

アサクサノリの脂質成分におよぼす環境要因の影響

佐藤 孜郎・鹿山 光*・真柴 雅史**

(ノートルダム清心女子大学家政学部食品栄養学科, 広島大学水畜産学部水産学科*)

Effects of Environmental Factors on the Lipid Components of *Porphyra* sp.

Shiro SATO, Mitsu KAYAMA* and Masafumi MASHIBA*

Food and Nutrition Department, School of Home Economics, Notre Dame
Seishin University, Okayama; * Department of Fisheries, Faculty of
Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama

(Tables 1-7)

脂質は生体のエネルギー貯蔵物質であると考えられている。さらに、植物において脂質は、光合成器官である葉緑体の重要な構成要素として知られているが、その役割については、必ずしも明確な説明がなされていない。しかし、*Chlorella*, *Scenedesmus* あるいは、*Euglena* などの微小藻類についての研究によれば、培地組成による光合成色素量の変動にともない、脂質組成、とくに、スルホリピド、ガラクトリピドなどの変動がみられることが知られており^{1)~4)}、脂質が光合成過程で重要な位置を占めていると推測される。大型海藻では、アサクサノリとかテングサなどにおいて、種々の環境要因と藻体内諸成分(含窒素成分、無機成分など)との関係について、従来からかなりの報告があり^{5)~12)}、これら大型海藻の基礎的ならびに応用的資料として有用なものとなっている。しかしながら、脂質成分に関し、これらの藻体内での挙動については、今日まであまり研究が見当たらない。

本報告は、わが国で最も有用な海藻のひとつであるアサクサノリを用い、二・三の環境要因と脂質成分との実験的關係を検討し、その結果をまとめたものである。

実験材料および方法

Table 1-1. Composition of organic medium.

DL Malic acid	0.3 g
L Glutamic acid	0.3 g
Sucrose	5.0 g
Glycine	0.12 g
KNO ₃	72.2 mg
KH ₂ PO ₄	4.5 mg
Na ₂ glycerophosphate·5H ₂ O	10.5 mg
Fe-EDTA	0.5 mg
Tris	0.5 g
Vitamin B ₁₂	0.8 μg
Natural sea water (filtered)	1.0 l

Table 1-2. Composition of inorganic medium.

KNO ₃	72.2 mg
KH ₂ PO ₄	4.5 mg
Na ₂ glycerophosphate·5H ₂ O	10.5 mg
Fe-EDTA	0.5 mg
Tris	0.5 g
Natural sea water (filtered)	1.0 l

** 現在：カルビー株式会社，東京 (Calbee Co. Ltd., Tokyo)

実験材料 本実験に使用した藻体は、広島大学水畜産学部、箕島水産実験所において養殖し、1970年12月に採集したものである。海水でよく洗滌し、バスケット型遠心分離機により脱水したこれらの藻体 20 g を、Table 1 に示す組成の培養海水 2 l に浸漬し、炭酸ガスを 1~2% 混合した空気を通気し、白色蛍光灯にて約 6,000 lx の明条件下、およびアルミ箔で容器を完全に包み遮光した暗条件下において、それぞれ室温 (11°C~14°C) で 5 日間培養した。

粗脂質抽出液の調製 培養を終了したのち、暗室内で各区ごとに藻体を充分水洗し、出来得る限り水を切り秤量した。これらの藻体はクロロホルム・メタノール (CM と略記) 2 : 1 混液 200 ml で 3 回抽出し、抽出液を合して減圧濃縮したのち水洗し、クロロホルム層を芒硝で脱水、減圧下に溶剤を除去した。得られた粗脂質は、2,2ジメトキシプロパン (2,2DMP と略記) 5% を含む CM 9 : 1 混液に溶解し、粗脂質抽出液とした。

フロリジルカラムクロマトグラフィー O'BRIEN ら¹³⁾の方法により調製したフロリジルカラム (40cm × 2cm φ) に、前記抽出液 (粗脂質 200 mg 相当) を吸着させ、以下の溶出溶媒、それぞれ約 200 ml を用い、毎分 3 ml の速さで順次溶出し、A, B, C の各画分を得た。

CM 9 : 1 (2,2DMP 5% 含有) …画分 A ; 色素, 中性脂質など。

CM 2 : 1 (2,2DMP 5% 含有) …画分 B ; ガラクトリピド, スルホリピドなど。

95% メタノール ……画分 C ; リン脂質の大部分。

薄層クロマトグラフィー フロリジルカラムクロマトグラフィーで得た A および B 両画分は、厚さ 0.25mm のシリカゲル G (メルク製) 薄層クロマトグラフィーにより、溶媒系として、A 画分は石油エーテル・エーテル・酢酸, 87.5 : 12.5 : 1 を、B 画分はクロロホルム・メタノール・酢酸・水, 170 : 25 : 25 : 6 を用いて、それぞれ展開した。展開後 50% 硫酸を噴霧し、110°C, 1 時間加熱して発色させ、Ozumor デンシトメーター (モデル No. 82) により各スポットの面積比を求め、各脂質の量比を算出した。また別に A, B 両画分は厚さ 0.75mm のシリカゲル G (メルク製) 薄層を用いて前記と同じ溶媒系で展開したのち、前記各スポットに相当する部分をかき取り、CM 2 : 1 混液で溶出し、トリグリセライド、遊離脂肪酸、モノガラクトシルジグリセライド (モノガラクトリピドと略記)、ジガラクトシルジグリセライド (ジガラクトリピドと略記)、およびスルホキノボシルジグリセライド (スルホリピドと略記) の各画分を得た。遊離脂肪酸以外の各画分はけん化し、それらの構成脂肪酸を分離した。なお、C 画分については、薄層クロマトグラフィーによる分離はおこなわなかった。

ガスクロマトグラフィー 前記各画分から得られた脂肪酸は、ジアゾメタンによりメチルエステルとし、水素炎イオン化検出器を装備した島津 GC-2C ガスクロマトグラフにより、ジエチレンジグリコールサクシネート 15% 含浸させたクロモソルブ W を充填したステンレスカラムを用い、カラム槽温度 180°C で分析した。

結果および考察

各培養条件下の藻体の脂質組成は Tabel 2 および Table 3 に示す通りである。フロリジルカラムにより分画した各脂質画分のうち、モノおよびジガラクトリピドならびにスルホリピドなどの糖脂質を主体とする B 画分は、明条件下では、培養前とほとんど変わらないが、暗条件下では、無機および有機培養液いずれも、培養前のもより、低い値を示した。その他の A, C 両画分、ならびに総脂質量はいずれも、明条件下のものは培養前よりかなり高く、暗条件下のものは培養前とほぼ同じかやや低かった。

シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより分画した各画分については、トリグリセライド、および X 成分が培養前ではほとんど痕跡であるのに対し、明条件下ではそれぞれ 40, および 13 mg と顕著に増加することが認められた。また、暗条件下、無機培養液では、明条件下の 1/2~1/3 と低い値であるが、さらに有機培養液は培養前と同じく、ほとんど痕跡程度であった。このことはトリグリセライドと X 成分が光合成と、かなり密接に関連していることを推測させるものである。X 成分については、まだ確実な同定をしていない

Table 2. Lipid composition of *Porphyra* sp.
(separated with Florisil column) mg per culture

	A	B	C	Total
Initial	85	55	89	229
Light, inorganic medium	129	56	110	295
Dark, inorganic medium	89	34	79	202
Dark, organic medium	90	41	74	205

Table 3. Lipid composition of fractions A and B.
(separated with TLC) mg per culture

	TG*	FFA*	MGDG*	DGDG*	X*	SL*
Initial	trace	23	4	28	trace	21
Light, inorganic medium	40	19	2	22	13	15
Dark, inorganic medium	16	16	4	14	5	12
Dark, organic medium	trace	32	6	21	trace	14

* Abbreviations: TG, triglycerides; FFA, free fatty acids; MGDG, monogalactosyldiglycerides; DGDG, digalactosyldiglycerides; X, unidentified, possibly glycosphingolipids; SL, sulfolipids.

が、恐らく、グリコスフィンゴリピドと思われ、この点については今後の検討を要する。また、トリグリセライド、およびX成分以外の遊離脂肪酸、モノガラクトリピド、ジガラクトリピド、およびスルホリピドは、明条件下では培養前よりやや低い値を示したが、暗条件下の無機培養液ではさらに低い値を示した。

しかしながら、暗条件下の有機培養液のものでは、遊離脂肪酸は無機培養液の2倍量で、培養前よりも高く、ジガラクトリピドが1.5倍で明条件下とほぼ同程度であり、スルホリピドは大きな変化がみられなかった。以上の結果は、光合成がおこなわれない暗条件下、無機培養液では、すべての脂質が培養前より低下もしくは現状維持であるのは当然と考えられるが、有機炭素源を供給する暗条件下、有機培養液ではトリグリセライド、X成分を除き無機培養液より高く、このことは、アサクサノリがシュクローズのような糖を炭素源として、ある程度脂質合成をおこない得ることを示唆するものである。とくに、遊離脂肪酸が著しく高い値を示したことは、暗条件下でも、ある種の有機炭素源が脂肪酸の合成にはかなり利用され得るが、トリグリセライド、その他の脂質には組み込まれ難いのではないかと考えられる。

NICHOLS²⁾は、*Chlorella* において明条件下では、モノガラクトリピド、ジガラクトリピド、スルホリピド、および諸種のリン脂質が増加し、暗条件下では、トリグリセライド、および遊離脂肪酸が増加することを報告しており、また、SHIBUYA ら³⁾は、グルコースを炭素源として培養した *Chlorella* の bleached cells を、炭素源として炭酸ガスのみを供給して明条件下に培養し、green cells とする過程で、³⁵S がスルホリピドに顕著にとり込まれることを報告している。今回のアサクサノリによる結果は、これら *Chlorella* による結果と大きく相異しており、このことから、アサクサノリは、脂質代謝のうえで、*Chlorella* と何らか相異なることが推測される。

脂肪酸組成をみると、明条件、暗条件いずれも遊離脂肪酸画分中のリノレン酸が、また、一部の画分を除き、20:5酸が、それぞれ相対的に著しく増加することが目立った。20:1酸は、暗条件下において存在比

Table 4. Fatty acid composition of lipids obtained from *Porphyra* sp. before culture.

	TG*	FFA*	MGDG*	DGDG*	SL*
12:0		1.1	0.6		0.1
12:1			0.4	0.4	
13:0	1.7	0.7		0.2	
13:1	2.8	6.0	1.3	1.5	
14:0	4.2	7.5	3.4	3.7	4.9
14:1	4.0	5.8	2.9	1.9	
15:0	2.6		2.1	2.4	
15:1	3.3	5.2		4.4	
16:0	18.4	10.4	25.6	33.3	55.0
16:1	10.2	18.1	7.4	11.9	
17:0			3.0		
17:1	9.3		1.7		
18:0	10.1	6.3	7.4	7.4	4.9
18:1	9.4	5.9	10.1	7.4	4.6
18:2	5.9	4.0	5.5	7.1	3.3
18:3(ω 6)	4.3	3.8	5.8		1.2
18:3(ω 3)	1.5	2.8	2.5		0.5
20:1	3.8	1.5	5.2	1.5	1.3
20:2	0.7	1.2	7.8	1.5	0.9
20:3		0.6	2.6	0.6	1.1
20:4(ω 6)		0.9			0.7
20:4(ω 3)		15.0	1.2	0.7	
20:5	8.1	1.1	2.7	13.9	21.5

Figures are per cent of total fatty acids of each fraction.

* Abbreviations are the same as in the Table 3.

Table 5. Fatty acid composition of lipids obtained from *Porphyra* sp. kept in inorganic medium under the light condition.

	TG*	FFA*	MGDG*	DGDG*	SL*
12:0		0.3	1.0		
13:0		0.3	0.4		
13:1		0.9	0.5		0.1
14:0	3.4	1.3	5.7	0.6	4.3
14:1		2.1	1.5		
15:0	1.3	1.2	1.0	0.2	0.3
15:1		2.8			
16:0	11.0	5.0	29.8	11.8	37.4
16:1	8.8	7.5	7.9	0.7	
17:0		1.9	2.5	1.2	
17:1		2.8		2.2	1.5
17:3				12.2	
18:0	3.6	5.9	4.7	9.4	2.0
18:1	5.4	6.9	2.7	9.2	3.2
18:2	3.3	6.1	2.0	6.3	2.4
18:3(ω 6)	1.3	7.5	3.5		
18:3(ω 3)	2.3	38.0	1.5	0.9	0.9
20:1	6.1	2.9	3.5	1.3	1.7
20:2	2.4			1.4	0.4
20:3	2.5		1.4	2.4	0.4
20:4(ω 6)	4.0		2.5	3.6	1.1
20:4(ω 3)		4.7	2.1		
20:5	44.6	1.7	25.3	36.8	44.2

Figures are per cent of total fatty acids of each fractions.

* Abbreviations are the same as in the Table 3.

Table 6. Fatty acid composition of lipids obtained from *Porphyra* sp. kept in inorganic medium under dark condition.

	TG*	FFA*	MGDG*	DGDG*	SL*
12:0		2.0	0.5		
13:0			0.5		
13:1	0.1	3.4	1.7		
14:0	1.8	4.9	3.4	2.2	0.6
14:1	0.6	2.4	2.3		
15:0	0.5		4.0		0.4
15:1	0.1	4.9	3.2		
16:0	9.3	6.6	18.1	20.1	42.5
16:1	6.6	9.5	10.0		15.3
17:0			7.7		
17:1			8.7	3.5	
18:0	2.1	2.6	5.1		1.6
18:1	3.3	5.1	7.0	8.7	2.2
18:2	2.3	4.0	3.6	6.9	2.7
18:3(ω 6)	1.9		7.7		
18:3(ω 3)	1.8	20.3	3.2		0.6
20:1	7.6	7.0	2.2	5.4	0.9
20:2	2.9				0.3
20:3	2.4	2.1	1.6	6.9	0.4
20:4(ω 6)	3.5	2.3	2.6	6.3	1.3
20:4(ω 3)		9.7	4.9		
20:5	53.1	4.2	8.6	39.8	30.7

Figures are per cent of total fatty acids of each fraction.

* Abbreviations are the same as in the Table 3.

Table 7. Fatty acid composition of lipids obtained from *Porphyra* sp. kept in organic medium under dark condition.

	TG*	FFA*	MGDG*	DGDG*	SL*
11:0		0.6			
11:1		0.4			
12:0		1.1	0.5		
12:1			0.8		
13:0	1.4	0.3	1.6		
13:1	1.6	1.5	1.4		
14:0	2.8	2.2	1.5	0.8	0.5
14:1	2.0		0.4		
15:0	1.5		0.3	0.1	0.1
16:0	26.0	4.1	12.7	28.1	46.0
16:1	6.9	6.4	6.6		
17:0			2.6		
17:1			2.2	4.9	
18:0	8.0	4.9	5.4	9.1	1.0
18:1	8.7		8.0	17.4	2.7
18:2	6.6		5.2	8.4	2.9
18:3(ω 6)	4.9	6.4	3.6		
18:3(ω 3)		45.5	2.5		0.4
20:1	7.1	19.0	6.9	11.3	0.9
20:2	4.6		3.0	5.7	0.3
20:3	1.2		2.5	3.1	0.7
20:4(ω 6)	1.1		3.1		1.3
20:4(ω 3)	0.8	3.9	2.8		
20:5	9.6		24.8	10.9	43.1

Figures are per cent of total fatty acids of each fraction.

* Abbreviations are the same as in the Table 3.

が高くなり、とくに暗条件下、有機培養液のトリグリセライド、遊離脂肪酸、およびジガラクトリピド各画分において著しく高いことが観察された。

さらに、アラキドン酸、および20:4(ω 3)酸は培養前の藻体中にも若干見出されたが、明条件、暗条件いずれも相対的に高くなっていることが観察された。

NICHOLS¹⁾ は *Chlorella* において、正常に光合成をおこなう条件下、すなわち、明条件下、無機培養液では、モノガラクトリピド、ジガラクトリピド、スルホリピド、およびフォスファチジルコリンなどの脂質画分中にリノレン酸が顕著に増加することを報告しており、また MATSUKA ら²⁾ は、同じく *Chlorella* の greening process において、リノレン酸は漸次増加するが、パルミチン酸、オレイン酸、およびリノール酸は培養開始後24時間までは、急速に増加し、その後は減少するか、あるいは、ほとんど変わらないことを報告している。今回のアサクサノリの結果は、変動の主体となる脂肪酸は、リノレン酸に加えて、高度不飽和酸である20:4(ω 3)酸、アラキドン酸、および20:5酸であって、この面からも *Chlorella* と相異なる脂質代謝の様相を示すものと思われる。なお、アサクサノリの脂肪酸組成におよぼす環境要因の影響については、さらに検討を加えたが¹⁴⁾、その結果は別に報告する。林ら¹⁵⁾は、緑藻類と非緑藻類(紅藻類、褐藻類)とで脂肪酸組成のパターンが相異なることをみており、それは系統進化にともなう遺伝的要因によるものであろうと推測しているが、今回の結果も、そのことと関連があるように思われる。しかしながら、これらの相異が微小藻類と大型海藻との相異であるのか、緑藻としての *Chlorella* と、紅藻としてのアサクサノリとの系統発生上の相異にもとづくのか、今後の検討を必要とする問題であらう。

要 約

環境要因にともなう、アサクサノリの脂質の変動の様相を知る目的で、明・暗両条件下において、有機炭素源(主として、シュクローズ)を含有する培養海水と、炭素源として、炭酸ガスを供給する培養海水とで5日間培養したのち、藻体中の脂質をフロリジルカラムならびにシリカゲル薄層で分画し、それぞれの脂質量と、それらの脂肪酸組成を調べた。その結果、

- 1) 明条件下では、トリグリセライドとX成分(恐らく、グリコスフィンゴリピドと思われる)が増加し、その他の糖脂質と遊離脂肪酸の増加はみられなかった。有機炭素源を供給した暗条件下では、遊離脂肪酸が顕著に増加した。その他の脂質も、炭酸ガスを炭素源とする暗条件下のものより高い値を示した。
- 2) 脂肪酸組成の面では、すべての遊離脂肪酸画分中のリノレン酸の増加と、一部の脂質画分を除き、20:5酸の増加が目立った。20:1酸、および20:4酸も一部の脂質画分で増加することがみられた。

以上の結果から、アサクサノリは、シュクローズのような有機炭素源を、脂肪酸合成に利用し得ること、ならびに脂質代謝に関して、緑藻類の *Chlorella* との相異点を有することなどが考察された。

引用文献

- 1) NICHOLS, B. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 274-279 (1965).
- 2) MATSUKA, M., OTSUKA, H., and HASE, E.: *Plant Cell Physiol.*, **7**, 651-662 (1966).
- 3) SHIBUYA, I., and HASE, E.: *ibid.*, **6**, 267-283 (1965).
- 4) ROSENBERG, A., and PEKER, M.: *Biochemistry*, **3**, 254-258 (1964).
- 5) 岩崎英雄・松平近義: 同誌, **20**, 112-119 (1954).
- 6) 佐藤孜郎・佐藤美和・伊藤啓二・松本文夫: 日水誌, **25**, 661-666 (1959).
- 7) 伊藤啓二・佐藤孜郎・佐藤美和・松本文夫: 同誌, **26**, 938-943 (1960).
- 8) 野田宏行・堀口吉重: 同誌, **37**, 992-995 (1971).
- 9) 堀口吉重・野田宏行: 同誌, **37**, 996-1001 (1971).
- 10) 三田喜代: 同誌, **26**, 1010-1012 (1960).
- 11) 山田信夫: 同誌, **27**, 953-957 (1961).

- 12) 山田信夫：同誌，**30**，908—911 (1964).
- 13) O'BRIEN, J. S., and BENSON, A. A.: *J. Lipid Res.*, **5**, 432-436 (1964).
- 14) 鹿山光・佐藤孜郎・井上晃男・中川平介・堀井郁夫・浅川末三：日本水産学会昭和44年秋季大会，講演番号319.
- 15) 林賢次・黄田茂・加藤和昭・山田実：日本誌，**40**，609—617 (1974).

SUMMARY

In order to get a better knowledge of the effects of environmental factors on the lipid components, the fronds of laver, *Porphyra* sp., were cultured in the organic and inorganic media under light and dark conditions for five days. The extracted lipids were fractionated by means of Florisil column chromatography and Silica gel G thin-layer chromatography. The results can be summarized as follows.

- 1) Under light condition, it was observed that the triglycerides and the X components (possibly glycosphingolipids) increased, while the galactolipids, the sulfolipids and the free fatty acids did not. On the other hand the lipids of laver cultured in the organic medium under dark conditions contained a remarkable amounts of free fatty acids and larger amounts of other lipid components than those cultured by the inorganic medium.
- 2) In the fatty acids composition, the proportion of 20 : 1, 20 : 4 and 20 : 5 acids mainly changed in every condition.

From these results, it was concluded that the fronds of *Porphyra* sp. are able to utilize organic carbon sources such as sucrose. Moreover, phylogenetic differences on the lipid metabolism between red alga *Porphyra* and green alga *Chlorella* were discussed.