

生物が作り出す自己組織化材料：バイオサーファクタントの多彩な機能とその応用

北本 大

Naturally Engineered Glycolipid Biosurfactants Leading to Distinctive Self-assembling Properties

Dai KITAMOTO

Research Institute for Innovation in Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Science and Technology (AIST), 1-1 Higashi, Tsukuba City 305-8565, Japan

(Received November 1, 2007)

Biosurfactants (BS) are functional amphiphilic compounds produced by a variety of microorganisms. They show unique properties (e.g. mild production conditions, lower toxicity, and environmental compatibility) compared to chemically synthesized counterparts. The numerous advantages of BS have prompted applications not only in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries but in energy and environmental technologies as well. Mannosylerythritol lipids (MELs) are one of the most promising BS known, and are produced at yields of over 100 g/l from vegetable oils by yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*. MELs exhibit excellent surface-active and self-assembling properties leading to the formation of different lyotropic liquid crystals such as sponge (L_3), bicontinuous cubic (V_2) and lamella (L_α) phases. They also show versatile biochemical actions, including antitumor and differentiation-inducing activities against human leukemia cells, rat pheochromocytoma cells and mouse melanoma cells. MELs also display high binding affinity toward different immunoglobulins and lectins, indicating great potentials as new affinity ligands for the glycoproteins. More significantly, the cationic liposomes bearing MELs increase dramatically the efficiency of gene transfection into mammalian cells *via* membrane fusion processes. The yeast BS should thus be novel nanobiomaterials, and broaden their applications in various advanced technologies.

Key words—biosurfactant; glycolipid; self-assembly; liquid crystal; yeast; mannosylerythritol lipid

1. はじめに

生体中には各種の両親媒性物質が存在し、様々な界面で、物質、エネルギー、情報の交換に関与し、生体の秩序形成に大きな役割を果たしている。例えば、細胞膜ではリン脂質が自己組織化によって二分子膜を形成し、その膜中に物質認識（結合）や、物質輸送（透過）に係わるタンパク質や糖鎖が機能的に配置することで、細胞内外での情報伝達を可能としている。二分子膜（ベシクル）を形成する最も一般的な生体素材はリン脂質、特にホスファチジルコリンであるが、最近、リン脂質以外にも、単独でベシクル形成を示す天然あるいは合成の糖脂質が多数報告されている。¹⁾ 例えば、天然の糖脂質として

は、古細菌や好熱性細菌の細胞膜に存在するエーテル型脂質（グリセロールにイソプレノイドアルコールがエーテル結合したもの²⁾や、植物の葉緑体のチラコイド膜に存在するジガラクトシル-ジアシルグリセロール³⁾が挙げられる。しかし、リン脂質以外の天然脂質の多くは微量成分か、あるいは含有量が多くても分離・精製が煩雑であるため、一般的には機能性材料への工業的な利用は困難である。これらに対し、「バイオサーファクタント」は微生物プロセスによって量産可能な高機能性脂質であり、バイオマスの利用促進や化学物質に由来する環境負荷低減といった社会的背景と相まって、各種技術分野での利用が期待されている。

2. バイオサーファクタントとは

バイオサーファクタント（以下、BS）は、広い意味では生体由来の界面活性物質の総称であるが、研究開発分野においては、「微生物によって菌体外に生産される両親媒性脂質」を指す（したがって、

独産業技術総合研究所環境化学技術研究部門バイオ・ケミカル材料グループ（〒305-8565 つくば市東1-1中央第5-2）

e-mail: dai-kitamoto@aist.go.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS31で発表したものを中心に記述したものである。

植物由来のレシチンやサポニン、動物由来の胆汁酸などは BS の範疇とは異なる)。⁴⁾ 近年、バイオテクノロジーの発展による植物資源の増産や、分離技術の進歩によるダウンストリームプロセスの低コスト化などを背景として、こうした微生物由来の新しい素材に多くの関心が集まっている。

BS は、1960 年代に始まった「炭化水素発酵」(石油を原料とする発酵プロセス)の研究に端を発している。当時、炭化水素類を原料として、ある種の微生物を培養すると、培地中に両親媒性の脂質が生産されることが知られていた。微生物の種類や反応条件によっては、その生産量が非常に多くなることから、こうした両親媒性脂質、すなわち BS 自体が次第に注目されるようになった。⁵⁾

BS 研究が開始されてしばらくの間は、生分解性や安全性に優れた“地球に優しい界面活性剤”への応用研究が主流であった。しかし、ここ数年、ナノテクやライフサイエンスのアプローチから、BS が既存の界面活性剤や生体系脂質にはみられない高度な分子集合能(自己組織化)や生理活性(細胞活性化)などを持つことが判り、⁶⁾ その研究動向は大きく変わりつつある。現在では、BS が持つ様々な特異機能を生かした、より高機能・高付加価値製品への応用展開が活発化している。本講演では、BS の構造・物性や、界面化学的・生化学的特性、微生物

生産について概説するとともに、化粧品素材としてのポテンシャルを紹介したい。

3. バイオサーファクタントの構造

BS は、その親水基の構造から、1) 糖型、2) アミノ酸型、3) 有機酸型、4) 高分子型に分類され、現在では数十種類のものが知られている。親水基としては、上記分類にあるように糖やアミノ酸類が、疎水基としては各種の中鎖及び長鎖脂肪酸(飽和、不飽和、分枝、ヒドロキシ型など)が代表的である。⁶⁾

BS の工業的な利用はまだ限られているが、植物や動物系に比べると、原料に対する依存性が少ない、構造や機能の拡張性に優れている、生産や分離の効率が高いといった特徴を有し、現在、各種の技術分野で実用化研究が進展している。Figure 1 に代表的な BS の構造とその生産菌を示した。合成界面活性剤と比べた場合、BS の構造的な特徴は、1) 複数の官能基(水酸基、カルボキシル基、アミノ基)や不斉炭素、2) 複雑でかさ高い構造、3) 生分解を受け易い構造、などを有することである。一方、その機能的な特徴としては、1) 低濃度で大きな界面活性性、2) 緩やかで持続的な作用、3) 優れた分子集合体や液晶の形成能、4) 多彩な生理活性、などを発揮することである。

これらの物性や機能は、親水基と疎水基の「きれ

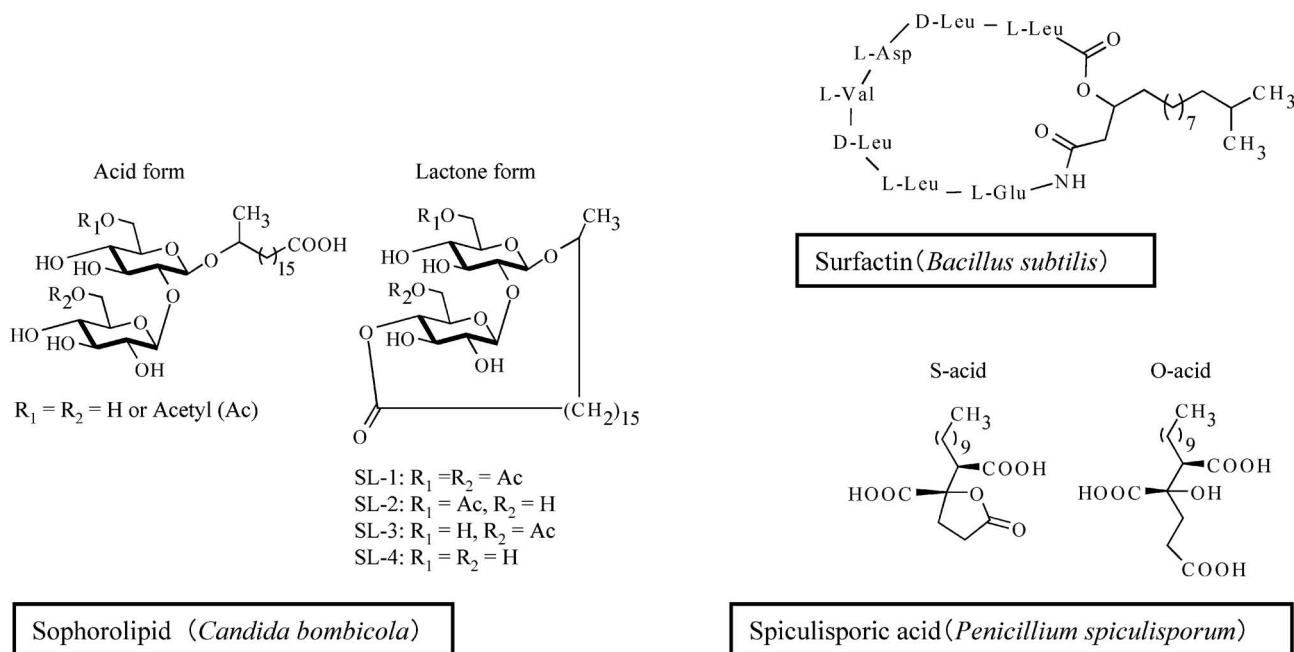


Fig. 1. Structures of Representative Biosurfactants and Their Producers

いに揃った構造」と「巧妙な組み合わせ」に起因している。BSの合成は、すべて酵素反応によって位置選択的、立体選択的に行われる。そのため、「分子の形・向き」が揃っており、界面で効率的な分子集合や配向が可能になるため、既存の界面活性剤に比べて「より低濃度で機能を発揮」できる。この特徴は、製品への処方を考える際、非常に大きなアドバンテージとなる。

4. バイオサーファクタントの実用化例

いくつかのBSは既に実用化され、工業的な利用が広がっている。これらは、国内企業によって達成されたものであり、BSの実用化技術では、わが国が大きく他国をリードしている。

4-1. ソホロリピッド ソホロリピッド(SL, Fig. 1)は、酵母菌が生産する代表的な糖型BSであり、植物油やグルコースなどから量産される。微生物が生産するSL自体はエマルジョンの安定化能を示さないが、その親水性誘導体やデシルアミド誘導体などは、乳化、湿潤、洗浄、可溶化など幅広い界面活性を示す。特に、そのプロピレンオキサイド付加体は、優れた皮膚の柔軟化作用や保湿作用があることが認められており、化粧品素材として実用化されている。⁷⁾

SLの洗浄特性(トリオレインの除去)は、ラクトン環の開環に伴って大きくなり、ラクトン環がすべて開環すると、ドデシル- β -D-マルトシド、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩、ドデシル硫酸ナトリウム塩(SDS)のような合成界面活性剤と同等になる。SLは優れた洗浄特性を持ちながら、起泡性が低く、かつ生分解性も高いため、この特性を生かして既に食器洗浄機用の洗剤としても実用化されている(サラヤ^株)。商品に配合されているSL量は1%程度であり、「低濃度でも高い効果」を発現している実例である。

SL(酸型)は、その構造を反映して、ユニークな自己組織化特性を示す。2つの親水部(糖部分と脂肪酸末端のカルボキシル基)を持つため、双頭型脂質に類似した自己組織化特性を示す。また、カルボキシル基を持つため、自己組織化によって形成されるナノ構造体は、pHに依存して変化する。酸性条件下(pH<5.5)では、幅が5-11 μ mで、長さが数百 μ mにも及ぶ巨大なリボンを容易に形成する。⁸⁾ pHの上昇に伴って、リボンの生成速度や生

成率は低下するが、リボンの「ねじれ度合い」や「リボン間の絡み合い」は上昇し、二重らせんも発生する。酸型のSLは、脂肪酸分子間の疎水性相互作用と糖分子間の強い水素結合によって安定化されたラメラ構造(interdigitate型で膜厚は2.78 nm)を形成し、ここからリボンが発生している。

4-2. サーファクチン サーファクチン(SF, Fig. 1)は、納豆菌が生産するアミノ酸型BSである。当初は、抗菌物質として発見されたが(1968年)、現在では、その強い乳化能と優れた皮膚特性を生かしスキンケア素材として実用化されている(昭和電工^株)。

SFは、ペプチド部分が β -シート状の高次構造を取るため、大きな棒状ミセルを形成し易く、優れた界面活性を示す。⁹⁾ 例えば、臨界ミセル濃度(cmc)は 2.4×10^{-5} Mで、表面張力は27 mN/m、水/*n*-ヘキサデカンの界面張力は1 mN/m程度である。SFのナトリウム塩の場合、cmcは 3×10^{-6} M(SDSに比べて1/1000, Triton X-100に比べても1/10以下)であり、少量でも高い乳化安定性や分散性を示し、起泡性や泡安定性も有する。さらに、皮膚刺激性が従来のアミノ酸系界面活性剤に比べ際立って低いことが特徴である。¹⁰⁾ SFを用いると各種オイルの透明ジェルを容易に調製できるため、化粧品の処方上有用であり、洗顔フォーム、クレンジング剤や各種乳液など、新しい化粧品素材として需要が拡大している。

5. マンノシルエリスリトールリピッドの微生物生産

BSの生産には、主として大豆油、菜種油などの植物油脂類が用いられる。また、生産菌によっては、その他の脂質系原料(脂肪酸、アルコール、エステル類)や、グルコース等の糖質でも生産可能である。生産菌としては、一般的な酵母菌や細菌(納豆菌)が知られている。種々のBSの中でも、特に糖型のBSは生産性が最も高く、原料面(糖質系バイオマスの利用が可能)、機能面(生体に対して特異な作用を示す)でも優位にあるため、最もよく研究が進んでいる。¹¹⁾

特定のBSを大量に得るためには、まず、その生産菌を効率的に取得する必要がある。通常は、特定の選択培地を用いて、自然界から幅広く探索(スクリーニング)を行う。われわれは新しいBSの取得

を目的として、大豆油を唯一として、土壌や花木から広範なスクリーニングを実施した。その結果、果皮等に存在する酵母菌 (*Pseudozyma antarctica*) が、既知の BS とは構造が異なる新しいタイプの糖型 BS を生産することが分かった。この BS は、マンノースとエリスリトールを親水性基に持ち、2 モルの中鎖脂肪酸を疎水基に持つことから、マンノシルエリスリトールリピッド (以下、MEL, Fig. 2) とした。^{5,6)} その後の研究で、MEL は、*P. antarctica* 以外にも、各種の *Pseudozyma* 属の酵母によって生産可能であることが分かった^{12,13)}。MEL には、マンノース上のアセチル基の数、有無によって数種類の同族体が存在する。興味あることに、生産菌に依存して、主要生産物のパターンが異なり、MEL-A や MEL-B あるいは MEL-C を、それぞれ優先的に生産可能な酵母菌が取得されている。¹⁴⁾ これら数種類の微生物を利用すれば、MEL 各同族体の選択的な量産が可能である。

さらに、培養条件の検討により、親水-疎水バランス (HLB) の大きく異なる、トリエステル型 MEL (エリスリトール側にも脂肪酸が導入されたもの)¹⁵⁾ や、モノエステル型の MEL (マンノースの C-3 のみに脂肪酸が導入されたもの)¹⁶⁾ の生産も可能となっている。このように各種 MEL の生産技術を確立することで、必要とされる物性・用途に応じた材料の供給が可能となる。

これらの酵母の場合、菌体の増殖時期と BS 生産時期が連動していないため、発酵法 (増殖のための栄養塩類を添加する培養) でも休止菌体法 (栄養塩類を添加しない培養) でも MEL の生産が可能であ

る。例えば、グルコースなどの糖類から調製した菌体 (休止菌体) を、非水溶性の炭素源と混合・かく拌するだけで、MEL は容易に菌体外に生産される (Fig. 3)。

例えば、実験室規模の条件下では、休止菌体法の場合、大豆油をリアクター内に流し続けることで、MEL 生産は安定に継続し、最終的な蓄積量は培養液 1 リッター当たり 100 g 以上に達する。¹⁷⁾

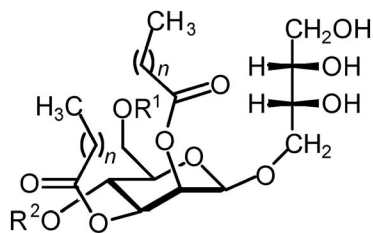
6. マンノシルエリスリトールリピッドの界面化学的特性

MEL は、疎水基 (脂肪酸) の鎖長が短い (C_8 - C_{12}) にも係わらず、非常に小さな臨界ミセル濃度 ($cmc = 2.7 \times 10^{-6} M$) で、大きな界面活性作用を示す。例えば、 cmc での表面張力は、27 mN/m であり、水/*n*-ヘキサデカンの界面張力は 2 mN/m 以下まで低下する。⁶⁾ また、MEL は、大豆油や炭化水素類に対する乳化能でみると、代表的な糖型の合成界面活性剤であるショ糖脂肪酸エステルやポリオキシエチレン-ソルビタン脂肪酸エステに比べ、数倍以上の活性を示す。¹⁷⁾

MEL は、水溶液中で非常にユニークな自己組織化特性・構造を示す。MEL-A (1 mM) の薄膜を水和させると、直径 1-20 μm の油滴状の構造体を形成する。透過電子顕微鏡観察や小角 X 線散乱法によって、その構造体がスポンジ相 (L_3 相、二分子膜がランダムに連結してできる三次元ネットワーク) であることが確認されている (Fig. 4)。¹⁸⁾ 一方、MEL-A からアセチル基が 1 つはずれた構造を持つ MEL-B は、スポンジ相ではなく、直径 10-20 μm の巨大リポソーム (ラメラ相、 L_α 相) を形成する。^{19,20)} すなわち、マンノース上の 1 つの水酸基の有無が、自己組織化の方向を決め、スポンジ相 (ランダム構造) からラメラ相 (秩序化構造) への劇的な構造変化を誘発することが分かる。

通常の界面活性剤や両親媒性脂質は、水溶液中で自己集合して容易にミセルを形成するが、二分子膜構造を持つ巨大リポソームを形成することができるのは、ごく限られた物質だけである。リン脂質 (レシチン) がリポソームを形成することはよく知られているが、糖脂質の場合、単独系でベシクルを形成することは稀である。

MEL の液晶形成能を、水侵入法によって評価した例を Fig. 5 に示す。¹⁷⁾ わずかな分子構造の違い



MEL-A: $R^1 = R^2 = Ac$
 MEL-B: $R^1 = Ac, R^2 = H$
 MEL-C: $R^1 = H, R^2 = Ac$
 ($n = 6$ to 10)

Fig. 2. Structure of Mannosylerythritol Lipid (MEL)

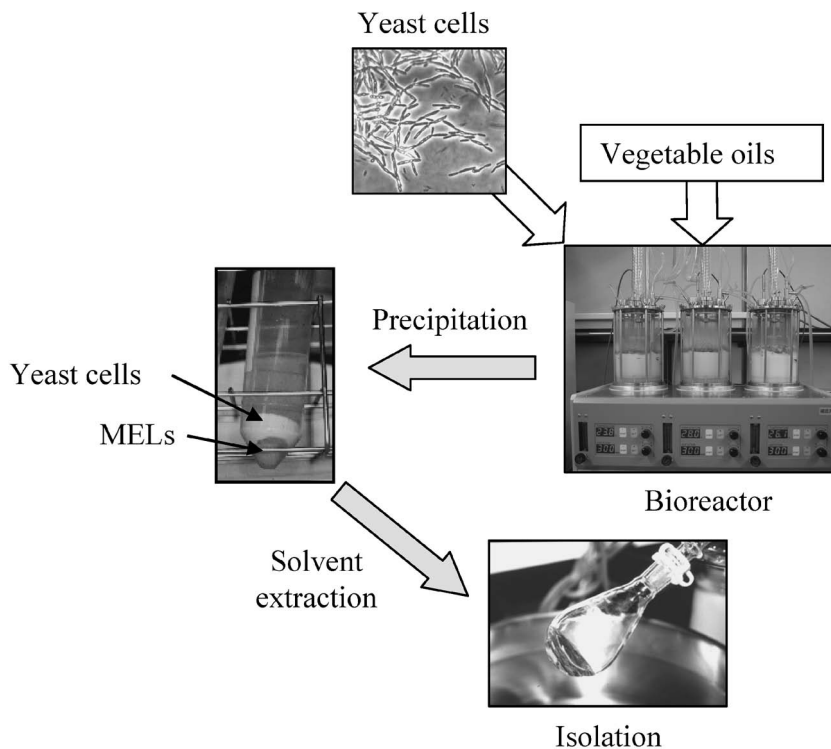


Fig. 3. Production Scheme of Mannosylerythritol Lipids Using Yeast Cells

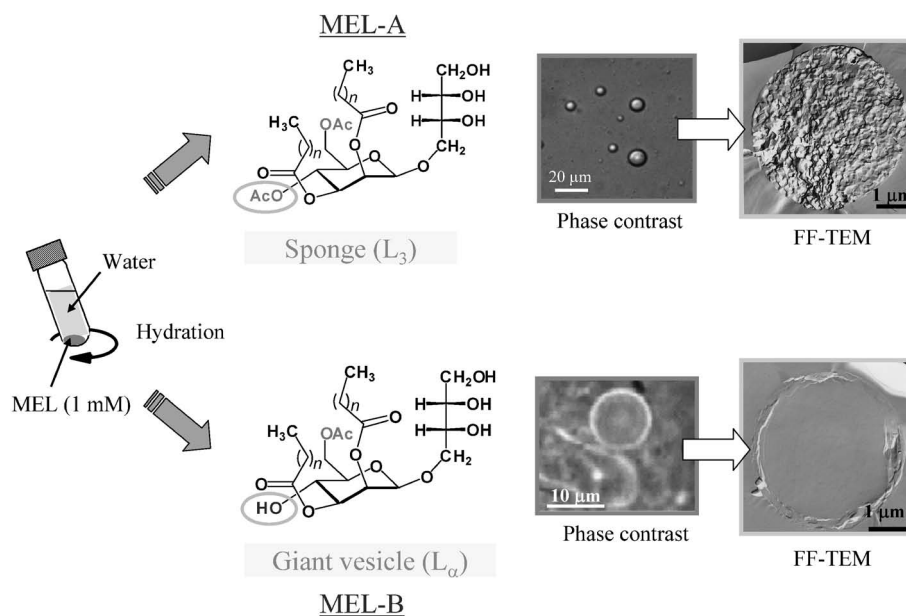


Fig. 4. Self-assembling Manner of MEL-A and MEL-B

が、液晶のパターンに大きく影響していることが分かる。また、Fig. 6には、MEL-Aの水溶液系での相図（リオトリピック液晶の形成）を示した。これよりMELは、各種の液晶（スポンジ相、両連続キュービック相、ラメラ相など）を、幅広い濃度域、かつ温度域で形成可能であり、既存の界面活性剤・

脂質とは大きく異なる特性を有することが明らかである。²¹⁾

7. マンノシルエリスリトールリピッドの生化学的特性

MELは優れた抗菌活性を有し、枯草菌や黄色ブドウ球菌などのグラム陽性細菌の生育を低濃度で阻

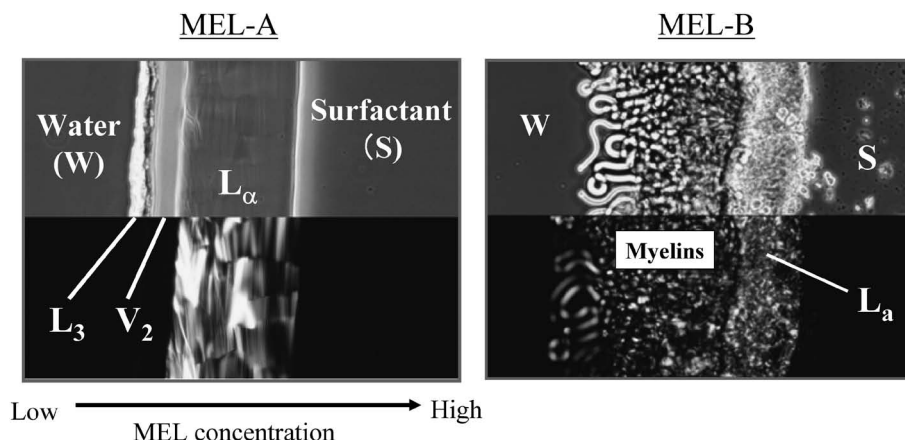


Fig. 5. Formation of Lyotropic Liquid Crystals: Water Penetration Scans of MEL-A and MEL-B

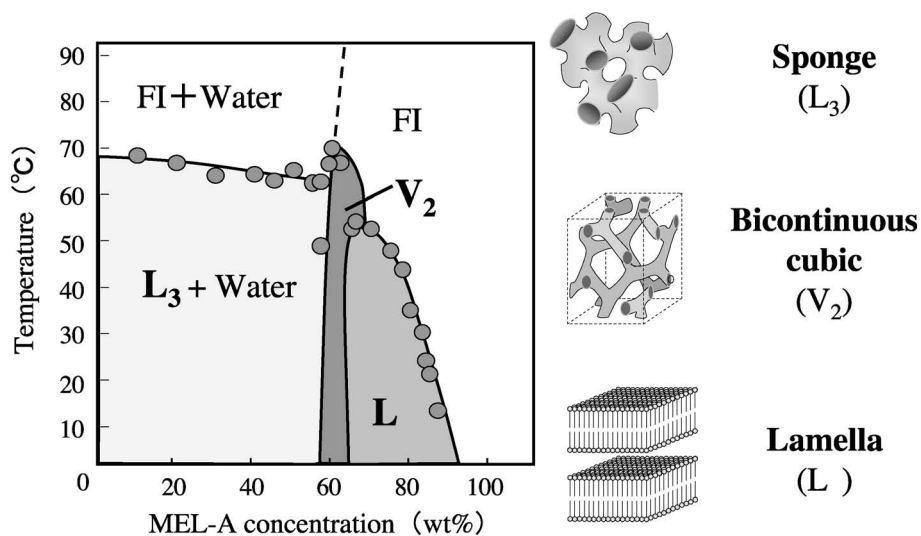


Fig. 6. Temperature Dependence of the Binary Phase Diagram of the MEL-A/water System
 L_3 : sponge phase, V_2 : bicontinuous cubic phase, L_a : lamellar phase, FI: fluid isotropic phase.

害できる。⁶⁾ その作用濃度は、上述の糖型の合成界面活性剤に比べると、1/100-1/300である。糖型BSには、これらの抗微生物活性に加え、腫瘍細胞に対する増殖抑制や分化誘導といったユニークな生理活性を発現するものが多い。

MELは、ヒト急性前骨髄性白血病細胞 (HL60株) を始めとする各種の白血病細胞に対して5-10 μM で、増殖抑制や分化誘導を示す。²²⁾ 一方、ソホロリピッド (SL) や、サクシノイルトレハロースリピッド²³⁾ (SLT-1, STL-3)、ポリオールリピッド (PL)²⁴⁾ にも同様の分化誘導活性が見られ、糖部分の構造の違いによって分化誘導の方向が顕著に異なる (Fig. 7)。例えば、MELはいずれの細胞に対しても顆粒球系への分化を誘導するが、STL-1は単球

系への分化を誘導している。いずれのBSも、HL60細胞のプロテインキナーゼC (PKC) に対して阻害活性を示すことから、これらの活性にはリン酸カスケード系が介在している可能性がある。

さらに、MELはラット褐色細胞腫由来細胞 (PC12) に対して神経突起の伸展促進、分化誘導を示す。²⁵⁾ この際、MELは、NGF (神経成長因子) による突起伸展作用をさらに増強する効果もある。また、MELは悪性腫瘍であるマウスメラノーマ細胞 (B16) に対しても、増殖抑制、分化誘導、アポトーシスを示す。²⁶⁾

このような生理活性は、ショ糖脂肪酸エステルやソルビタン脂肪酸エステルなどの糖型合成界面活性剤には全くみられない。さらに、興味深いことに、

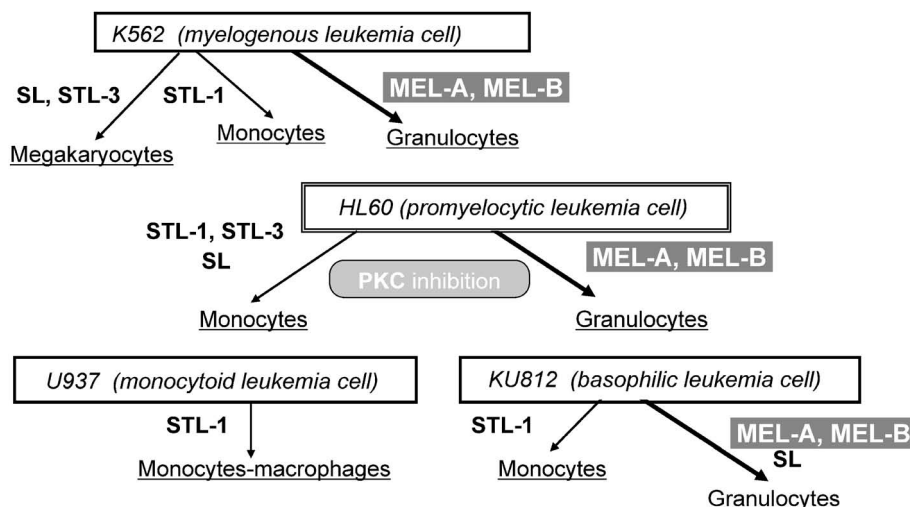


Fig. 7. Differentiation-inducing Activities of Glycolipid Biosurfactants against Human Leukemia Cells
 PKC: protein kinase C, SL: sphingolipids, STL: succinoyl-trehalose lipids.

こうした MEL の生化学的特性は、動物の細胞表層糖脂質であるガングリオシド類 (GM1 や GM3 など) の活性に類似している。ガングリオシド類は、微量成分であり、分離精製や合成も煩雑であるため、機能性材料としての実用は困難である。しかし、MEL は同様の機能を有しながらも量産可能なため、ライフサイエンス・医療分野における有望なツールとしても期待できる。

8. マンノシルエリスリトールリピッドの遺伝子導入への応用

上述のように、MEL は優れたラメラ・ベシクル形成能を示すが、このような特性があれば、リン脂質や他の素材と組み合わせると高機能性リポソームの開発や、化粧品や薬剤成分の送達システムへの応用も可能となる。実際、MEL を各種リン脂質と混合することによって、熱力学的に安定なリポソームを容易に作り出すことが可能である。²⁷⁾

特に、DDS や遺伝子導入において、リポソームベクターの開発は多方面からなされているが、現状では、ウイルスベクターに比べ操作性や安全性は高いものの、導入効率が相当に低いことが課題となっている。われわれは、愛知学院大学の中西 守教授のグループと共同で、MEL を活用した新しいタイプのリポソームの開発を行った (リン脂質を基材として、陽イオン性コレステロール誘導体と MEL を組み込んだもの)。このリポソームの場合、ヒト子宮頸部ガン細胞など代表的な哺乳類の培養細胞 (HeLa, COS7, NIH3T3 など) に対して遺伝子導入

を行ったところ、極めて高い導入効率が得られた。従来の市販のリポソーム (リポフェクチンなど) に比べると、その導入効率は 50–70 倍であり、導入時間も短いことが特徴である。²⁸⁾

詳細な導入機構は検討中であるが、この MEL 含有リポソームの特性としては、1) DNA に対する結合性が高い、2) 複合体のサイズがコンパクトである、3) 細胞への付着や取り込みが起こり易い、ことが挙げられる (Fig. 8)。特に、エタノール注入法によって MEL 含有リポソームを作製すると、そのサイズが非常に小さく (40 nm)、DNA との複合体になっても一定サイズ (200 nm 以下) を保持していることが分かった。共焦点レーザー走査顕微鏡での観察結果によれば、MEL 含有リポソームは短時間で細胞質内に広く拡散し、特に核膜周辺に集積する特性がある。²⁹⁾ また、一般的にリポソームの細胞への取り込みはエンドサイトーシスによって起こるが、MEL 含有リポソームの場合は、エンドサイトーシスに加え、「細胞膜とのリポソームとの膜融合」によっても、細胞内に迅速に取り込まれていた。^{30,31)}

9. マンノシルエリスリトールリピッドの抗体分子認識への応用

動物細胞表層の糖脂質であるガングリオシド類は、細胞膜上で分子認識や情報伝達に係わり、各種の糖タンパク質と特異的に結合することが知られている。上述のように、MEL は腫瘍細胞に対してユニークな生理活性を発現することから、生体物質と

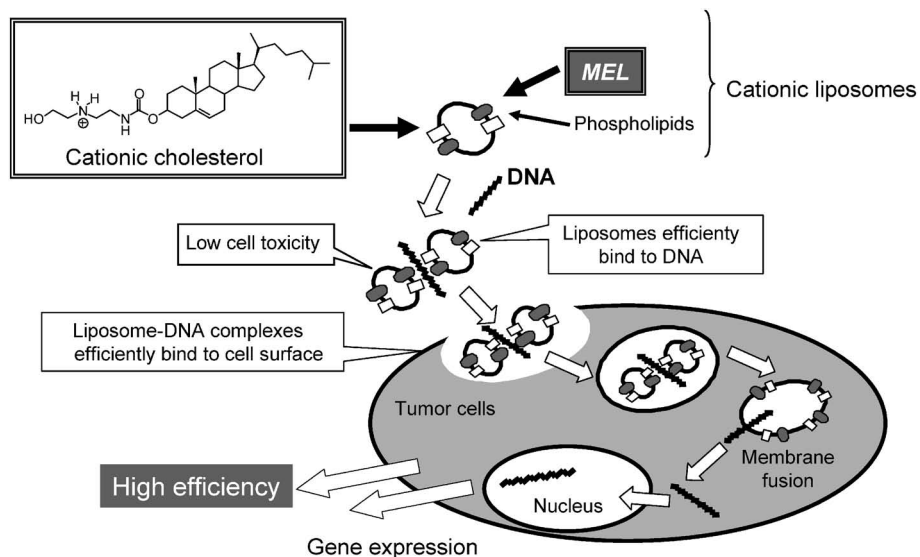


Fig. 8. Scheme of Gene Delivery into Mammalian Cells Using Cationic Liposomes Containing Mannosylethritol Lipids

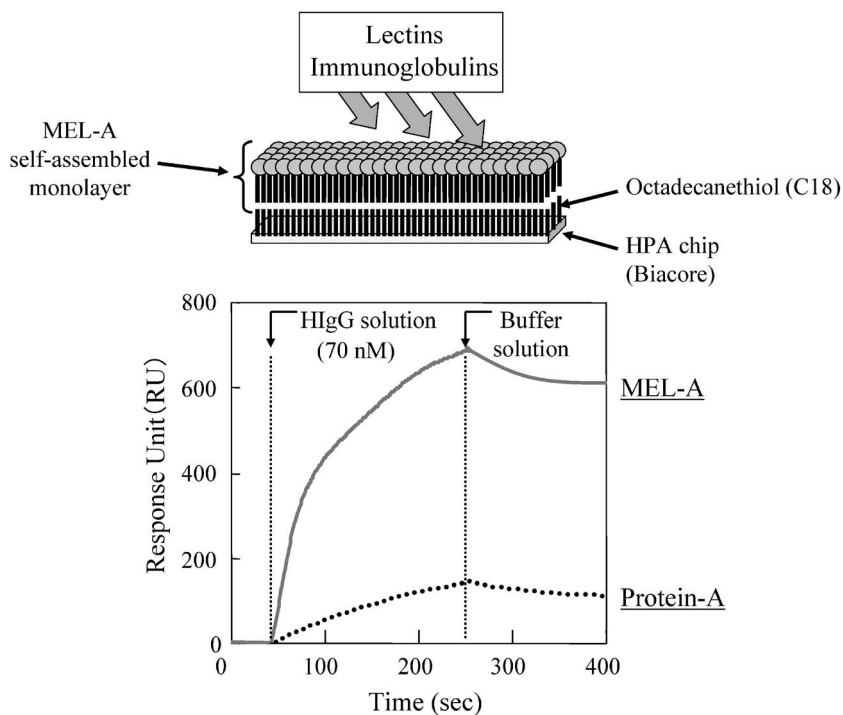


Fig. 9. Binding of Glycoproteins toward the Self-assembled Monolayer of MEL-A on the Surface Plasmon Resonance Study
 HgG: human immunoglobulin G.

の特異的な相互作用が期待された。そこで、表面プラズモン共鳴装置 (SPR, Biacore 製) を利用して、MEL (自己組織化によって得られる単分子膜) と各種の生体物質との結合特性を調べてみた [Fig. 9 (上方図)]. その結果、ガングリオシド類と同様、MEL-A は、抗体やレクチン等の糖タンパク質に対して強い結合親和性を示すことが分かった。

例えば、MEL-A は、マンノースに特異的である concanavalin A (ConA) や、シアル酸に特異的である *Maackia amurensis* lectin-I (MAL-I) に対して強い結合性を示し、その結合定数は、 10^6 (M^{-1}) オーダーであることが分かった。³²⁾ MEL-A と ConA の結合は、結合阻害剤である α -メチルマンノシドによっても全く影響を受けないことから、ConA

における MEL 結合サイトは、既知の糖結合サイトとは違う可能性がある。

一方、抗体に対する結合では、ヒト免疫グロブリン (HIgG) に対して、 10^6 (M^{-1}) オーダーの結合活性がみられた (酵素や血清タンパク質など他種のタンパク質に対しては、全く結合性がなかった)。IgG の最も一般的なアフィニティリガンドである protein-A に比べると、MEL-A は十数倍以上の大きな結合定数を示した。³³⁾ Figure 9 (下方図) に、MEL-A 単分子膜をリガンドした場合と、protein-A をリガンドとした場合の比較を示した。

IgG の各種フラグメントを用いた結合実験、及びその速度論的解析から、IgG の MEL に対する結合部位は Fab サイト (すなわち二価モードでの結合) であり、既存のリガントとは結合様式が違うことも判明した³⁴⁾ (例えば、protein-A は IgG の Fc サイトに結合する)。また、これらの糖タンパク質に対する結合活性は、MEL-A 特異的であり、アセチル基が 1 つ少ない MEL-B や MEL-C では、ほとんど観察されなかった。したがって、マンノース上の 2 つのアセチル基が糖タンパク質との結合に大きく寄与していることが推定された。

上述のように、MEL-A は Fab サイトを介して抗体と結合できるため、Protein-A が適用できない多価抗体や低分子化抗体に対しても有用と考えられた。そこで、MEL-A とリン脂質 (dipalmitoyl-pho-

sphatidylcholine, DPPC) から Langmuir-Blodgett 法によりハイブリッド二分子膜を作製し、MEL-A 単分子膜表面への各種抗体の結合性を評価した。ここでは、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、水溶液中で直接、膜表面と抗体との結合を観察した (Fig. 10)。Figure 10 から分かるように、IgG、IgA、IgM、いずれの場合でも、MEL-A 単分子膜上に、高密度で抗体が結合していることが分かる。さらに、高さ方向の解析から、IgA や IgM では、抗体分子が IgG とは違う形態、すなわち “staple form” で結合していることも推定された。³⁴⁾

上記のアプローチとは別に、MEL を抗体のアフィニティ分離担体へ利用することを考え、高分子ビーズ上に MEL を吸着担持させ、MEL-高分子複合体を作製した (高分子には、生体適合性を有するポリメタクリル酸ヒドロキシエチル、poly-HEMA を利用した)。poly-HEMA 自体は、IgG と血清アルブミンに対して結合選択性を示さない。しかし、MEL をビーズ上に担持させると IgG に対する結合選択性が発現し、その担持量の増加に伴い選択性も上昇した。この複合体と IgG の結合定数 ($1.4 \times 10^6 M^{-1}$) は、SPR での解析結果同様、protein-A-アガロース複合体に比べ数倍以上であった。^{35,36)} protein-A は IgG に対して高い結合選択性を示す一方、多価抗体に提供できない、コストが高い、担体からのリークがある等の課題がある。MEL-高分子

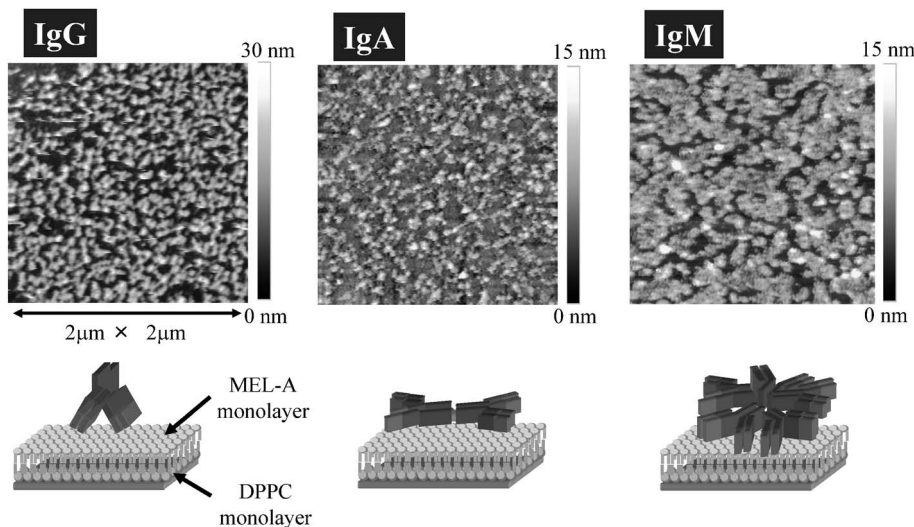


Fig. 10. Tapping Mode of Atomic Force Microscopy (AFM) Images of HIgG, HIgA, HIgM Bound to MEL-A Self-assembled Monolayers

DPPC: dipalmitoyl-phosphatidylcholine.

複合体の結合選択性や安定性等をさらに上昇できれば、各種抗体に対する新しいアフィニティー分離担体となり得るかもしれない。

10. マンノシルエリスリトールリピッドのスキンケア化粧品への応用

近年、皮膚の構造や、老化・肌荒れ等のメカニズムの科学的な解明に伴い、新しい素材や処置方法が紹介され、スキンケア化粧品や皮膚外用剤の市場は拡大している。主要なスキンケア成分には、アンチエイジング機能（抗老化）に関与するものと、モイスチャー機能（保湿）に関与するものがある。アンチエイジング成分のいくつかでは、構造が特異であるため、微生物による量産システムが活用されている。例えば、コエンザイム Q10 では酵母の生産システムが、アスタキサンチンでは藻類の生産システムが実用されている。

一方、モイスチャー成分には、ヒアルロン酸などの「水分蒸散抑制」タイプの素材や、アミノ酸やセラミドなどの「生体保湿成分補充」タイプの素材が用いられている。特に、天然セラミドは優れた保湿効果を示すスペシャルケア用の代表的素材である。しかし、植物等を原料としているため分離精製が煩雑であり、高純度品では、キログラム当り数十万から数百万円に達するものもあり、非常に高価となっている。また、化学的な手法で天然あるいは疑似セラミドが合成されているが、複雑な反応が要求されるため、大きなコスト低下にはつなげない。

このような背景の基、われわれは東洋紡績(株)（以下、東洋紡）と共同で BS の用途開拓を進め、スキンケア素材に実用可能であることを見出した。今回開発した素材は、MEL をベースとするものであり、天然セラミドと同様の優れた保湿効果を示し、化粧品や皮膚外用剤等へ利用可能である。

保湿効果（肌荒れ改善効果）の評価には、ヒト三次元皮膚モデル（テストスキン：上層の表皮角化細胞＋下層の繊維芽細胞の二層系）を用いた。まず、皮膚培養細胞に対して SDS などの合成界面活性で「肌荒れ状態」を誘引する。その後、上層に被検物質（各 1% 濃度）を添加し、細胞の生存率を測定し、肌荒れからの細胞の回復率を評価する。その結果、オリーブ油等の油脂類では、ほとんど肌荒れからの回復はみられなかったが、天然セラミド（動物由来）では、9 割以上の優れた回復率がみられた。一方、

MEL（オリーブ油を原料として得られたもの）では、セラミドと同程度の細胞生存がみられ、優れた肌荒れ改善効果があることが分かった。

これまでの検討から、MEL の保湿作用のメカニズムとしては、1) 立体的な構造がセラミドに類似しているため、角質層の細胞間に取り込まれ易い、2) 液晶構造を形成し易いため、細胞間で皮膚の水分保持に効果的に寄与できる、等を予想している。

特に MEL の場合、上述のようにリポソームをはじめとする各種液晶を、幅広い濃度域で容易に形成できるため、化粧品成分と混合することで、これらの成分の安定化（カプセルによる保護効果）や、皮膚浸透性の向上（カプセルの示す皮膚親和効果）も期待できる。一方、製造面では、酵母の発酵プロセスを利用することで、高い純度で BS が得られるため（菌体外に生産されるのは BS のみ）、植物からの天然セラミドを抽出する方法や、化学的に天然あるいは疑似セラミドを合成する従来の手法に比べ、コストを相当程度抑えることができる。

スキンケア製品へ利用できる機能性バイオ素材は大きな関心を集めており、われわれは微生物バイオ技術の活用により、新たな構造や特性を持つ BS の探索・開発（ラインナップの拡充）を続けている。なお、当該素材については、東洋紡から業界各メーカー向けにサンプル供給が開始されている（問い合わせ先：東洋紡バイオ開発部）。

11. おわりに

BS は、有機合成に依存することなく、各種のバイオマス資源から量産可能である。BS の幅広い分野での実用化にとって、微生物生産のコストは常に重要な技術課題ではあるが、最近のバイオテクノロジーの飛躍の革新や、周辺技術の進歩により、早期のブレイクスルーが十分に可能となりつつある。既に、SL が家庭用洗剤のレベルで実用化されていることがよい例である。

ここで紹介した BS のユニークな物性や機能は、基本的にその「立体的にきれいに揃った構造」や「巧妙な自己集合能」に基づくものである。このような観点で考えれば、BS は高機能な「界面活性剤」や「化粧品素材」だけでなく、新しいタイプの「機能素子＝ナノバイオ素子」としても高いポテンシャルを有している。したがって、本開発により BS の市場参入、及び品目の多様化とコストダウンが進行

すれば、各種の先端技術分野での一層の活躍が見込めるであろう。

謝辞 本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 「産業技術研究助成事業」の支援を受け推進されたものであり、ご協力頂きました関係者の皆様に感謝致します。また、本編をまとめるに当たり、データの提供並びに有用な議論を頂きました、共同研究者である、レイパスツール大学・中谷陽一教授、愛知学院大学薬学部・中西 守教授、東洋紡総合研究所・北川 優博士及び曾我部 敦氏に、深謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kitamoto D., Toma K., Hato M., "Glycolipid-based Bionanomaterials Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanotechnology," Vol. 1, American Scientific Publishers, 2005, pp. 239-271.
- 2) Gliozzi A., Relini A., Chong P. L.-G., *J. Membr. Sci.*, **206**, 131-147 (2002).
- 3) Vothknecht U. C., Westhoff P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1541**, 91-101 (2001).
- 4) Desai J. D., Banat I. M., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 47-64 (1997).
- 5) Kitamoto D., *Oleosience*, **3**, 663-672 (2003).
- 6) Kitamoto D., Isoda H., Nakahara T., *J. Bioeng. Biosci.*, **94**, 187-201 (2002).
- 7) Kimura Y., *Fragrance J.*, **20**, 22 (1992).
- 8) Zhou S., Xu C., Wang J., Gao W., Akhverdiev R., Shah V., Gross R., *Langmuir*, **20**, 7926 (2004).
- 9) Cameotra S. S., Makker R. S., *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 262-266 (2004).
- 10) Yoneda T., Fujita I., Tsuzuki T., *Fragrance J.*, **2001-12**, 93 (2001).
- 11) Kitamoto D., *Fragrance J.*, **2002-5**, 29-38 (2002).
- 12) Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D., *Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 305-313 (2006).
- 13) Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D., *FEMS Yeast Res.*, **7**, 286-292 (2007).
- 14) Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 521-531 (2007).
- 15) Fukuoka T., Konishi M., Morita T., Imura T., Kitamoto D., *Biotechnol. Lett.*, **29**, 1111-1118 (2007).
- 16) Fukuoka T., Konishi M., Morita T., Imura T., Kitamoto D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2007) (in press)
- 17) Kitamoto D., Ikegami T., Suzuki T., Sasaki A., Takeyama Y., Idemoto Y., Koura Y., Yanagishita H., *Biotechnol. Lett.*, **23**, 1709 (2001).
- 18) Imura T., Ohta N., Inoue K., Yagi N., Negishi H., Yanagishita H., Kitamoto D., *Chem. E. J.*, **12**, 2434-2440 (2006).
- 19) Imura T., Yanagishita H., Kitamoto D., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10804-10805 (2004).
- 20) Kitamoto D., Sangita G., Ourisson G., Nakatani Y., *Chem. Commun.*, 860-861 (2000).
- 21) Imura T., Hikosaka Y., Worakitkanchanakul W., Sakai H., Abe M., Konishi M., Minamikawa H., Kitamoto D., *Langmuir*, **23**, 1659-1663 (2007).
- 22) Isoda H., Shinomoto H., Kitamoto D., Matsumura M., Nakahara T., *Lipids*, **32**, 263-271 (1997).
- 23) Uchida Y., Misawa S., Nakahara T., Tabuchi T., *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 765-769 (1989).
- 24) Kurosawa K., Sakai K., Nakahara T., Ohshima Y., Tabuchi T., *Biosci. Biochem. Biophys.*, **58**, 2057-2060 (1993).
- 25) Wakamatsu Y., Zhao X., Jin C., Day N., Shibahara M., Nomura N., Nakahara T., Murata T., Yokoyama K., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 374-383 (2001).
- 26) Zhao X., Wakamatsu Y., Shibahara M., Nomura N., Geltinger C., Nakahara T., Murata T., Yokoyama K., *Cancer Res.*, **59**, 482-486 (1999).
- 27) Imura T., Yanagishita H., Ohira J., Sakai H., Abe M., Kitamoto D., *Colloid Surf. B, Biointerfaces*, **43**, 115-121 (2005).
- 28) Inoh K., Kitamoto D., Hirashima N., Nakanishi M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 57-61 (2001).
- 29) Igarashi S., Hattori Y., Maitani Y., *J. Control. Release*, **112**, 362-368 (2006).
- 30) Inoh K., Kitamoto D., Hirashima N., Nakanishi M., *J. Control. Release*, **94**, 423-431 (2004).
- 31) Ueno Y., Hirashima N., Inoh K., Furuno T.,

- Nakanishi M., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 169–172 (2007).
- 32) Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D., *Biotechnol. Lett.*, **29**, 473–480 (2007).
- 33) Imura T., Ito S., Azumi R., Yanagishita H., Sakai H., Abe M., Kitamoto D., *Biotechnol. Lett.*, **29**, 473–480 (2007).
- 34) Ito S., Imura T., Fukuoka T., Morita T., Sakai H., Abe M., Kitamoto D., *Colloid Surf. B, Biointerfaces*, **58**, 165–171 (2007).
- 35) Im J.-H., Nakane T., Yanagishita H., Ikegami T., Kitamoto D., *BMC Biotechnol.*, **1**: 5, 1–7 (2001).
- 36) Im J.-H., Ikegami T., Yanagishita H., Takeyama Y., Idemoto Y., Koura N., Kitamoto D., *J. Biomed. Mater. Res.*, **65**, 379–385 (2002).