

〈学位論文の紹介〉

天然色素の有効利用をめざして：  
色素の単離・安定化及びその機能について

石井 麻子

稲田 祐二 (監修)

桐蔭人間科学工学センター教授

桐蔭横浜大学大学院工学研究科博士課程材料工学専攻の石井麻子は本年3月、工学博士の学位を取得した。本論文は天然色素の有効利用をめざし、天然色素の簡単な単離法の確立、不安定な色素の安定化、さらに機能の発現について試みたものである。

「野草自ずから香る」という言葉は、野に咲く一輪の花の色と香りに魅せられ、自分の人生もかくありたいとの想いを表しているのであろう。このように自然の美しさを象徴するものの一つは天然色素であり、優雅で淡泊、可憐な色を持つ植物が野に山に満ち満ちている。自然の創り出したこれらの天然色素を人は愛で、ある人は詩に詠み、絵に描き、心を慰め、人生航路の糧としている。しかしながら「花の命は短くて……」の言葉のように、美しい花の色は日毎に退色するのを私たちは惜しみながらもいかんともなし難い。

色のある生き物の中で代表的な色素は植物の持つ葉緑素(クロロフィル)と動物の持つ血色素(ヘム)である。前者は光合成、後者は体内での酸素運搬を司る重要な機能を持つが、いずれもタンパク質と結合した状態で機能を発現するポルフィリン系の色素である。カニの甲羅、野菜のトマト、パプリカ、花のサフランはカロテノイド系色素、赤キャベツ、ハイビスカスの花の色はアントシアニン系色素であり、その他にもフラボノイド系色素(紅花の花)などがある。図1は主要な天然色素の化学構造を示し、ポルフィリン系色素のクロロフィルa(緑葉)、カロテノイド系色素の $\beta$ -カロテン(ニンジン)及びアスタキサンチン(カニの甲羅)、アントシアニン系色素のシアニジン(ハイビスカスの花)、フラボノイド系色素のカルサミン(紅花の花)、アザフィロン系色素のモナスコルブリン(紅麴菌)、その他としてポルフィリンの開環したフィコシアノビルン(ラン藻)である。

天然色素は合成着色料にはない独特の色調を帯び、天然物であるがゆえに安全というイメージを私たちに与える。さらに、色素自体が生理機能に重要な役割を果たす場合がある。しかし、原料が天然物であるため産地、気候の変動により品質の均一性、含量の変動を生じる。また、一般に極めて不安定であり、光、酸素、熱、pHに対して敏感に反応し、変色、退色を起こすなど問題点も少なくはない。現在天然色素の利用は狭い範囲に限られ、例えば、食品に色付けするための添加剤、化粧品の素材の一部などである。本研究は天然色素の利用の拡大をめざし、まず色素の簡単な単離法の確立、また天然色素分子にタンパク質あるいは粘土鉱物を結合させたハイブリッド物質を創製し、天然色素の安定化及びその機能の発現をめざしたものである。この研究が将来人工光合成の成功につながることを期待している。

天然色素の利用の拡大のためには、まず天然色素を大量に簡単に単離する必要がある。そこで、大量培養の確立しているラン藻スピルリナに着目し、その中に含まれるフィコシアニン、クロロフィルa及びカロテノイドの単離法を確立した。すなわち従来の方法を改善し、細胞の構造を破壊することなくフィコシアニンを抽出することに成功したため、不純物の混入が抑えられ、簡単な操作で再現性よく単離する方法を確立している。さらにその残さより紫外光を吸収し、可視部に青い蛍光を発する物質を発見

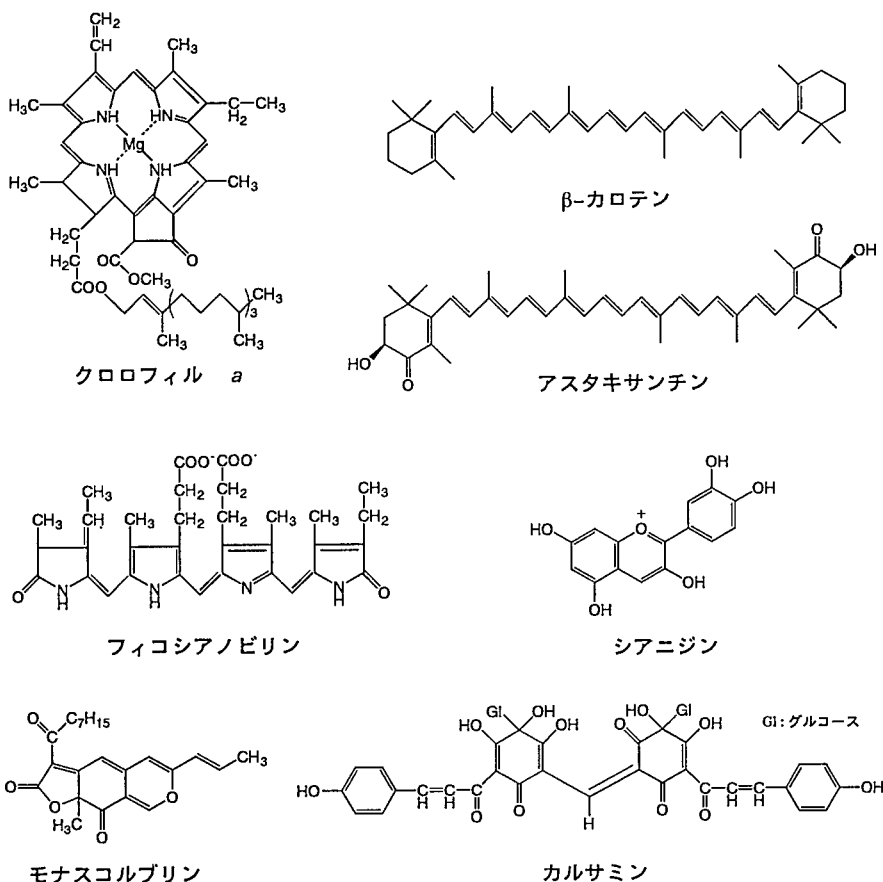


図1 天然色素の化学構造

し、その物質を単離し、ピオプテリンにグルコースが1分子結合したピオプテリングルコシドと同定した。またフィコシアニンは発色団であるフィコシアノビルンとタンパク質が化学的に結合した色素タンパク質であることより、色素の発色とタンパク質の構造との関係を調べ、色素の発色にタンパク質の高次構造が密接に関与することを証明している。

多くの天然色素は生体内においてタンパク質と化学結合あるいは相互作用により安定であるが、天然色素を生体内より取り出すと極めて不安定で光等により変色、退色を起こしやすい欠点がある。そこで脂溶性の天然色素であるクロロフィルa、β-カロテン及びアスタキサンチンを絹の主成分であるタンパク質フィブリンと複合化した。その結果、脂溶性色素-フィブリン複合体は可視光及び紫外線照射に対し高い安定性を示す。またクロロフィルaを層状粘土鉱物である天然スメクタイトのベントナイト（モンモリロナイト）あるいは合成スメクタイト（ヘクトライト）に吸着させたクロロフィルa-ベントナイト複合体あるいはクロロフィルa-合成スメクタイト複合体は、水に分散させた状態において可視光照射に対し高い安定性を獲得する。さらにクロロフィルaの吸着量が増加すると複合体の吸収極大波長の長波長側への移行が観察され、長波長側への移行に伴い光照射に対する安定性も増加する。ベンゼン中のクロロフィルaが665 nmに吸収極大波長を示すのに対し、クロロフィルa-ベントナイト複合体は675 nmまで吸収極大波長が長波長側へ移行する。緑葉中のクロロフィルaが678 nmに吸収極

大波長を示すことから、クロロフィル a はスメクタイトに吸着することにより生体内の状態に近づいたため安定化したと考えている。合成スメクタイトは粒径が小さく均一で不純物が少ないため、水に分散させると無色透明なコロイド溶液となる。クロロフィル a - 合成スメクタイト複合体はクロロフィル a が水に不溶であるにもかかわらず、水に分散させると美しい緑色の透明なコロイド溶液となると述べている。

クロロフィルは緑葉中において光合成の初期過程である水の光分解反応を担うなど、生体内で重要な役割を果たしている。そこで、光に対する安定性を獲得したクロロフィル a - スメクタイト複合体の機能の発現について調べた結果、複合体を酸化還元色素であるニトロブルーテトラゾリウム (NBT) を含むリン酸緩衝液に分散させ可視光を照射したところ、50 時間にわたり NBT を還元する現象を観察している。

以上の研究成果を表 1 にまとめているが、本研究では天然色素の単離より安定化・機能発現に至る一連の問題点を解決した。

21 世紀を間近に控え、現在最大の問題は地球環境の悪化であり、炭酸ガスの過剰の放出が地球の温暖化につながっている。一方植物は天然色素クロロフィルにより太陽エネルギーを吸収し、炭酸ガスと水より光合成反応で有機物を合成している。本研究は次世代に開花すると期待される人工光合成の成功を夢み、まず最初のステップとしてクロロフィルを含む天然色素の安定化法を確立するのみならず、その機能発現に成功した研究であり、その独創性は高く評価される。

本論文で述べられた研究は 4 報の論文として国際誌に掲載され、また国内の学会では 11 報を発表し、総説 1 報が国内誌に掲載されている (表 2)。

表 1 天然色素の有効利用をめざした研究のまとめ

天然色素	研究の概要	結果
フィコシアニン クロロフィル a カロテノイド	ラン藻スピルリナからフィコシアニン色素の簡単な単離法の確立及びその発色機構について。	抽出、等電点沈澱、陰イオン交換樹脂による精製の 3 段階の操作でも純度の高いフィコシアニンが得られた。 フィコシアニンの発色にはタンパク質の高次構造が関与していた。
蛍光物質	スピルリナ中の紫外線を吸収し可視に蛍光を発する物質の同定及びその機能について。	ピオプテリンにグルコースが結合している物質であり、紫外線防御作用を示した。
クロロフィル a β-カロテン アスタキサンチン —フィブロン複合体	脂溶性天然色素を絹の主成分であるタンパク質のフィブロンに吸着させた複合体の光安定性について。	可視光、紫外線のいずれの照射に対しても高い安定性を示した。
クロロフィル a —合成スメクタイト複合体	クロロフィル a を合成の粘土鉱物に吸着させた複合体の光安定性について。	複合体は水に分散させると緑色の透明な溶液状となり吸収極大波長の長波長側への移行を伴い光安定性の増加が見られた。
クロロフィル a —ベントナイト複合体	クロロフィル a を天然の粘土鉱物に吸着させた複合体の光安定性及び光増感作用について。	複合体は光に対して安定となり、可視光照射により酸化還元色素であるニトロブルーテトラゾリウムを還元し続けた。

表2 本研究に関連する論文及び学会発表

## (1) 国際誌掲載論文

1. Hitoshi Kageyama, Asako Ishii, Takahito Matsuo, Yoh Kodera, Misao Hiroto, Ayako Matsushima and Yuji Inada, Simple isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* and phycocyanobilin-protein interaction, *J. Marine Biotechnol.*, 1 (4), 185-188, 1994
2. Asako Ishii, Makoto Furukawa, Ayako Matsushima, Yoh Kodera, Akira Yamada, Hirokazu Kanai and Yuji Inada, Alteration of properties of natural pigments by conjugation with fibroin or polyethylene glycol, *Dyes and Pigments*, 27 (3), 211-217, 1995
3. Asako Ishii, Tetsuji Itoh, Hitoshi Kageyama, Tomoki Mizoguchi, Yoh Kodera and Yuji Inada, Photostabilization of chlorophyll a adsorbed onto smectite, *Dyes and Pigments*, 28 (1), 77-82, 1995
4. Asako Ishii, Tetsuji Itoh, Yoh Kodera, Ayako Matsushima, Misao Hiroto, Hiroyuki Nishimura and Yuji Inada, Photostable chlorophyll a-bentonite conjugate exhibits high photosensitive activity, *Res. Chem. Intermed.*, 23 (8), 683-689, 1997

## (2) 国内誌掲載総説

1. 石井麻子, 稲田祐二, 「天然色素の色彩を保つ -不安定な色素の安定化-」, *現代化学*, 3, 24-28, 1995, 東京化学同人

## (3) 学会発表

1. 石井麻子, 松岡貴人, 影山 均, 松島瑞子, 小寺 洋, 広戸三佐雄, 稲田祐二, ラン藻 *Spirulina platensis* から phycocyanin の単離及びその性質, 第66回日本生化学会大会, 1993年10月2-4日(東京)
2. 影山 均, 小寺 洋, 石井麻子, 伊藤徹二, 松島瑞子, 西口宏泰, 安保正一, 稲田祐二, クロロフィル-モンモリロナイト複合体, 日本MRS第5回年次総会・学術シンポジウム,

1993年12月9-10日(神奈川)

3. 石井麻子, 伊藤徹二, 松島瑞子, 小寺 洋, 稲田祐二, 天然色素-フィブロイン複合体の光安定性, 日本MRS学術シンポジウム, 1994年7月11-12日(神奈川)
4. 石井麻子, 山田 晃, 松島瑞子, 小寺 洋, 稲田祐二, 天然色素-フィブロイン複合体の光安定性, 第67回日本生化学会大会, 1994年9月7-10日(大阪)
5. 伊藤徹二, 石井麻子, 溝口智樹, 松島瑞子, 小寺 洋, 稲田祐二, クロロフィル-スメクタイト複合体の光安定性, 日本MRS第6回年次総会・学術シンポジウム, 1994年12月8-9日(神奈川)
6. 石井麻子, 伊藤徹二, 小寺 洋, 松島瑞子, 広戸三佐雄, 稲田祐二, 天然色素の安定化, 繊維学会・第12回生体繊維と生医学材料に関するシンポジウム, 1995年6月27-29日(東京)
7. 石井麻子, 伊藤徹二, 溝口智樹, 松島瑞子, 小寺 洋, 稲田祐二, クロロフィル-スメクタイト複合体の光安定性, 第68回日本生化学会大会, 1995年9月16-18日(宮城)
8. 伊藤徹二, 石井麻子, 小寺 洋, 広戸三佐雄, 松島瑞子, 西村裕之, 稲田祐二, PEG-chlorophyllinの光安定性と光増感作用, 日本MRS第7回年次総会, 1995年12月7-8日(神奈川)
9. 石井麻子, 伊藤徹二, 小寺 洋, 松島瑞子, 広戸三佐雄, 西村裕之, 稲田祐二, クロロフィル-ベントナイトによるNBTの光還元, 第69回日本生化学会大会, 1996年8月26-30日(北海道)
10. 石井麻子, 伊藤徹二, 小寺 洋, 松島瑞子, 広戸三佐雄, 西村裕之, 稲田祐二, クロロフィル-ベントナイト複合体による光増感作用, 繊維学会・第14回生体繊維と生医学材料に関するシンポジウム, 1997年6月18-20日(東京)
11. 伊藤徹二, 吉田 崇, 石井麻子, 小寺 洋, 松島瑞子, 西村裕之, 稲田祐二, クロロフィル-スメクタイト複合体の光化学的挙動, 第70回日本生化学会大会, 1997年9月22-25日(石川)