-semialdehyde は不安定な中間体であり、生物試料から抽出して、定量したという報告はない。また、glutamyl-tRNA から glutamate-1-semialdehyde を合成する glutamyl-tRNA reductase と glutamate-1-semialdehyde から ALA を合成する glutamate-1-semialdehyde aminomutase は複合体を作っていると考えられており、中間体である、glutamate-1-semialdehyde が細胞内に蓄積しているとは考えにくい。

tRNA^{Glu} の定量は northern blotting によって行う¹²⁾。tRNA^{Glu} はタンパク質合成の基質でもあり、tRNA^{Glu} の増減はテトラピロール合成だけでなく、葉緑体内のタンパク質合成にも影響を与えると予想される。従って、生物が tRNA^{Glu} の増減でテトラピロールの量を調節しているとは考えにくい。(ヘムとクロロフィルを含めた)テトラピロール合成の調節は glutamyl-tRNA から glutamate-1-semialdehyde を経て ALA を合成する段階で調節されていると考えられる。

Porphobilinogen ALA 2 分子が縮合するとピロール環をもつ porphobilinogen (PBG) が生成される。PBG の定量は、原理的に ALA の定量法と同様に Ehrlich 試薬を用いればよい。Mock らは、PBG を 95°C で熱することによって、uroporphyrin I に変換し、HPLC によって定量する方法を紹介している¹³⁾。(注: uroporphyrin I は uroporphyrinogen I が酸化されたもので、uroporphyrinogen I は uroporphyrinogen III の D ring が逆向きに付加されたテトラピロール分子である。)PBG のモル吸光係数は、Mauzeall と Granick によると 2N の perchloric acid を含む Ehrlich 試薬中で、61 mM⁻¹cm⁻¹ (555 nm) である¹⁴⁾。

Hydroxymethylbillane この分子も不安定であり、自動的に閉環して uroporphyrinogen I を生成する。uroporphyrinogen III synthase が存在すると D 環が反転して、テトラピロールを形成し、uroporphyrinogen III となる。hydroxymethylbillane は細胞内ではほとんど蓄積していないと考えられる。

Uroporphyrinogen III から Protoporphyrin IX これらの化合物は全てテトラピロール化合物である。uroporphyrinogen III, coproporphyrinogen III, protoporphyrinogen IX の 3 つの化合物では、4 つの methene bridge

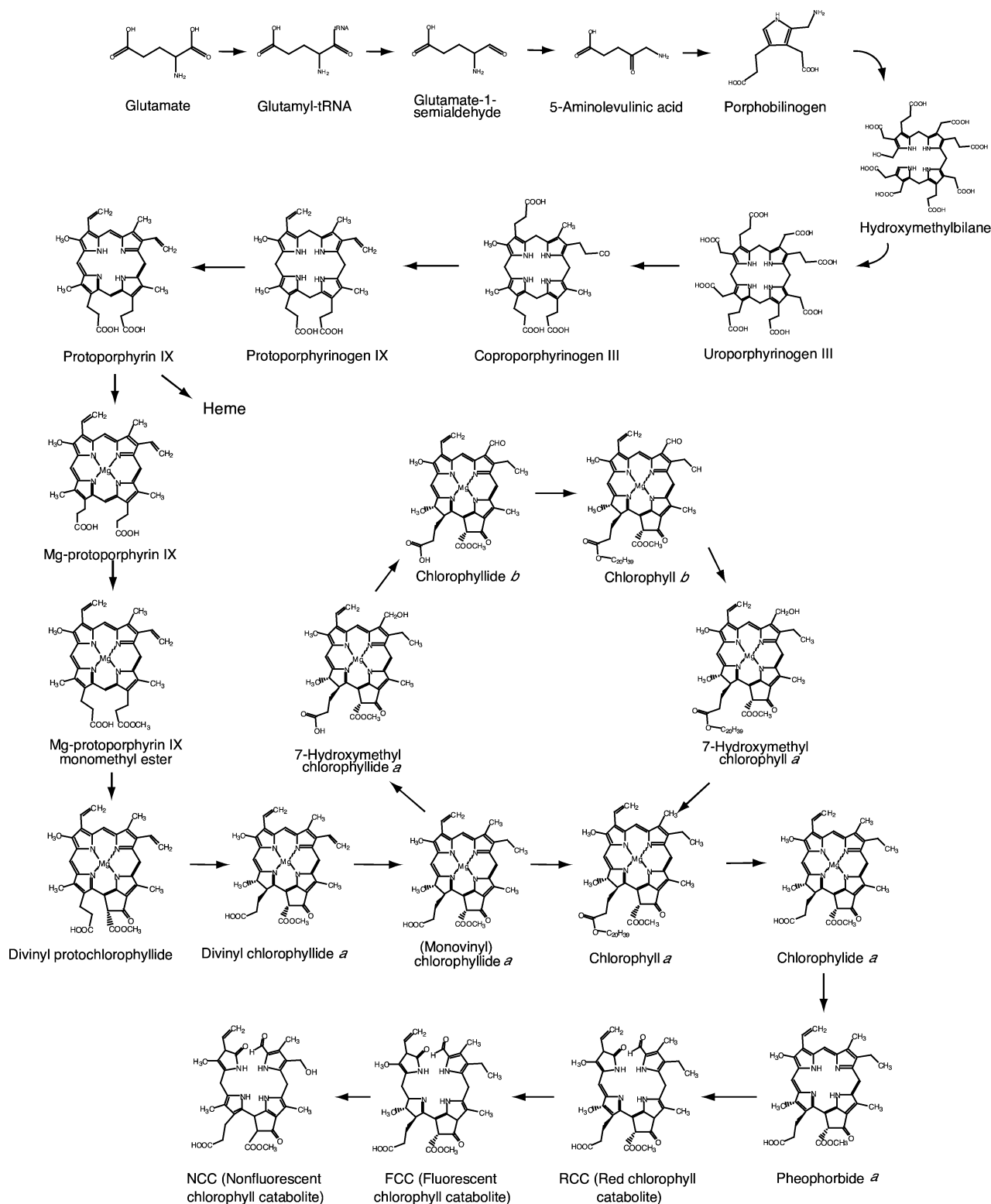


図3：被子植物のクロロフィル代謝経路

が還元されているが, protoporphyrin IX は酸化されている。前者の3つの化合物は, テトラピロール環が共役していないので無色であるが, 後者はテトラピロール環が共役しており, 赤色で, 蛍光を発する。(後述する Zapata らの HPLC の分離システムの A 溶媒中において, 励起極大波長が 400 nm, 蛍光極大波長が 634 nm である。) uroporphyrinogen III, coproporphyrinogen III, protoporphyrinogen IX の3つは, 抽出中に自動的に酸化してしまっており, uroporphyrin III, coproporphyrin III, protoporphyrin IX になる。HPLC を用いて定量する場合は, 酸化した化合物を蛍光検出器を用いて定量する。uroporphyrin III, coproporphyrin III の場合は, 細胞内では uroporphyrinogen III, coproporphyrinogen III であったと仮定してよいが, protoporphyrin IX の場合は, それが, 生体内で protoporphyrinogen IX であったのか, protoporphyrin IX であったのか, 判別することは難しい。抽出液中の uroporphyrinogen III, coproporphyrinogen III, protoporphyrinogen IX を完全に酸化させるために, 2-butanone peroxide などの酸化剤を抽出液に加えることもある¹⁵⁾。

Protoporphyrin IX は, 後述する Zapata らの方法¹⁾で定量が可能であり, また, uroporphyrin III, coproporphyrin III の定量も可能であると思われるが, uroporphyrin III, coproporphyrin III の定量に関しては, 筆者らの研究室では, まだ確認していない。そこで, 本稿では, この2つの化合物の定量に関して, Bernhard Grimm (ドイツ, Humboldt 大学) の研究室で行われている方法¹⁵⁾を紹介する。

色素の抽出: 100 mg の葉を 200 μ l の 50 mM のリン酸カリウムバッファー (pH 7.8) 中で破碎し, 遠心し, 上清を別なチューブに移す。続いて, 沈殿を 200 μ l の methanol/0.1 M ammonium hydroxide (9:1 v/v) に懸濁し, 遠心し, 上清をチューブに集める。再び, 沈殿を 200 μ l の acetone/methanol/0.1 M ammonium hydroxide (10:9:1, v/v/v) に懸濁し, 遠心を繰り返す。最終的に上清を一本のチューブに集める。抽出液に, acetic acid と 2-butanone peroxide を最終濃度がそれぞれ 25 mM と 2.5% になるように加え, ポルフィリン化合物を酸化させる。

HPLC による分離: Novapak C18, 4 μ m particle size, 3.9 x 150 mm (Waters) を用いる。A 溶媒 (methanol/0.1 M ammonium acetate pH 5.2/水=1:1:8, v/v/v) と B 溶媒 (methanol/0.1 M ammonium acetate pH 5.2=9:1, v/v/v) のグラジエントで分離する。流速は 1 ml/min で, 最初の 12 分間に A 溶媒 100%, B 溶媒

0% から A 溶媒 0%, B 溶媒 100% のグラジエントをかけ, 続く 13 分間は, B 溶媒 100% ですべての色素を溶出する。蛍光検出器が必須で, 励起波長は 405 nm, 蛍光波長は 615 nm にあわせる。標準物質を入手し (例えば, Frontier Scientific Inc. などから入手できる。http://www.frontiersci.com/), 検量線を作成した上で定量する必要がある。

Mg-Proto IX, Mg-Proto IX monomethylester これらの化合物は, Mg²⁺ が配位しており, 強い蛍光を発する。クロロフィルとは異なって, phytol などの側鎖がないので, 比較的親水性で, 20% 程度の水を含む acetone や diethylether などによく溶ける。筆者の研究室では Zapata らの系を用いて分離, 定量している (4 章参照)。

Protochlorophyllide 被子植物の場合, Protochlorophyllide は暗所におけるクロロフィル合成経路の最終産物である。Protochlorophyllide には, 3, 8-divinyl-(DV)-protochlorophyllide, 3-vinyl-(MV)-protochlorophyllide の2つの化合物が存在する。前者は8位に vinyl 基が付加しているが, 後者ではこれが還元されて ethyl 基になっている。DV-protochlorophyllide と MV-protochlorophyllide は吸収極大波長が若干異なっており, diethylether 中での Soret 帯の吸収極大波長はそれぞれ, 432 nm と 437 nm である¹⁶⁾。DV-protochlorophyllide から MV-protochlorophyllide への還元反応を触媒するのは, 8-vinyl chlorophyllide reductase である^{17,18)} が, この酵素は, protochlorophyllide に対する活性が低いので, 8-vinyl 基の還元にかかる。その結果, 双子葉植物では, 主に DV-protochlorophyllide が蓄積する¹⁹⁾¹⁶⁾ が, 暗所で生育させる期間が長いほど, MV-protochlorophyllide の割合が高くなる¹⁶⁾ という現象が観察される。単子葉植物の子葉では, MV-protochlorophyllide の蓄積が主に観察される¹⁶⁾。単子葉植物の 8-vinyl chlorophyllide reductase は, 比較的 DV-protochlorophyllide に対する活性が高いと考えられる。

Protochlorophyllide の抽出において, 最も大切な点は, 組織が完全に破碎され, acetone に懸濁されるまで, 可視光にあてない, という点である。protochlorophyllide が光を吸収すると, そのエネルギーを使って, 暗所で protochlorophyllide に結合している protochlorophyllide oxidoreductase (POR) が瞬時に protochlorophyllide を還元して, chlorophyllide を生成してしまう。この反応は 77 K でも起こりうる。したがって, 完全な暗所で組織の破碎を行うべきであるが, 難しければ, 緑色の蛍

光灯に緑色のセロファンをまいた「安全灯」のもとで暗室内で色素の抽出を行う。このとき、光の強度は、目が慣れてやっとものが見える程度の明るさまで落とす必要がある。あるいは、赤外光の照射下で赤外線カメラを使用して抽出を行う、という方法もある。protochlorophyllide の定量にはいくつかの方法が報告されているが^{20,21,22)}、本稿では、4章で HPLC を用いる方法を述べる。

Chlorophyllide 上述の通り、protochlorophyllide が還元されると chlorophyllide になる。chlorophyllide は、phytol が結合していないので、比較的親水性である。in vivo では、DV 型の chlorophyllide は生成されるとすぐに MV 型に還元されてしまうので、通常は DV 型の chlorophyllide が観察されることはない。また、MV-chlorophyllide もすぐに phytol と結合して、chlorophyll になるようである。したがって、少なくとも被子植物の場合、観察される chlorophyllide は、多くの場合、chlorophyll の合成経路の中間体というよりは、むしろ、chlorophyll が chlorophyllase のはたらきによって分解された産物であると思われる。また、シロイヌナズナの葉を材料とした場合、微量の chlorophyllide a は頻繁に検出されるが、chlorophyllide b はまれにしか検出されない。筆者の経験では、chlorophyllide b が検出されるのは、抽出液に含まれている chlorophyllase によって、抽出の際に生成された artifact であることが多い。このような場合には、クロロフィルを抽出するときに acetone の量を増やすことによって、chlorophyllase の活性を抑えることができる場合がある。

Chlorophyll chlorophyll a または b のみを測定する場合には、第2章に記載の方法を用いるのが最も簡便である。これ以外のクロロフィルを測定する場合には、第4章で述べるように、HPLC を用いる必要がある。Zapata らの原報¹⁾には、彼らの HPLC における chlorophyll c1, c2, c3 の溶出位置が報告されているので参照していただきたい。

クロロフィルの誘導体 ほとんどの酸素発生型光合成生物のもつクロロフィルの17位は ethyl 基となっているが、例外的に17位に vinyl 基を持つ DV-chlorophyll a および DV-chlorophyll b を合成するラン藻の一群が存在する²³⁾。また、これも例外的であるが、phytol 鎖の代わりに geranyl-geranyl (GG) 鎖、あるいは、GG 基の2重結合が一ヶ所、または2ヶ所還元された、dihydrogeranyl-geranyl (DHGG) 基、tetrahydrogeranyl-geranyl (THGG) 基を側鎖にもつクロロフィルも存在する。これらのクロロフィルは、キュ

ウリや大麦など被子植物の黄化芽生えが緑化する際に見つかることがある。これらの化合物は、基本的にクロロフィルとよく似た性質を持っており、大半は4章に記載した方法で分離することができる。

また、chlorophyll a から Mg イオンが抜けた pheophytin a や 13(2) 位の epimer (chlorophyll a' と呼ぶ) も光化学系に存在する。pheophytin a は4章の方法で分離することができる。chlorophyll a' の分離については、中村らの方法^{4,24)}を参照されたい。

Hydroxymethyl-chlorophyll a この化合物は chlorophyll b が chlorophyll a に変換されるときの中間体である。chlorophyll b から a への変換は、植物が環境に適応して、chlorophyll a と b の比率を調整するときや、chlorophyll b が chlorophyll a を経て分解されるときにおけると考えられている。シロイヌナズナの葉には、常に chlorophyll a の 0.1% 程度存在するようである。Scheumann らは、オオムギの葉の老化初期に hydroxymethyl-chlorophyll a の蓄積が増加すると報告している²⁵⁾。この化合物も4章の記載した方法で分離することができる。

クロロフィルの分解産物 クロロフィルの分解経路の研究は主に高等植物を材料として行われている²⁶⁾。現在のところ、chlorophyll b を直接分解する経路は知られておらず、大半の chlorophyll b は一度 chlorophyll a に変換されてから分解されると考えられている²⁷⁾。chlorophyll a は chlorophyllase の活性によって、chlorophyllide a になり、Mg²⁺ が抜けて、pheophorbide a になる、というのが、通説であるが²⁶⁾、chlorophyllase の役割については異論もある²⁸⁾。pheophorbide a は red chlorophyll catabolite (RCC), fluorescent chlorophyll catabolite (FCC), non-fluorescent chlorophyll catabolite と変換されるのが、主要な分解経路と考えられている。ダイコン (*Raphanus sativus*) など一部の植物には、pheophorbide a の13位の methoxycarbonyl 基が外れた pyropheophorbide a が生成される経路も存在する²⁹⁾。

クロロフィルの分解産物のうち、pheophorbide a までは4章に記載した方法で、分離することができる。クロロフィルは分解が進むと次第に親水性が増すので、RCCR 以降の分解産物を4章に記載した Zapata らの方法¹⁾で分離することはできない。これらの分解産物を分離するには、Hörtensteiner らの方法^{30,31)}を参照していただきたい。

5.a.4 Zapata らの方法によるクロロフィルと代謝中間体の分離と定量

この章では、Zapata らの方法¹⁾によるクロロフィルと代謝中間体の分離と定量について述べる。この方法で分離、同定できる化合物を表1に示した。クロロフィル類の他に protoporphyrin IX 以降、pheophorbide *a* までのほとんどの代謝中間体を分離することができる。いくつかの物質は、(例えば chlorophyllide *a* と Mg-

protoporphyrin IX) は溶出時間が同一であるので、定量には注意が必要である。これらの注意点に関しては、適宜、項目を設けて記載した。また、この方法では、カロチノイド類も同時に検出することができる。カロチノイド類の定量は、本稿の範囲ではないが、クロロフィルと同時にカロチノイド類の定量を行う読者のために、有用と思われる情報を付記した。カロチノイド類の定量の詳細に関しては、高市の稿を参照していただきたい。また、この章に記載した方法で測定した、一部の代謝中間体の

表1：本稿の4章で紹介した HPLC システムにおける色素の溶出時間とそれぞれの色素の吸収極大、モル吸光係数およびモル吸光係数の出典の文献

色素名	溶出時間 (分) (a)	吸収極大(b)	モル吸光係数	溶媒	文献
7-hydroxymethyl chlorophyllide	3.3	n. d.	7-hydroxymethyl Chl と同じ		
chlorophyllide <i>b</i>	4.7	n. d.	Chl <i>b</i> と同じ		
chlorophyllide <i>a</i>	9.2	430, 664	Chl <i>a</i> と同じ		
Mg-proto IX	9.2	416	165900 (417)	80% acetone	³⁶⁾
DV-Pchlide	9.9	439, 629	205000 (437) 22100 (622)	diethylether	³⁷⁾
pheophorbide <i>b</i>	10.1	n. d.	n. d.		
MV-Pchlide	10.4	436, 626	241000 (432) 31100 (623)	80% acetone	³⁸⁾
Mg-protoIX monomethylester	11.7	416	Mg-proto IX と同じと思われる		
proto IX	13.7	402	150000 (404)	diethylether	³⁹⁾
pheophorbide <i>a</i>	14.2	409, 664	44500 (667)	ethanol	⁴⁰⁾
neoxanthin	15.9	413, 437, 466			
violaxanthin	17.0	418, 440, 470			
lutein	19.8	446, 474			
Chl <i>b</i> (GG)	20.1	461, 647	Chl <i>b</i> と同じ		
Chl <i>b</i> (DHGG)	21.0	461, 647	Chl <i>b</i> と同じ		
Chl <i>b</i> (THGG)	21.9	461, 647	Chl <i>b</i> と同じ		
Chl <i>a</i> (GG)	22.0	431, 664	Chl <i>a</i> と同じ		
hydroxymethyl Chl	22.4	434, 657	61100 (655.5)	diethylether	⁴¹⁾
Chl <i>a</i> (DHGG)	22.7	431, 664	Chl <i>a</i> と同じ		
Chl <i>b</i>	22.9	461, 647	47040 (646.6)	80% acetone	²⁾
DV-Chl <i>b</i>	22.9	466, 650	43910 (643) 50530 (651)	diethylether 80% acetone	⁴²⁾
Chl <i>a</i> (THGG)	23.4	431, 664	Chl <i>a</i> と同じ		
DV-Chl <i>a</i>	24.1	441, 664	78340 (660) 69290 (664)	diethylether 80% acetone	⁴²⁾
Chl <i>a</i>	24.3	431, 664	76790 (663.6)	80% acetone	²⁾
pheophytin <i>a</i>	26.2	409, 665	50530 (665)	diethylether	⁴²⁾
β -carotene	26.8	451			

- (a) 溶出時間については、筆者の研究室における複数のクロマトグラムをもとに、実験間での溶出時間の誤差を計算によって補正して、一覧に示した。用いる HPLC システムによって、溶出時間は変わりうるので、各々の研究室ごとに標準物質を用いて、溶出時間を確認する必要がある。
- (b) この欄に示した吸収極大は、HPLC のフォトダイオードアレイ検出器のデータをもとにした、 ± 2 nm の誤差がありえる。よく似た色素であっても、溶出時間によって、溶媒組成が異なるので、吸収極大はシフトすることがある。テトラピロール化合物に関しては、Soret 帯と Qy 帯の吸収極大を示した。カロチノイド類については、S2 吸収帯の極大波長を示した。

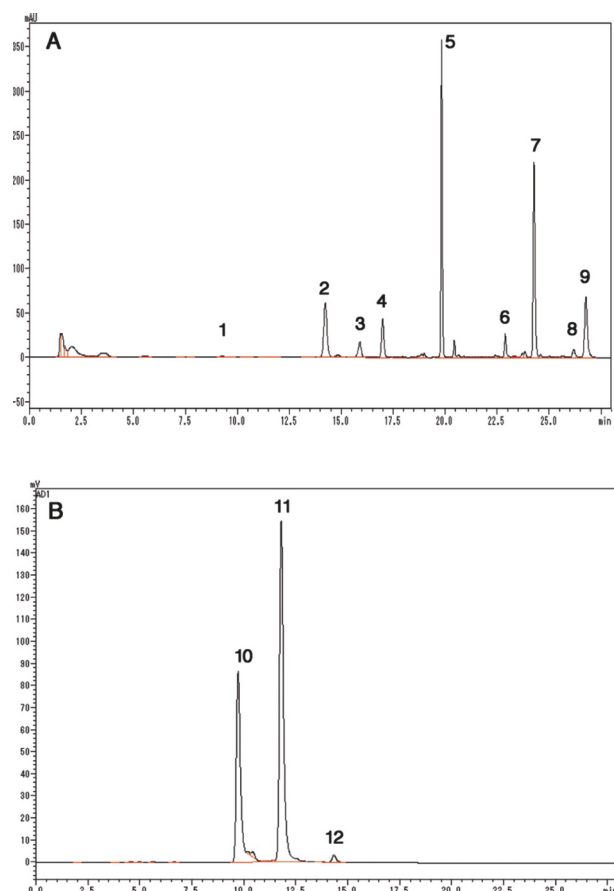


図4：Zapataらの系による光合成色素の分離
A. シロイヌナズナの葉の抽出液の分離。横軸は溶出時間(分)、縦軸は410 nmにおける吸収。：1.chlorophyllide *a*, 2. pheophorbide *a*, 3.neoxanthin, 4.violaxanthin, 5.lutein, 6.chlorophyll *b*, 7.chlorophyll *a*, 8.pheophytin *a*, 9.β-carotene B. クロロフィル代謝中間体(標準物質)の分離。蛍光検出器(Shimadzu, RF550)を用いて、励起波長417 nm, 蛍光波長600 nmで測定した。：10.Mg-protoporphyrin IX, 11.Mg-protoporphyrin IX monomethylester, 12.protoporphyrin IX

吸収スペクトルが、光合成事典³²⁾に記載されているので、参照していただきたい。

また、光合成色素の分離に関しては、van Haukelemらが、数十種類の色素をHPLCで分離する方法を報告している³³⁾。彼らの方法は、藻類の光合成色素の分離に特に有用だと思われる。

5.a.4.1 HPLCのためのクロロフィルと代謝中間体の抽出方法

筆者は、植物の葉からクロロフィルや代謝中間体を抽出するために、acetoneを用いている^{※2}。水やbufferを加

※2 クロロフィルの代謝中間体を植物から抽出するために、リン酸バッファーや90% methanolなど3種類の溶媒を順番に用いる方法が報告されているが³⁴⁾ A. Strand, T. Asami, J. Alonso, J. R. Ecker and J. Chory. Nature **421** (2003) p.79., この方

えた80% acetoneなどを用いることも出来るが、上述のように、抽出液中の水分含量が5%を超えると chlorophyllase によって chlorophyll *a* と chlorophyll *b* が phytol 鎖と chlorophyllide に分解されてしまい、正確な測定が困難になることがある。特に、ストレスを受けた葉からクロロフィルを抽出するときは注意が必要である。(2章に記述した方法で、HPLCを使わずにクロロフィルを定量する場合には、chlorophyllaseの作用を気にする必要はない。chlorophyllide と chlorophyll の吸光スペクトルは同一である。)

一方、ラン藻、プラシノ藻、珪藻などの場合は、80% acetone や acetone/methanol (50:50, v/v) などの溶媒で色素を抽出することが多い。これらの生物では、chlorophyllase の活性が見られることはなく、また、pure acetone を用いるよりも、これらの溶媒を用いる方が抽出効率が高いことがある。固い殻を持つ藻類の場合、ガラスビーズ等による破砕が必要になる場合もある。筆者の研究室では、Mini-Beadbeater (Biospec Products Inc. OK, USA) を用いる場合もある。

5.a.4.2 HPLCのシステム

筆者は、以下のHPLCシステムを使用している^{※3}。

システム1 (Hitachi 製)

ポンプ：L-7100 (低圧グラジエントシステム)

検出器1：フォトダイオードアレイ検出器 L-2450

検出器2：蛍光検出器 L-2485

オートサンプラー：L-7200

カラムオープン：L-7200

デガッサー：L-7610

システム2 (Shimadzu 製)

ポンプ：LC-10ATvp

ミキサー：FCV-1-ALvp

検出器1：フォトダイオードアレイ検出器

SPD-M10Avp

検出器2：蛍光検出器 RF-550

オートインジェクター：SIL-10ADvp

法は単に煩雑だけでなく、chlorophyllase の作用が見られることがあり、あまり薦められない³⁵⁾ N. Mochizuki, R. Tanaka, A. Tanaka, T. Masuda and A. Nagatani. Proc Natl Acad Sci U S A **105** (2008) p.15184.. Mg-Proto IX などのクロロフィル代謝の中間体の acetone への溶解度はあまり高くないので、標準品などを高濃度で扱う場合には水分含量の低い acetone は適さないが、植物試料中のクロロフィル代謝中間体の濃度は非常に低いので、acetone で十分に抽出可能である。

※3 原報1) M. Zapata, F. Rodriguez and J. L. Garrido. Marine Ecology-Progress Series **195** (2000) p.29.では、3種類のHPLCシステムを比較している。システムによっては、溶媒のグラジエントのかけ方を多少変更する必要があるようだ。

カラムオープン：CTO-10Avp
デガッサー：DGU-14A
コントローラー：SCL-10Avp

検出器

筆者はフォトダイオードアレイ検出器を用いて、400 nm-700 nm の範囲で吸光度を記録している。通常の一波长型の吸光検出器でも構わないが、2種類以上の色素がほぼ同じ時間に溶出されることがあり、一波长型の吸光検出器では見落としてしまうことがある。一波长型の検出器を用いる場合は、研究対象としている色素以外の色素の溶出位置を確認しておいた方がよい。

また、protoporphyrin IX 以降のクロロフィル代謝の中間体の検出をする場合は、蛍光検出器が必須であると考えた方がよい。吸光光度計とは違って、蛍光検出器の場合は、ランプの劣化によって、シグナルが低くなってくるので、定量を目的としている場合は、頻繁に標準物質を流す必要がある。protoporphyrin IX を検出する場合は、蛍光検出器の励起波長を 400 nm、蛍光波長を 635 nm にあわせる。Mg-protoporphyrin IX, Mg-protoporphyrin IX monomethylester を検出する場合は、蛍光検出器の励起波長を 417 nm、蛍光波長を 600 nm にあわせる。同時に検出する場合は、蛍光検出器のタイムプログラムを利用して、Mg-protoporphyrin IX monomethylester の溶出のあとで、蛍光波長を切り替える。

Zapata の系に特有の問題として、ピリジン（または、ピリジンに混入している物質）の 595 nm 付近の蛍光がある。一波长型の吸光光度計の場合は問題にならないが、蛍光光度計の場合や、特にフォトダイオードアレイ検出器の場合は、奇妙なスペクトルが見られる原因となるので、注意してほしい。

カラム

カラムは、Symmetry C8, 150×4.6 mm, 3.5 μ m particle size^{※4} (Waters) で、ガードカラムとして、Phenomenex (AJO-4290) C8 4.0 (L) mm × 3.0 (ID) mm を使用している。カラム温度は 40°C に設定している。

溶媒

A 溶媒：Methanol: Acetonitrile: 0.25 M aqueous pyridine = 50 : 25 : 25 (v:v:v)

B 溶媒：Methanol: acetonitrile: acetone = 20 : 60 : 20 (v:v:v)

A 溶媒のピリジンは酢酸で pH を 5.0 にあわせる。われわれの研究室では、pH メーターを使って、ピリジン溶液の pH をあわせ、必要な酢酸の量を測っておき、2 回目の溶媒調整からは pH メーターを使わずに一定量の酢酸をピリジン水溶液に足すようにしている。酢酸の量は色素の保持時間に大きな影響を与えるので、常に一定量の酢酸を加えるようにすると、毎回 pH メーターを使って溶液を調製するよりも簡便に再現性を保つことができる。

サンプルのインジェクションについて

サンプル容量が 20 μ l 以下の場合は、抽出液（100%に近い濃度の acetone）をそのままインジェクションしても構わない。しかし、サンプル容量が 20 μ l を超える場合は、サンプル抽出液と A 溶媒のミスマッチによって、ピークのテイリングがおこる。サンプルに 20% 程度の水を加えるとテイリングを抑えることができる。しかし、サンプルに水を加えると、時間とともに β -carotene の沈殿がおこるので、 β -carotene の検出をする場合は、水を加えたらすぐにサンプルをインジェクションする必要がある。また、水の存在下では、クロロフィル類の修飾がおこりやすいと思われるので、微量のクロロフィルの検出、定量をするばあいは、できるだけ水は加えない方がよいと思われる。

オートサンプラーを使う場合、もう一つ注意しないといけないのは、サンプルバイアルからの蛍光物質の溶出である。ポリプロピレン製のバイアルを使うと蛍光物質が溶出されることがあるので、クロロフィル代謝中間体を分離する際には、ガラス製のバイアルを使用するか、事前に蛍光物質の溶出がないことを確認してポリプロピレンバイアルを使用する（京都大学・望月伸悦博士・私信）。

タイムプログラム

A 溶媒 100%, B 溶媒 0 % から開始して、直線的なグラジエントをかける。phytol 鎖をもたない物質は主に A 溶媒で溶出され、phytol 鎖をもつ物質は主に B 溶媒で溶出される。筆者の研究室では流速をあげて、原報¹⁾よりも若干解析時間を短縮している。

流速 1.2 ml/min

0 min	B 溶媒	0 %
12 min		40 %
17 min		95 %

^{※4} 同じ Waters 製の Sunfire という C8 カラムも試してみたが、 β -carotene と pheophytin a が同じ位置に溶出してしまった。

22.5 min	95%
25 min	0 %
30 min	0 % (5 分間平衡化してから, 次のサンプルをインジェクション)

検量線について

原理的には, HPLC の吸光検出器のピーク面積から, モル吸光係数を使って色素の濃度を見積もることは可能であると思われるが, 筆者の研究室では, 基本的に標準物質を購入するか, または生物試料から調製して, 検量線を作成している. Mg-protoporphyrin IX, Mg-protoporphyrin IX monomethylester は Frontier Scientific Inc. で購入できるが, 特注になる. protoporphyrin IX, pheophorbide a は和光純薬やフナコシ, コスモバイオなどで購入できる. protochlorophyllide はキュウリや大麦の暗所芽生えから精製する¹⁹⁾. クロロフィルも各社から購入できる. 標準物質の濃度を見積もるために, モル吸光係数が必要となるので, モル吸光係数を表 1 に示した.

5.a.5 おわりに

クロロフィルおよびその代謝中間体の検出には, さまざまな方法が開発されている³³⁾. 本稿では, 筆者の研究室で実際に使っている, 比較的簡便で応用のきく分析方法を紹介したが, これらの方法ですべてのクロロフィルとその代謝中間体が測定できるわけではないので, 目的にあった分析系を選んで使い分ける必要があると思われる.

Abbreviations

GG: geranylgeranyl, **DV:** divinyl, **MV:** monovinyl, **Chl:** chlorophyll, **Chlide:** chlorophyllide, **DHGG:** dihydrogeranylgeranyl, **THGG:** tetrahydrogeranylgeranyl

謝辞

本稿の執筆にあたって, さまざまな情報を提供していただいた北海道大学・低温科学研究所の田中歩教授, 伊藤寿博士, Wesley Swingley 博士, 得津隆太郎氏, 長根智洋氏, 岸本純子氏, 田中佐知子氏, に感謝いたします. また, 作図に関して, 同研究所の岸本純子氏に感謝いたします.

参考文献

- 1) M. Zapata, F. Rodriguez and J. L. Garrido. Marine Ecology-Progress Series **195** (2000) p.29.
- 2) R. Porra, W. Thompson and P. Kriedemann. Biochim Biophys Acta **975** (1989) p.384.
- 3) M. Latasa, K. van Lenning, J. L. Garrido, R. Scharek, M. Estrada, et al. Chromatographia **53** (2001) p.385.
- 4) A. Nakamura and T. Watanabe. Analytical Sciences **17** (2001) p.503.
- 5) D. I. Arnon. Plant Physiol **24** (1949) p.1.
- 6) W. P. Inskeep and P. R. Bloom. Plant Physiol **77** (1985) p.483.
- 7) R. Tanaka and A. Tanaka. Annu Rev Plant Biol **58** (2007) p.321.
- 8) D. Aarti, R. Tanaka, H. Ito and A. Tanaka. Photochem Photobiol **83** (2007) p.171.
- 9) D. Goslings, R. Meskauskiene, C. Kim, K. P. Lee, M. Nater, et al. Plant J **40** (2004) p.957.
- 10) E. Kruse, B. Grimm, J. Beator and K. Kloppstech. Planta Heidelberg **202** (1997) p.235.
- 11) S. I. Beale. Plant Physiol **45** (1970) p.504.
- 12) T. Masuda, R. Tanaka, Y. Shioi, K. Takamiya, C. G. Kannangara, et al. Plant Cell Physiol **35** (1994) p.183.
- 13) H. P. Mock and B. Grimm. Plant Physiol **113** (1997) p.1101.
- 14) D. Mauzerall and S. Granick. J Biol Chem **219** (1956) p.435.
- 15) A. E. Alawady and B. Grimm. Plant J **41** (2005) p.282.
- 16) Y. Shioi and K. Takamiya. Plant Physiology **100** (1992) p.1291.
- 17) H. Nakanishi, H. Nozue, K. Suzuki, Y. Kaneko, G. Taguchi, et al. Plant Cell Physiol **46** (2005) p.467.
- 18) N. Nagata, R. Tanaka, S. Satoh and A. Tanaka. Plant Cell **17** (2005) p.233.
- 19) N. Nagata, R. Tanaka and A. Tanaka. Plant Cell Physiol **48** (2007) p.1803.
- 20) C. A. Rebeiz (2002) Analysis of intermediates and end products of the chlorophyll biosynthetic pathway. In: Smith AG, Witty M, editors. Heme, Chlorophyll, and Billins: Methods and Protocols. NJ: Humana Press. pp. 111.
- 21) T. Masuda, N. Fusada, N. Oosawa, K. i. Takamatsu, Y. Y. Yamamoto, et al. Plant & Cell Physiology **44** (2003) p.963.
- 22) F. Franck, U. Sperling, G. Frick, B. Pochert, B. van Cleve, et al. Plant Physiol **124** (2000) p.1678.
- 23) M. Helfrich, A. Ross, G. C. King, A. G. Turner and A. W. Larkum. Biochim Biophys Acta **1410** (1999) p.262.
- 24) A. Nakamura, M. Akai, E. Yoshida, T. Taki and T. Watanabe. Eur J Biochem **270** (2003) p.2446.
- 25) V. Scheumann, S. Schoch and W. Rudiger. Planta **209**

- (1999) p.364.
- 26) S. Hortensteiner. *Annu Rev Plant Biol* **57** (2006) p.55.
 - 27) M. Kusaba, H. Ito, R. Morita, S. Iida, Y. Sato, et al. *Plant Cell* **19** (2007) p. 1362.
 - 28) N. Schenk, S. Schelbert, M. Kanwischer, E. E. Goldschmidt, P. Dormann, et al. *FEBS Letters* **581** (2007) p. 5517.
 - 29) Y. Suzuki, T. Amano and Y. Shioi. *Plant Physiology* **140** (2006) p.716.
 - 30) A. Pruzinska, I. Anders, S. Aubry, N. Schenk, E. Tapernoux-Luthi, et al. *Plant Cell* **19** (2007) p.369.
 - 31) A. Pruzinska, G. Tanner, S. Aubry, I. Anders, S. Moser, et al. *Plant Physiol* **139** (2005) p.52.
 - 32) 光合成研究会 (2003) 光合成事典. 東京:学会出版センター.
 - 33) L. Van Heukelem and C. S. Thomas. *Journal of chromatography* **910** (2001) p.31.
 - 34) A. Strand, T. Asami, J. Alonso, J. R. Ecker and J. Chory. *Nature* **421** (2003) p.79.
 - 35) N. Mochizuki, R. Tanaka, A. Tanaka, T. Masuda and A. Nagatani. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (2008) p. 15184.
 - 36) C. A. Rebeiz (2002) Analysis of intermediates and end products of the chlorophyll biosynthetic pathway. In: Smith AG, Witty M, editors. *Heme, Chlorophyll, and Bilins: Methods and Protocols*. NJ: Humana Press. pp. 111.
 - 37) C. Houssier and K. Sauer. *Biochim Biophys Acta* **172** (1969) p.492.
 - 38) A. Kahn. *Physiologia Plantarum* **59** (1983) p.99.
 - 39) P. Hukmani and B. C. Tripathy. *Anal Biochem* **206** (1992) p.125.
 - 40) I. Eichwurz, H. Stiel and B. Roder. *J Photochem Photobiol B* **54** (2000) p.194.
 - 41) H. Ito, T. Ohtsuka and A. Tanaka. *J Biol Chem* **271** (1996) p.1475.
 - 42) V. P. Shedbalkar and C. A. Rebeiz. *Anal Biochem* **207** (1992) p.261.