

Zeaxanthin 分子集合体の分光学的挙動とその形態

高木 茂明・伊谷 淳子・木村 吉伸・竹田 邦雄^{a)}

(生物資源開発学講座)

A Spectroscopic Behavior of Zeaxanthin Molecular Aggregate and Its Form

Shigeaki Takagi, Junko Itani, Yoshinobu Kimura and Kunio Takeda^{a)}

(Department of Bioresources Chemistry)

Lutein, one of the xanthophylls, can be dispersed in various aqueous solutions, for example, protein solution, dilute acetone solution, dilute sodium dodecyl sulfate (SDS) solution, dodecyl trimethylammonium bromide solution, hen egg yolk phosphatidylcholine (PC) liposome, or digalactosyldiglyceride liposome, to form chiral helical aggregates which acquire an optical activity in the visible region, and have a left handed helical structure.

In this report, zeaxanthin, a structural isomer of lutein, was subjected to investigation as to whether zeaxanthin formed the chiral helical aggregate. When zeaxanthin was dispersed in SDS solution, some differences from lutein were observed. (1) CD spectrum of positive Cotton effect was shown, which was the reverse of lutein. (2) SDS concentration giving the reversion of the CD spectrum pattern was higher (3.5 mM) than that of lutein (0.6 mM). In spite of these differences, however, the results showed that zeaxanthin molecules also associated to form molecular aggregate in such a manner performing π^* - π^* interaction at conjugated polyene sites.

Zeaxanthin dispersed in PC liposome gave both left and right-handed helical structure under presence of Ca^{2+} at alkaline condition in comparison with lutein's left-handed structure. This result may depend on the fact that synthesized racemic zeaxanthin is subjected to this experiment.

Those results gave the general conclusion that xanthophylls had the same basic types of behavior for making molecular aggregate in aqueous dispersion.

Key words : zeaxanthin, molecular aggregate, chiral helical structure liposome

緒 言

緑葉 xanthophyll のうちとくに lutein は蛋白水溶液¹⁾, 界面活性剤²⁾, acetoneのうすい水溶液³⁾及び phosphatidyl choline (PC) 又は digalactosyldiglyceride (DGDG) の liposome⁴⁾など水を溶媒とする保護コロイド的性質を持つ溶液に均一に分散して分子集合体を形成することをこれまで明らかにして来ている。この集合体は PC-liposome に分散さ

せたとき pH10 以上において Ca^{2+} 存在下で左巻きのらせん構造を形成することが電子顕微鏡によって観察できた。このように lutein が水溶性のキララらせん状の集合体を形成する挙動が明らかになったので、これが xanthophyll 類に共通の性質に基づくものか

Received October 4, 1995

a) 岡山理科大学理学部

(Faculty of Science, Okayama University of Science)

どうかを確認するために、lutein の構造異性体である zeaxanthin を用いて同様の手法で調べた。すなわち、sodium dodecyl sulfate (SDS) 水溶液及び PC-liposome に分散させた zeaxanthin の分光学的挙動を調べて分子会合の有無を知ると共に電子顕微鏡によって集合体像の観察を行った。

材料と方法

Zeaxanthin：結晶 zeaxanthin は日本ロシユ(株)より恵与された合成ラセミ混合物であり光学異性体(3R,3'R) : (3R,3'S) : (3S,3'S) = 1 : 2 : 1 のモル比で存在する。これをエタノール溶液として供試した。ゼアキサントンの濃度はエタノール中 E 1%, 1 cm, 453 nm = 2540 を用いて求めた。

界面活性剤：zeaxanthin の水系における挙動を調べるために可溶化剤として SDS (半井化学) を用いた。liposome 調製用界面活性剤として卵黄から調製した⁵⁾ phosphatidyl choline (PC) を用いた。

吸収スペクトル：Shimadzu MPS-5000 分光光度計を用いて測定した。

円二色性：JASCO J-500 spectropolarimeter を用いて測定した。

蛋白質：lysozyme は市販の結晶(生化学工業)を用い、卵白アルブミンはニワトリ卵白から調製した結晶を用いた。

平衡透析：zeaxanthin への SDS の結合量を求めるために二室型セルを装着した平衡透析機を用いた。

PC liposome への zeaxanthin の分散：50ml のナシ型フラスコに PC のクロロフォルム溶液を 5ml 又は 10ml とりロータリーエバポレーターによって減圧乾固させる。デシケーター中で 24 hr 乾燥後、水又は緩衝液を 10ml 加え、craft 点以上の温度(42°C)で Voltex mixer を用いて 5 min 間攪拌して multi lamellar vesicle (MLV) を調製した。さらに、MLV を 42°C で超音波洗浄器中 90 分間かけて微細リポソーム (small unilamellar vesicle) を調製し、これを PC liposome として用いた。zeaxanthin の分散は PC liposome 5.3ml に zeaxanthin のエタノール溶液 0.2ml を攪拌滴下して行い、これを供試液とした。

電子顕微鏡観察：zeaxanthin 試料溶液をカーボン蒸着メッシュ上に毛細管で 1 滴のせ、さらにその上から 1% 酢酸ウランを 1 滴重ねてのせ、約 15 min 後に残液を濾紙に吸収させ風乾して negative 染色を行い

供試した。透過型電子顕微鏡(日本電子 JEM 100B 型)を用い、加速電圧 80 KV (電流約 70 mA) で像の観察を行った。

結 果

1. SDS 分散 zeaxanthin の分光学的挙動

SDS の濃度を変えて分散させた zeaxanthin の吸収及び CD スペクトルを Fig. 1 に示す。吸収スペクトルの λ_{max} は 1 mM 以下の SDS 濃度で 392 nm にあるが、SDS 濃度が高くなるにつれて少しずつ長波長にシフトしている。それに伴って SDS の 2 mM 以上では 447 nm を中心ピークとしたスペクトルの盛り上がりが見られ、これは対照として示した zeaxanthin エタノール溶液の共鳴振動ピークの λ_{max} に近似している。CD スペクトルは 3 mM SDS 濃度以下では正の Cotton 効果を示しており、lutein の負の Cotton

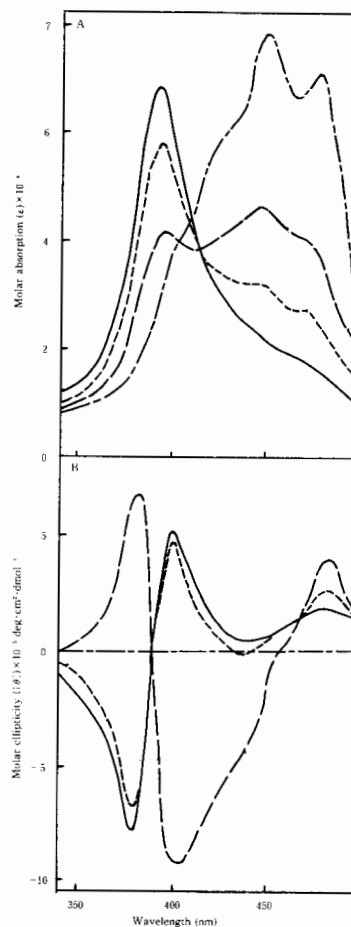


Fig. 1 Absorption(A) and CD(B) spectra of zeaxanthin dispersed in SDS solutions of different concentrations.

SDS solution : —, 1 mM; ---, 2 mM; - · - ·, 3 mM; · · · ·, control (ethanol solution)

効果と逆になっている。このときの λ_{\max} は 380 nm, λ_{\min} は 402 nm であった。いっぽう, SDS が 4 mM 以上になると λ_{\max} と λ_{\min} の関係は 3 mM 以下の場合とは全く逆になってしまい lutein で見られた逆転現象を生じた。しかし, この CD スペクトル逆転現象は lutein において観察されたもの²⁾と Cotton 効果の符号の正負が反対になっている。また, この結果から zeaxanthin 分散液の CD 強度が 0 になる(ちょうど逆転する) SDS 濃度は約 3.5 mM であった (Fig. 2)。このように SDS に分散した 3,3'-dihydroxycarotene (zeaxanthin, lutein) は一般に SDS の濃度に依存した CD スペクトルの逆転現象を示すようであり, その機構については lutein について既に詳しく考察している⁹⁾。lutein 集合体の CD スペクトル波形が逆転する SDS 濃度は 0.6 mM であるので, zeaxanthin 集合体は SDS の作用に対して lutein よりも鈍感であり, 界面活性剤への抵抗性の大きい強固に結合したものと推測される。

2. zeaxanthin への SDS 結合量

zeaxanthin 分散液における SDS 濃度を変えると zeaxanthin の分光学的挙動が顕著に変化する。また,

SDS 溶液に分散した lutein の電子顕微鏡像⁷⁾は SDS 濃度が高くなるにつれて集合体の幅が大きくなることから, SDS と zeaxanthin の相互作用性の尺度として SDS の zeaxanthin への結合量を求めた。lutein においては SDS 濃度を変化させた時の CD スペクトル解析⁹⁾によって SDS の lutein への結合モル比を求めることができたが, zeaxanthin の場合 CD スペクトル波形が逆転する $[\theta] = 0$ に丁度等吸収点 (isosbestic point) があるために, 作図的解析は困難であった。そこで平衡透析法により SDS の結合量を直接求めた。半透膜をはさんだ双方のセルに同一濃度の SDS 水溶液を入れ, 一方のセルに zeaxanthin エタノール溶液, 他方にエタノールのみをそれぞれ 10 μ l 加える。これを 4 $^{\circ}$ C の恒温槽中で遮光下 24 hr 振盪して平衡に到達させた。この平衡状態とは SDS のモノマー又はオリゴマーが zeaxanthin に結合することによって試料セル中の遊離 SDS イオン濃度が低下するため対照セルから SDS が半透膜を通過して試料セルに移動して平衡になる事を指す。平衡到達後に各セルより 0.5 ml ずつ取り出しメチレンブルー法によって SDS 濃度を測定⁸⁾した。平衡 SDS 濃度は

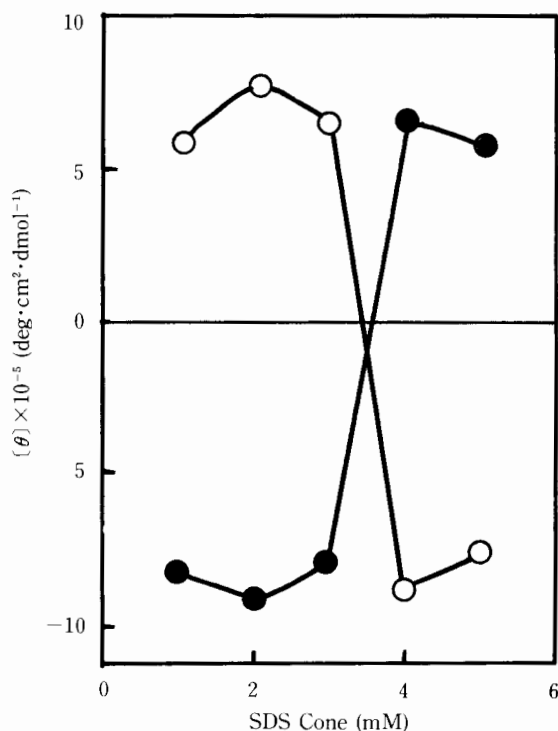


Fig. 2 Effect of SDS concentration on molar ellipticity of zeaxanthin at λ_{\max} (400 nm) and λ_{\min} (380 nm).

Zeaxanthin, 23.2 μ M

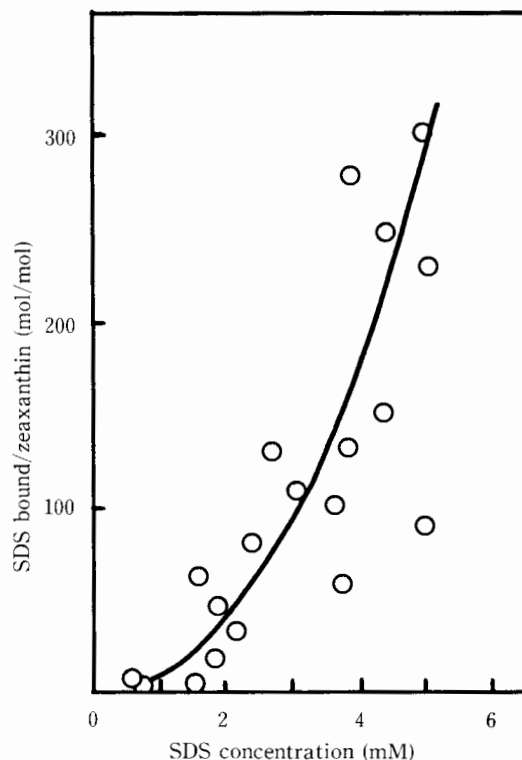


Fig. 3 Binding isotherm of SDS to zeaxanthin in 20 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 4 $^{\circ}$ C.

Zeaxanthin, 1.5 μ M

対照セルのそれを用いた。横軸に平衡 SDS 濃度、縦軸に SDS 結合量を取りプロットした結合等温線を Fig. 3 に示す。この結果から平衡 SDS 濃度が高くなると zeaxanthin への SDS 結合量が指数関数的に増大することが分かる。Fig. 4 から各平衡濃度における平均 SDS 結合量を求めると、平衡濃度 1, 2, 3, 4, 5 mM に対してそれぞれ 10, 40, 100, 200, 340, (SDS/zeaxanthin; mol/mol) であった。lutein において既に CD スペクトル解析法によって得られた SDS 結合モル比と比較すると、CD パターン逆転の 0.6 mM SDS において 30 (mol/mol) の結合モル比を示す lutein に対し、zeaxanthin は 1 mM SDS で結合比が 10 であるが CD パターンの逆転を示す 3.5 mM SDS では 140 と大きくなっている。このことは、前述のように zeaxanthin が lutein よりも SDS による影響を受けにくいことを示しており、供試 zeaxanthin が水系で集合体を形成しにくいことや集合体における分子間力が lutein のそれよりも大きいことが予測される。

3. PC リポソーム分散 zeaxanthin の分子集合

lutein についてはすでに PC リポソーム分散系の分子集合体について詳しく調べており⁴⁾、CD における負の Cotton 効果から予想された左巻きの分子集合体を電子顕微鏡によって観察している。zeaxanthin の CD スペクトルは正の Cotton 効果を与えることから、右巻きらせん構造が予測された。らせん構造の形成には①PC濃度、②Ca²⁺の存在、③pHの3つの条件が適当でなければならないことをこれまでの研究により経験的に明らかにしている⁴⁾。Fig. 4 に pH 7.0 において Ca²⁺が存在する場合としない場合との吸収及び CD スペクトルならびにそれらの極値における ϵ 及び $[\theta]$ の PC 濃度依存性を示す。PC に分散させた zeaxanthin は 394 nm に単一ピークを持つ吸収スペクトルを与え、さらに 380 nm に谷、400 nm に山を持つ CD スペクトルを示すが長波長側のピーク ($\lambda_{\max} = 480$ nm) については未検討である。これに Ca²⁺を加えると吸収スペクトルにおいて λ_{\max} は 394 nm で変わらないが Abs は 1.2 から 1.8 倍に大きくなる。また、CD スペクトルにおいては波形が変化し、山及び谷の各 $[\theta]$ は 1/5 以下に小さくなった。このことは Ca²⁺の結合によって集合体が引き伸ばされたために集合体の構造の規則性が低下したことを示

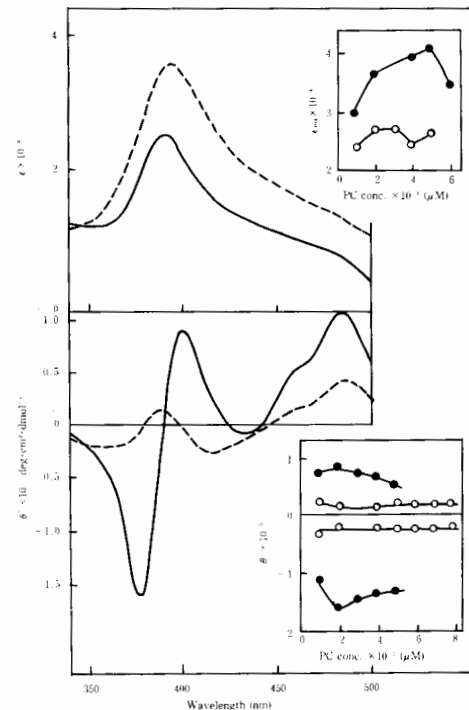


Fig. 4 Absorption and CD spectra of zeaxanthin dispersed in PC liposome under presence and absence of Ca²⁺.

Phosphatidylcholine(PC), 20 μ M; zeaxanthin, 28.9 μ M; pH 7.0; —, no Ca²⁺; - - -, Ca²⁺. Internal small figures show the effect of PC concentration on molar absorption coefficient (ϵ) and molar ellipticity ($[\theta]$) at λ_{\max} and λ_{\min} , respectively.

●—●, no Ca²⁺; ○—○, Ca²⁺. Figures show λ_{\max} or λ_{\min} .

すものであり、後述のように形態的に長く引き伸ばされたため電子顕微鏡でらせん構造が観察できるものと考えられる。

上記の分光学的結果をふまえてまず pH 7.0 及び 8.0 において PC リポソームに分散させた zeaxanthin 分子集合体の電子顕微鏡像を観察した (Fig. 5)。Ca²⁺を加えない系においては集合体像は棒状のみのみであり、その系の PC 濃度を変化させた時の像の長さや幅はそれぞれ 5~25 nm と 100~600 nm の範囲で変動していた。Ca²⁺の存在する系においては棒状の集合体像の中にらせん状の像が部分的に認められた。らせん構造の一端又は両端が集合体の団塊中に没して長さの測定はできなかったため、らせんの周期と幅の変動を調べた結果、幅は 15~35 nm、周期は 100~170 nm であり、PC の濃度依存は認められなかった。これらの中性から微アルカリ条件で Ca²⁺存在下における電子顕微鏡観察では右巻きのらせん

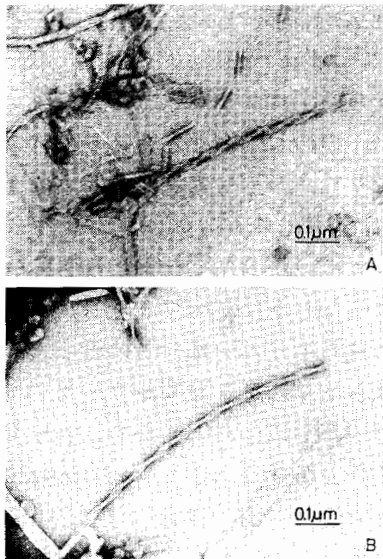


Fig. 5 Effect of pH on transmittance electron micrographic image of zeaxanthin aggregate dispersed in PC liposome (1).
PC, 30 μ M; CaCl_2 , 5 mM; pH 8.0. A, left-handed helix; B, right-handed helix.

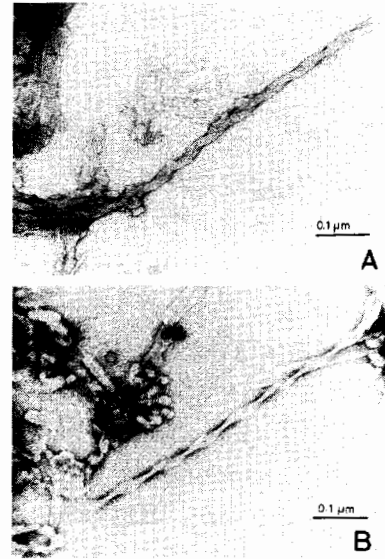


Fig. 6 Effect of pH on transmittance electron micrographic image of zeaxanthin aggregate dispersed in PC liposome (2).
PC, 30 μ M; CaCl_2 , 5 mM. A, right-handed helix at pH 9.0; B, right-handed helix at pH 10.0.

構造のみが観察され、これは CD スペクトルにおける正の Cotton 効果から予測された結果と一致した。しかしながら、pH7.0ではラセン構造の数が少なくまた像が明瞭でなかったので pH を上昇させて集合体を観察した。これは既に lutein のときにみられたように pH を上げると、 Ca^{2+} との結合性が増加して集合体が PC との相互作用を強めて伸長されるためにらせん構造が明瞭になるという同様の結果を期待したものである。その結果 (Fig. 6) pH9.0以下では右巻きらせんが多く、まれに左巻きらせんが観察された。一方、pH10と11の比較的高い pH においては左巻きのらせん構造のみが観察された。このときの、各分散液の分光学的挙動を調べるとスペクトルパターンは pH によって少し変動するが (Fig. 7)、 Ca^{2+} の有無のときほど大きくは変動していなかった。またらせんの幅は pH が高くなると広く、逆にらせん周期は短くなっていた。

これらの結果から、Zeaxanthin 合成品を PC リポソームに分散させたとき右巻きと左巻きの2種類のキラルな分子集合体を形成することがわかる。しかし pH が 10 以上と高いときには zeaxanthin は OH 基の解離によって負に荷電して Ca^{2+} 存在下で左巻きのらせん構造のみをとる。そうしてこのときには zeaxanthin の集合体は長軸方向にしっかり引っ張ら

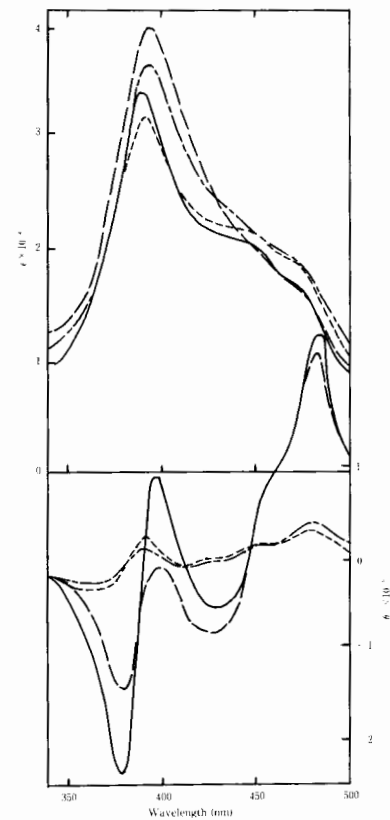


Fig. 7 Effect of pH on absorption and CD spectra of zeaxanthin dispersed in PC liposome.
PC, 30 μ M; zeaxanthin, 24.4 μ M; Spectra, —, pH 7.0; ---, pH 7.0 + Ca^{2+} ; - · - ·, pH 11.0; — —, pH 11.0 + Ca^{2+}

れた構造を取っているものと考えられる。

考 察

ホウレンソウ葉 lutein (lutein A) の水系における分子集合体についてはこれまで詳しく報告して来たが^{1-4,6,9-12)}, lutein が水系で示した種々の現象は水酸基を持つカロテノイド (xanthophyll) が一般的に示す物理化学的性質であるかどうかを確認するため zeaxanthin を試料に用いたが, 化学合成品のため光学異性体の混合物 (ラセミ体; I, 3R·3'R: II, 3R·3'S: III, 3S·3'S= 1:2:1 (mol/mol) であった。このうち I と III は enantiomer であるためラセミ化して光学活性を示さないが, 試料の半分を占める II は chiral である。したがって, 予想としては chiral な分子集合体が形成されることになり, 結果として予想どおり SDS 水溶液に分散させても (Fig. 1), また PC リポソームに分散させても (Fig. 5) 吸収スペクトル及び円二色性 (CD) スペクトルにより chiral な分子集合体の形成が確認できた。CD スペクトルにおいては lutein の場合と異なり正の cotton 効果を示しているが, これは上述のように zeaxanthin II (3R,3'S) に由来するものと考えられる。また PC リポソームに分散させた zeaxanthin の集合体はらせん構造をとっていることも確認できた。しかしながら, らせん構造の回転方向は pH によって異なり, Ca²⁺ 存在下中性及び微アルカリ性において右巻きと左巻きの2種のらせん構造体が観察されるのに対し, pH 10, 11 の高いアルカリ性においてはすべて左巻きらせんであった。このことは lutein が負の cotton 効果を示して左巻きらせん構造体のみを現していることと比較すると, 正の cotton 効果を示す zeaxanthin の場合には右巻きらせん構造体が予測されるのであるが左巻きを示すこともあるのは合成品であることと, さらに集合に対する pH の影響が lutein より大きいと考えられる。lutein についてはすでに報告しているように⁴⁾ 3' 及び 3' 水酸基の解離が起こって Ca²⁺ が結合し PC のリン酸基との橋渡しを行うから, pH が高くなるほど PC と zeaxanthin との結合は強くなりラセン構造として rigid になるものと考えられる。また Ca²⁺ 添加において CD スペクトルの $[\theta]$ は極端に低下していることから Ca²⁺ 添加が集合体を引き伸ばして共役 2 重結合系 π -exciton の相互作用を弱めたことを示している。このように考えると

zeaxanthin の光学異性体混合物は Ca²⁺ との相互作用が比較的弱い低い pH 条件下では I, II, III の光学異性体のうちいずれかが右巻きの分子集合体を作ろうとするが, 他のものが左巻きらせんの傾向をもつため左右いずれかのらせんを形成することになったのであろう。しかしながら pH が高くなり 3, 3' の水酸基の解離で負電荷が大きくなるために Ca²⁺ との相互作用が強まったときにすべて左巻きのらせん構造をとることは共役ポリエン部分での分子会合が本質的には左巻きらせん構造を取りやすいものであることを示唆している。以上のことから, 光学異性体混合物についての実験ではあるが zeaxanthin も lutein と同様に polyene の腹と腹をつけて少し振れている会合様式をとって, 大きさのうえでも lutein と類似のらせん構造体を形成していることがわかる。

zeaxanthin の CD スペクトルパターンが逆転する SDS の結合モル比を lutein のばあいと比較すると, 測定方法は異なるものの zeaxanthin に lutein の10倍以上の SDS が結合した時に逆転が起こっている。このことは zeaxanthin が光学異性体混合物であることのほかに, 水系での集合体における zeaxanthin 分子間の相互作用力が lutein のそれより大きいためであることが考えられる。これらの結果を総合すると, 水系において分子集合体を作る diol xanthophyll である lutein 以外に zeaxanthin (diol) も同じ挙動を示し, またこれまでに調べた cryptoxanthin (monool)⁹⁾ と合わせて3種が polyene 部分を合わせ少しねじれた類似のらせん構造をとることが明らかとなり, ケト基を持つカロテノイド (canthaxanthin) を除いては水系における分子集合体形成は xanthophyll 類に普遍的な性質であることがうかがえる。

要 約

我々は xanthophyll の一つである lutein が種々の水溶液例えばたんぱく質溶液, うすいアセトン溶液, うすい界面活性剤水溶液, 卵黄レシチン製リポソーム, あるいはホウレンソウ digalactosyl diglyceride 製リポソームに分散溶解してキラルらせん状集合体を形成し, 可視領域に光学活性を示すと同時に左巻きのらせん構造体を作ることを既に明らかにしている。本報告では lutein の構造異性体である zeaxanthin を用いて同様に分子集合体を形成するか

どうかを検討した。

zeaxanthin を sodiumdodecylsulfate (SDS) に分散させると、円二色性 (CD) スペクトルが逆の Cotton 効果を与え、またそのスペクトルパターンが逆転する SDS 濃度が lutein のとき 0.6 mM であったのに対し約 3.5 mM と高く、またそのときの SDS 結合量も多いという相異はあるが水系において π^* - π^* 相互作用を行わせるような分子集合体を形成するという基本的挙動を示した。PC リポソームに分散させたときアルカリ性で Ca^{2+} 存在下らせん構造を与える点も lutein と同じであった。しかし、用いた zeaxanthin が合成された光学異性体混合物であったためか左巻きと右巻きらせんの両方とも観察されホウレンソウ lutein A の左巻きらせんだけの結果と異なった。以上の結果から zeaxanthin も lutein と同じく水系で分子集合体を形成するという基本的分子挙動をとることが明らかとなった。

文 献

- 1) Takagi S., M. Shiroishi, and T. Takagi : Interaction of lutein with OVA and other proteins; Association and acquisition of novel optical activity. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2111-2117 (1980)
- 2) Takagi S., K. Takeda, K. Kameyama, and 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. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2035-2040 (1982)
- 3) Takagi S., S. Nakano, K. Kameyama, and T. Takagi : Lutein dispersed in acetone aqueous solution; spectroscopic analysis and electron microscope observation. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1561-1566 (1987)
- 4) Takagi S., T. Yamagami, K. Takeda, and T. Takagi : Helical configuration of lutein aggregate dispersed in liposomes of phosphatidyl choline and digalatosyldiglyceride. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1567-1592 (1987)
- 5) Allen C. E., P. Good, H. F. Davis, P. Chisum, S. and D. Fowler : Methodology for the separation of plant lipids and application to spinach leaf and chloroplast lamellae. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **43**, 223-231 (1966)
- 6) Takagi S., K. Takeda, and M. Shiroishi : Aggregation, configuration and particle size of lutein dispersed by SDS in various salt concentrations. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2217-2222 (1982)
- 7) Takagi S., T. Yoshida, and T. Takagi : Electron microscopic observation of lutein aggregates. *Sci. Rep. Fac. Agr. OKAYAMA Univ.*, **65**, 47-52 (1985)
- 8) Takeda K., M. Miura, and T. Takagi : Stepwise formation of complexes between sodium dodecyl sulfate and bovine serum albumin detected by measurements of electric conductivity, binding isotherm, and circular dichroism. *J. Colloid Interface Sci.*, **82**, 38-44 (1981)
- 9) Takagi S., M. Shiroishi, and T. Takeda : Further studies on the acquisition of novel optical activity on interaction of lutein and other carotenoids with proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1159-1165 (1981)
- 10) Takagi S., K. Takeda, and T. Takagi : Effect of addition of lipids on the novel optical activity of the complex between lutein and ovalbumin. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 399-404 (1982)
- 11) Takagi S., K. Takeda, and M. Shiroishi : Aggregation, Configuration and particle size lutein dispersed by sodium dodecyl sulfate in various salt concentrations. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2217-2222 (1982)
- 12) Takagi S., and K. Takeda : Visible circular dichroism of lutein aggregate in cationic surfactant solution. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1435-1440 (1983)