

海洋中のカロテノイド産生微生物の探索並びにその生産性の向上に関する研究

坂上 吉一,^{*,a} 住谷 保治,^{a,b} 米虫 節夫^{a,c}**Research on Search of the Carotenoid-producing Microorganisms
in Marine Area and the Improvement of Production Ratio**Yoshikazu SAKAGAMI,^{*,a} Yasuji SUMIYA,^{a,b} and Sadawo KOMEMUSHI^{a,c}

^aFaculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan, ^bKanae Technos Co., Ltd., 93-27 *tei*, kunita-cho, Kanonji, Kagawa 768-0040, Japan, and ^cGraduate School of Engineering, Osaka City University, 3-3-138 Sugimoto Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585, Japan

(Received July 17, 2010)

Carotenoids are liposoluble pigments widely distributed in nature. More than 750 carotenoids are isolated from natural sources, but only a few kinds are used industrially. The production of carotenoid by microorganisms is to be expected, but few carotenoids originate from living things on land. And there is little knowledge about carotenoid-producing microorganisms in the oceans. The possibility still exists of discovering new carotenoid-producing microorganisms. Sunlight is very strong in subtropical regions. The surface of the sea and coral reefs in these regions is a severe environment for growth of microorganisms. While such conditions produce reactive oxygen species, the continuing strong irradiation can also lead to damaging and lethal photo-oxidative reactions. Many undiscovered microorganisms may possess protective mechanisms such as anti-oxidative activities for survival in this environment. This study focused on marine microorganisms inhabiting coral reefs in the Okinawa area, especially carotenoid-producing bacteria possessing anti-oxidative activities. Many carotenoid-producing microorganisms were collected from subtropical ocean areas (a total of 334 strains of pigmented microorganisms), and the chemical composition, some culture conditions and genetic characteristics of the carotenoids from these microorganisms were examined. Furthermore, similar research was performed using some creatures from the ocean surrounding Kochi Prefecture.

Key words—carotenoid-producing microorganism; Okinawa area; creature of ocean

はじめに

海洋は地球全体の面積の約70%を占めており、そこには多種多様な生物が生息している。人類が利用した海洋天然物の古い例に、貝（プルプラ）の分泌液で布を染めて空気に晒した地中海文明の染料、古代紫（赤みがかかった紫）¹⁾がある。その主成分色素は藍（インジゴ）の主成分に臭素がついた6,6'-ジプロモインジゴチンである。また、人類が天然の繊維を草木や貝殻から得た天然色素で染色し利用したのは非常に古い時代で、エジプトのミイラの着衣が既にインジゴで染められていた。したがっ

て、当時の色素は高価であり、色はまた地位の象徴でもあった。また、色には宗教的な意味があり、赤く染めた革や、黄色に染めた布などが神に捧げられた。ある種の色素には薬理作用があり、色は人間の情緒的並びに心理的効果に対しても活用されてきた。

カロテノイド（Carotenoids）は、カロチンなどの一般名称で知られ、ウイルスを除くすべての動植物、原生生物に含まれる自然界に最も多く分布する脂溶性の天然色素である。一部を除いて、黄色～赤色の色調を呈し、その名称は、ニンジン（英名：Carrot, 学名：*Daucus carota*）の学名に由来する。

近年の研究で、多くの優れた予防医学的な知見を示すことが知られている自然界に広く分布する色素である。既知カロテノイドの生理活性の多くは、プロビタミンA様作用と抗過酸化活性によるものと推測される。優れた生理活性を示す新規カロテノイドの探索のためのスクリーニングは重要なことであ

^a近畿大学農学部（〒631-8505 奈良市中町 3327-204）

^b株式会社カナエテクノス（〒768-0040 香川県観音寺市杵田町丁 93 番地 27）、^c大阪市立大学大学院工学研究科（〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138）

*e-mail: sakagami@nara.kindai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS55で発表したものを中心に記述したものである。

る。

カロテノイドの研究は多く認められる。しかし、海洋微生物からの有用なカロテノイドを回収する研究はほとんど認められない。²⁾

われわれはこの点に着目し、海洋に存在するカロテノイド生産微生物について検討した。また、海洋生物からのカロテノイドの生産についても併せて検討した。

1. カロテノイド産生微生物及び海洋生物の検索

新規カロテノイドのスクリーニングを実施する場所として、沖縄県慶良間諸島及び黒潮が流れる高知県南部に位置する柏島並びに鮪黒潮生物研究所付近の海域を選定し、カロテノイド産生微生物及び海洋生物の探索を実施した。

沖縄のような亜熱帯では、常に強い太陽光が降り注いでおり、容易に環境中で活性酸素種が発生し易いと考えられている。したがって、これらの環境に生きる生物は、酸化的なダメージを受け易いと言える。これらの環境に生息する微生物は酸化的なストレスに対抗する物質を生産する可能性が推定される。

黒潮はフィリピン大陸にぶつかる場所から始まり、沖縄を經由し、高知県の南を通る。沖縄以外の探索場所として高知県南部に位置する鮪黒潮生物研究所及び柏島沿岸部を選定し、海洋生物のサンプリングポイントとした。

これらの地域で得られた種々のカロテノイド産生微生物及び海洋生物が有するカロテノイド類、産生カロテノイド類の組成及びカロテノイドの生産性に及ぼす種々の物理的要因並びにカロテノイド産生微生物の遺伝学的検討等を実施した。

2. カロテノイド産生微生物及び海洋生物の採取方法

サンゴ礁域の海水からスピッツ管若しくは微生物のトラップ用としてケミカルスポンジを用いて、海水を採取した。ケミカルスポンジは、水深約3-25 mで、3 mおきに5つ設置し、原則として3日後に回収し、カロテノイド産生微生物を採取した。^{2,3)}

また、カロテノイド産生海洋生物は直接素潜りにて採取した。なお、採取した海洋生物は、サンゴ(エンタクミドリイシ)の卵、ヒメシロレイシガイダマシ及びオニヒトデである。

3. カロテノイド産生微生物の単離方法^{2,3)}

得られた試料からの微生物の分離・単離は、以下

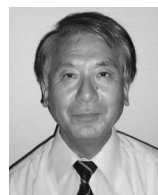
の方法に従い実施した。クリーンベンチ内で海水を含んだスポンジを一辺約1 cmの長方形に切り取って、試料とした。試料調製は2段階から4段階まで滅菌人工海水(MARINE ART SF-1 36.0 gを蒸留水1 lに溶解し、滅菌調製)を使用し、10倍段階希釈し、希釈液を作製した。各希釈液をそれぞれ1 mlずつとり、可溶適温寒天培地(約15 ml)に加え固まらないうちにシャーレに流し込んだ。細菌類は約3日間、真菌類は約1週間、28°Cで培養した後、寒天培地上に形成されたコロニーを観察し、有色コロニーや形状の異なるものを、スラントに白金耳を用いて移植した。なお、今回得られた種々のカロテノイド産生微生物のうち、光合成細菌であり Zeaxanthin 産生株である *Erythrobacter* sp. (以下、TMN11株と略する) 及び Astaxanthin 産生株である *Paracoccus* sp. (以下、FM6株と略する) に焦点を絞って述べることとする。

4. カロテノイドの抽出法^{2,3)}

分離菌株を人工海水培地で前培養した後、同液体培地を入れた振とう培養用フラスコで、25°C、5日間培養後、遠心分離(6000 rpm, 10 min)で菌体を得た。菌体にアセトン:メタノール(1:1)混合溶液を加え、ガラスビーズ(直径1 mm, 0.5 mm)を少量入れ細胞破砕機により攪拌物理破砕方法により、色素を抽出した。遠心分離(6000 rpm, 10 min)後、上清の色調を観察し、可視的に着色しているものをカロテノイド産生菌として選択し、抽出液の色がなくなるまで抽出操作を繰り返した。集めた上清を減圧乾固し、油状残留物をヘキサンに転溶し、カロテノイドを回収した。

5. カロテノイドの定量

得られたカロテノイドサンプルを有機溶媒に溶解し、吸光度を測定後、McBethの式⁴⁾に従いカロテノイドを定量した。



坂上吉一

近畿大学農学部環境管理学科教授。1950年大阪市生まれ。1974年岐阜薬科大学卒業。大阪府立公衆衛生研究所勤務。岐阜薬科大学大学院研究生。2005年近畿大学農学部教授。日本防菌防黴学会参与。Biocontrol Science 編集責任者。奈良県香芝市学校薬剤師会顧問。専門分野：環境微生物学、環境科学、公衆衛生学。

$$\frac{\text{Carotenoid contents (mg)}}{100 \text{ g tissue}} = \frac{O. D. \times \text{Vol.} \times 10^3}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{weight}}$$

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$: absorption coefficient

O. D.: optical density

Vol.: total volume of solution

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ には以下の数字を用いた. β -carotene (2337: ベンゼン, 2592: ケロシン), γ -carotene (3100: ケロシン), toluene (3240: ケロシン), neurosporaxanthin (2210: ベンゼン, 1715: ケロシン), astaxanthin (2180: benzene).

また, カロテノイド抽出液 (ベンゼン) 中のカロテノイドは, UV-VIS スペクトル λ_{max} における optical density を求め, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2200$ に設定して定量した.

6. カロテノイドの生産性に与える諸影響-UV-A 及び UV-C 照射条件下での TMN11 株及び FM6 株のカロテノイド含有量並びにカロテノイド含有比率²⁾

TMN11 株, FM6 株各々を, 細菌用培地 I (ペプトン 5 g, 酵母エキス 1 g, グルコース 2 g, MARINE ART SF-1 36 g に精製水を加え, 1 l とし, 121°C, 20 分間高圧蒸気滅菌し, 製する) を用い, 前培養 (100 rpm, 25°C, 2 d) し, この培養液を O.D. 値 1.0 に調整後, 6 ウェルマイクロプレートを使用し 1 ウェルあたり 5 ml の培養液中へ 50 μ l の割合で植菌した. 紫外線照射装置に入れ, 本培養 (100 rpm, 25°C, 5 d) を行った. なお, LED では UV-A のような短波長を出すことはできないので, 蛍光管を使用した. UV-A (400–315 nm) 照射にはブラックランプ (TOSHIBA, 10 W) を, また UV-C 照射 (280–200 nm) には殺菌ランプ (TOSHIBA, 10 W) を用いた.

培養終了後, 吸光度 (620 nm) を測定し, 直ちに遠心分離 (8000 rpm, 4°C, 10 min) により集菌し, 窒素充填後に凍結保存した. 凍結した菌体を解凍し色素抽出を行った. 菌体にガラスビーズとアセトン:メタノール (7:3) を 20 ml 加え, ボルテックスミキサーを用いて菌体を破碎し, 色素を溶出させた. この溶出液を遠心分離 (8000 rpm, 4°C, 10 min) にかけて上澄みを濾過した. これを 2, 3 回繰り返し, 37°C で減圧乾固し色素回収を行い, カロテノイドの測定に供した.

7. 生産カロテノイドからのクラスター解析と遺伝学的な系統樹との比較

7-1. 生産カロテノイドからの系統解析方法

カロテノイド試料は, PDA 分析の結果よりそれぞれのピークの保持時間と面積値によって類似度を求め, 距離行列を算出し, 生物系統計学で多用される UPGMA 法^{5,6)}により連結した. 得られた結果を統計学の変量解析であるクラスター解析し, 距離関係を示す系統樹を作成した.

7-2. 遺伝学的手法による系統樹の作成 16S rDNA 遺伝子配列の解析結果を用いて系統樹解析を行った. 16S rDNA 遺伝子配列を国立遺伝子研究所の Clustal W プログラムを用いて相同性を比較し, 系統樹を作成した (なお, 主生産カロテノイドについて○印で示した).

8. 海洋生物からの新規カロテノイド化合物の検索

柏島及び鮫黒潮生物研究所 (高知県) をサンプリングポイントとし, サンゴ (エンタクミドリイシ) の卵, ヒメシロレイシガイダマシ及びオニヒトデの 3 点を採集した. カロテノイド生産海洋生物については, 採取後すぐにアセトンに浸漬し, 前処理した後, TLC, HPLC, 紫外-可視分光光度計及び FAB-MS により, カロテノイド成分の分析を実施した.

9. 結果

9-1. カロテノイド産生微生物について 慶良間諸島 (沖縄県) の海水中の生菌数は, 約 9.0×10^2 – 5.0×10^6 cfu/ml の範囲であった. また, 今回の検討で, 計 334 株の有色コロニーが得られた. カロテノイド含有量は, 最も多かった TMN11 株で約 7.9 ng/100 mg Tissue, 最も低かった FM6 株で約 0.4 ng/100 mg Tissue であった.

9-2. UV-C 照射条件下での TMN11 株・FM6 株のカロテノイド含有量, カロテノイド含有比率 UV-A 照射条件の TMN11 株・FM6 株のカロテノイド含有量, カロテノイド含有比率を Fig. 1 及び Fig. 2 に示した. また, UV-C 照射条件の TMN11 株・FM6 株のカロテノイド含有量, カロテノイド含有比率を Fig. 3 及び Fig. 4 に示した.

UV-A 照射では, TMN11 株においてカロテノイド含有量が UV-A, control 条件に比べ, 遮光の条件で減少がみられた. TMN11 株は, 光合成細菌であり, UV-A 照射がカロテノイド生産に有用に働いた

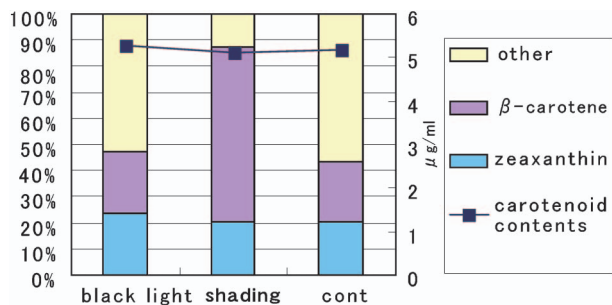


Fig. 1. Carotenoid Content (µg/ml) and Contents Ratio (%) of TMN11 Strain by UV-A

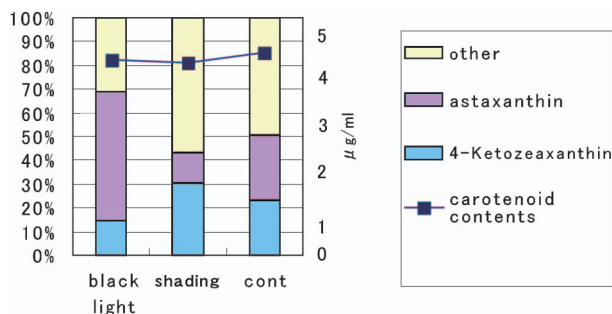


Fig. 2. Carotenoid Content (µg/ml) and Contents Ratio (%) of FM6 Strain by UV-A

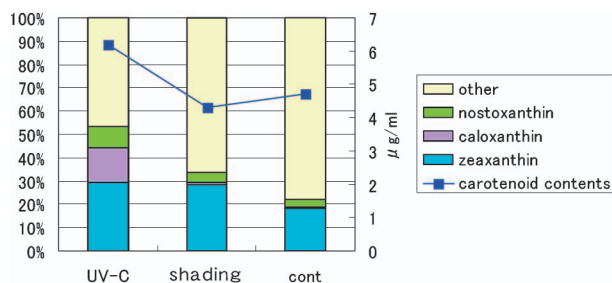


Fig. 3. Carotenoid Content (µg/ml) and Contents Ratio (%) of TMN11 Strain by UV-C

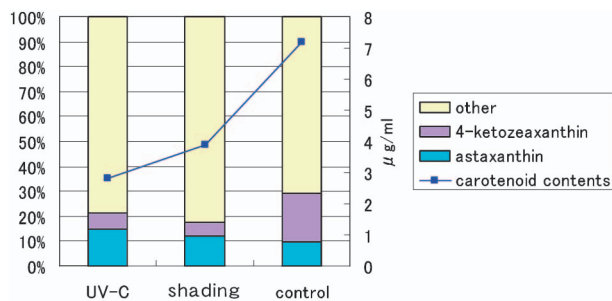


Fig. 4. Carotenoid Content (µg/ml) and Contents Ratio (%) of FM6 Strain by UV-C

ためと考えられる。また、カロテノイド含有比率では、UV-Aにおいて遮光、controlにはほとんどみられなかった Caloxanthin, Nostoxanthin 含有比率が増加した。これは、UV-A 照射によって TMN11 株の生合成経路が促進されたためと考えられる。

また、FM6 株においては UV-A 条件においてカロテノイド含有量が各条件に比べ増加した。また、UV-A 条件においてカロテノイド含有比率で Astaxanthin の増加がみられた。これは膜保護のために抗酸化能の高い Astaxanthin が増産され、その結果、カロテノイド含有量も増加したためと考えられる。

UV-C 照射では、光合成細菌である TMN11 株ではカロテノイド量が control と比べ増加したが、FM6 株では減少した。しかし、両株ともカロテノイド含有比率では抗酸化能の高いカロテノイドの割合が増加した。また、TMN11 株においては Caloxanthin の割合が増加していたことから、UV-C 照射によって TMN11 株の生合成経路が促進されたためと考えられる。

FM6 株では UV-C 照射条件によって、カロテノイド含有量に明らかな減少がみられた。これは、非光合成細菌の FM6 株では UV-C 照射により菌体量も若干の減少があり、それに伴いカロテノイドの生産も阻害されたものと考えられ、光合成細菌と非光合成細菌の膜構造の違いが表れたものと考えられる。

9-3. 遺伝子配列の解析結果を用いた系統樹の作成 カロテノイド生産微生物が生産しているカロテノイドのピーク情報を統計的にクラスター解析した。得られた系統樹を Fig. 5 に、また、遺伝子配列の解析結果を用いて作成した系統樹を Fig. 6 に示した。また、細菌のカロテノイド含量とクラスター解析による系統樹の相関性を Fig. 7 に示した。

生産色素の特性による分類と遺伝子配列の特性による分類のクラスターがほぼ一致していることから生産色素の特性による分類と遺伝子配列の特性による分類の関連性が高いことが認められる。このことから、各々の系統樹を比較することで有用カロテノイド代謝系を有するものの検出に相補的な判断ができることが示唆された。⁷⁾

なお、今後はさらにサンプル数を増やし、細かい分類を行うことにより、簡便かつ迅速に有用なカロテノイド生産微生物を探索できると思われる。

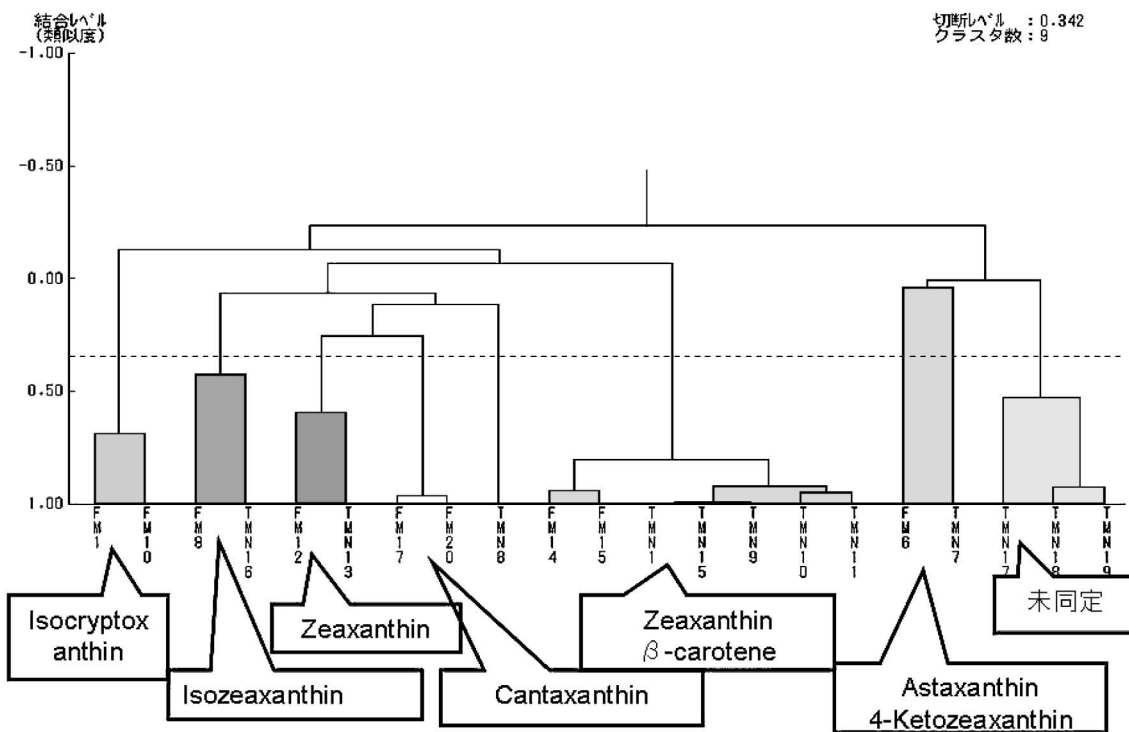


Fig. 5. Cluster Analysis by the PDA Chart Pattern of Carotenoid-producing Microorganisms

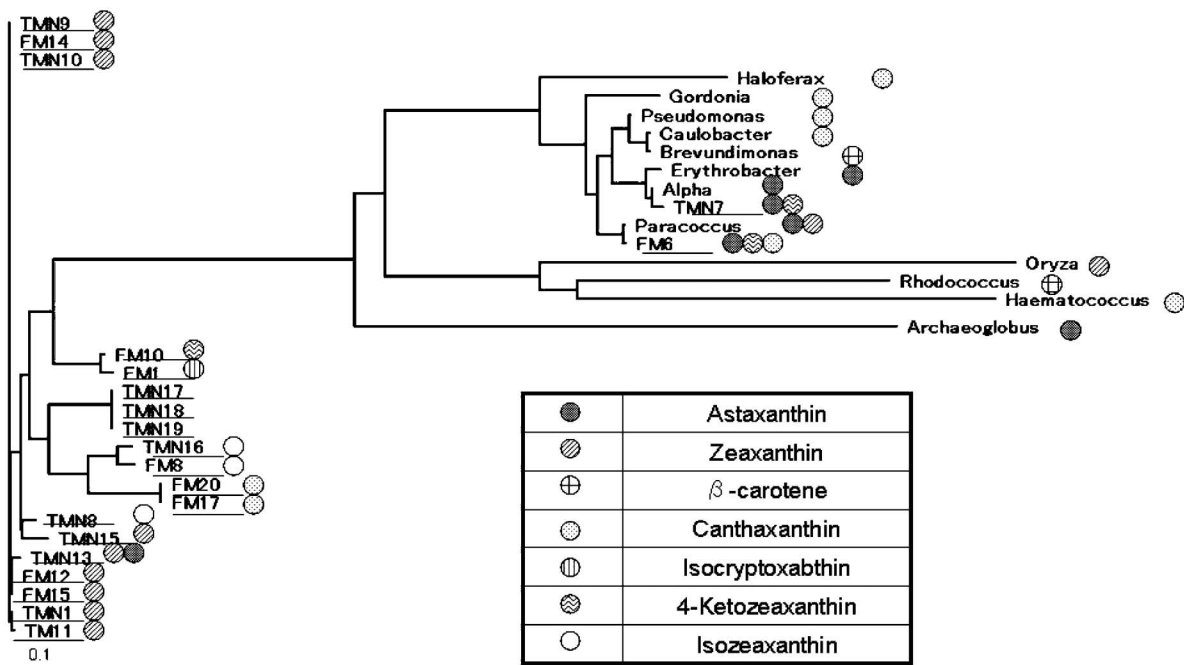


Fig. 6. Phylogenetic Tree of Carotenoid-producing Microorganisms
The main carotenoid-producing bacteria are marked by circles.

9-4. 海洋生物からの新規カロテノイド化合物の検索
海洋生物であるオニヒトデから得られたカロテノイドを Fig. 8 に示す。今回の検討より、新規カロテノイドとして、4-ketodeepoxyneoxanthin

(1), 4-keto-4'-hydroxydiatoxanthin (2), 3'-epigobiusxanthin (3) 及び 7,8-dihydrodiadinoxanthin (4) が得られた。⁸⁾

新規カロテノイドの検出より、サンゴとヒメシロ

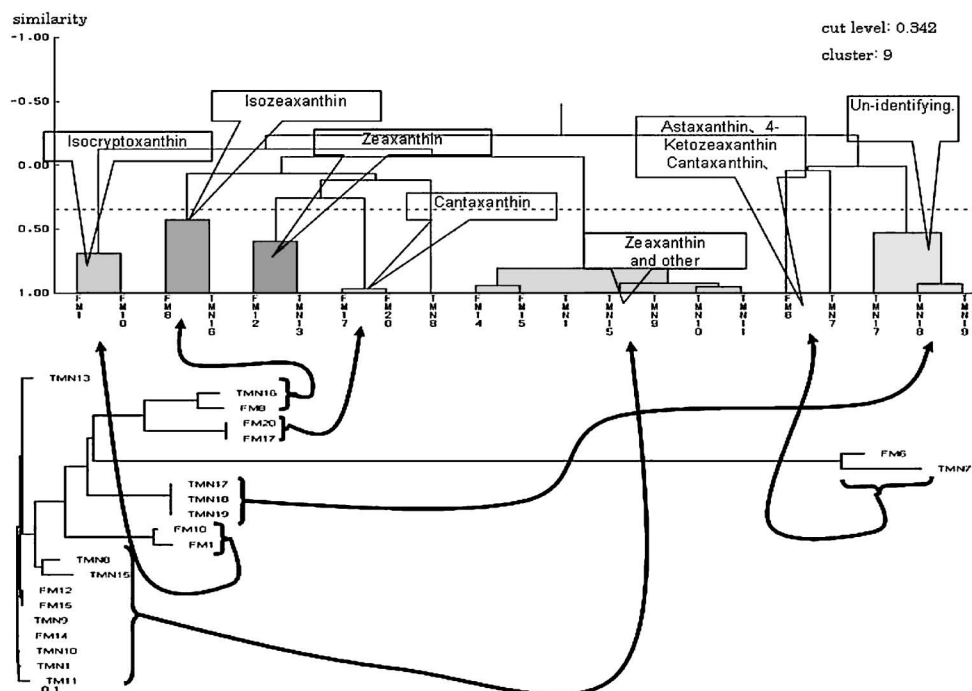


Fig. 7. Correlation between Carotenoids Contents of Bacteria and the Phylogenetic Tree Identified by the Cluster Analysis

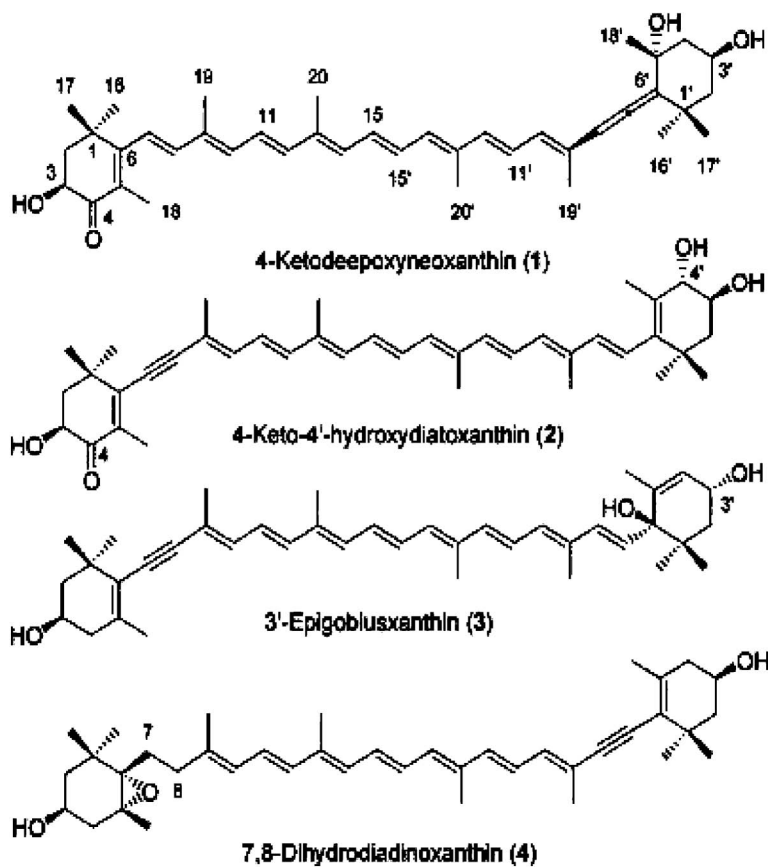


Fig. 8. Four New Carotenoids

(1) 4-ketodeepoxyneoxanthin, (2) 4-keto-4'-hydroxydiatoxanthin, (3) 3'-epigobiusxanthin, and (4) 7,8-dihydrodiadinoxanthin, were isolated from crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*.

レイシガイダマシ及びオニヒトデの間の食物連鎖の関係がほぼ断定された。しかし、採取したサンゴのサンプルがサンゴ本体ではなくサンゴの卵であったこと、ヒメシロレイシガイダマシとオニヒトデの双方はサンゴを食害するほかにも他の生物を食害した可能性も否定できない。これらのことを踏まえて、今後の課題としてはサンゴ本体からのカロテノイドの抽出やサンプルを採取した周辺海域の海水や他の海洋生物を調査していくことも必要と考えられる。

まとめ

カロテノイドは有用資源である。海洋中でカロテノイドを適切に生産する手段を考えることは、資源の有効活用の立場で大切なことと考えられる。カロテノイド生産菌からのカロテノイドの回収は意義深いことと考えられる。本稿が少しでも資源の有効活用につながることを期待している。

謝辞 本稿をまとめるに際して、ご協力を賜りました財生産開発科学研究所の眞岡孝至先生に感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Suzuki T., "New Century Encyclopedia," 2nd ed., Gakken, Tokyo, 1983, p. 53.
- 2) Sumiya Y., Dissertation, Graduate School of Agriculture, Kinki University (2007).
- 3) Sumiya Y., Sakaki H., Hirakawa R., Morita S., Tajiri N., Sugita T., Hirabayashi M., Tsushima M., Miki W., Tanangonan J. B., Sawabe A., Sakagami Y., Komemushi S., *Carotenoid Science*, **11**, 59–61 (2007).
- 4) McBeth J. W., *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 55–68 (1972).
- 5) Sourdis J., Krimbas C., *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 159–166 (1987).
- 6) Saitou N., *J. Mol. Evol.*, **27**, 261–273 (1988).
- 7) Sumiya Y., Morita S., Nishida Y., Sakaki H., Tsushima M., Miki W., Tanangonan J., Sawabe A., Sakagami Y., Komemushi S., *Biocontrol Sci.*, **13**, 17–22 (2008).
- 8) Maoka T., Akimoto N., Terada Y., Komemushi S., Harada R., Sameshima N., Sakagami Y., *J. Nat. Prod.*, **73**, 675–678 (2010).