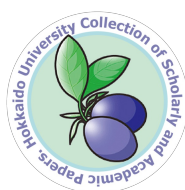




Title	緑色系統におけるカロテノイドの分析
Author(s)	関, 莊一郎; 藤井, 律子
Citation	低温科学, 83, 237-249
Issue Date	2025-03-29
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.83.237
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94800
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p237-249_LT83.pdf



緑色系統におけるカロテノイドの分析

関 荘一郎¹⁾, 藤井 律子²⁾

2024 年 12 月 3 日受付, 2024 年 12 月 12 日受理

近年, 様々な研究手法の発展により, 緑色系統(Green lineage)の光合成生物内, さらに光合成色素蛋白質複合体内におけるカロテノイドの局在や組成, その化学構造の分析の必要性が高まっている. 本稿では, 光合成色素の各複合体への蓄積パターンや生合成経路等から, 緑色系統の光合成生物のカロテノイドの戦略的な分析方法について記載する.

Carotenoid analysis for photosynthetic organisms in green lineage

Soichiro Seki¹, Ritsuko Fujii²

Recent advancements in various research techniques have highlighted the increasing need to analyze the localization, composition, and chemical structures of carotenoids within the pigment-protein complexes of photosynthetic organisms in the green lineage. This paper outlines strategic approaches for analyzing carotenoids in these organisms, focusing on accumulation patterns within pigment complexes, biosynthetic pathways, and related aspects.

キーワード: カロテノイド, 緑色植物, 光合成色素蛋白質複合体, 色素分析, 化学構造決定
carotenoids, green plants, photosynthetic pigment-protein complexes, pigment analysis,
chemical structural determination

1. はじめに

光合成生物は光合成色素としてクロロフィルとカロテノイドを含有する. クロロフィルは大まかに5種類が, その類縁体を含めると十数種類が発見されている. 一方, カロテノイドは2004年に750種類以上の化学構造が体系的にまとめられており (Britton et al. 2004), その化学構造は比較的多様である. この中でも, 光合成器官に蓄積するカロテノイドは約150種類が知られており (高市 2006), 光合成生物が進化の過程でカロテノイドの化学構造を多様

化させてきた経緯を物語る. これら既知のカロテノイドの中でも機能がよくわかっているものは数十種類程度であり, まだまだ未解明な点が多い.

そんな中, 近年の様々な技術革新により, 特殊な光合成器官や色素系を持つ光合成生物にも研究の手が広がり, これまで以上にカロテノイドの分析や構造同定の重要性が高まっている. 著者らはこれまでユニークなカロテノイドを結合する海洋性の緑藻や陸上植物の光合成アンテナ, また色素そのものの構造と機能を研究してきた. 本稿ではこれらの経験を元に, 緑色系統の光合成生物から

連絡先

関 荘一郎

大阪大学 蛋白質研究所

〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

Tel: 06-6879-8605

Email: s-seki@protein.osaka-u.ac.jp

1) 大阪大学 蛋白質研究所

Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan

2) 大阪公立大学 人工光合成研究センター

Research Center of Artificial Photosynthesis, Osaka Metropolitan University, Osaka, Japan

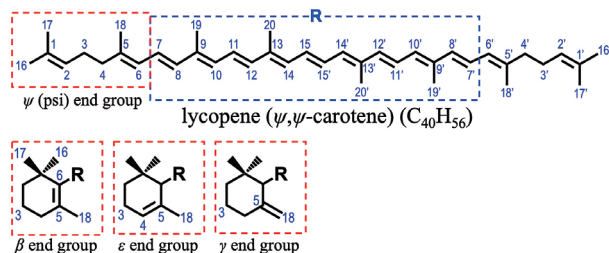


図1:カロテノイドの半体系的名称:炭素番号と代表的な末端基。

カロテノイドを抽出、分析する上で必要となる基本事項について、カロテノイドの構造、電子状態、反応性やその他の特徴を概観し、具体例を含めながらその分析方法について解説する。

2. カロテノイドの基礎

2.1 カロテノイドの基本的な化学構造と命名法

カロテノイドの化学構造は、8個のイソプレン単位 (C5) が結合してできる炭素数40の骨格が基盤となる。イソプレンに由来する飛び飛びの二重結合の間を埋めるように不飽和化が進み、それに伴って共役鎖が長くなり、より長波長側の光を吸収するようになる。共役二重結合数11のリコペンを基準とし、両末端の環化、水素化/脱水素化、酸化などを組み合わせてカロテノイドの構造を記述する「半体系的命名法」は、正式名称として、国際化学連合 (IUPAC) や国際生化学連合 (IUB) などに推奨されている (Britton et al. 1995a, <https://iupac.qmul.ac.uk/carot/>)。

主なカロテノイドの末端構造を図1に示す。非環状のψ末端と、六員環状のβ, ε, γ末端 (環) がある。ε, γ環の場合は、共役鎖 (R) との接続部位に立体異性が生じるため、注意が必要となる。また、非対称の場合はアルファベット順に左右を決定する (右半分は炭素番号にアポストロフィをつけて区別する) ため、β環とε環を両末端に持つαカロテン (慣用名) は、β環を左に描き、「半体系的名称」はβ,ε-caroteneとなる。

このように炭化水素のみで構成されるものをカロテンと呼び、分子内に酸素原子を含有するものをキサントフィルと呼ぶ。植物は六員環末端構造の3位に水酸基を持つキサントフィル類を大量に蓄積する。水酸基はアルコールなので、これはβ-carotene-3,3'-diolとなる。ここで3位のOH基には立体異性体が生じる事に注意してほしい。例えばε末端やγ末端の3位にOH基を持つキサントフィルの場合、6

位と3位の立体を全て指定する必要がある。例えばルテインの半体系的名称は、(3R,3'R,6'R) -β,ε-carotene-3,3'-diolとなる。それぞれのカロテノイドの立体構造は、立体構造を識別できるという酵素反応の特徴より、生合成経路を推定する上での根拠の一つとなる。

カロテノイドの共役鎖骨格にかかる変異として、ラクトン環、カルボニル基、アレン基、官能基として5,6-エポキシ基、アシル基等がある。末端基が対称の場合は主たる構造の変異が左に来るように構造を命名するが、どちらが主要な構造なのかの判断は困難場合も多い。また構造の類似性や生合成経路などの議論に応じてあえて左右逆に図示することもあり、図2にその例を示す。

2.2 緑色植物のカロテノイドの生合成経路とその分布

カロテノイドの生合成経路と各生物種の蓄積パターンは、目的試料に含まれるカロテノイドの化学構造や立体配座を予測、同定、分析する上で重要な基礎的知識の一つである。ここでは特に緑色植物が蓄積するカロテノイドの生合成経路について概説する。

多彩な化学構造のカロテノイドは段階的な酵素反応の組み合わせにより生合成される。緑色植物のカロテノイド生合成は、共通の生合成中間体であるリコペンから分岐する (図3)。リコペンはβ-サイクラーゼ (β-cyclase)、もしくはε-サイクラーゼ (ε-cyclase) によって両末端が環化する。二つの末端に対して二つの酵素が反応し、全体の化学構造が二回回転対称軸を持つため、β-カロテン、α-カロテン、ε-カロテンの3種類の骨格が生じる (図3)。これらの基本骨格にはまず、3位へのヒドロキシ基の導入が生じるため、それ以降は全てキサントフィルとなる。β-カロテン、α-カロテンから始まる生合成経路をそれぞれβ-経路 (β-line)、α-経路 (α-line) と呼ぶ。植物の生育環境に依存したカロテノイドの組成変化が生じた場合、これらの生合成経路に基づいて議論される。ε-カロテンからの生合成経路に関連した研究は非常に限られており、あまり一般的な名称ではないが、本稿ではε-カロテンから始まる生合成経路をε-経路 (ε-line) と呼ぶ。以降、各経路について蓄積する光合成生物種とともに詳細に見ていく。

α-経路について、緑藻類のα-経路はその化学構造が多彩である (図3a)。陸上植物は基本的に3,3'-ヒドロキシ化酵素までしか持たないため、α-経路の最終生成物としてルテインのみを蓄積する種がほとんどである。一方、クラミドモナスやクロレラなどの淡水の緑藻類は19位のメチル基をヒドロキシ化する酵素を持ち、ルテインに加えて19位がヒドロキシ化されたロコキサントフェンを蓄積する。ミ

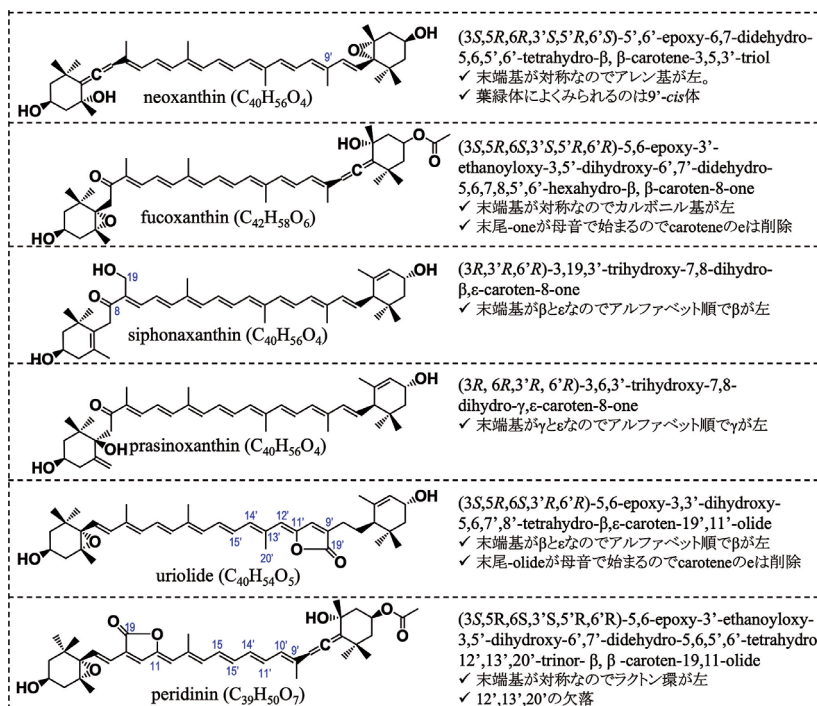


図2：カロテノイドの構造と半体系的名称の例：炭素番号を青字で、また基本骨格を決定した考え方の概要を付記した(Britton et al., 2004; Britton et al., 1995a)。

ルやウミブドウ等の海洋性の緑藻は更に多彩で、19位のヒドロキシ化酵素に加えて、8位に共役カルボニルを導入する酵素を持つ。そのため、ルテインの8位にカルボニルが入った19-デオキシシフォナキサンチン、あるいはロロキサンチンを経由して、それら両方の官能基が付加したシフォナキサンチン、更に19位のヒドロキシ基に短鎖脂肪酸がエステル結合したシフォネイン等を蓄積する (Seki et al. 2022)。また、緑色系統では初期に分岐したブラシノ藻は更に群を抜いて多彩で、種ごとにカロテノイド組成は多様である。例えば、ルテインから19-デオキシシフォナキサンチン、5-6 エポキシルテインを経由し、プレブラシノキサンチンから最終的にブラシノキサンチンを生合成する種や、それに加えて、ルテインの7'-8'位が水素化されたジヒドロルテインを持ち、そこから生合成されるマイクロモナル、ウリオリド等を含有する種 (図3d) が報告されている (Egeland et al. 1997)。またブラシノ藻の中にはロロキサンチンの19-アシルエステル体を含有する種 (図3e) なども報告されている (Sasa et al. 1992)。

β-経路は (図3b)、基本的に全ての緑色植物に共通して、β-カロテンの3,3'-ヒドロキシ化によりゼアキサンチンが生合成され、そこから両末端のC5=C6やC5'=C6'がエポキシ化されることで、アンテラキサンチン、ヴィオラキサンチンが生合成される。ヴィオラキサンチン-アンテラキ

サンチン-ゼアキサンチンの間は、逆反応を触媒する酵素が存在し、光環境に応じたカロテノイドの可逆的な蓄積量の変化が確認されており、キサントフィルサイクルと呼ばれる。更に生合成が進むと最終的にヴィオラキサンチンからネオキサンチンがall-trans体として生合成されるが、葉緑体内には9'-cis体で蓄積する。この9'-cis体への構造異性化についても酵素反応的に進むと考えられるが、その生合成過程は明らかになっていない。

ε-経路 (図3c) のカロテノイドを蓄積する種は非常に限られているが、レタスなどが含有するラクツカザンチンはε-カロテン両末端の3,3'-位にヒドロキシ基が結合することで生合成される。

基本的に天然のカロテノイドの生合成反応では、中間体によって蓄積するものとししないものがある。中間体の蓄積が観測される場合、生合成中間体と次の反応を触媒する酵素が何らかの要因で空間的に分離されていることになる。カロテノイド生合成酵素は細胞質側に存在すると考えられており、例えば、蛋白質への結合や膜脂質中への蓄積といったケースが考えられる。特例として、特殊な環境下 (光や栄養) でのみ生合成中間体を蓄積するケースや、最終生合成産物の生産量を大幅に増加するケースも存在する。

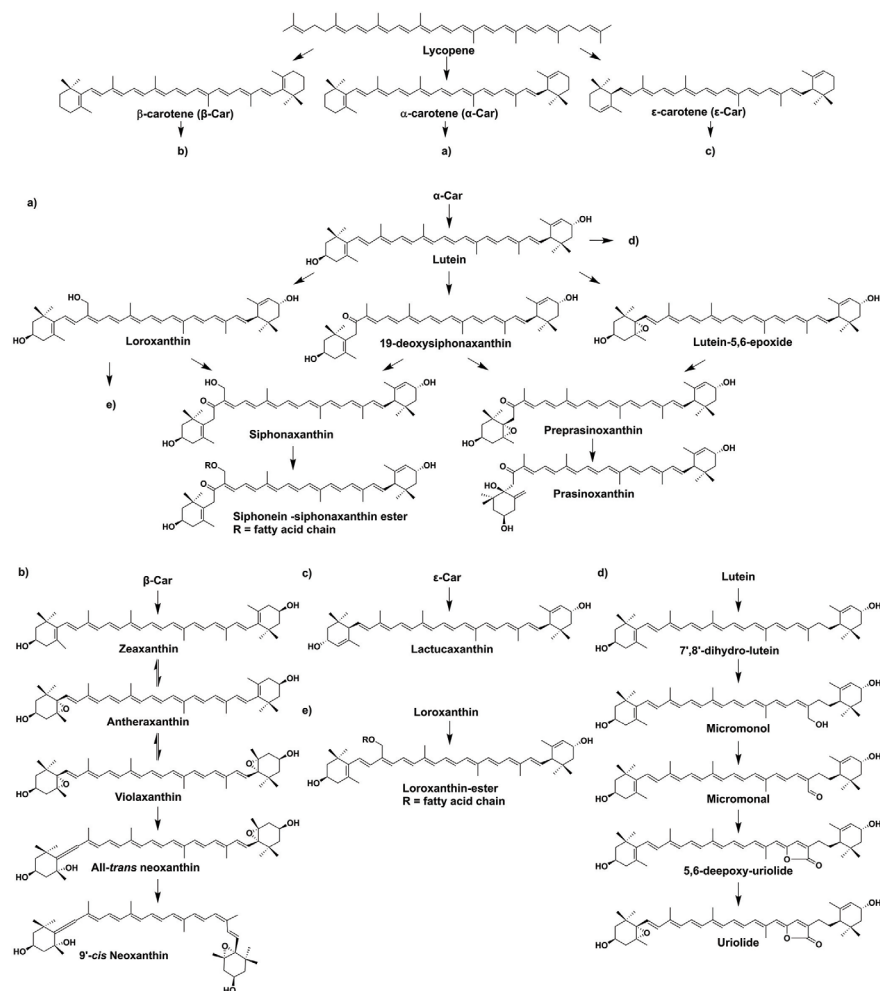


図3：緑色系統の光合成生物が蓄積するカロテノイドの生合成経路図(高市 2006; Egeland 1997; Sasa 1992; Seki 2022). α -経路の主な分岐経路はa)に、その他の分岐経路は、d), e)に記載している. β -, ε -経路についてはb), c)に記載している.

2.3 葉緑体内におけるカロテノイドの局在

カロテノイドは葉緑体内では主にチラコイド膜内に存在する色素-蛋白質複合体 (Pigment-protein complex: PPC) に結合する. 現在, X線結晶構造解析に加えて, クライオ電子顕微鏡法単粒子解析により, 様々な緑色植物由来のPPCの構造が高い分解能で解明され, その色素組成の多彩さが明らかになってきている. この多彩な色素の蓄積パターンにはある程度の一貫性があるため, それを踏まえておくことで, 構造解析や生化学的研究がされていない未知試料でも, カロテノイドの結合部位やその組成を予想する上で, 有効な手掛かりとなる. ここでは, これまでに決定された緑色系統のPPCの立体構造に基づき, 葉緑体内におけるカロテノイドの局在や組成について概説する.

葉緑体内に存在するPPCのほとんどはカロテノイドを結合するが, 代表的なのは光化学系 PS (Photosystem, PS) II, PSIとそのアンテナ系LHC (Light-harvesting complex) II,

LHCIである. 光化学系では, 反応中心部 (core) にはカロテンのみが結合し, 周辺領域に結合するLHCにはキサントフィルが結合する傾向がある. 維管束植物を例にとると, PSII-LHCIIの単量体coreには β -カロテンが11分子結合している (Su et al. 2017) 一方, 周辺領域のアンテナに該当するCP24, CP26, CP29, LHCIIにはCP24の1ヶ所を除けば全てキサントフィルが結合している. また, CP24以外のLHCには単量体当たり一分子の9'-cisネオキササンチンが結合しており, 残りのサイトをルテインやヴィオラキササンチンが埋めている. 特に, 三量体のLHCIIは他のLHCとは異なり, 単量体当たり四分子のキサントフィルが結合する. 一方, 植物のPSI-LHCIの構造 (Qin et al. 2015) を見ると, PSII-LHCIIと異なりほとんど β -カロテンで構成されている. coreが全て β -カロテンであるのに加えて, 周辺領域のLHCIにも単量体あたり一分子の β -カロテンが配置されている. LHCIにはキサントフィルも結合しており, そ

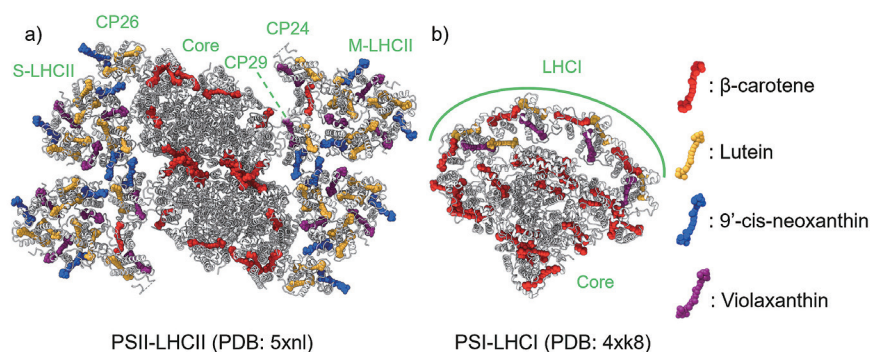


図4：二つの光化学系〔PSII-LHCII: a) , PSI-LHCI: b)〕に結合するカロテノイドの組成. 各カロテノイドはそれぞれ以下の通りに色づけている. (β カロテン: 赤, ルテイン: 黄色, 9'シスネオキササンチン: 青, ヴィオラキササンチン: 紫)

それぞれ単量体内の三分子の内、一分子はルテイン、一分子はヴィオラキササンチンと同定されている。

他にも近年のクライオ電顕の発展により、様々な緑藻の光化学系やLHCの構造が解明されている。それらの構造でも、クライオ電顕で分解能が上がりやすいcore部分には β -カロテンが結合していることはわかるが、分解能が向上しにくい周辺領域にあるLHC内のカロテノイドの判別は簡単では無い。その同定には、HPLCによる色素組成分析やその他、生化学的な解析が必要不可欠である。加えて、タンパク質内へのカロテノイドの結合は、カロテノイドと結合ポケット間の疎水性相互作用や、カロテノイドの官能基(主としてOH基)との水素結合により制御される。そのため、結合は比較的非特異的であり、化学構造が少し異なっても十分に同じ位置に結合しうる。例えば、カロテノイドの生合成量や組成が変わると、各結合ポケットのカロテノイド組成も変動すると予想される。構造解析やその他生化学分析でカロテノイドの結合位置を同定する際には、そういった様々な点を考慮したうえで、注意深く検討、検証する必要がある。

PPCを色素と蛋白質の複合体と定義するならば、他の光合成関連蛋白質もそれに該当するが、その中でもCytb₆f複合体も β -カロテンとクロロフィルを一分子ずつ含有する(Kurisu et al. 2003)。基本的にプラストキノンベースとした電子伝達が目的の複合体であるため、これらの色素の機能的な意義は明らかになっていない。

PPC以外に結合しうる場所としては、チラコイド膜を含む膜自体、またPPCの周辺領域に張り付くことが想定される。カロテノイドは基本的に脂溶性が高いため膜の疎水性領域や膜内在性のPPCにも付着し得る。そのため、PPCの色素分析をする際には膜成分や周辺に付着するカロテノイドの除去に気を付けることをお勧めする。

3. カロテノイドの物性：光応答と化学反応

カロテノイドの物性の基礎は長鎖ポリエンという点にある。この物性は、カロテノイド全てに共通すると考えて良く、一般的なカロテノイド試料を取扱う上での基礎的な知見を与える。一方、特定の官能基や部分構造に依存する物性もあり、生体内での役割を議論する上ではこちらの方がより重要となってくる。本節では、特にカロテノイドの取扱いや保存方法に関連する事項について、カロテノイドに共通する物理反応と化学反応の基盤となる性質を概説する。

3.1 カロテノイドの電子励起状態の構造

カロテノイドはメチル基の存在により、比較的長い直鎖共役二重結合がねじれたり会合したりせず、安定に存在する。この交互炭化水素の直鎖状共役系は、 C_{2h} 対称性を示す(図5a)ため、分子軌道法の π 電子近似で電子励起状態の対称性が記述できる：基底状態は $^1A_g^-$ という対称性ラベルを持つ。左肩の上付きの1は一重項励起状態を示す。AとB, gとu, -と+, という異なる対称性を持つ状態間の遷移は許容遷移となり、同じ対称性を持つ状態間では禁制遷移(対称禁制)となる。カロテノイドの特徴である可視部の強い吸収帯は、基底状態 S_0 ($^1A_g^-$) から第二励起状態 S_2 ($^1B_u^+$) への許容な電子遷移に由来し、10万以上という大きなモル分子吸光係数を持つ。一方第一励起状態(S_1)は $2^1A_g^-$ という対称性を持つため、 S_0 ($^1A_g^-$) との間の遷移は禁制となり、蛍光を発さず内部転換(IC, internal conversion)でエネルギーを熱として失活する。(現実のカロテノイド分子は厳密には C_{2h} 対称性を持たないため、 S_1 状態からの超微弱な蛍光も実測は可能である(Fujii et al. 1998).) これらの特徴により、カロテノイドは1分子あたりに吸収するエネルギー

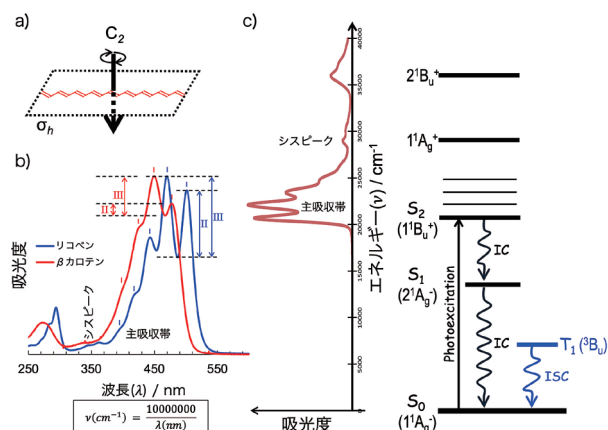


図5：カロテノイドの吸収スペクトルと電子励起状態。a) ポリエンの示す C_{2h} 対称性。b) n-ヘキサン中の吸収スペクトルの例。c) 吸収スペクトルとカロテノイドの電子励起状態の対応。

ギーは多いが、得たエネルギーを最終的に熱として安全に放散する能力を持つと言える(図5b,c)。

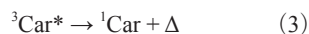
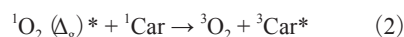
カロテノイドの吸収スペクトルには、炭素-炭素の二重結合伸縮振動($\sim 1500\text{ cm}^{-1}$)と単結合伸縮振動($\sim 1000\text{ cm}^{-1}$)による振動構造が見られる。振動構造は電子準位の上に刻まれた振動準位($v=0,1,2,\dots$)のそれぞれへの遷移を示し、吸収スペクトルに現れる振動構造のエネルギー間隔はおよそ 1400 cm^{-1} である。基本構造からの逸脱が少ないリコペンなどでは、基底状態($v=0$)から励起状態($v=0$)への電子遷移(0-0遷移)から0-3遷移くらいまで目視で帰属可能である。一方、この切れ込み方は末端の環化、カルボニル化などの化学構造の違いに敏感であり、0-0遷移と0-1遷移のピーク間の谷を原点として、0-0、0-1の高さの比を%で表した%II/IIIがカロテノイドの同定の目安の一つとして使われる(図5b)。

π 電子共役系は π 電子の動ける領域が広がるほど遷移エネルギーは低くなる。よって、カロテノイドでは共役二重結合数が多いほど低エネルギーとなる。吸収スペクトルから得られる遷移エネルギーは共役二重結合数(N)の関数 $1/(2N+1)$ と直線関係にあることを利用して、同じ溶媒中における様々なNを持つ既知カロテノイドとの比較から、Nの情報が得られる。また、Nの短い不純物が含まれていると、吸収スペクトルの短波長側が不自然に盛り上がって見えるので、できるだけ短波長側まで取得した吸収スペクトルは、簡易的な純度判定にも有効である。

主吸収帯の少し高エネルギー側(短波長側)、350 nm付近にみられるピークは、 $1A_g^+$ の対称性を持つ一重項励起状態であるが、共役系の骨格の折れ曲がりが大きくなるに

つれて大きくなるため、シスピークと呼ばれる。シスピークは主吸収帯にも1-5 nmのシフトがみられたり、%II/IIIも変化したりするため、注意が必要である。(図5b)

カロテノイドの最低三重項励起状態は、 S_1 のおよそ半分のエネルギーを持つことが知られており、微弱燐光の観測により実験的にも検出されている(図5c)。項間交差の量子収率が極めて低いので、カロテノイドは直接の光励起で三重項状態を生じない。カロテノイドは三重項励起状態を経由して異性化する。純度の高いカロテノイドは比較的光には安定といえる。カロテノイドの三重項状態は三重項増感剤からの三重項-三重項エネルギー伝達により生じる。三重項励起状態のクロロフィル($^3\text{Chl}^*$)、一重項励起状態の酸素($^1\text{O}_2(\Delta_g)^*$)は、カロテノイドに対する三重項励起増感剤となる(式1,2)。



酸素雰囲気下でクロロフィルと混在して光が照射されるとこれらの増感剤からのエネルギーを受けてカロテノイドは三重項励起状態になり、異性化や分解を起こす。よって、カロテノイド試料を扱う際には、酸素とクロロフィルと光が揃う状態はなるべく避けた方がよい。クロロフィルの分解物はさらに厄介な副反応を誘発するため、クロロフィルの分解を防ぐ目的でも低温が推奨される。

こうして生じたカロテノイドの三重項励起状態は、 B_u の対称性ラベルをもつ状態であり、燐光を發さず、項間交差により熱的に失活する(図5c)。この意味でもカロテノイドは有効なクエンチャーといえる。

3.2 化学反応とその他の物性に関する留意点

上述のようなエネルギーの授受という物理過程によるエネルギーの散逸では、カロテノイドが分解することは稀である。一方、カロテノイドの持つ共役二重結合は、フリーラジカルの消去能力が高いことが知られており、一重項酸素だけでなく、他の活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンラジカル($\cdot\text{O}_2^-$)、ヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)、また過酸化脂質($\text{LOO}\cdot$)などの活性種と化学反応をおこし、カロテノイド自身の分解や、*cis-trans*構造異性化などを起こす。そのため、暗所でラジカルや過酸化物を蓄積するクロロホルムなどのハロゲン溶媒、ベンゼンなどの共役系溶媒を利用する際には注意が必要である。NMRや分光学に用いる安定剤が入っていない高純度クロロホルムは、

アルミナ(Merck Aluminum oxide 90 for chromatographyなど)を、綿栓を詰めたパスツールに入れた簡易カラムを通してから用いると良い。

葉緑体にはヴィオラキサンチンやネオキサンチン等、5,6-エポキシド構造を持つものが多い。この部分構造は酸性条件で5,8-転移反応を起こすため、この部分構造を持つカロテノイドを大量に調製する際には、水の代わりに緩衝液を用いる(高市 2006)、 MgCO_3 を添加する(Saini et al. 2018)などを行い、植物材料から出てくる酸を中和することが推奨される。

また葉緑体には、9'-*cis*ネオキサンチンのように、特定の*cis*体が蓄積していることがある。構造異性体はそれぞれの二重結合周りの回転運動の活性化エネルギーにより熱的平衡にあるため、溶液中では様々な異性体のその温度における平衡混合物になろうとする。ネオキサンチンは常温でall-*trans*体が優位となるため、温度を上げると自然にall-*trans*体が増える。また、ラジカルも異性化を促進する(これは三重項励起状態を経由しない)ので、クロロホルムやベンゼンなどのラジカル反応を促進する有機溶媒を抽出溶媒に使うにはリスクがある。こういった副反応を想定して実験条件を考える必要がある。

溶解性やカロテノイドの取り扱いについて、カロテノイドは、有機溶媒に溶ける速度が比較的遅い。クロロフィルと比べると顕著である。そのため、完全に回収できているかをよく確認する必要がある。一方、ガラス容器を有機溶媒で洗浄するといつまでも黄色い液が出てくるが、これは人間の目の感度が高い領域に吸収帯があることに由来し、見た目の色の割に実際の物質量は少ない。そのため、適当なところで有機溶媒による洗浄(回収)を諦め、あとのガラス容器は通常の有機物と同様に中性洗剤で洗浄するとよい。また、白衣や衣服に高濃度のカロテノイドが付着した場合、有機溶媒をつけても広がるだけで完全には落ちないが、そのまま天日干しすれば色は見えなくなる。

4. カロテノイドの抽出、単離・精製法

4.1 基本戦略

カロテノイドの抽出、単離・精製方法は目的に応じて、大きく異なる。分析か分取か、どの程度のスケールか、抽出の対象は何で、どの程度の純度が必要かによって、検討事項が異なる。以下では、各目的に応じたカロテノイドの抽出、単離・精製法について、実際の経験も踏まえつつ、概説する。

4.2 分析用色素抽出

HPLCによる色素組成分析であればシステムにもよるが、サンプル自体は少量でも分析可能である。具体的にはホウレンソウの葉であれば2～3 mm四方の切片があれば十分に分析出来る。一方、PPCの色素分析となると抽出方法が異なる。以下に、①葉等の組織からそのまま色素抽出する方法と②PPCから色素抽出する方法(凍結乾燥機がある場合)と③PPCから色素抽出する方法(分液する方法)を紹介する。以降の実験では、基本的に部屋は暗く(照度でいうと、 $1 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PFD) 程度)で、サンプルに触れるものは良く冷やして用いることをお勧めする。

4.2.1 具体的な抽出例① 組織(葉や藻体)からの色素抽出

1. 試料^{※1}をマイクロチューブに移す。
2. 良く冷やした有機溶媒^{※2}を入れ、ホモジナイザーベッスル等^{※3}で、有機溶媒と共に良くすりつぶす。
3. 十分に色素が抽出でき次第、遠心する(15,000×g, 5分)。
4. ペレットを浮かさないように気を付け、上清のみを回収する。

※1 試料の状態について

試料によって、多糖が多く蓄積している等、含水率が高い場合、また細胞が固い場合には色素抽出が難しい場合がある。そのような場合は、凍結乾燥後、乳鉢ですりつぶし、粉末化した上で抽出することをお勧めする。凍結乾燥は色素系には特に影響しない上に、凍結乾燥後は乳鉢ですりつぶしやすくなるため、色素抽出が容易になる。

※2 抽出溶媒の選定について

抽出溶媒に関しては、分析する際の液クロの溶液と同じ性質の近い溶媒であれば基本的に問題はない。我々はしばしばN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)を用いて実験する。理由は、①カロテノイドやクロロフィルが総抽出物とほぼ同じ比率で等しく抽出できる点と、②揮発しにくい点が挙げられる。特にオートサンプラーなどで大量にサンプルを用意する際には不揮発性は有利になる。

※3 ホモジナイザーについて

筆者らが良く使うのはプラスチック製のホモジナイザーベッスルで、1.5 mlと0.5 mlのマイクロチューブ用のものがある。ベッスルは非常に簡便で扱いやすい反面、先がなめらかで、磨り潰す力は弱い。その点、ガラスホモジナイザーはその力が強く、少量の試料から効率的に色素を抽出する際にはお勧めである。

4.2.2 具体的な抽出例② PPCからの色素抽出（凍結乾燥器がある場合）

1. パスツールピペットの先に綿を少量詰め、その上からアニオン交換セルロースDE52 (Whatman®) の担体を入れ、カラムを作成する。
2. カラムを試験管などに立て、PPCの溶けているバッファーで平衡化後、試料を添加する。
3. ゴム球で押し出し、試料を担体に吸着させる。バッファーで洗い流す。
4. パスツールピペットの入り口のみをパラフィルムでふさぎ、アルミホイル等で全体を包んで凍結乾燥する。
5. 凍結乾燥後、有機溶媒(アセトン：メタノール=1：1)を入れて、色素のみを溶かし出す。
6. 色素抽出物を、窒素ガス等を用いて、乾固させる。
7. 少量の有機溶媒に溶かす。

4.2.3 具体的な抽出例③ PPCからの色素抽出（分液する方法）

1. 試料をメンブレンフィルター等で100 μ L程度に濃縮し、ガラス試験管に移し入れる。
2. 有機溶媒（アセトン：メタノール=1:1）を2～3 ml程度加え、よく混ぜて色素を抽出する。
3. 良く冷やしたジクロロメタン（クロロホルムでも可）、および飽和食塩水（濃い塩の入った水溶液）を有機溶媒と等量ずつ入れ、良くかき混ぜる。
4. 遠心(3,000 $\times$ g, 5 min)した後、飽和食塩水を添加し、良くかき混ぜたのち再度遠心する。
5. 上層をできるだけ廃棄し、残った下層のみをパスツールピペット等で取り出す。
6. 窒素ガスを吹き付ける等、乾固させた後、目的の溶媒に溶かす。

4.3 分取用色素抽出、及び精製

カロテノイドの研究を進めるうえで、未同定のカロテノイドと出会ったとき、また実験的にカロテノイドの量が必要な場合、大量に分取、精製する必要がある。その抽出方法は上記の手法と比べて、スケールや抽出方法が大きく異なる。以下では具体例を挙げながら、大量に色素を抽出するための各段階について、4.3.1 色素の抽出、4.3.2 オープンカラムによる粗精製、4.3.3 HPLCによる精製の項目で詳細に説明する。

4.3.1 大量の色素抽出

大量に色素を抽出する場合、必要量と抽出効率および

手に入る試料の量を基に、どのように抽出するかを考える。例えば、ハウレンソウ等の入手が容易な試料の場合、多少抽出効率が低くても、元の量を増やすことで目的量が得られる。一方、希少な試料から抽出する場合や、蓄積量が微量な場合はより入念に、抽出効率をできるだけ高めるよう実験する必要がある。今回はハウレンソウから効率よく色素を抽出する方法を紹介する。

具体例：ハウレンソウから色素を大量に抽出

1. ハウレンソウを事前に凍結乾燥する^{※1}。
2. 乳鉢に液体窒素を注ぎ、平衡化した後、ハウレンソウを入れる。崩しながらつぶし、粉末になるまですりつぶす^{※2}。
3. 良く冷やした有機溶媒（アセトン：メタノール=1:1）を入れ、すりつぶしながら色素を抽出する。
4. ろ紙でろ過して不純物を取り除き、エヴァポレーター等^{※3}で有機溶媒の大部分を揮発させる。
5. 分液漏斗に移し入れ、ジクロロメタン、飽和食塩水を用いて分液する^{※4}。
6. ジクロロメタン層（下層）を回収し、エヴァポレーター等で乾固する。
7. 目的の有機溶媒に溶解して回収する。

※1 凍結乾燥の重要性について

ハウレンソウから抽出する際に、そのまま有機溶媒を加えるだけでは抽出効率が非常に悪い。一方、事前に凍結乾燥しておく、非常に効率良く抽出できる。ちなみに凍結乾燥の有効性は種に寄らない。大型の海藻等多糖が多く蓄積する種でも凍結乾燥により、色素抽出が容易になる。微細藻の場合、種にもよるが遠心などでペレットにしたうえで、有機溶媒を加えれば抽出出来る場合が多く、比較的抽出は容易である。

※2 乳鉢は消耗品

磨り潰す際の注意点として、乳鉢が良く割れる点が挙げられる。本研究室ではコツをつかむまでは月に一度は乳鉢を壊して、新しいものを購入していたことが記憶に新しい。初めに乳鉢に液体窒素を入れると、表面は冷えて、内部は暖かいままになっており、その時に衝撃を加えると割れてしまう。十分に予冷してから磨り潰すことをお勧めする。加えて、すり潰す際に底に対して垂直に押し込むのではなく、壁面に対して擦るようにすれば乳鉢は消耗品ではなくなる。

※3 有機溶媒を揮発させるには

有機溶媒を揮発させるうえで、エヴァポレーターは有効な装置である。しかし、そこまでの設備がないところも多くあるだろう。その際には、窒素パージがお勧めである。窒素ガスを吹き付けるだけで、時間はかかるが簡単に有機溶媒を飛ばすことができる。

※4 分液で上手く分離しない場合

分離しない場合は、水層（今回は上層）の塩濃度が足りないことや溶液の比率が良くないケースがほとんどである。その際には飽和食塩水やジクロロメタンを添加するなど、溶媒の比率や塩濃度を調整しながら最適な分離条件を検討する必要がある。

4.3.2 オープンカラムによる粗精製

基本的に、色素の単離・精製にはHPLCが必要だが、カラムに吸着できる量は限られている。そのため、HPLCにインジェクトする総色素の量を減らすことで、コンタミ量を減らし、狙った色素の単離精製を容易にする。以下に具体例とその注意点を示す。

具体例：ミル由来色素のオープンカラム精製

1. 100%ヘキサンにシリカを入れ、かき混ぜながらオープンカラムに流し込み、シリカが落ち着いた後、上から海砂を5 mm程積む^{※1}。
2. ヘキサンがカラムの上端周辺に来たところで100%ヘキサンに溶かした抽出色素混合物を静かに添加する。
3. しばらく100%ヘキサンで流し続け、黄色いバンドが流れ出てくる。これがカロテン類である。
4. その後、アセトンを5%ずつ増やしながらしばらく流し、バンドの様子を見る。
5. 溶出する順番はカロテン類→クロロフィル *a*→クロロフィル *b*→キサントフィル類である^{※2}。キサントフィル類が目的の場合、クロロフィルをできるだけ取り除いた後、100%アセトンで流し出すと良い。

※1 カラムの高さについて

カラムは制御が難しいので高く積みがちだが、経験的に10 cm程度の高さがあれば十分に分離可能である。むしろ、高く積みすぎると、有機溶媒を無駄に消費し、時間も浪費してしまう。

※2 クロロフィル *b* とキサントフィルの分離について

クロロフィル *b* は一部のキサントフィルと性質が近く、

オープンカラムでは上手く分離しないケースがある。そのため目的物が混入している恐れのあるフラクションは分析し、目的物質の所在を常に確かめることに注力する必要がある。

4.3.3 HPLCによる精製

特定のカロテノイドのみを狙って高純度で得るとなると、HPLC等、分離能が良く目的物質の溶出をリアルタイムで検出しながら、分取する必要がある。ここでは一例として、HPLCを用いた色素の精製について具体例を紹介する。

具体例：基本的なHPLCでの精製方法

1. 上記の工程を経て取得した総色素抽出物をアセトンに溶かし、フィルター（PTFE 0.22 μm等）にかける。
2. 窒素パージ等で、一度、揮発させて乾固する。
3. HPLC^{※1}の有機溶媒^{※2}（アセトン：ヘキサン）をセットして、平衡化する。
4. 平衡化に用いた比率の有機溶媒に色素を溶かし、インジェクトする。
5. 目的試料のフラクションを回収する^{※3}。
6. 分析用のHPLCで分析し、純度を確認する。

※1 HPLCのシステム

著者らはShimadzuのHPLCシステム（仕様※4）をよく用いている。かなり濃くロードするため、普通のセルでは、色素由来の吸収が濃すぎてクロマトグラムが飽和してしまう。そのためセル長の短い、分取用のセルを用いることをお勧めする。

※2 有機溶媒とその組成について

溶媒は液体クロマトグラフィーグレードのものをを用いる。ほとんどのキサントフィル類については15～25%アセトンで、極性の高いキサントフィル類を狙う際には、30～40%程度で単離できる。流れてこない場合、更にアセトンの割合を増やして、目的試料を取得する。

※3 分離時間について

分離時間は短いほど、実験の都合上楽ではあるが、経験的には目的物質が10～30分程度で出てくる条件が綺麗に精製できる最適な溶媒条件である。保持時間が1～2時間と長すぎる場合、目的試料が分解する事がある。

※4 分取用のHPLCシステム

色素の単離に用いたシステムは以下の通りである。

HPLCシステム：(CBM-20A, SPD-M20A (分取用セルを装着), LC-20A, DGU-20A), カラム (COSMOSIL, SL-II, 10 mmID×250 mm). カラムは常温で立て置き, フラクションの回収にはディスポのガラス試験管を用いている.

5. カロテノイドの分析と絶対構造の同定

5.1 基本戦略

これまでに説明してきた方法で抽出, 単離・精製したカロテノイド標品を用いて構造を同定するにはどのような戦略が適当だろうか.

大体的場合, HPLCの分析で未同定のピークを見つけた, 興味深い蓄積挙動が新たにわかった, といった動機で構造同定に踏み切るのではないだろうか. この場合すでにHPLCでの分析はできているため, 吸収スペクトル, HPLCの溶出順序により推定構造を提出できることが多い. ここでは, フォトダイオードアレイ検出器 (PDA) 付きのHPLCが有効である. また, LC-MSも普及してきたため, MSによる分子イオンの測定, 最近ではLC-MSでも精密分子量測定ができるものが多く, 一気に分子式の同定までできることも多い. ただし, カロテノイドは同じ分子式でも異なる構造の異性体が多く存在するため, 分子式がわかっていても構造同定の決め手にはなりにくい (例えばネオキササンチン, ビオラキササンチン, シフォナキササンチン, プラシノキササンチンは全て $C_{40}H_{56}O_4$ である). それよりもMS/MSで官能基ごとの分離パターンを精密に検出するテクニックがカロテノイドの構造同定には有効である. よって, LC-PDA-MS/MSを整備すれば, カロテノイドの構造同定には強い味方となる. 本稿ではLC-PDAを活用した戦略をご紹介します. 概略を図6, 図7に示した.

5.1.1 推定構造を決定する

HPLCの溶出時間や順序, 吸収スペクトルからの構造の推定: HPLCの溶出時間は官能基や全体の極性にも依存するため, 溶媒系によって時間そのものは多少変化したり局所的に順番が入れ替わったりするが, 大まかな溶出順序は一定である. 論文を参考にしても良いが, 様々な海洋性微細藻類の網羅的な色素分析結果と主な色素のデータが載っている海洋学の本 (Jeffrey et al. 2005) はお勧めの一つである.

生合成経路からの構造の推定: 生物種によって持っているカロテノイドの生合成酵素が異なるため, 近縁種のカロテノイド組成の報告例が参考になる場合が多い. 例えば陸上植物が蓄積するカロテノイドは β -カロテン, ルテ

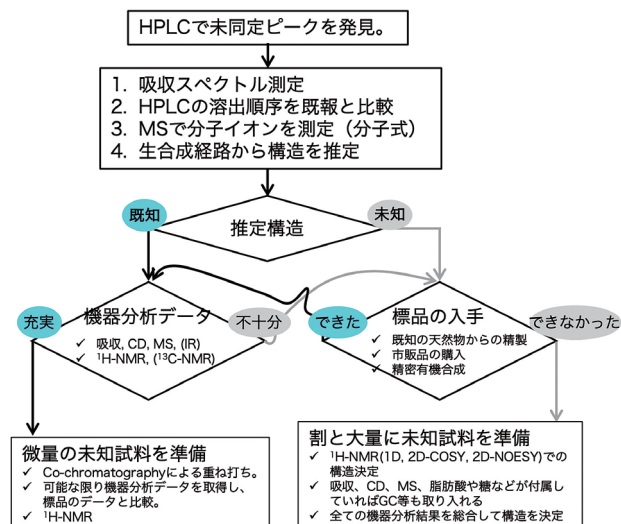


図6: 未知カロテノイドの構造同定の戦略.

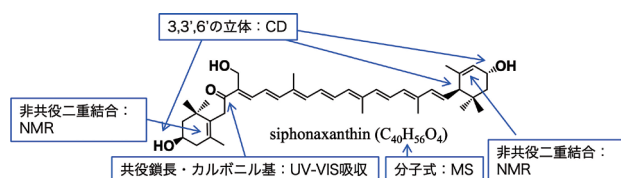


図7: 各部分構造の同定に関する分析方法の一例.

イン, ネオキササンチン, ヴィオラキササンチン, アンテラキササンチン, ゼアキササンチンであり, 種依存性はそこまで大きくない. しかしながら, 緑藻では組成が多様であり, α -経路のカロテノイドではあるが, ルテイン以降の生合成経路が不明瞭なカロテノイドを蓄積する傾向にある. いずれにせよ, 分類学上の近縁種の持つ色素組成を参考にして生合成経路から構造をまず予測する.

機器分析データとの比較: カロテノイドは機器分析データが充実している (Britton et al., 1995a, 1995b, 2004; Maoka 2016) ため, 完全に既知の構造ではなくても, 部分構造が既知の場合も多い. 機器分析データは, 局所的な分子の構造を反映するものが多く, それらは加算的で, 部分構造のシグナルの足し算として現れることが多い. この性質を利用して, 局所的な構造を予測することができる.

5.1.2 推定構造が既知の場合

機器分析データとの比較: 既知カロテノイドの機器分析データを参考に, 同じ条件で測定した未知試料と比較する. この時参考とするデータは, 総説 (Britton et al. 2004; Jeffrey et al. 2005; Britton et al. 1995b; Maoka 2016) だけではなく, なるべくその中の元論文を参照する. HPLCの溶出順序, 吸収スペクトル, CDスペクトル, MSによる分子式

表1：各分析手法のまとめ

手 法	同定ターゲット	試料について	特 徴	参考文献
HPLCの溶出順序	分子全体の極性, OH基の数など	少量で良い. 非破壊であるが, 分析では通常回収しない.	様々な充填材と溶媒の組み合わせがあり, 良い分離条件を見つけることが重要.	Jeffrey et al. 2005
紫外-可視吸収 (UV-VIS)	共役鎖長, カルボニル基, II/III% など	少量で良い 非破壊測定	簡便に測定できる.	Britton et al. 2004; Jeffrey et al. 2005
円偏光二色性 (CD)	不斉炭素原子周りの末端官能基の立体	少量で良い 非破壊測定	吸収スペクトルと同様のセルで測定可能.	Britton et al. 2004
高分解能質量分析 (HRMS)	分子式 (分子イオン, Na 付加イオン等)	少量で良いが高純度が必要	破壊測定なので他のデータを取った後に行う.	Britton et al. 2004; Maoka 2016
¹ H-NMR	特徴的な構造, 非共役二重結合の位置など	0.01 ~ 0.1mg 必要. 高純度が望ましい.	少量用のNMR管(SHIGEMI)もあり, 汎用性が高まっている.	Britton et al. 1995b; Maoka 2016

の一致でおおよそ問題ないと思われる. これらに必要な量はおおよそ0.01 mg (1 cmセル光路長における吸光度OD = 0.5の溶液が4 mL, モル分子吸収係数を10万, カロテノイドの分子量600で概算)である. 一次元(1D)の¹H-NMRまで合致すればまず間違いない. 骨格の*cis-trans*構造異性の情報も¹H-NMRで確定できる. CDスペクトルは, OH基やε-環の立体によって決まり, 生合成酵素による生産物であることを示す上では重要であるため, ぜひCDのデータも取得して欲しい.

重ね打ち (co-chromatography) : 既知試料の場合, 市販されていたり, 既知の植物等から簡便に精製できたりするので, 標品と比較する方が早い場合が多い. その場合, 標品を入手して, 重ね打ちを行う. HPLCの保持時間は溶媒系や測定装置によって微妙にズレるため, 未知試料と標品を完全に同一の分析系で分析する必要がある. さらに, 未知試料と標品を1:1になるように混合して分析することによって同一性が検証できる. ただし, 異なるカロテノイドが完全に同一の溶出時間に出ることがあるため, 他の手法での同定も合わせて行うことをお勧めする. 特に2液あるいは3液のグラジエント溶出を用いている場合は, ピーク形状が参考にならないことが多く, 注意を要する.

5.1.3 推定構造が未知の場合

機器分析による同定 : 完全に新規化合物であった場合, 覚悟を決めてある程度の量を集め, 上述のHPLC, 吸収スペクトルの他, 高分解能MS, ¹H-NMR, CDといった機器分析データを揃えて構造決定をする必要がある. 特に¹H-NMRは重要で, 他の機器分析では得られない共役していない二重結合の位置などの情報が得られるため, 1Dだけでなく, COSY (correlation spectroscopy, 直接の炭素-炭素化学結合を介した相関), long-range COSY (ちょっと先

までの炭素-炭素化学結合を介した相関), NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy, 空間的に近いところの相関)といった2次元の¹H-¹H相関を用いて, 帰結的に全てのシグナルを帰属する必要がある. これには最低でも0.1 mgくらいは必要である. また, 身近に存在する物質は大概プロトンを持つため, 不純物が多いとシグナルの帰属ができない. 特に水を除くことが重要である. ¹³C-NMRの場合水の混入は問題にならないが, 桁違いに大量の試料が必要である. 代わりに不純物の少ない試料を用いて, 上述のlong-range COSYでメチル基とオレフィンプロトンの相関を綺麗に検出できれば, ¹H-NMRのみでも全てのシグナルを帰結的に帰属し, 構造決定が可能である. 有機化合物の物質同定には通常赤外吸収スペクトル (IR) が用いられるが, 特殊な官能基を持たないカロテノイドの場合はそれほど重要な情報は期待できない. 逆に末端OH基の立体などの根拠となるCDは重要な情報となる. 部分的には既知の構造と同一であることがほとんどであるため, 報告されているデータと比較・参照しながら部分構造を決めていくと比較的速やかに構造決定できる.

精密化学合成による標品の入手 : 推定構造の標品を有機合成で作製, 標品で機器分析データを厳密に取得し, それと比較する, という力技もある. これは非常に強力な手段ではあるが, カロテノイドのような共役ポリエンの立体を制御した精密有機合成には特別な技術と試薬が必要であるため, 天然物合成, 特に合成による天然物の立体構造の同定に興味のある有機化学者の助力が必須である. 推定構造が有機合成の研究対象としても興味深いものであれば, 共同研究として協力してもらえる場合もある.

5.2 HPLCによる分析の条件の最適化例と分析例

表1に記載したように, HPLCは充填材, 溶媒組成とも

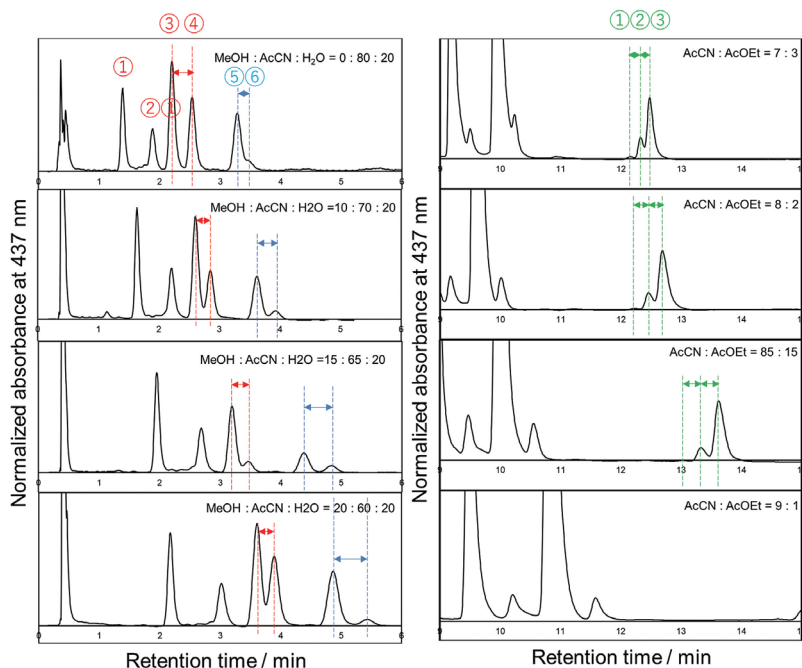


図8：2液グラジエントのHPLC分析系の構築例。使用した色素はクラミドモナスとミル由来の総抽出色素の混合物。左①：シフォナキサンチン，②：all-*trans* ネオキサンチン，③：9'-*cis* ネオキサンチン，④：ロロキサンチン，⑤：ヴィオラキサンチン，⑥：19-デオキシシフォナキサンチン。右①： ϵ -カロテン，②： α -カロテン，③： β -カロテン。

に極めて自由度が高い分析方法であり，目的に応じた分離を実現するために，様々な系が報告されている。基本的なカロテノイドのHPLCによる分離戦略については，総説 (Britton et al. 1995a; Britton 2022) が参考になる。

ここでは，基本的にアセトニトリル (AcCN) をベースに分析方法を検討した2液のグラジエント系の例を記載する (図8)。まずA液の最適化について，今回，6種類のキサントフィルを分離する必要がある，最初の条件 (MeOH:AcCN:H₂O = 0:80:20, V/V/V) では⑤⑥のピークが分離していないことがわかる。そこで，MeOH:AcCN比を変えていくことで，全体的にキサントフィルの領域の保持時間が長くなり，MeOHの量が増える程，ピークの分離が改善される。一方，それに伴い③と④のピーク間隔は少し狭くなり，ピークの分離は悪くなっている。その点から，今回の最適条件はどちらの両ピークも十分に分離しているMeOH:AcCN:H₂O = 15:65:20 (V/V/V) と決定している。次にB液について，ここではAcCNと酢酸エチル (AcOEt) の混合物を用いており，今回の試料には3種類のカロテンが含有されているが，最初の条件ではAcCN:AcOEtでは分離が良くない。そこで，こちらも二液の組成を変え，アセトニトリルの割合を増やして行くことで，分離条件が改善されていることがわかる。

以上のように，溶媒条件や組成比を変えることで，狙っ

たカロテノイドの分離を改善でき，色素の組成比をはっきりと決定することができる。それでも分離できない場合，溶媒の組成を根本から見直す必要がある。

当時の研究目的は，未同定カロテノイドであった19-デオキシシフォナキサンチンの構造決定にあったが，先行研究で近くにロロキサンチンが溶出することはわかっていたため，それとはっきりと区別することが主たる目的の一つであった。最終的に得られた分離パターンでは，生合成経路の中で可能性のある (疑わしい) カロテノイドがすべて，ピークとしてきれいに分離できた。最後に今回最適化した条件で分析した例を図9に紹介しておく。読者の目的に沿った分離を得る上で，ここでご紹介した戦略が少しでも参考になれば幸いである。

※ 分析用のHPLCシステム

今回の色素分析に用いたシステムは以下の通りである。HPLCシステム：(CBM-20A, SPD-M40A, LC-20A×2, DGU-20A, SIL-30A, CTO-20A)，カラム (COSMOSIL, 2.5C18 MS-II, 75 mm)。カラムは40℃で平衡化し，試料の入オートサンプラーは，4℃に設定した。カラムの温度を上げると分離は良くなるが，上げすぎると試料によっては分解してしまうため，注意されたし。

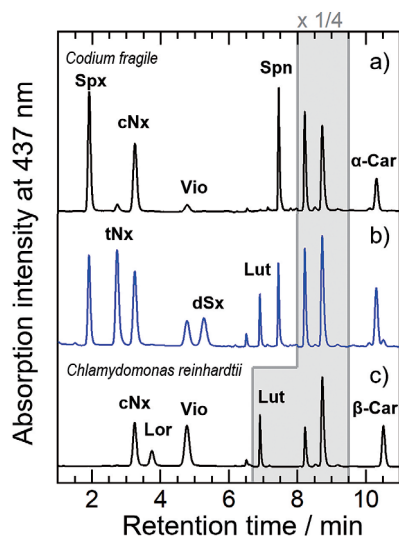


図9：完成した分析系を用いた分離の例。a) ミルの色素抽出物，b) 青色強い光で培養したミルの色素抽出物，c) クラミドモナスの色素抽出物。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は科研費23K05721, 24H02091の助成を受けて実施されたものです。

参考文献

- 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
- Britton, G. (2022) Chapter One - Getting to know carotenoids. *Methods Enzymol.* 670: 1-56.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (eds.) (1995a) Carotenoids vol 1A Isolation and Analysis. Birkhäuser, Basel.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (eds.) (1995b) Carotenoids vol 1B Spectroscopy. Birkhäuser, Basel.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H. (eds.) (2004) Carotenoids Handbook. Birkhäuser, Basel.
- Egeland, E. *et al.* (1997) Additional carotenoid prototype representatives and a general chemosystematic evaluation of carotenoids in prasinophyceae (chlorophyta). *Phytochem.* 44: 1087-1097.
- Fujii, R., *et al.* (1998) The $2A_g^-$ energies of all-*trans*-neurosporene and spheroidene as determined by fluorescence spectroscopy *Chem. Phys. Lett.* 288: 847-853.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., and Wright, S.W. (eds.), (2005) Phytoplankton Pigments in Oceanography Guidelines to Modern Methods. UNESCO Publishing, Madrid, Spain.

- Kurisu, G. *et al.* (2003) Structure of the Cytochrome b_6/f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science* 302: 1009-1014.
- Maoka, T. (2016) Structural studies of carotenoids in plants, animals, and food products. In: Kaczor, A. and Baranska, M. (eds.), "Carotenoids Nutrition, analysis and technology", Chapter 7, Wiley Blackwell, Chichester, UK, pp. 103-130.
- Qin, X. *et al.* (2015) Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. *Science* 348: 989-995.
- Saini, R.K. *et al.* (2018) An efficient one-step scheme for the purification of major xanthophyll carotenoids from lettuce, and assessment of their comparative anticancer potential. *Food Chem.* 266: 56-65.
- Sasa, T. *et al.* (1992) A novel carotenoid ester, loroxanthin dodecenoate, from *Pyramimonas parkeae* (Prasinophyceae) and a Chlorarachniophycean Alga. *Plant Cell Physiol.* 33: 921-925.
- Seki, S. *et al.* (2022) Discovery of a novel siphonaxanthin biosynthetic precursor in *Codium fragile* that accumulates only by exposure to blue-green light. *FEBS Lett.* 596: 1544-1555.
- Su, X. *et al.* (2017) Structure and assembly mechanism of plant $C_2S_2M_2$ -type PSII-LHCII supercomplex. *Science* 357: 815-820.