

総合論文

カロテノイドの生化学的研究

高木 茂 明

(生物資源開発学)

Studies on the Biochemistry of Carotenoids

Shigeaki Takagi

(Department of Bioresources Chemistry)

Green leaf carotenoids mainly composed of lutein and β -carotene were studied regarding their its biochemical and physicochemical properties from new stand points in research. This review contains the following contents ; 1) Compositions of leaf carotenoids vary by season and temperature effects this phenomenon. 2) Lutein was isolated from spinach leaves as a crystal. 3) Lutein inhibits spinach lipoxygenase activity, and the addition of a small amount of vegetable oil to feed grasses will keep their yellowish color. 4) Lutein disperses in aqueous systems, for example, protein solution, surfactant solution, dilute acetone aq. solution, to make chiral molecular aggregates. This phenomenon suggests some probabilities, for example, an electron conductor in chloroplast or a biotip for a light switch. 5) When lutein is used together with carotene, human leukemia cells differentiate more clearly than by a single addition of carotene. This means that lutein has a synergistic activity for carotene in control of cancers. 6) Behaviors of absorption and metabolism in the intestine were examined with both hens and quails as carotenoid-accumulating animals and rats as non-accumulators. The former accumulate lutein in the body, while in the latter lutein is missing after absorption. 7) β -Carotene cleavage enzyme and retinal reductase were studied *in vitro* regarding revised assay methods and some enzymatic properties. 8) A new method of separating palm carotene from crude palm oil was developed for the palm edible oil industry.

Key words : β -carotene, lutein, lutein aggregate, absorption and metabolism of carotenoids

緒 言

カロテノイドを研究対象にすることを決心したのは、27年前に岡山大学農学部に来たときからである。当時、生物化学研究室の中心的研究・教育課題の1つとして挙げられていたこと、設備や経費その他を配慮すると同時にアイデアをだしていくこと、研究者が比較的少ない研究対象であることなどを選択の理由としたためである。事実、そのころの日本でのカロテノイドに関する研究者は10指に満たないくら

いであった。また試薬として市販されているカロテノイドも β -カロテンの合成品だけであり、研究対象にする試料は自ら調製する必要があった。乏しい研究費をランニングコストにして学生たちを教育すると同時に研究成果を上げていくための厳しい選択であったと思う。

思えば大学院時代5年間はアズキ種子蛋白質の発芽時代謝挙動を酸性プロテアーゼ活性サイドから調

Received October 1, 1997

べる研究生活を送り、その後、日本油脂(株)で“界面活性剤の応用研究”に4年間従事した。これが私の脂質との濃い出会いとなった。その後、神奈川県立栄養短期大学に赴任し、食品栄養学の何たるかを体得する貴重な経験を得た。岡山大学農学部においては結果的に選んだテーマが『カロテノイドの生化学的研究』であった。そうして、カロテノイド源としては躊躇無く緑葉を選んだ。植物においてエネルギー獲得と物質生産の主要な器官であるクロロプラストにはカロテノイドがクロロフィルと一緒に存在しており、光合成における物質生産への関与と、食品・栄養学的面でカロテノイドの新しい研究展開が図れるかもしれないと考えたからである。緑葉カロテノイドを実際に研究題材として取り上げたあとで、カロテンよりもルテインなどキサントフィル類に的を絞った。ルテインは比較的大量に緑葉に存在し、実験材料として調製しやすく保存も容易な扱いやすい研究材料であった。このような年代を追っての追憶から、このテーマについて自分がやってきた研究の抄録を残すのは自身の研究過程を振り返ること以外に、関係する研究者の方々の眼に留って、なんらかのお役に立てれば幸いと思ったからである。

1. 緑葉カロテノイド組成の季節的変動^{1,2)}

緑葉に存在する主なカロテノイドはβ-カロテン、ルテイン、ピオラキササンチン、ネオキササンチン、アンセラキササンチンの5種 (Fig. 1) であるが、その組成が季節的に変動することはほとんど知られていなかった。光合成の場であるクロロプラスト (チラコイド) にはクロロフィルと共に著量のカロテノイドが存在し、そのほとんどはチラコイド膜に在る³⁾。これら緑葉カロテノイドの組成比は固定されているものではなく、季節によって変動することが明らかとなった。季節ごとに採取した各種緑葉からカロテノイドを抽出し順相 HPLC によって定量分析した (Table 1)。常緑樹葉の結果から四季のうち春から秋までの成長の盛んな時期にβ-カロテンが多く、晩秋から早春までの寒い休眠期にルテインの多いことがわかった。野菜など草本植物についても同じ傾向があり、暖かい時期の野菜にはβ-カロテンが多く、冬期の野菜にはルテインが多い。このことは光合成に対する両主要カロテノイドの関与の仕方が異なることを示すと同時に、緑黄色野菜からのプロビタミンAの供給量が同一量の野菜を摂取したとき夏には

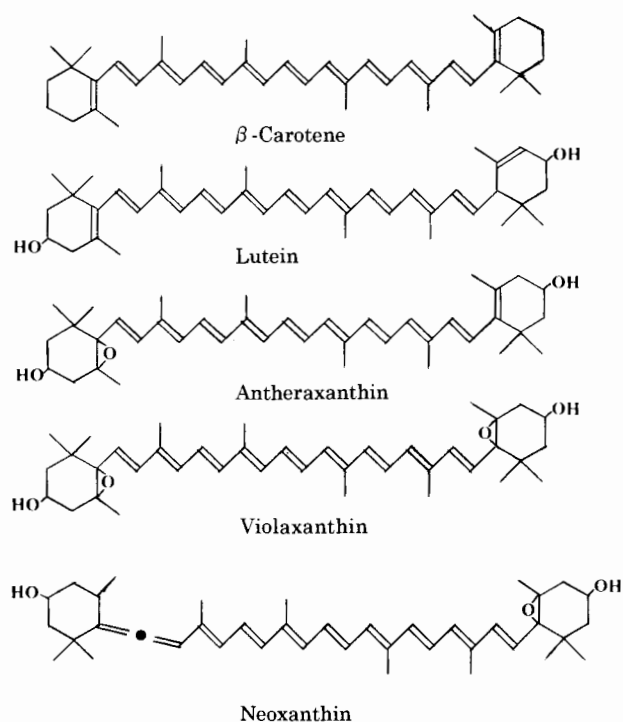


Fig. 1 Carotenoids in Green Leaf.

多く、周期的に変動することを示している。

この緑葉カロテノイド組成の季節による変動は気象条件によって起こるので、ブドウの鉢植え用いて気温の影響を、また大根幼植物を用いて光強度の影響を調べた (Fig. 2, Fig. 3)。光量が一定のとき気温がカロテノイド組成に大きな影響を与えており、一方光量は気温20℃、と27℃で0.3 J以上になるとカロテノイド組成にほとんど影響を及ぼさない。岡山における光の強さは5月から9月までは0.5—0.8 J cm⁻²min⁻¹であり、冬期は約0.3 Jであるので、緑葉カロテノイド組成の季節的変動の主因子は光強度よりもむしろ気温であると結論づけた。この結果から、冬期のハウス栽培などはカロテン含量の高い野菜を供給していることにもなる。

2. 緑葉からルテインの単離⁴⁾

緑葉の主カロテノイドのうちルテインを研究対象とするため単離調製した。ハウレンソウ葉10kgからクロロフォルム (Ch) : メタノール (MtOH) = 2 : 1, v/v 混液で脂質を抽出し、抽出液をベンゼン (Be) 溶液としてシリカゲル吸着クロマトグラフィーに供した。溶出は Be 中のジエチルエーテル (Ether) 濃度を段階的に上げた Be/Ether 混液により順次行い、主として Be : Ether = 6 : 4 の溶媒で溶出する赤とう

Table 1 Composition of Leaf Carotenoids in Summer and in Winter

Plants	Carotene (%)	Lutein (%)	Antheraxanthin (%)	Violaxanthin (%)	Neoxanthin (%)	Crocetin (%)	Total carot. ($\mu\text{g}/10\text{ g fresh weight}$)
(In summer)							
Carrot (<i>Daucus carota</i> var. <i>sativus</i>)	45.5	28.2	8.5	9.1	8.7	0	743.5
Maize (<i>Zea mays</i> L.)	50.0	37.0	6.3	4.2	2.5	0	1,389.0
Soya (<i>Glycine max</i> Merrill)	50.6	33.6	6.3	3.3	5.4	0.8	1,376.0
Perilla (<i>Perilla frutescens viridis</i> Makino)	41.4	26.0	8.8	13.7	6.0	4.0	2,233.0
Cherry (<i>Prunus yedoensis</i> Matsum.)	36.1	35.3	5.7	16.6	6.3	0	2,142.4
Maple (<i>Acer palmatum</i> Thunb.)	36.4	40.7	5.6	11.1	6.3	0	3,158.4
Azalea (<i>Rhododendron indicum</i> Sweet)	30.1	33.9	8.4	13.6	9.1	0	1,436.0
Spindle tree (<i>Euonymus japonica</i> Thunb.)	28.9	34.2	8.0	15.6	13.2	0	630.8
(In winter)							
Radish (<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>acanthiformis</i> Makino)	28.4	47.7	8.0	8.6	7.3	0	1,058.0
Lettuce (<i>Lactuca scariola</i> L. var. <i>sativa</i> Bisch)	28.5	44.5	8.8	9.9	8.3	0	1,019.5
Cabbage (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L.)	17.9	36.3	15.3	14.2	13.5	0	1,731.3
Leaf mustard (<i>Brassica juncea</i> Czern. et Coss.)	20.3	33.5	18.9	15.2	6.2	0	2,175.3
Azalea (<i>Rhododendron indicum</i> Sweet)	22.1	42.1	11.9	11.2	5.2	0	2,022.0
Spindle tree (<i>Euonymus japonica</i> Thunb.)	34.5	42.1	9.9	7.5	6.1	0	789.5

色の太いバンドの画分がルテインである。溶媒をほとんど溜去後少量のアセトンに溶かして -25°C に置くと約48hrで赤色の結晶が多量に析出してくる。再結晶して得られた柱状結晶の収量は730mg, mp. 176°C , 室温でEther, アセトンに易溶であるが石油エーテル, MtOH, Chには難溶である。EtOHに溶かしたルテインは典型的な可視吸光スペクトルを示し, 60 Mhzのプロトン NMRの比較的高磁場の τ 値は文献値⁵⁾と良い一致を示した。また, MS分析(70 ev, イオン源温度 270°C , プローブヒーター 150°C , ルテイン結晶の0.1%アセトン溶液の直接導入)によると M^+ として m/e 568を示し, さらにフラグメントイオンである m/e 550 (M-H₂O), 532 (M-2H₂O), 476 (M-92), 458 (M-92-H₂O), 444 (M-106-H₂O)などを示し文献値^{5,6)}と良く一致した。

3. ルテインによるハウレンソウリポキシゲナーゼ活性阻害^{7,8)}

リポキシゲナーゼ(LP)は大豆中に初めて見い出され, その後アルファルファ⁹⁾など飼料用刈り取り緑葉中のカロテノイドの退色を触媒する酵素としてクロプラスト¹⁰⁾やミトコンドリア¹¹⁾などに存在することが示されている。動物にも普遍的に存在し, アラキドン酸からプロスタグランジン生成の初発反応を触媒することが知られている。ルテインはクロプラストに存在することから, ルテインとLPの間には細胞生理学的, 生化学的關係のあることが考えられる。in vitroにおいてリノール酸を基質としたときのハウレンソウLPの酸素吸収活性はルテインによって阻害を受けるが, 活性阻害が大きくなるとルテインの退色度も大きくなることから, それまで言われて来たLPの作用によって生成したヒドロキシパーオキシド(HPO)との共役酸化によってカロテ

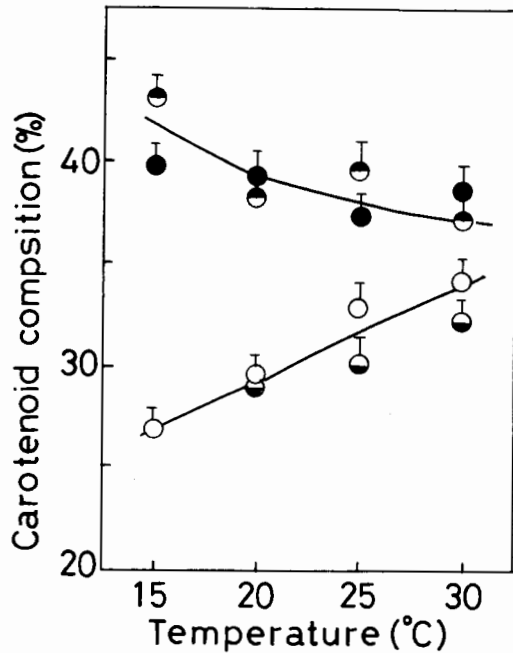


Fig. 2 Effects of Temperature on Compositions of β -Carotene and Lutein in Grape Leaves.
 ○—○, β -carotene in newly matured leaves;
 ○—○, β -carotene in mature leaves;
 ●—●, Lutein in newly matured leaves;
 ○—○, Lutein in mature leaves.

ノイドが退色するという説¹²⁾に疑問を抱き、ルテインによる LP 活性の阻害機構を調べた。

(LP 活性測定法)；所定量のリノール酸に0.1Mリン酸緩衝液, pH7.0を加え, さらに Tween-20を加えて乳化させ, 1 NNaOHを加えてほぼ透明にしたあと同緩衝液にてメスアップしリノール酸基質溶液とする。ルテインは1% Triton X-100を含む0.1Mリン酸緩衝液, pH7.0溶解して供試した。ルテイン濃度は $E^{1\%}_{1\text{cm}}$, 446nm=2344 (in EtOH) を用いて測定した。酵素活性はリノール酸基質溶液1.9ml, 1 mM EDTA 0.1ml, 緩衝液0.5ml, 酵素溶液0.5mlの反応系組成によりワールブルグ検圧計を用いて酸素吸収量を測定した。ルテインなど阻害剤その他添加物を加えるときはその0.2ml溶液を反応系のリン酸緩衝液の0.2mlと入れ替えた。反応系におけるルテイン退色は分光光度計セル中で直接 incubate し, ΔAbs_{453} を経時的に測定した。

ハウレンソウ葉のアセトン粉末を出発材料とし1% Triton X-100溶液, pH7.0で抽出し CM-セルロースカラムクロマト及び Sepadex-G-200ゲルろ過によってクロロプラストにおける LP 活性の約25倍にま

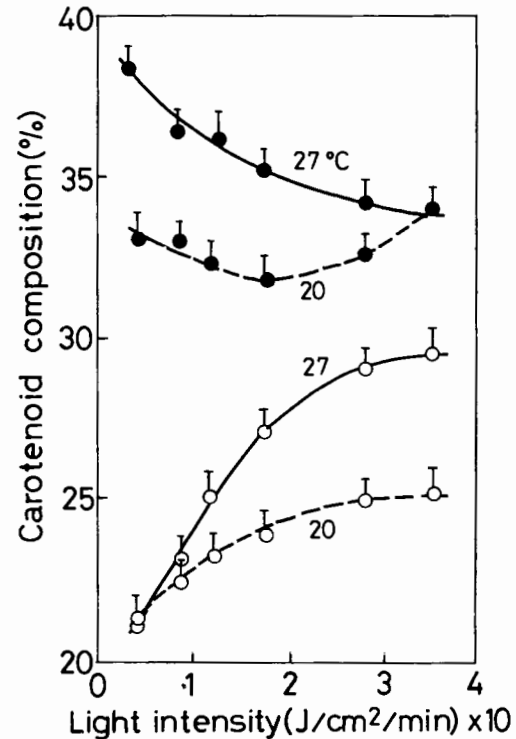


Fig. 3 Effects of Light Intensity on Carotenoid Compositions of Radish Leaves.
 ○—○, β -carotene; ●—●, lutein.

で部分精製した酵素を得た。これは酸素吸収活性とルテイン退色活性のピークが一致し, CN^- によって活性が低下しない酵素標品であった。この酵素標品は破壊されたクロロプラスト膜と結合していると考えられるが, 水溶性でありゲルろ過による推定分子量は80万以上であった。

LP 活性に及ぼすルテインの作用機作を調べた。ハウレンソウ LP の作用最適pHは7.0, pb^+ は活性を阻害し, Cu^{2+} は促進し, 抗酸化剤の NDGA は活性を完全に阻害する。ハウレンソウクロロプラスト (intact) を用いたとき LP の酸素吸収活性に及ぼすルテインの影響は小さく, Triton-X-100水溶液で抽出した標品の LP 活性はルテインによって intact の約30倍の大きい阻害を受けた。これは LP がクロロプラストの内部に存在していることを示すものであろう。酸素吸収活性とリノール酸濃度との関係から Km 値は $6.67 \times 10^{-3} \text{M}$ であり, ルテイン存在下でリノール酸濃度が高いと (Km 値以上) 酸素吸収活性は抑えられる。いっぽう, ルテインは Km 以上で退色しにくくなっており, リノール酸の高濃度のときは酸素吸

取とルテイン退色の両方が抑えられることがわかった (Fig. 4). ルテイン濃度を変えてホウレンソウ LP の活性阻害効果を調べると, 全酸素吸収活性の阻害とルテイン退色度とは正比例の関係にあるが, ルテイン量が増すと酸素吸収量は抑えられ, いっぽう, 退色度は増大する (Fig. 5). もしリノール酸 HPO との共酸化によってカロテノイドの退色が起こっている¹²⁾とすれば, 酸素吸収が抑えられればルテイン退色も抑えられて当然であるが結果は異なる. このことはリノール酸が酸素をルテインに渡す carrier であり, ルテインは別のなんらかの機構でリノール酸の酸素吸収を阻害していることを示している.

以上の反応機構を調べるため, ルテインが存在するとき生成する HPO を酸素吸収量と同時に定量し,

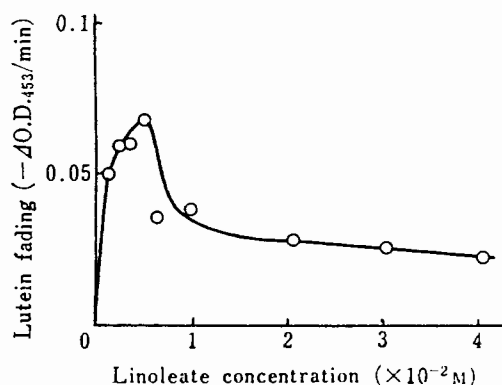


Fig. 4 Effects of Linoleate Concentration on Lutein Bleaching.
Enzyme, 0.236 mg/ml ; lutein, 1.23 M.

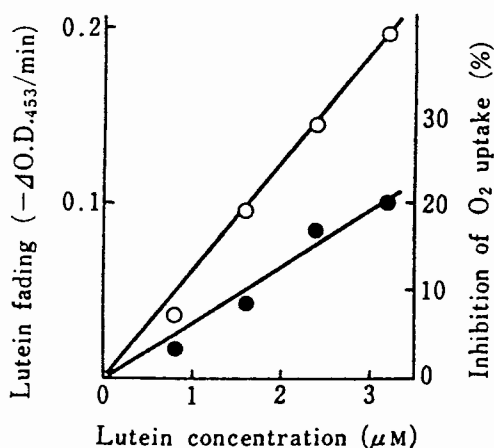


Fig. 5 Effects of Lutein Concentration on Inhibition of O₂ Uptake and Lutein Bleaching Activities.
Enzyme, 0.470 mg/ml ; linoleate, 6.33×10^{-3} M.
○—○, lutein bleaching ; ●—●, inhibition of O₂ uptake.

酸素吸収量から生成が予想される計算量の HPO との関係調べた (Table 2). ルテイン無添加区で吸収された酸素の大部分はリノール酸 HPO 生成に使われているが, ルテイン添加区では HPO 量は酸素吸収量から求めた値よりかなり小さく, この差に相当する酸素量がルテイン退色に使われていると考えられる. 4×10^{-2} M リノール酸・ルテイン添加区において, 1.08 μmole の酸素がルテインとモル比 1:1 で反応をしたとすると約 1/4 のルテインが酸化されたことになり, リノール酸が酸素と反応した割合 (1.32 μmole/122.4 μmole) と比べルテインはみかけ酸素との反応性に極めて富んでいる.

ここでルテインの退色機構を考えて見る. ルテインだけでは LP があっても酸素を吸収しないし, 退色もしない. 微量のリノール酸の存在で初めてルテインは LP によって酸素吸収と退色を受ける. ところが, あらかじめリノール酸を酵素と共に preincubation し, これにルテインを加えると preincubation の時間が15分を超えるとルテインの退色は強く抑えられ, 通常時の約10%程度である. このことはルテインが HPO と反応しないことを意味し, むしろパーオキシラジカルとのラジカル反応によって酸化されると考えられる. いっぽう, ルテイン及びルテイン退色生成物は共に LP によるリノール酸酸化(酸素吸収)を阻害する. これらの結果から, Fig. 6 の式(1), (2)が LP によるルテイン退色とリノール酸酸化機構の関係を示している.

動植物界に広く存在する LP はその細胞内での役割, 作用機作, 調節機構については現在でも不明の

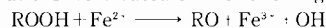
Table 2 Correlation between the Determined Hydroperoxides and the Calculated Hydroperoxide from Oxygen Uptake

Linoleate concentration $\times 10^{-2}$ M	Hydroperoxide ^{a)} (μmole)			
	No lutein		Lutein	
	Calculated from ^{b)} oxygen uptake	Determined	Calculated from ^{b)} oxygen uptake	Determined
4.08	2.98	2.62	2.40	1.32
2.04	2.24	2.21	1.80	1.32

Enzyme, 0.470 mg/ml ; lutein, 3.80 μM

a) Values for 15 min reaction.

b) These calculations were based on the following equation¹⁰⁾.



Thus one gram equivalent hydroperoxide reacts with one gram iron ferrous.

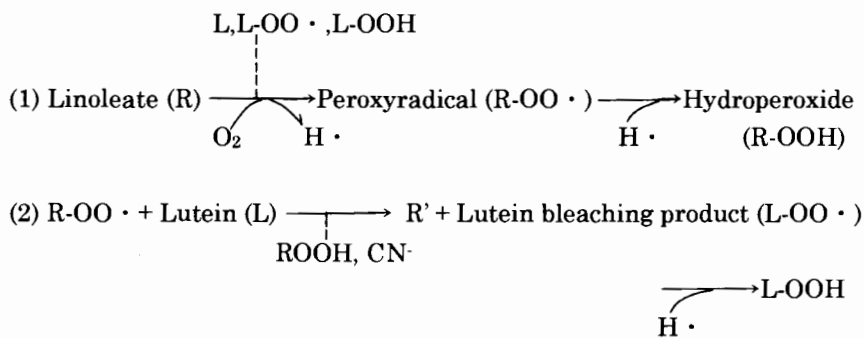


Fig. 6 Equations of Oxygen Uptake by Linoleate and Lutein Bleaching Reactions.

Lipoxygenase catalyses both reactions in equation (1), while lutein-bleaching enzyme, the existence of which still appears doubtful, may be supposed to catalyze the reaction in equation (2). Dotted lines exhibit inhibition. R' may differ from linoleate.

点が多く, LP 活性をカロテノイドが阻害することは両者が共存するクロロプラストにおいてとくに興味深い。なお, ルテインと共に緑葉の主要カロテノイドである β -カロテンも同様の阻害活性を示した¹³⁾。これらの結果の農業への応用としては, 飼料作物として収穫されたアルファルファにおいて緑葉カロテノイドが LP によって退色⁹⁾することを防ぐためには不飽和脂肪酸を含む植物油をサイロ充填の際に存在するカロテノイドと等モル以上加えれば退色は防げるといことが考えられるが実験はしていない。

4. 水系におけるルテイン集合体形成

4-1. 蛋白水溶液中でのルテイン集合体形成¹⁴⁾；脂質であるルテインが蛋白水溶液に簡単に分散し, みかけ溶解することがわかり, 蛋白質とルテインとの結合様式について調べた。エタノールに溶解させたルテインが446 nm に λ max を示すのに対し蛋白水溶液に分散させた場合391 nm に大きくシフトしていた (Fig. 7)。この現象は界面活性剤の水溶液に可溶化したときにも見られ¹⁵⁾, ルテイン分子の π 電子がなんらかの理由で拘束されて光によって励起しにくくなったためと考えた。そこで, 蛋白質とルテインの相互作用について検討を加えた結果, ルテイン/蛋白比 (w/w) が高い場合 (5×10^{-3} 以上) 及び蛋白の等イオン点に近い pH の場合着色した沈殿が生じ, 沈殿中の蛋白とルテインの回収率は95%以上であった。このことから, 蛋白とルテインとの複合体形成が考えられ, ゲルろ過の結果は, ルテインが蛋白質と結合していること, 及び蛋白質が会合体を作っていることを示した。卵白アルブミン (OVA) の場合分子量は45,000から240,000に, アズキグロブリン (AP) のとき370,000が507,000になった。AP-ル

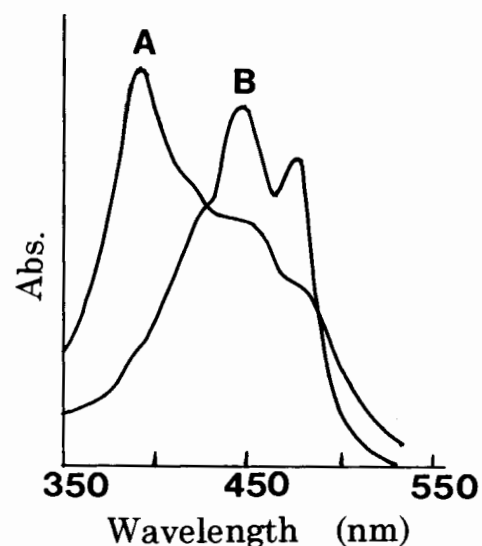


Fig. 7 Absorption Spectra of Lutein Ethanol Solution (B) and Lutein-Protein Complex aq. Solution (A). λ max of A is 391 nm while that of B is 446 nm.

テイン複合体の系にカチオン界面活性剤を加えると蛋白質が沈殿するが陰イオン (SDS) 及び非イオン界面活性剤 (Tween-80, Triton-X-100) は透明な着色溶液の状態を保つ。これをゲルろ過すると陰イオン性の場合ルテインの回収率は減少し, 非イオン性の場合逆に増えている (Table 3)。蛋白質の表面電荷が負であることから陰イオン活性剤はこれと反発して蛋白質の会合を妨げることが考えられ^{16,17)}またルテインを活性剤ミセル中に取り込むことも考えられる。蛋白質の解離剤である尿素, グアニジンをこれらの系に加えた結果, ゲルろ過によって複合体中のルテイン量は激減し複合体中への回収率は15%以下であった (Table 4)。このことはルテインの蛋白

Table 3 Recovers of Protein and Lutein for Gel Chromatography of Complexes Formed in the Presence of Detergents

Detergent	Protein recovery ^{a)} (%)	Lutein recovery (%)
None	99.7	67.5
SDS	89.7	34.1
CDMBAC ^{b)}	—	—
Tween-80	96.4	90.5
Triton X-100	100.5	91.8

a) Whole protein of Azuki C₃^{PPt} was subjected.

b) Cetyldimethylbenzylammonium chloride.

Table 4 Effects of Urea and Guanidine on the Interaction between Lutein and Azuki Protein

Dissociating agent	Protein recovery ^{a)} (%)	Lutein recovery ^{a)} (%)
3 M Urea	99.3	15.0
5 M Urea	95.3	13.5
2 M Guanidine HCl	97.4	16.8
4 M Guanidine HCl	97.0	14.6

0.3 ml of 0.015 % lutein alc. solution was added to 3 ml of each 2 % protein solution containing each dissociating agent with the prescribed concentration.

a) Chromatographic recoveries with Sephadex G-200.

質への結合が解離剤によって強く阻害されており、ルテインは蛋白質の非極性部分に結合して複合体を形成すると同時に蛋白質の会合を推進しているといえることができる。

4-2. ルテインは蛋白質と相互作用をして新規な光学活性を獲得する¹⁸⁾

ルテインが蛋白質と水系で容易に結合して蛋白質の会合を惹き起こす機構を分光学的（吸収及び円二色性分散）の面などから検討した。ルテイン-蛋白質複合体の円二色性分散(CD)測定、沈降平衡分析、ゲルクロマトグラフィーを行った結果、ルテインはOVA, BSA, β -ラクトグロブリンなどと結合して非常に強いスプリット型のCDスペクトルを可視領域に与えた (Fig. 8)。すなわち、374 nm に正、395 nm に負の極大吸収があり、384 nm の cross-over point は可視吸収スペクトルの λ max に一致した。これは可視部に光学活性を持たないルテインが蛋白質と結合することによって新たに獲得した性質である。ルテイン量を一定にしてルテイン/OVA モル比

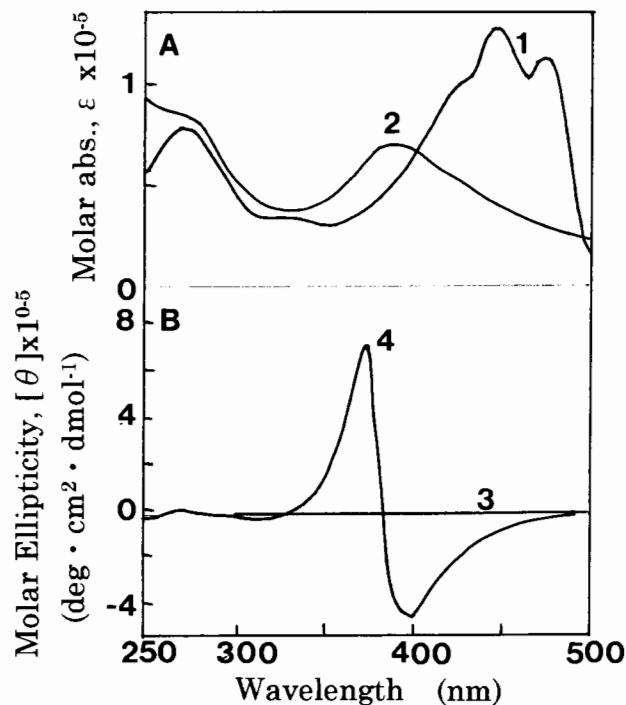


Fig. 8 Absorption Spectra (A) and CD Spectra (B) of Lutein in Ethanol and Lutein-ovalbumin Complex in Aqueous Solution.

Lutein concentration was 4.20×10^{-4} M throughout all the measurements; ovalbumin concentration, 4.53×10^{-4} M (curves, 2 and 4). (1) absorption spectrum of lutein in ethanol, (2) absorption spectrum of lutein-ovalbumin complex, (3) CD spectrum of lutein in ethanol, and (4) CD spectrum of the complex.

を変えて生成させた複合体の374 nmにおけるモル楕円率 ($[\theta]_{374}$) はほぼ一定の値を示す。モル比をさらに高めると赤色沈殿を生じ、沈殿中のルテイン/蛋白質モル結合比は25であるが、可溶化している複合体の結合モル比は8であった。また、複合体の沈降平衡分析によると、5,200 rpm, 15 hr で着色物の85%が沈殿し残り15%の分子量 Mn は72万であった。これらの結果からルテインは蛋白質に非特異的に結合して可視領域に光学活性を獲得し、同時に蛋白質は会合する。ルテインの添加量を増やせば、初めにルテインが結合した蛋白質の特定表面部位に集中的にルテインが結合していき、ある量(多分 lutein/OVA モル比25以上)を超えると沈殿すると思われる。

以上は蛋白質としてOVAを用いた場合であるがBSAや β -LGを用いても一般的挙動は変わらずCD極値を示す波長はほぼ等しく、モル楕円率はOVAが他より少し高かった (Table 5)。一方、RNaseと

Table 5 Absorption and CD Data of Complexes between Lutein and Several Proteins

Protein	Conf. of protein ×10 ⁴ M	Molar ratio lutein/protein	Absorption maximum (nm)	Observed CD-band extrema. Positions (nm) and corresponding molar ellipticities of lutein × 10 ⁵ in parenthesis (deg. cm ² . dmol ⁻¹)		
				Positive peak	Negative peak	Cross-over point
Ovalbumin	2.02	0.21	384	373 (8.54)	394 (-5.30)	384
BSA	2.02	0.21	384	373 (5.75)	396 (-3.94)	384
β-LactoG.	2.02	0.21	384	374 (5.65)	398 (-4.00)	384
Lysozyme	2.02	0.21	446	Not detected*		
RNase	2.02	0.21	446	Not detected*		

* Red precipitates produced by the addition of lutein to proteins were solubilized with 0.5 % SDS in 0.1 phosphate buffer, pH 7.0, followed by measurements of absorption and CD spectra.

lysozyme の場合はルテインが可溶化せずすべて沈殿した。しかし、Rnase は pH を 11 (pI) 以上にすると OVA など酸性側に pI を持つ蛋白質と同じ分光学的挙動を示した²⁰⁾。このことは複合体形成の pH 条件において、正に荷電する両蛋白が負に荷電する OVA 他の蛋白質と異なりルテインの保護コロイド的性質を持たないためである。この理由は、ルテインが負の表面を持つホモ会合体を作って蛋白質と複合体をつくるためである (4-3 項)。したがって、ルテインは蛋白質の pI 以上の pH 条件であれば蛋白質の種類に関係なく分散、可溶化し、蛋白質との特異的な結合はなく、保護コロイド的に分散させられていることが分かった。

つぎにルテイン以外のカロテノイドについて OVA との複合体形成及び CD スペクトルについて調べた¹⁸⁾。カンタキサンチン (4, 4'-diketo-β-carotene) は蛋白質溶液に分散し水溶性となるが、光学活性を獲得しない。いっぽう、β-クリプトキサンチン (4-hydroxy-β-carotene) は OVA と水溶性複合体を形成し、その光吸収スペクトルは低波長に約 30nm シフトし、fine structure の崩れた吸光度の小さい幅広のスペクトルを示した。CD も与え、そのスペクトルのピークは 517, 482, 461 nm に、谷は 410 nm に認められ、ルテインとくらべて全体的に幅広でありさらに CD スペクトルパターンの正負が逆転して負の cotton 効果を示した。モル楕円率 ([θ]) はルテインの場合より少し小さい程度であった。

ルテインが蛋白質水溶液に“溶けて”みかけ透明なとう赤色溶液になり、光学活性を可視領域に示すためには、ルテイン分子が“不整”の場に置かれな

ければならない。なぜなら、可視光を吸収する共役ポリエン発色団には不整炭素がないので、その近くにある不整炭素を“利用”することが必要だからである。一般に蛋白質は UV 領域に強い CD を示すことから分かるように“不整の場”を持っており、その場に結合したルテイン分子がそのまま光学活性を示すようにも思える。しかし、共役ポリエンを持つが分子内不整炭素を持たないカンタキサンチンは蛋白質と結合しても CD を示さず、またエタノールに溶けたルテインも CD を示さないことから、ルテイン分子が光学活性を獲得するためにはルテイン自身の何らかの高次構造変化が必要と考えられる。この構造変化は光吸収スペクトルを手がかりにして一般的カロテノイドの trans から hindered cis 変換現象¹⁹⁾をルテインの場合に適用することによってある程度説明することは出来るが、いっぽうで何故 CD として現われる不整の場が生じるのかを説明出来ない。また、π 電子の励起抑制による約 60nm の低波長シフトと共役二重結合系の電子振動による fine structure の消失は何らかの機構による dipole-dipole 相互作用の存在を推定させる。

これに関係して、ルテイン-OVA 複合体系の光学活性が脂質を加えた場合にどのような影響を受けるかを調べた²¹⁾。脂質として卵黄レシチンを加えると、CD スペクトルのピーク波長は低波長側にシフトし [θ] も大きく低下した。しかし、OVA 濃度が高い (0.2%) ときにはこのような大きな変化は認められない。蛋白質濃度がルテインの光学活性に大きく影響することは蛋白と脂質との相互作用がルテインの光学活性発現に大きな影響を持つことを示すもの

である。すなわち、蛋白質の疎水性表面にルテインが方向性を持って結合することにより、ルテインが可視領域に光学活性を獲得するものと考えられる(キラルになるため)、レシチンの添加は OVA 表面の疎水性部位に対して競合的に結合することにより、ルテイン会合の方向性を乱して光学活性獲得を妨げると考えられる。したがって、蛋白質濃度が低いときに脂質添加によって起こる複合体の吸収及び CD スペクトルの変化は、ルテインと脂質の競合及び規則的なルテイン会合への脂質の介入などによるものと考えればよく、これらの現象は蛋白へのルテインの結合様式を理解する一助となった。

4-3. 界面活性剤分散ルテインの Chiral Aggregate 形成とその形態²¹⁾

1% SDS (約35 mM) 溶液に可溶化したルテインは有機溶媒に溶けたそれと全く同じ吸収及び CD スペクトルを示した。ところが、臨界ミセル濃度(CMC)以下の低濃度 SDS 溶液に分散したルテインは蛋白質溶液の場合と似た分光学的挙動を示した(Fig. 9)。0.1 mM SDS では吸光度が低く分散が充分でないが、SDS 濃度を0.3 mM 以上にすると吸光度は大きくなる。 $[\theta]$ も大きくなるが、CMC の少し手前で必ず CD パターンの逆転があるのは大きな特徴である。CD スペクトルは逆転パターンのまま次第に $[\theta]$ が小さくなり、50 mM ではほぼ完全に消失する(Fig. 10)。ルテインは CMC 以上の SDS 濃度でも未だ弱い CD 活性を残しているが、沈殿を生じない程度の加熱もしくは遠心力によって $[\theta]$ は減少又は消滅する。これはルテインが SDS ミセルに取り込まれたためと考えている。このように、ルテインは SDS ミセルに取り込まれると、有機溶媒中と同じように CD を示さないが、分散 (pre-solubilization) の状態で特異な分光学的性質を示す。この現象が起こるときのルテイン分子の挙動について考えてみた。Hagar ら²²⁾ はうすい EtOH 水溶液中にルテインを溶解させ吸収スペクトルを測定しているが、そこで観察されたスペクトル変化は我々の SDS 低濃度のものに酷似していた。我々はこのスペクトル変化の様相を分子の“Card pack model”²³⁾によって推論した。すなわち、このモデルではポリエン発色団が腹と腹を付けて会合体をつくり、遷移モーメントは平行となる。このような分子集合体では非極性溶媒中のそれに比べて短波長側にシフトし、山の長波長側にスカート

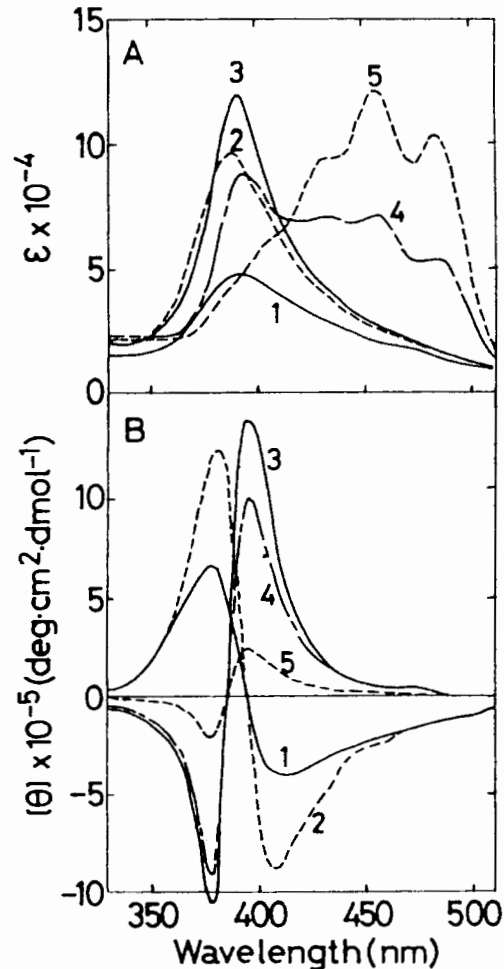


Fig. 9 Absorption and CD Spectra of Lutein dispersed by SDS in a 20 mM Phosphate Buffer, pH 7.0, before Ultrafiltration with a 0.45 μ m Millipore Filter.

Concentration of lutein, 4.64 μ M. Concentration of SDS, 1, 0.1; 2, 0.3; 3, 1.0; 4, 3.0; 5, 30.0 mM.

を引くことが期待され、事実そうである。しかし、このモデルはポリエン発色団に関して対象面を持つため強い光学活性を示すことは期待しにくい。これまで観察された光学活性を説明するにはルテイン分子は card pack であると同時に非対象形をとらなければならない。すなわち、chiral card pack モデルを考えることが必要である。このモデルの条件を満たすためには発色団は並んで会合し、しかも互いにわずかにずればよい。このとき、左か右に巻く2種の対掌体が形成される。すなわち左巻きと右巻きのらせん状構造体である。

Bradley ら²⁴⁾による共役二重結合形のらせん状重合体に対して期待される CD の計算結果によると、

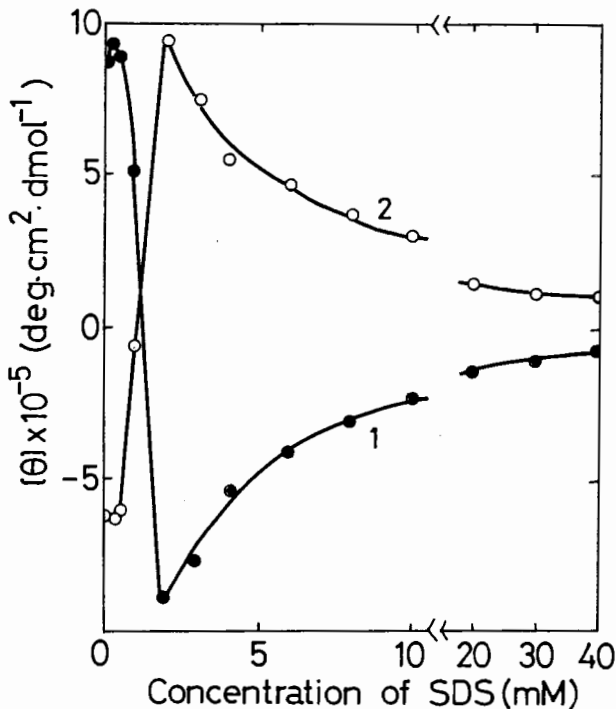


Fig. 10 Effect of the Concentration of SDS on the Molar Ellipticity of Lutein in a Phosphate Buffer of 20 mM. Lutein concentration is constant, $4.5 \mu\text{M}$. Curves 1 and 2 represent molar ellipticities at 376 and 408 nm, respectively.

10個のポリエン発色団を持つ右巻きコイルが、ここでルテインについて観察された SDS 低濃度溶液及び蛋白質溶液中での CD スペクトル²¹⁾と類似のパターンを示すであろうことを予想していた。そのことがここで実証されたことになり、我々は上記の難解な事柄を「ルテインが水系に分散して得られる光学活性は共役ポリエンが腹で接合し、ややずれてそれを繰り返すことにより、右又は左巻きの分子らせんを形成している」と考えることができる。SDS 濃度を上げて、CMC 近くに来たときに見られる逆転現象について単純でしかもそれらしい説明は、ルテイン分子のらせん集合体の集合方向の逆転である。厳密に言えば、分子集合体の左右の相手部分是对称性なく、その表面のグループの配列の点で異なる。なぜならば、ルテイン単分子は 3R, 3S', 6R' の不整炭素を持ちキラールだからである。低濃度のアセトン水溶液中においても同じ CD パターンを示していることから、その構造は単にルテイン分子間の相互作用によってのみ決定されるようである。蛋白質や SDS はその分子集合体の形成と水可溶性を援助している

と考えることが出来た。低濃度 SDS などで認められる構造体はやや不安定であり、SDS 濃度が増大すると自然にもう一方の構造体に変化し安定化すると考えられ、CD の逆転はそのような集合体の構造変化を反映したものであろう。以上をまとめて Fig. 11 に示した。

このときのルテイン集合体に結合している SDS 量を調べ、ルテインに対する SDS の結合モル数を求めた²⁵⁾。方法の説明は省くが、SDS/ルテインのモル比はルテイン濃度によって異なるが10から30であり、例えばルテイン $9 \mu\text{M}$ 以上ではルテイン 1 分子当たり 10 分子の SDS が結合したときに集合体は丁度逆転する。集合体のサイズについて $0.45 \mu\text{m}$ ミリポアフィルターを用いた限外ろ過により、ろ過前後の吸収と CD スペクトルを測定し解析した²⁶⁾。詳細は省くが、SDS に分散又は可溶化したルテインは $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターをほとんど 100% 通過するのに、ろ過液の $[\theta]$ は急激に低下する。ところが、CD スペクトル逆転時の SDS 濃度ではほとんど変化が無かった。理由として考えられることは CMC 以上の SDS 濃度になってもルテインはしばらくの間会合を続け(約 5 mM まで)て会合体分子量は大きくなっていく。それが $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターを通過するときに崩れて、小さい会合体や SDS ミセルに取り込まれたルテイン分子となり、結果として CD 強度が低下する。したがって、偶然ではあるがルテインの SDS 溶液における会合体のサイズは 1 mM SDS (CMC) で丁度 $0.45 \mu\text{m}$ 程度ということになる。

ルテイン集合体がキラールならせん構造体である証拠として透過型電子顕微鏡像の観察を試みた^{26,27)}。分散させたルテインを超遠心沈殿させて、その懸濁液をコロジオン被覆グリットに載せ、風乾後 Pt-Pa による positive shadowing 又は 1% 酢酸ウラン水溶液による negative staining を行ったのち観察した。SDS, カチオン活性剤²⁸⁾又はアセトン水溶液²⁶⁾に分散させた場合に棒状の形態が観察されたが、ラセン状は認められなかった。このとき、CD スペクトルの逆転が起こる各濃度の前後では細長い形態は変わらないが、幅/長さの比が急激に変化していた。続いて、もう少し温和な界面活性剤として卵黄レシチンで調製したりボソームを分散剤として同様の実験を行ったところ、pH11以上の高い pH と Ca^{2+} の存在下で左巻キラセンの構造を観察することが出来た (Fig. 12)²⁷⁾。

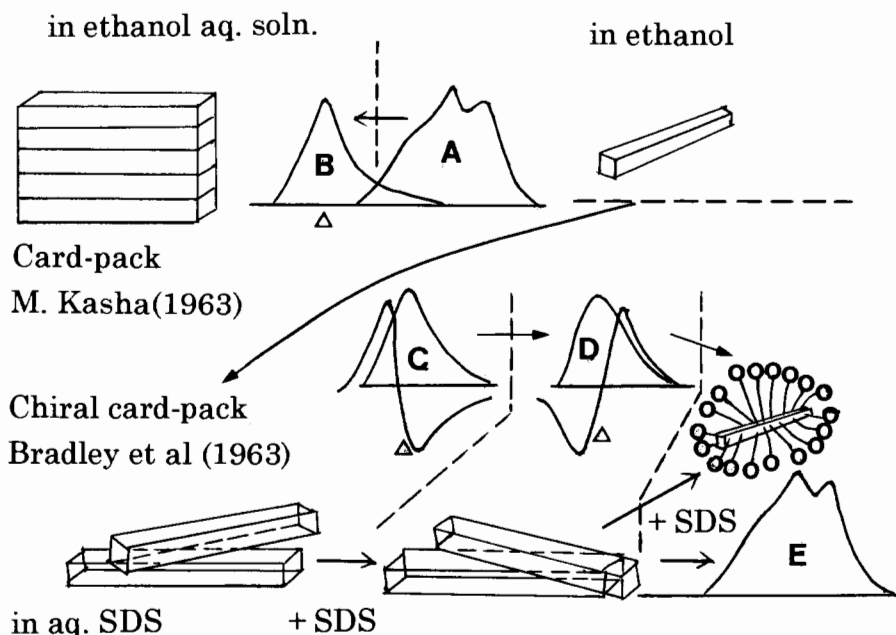


Fig. 11 Chiral Card-pack Model of Lutein Dispersed in SDS aq. Solution.
 A, absorption spectrum in ethanol with no CD ; B & C, absorption spectra shifted to shorter wavelength to acquire CD with positive Cotton effect; D, CD pattern reversed in increasing SDS concentration ; E, absorption spectrum returned to the original with no CD under higher SDS concentration.
 Δ, Absorption maximum.

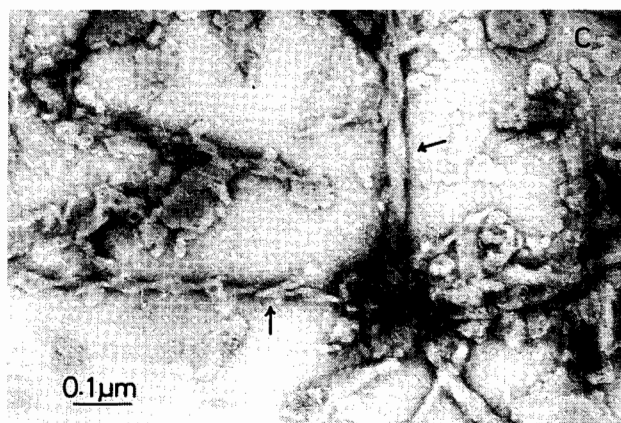


Fig. 12 Electron Micrograph of Lutein Aggregate.
 Lutein aggregate dispersed in PC liposome in the presence of Ca^{2+} at high pH Solvent, 20 mM $CaCl_2$ aq. solution, pH 11.5. PC concentration, 1 mM. Arrows indicate left-handed helical structure. Vesicles have high electron density. Lutein concentration, $6.0 \mu M$.

その後の観察条件の検討からpH 8 から 9 の比較的温和なpH条件下で右巻きラセンが観察されたので、ルテイン分子会合におけるモノマーの接合のわずかの相異が左右のラセンとして現われることが分かった。

これらの結果に基づいて描いたルテイン集合体のラセン状構造の模式図は Fig. 13 のようである。ルテインの共役二重結合部分（腹）が水系で会合し、その接合様式が少しずつずれることによって自然にラセン構造が作られていく。集合体の外側はルテインのOH 基が取り囲んで親水性を持ち、内部に炭化水素の共役ポリエンが $\pi-\pi$ 相互作用によって会合し、光による π 電子励起を抑え、吸収スペクトルは低波長にシフトし、又 π 電子による共鳴微細吸収も消失する。このとき可視領域に CD を示すことになる。蛋白質や界面活性剤などはルテイン会合体表面に付着し保護コロイドとして働くと考えられる。PC リポソーム系において、ラセン構造は高pHと Ca^{2+} 存在下で観察されやすいことから、このときには会合体が引き伸ばされた状態になっているとおもわれ、本質的には水系で認められたすべてのルテイン会合体はラセン構造をとっていると考えて良い。また、TEM で観察された会合体のサイズ（幅 $0.1-0.2 \mu m$ 、長さ $0.3-1.5 \mu m$ ）はルテイン（長さ 30 \AA ）の単一会合体としては大きすぎることから、単一会合体がモノマーとなって形成された二次会合体と推測している。

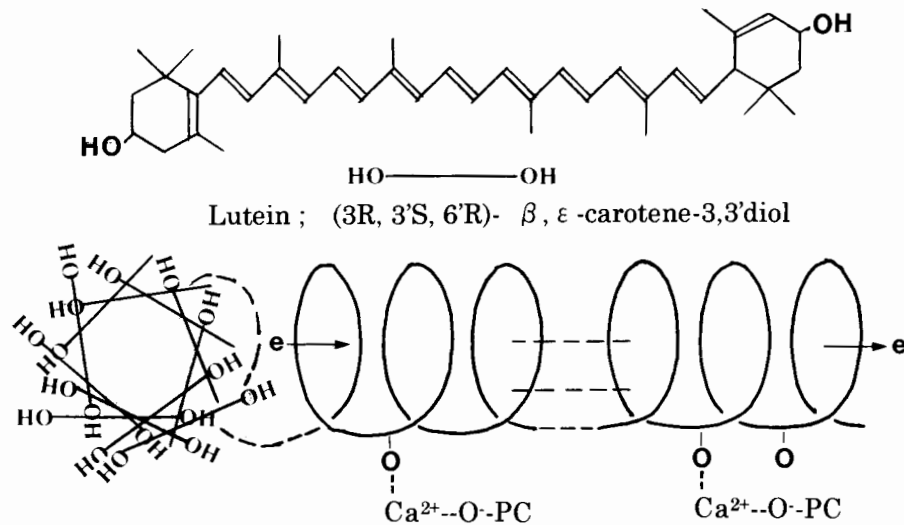


Fig. 13 Conformation of Lutein Aggregate in Phosphatidyl-choline Liposome (PC).
"e-", electrons.

そうして、そのような大きな会合体においてもラセン構造が観察されるのであるから、ルテインが水系で会合する様式は本質的にキラルなラセンであることを示している。

Fig. 13を見ると、一つの概念が浮かぶ。すなわち、ルテイン会合体が電子電導体になる可能性を持つことである。共役二重結合部では π 電子が電子運動軌道を共有しているから会合体の一方から外部電子が入れば他方から等量の電子が速やかに出るであろう。この点については実験方法を持たないため未確認であるが、クロロプラストのチラコイド光合成系IIにルテインが局在し、系IIにルテイン会合体が在ることを間接的に確認しているので²⁹⁾、水の電荷分離により生じた電子が速やかに膜中を移動する電導体として役立っているのではないかと考える。また、工業的には光によって電導体となり、切れば絶縁体となる性質（確認が必要）を利用できる可能性も持っている。今後、このような生物資源を利用あるいはモデルとする多様な応用面が開発されることを期待する。

5. ヒト白血病細胞株の分化に及ぼすカロテンとルテインの影響³⁰⁾

カロテンの腫瘍細胞増殖抑制作用が注目されており^{31,32,33)}、 α -カロテンの発癌プロモーション抑制作用も明らかにされて来ている。これらカロテンの機能の一部は細胞の分化促進活性にあると考えられる。レチノイドによる細胞分化の活性は認められて

Table 6 Differentiation-inducing rate of ML-2 cell by spinach carotene-lutein co-aggregate (%)

Culture time (day)	Carotene conc. (μ M)					
	0.9			1.8		
	Lutein/carotene (M/M)					
	0	2.5	5.0	0	2.5	5.0
2	0	1.9	0.9	0	2.2	0.5
3	0.3	1.9	2.7	0.3	2.9	2.3
4	0.3	1.9	1.8	0.3	4.1	5.1

いるものの³⁴⁾、カロテノイドによる直接の活性についての知見は見当ら無い。そこで、ヒト白血病培養細胞に直接カロテノイドを与えることによって、細胞の分化に及ぼす影響を調べた。骨髓芽球（白血球前駆体）のML-1、ML-2細胞、骨髓球のHL-60細胞の3 cell lineを用いた。NBT還元法を用いて、ML-2細胞にホウレンソウカロテン画分と対照の β -カロテンを与えて分化誘導活性を調べたが、活性は認められなかった。これはカロテンと細胞表層との相互作用が弱かったためではないかと考え、ルテインが上記細胞に多量に付着するが生存率には影響しないことが確認されたので、それを利用して β -カロテンとルテインの共複合体を作らせて同様の実験を行ったところ、大きな分化誘導活性が得られた（Table 6）。これはML-2細胞の顆粒球方向への分化であることがライト染色法による細胞形態の顕微鏡観察からも確認できた。また、分化誘導活

性測定法と供試白血病細胞株の組み合わせのうちカロテノイドについて調べるときの最適の assay 法を求めたところ、HL-60細胞と CD-15分化抗原を用い、間接蛍光抗体法との組み合わせの良いことが分かった。

結論としては、 β -カロテンだけでは白血病を分化誘導して減少させる効果は小さいが、ルテインとの併用は β -カロテンの効果をも5乃至10倍に増加させており、これはルテインと細胞との相互作用の大きいことを利用した併用効果であると考えている。疫学的に血中カロテン濃度と対象疾患（例えば癌）の発生率の関係を調べるときに同時にルテインなどキサントフィル類も分析しその補助的效果をも解析することは意味あるものとする。

6. 緑葉カロテノイドのニワトリによる吸収と体組織分布³⁵⁾

ニワトリなど鳥類の卵黄にはキサントフィル類が優先的に蓄積されカロテン類の蓄積は少ないことが知られている³⁶⁾。摂取された緑葉カロテノイドの個々

の成分の吸収挙動と卵黄を含む組織への移行蓄積を定量的に検討した例はないので調べた。

テスト飼料投与開始後8日間のカロテノイドの摂取量、吸収量及び卵黄蓄積量の平均値を Table 7 に示す。各カロテノイドの吸収率は50—60%であり、そのうち卵黄への移行蓄積率の最も高いのはルテインで(約27%)、次いでピオラキサントとアンセラキサントであった。これに対し、 β -カロテンの蓄積率は1%以下と極めて低い。なお、卵黄のカロテノイド組成は投与量と無関係にはほぼ一定に保たれていた。一方、吸収カロテノイドの体内分布は Table 8 のようである。胃、腸及び血液中の正味蓄積カロテノイド量は組織へのカロテノイド分布量に近い値となっており、これらの組織ではカロテノイドの出入り(代謝)速度が大きいことを示している。肝においては全カロテノイド184 μ gに対し正味の増加量は7.4 μ gと少なく、肝に流入したカロテノイドの移行・代謝速度の小さいことを示している。卵巣においては肝よりも多い蓄積が認められ、とくにルテイン

Table 7 Absorption of dose carotenoid and accumulation of the absorbed carotenoid into egg yolk

Control diet	Carotenoid	Dose carot. (μ g/hen)	Absorbed carot.		Accumulation ratio* (%)	Carot. in egg yolk		
			Absorbed (μ g/hen)	Composition (%)		Accumd. (μ g/hen)	Comp. (%)	
	β -carot.	6.8	1.8	26.0	61.6	1.1	6.1	
	Cant. x.	25.1	15.6	62.1	16.3	2.5	14.1	
	Lutein	35.2	15.5	44.0	82.7	12.8	71.1	
	Anth. x.	4.2	1.0	24.2	72.6	0.7	4.1	
	Violax.	3.3	1.7	52.9	48.0	0.8	4.6	
	T. carot.	74.4	35.6	47.8	50.6	17.9	100.0	
Test diet	Carotenoid	Net dose** (μ g/hen)	Net absorbed carot.***		Net carot. accumd. into yolk (μ g/hen)	Net accumulation ratio**** (%)	Carot. in egg yolk	
			Absorbed (μ g/hen)	Composition (%)			Accumd. (μ g/hen)	Comp. (%)
	β -carot.	292.1	184.3	63.1	1.6	0.9	2.7	1.1
	Cant. x.	4.1	1.9	46.3	0.7	37.3	3.2	1.3
	Lutein	1,104.6	719.9	65.2	198.9	27.6	211.7	85.9
	Anth. x.	99.3	48.3	48.6	7.0	14.6	7.8	3.2
	Viola. x.	217.3	132.2	60.8	20.2	15.3	21.0	8.5
	T. carot.	1,715.5	1,086.4	62.3	228.4	21.0	246.4	100.0

* Carot. in egg yolk/absorbed carot.

** Differences between dose carotenoids in test diets and those in control diet, which means dose carotenoids originated from leaf carotenoid.

*** Differences between absorbed carotenoids in test diets and those in control diet, which means absorbed carotenoids from leaf carotenoids.

**** Ratios of the net accumulated leaf carotenoids in egg yolk to the net absorption.

Table 8 Distribution of spinach carotenoids to organs and blood in hen on 3 day test diet

Carot.	Absorbed carot.* ($\mu\text{g}/\text{hen}$)	Net carotenoid accumulated in organs and blood after 3 days dose ($\mu\text{g}/\text{hen}$)					Net total carot. accumd. ($\mu\text{g}/\text{hen}$)
		Stomach	Intestine	Blnd**	Liver	Ovary	
β -carot.	156.4 (156.0)***	1.7 (0.8)	5.6 (5.1)	7.2 (5.0)	21.5 (-7.1)****	2.5 (-0.2)	(3.6)
Cant. x.	1.2 (-0.4)	—	4.2 (2.0)	7.9 (5.0)	40.0 (3.3)	13.5 (3.4)	(13.7)
Lutein	363.3 (346.3)	4.0 (3.1)	36.3 (35.2)	80.1 (72.3)	88.2 (2.6)	46.3 (19.7)	(132.9)
Anth. x.	13.1 (12.8)	0.8 (0.8)	3.9 (3.9)	8.2 (7.0)	16.2 (3.1)	2.0 (0.2)	(15.0)
Violax.	38.1 (37.9)	1.2 (1.2)	2.7 (2.7)	4.4 (3.1)	17.5 (5.5)	3.0 (0.8)	(13.8)
Total	613.2 (594.6)	7.1 (4.6)	52.8 (48.9)	107.9 (92.5)	184.0 (7.4)	67.2 (23.8)	(177.2)

* Differences in quantities between dose carotenoid and that excreted.

** Total blood volume is postulated as 1/13 of hen body weight.

*** All figures in parenthesis indicate net carotenoids migrated or accumulated, which are obtained from differences between test groups and control group.

**** Negative values will depend on the varieties of the individual hens.

ンの蓄積が顕著であるが、これは卵黄への蓄積と関係するものである。 β -カロテンとルテインの挙動の対比も明瞭である。吸収 β -カロテンのうち体内蓄積量は少なく、胃や腸に滞るのは約4%、血液中には約3%移行しているだけであり、その他はレチノイドへ変換されたものと考えて良いであろう。これに対し、ルテインはじめ他のキサントフィル類はかなりの量が組織へ移行していた。ルテインは吸収量の20%が血液へ、6%が卵巣へ移行しているが、血液中ルテインのほとんどはLDLに存在しており卵巣(黄)へ移行する前段階のものと考えて良いであろう。

7. 緑葉カロテノイドのウズラ反転小腸による吸収とレチノイド生成³⁷⁾

約10cmにきった小腸を反転し両端解放で基質と cofactors 含むpH7.7の等張液(反応液)中で incubation する in situ 酵素反応を行った。基質に β -カロテン($0.4 \mu\text{mol}/40\text{ml}$)を用いた場合、60 minで25.5 nmolが1gの小腸に吸収されている。これは実際に小腸粘膜に検出された β -カロテンの約10 nmol/hr/gと、粘膜を除いた小腸残部にあったレチノール生成量(約25 nmol=13 nmol カロテン)との合計値にほぼ等しい。また、反応時間60 minまで、粘膜 β -カロテンのモル数が小腸残画分のモル

数のほぼ1/2となっていることは、 β -カロテンからレチノール生成への反応と β -カロテンの吸収とが動的平衡を保っていることを示すものであり(Fig. 14)、このことはウズラ小腸においては β -カロテンが15, 15'位で中央開裂を受けて2分子のレチノールを生じることを強く示唆している。

上記と同じ濃度の β -カロテンを含むハウレンソウカロテノイドについて同様の実験を行った。小腸での吸収量(速度)はルテイン、アンセラキササンチン、ピオラキササンチン、ネオキササンチン、 β -カロテンの順であった。 β -カロテンの吸収量は単独で供試したときと比べて約1/20に激減しており、カロテノイド混合物として与えると吸収阻害を受ける。これはニワトリを用いた in vivo の吸収挙動においても認められている³⁸⁾。しかし、レチノールの生成量は β -カロテン単独のときの約1/3のレベルであり、このことは吸収された β -カロテンが速やかに開裂と還元を受けてレチノールになることを意味している。小腸の粘膜画分と残画分におけるレチノール量を反応時間で追跡すると、残画分には粘膜よりレチノールが多いのは(Fig. 15)、生成レチノールの粘膜からの速やかな移行が進んでいることを示すものである。このときレチノールは小腸外に出て反応液に存在するが、これについては8節で述べる。各カロテノイド

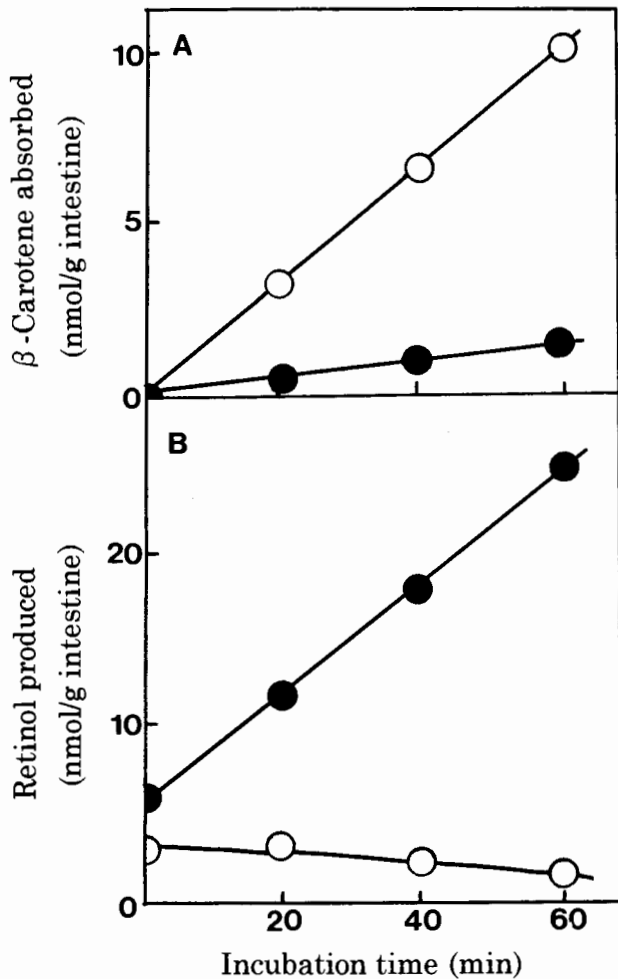


Fig. 14 Absorption of β -Carotene (A) and Retinol Production (B) by Inverted Small Intestine of Japanese Quail. Incubation, at 37 °C. Incubation mixture, 40 ml, contains; 10 μ M β -carotene, 2 mM nicotinamide, 5 mM GSH, 5 mM Na-cholate, 150 mM NaCl, 7 mM KCl, in 10 mM Naphosphate buffer, pH 7.7. \circ — \circ , mucosa fraction; \bullet — \bullet , residue fraction.

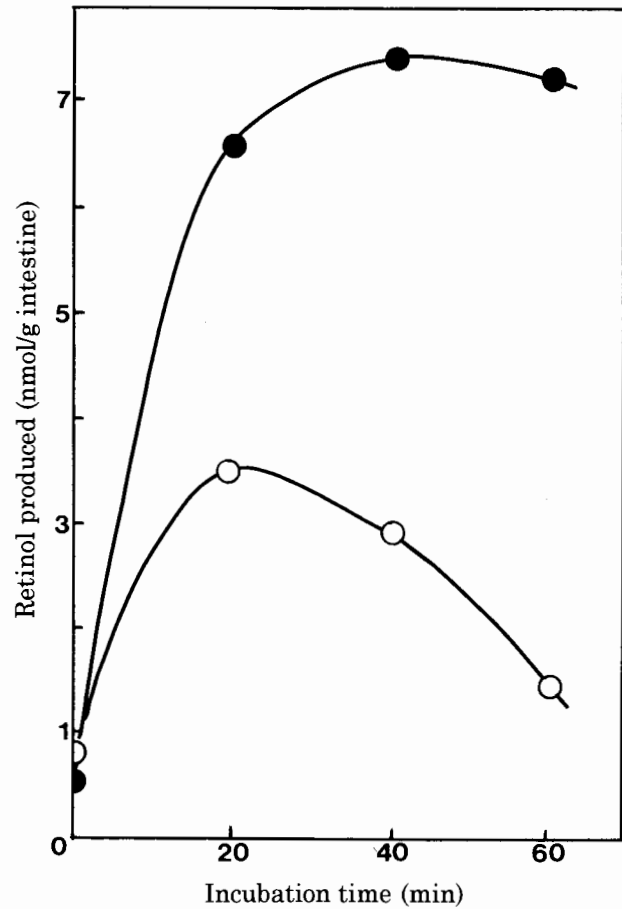


Fig. 15 Retinol Production in Mucosa and Residue fraction of Inverted Small Intestine of Japanese Quail at Incubation with Spinach Carotenoid. Substrate carotenoids, 15.7 μ M lutein; 10.0 μ M β -carotene; 5.6 μ M violaxanthin; 4.9 μ M neoxanthin; 2.8 μ M antheraxanthin. \circ — \circ , mucosa; \bullet — \bullet , residue.

の反応液からの減少量は小腸への吸収量とみなせるから (Fig. 16), 得られた各カロテノイドの減少量合計値と小腸に吸収されたカロテノイド及び生成レチノイド量の 1/2 の合計値とのモル比をとると, 小腸中の量は吸収量の約 20% モル比に過ぎない. これは小腸に吸収されたカロテノイドがそれぞれ代謝を受けて速やかに小腸から移行して元の反応液に戻るためである. これについても, 次の節で述べる.

8. ラットにおける β -カロテンの吸収と代謝^{38,39)}

哺乳動物においてカロテンはプロビタミン A 活性

以外に, ガン予防^{40,41)}や一重項酸素の消去剤⁴²⁾としての機能を持つことが明らかになって来た. カロテンはすべて経口摂取されるが, その吸収代謝機構は未だ不明の点が多く, カロテン及びキサントフィルの体内への取り込みについて⁴³⁾, また吸収されたカロテンの開裂が中央開裂⁴⁴⁾か逐次開裂⁴⁵⁾かについても結論が出ていない. さらに, レチナール, レチノール及びレチノイン酸間の相互的酸化還元反応の選択的機作もほとんど分かっていない. ここでは, ニワトリ, ウズラの結果をふまえてラット反転小腸を用いた in situ における β -カロテンの吸収とそのレチノールへの変換及び小腸からの輸送について明らかにするため, カロテン吸収・代謝の測定系を確立し, 吸収速

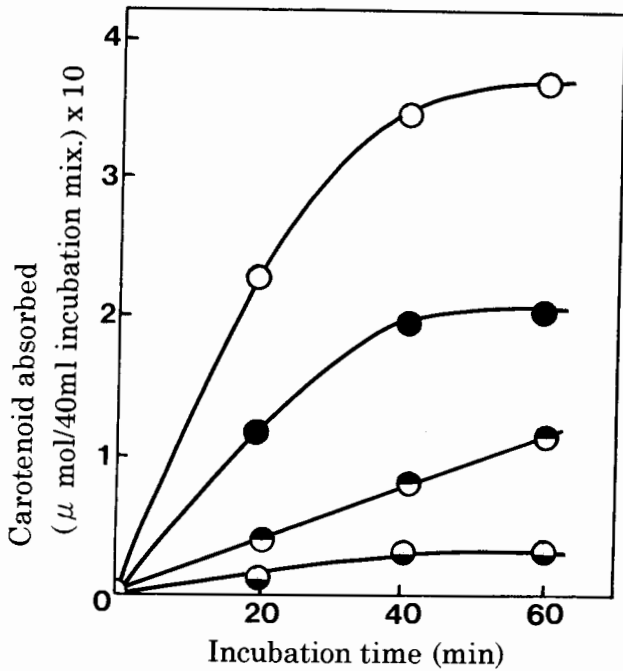


Fig. 16 Spinach Carotenoids Taken up into Inverted Small Intestine of Japanese Quail from Incubation Mixture.
Substrate carotenoid; ○—○, 15.7 μM lutein; ●—●, 2.8 μM antheraxanthin; ◐—◐, 10 μM β-carotene; ◑—◑, 5.6 μM violaxanthin.

度と反転小腸における代謝挙動について調べた。

この系におけるカロテン吸収とレチノール生成の最適pHは7.7であり、β-カロテンジオキシゲナーゼ活性のそれと同じであった。cofactorとしてニコチンアミドとジオキシゲナーゼの補因子⁴⁶⁾のFe²⁺との併用はβ-カロテン吸収とレチノール生成を促進した。また、“全カロテン吸収量”及び“全レチノール生成量”という新しい吸収・代謝活性のパラメーターを導入した。これはカロテンが反転小腸に吸収された後開裂と還元を受けるとレチノールになり、これがエステルとなって粘膜から小腸に空いた血管を通過して外部（反応液）へ輸送されていくので、そのときの反転小腸 assay 系における吸収カロテン及び生成レチノールの全量を求めるものである。但し、このときβ-カロテンの中央開裂を仮定している。すなわち、全β-カロテン吸収量 (nmol) = (小腸β-カロテン) + 1/2 (全レチノール生成量)、全レチノール生成量 (nmol) = (小腸レチノール) + (反応液レチノール) である。このパラメーターを用いたときの吸収・代謝活性の基質β-カロテンとの関係 (Fig. 17)、及び経時変化 (Fig. 18) を示すが、これらパラメー

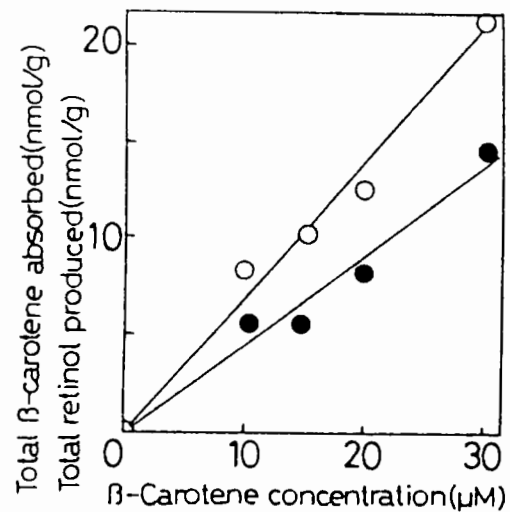


Fig. 17 Effect of Substrate β-Carotene Concentration on Total β-Carotene Absorption and Total Retinol Production in Rat Inverted Intestine.
Incubation time, 60 min. ○—○, β-carotene absorbed; ●—●, retinol produced.

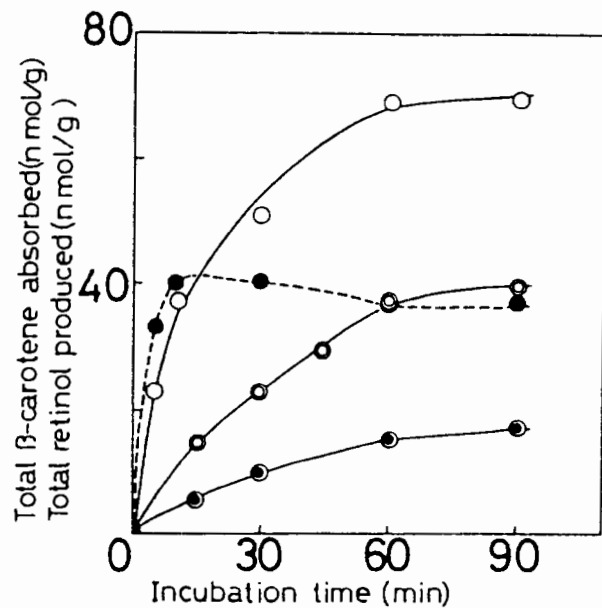


Fig. 18 Time Course of Total β-Carotene Absorption and Total Retinol Production in Rat Inverted Intestine.
○, Total β-carotene absorbed at 70 μM substrate β-carotene; ●, total retinol produced at 70 μM substrate β-carotene; ◐, total β-carotene absorbed at 15 μM substrate β-carotene; ◑, total retinol produced at 15 μM substrate β-carotene.

ターがカロテン吸収とレチノール生成を表わすのに好都合であることがわかる。その解析の結果はβ-カロテンの小腸粘膜への取り込み及びレチノールへの変換が基質β-カロテン濃度に強く依存することを示している。また、反応液中の可溶化剤であるコール酸の濃度もカロテン吸収とレチノール生成に影響していた。β-カロテン吸収からレチノールエステルに至る一連の反応の Lineweaver-Burk プロットを行い、反転小腸に対するβ-カロテンのみかけのKm値は34.5μMであった。そうして基質濃度が全カロテン吸収速度、全レチノール生成速度、吸収カロテンのレチノールへの変換率、及びβ-カロテン吸収率に及ぼす影響はβ-カロテン基質濃度70μMのときにそれぞれ、70nmol/h/g小腸、36.4nmol/h/g小腸、75.2%、4.3%であった (Table 9)。これらの結果は、カロテノイド非蓄積動物であるラットの腸内において吸収β-カロテンの多くが速やかに開裂したあとレチノールを経てビタミンAに変換されることを推測させβ-カロテン中央開裂の可能性の高いことを示唆している。

9. ラットによるハウレンソウカロテノイドの吸収と体内蓄積³⁹⁾

ラットにおける in vivo での緑葉カロテノイドの吸収と蓄積の挙動を調べた。ハウレンソウ葉カロテノイドを含む飼料 (A) 及びβ-カロテンのみを含む飼料 (B) を投与したときのみかけ吸収率を Table 10 に示す。みかけ吸収率は摂取カロテノイド量から糞中排泄量と腸内残存量とを引いた値の摂取カロテノイド量に対する100分率である。A飼料投与の場合、β-カロテンはほとんど吸収されていないの

に対し、β-カロテンのみを含むB飼料の場合には吸収率は50%を超えている。A投与区において腸内に多量のβ-カロテンが残存している。これは、ラットにおいてもウズラと同様β-カロテンの吸収がキサントフィル類によって強く阻害されていることを示すものであり、キサントフィル類の優先的吸収がラットでも確認できた。この現象には水に分散しやすいルテインなどキサントフィル集合体の形成²²⁾が強く影響しているものと考えられる。吸収カロテノイドの肝及び血液への移行蓄積量は投与25日目で吸収量の10%以下であり、とくにルテインは微量検出されただけである。ルテインなどキサントフィル類の代謝的挙動は不明のままである。レチノールの肝と血液

Table 9 Effects of substrate β-carotene concentration on total β-carotene absorption and total retinol production in rat inverted small intestine.

Item	Substrate β-carotene concentration (μM)		
	15	30	70
Total β-carotene absorbed (nmol/g intestine·h)	38.7	40.7	69.0
Total retinol produced (nmol/g intestine·h)	14.8	18.1	36.4
Ratio of retinol produced to β-carotene absorbed (%)*	15.0	26.9	75.2
Absorption ratio of β-carotene (%)**	10.8	5.7	4.3

Incubation time, 60 min.

* Ratios between initial velocities of curves in Fig. 7.

** (Total β-carotene absorbed/substrate β-carotene) × 100.

Table 10 Absorption of carotenoids by rats

(A-group)				
Carotenoid	Dose μg/rat	Feces μg/rat	Intestine μg/rat	Absorption %
β-Carotene	68.4	31.9	39.1	0
Lutein	138.3	26.5	1.4	79.8
Antheraxanthin	43.3	1.4	24.0	41.3
Violaxanthin	96.1	11.8	25.5	61.2
Neoxanthin	11.7	12.3	15.6	—
Total	357.8	83.9	105.6	47.0
(B-group)				
β-Carotene	50.2	20.7	3.1	52.6

における挙動をみるとカロテノイド投与がそれらのレチノール水準に非常に大きな影響を及ぼしている。カロテノイドの供給を絶つと（空対照飼料の投与）肝から多量のレチノールを動員して肝以外の組織へ送るようであり、結果として血中レチノールの上昇と肝レチノールの低下が一時的に起こる。A飼料を25日間投与後の血液、肝、腸、卵巣へのカロテノイドの正味の蓄積は Table 11 のようである。 β -カロテンの吸収量は少ないが (Table 10)、その正味の増加の多くは肝に在る。ルテインは吸収された110 μ gのうち血液中に0.89 μ gが存在するのみで肝への蓄積もない。B飼料投与区でも β -カロテンの肝蓄積量はA区とほとんど同じであり、さらに、両区共に14日間と25日間飼育後の肝のカロテノイド量があまり変わらないことから、肝のカロテノイド量は恒常的な値に制御されていると考えられる。

以上のことから、ホウレンソウカロテノイドのうち、 β -カロテンだけは肝にかなりの量が蓄積することはわかるが、もっとも多量に吸収されたルテインをはじめとするキサントフィル類は行方不明である。肝はレチノールの貯蔵庫であり、体細胞のレチノール水準を一定に保つように働いていることを示すが、レチノール生成に緑葉のキサントフィルは関与していないと考えられているので、これらカロテノイドの代謝及び機能についてさらに明らかにしていく必要がある。

10. 遊離型胆汁酸塩によって分散したルテインの分光学的挙動と形態⁴⁷⁾

ラットにおいてカロテンの吸収率は低い、キサントフィル類のそれは高く、またカロテンの吸収はキサントフィルによって阻害されている³⁹⁾。また、キサントフィルが界面活性剤によって水系で規則的な

ラセン構造をとって分散することも明らかにしている(4節)。これらのことは小腸内におけるカロテノイドの分散状態がその吸収と密接な関係にあることを示している。そこで、3種の遊離型胆汁酸塩、コール酸ナトリウム (CA)、デオキシコール酸ナトリウム (DCA)、及びケノデオキシコール酸ナトリウム (CDCA)、の各水溶液にルテインを分散させて小腸におけるカロテノイドの乳化・分散モデルとして分光学的挙動を検討し、電子顕微鏡像を観察した。

吸収スペクトルは SDS や PC リポソームの時と同じ挙動を示したが、CD スペクトルにおいては異なっていた。SDS や DTAB 溶液中のルテインが負の Cotton 効果を示す CD スペクトルから正への逆転現象を示しているのに対し、いずれの胆汁酸塩の場合にも逆転は認められなかった (Fig. 19)。SDS 溶液などにおけるルテインの CD スペクトルの逆転は活性剤の CMC より少し高い濃度で起きており、ミセルとルテイン集合体との相互作用によって起きるものと考えられる。この逆転現象が認められないことは胆汁酸塩がきわめて温和な作用をしていることを示している。この相異は胆汁酸の疎水領域が SDS と異なることに起因する。胆汁酸塩はポリヒドロキシコレストラン環を疎水領域とするため、円筒状または層状ミセルを作ることが知られている⁴⁸⁾。CA に分散させたルテインの形態を透過型電子顕微鏡で観察したところ、幅0.2—0.8 μ m、長さ1.5—3.0 μ mの短棒状であり、その表面に円筒状または球状の物質が結合していた (Fig. 20)。この付着物質は CA 濃度増加によって数が増しサイズも大きくなる。これは CA ミセル集合体と考えられ径は0.28—0.72 μ mで CA 濃度に比例して大きくなった。この大きさと形態からトリヒドロキシコレストラン環が腹と腹を付けて100—

Table 11 Net carotenoids transported or accumulated into blood, liver, intestine, and ovary of rats administered with leaf carotenoid for 25 days

Carotenoid	Net Carotenoid Increase (μ g/rat)				Dosage μ g/rat/day	Feces μ g/rat/day
	Blood*	Liver	Intestine	Ovary		
β -Carotene	0.05	4.7	39.1	0.02	68.2	32.0
Lutein	0.89	trace	1.4	—	138.5	26.5
Antheraxanthin	—	—	24.0	—	43.1	0.47
Violaxanthin	0.23	—	25.5	—	95.9	3.9
Neoxanthin	0.34	1.5	15.5	0.01	11.7	4.0

* Total blood volume was calculated as 1/13 of body weight.

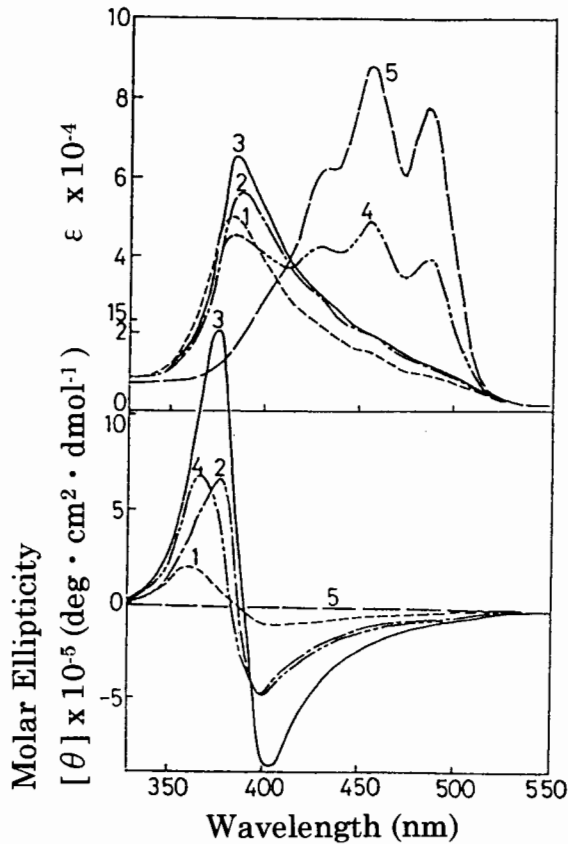


Fig. 19 Absorption and CD Spectra of Lutein Dispersed in Deoxycholate Solution. Lutein, 20 μ M. Deoxycholate; 1, 1 mM; 2, 2 mM; 3, 3mM; 4, 4 mM; 5, 5 mM in 10 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0.

200個の CA 分子が長軸方向に並んだ円筒状のミセル形態が考えられる。一方, SDS の場合にルテイン会合体表面にミセル様物体を観察出来なかった。これは SDS のルテインに対する結合モル比が CA の 1/100以下 (Table 12) になっていることに対応し, SDS は CA と比べて極めて小さなミセルを形成していることが確認できた。一般に分散質が巨大分子であったり, 分散性が悪いと $[\theta]$ は小さくなる⁴⁹⁾ので, ルテイン会合体の $[\theta]$ は界面活性剤の分散力の尺度として使える可能性を持つ。

胆汁中に界面活性の異なる胆汁酸塩が各種存在するのは, 分散力が強くて低濃度で極大活性を示す DCA, CDCA に加えて分散力が弱くて高濃度になって初めて大きい分散活性を示す CA の二つの種類が存在して, 小腸内においてルテインや他のカロテノイドを脂質と同時に分散させていることが分かったが, その生理的意義は不明である。



Fig. 20 Electron Micrographic Image of Lutein Aggregate Dispersed by 5 mM Sodium Cholate in 10 mM Phosphate Buffer, pH 7.0.

Table 12 CMC of Surfactants and Their Binding Ratios to Lutein

Surfactant	CMC (mM)	Binding molar ratio	Characteristics of CD spectra
SDS	0.5* ¹	10~30	inversion of CD pattern
DTAB	—	130~210	inversion of CD pattern
DCA	2* ²	80	no inversion
CA	40* ³	1,360~3,850	no inversion

*¹ in 20 mM phosphate buffer, pH 7.0.

*² in 10 mM phosphate buffer, pH 7.0.

*³ in water.

11. ラット小腸粘膜 β -カロテン-15, 15'-ジオキシゲナーゼ (BCDO) の in vitro 酵素活性⁵⁰⁾

小腸粘膜における β -カロテン代謝経路については15, 15'位における中央開裂によってレチナール2分子が生成する説 (中央開裂説)^{51,52)}と中央以外の部位で開裂を受けてアポカロテナールを生成するランダム開裂説^{53,54)}がある。我々はすでにカロテノイド非蓄積動物であるラットの反転小腸を用いて β -カロテンが吸収されたあと素早く中央開裂, 続いて還元とエステル化を受けて小腸から輸送されていくことを定量的に示した³⁸⁾。 β -カロテン吸収後の初発反応と考えられる中央開裂に関与する BCDO 活性を in vitro において調べた。 Goodman らが示した常法⁵¹⁾に準じて小腸粘膜粗酵素を用いて BCDO 活性を測定したところ, レチナール, レチノール生成がほとんど認められなかった。検討の結果, 酵素調製

時に DTT, グルタチオンなどの SH 試薬をニコチン酸アミドと共に加えることで安定して BCDO 活性を測定出来た。また, ジオキシゲナーゼ活性に一般に要求される Fe^{2+} の添加が有効であった。本酵素は最適 pH 7.7, β -カロテンに対する K_m は $6.82 \mu\text{M}$, V_{max} は 1.85 nmol/h/mg であり, α -カロテンに作用してレチナールを生成させるがゼアキササンチンとカンタキササンチンには作用しない。

12. ラット小腸粘膜レチナール還元酵素活性⁵⁵⁾

ラット小腸レチナール還元酵素 (RRase) は cofactor として還元型ピリジンヌクレオチドと SH 試薬が必要であり, 最適 pH は 6.3 でアルデヒド類を比較的非特異的に還元することが既に知られている⁵⁶⁾。この酵素 (EC 1, 1, 1, 71) は小腸で吸収されたプロビタミン A なかでも β -カロテンの分解に続くレチナールのレチノールへの還元を触媒している。BCDO と同様に *in vitro* の条件でこの酵素は非常に不安定であり, 粗酵素液を 4°C に数時間放置すると活性の 90% 以上が失われる。プロテアーゼ阻害剤の TLCK, TPCK 又はロイペプチンの添加は効果なく, GSH も無効なのでプロテアーゼによる分解や SH 基の酸化による失活ではないらしい。しかし, BCDO 活性の安定化に有用であった NA または NADH を酵素調製時に 2 mM 程度添加することによって活性低下を 30 から 60% に抑えることが出来た。cofactor として NADH と GSH 各 2 mM が必要である。最適 pH は 6.3 であり, K_m は $83.3 \mu\text{M}$, V_{max} は 13.3 nmol/h/mg であった。RRase は還元酵素なので, 酵素内の Ser 又は His 残基が H^+ carrier として働いている可能性がある。phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) は活性に影響せず, dimethylpyro carbonate (DEP) は 35% 低下させたので, His 残基の活性への関与が示唆された。 Ca^{2+} 及び Mg^{2+} は活性に関与している。RRase 及び BCDO の活性の不安定さが何に起因するものかは不明であるが, 代謝回転の早い小腸粘膜細胞においては酵素も寿命が短いのかかもしれない。

13. 粗パーム油からのカロテン回収^{57,58)}

カロテノイドの摂取は緑葉野菜を充分にとれば, 食品・栄養学的, 疫学的に必要な量を満たしていると考えられる。しかし, 医薬として臨床面からカロテンを多量に摂取しようとするれば, その供給源は現在世界で数社が製造販売している合成品か単細胞生物

からの抽出精製品に限られる。

パーム油は南アジア・アフリカ地方で多量に生産加工され消費されている一般的な食油である。現在, 最大の産出国はマレーシアであり次いでインドネシアである。パームヤシ果肉から絞った粗パーム油(原油)は, 品種によって異なるが 500 から 700 ppm のカロテンを含む。カロテンのうち 1/3 は α -カロテンで残りは β -カロテンであり, マレーシアにおいて 2000 年には 1,000 万トンのパーム原油生産が見込まれ, これに含まれるカロテンは約 7,000 トンと推定されるが, 食油加工の脱ガム・脱色工程においてほとんど除去され廃棄されている。工業原料としてのパーム原油からカロテンを回収する方法がすでにライオン(株)によって開発され, 工場スケールでの回収生産を行っている⁵⁹⁾。しかしながら, この過程でパーム油はトリグリセリドからメチルエステルに変化しており, 食用にならない。東南アジアにおける食油需要を配慮すると, 生産地(マレーシア)においてパーム食油工業にカロテン回収プロセスが導入できれば貴重な生物資源を有効に利用できる考えた。そこで, ライオン(株)の協力を得てパーム原油からカロテンを回収する方法の開発を進め, 実験室段階の研究を終えて実用化試験の段階に至っている。以下に方法の概略を示す。

パーム原油中のカロテンが吸着クロマトグラフィーによってトリグリセリドから分離する方法を開発した。カラム担体に divinylbenzene-styrene 共重合体を用い, 低級アルコールとヘキサンによる段階的溶出を行った。クロマト条件はカラム温度が $50\sim 60^\circ\text{C}$, 低級アルコールによって油脂を溶出させ, その後ヘキサンでカロテンを溶出する。一例を Fig. 21 に示す。一回のクロマトグラフィーによってカロテン回収率は 60% 以上であり, カロテン濃度は 60 から 100 倍に上昇した。回収されたカロテン画分の α -カロテンと β -カロテンの組成は変わらず, 油脂の脂肪酸組成もほとんど変化がない。

この研究は JICA プロジェクトの中で行われたものであり, マレーシア国特許申請をしている。この方法の実用化が軌道に乗ればマレーシア国の関係者にとって大きな喜びになるものと期待している。そうして, 比較的安価なカロテン製剤が病の心配がある世界の人々に貢献できることになれば指導した著者にとって望外の喜びである。

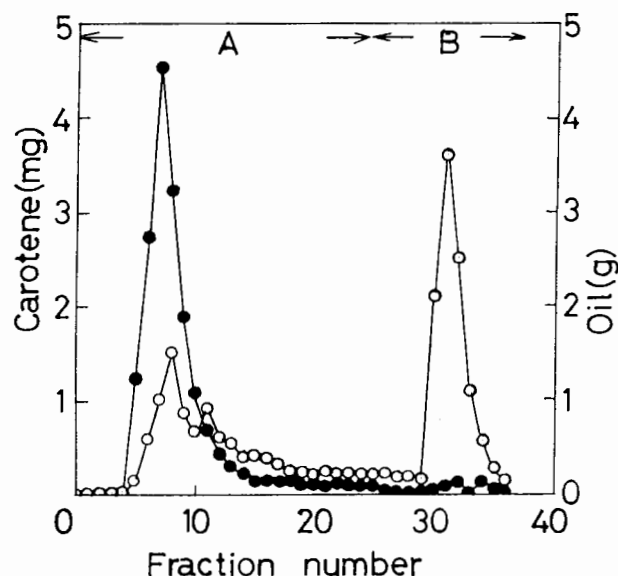


Fig. 21 Diaion HP-20 Column Chromatography for separation of Palm Carotene. Column, 3 cmD×35 cmL; Initial solvent (A), isopropanol 550 ml; second solvent (B), n-hexane 250 ml. One fraction, 23 ml. Column temperature, 50 °C. Flow rate, 1.75 ml/min. CPO loading, 30 g. ○, carotene; ●, oil.

要 約

緑葉カロテノイドの主成分であるルテインと β -カロテンについて生化学的及び物理化学的特性を新規な面から明らかにした。1) 緑葉カロテノイド成分組成は季節によって変動し、その要因は気温であった。2) ホウレンソウ葉からルテインを結晶として調製する方法を確立した。3) ルテインは緑葉リポキシゲナーゼ活性を阻害し、少量の植物油添加が飼料作物貯蔵時の退色を防ぐなどの応用が可能である。4) ルテインが蛋白質や界面活性剤など保護コロイド溶液中でキラルな分子集合体を形成する。この現象はクロロプラストにおける光合成の電子伝達体として機能する可能性を含む。また、光スイッチの働きをする実用性が考えられることを示した。5) ヒト白血病細胞株の分化促進に β -カロテンとルテインの併用効果が有効であり、これは発癌抑制効果と見ることが出来る。6) カロテノイドの吸収・代謝機構をカロテノイド蓄積動物のニワトリ、ウズラと非蓄積動物のラットを用いて調べた結果、鳥ではルテインを主とするキサントフィルが多量蓄積されるが、ラットでは多量に吸収されたルテインは代謝を受け

て行方不明である。7) これに関与する β -カロテン開裂酵素とレチナル還元酵素の *in vitro* 活性測定法を改良して酵素化学的性質を明らかにした。8) パーム原油から、食油製造工程におけるカロテンの回収方法を開発し、マレーシア国にて実用化を進めている。

謝 辞

岡山大学農学部において27年間教育・研究に携わり、学生への指導を通して行ってきた研究成果のうち緑葉カロテノイドに関わるものをまとめて総合論文にした。これらの研究を進めるうえで多数の方々のご協力とご援助を得た。掲げて感謝の意を表したい。

農学部農芸化学科・生物化学研究室及び改組後の生物資源開発学講座・資源利用生化学研究室内の教官と学生の皆さん。

高木俊夫大阪大学名誉教授にはカロテノイドと蛋白質の相互作用の研究でご指導頂いた。

岡山理科大学理学部竹田邦雄教授にはカロテノイドと界面活性剤との相互作用の研究でご協力を頂いた。

その他農学部の教官の方々に様々なご協力、ご援助を頂いた。

また、12節のパームカロテン回収の研究は国際協力事業団 (JICA) によるマレーシア農科大学 (UPM) に関わるプロジェクトの中で行われたものであり JICA 関係者のご協力とライオン(株)オレオケミカル研究所のご厚意に深謝する。

文 献

- 1) Takagi S.: Determination of Green Leaf Carotenoids by HPLC. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1211-1213 (1985)
- 2) Takagi S., F. Kishi, K. Nakajima, Y. Kimura, M. Nakano: A Seasonal Variation of Carotenoid Composition in Green Leaves and Effect of Environmental Factors on it. *Sci. Rep. Fac. Agr. OKAYAMA Univ.*, **75**, 1-7 (1990)
- 3) 林 孝三: 植物色素. 養賢堂, 東京, p 76 (1980)
- 4) 高木茂明: ホウレンソウ葉から Lutein の結晶単離について. *岡大農学報*, **44**, 44-46 (1974)
- 5) Bartlett L., W. Klyne, W.P. Mose, P.M. Scopes, G. Galasko, K. Mallams, B.C.L. Weedon, J. Szaboles, G. Toth: Optical Rotatory Dispersion of Carotenoids. *J. Chem. Soc.*, (C) 2527 (1969)
- 6) Enzell C. R., G. W. Francis: Mass Spectrometric Studies of Carotenoids, 2. A Survey of Fragmentation Reaction. *Acta Chemica Scand.*, **23**, 727 (1969)
- 7) 高木茂明, 松上道雄, 守時 勤: ホウレンソウ葉リポキシゲナーゼの精製とルテインによる活性阻害. *岡大農学*

- 報, **49**, 35-44 (1977)
- 8) 高木茂明, 松上道雄: ルテインによるハウレンソウリポキシゲナーゼ活性阻害機構について. 農化, **51**, 489-495 (1977)
- 9) Ben-Aziz A., S. Grossman, P. Budowski, I. Ascarelli: Enzymatic Oxidation of Carotene and Linoleate by Alfalfa; Properties of Active Fraction. Phytochem., **10**, 1823-1830 (1971)
- 10) Friend J., M. Mayer: The Enzymatic Destruction of Carotenoids by Isolated Chloroplasts. Biophys. Biochim. Acta, **41**, 422-429 (1960)
- 11) Grossman S., A. Ben-aziz, I. Ascarelli, P. Budowski: Intracellular Distribution of Lipoxigenase-Like Activity of Alfalfa Leaves. Phytochem., **11**, 509-514 (1972)
- 12) P. Budowski, A. Bond: Autoxidation of Carotene and Vitamin A. Influence of Fat and Antioxidants. Arch. Biochem. Biophys., **89**, 66 (1960)
- 13) 高木茂明: ハウレンソウリポキシゲナーゼ活性に及ぼす β -カロテンの影響. 岡大農学報, **53**, 29-35 (1979)
- 14) 高木茂明: 蛋白とルテインとの結合性について: 農化, **52**, 25-30 (1978)
- 15) S. Takagi: Simultaneous Determination of Total Chlorophyll and Total Carotenoid in Detergent solubilized chloroplasts: Sci. Rep. Fac. Agr. OKAYAMA Univ., **43**, 75-84 (1974)
- 16) Emerson M. F., A. Holtzer: On the Ionic Strength Dependence of Micelle Number II. J. Phys. Chem., **71**, 1898 (1967)
- 17) Reynolds J. A., S. Herbert, H. Polet, J. Steinhardt: The Binding of Diverse Detergent Anions to Bovine Serum Albumin. Biochem., **6**, 937-947 (1967)
- 18) Takagi S., M. Shiroishi, T. Takagi: Interaction of Lutein with Ovalbumin and other Protein. Agr. Biol. Chem., **45**, 1159-1165 (1981)
- 19) Weedon B.C.L., Carotenoids; Ed. by O. Isler, p 267. Berkhauser Verlag, Barseel (1971)
- 20) Takagi S., K. Takeda, T. Takagi: Effect of Addition of Lipids on the Novel Optical Activity of the Complex between Lutein and Ovalbumin. Agr. Biol. Chem., **46**, 399-404 (1982)
- 21) Takagi S., K. Takeda, K. Kameyama, T. Takagi: Visible Circular Dichroism of Lutein Acquired on Dispersion in an Aqueous Solution in the presence of a Limited Amount of Sodium Dodecyl Sulfate and a Dramatic Change of the CD Spectrum with Concentration of the Surfactant. Agr. Biol. Chem., **46**, 2035-2040 (1982)
- 22) Hagar A.: Ausbildung von Maxima im Absorptionsspektrum von Carotenoiden im Bereich um 370 nm; Folgen für die Interpretation bestimmter Wirkungsspektren. Planta, **91**, 38 (1970)
- 23) Kasha M., H. R. Rawls, A. El-Bayoumi: The Exciton Model in Molecular Spectroscopy. Pure Appl. Chem., **11**, 371-392 (1965)
- 24) Bradley D. B., I. Tinoco Jr., R. W. Woody: Absorption and Rotation of Light by Helical Oligomers; The Nearest Neighbor Approximation Biopolymers, **1**, 239-267 (1963)
- 25) Takagi S., K. Takeda, M. Shiroishi: Aggregation, Configuration, and Particle Size of Lutein Dispersed by SDS in Various Salt Concentrations. Agr. Biol. Chem., **46**, 2217-2222 (1982)
- 26) Takagi S., S. Nakano, K. Kameyama, T. Takagi: Lutein Dispersed in Acetone Aqueous Solution; Spectroscopic Analysis and Electron Microscopic Observation. Agr. Biol. Chem., **51**, 1561-1566 (1987)
- 27) Takagi S., T. Yamagami, K. Takeda, T. Takagi: Helical Configuration of Lutein Aggregate Dispersed in Liposomes of phosphatidyl Choline and Digalactoyldiglyceride. Agr. Biol. Chem., **51**, 1567-1572 (1987)
- 28) Takagi S., T. Yoshida, T. Takagi: Electron Microscopic Observation of Lutein Aggregates. Sci. Rep. Fac. Agr. OKAYAMA Univ., **65**, 47-52 (1985)
- 29) Takagi S., K. Makita: Effect of Chiral Aggregate of Lutein on Photosynthetic Electron Transport Activity in Spinach Thylakoid, and Interaction between Lutein and Thylakoid Membrane. Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ., **66**, 49-58 (1985)
- 30) 高木茂明・樋詰和久・木村吉伸・養和田潤・松尾義信: ハウレンソウ葉カロテノイドがひと白血細胞株の分化に及ぼす影響. 岡大農学報, **80**, 7-15 (1992)
- 31) Tomita Y., K. Himeno, K. Nomoto, H. Endo, T. Hirohata: Augmentation of Tumor Immunity Against Syngeneic Tumors in Mice by β -carotene. J. Natl. Inst. Cancer, **78**, 679-681 (1987)
- 32) Pung A., J. E. Rundhang, C. N. Yoshizawa, J. S. Bertram: β -Carotene and Canthaxanthin Inhibit Chemically and Physically Induced Neoplastic Transformation in 10T. 1/2 Cells. Carcinogenesis, **9**, 1533-1539 (1988)
- 33) 西野輔翼・村越倫明・高安淳子・木村 修・河村恵美子・酒井敏行・今西二郎: 天然カロテンによる神経芽細胞腫 GOTO 細胞の増殖抑制機構. 生化学, **60**, 638 (1988)

- 34) Thaller C., G. Eichele : Identification and Spatial Distribution of Retinoids in the Developing Chick Limb Bud. *Nature*, **327**, 625-628 (1987)
- 35) 高木茂明・中野浩行・木村吉伸・近藤康博・田辺 昭 : 緑葉カロテノイドのニワトリ卵黄への選択的移行とその機構. *岡山大農学報*, **77**, 1-8 (1991)
- 36) Norman G. H., A. H. Sykes, H. S. Baylay : Deposition of Orally Administered β -Carotene, β -Apo-8-carotenoid acid ethyl ester and zeaxanthin in the egg yolk by laying hens. *Brit. Poul. Sci.*, **14**, 507-519 (1973)
- 37) 高木茂明・三木 晃・木村吉伸・佐藤勝紀 : ウズラ反転小腸によるハウレンソウ葉カロテノイドの吸収とレチノイド生成及び血中カロテノイドの卵黄への移行機作について : *岡大農学報*, **84**, 1-6 (1995)
- 38) 高木茂明・広尾禎久・大田守也・木村吉伸 : ラット反転小腸における β -カロテンの吸収と代謝挙動. *日本栄養食糧学会誌*, **47**, 287-293 (1994)
- 39) 高木茂明・佐藤美郎・木村吉伸 : β -カロテン及びハウレンソウカロテノイドのラットにおける吸収と蓄積. *岡大農学報*, **78**, 1-9 (1991)
- 40) Bentram J. S., L. N. Kolond, F. L. Meyskens Jr. : Rationale and Strategies for Chemoprevention of Cancer in Humans. *Cancer Res.*, **47**, 3012-3031 (1987)
- 41) Murakoshi M., H. Nishino, Y. Satomi, J. Takayama, T. Hasegawa, H. Tokuda, A. Iwashima, J. Okuzumi, H. Okabe, H. Kitano, R. Iwasaki : Potent Preventive Action of α -Carotene against Carcinogenesis: Spontaneous Liver Carcinogenesis and Promoting Stage of Lung and Skin Carcinogenesis in Mice are Suppressed more effectively by α -Carotene than by β -Carotene. *Cancer Res.*, **52**, 6583-6587 (1992)
- 42) 牛島義雄 : 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 335 (1988)
- 43) Goodman T. W. : Metabolism, Nutrition, and Function of Carotenoids. *Annual Review of Nutrition* (Olson R. E., et al eds.), **6**, 273-292, Annual Reviews Inc. Palo Alto (1986)
- 44) Olson J. A. : *Am. J. Clin. Nutri.*, **22**, 953- (1969)
- 45) Wang X. D., G. W. Tang, J. G. Fox, N. I. Krinsky : Enzymatic Conversion of β -Carotene into β -Apocarotenals and Retinoids by Human, Monkey, Ferret, and Rat Tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 8 (1991)
- 46) 早石 修・野崎光洋 (編) : 酸素添加酵素, p 49, 東大出版会, 東京 (1973)
- 47) 高木茂明・井藤隆之・中島明夫・木村吉伸・竹田邦雄 : 遊離胆汁酸塩によって分散されたルテインの分光学的挙動と形態. *日本農芸化学会誌*, **67**, 1055-1060 (1993)
- 48) Hofman A/F., D. S. Small : Detergent Properties of Bile Salts: Correlation with Physical Function. *Ann. Rev. Med.*, **18**, 333-343 (1967)
- 49) Dysens L. N. M. : The Flattering of the Absorption Spectra of Suspensions, as Compared to That of Solution. *Biophim. Biophys. Acta*, **19**, 1-10 (1956)
- 50) 高木茂明・渡辺正徳・中島明夫・木村吉伸 : ラット小腸粘膜 β -carotene-15, 15' dioxygenase 活性測定法の確立と酵素化学的性質. *岡大農学報*, **87**, in press (1998)
- 51) Goodman D.S., J. A. Olson : The Conversion of All-trans β -Carotene into Retinol. *Method in Enzym.*, **15**, 462-475 (1969)
- 52) Lakshman M/R., I. Mychkovsky, M. Attlesey : Enzymatic Conversion of All Trans β -Carotene to Retinol by a Cytosolic Enzyme from Rabbit and Rat Intestinal Mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9124-9128 (1989)
- 53) Hansen S., W. Maret : Retinal is not Formed in vitro by Enzymatic Central Cleavage of β -Carotene. *Biochem. J.*, **27**, 200-206 (1988)
- 54) Wang X. D., G. T. Tang, J. G. Fox, N. I. Krinsky, R. M. Russel : Enzymatic Conversion of β -Carotene into β -Apocartenals and Retinoids by Human, Monkey and Rat Tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 8-16 (1991)
- 55) 高木茂明・藤井祐子・木村吉伸 : ラット小腸粘膜レチナル還元酵素活性の測定法の確立と酵素化学的性質. *岡大農学報*, **81**, 1-7 (1993)
- 56) Fidge N. H., D. S. Goodman : The Enzymatic Reduction of Retinal to Retinol in Rat Intestine. *J. Biol. Chem.*, **243**, 4372-4379 (1968)
- 57) Baharin B. S., K. Abdul Rahman, M. I. Abdul Karim, T. Oyaizu, K. Tanaka, Y. Tanaka, S. Takagi : Separation of Palm Carotene from Crude Palm Oil by Adsorption Chromatography with Synthetic Polymer Adsorbent. *J. Am. Oil Chem. Sci.*, in press (1998)
- 58) Universiti Pertanian Malaysia, Carotene Recovery from Palm Oil. Malaysia Patent, Application No., PI 9501562 (1995)
- 59) Hama I., Y. Tanaka, Y. Yago, T. Okabe : Japanese Patent 61109764 (1986)