

博士学位論文

海洋資源由来のカロテノイド生産微生物の探索と
その応用に関する研究

近畿大学 大学院
農学研究科 環境管理学専攻

住谷保治



博士学位論文

海洋資源由来のカロテノイド生産微生物の探索と
その応用に関する研究

平成 20 年 3 月

近畿大学大学院 農学研究科
環境管理学専攻 (指導: 坂上吉一教授)

住谷保治

(和文題目)

海洋資源由来のカロテノイド生産微生物の探索と
その応用に関する研究

近畿大学大学院 農学研究科

環境管理学専攻

住谷 保治

(指導: 坂上吉一教授)

(英文題目)

Search of Carotenoid-producing Microorganisms from
Marine-resources and Its Application

Yasuji Sumiya

March, 2007

Graduate Scholl, Kinki University

Division of Agricultural Science

Major: Environmental Management

(Advisor: Prof. Yoshikazu Sakagami)

目次

第1章 序論	1
1-1 天然色素の歴史	
1-2 カロテノイド物質の発見	
1-3 工業的利用の歴史	
1-4 人類に与える有用性	
1-5 本論文の目的	
1-6 本論文の構成	
第2章 海産資源からのカロテノイド生産微生物の探索	9
2-1 サンプルング手法とサンプルングポイント	
2-2 カロテノイド生産微生物のスクリーニング	
2-3 カロテノイド生産菌の分布	
2-4 まとめ	
第3章 カロテノイド物質の分析	27
3-1 カロテノイドとキサントフィル	
3-2 カロテノイド物質の分析	
3-3 カロテノイド抽出における物理的條件の比較	
3-4 まとめ	
第4章 培養特性	48
4-1 物理的環境条件 -音波の影響-	
4-2 物理的環境条件 -光波長の影響-	
4-3 物理的環境条件 -紫外線領域の波長の影響-	
4-4 まとめ	
第5章 カロテノイド生産微生物の遺伝学的特性	79
5-1 16S rDNAによるカロテノイド生産微生物の同定	
5-2 沖縄県慶良間諸島におけるカロテノイド生産菌の分布	
5-3 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	
5-4 まとめ	

第6章 総括 ----- 93

引用文献 ----- 95

謝辞

要約

Summary

第1章 序論

1-1 天然色素の歴史

海洋は地球全体の面積の約70%をしめており、そこには多種多様の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）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 Fig. 1-1 参照）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だしたのは非常に古い時代で、エジプトのミイラの着衣がすで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ささげられた。ある種の色素には薬理作用があり、また色は人間の情緒的ならびに心理的効果に対しても活用されてきた。兵隊には赤色（アリザリン）、農夫には紺色（インジゴ）、僧侶には黒色（ヘマチン）などの色が多用されていた。

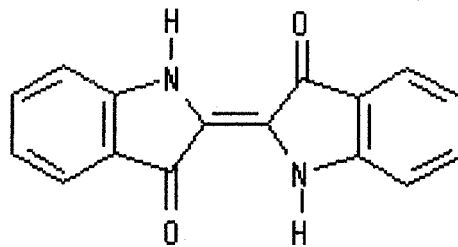


Fig. 1-1 Indigo

1-2 カロテノイド研究の歴史

カロテノイド (Carotenoids) とは、カロチンなどの一般名称で知られるような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～赤色の色調を呈する。カロテノイドの名称は、ニンジン（英名:Carrot 学名: *Daucus carota*）の学名に由来する。

カロテノイドの研究の歴史は、意外に古く 19 世紀初頭から研究が行なわれ、はじ

めにパプリカ (*Capsicum annuum*)、少し遅れてニンジンから脂溶性色素として単離されている。しかしながら、当初は、脂溶性であること、不安定であるなどの理由によりなかなか研究は進まなかったようである。それから 21 世紀に入るまで研究は停滞していたが、ロシアの植物学者 Mikhail S. Tswett による、植物色素成分を石油エーテルと共に炭酸カルシウム層に通し、緑色の Chlorophyll 類と黄-橙色の色素で極性の低い Carotene 類および黄色で極性の高い Xanthophyll 類を分離した。すなわち天然物化学分野で最も重要といえるクロマトグラフィーの発明以降、研究は徐々に加速していった。その後、1907 年、Richard M. Willstätter らの質量分析や古典的手法により Carotene の分子式が $C_{40}H_{56}$ 、Xanthophyll の分子式が $C_{40}H_{56}O_2$ と決定された。なお、これらの成分は後に混合物であることが判明するが、カロテノイドの構造化学に大きな前進をもたらした。また、1928 年には Richard Kuhn と Paul Karrer はポリエン鎖を有するカロテノイドの合成に成功し、さらに Paul Karrer らは 1931 年にビタミン A の構造決定と、 β -Carotene から代謝されることを見出している²⁾。また、20 世紀に入ってから、新規カロテノイドが数多く発見され、現在までに 750 を超える構造のカロテノイドが自然界から単離され、そのうちの約 600 種類については 2004 年、発刊された” Carotenoids Handbook”³⁾ に詳細なデータが記載されている。なお、非天然型のものを含めるとさらに膨大な数に上るであろう。

日本では、天然物からのカロテノイドの構造解析については、京都府立医大の松野らのグループが、海洋性生物を含めた水生生物から 100 種類以上のカロテノイドを単離同定している。それらのカロテノイドは、ほとんどが Xanthophyll 類であり、様々な Xanthophyll や一部の Carotene が生体内で酸化型代謝を受け生じるものが多いが、一部は還元型代謝を受けることも報告されている⁴⁾。近年では、松野グループの眞岡により天然物から、また、高市らにより微生物から多くの新規構造カロテノイドに関する報告が盛んにあり興味深い。

また、Synnøve Liaaen-Jensen らのグループが、海洋性細菌を含めた微生物から数多くを単離同定している³⁾。

1-3 産業界利用の歴史

海洋資源の産業利用では、臭素化テルペンであるアプリシンがアメフラシの成分として同定された（1963年）。続いて一連のハロゲン化脂肪酸が紅藻類やこれを食べるアメフラシから次々と報告された。同時期にふぐ毒テトロドトキシンの奇異な化学構造がその誘導体結晶のX線解析により解明され（1964年）、新しいタイプの化学構造や生理活性を持つ二次代謝物の宝庫として海洋生物に注目が集まってきた。時を同じくして、スキューバーの普及により、研究者自らの研究材料の選択調達が可能となる一方、薬理活性試験の迅速化による新規天然物の需要への供給源とした制ガン剤リードの探索目的として、海洋生物は今や土壌菌と並ぶ新規生理活性物質の探索源となっている⁵⁾。しかし、1970年代の海洋天然物化学研究は研究知識やアッセイ系が確立されていなかったこともあり、産業上の有効利用法が見いだされず、非選択的な活性物質を単離しがちであったことなどから、一時的に衰退を迎えた。1980年代には研究者の数も減少し、一種の暗黒時代が訪れた。1980年代後半になって「マリンバイオテクノロジー」が芽生え、発展し、特に微生物が注目されるようになってきた。

カロテノイドの工業面の利用では、古くから漁業分野では色上げ剤として利用されている。さらに、近年漁業は捕る漁業から養殖生産する漁業へと進み、養殖魚を天然魚に近い品質にする研究が活発に行われている。魚体の大きさのみならず色調や肉の質の改良が市場価値を高めるためである。魚の色調は、メラニン色素、プテリジン類、グアニン、カロテノイド類などからなっているが、カロテノイド類は魚類では一般に生合成できないので餌から得て色々な色調をあらわしている。したがって、養殖時の餌にカロテノイド類や色素の前駆体を混じて飼育すると色調や肉質が改善することが知られている⁶⁾。サケの色がアスタキサンチンであること⁷⁾より、アスタキサンチンを含むオキアミをギンサケの養殖に用いる試験がなされ肉色の改善効果が確認された⁸⁾。合成のアスタキサンチンを含む混餌飼育で同様に肉色改善に効果を見出しており、サケの肉のアスタキサンチン含量が5mg/kgくらいあれば商品価値を維持できると推察されている⁹⁾。現在、北欧における大西洋サケの養殖に合成アスタキサンチンが大量に用いられている。マダイの色調にアスタキサンチンが含まれる¹⁰⁾ことが知られる以前にマダイの養殖にオキアミ利用試験がなされている¹¹⁾。アスタキサンチンの供給源として赤色酵母 (*Phaffia rodomya*) を利用する試みもなされ、実用化されて

いる¹²⁾。市場はUS \$100,000,000/年とも言われている¹³⁾。

サプリメントの分野においては、欧米では古くから天然や合成の β -carotene が利用されてきた。近年では、アンチエイジングの思想の広がりでも市場規模は大きくなり、本来サプリメントを常用する習慣の無かった日本においてもカロテノイドのサプリメントは普及しだしている。その代表例はアスタキサンチンであり、藻類やサケの身、エビやカニの甲羅などに含まれる。生活習慣病につながる活性酸素の過剰発生を抑えるなど、ビタミンEの1000倍とも言われる高い抗酸化力を持ち、老化防止成分として最近特に注目されている。日本における2006年の原料市場規模は、前年比4割増の約20億円と成長を続けている。

1-4 人類に与える有用性

カロテノイドは単なる色素としてだけでなく生体において非常に重要な化合物群である。全ての光合成生物は、クロロフィル以外にカロテノイドを光合成の反応中心に有しているが、これは光合成において光エネルギーを受け取り光合成反応中心へエネルギーを受け渡すほか光アンテナの役割を担うとともに、LH2において光増感作用によって発生する一重項酸素の消去能を担っている。そのため、Phytoene desaturaseの阻害剤であるNorflurazoneの存在下では、暗黒下で従属栄養的に生育できても、強光を照射すると一重項酸素の障害により枯死する¹⁴⁾。また、植物ホルモンであるAbscisic acidやIonone系の香気成分などの前駆物質としても存在する¹⁴⁾。光合成生物におけるカロテノイドの生産に関与するHMG CoA reductase 遺伝子¹⁵⁾やPhytoene desaturase 遺伝子¹⁶⁾⁻¹⁹⁾、*crtK*^{20,21)}、*crtO (bkt)*²²⁾などは、光や環境ストレスによって発現が誘導される。例えば、緑藻*Haematococcus*では、強烈な環境ストレスに晒されると、自身は赤色嚢子と呼ばれる細胞状態へ形態変化する。その際に、通常の分裂細胞の形態時には細胞中にほとんど認められないAstaxanthinを過剰に生合成し、細胞に蓄積する^{21,22)}。

非光合成微生物におけるカロテノイドの存在意義は、まだ未解明である。主に強光環境下や極限環境下に見出される微生物の多くはカロテノイド生合成能を獲得しているものが多い。また、真菌や一部のActinobacteriaでは、光などの環境ストレスを感

知すると、光合成生物と同様にカロテノイドの生産性を上昇させることが知られている²³⁾⁻³⁵⁾。その為、自然環境下での光や酸化的障害の防御物質として、あるいは、機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

また、動物において、カロテノイドは、プロビタミンAとして機能し、レチノイドは生体の機能維持や分化に不可欠な化合物となっている。それだけではなく、カロテノイドは、動物においても光障害などの生体防御物質として防御機能を担っていると考えられている。

ヒトにおいてもカロテノイドは広く分布し、主たるものとして13種類のカロテノイドとその12種類の(幾何)異性体、および9つ代謝物の合計34種類のカロテノイドが血液中から検出されている。これらは、2章で述べたように動物はカロテノイド生合成経路を欠損しているので、主に緑黄色野菜や鶏卵などカロテノイドを多く含有する日常的な摂食由来であることは言うまでもない。また、プロビタミンA活性を有しないものを含め、生体におけるカロテノイドの存在意義は、レチノイドの前駆体としてだけではなく、疫学的調査により様々な知見が報告されている。

先進国における死因の第一位は悪性新生物、次いでほぼ同率で循環器系および脳疾患が挙げられる。カロテノイドは第一位の悪性新生物に関して予防的効果が認められる。例えば、World Cancer Research Fund と American Institute for Cancer Research からの報告では、カロテノイドを多く含む緑黄色野菜の日常的な摂取は、研究事例が少ない臓器を除いて、多くの臓器での発ガン抑制効果を持つと結論付けられている³⁶⁾。また、2005年には、WHOの部位別がん死亡率データに基づいたガンリスク評価共同コホート研究で、世界のガン死亡の主たる原因は喫煙、飲酒、低果物・野菜摂取によると報告されている³⁷⁾。疫学的に血中の β -Carotene量と肺ガンリスクとの相関が報告されたことから、食事由来のもの以外に β -Caroteneの補助的な摂取は発ガンリスクを減少させることが期待される。実際の例としては、ビタミンA摂取量が少ないことで知られている中国の竜山県(Linxian)で行なわれた29,584名を対象とした臨床試験では、胃ガンの罹患率が21%、ガン死亡率が13%も減少した報告がされている³⁸⁾。しかしながら、フィンランドで行なわれた、29,133名の喫煙中高年男性を対象とした無作為二重盲検条件での β -Carotene(20mg/day)および α -Tocopherol(50mg/day)の補助的摂取の影響を調べた臨床試験(ATBC Study)では、驚くべき結果が得られた

39)。すなわち、Linxian Study とは逆に β -Carotene 摂取により肺ガンリスクが高まることが示された。同様に 1996 年、アメリカでも喫煙者経験者を含む喫煙者およびアスベスト暴露労働者 18,314 人を対象に、被験者を β -Carotene (30mg/day) 投与群またはプラセボ投与群に無作為化し、プライマリーエンドポイントは肺ガンの発症とした時、 β -Carotene 群は肺ガン発生率 (RR=1.28 ; 95%CI、1.04~1.57) も総死亡率 (RR=1.17 ; 95%CI、1.03~1.33) もプラセボ群より高いことを報告した。しかし、 β -Carotene の有害作用を示唆する ATBC 試験の結果、確認する成績が得られたため、早期に試験が中止された⁴⁰⁾。また、Mannisto らの報告では、上記を含めた過去行なわれた 7 つのコホート研究 (合計 399,765 人) の再解析の結果、 β -Carotene の摂取は、総合的な見地で肺ガンリスクには影響がないとされている⁴¹⁾。また、Cook らの報告では米国男性医師に β -Carotene を 12 年間投与したところ、対象者全体で見るとガンリスクが低下しなかったが、もともと血中 β -Carotene 濃度が低い集団に限っては、前立腺ガンリスクが低下することも報告されている⁴²⁾。これらのことから推察すると、血中においてある一定濃度以下であれば β -Carotene は、ガン罹患を抑制する可能性はあるが、過剰量の場合、喫煙などの特定の条件下では、逆に発ガンリスクを高めることを示唆している。

β -Carotene の発ガン機構への関与については、 β -Carotene の Eccentric Cleavage による酸化的代謝物が、肺において CYP を誘導し、これにより、レチノイン酸が代謝を受け Retinoid Signaling を抑制する⁴³⁾ほか、喫煙により肺に取り込まれた Benzo[a]pyrene が上記で誘導された CYP により発ガン性の高い物質に代謝を受け⁴⁴⁾、それによる DNA 損傷の結果、発ガンイニシエーションが生じリスクが高まることが考えられている。

さらに興味深いことに β -Carotene が極わずかに修飾されただけの化合物では全く異なる結果が得られている。例えば Mannisto らは、過去行なわれた 7 つのコホート試験 (約 40 万人) を再解析した結果、主要な血中カロテノイドのうち β -End group が一箇所水酸化された β -Cryptoxanthin のみが、その血中濃度が高いグループは低いグループと比較して肺ガンリスクを有意に軽減させると報告している。構造的には、血中に多く認められる β -Carotene や、やや多く認められる Zeaxanthin とわずかな構造の差異しかないのに驚かされる。また、食道、子宮頸部、膀胱ガンに対しても有効との

知見が得られている。

また、Giovannucci によると、それまでのトマト製品 (Lycopene を多く含有する) の摂取や血中の Lycopene 量を報告している多くの疫学的報告を再解析したところ、トマトの摂取による血中 Lycopene 量とガンリスク、特に前立腺ガン発症のリスクとは密接な逆相関があることが明らかであり⁴⁵⁾、前立腺ガン患者を対象とした Lycopene の投与では有意ではないがガンの進行を抑制することが報告されている⁴⁶⁾⁻⁴⁹⁾。

上記のようにカロテノイドは何らかの発ガンイニシエーションあるいはプロモーションを抑制する作用がうかがえる。そのため、その作用の確認や作用機序の解明の為に補助的なカロテノイド投与を行なう多くの *In vitro* 研究や実験動物を用いた *In vivo* 研究が行われてきた。日本においては西野らのグループが精力的に自然界に分布するカロテノイドを用い、動物試験や培養細胞を用いた発ガンの抑制、プロモーションの抑制を見出している。これら一連の研究で最も興味深いことは疫学調査による結果と同様にカロテノイドの種類によりその活性部位や活性が異なっているという点が挙げられる。

上記で述べたように、カロテノイドの生理活性は主に疫学調査によるものから研究が始まっている。Lutein や Zeaxanthin は加齢性黄斑変性症 (Age-related macular degeneration : AMD) に対する抑制効果が有ることが示唆されている⁵⁰⁾。

これら多くの活性は、一つは、代謝物による PPARs, RXRs, RARs といった核内転写因子のリガンドとして作用すること、もう一つは、異常なシグナル伝達時に生じる活性酸素種の消去によるものであると推測される。

カロテノイドは、非常に優れた一重項酸素消去能、脂質過酸化抑制作用をもつことが古くから知られ、特に、共役二重結合が長いもの、極性基を有するものが生体内で機能的に働くと考えられる。前者は、特に一重項酸素消去に深く関与し、後者は、極性、非極性環境下での活性変化の低減、プロオキシダント活性の低減に働いていることが知られている。

1-5 本論文の目的

以上のことにより、本論では、近年、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「カロテノイド」系の化合物に着目し

研究を行なった。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。そこで優れた生理活性を示す新規カロテノイドのスクリーニングを行なった。

また得られた菌株から、その菌株が持つカロテノイド生合成経路、産生条件および産生カロテノイド類の組成などの性質について検討を行なったのでここに報告する。

1-6 本論文の構成

先に述べた第1章序論では、現在人類が置かれている疾病などの環境と将来的な予測の概要を説明し、疾病に対する意識の構造変化と疾病予防に対する考え方の高まりについて述べた。

第2章では、本論文で中心となるカロテノイド生産微生物のスクリーニングについて示す。また、カロテノイド生産菌とサンプリングポイントの関係について示す。

第3章では、生産カロテノイドの分析について示す。また、得られたカロテノイドについてカテゴリーに分け考察した。

第4章では、カロテノイド生産微生物の培養特性について検討した。物理的な培養環境に着目し、音波の周波数ならびに光の周波数のカロテノイド生産に与える影響について検討した。

第5章では、遺伝学的観点から微生物を同定した。また、生産物質のカロテノイドの分析データを応用し、統計学的に系統解析し、遺伝学的な手法と比較を行なった。

第6章では本論文についての総括を行なった。

第2章 海洋資源からのカロテノイド生産微生物の探索

熱帯・亜熱帯海域の表層から試料海水の採集を行ない、その試料海水から海洋性微生物の分離、保存を行なった。有用な生理活性物質を効率よく得るために、より強い太陽光線に晒される海域・時期に、できるだけ多種多様な試料（場所・季節・採集方法を変えるなど）を採集することを心がけた。また、分離・培養には、千寿製薬(株)の人工海水 MARINE ART SF-1 を用いた人工海水培地を、適宜希釈して用いた。希釈することで、より多くの菌株が得られた。

2-1 サンプリング手法とサンプリングポイント

材料は海水サンプルの採取用に滅菌スピッツ（10ml 容）とケミカルスポンジをカットしたもの（ $5 \times 10 \times 10 \text{ cm}^3$ ）（Fig. 2-1）採取用に用いた。ケミカルスポンジは抗菌処理をしていない製品を用い、事前に高圧蒸気殺菌（ 121°C 、15 分間）を行ない試料採取に供した。

サンプリングポイント

海水の採取場所として、黒潮の流れに着目し、フィリピン、沖縄、高知においてダイビングで海水を採取した。黒潮は北赤道海流がフィリピン大陸に当たる付近が起源であり、サンゴの卵や、オニヒトデの卵が運ばれてくる⁵¹⁾。これらに微生物がどのように関与しているかはいまだわからない、また、カロテノイド生産菌の役割も確かなことはわかっていない。

本研究ではサンゴ礁海域に特に着目してサンプリングを行なった。サンゴ礁は海の森林ともよばれ、大量の二酸化炭素を吸収し、酸素を放出することで、地球温暖化防止や環境保護の観点で近年注目を集めている。サンゴ礁には、さまざまな種のサンゴが生息するとともに、多数の魚やウミウシのような小動物まで生態系を支える役割もあると考えられている。我々は、生物種の多様性が微生物の種の多様性にも関連しているのではないかと考え、黒潮の流れに沿ったフィリピン、沖縄、高知でサンプリングを行なった。

また、生物の体内も新規微生物の探索箇所として有効である。カニや二枚貝など、砂や海水を濾すことでそこに生息する微生物を取り込んでいる。生物濃縮の作用も考

えられ、通常の海水からは得られない微生物を得られることが期待される。サンプリングは、運搬の面を考慮し、近畿県内で行なった。

サンプリング箇所の図を Fig. 2-2~8 に示した。

黒潮海流

黒潮は、赤道のすぐ北側を西向きに流れる北赤道海流に起源を持ち、これがフィリピン諸島の東で、北に向かった流れがコリオリ力の緯度変化の影響（ β 効果）を受けて強化される。その後、黒潮は台湾と石垣島の間を抜け、東シナ海の陸棚斜面上を流れ、九州の南西で方向を東向きに転じトカラ海峡を通過して日本南岸に流れ込む。日本南岸を流れる黒潮は、日本沿岸の近くを流れる流路と、南に大きく蛇行する大蛇行流路と呼ばれる特徴的な流路をとることが知られている。黒潮の幅は、日本近海では約100kmで、最大時速は最大で4ノット（約7.4km/h）にもなる。厚さは幅に比べて長く、600~700mの深さでも1.2ノットになることも珍しくない。正確な流量の見積もりは困難であるが、概算で一秒間に2000万~5000万立方メートルの海水を運ぶとされている。表層（200m以浅）の海水温は夏季で30℃近く、冬季でも20℃近くになることがある。高塩分であり冬季には3.48%に達する（夏季は3.4%以下）。溶存酸素量は5ml/l前後であり、栄養塩濃度は親潮系水に比べて1桁少ない。

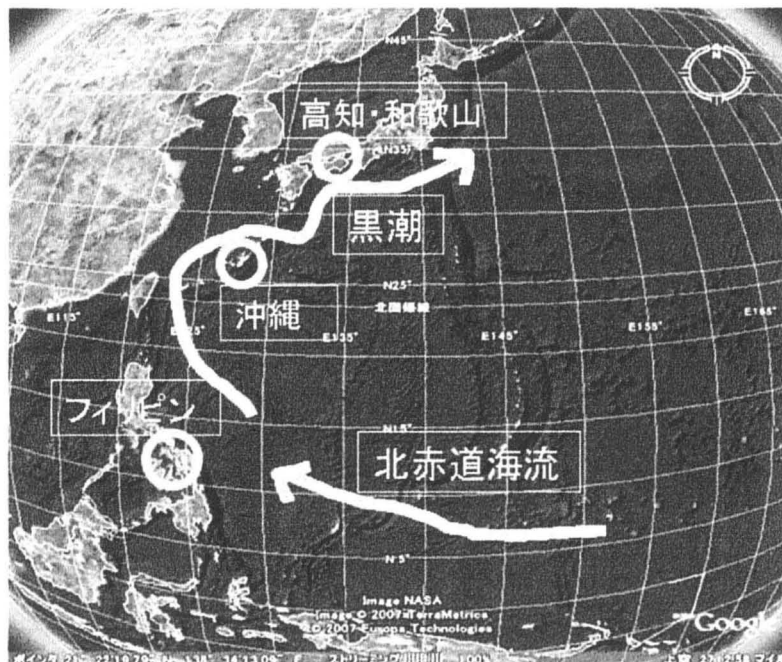


Fig. 2-1 Japan Current

フィリピン アポ島周辺

フィリピンは東南アジアの島国であり、ルソン島、ヴィサヤス諸島、ミンダナオ島などを中心に、大小合わせて7109の島々から構成されている。資源に乏しく、農業や漁業、観光などのサービス業が主である。かつて、漁業ではダイナマイトを用いた漁が中心でありサンゴ礁が深刻なダメージを負っていた。近年では、政府がサンゴ礁の保護政策を行ない、禁猟区（サンクチュアリ：聖域）を設けて保護を行ない成果を残している。主にサンプリングを行っているアポ島も禁猟区であり、サンゴが復元された場所である。

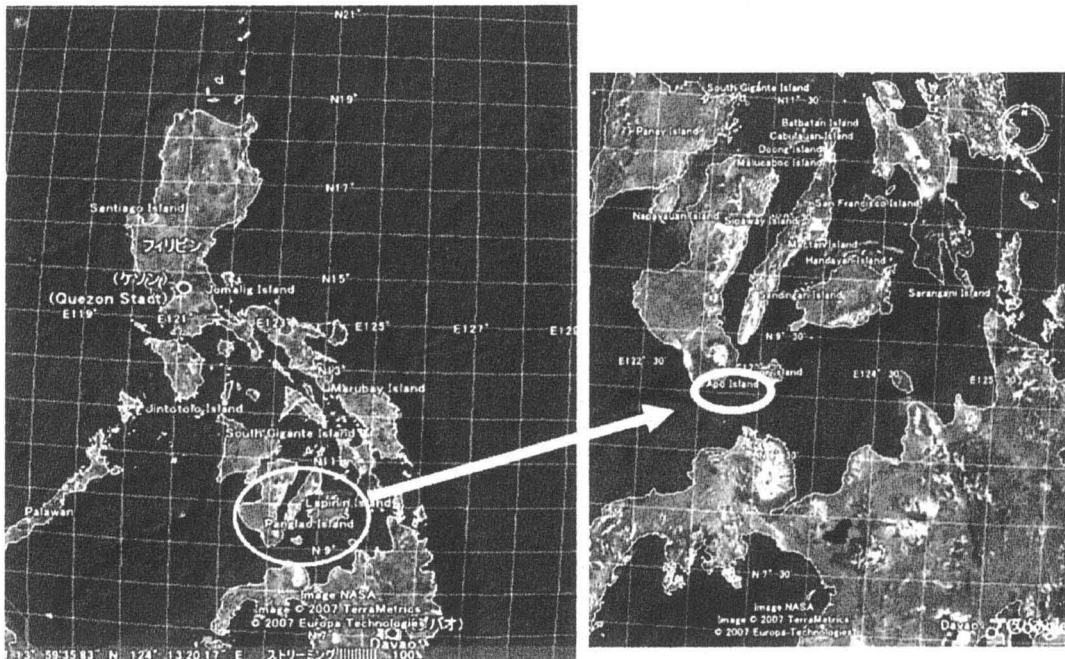


Fig. 2-2 Philippines Apo island

沖縄県 慶良間諸島

慶良間諸島（けらましょとう）は、沖縄県那覇市（沖縄本島南部）の西方約 40km の東シナ海上に点在する大小 20 余りの島からなる島嶼群である。世界でも有数の海水の透明度を誇り、ダイビングやホエーウォッチングのポイントとして人気が高い。

生息する生物も非常に多様であり、サンゴ種は 300 種を超え、魚類では 1000 種を超えるほどの生物多様性が維持されている。また、慶良間諸島の特徴として、天然の河川がないことが挙げられる。河川がないことで陸地からの赤土の流入がなく、海の透明度が保たれている。我々は、慶良間島を中心としてサンプリングを行なった。

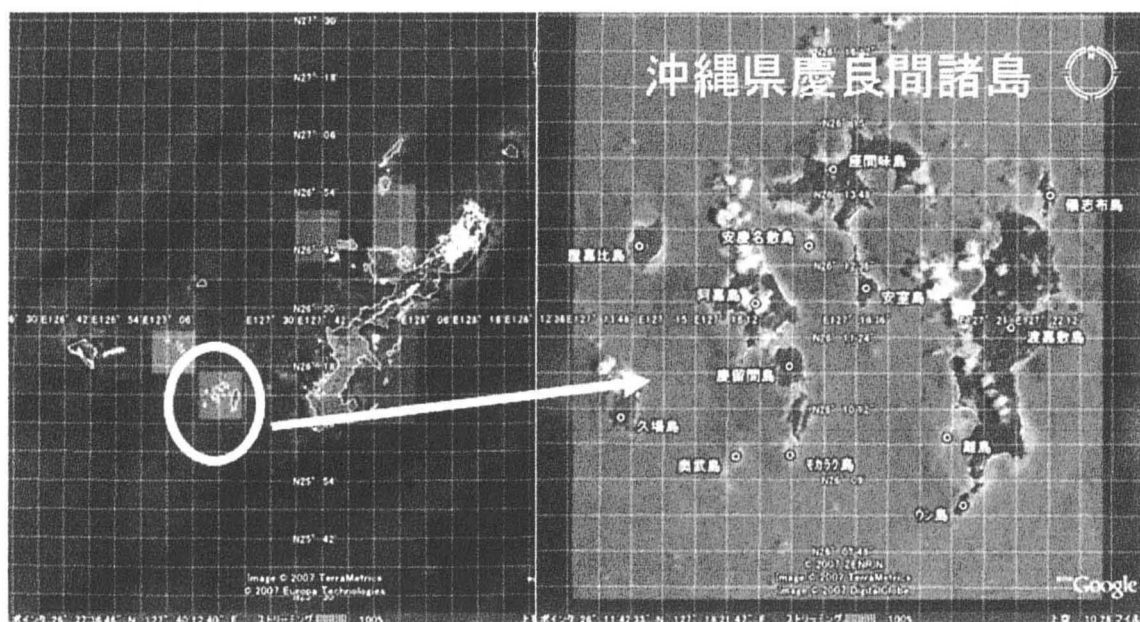


Fig. 2-3 Kerama Islands of Okinawa

高知県 柏島、黒潮生物研究所

高知県大月町柏島は西端に位置し足摺岬の西側、高知県幡多郡大月町に位置する周囲 4 km の小さな島である。ダイビングで非常に有名な島であり、かつては獺師の島であったが、現在では魚の養殖とダイビングが島の主要な産業となっている。柏島の南を黒潮が通っており、海の透明度も比較的高い。サンゴ礁は 10 年前のピーク時と比較すると減少しているものの、多様なサンゴ種を見ることができる。

また、黒潮生物研究所も同じ大槻町内にある。この研究所は国内でも有数のサンゴ研究の場所であり、目の前の湾にはサンゴ礁が群体で生息しており、サンゴの放卵など観察において非常に有効である。そして、国に登録すれば生きたサンゴを採取できる貴重な場所でもある。

我々も 2007 年よりサンゴに関する研究を始め、研究所を訪れ海水や生体サンゴのサンプリングを行なった。

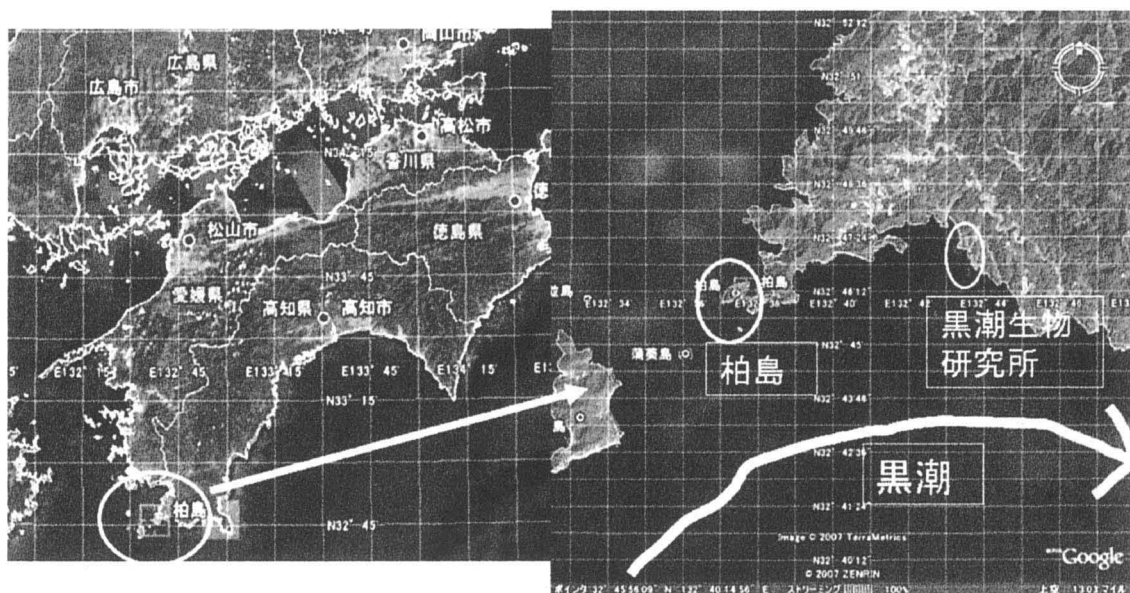


Fig. 2-4 Kashiwa Island and Kuroshio Biological Laboratory in Kochi

兵庫県：甲子園浜、大阪府：舞洲・箱作、和歌山県：磯ノ浦・加太・片男波
生物採取には主に兵庫県、大阪府、和歌山県で行なった。これは生体のサンプルを
生きたまま安定して運ぶためである。

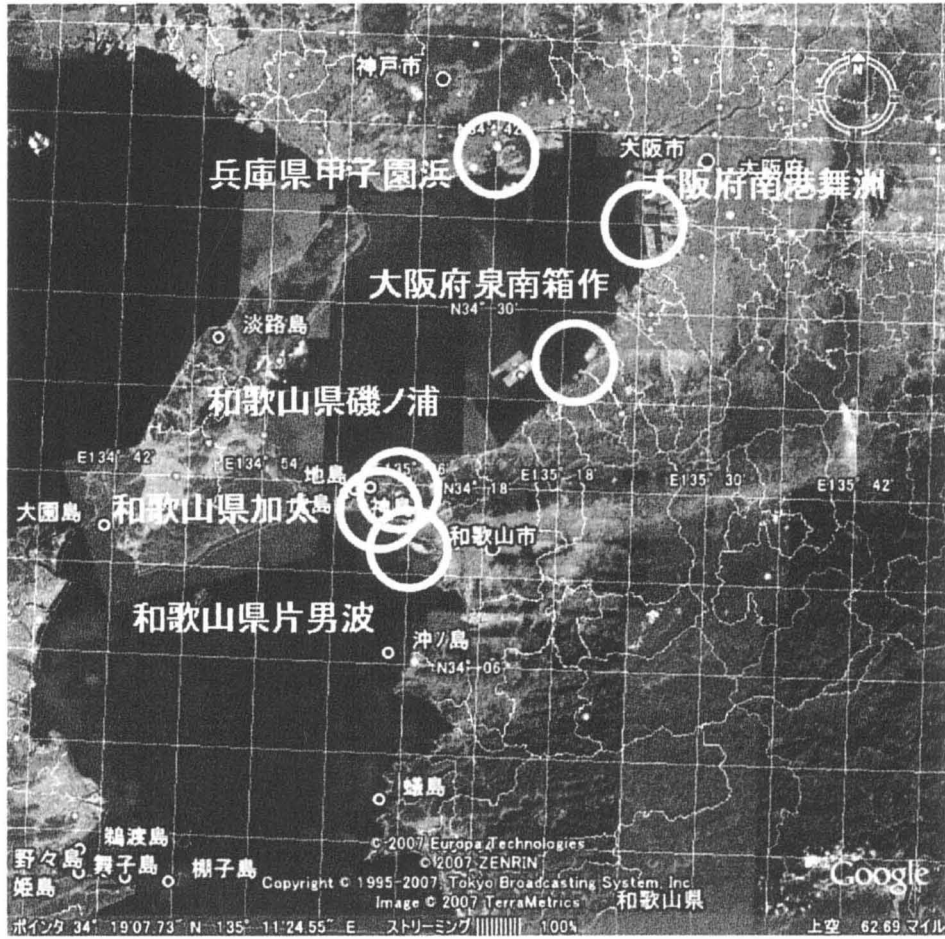


Fig. 2-5 Sampling point in Kinki district

2-1-1 海洋性微生物分離用海水の採集

海水の採取

微生物の分離用試料は次の手順で採集した。

- 1) フィリピンアポ島周辺(2004~2006年)、沖縄県慶良間諸島周辺(2001年~2006年)、高知県柏島周辺海域(2006年)において、スピッツもしくは微生物のトラップ用としてケミカルスポンを用いて、海水を採取した。
- 2) ケミカルスポンジは水深約3m~25mで3mおきに5つ設置し、原則として3日後に回収した。(Fig. 2-6, 7.)
- 3) 滅菌チューブによる採取は一つのダイビングポイントにつき、上部(水深2~5m)、中部(7~10m)、下部(12~15m)と3箇所の海水採取を行なった。

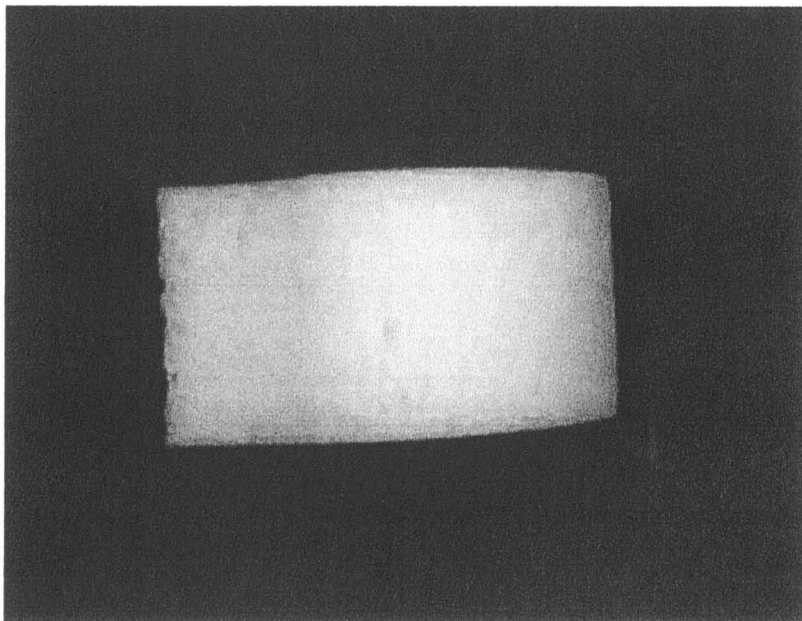


Fig. 2-6 The sponge for the collection of the marine microorganism

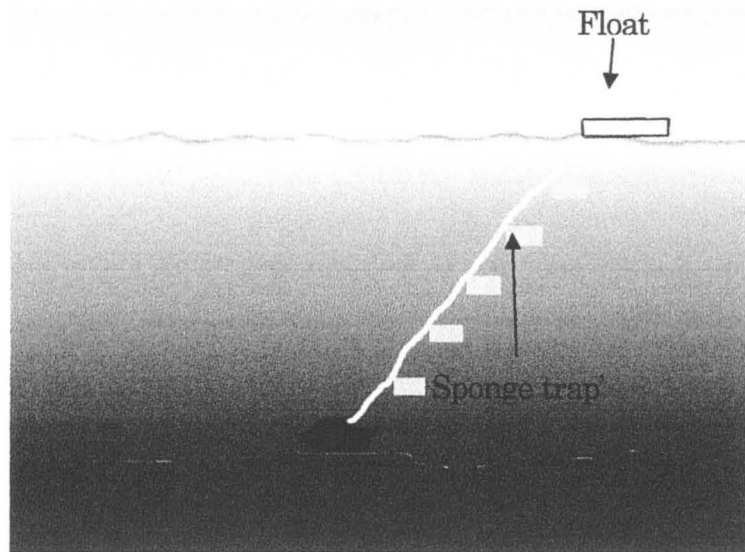


Fig. 2-7 The trap for the collection of the marine microorganism

2-1-2 海洋性小動物の採取

海洋性小動物の採取

2005～7年8月中旬から10月末にかけて、近畿海域5ヶ所で海洋性小動物と海水をそれぞれ採取し、これらを試料とした。

Table 2-1 Sampling data of living things

採取場所	年	日付	比重	水温	採取生物
和歌山県磯ノ浦	2005	8月13日	1.023	26.5℃	カニ、巻貝、ヒザラガイ、小魚、イソギンチャク
大阪府此花舞洲	2005	9月1日	1.017	25℃	カニ、巻貝
兵庫県甲子園浜	2005	9月1日	1.017	25.5℃	カニ、ヤドカリ
和歌山県加太	2005	10月11日	—	—	アジ、赤鯛、黒鯛
大阪府泉南箱作	2005	10月28日	1.025	22℃	カニ、ヤドカリ、フグ、ベラ、マツバガイ
和歌山県片男波	2007	5月7日	—	24℃	カニ、ヤドカリ、二枚貝

2-2 カロテノイド生産微生物のスクリーニング

微生物の分離・単離は、クリーンベンチ内で行なった。

海水を含ませたスポンジは一辺約 1cm の長方形に切り取り、海底の土はピペッターを使ってスピッツから海水を含ませながら 1ml 採取した。珊瑚の死骸は滅菌済み乳鉢で粉々に砕いたものを約 1g 秤量し、それぞれ試料とした。

試料調整は 2 段階から 4 段階まで 10 倍段階希釈し、希釈液を作成した。希釈には滅菌人工海水 (Table 2-2) を用いた。

希釈液をそれぞれ 1ml ずつとり、可溶適温寒天培地 (約 15ml) (Table 2-3, 4) 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。

また、その際コロニーカウントを行ない微生物数を測定した。

Table 2-2 Composition of medium used for seawater dilution

MARINE ART SF-1	36.0 g
Distilled Water	1,000ml

After sterilization at 121°C for 15min this medium was used in this experiment.

Table 2-3 Composition of medium used for marine microbe (for bacterium)
isolation or preservation

Peotone	5.0g
Yeast ex.	1.0g
Glucose	2.0g
MARINE ART SF-1	36.0g
Distilled Water	1000ml
pH	7.0

After sterilization at 121°C for 15min this medium was used in this experiment.

Table 2-4 Composition of medium used for marine microbe (for fungi)
isolation or preservation

Peotone	5.0g
Yeast ex.	1.0g
Glucose	20.0g
Chloramphenicol	0.12g
Streptomycin	0.02g
MARINE ART SF-1	36.0g
Distilled Water	1000ml
pH	7.0

After sterilization at 121°C for 15min this medium was used in this experiment.

2-2-1 継代培養保存

単離した菌株はスラントに植菌し、28℃で数日間培養した菌の生育を確認後、4℃において、生化学的活性を低下させた状態で保存した。2～3ヶ月毎に新鮮な培地に植え継いだ。コンタミネーションが起こった株については、再度2-2の方法で分離を行った。

2-3 カロテノイド生産菌の分布

得られた菌株は多種多様で、様々な色彩を呈していた。とくに表層海水より単離した株の色調はバラエティーに富み、強い太陽光下で生息するために様々な種類の色素を生産している可能性が高い。

試料海水は、採取したポイントならびに深度にわけて培養した。一般生菌数は、ポイントや深度において違いがみられた、特に沖縄においては内湾と外洋で違いがみられた(Fig. 2-8～11)。また、海洋小動物内の一般生菌数は平均的に多い結果となった(Fig. 2-12, 13)。今回得られた有色菌株のリスト(Table 2-5)と、ダイビングポイントとの相関図を示した(Fig. 2-14)。

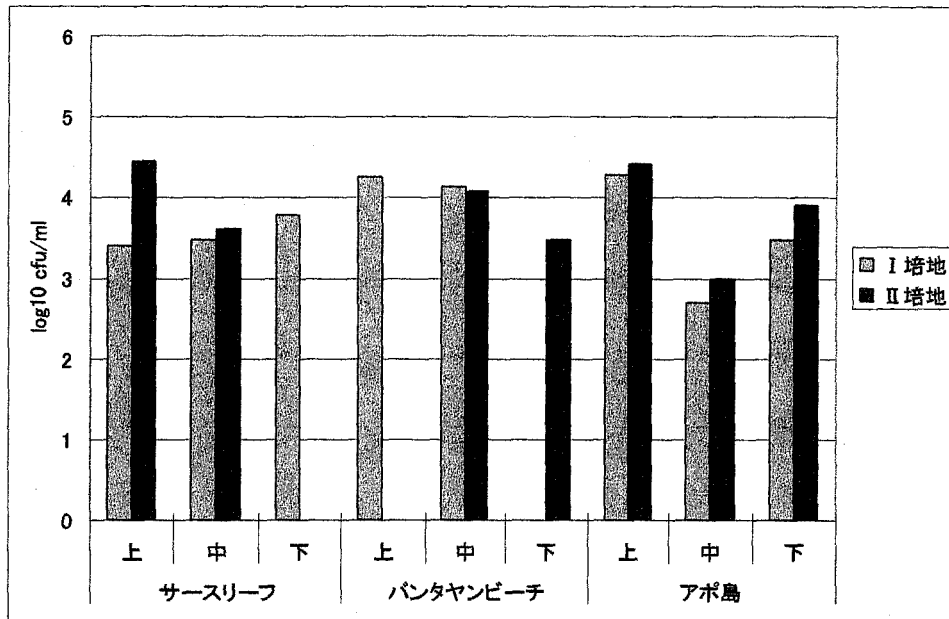


Fig. 2-8 Viable bacterial counts of the Philippines

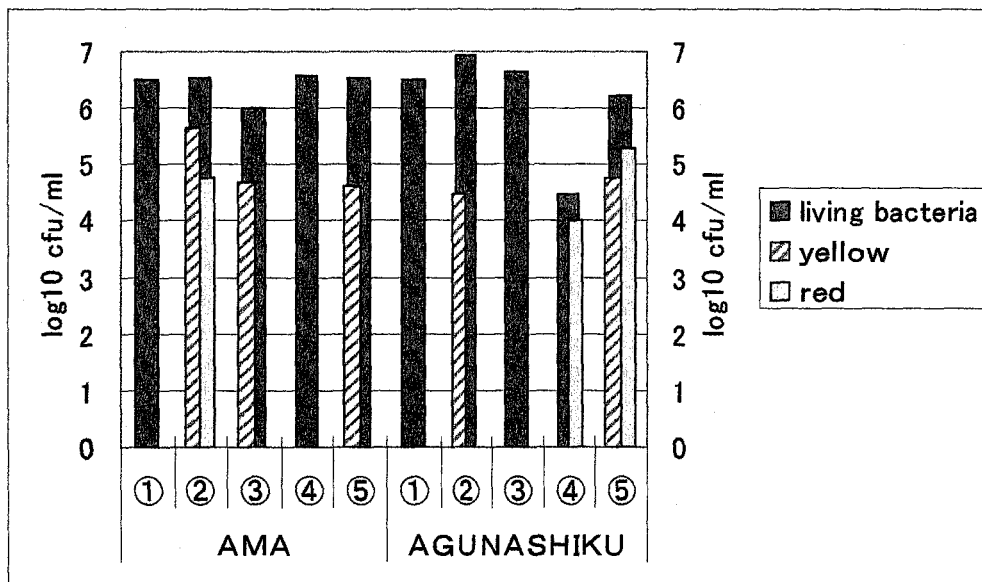


Fig. 2-9 Viable bacterial counts of Kerama (extracts by chemical sponge)

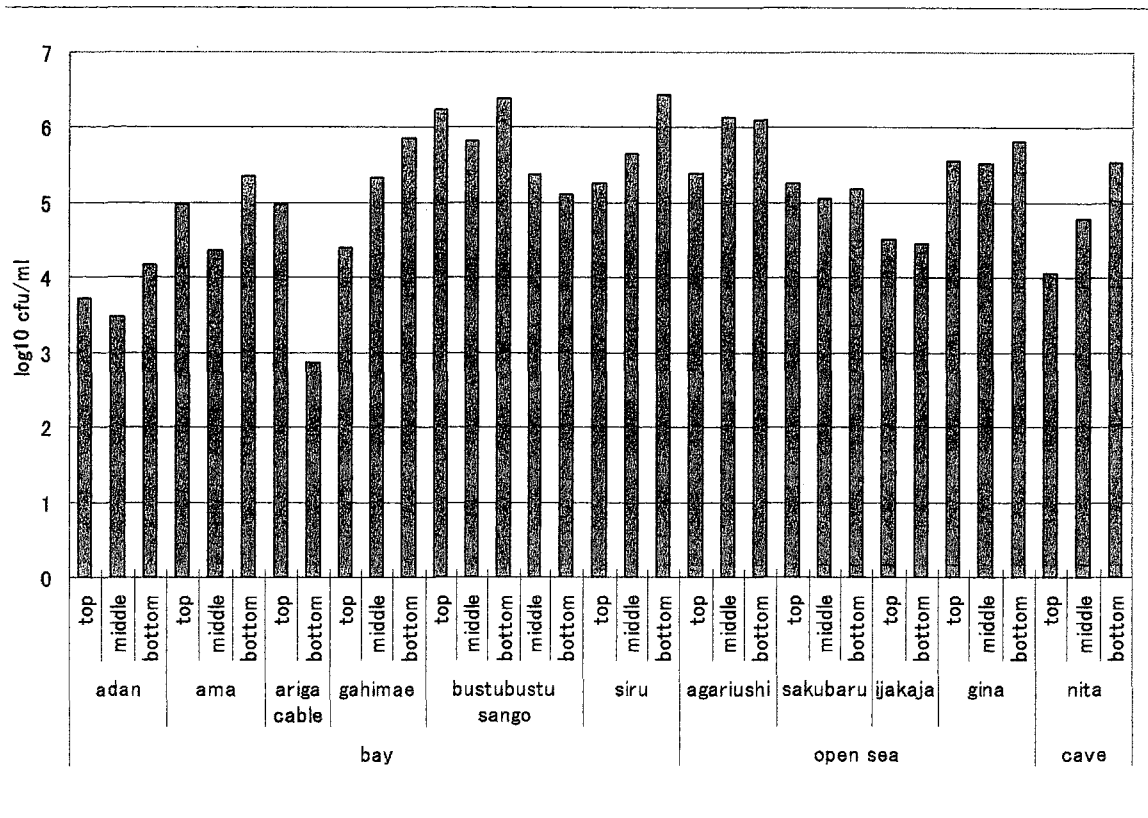


Fig. 2-10 Viable bacterial counts of Kerama

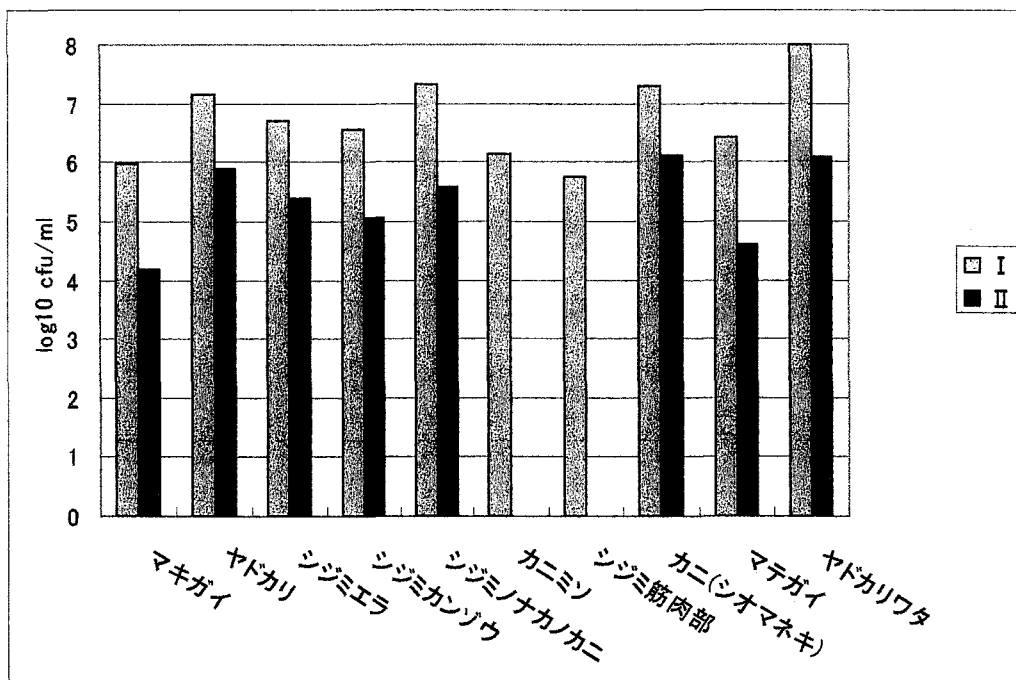


Fig. 2-11 Viable bacterial counts of Kochi

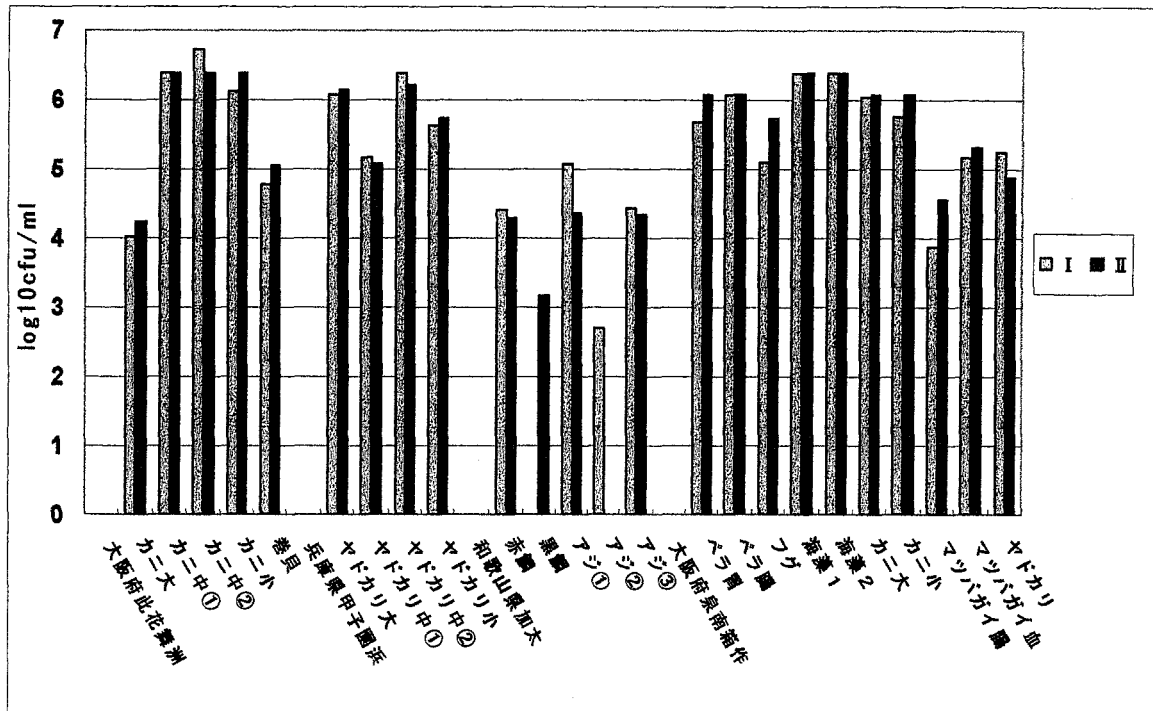


Fig. 2-12 Viable bacterial counts of living things (2005)

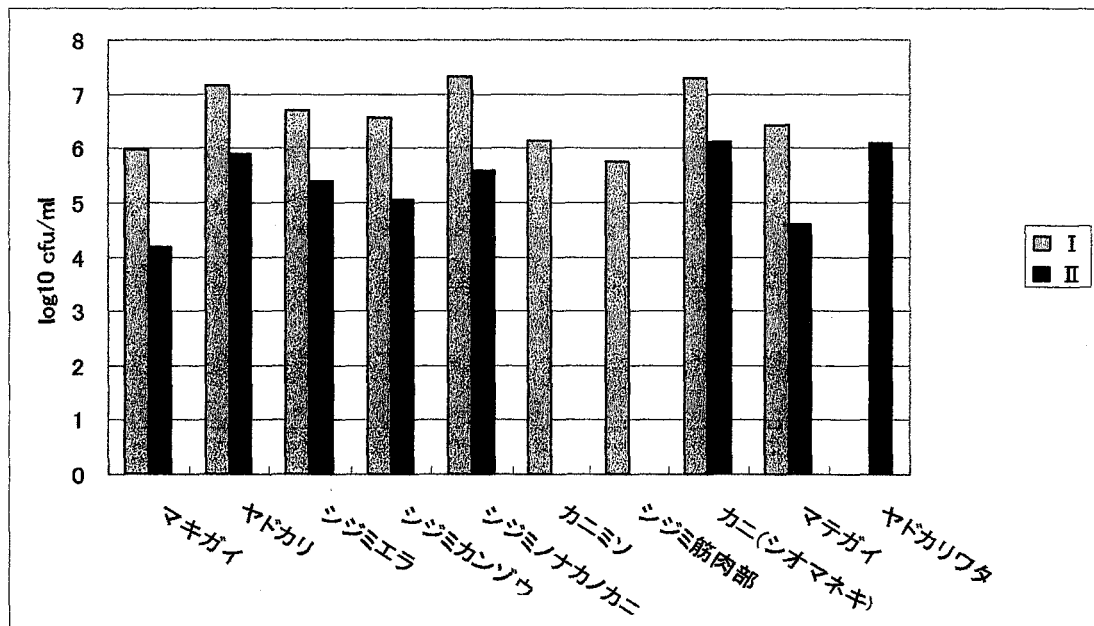


Fig. 2-13 Viable bacterial counts of living things (2007)

Table 2-5 The colored microbes stock collected in 2001~2007

年度	沖縄	フィリピン	高知	生物 (近畿)
2001	31	-	-	-
2002	18	-	-	-
2003	50	-	-	30
2005	20	-	-	42
2006	11	25	-	32
2007	15	14	10	36
計	145	39	10	140

Table 2-6 The colored microbes stock collected in Okinawa

環境	ポイント名	株数	サンゴ被度
内湾	アグナシク裏	1	中
	アザハタの根	4	小
	アダン下	3	中
	阿真ビーチ	5	小
	安室漁礁	17	中
	ブツブツサンゴ	32	大(特定種)
	嘉比前	34	中
	アリガーケーブル	20	中
外海	ギナ	4	小
	古座間味	8	小
	ニタ洞窟	1	小
沖縄本島	残波岬	1	
生物	ウミウシ	5	
	ウミハネウチワ	10	
合計		96	

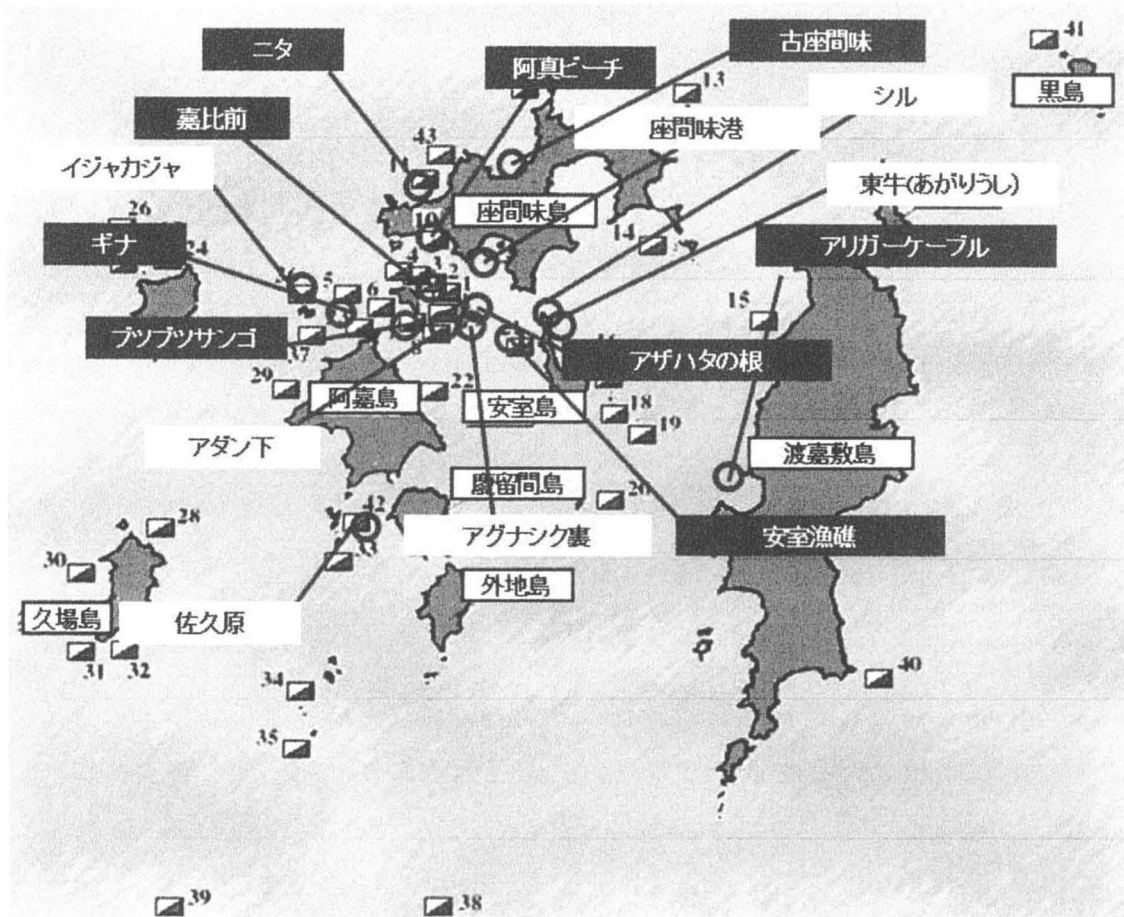


Fig. 2-14 Diving Map for Sea Around Zamami Islands
 Point name(white):Separated strains producing pigments

2-3-1 考察

今回、ケミカルスポンジおよびスピッツを用いてフィリピンアボ島周辺、沖縄県慶良間諸島座間味島周辺、高知県柏島周辺海域において微生物回収用試料である海水などを採集した。本法は幹らが考案した方法で⁵²⁾、幅広い菌株のサンプリングが可能であった。海洋には水深 50m 付近までには 1ml あたり約 $10^4 \sim 10^6$ もの細菌が存在している。スポンジを擬似海綿生物に見立てて微生物を吸着させる方法は、何かに付着する性質を有する微生物に対して格好のトラップ材になるものと考えられる。また本法は、太陽光が海水中にある程度、できれば 20~30m 以上の深度まで届くような透明度の高い海域でより威力を発揮するものと考えられる。

一方、分離時における重要な操作として、希釈があげられる。希釈することにより他の菌の混入が大幅に減少し、また分離操作自体も比較的容易に行うことができる。また、今回は単一培地を用いた継代培養による保存を中心に行なったが、菌株の変化や死滅が認められた。今後は多種多様な保存法を併用する必要があると考えられる。

今回の調査において、フィリピンの試料海水中の生菌数の結果では全体的に数が多い結果となった。これは、フィリピンで海水を採取してから、日本に持ち帰り生菌数測定を実施するまで期間が開いてしまうことが原因と考えられる。沖縄県慶良間諸島の生菌数は、内湾と外海で分布の仕方が若干異なった。内湾では、深度が深くなるにつれ増加する、もしくは中層の深度で菌数が減少しているという傾向が見られた。しかし、外海から採取した海水では、層にかかわらず平均的に菌が存在した。これは潮流により絶えずかき混ぜられる外海と異なり、安定した環境にある内湾との違いが現れたと考えられる。

また、ケミカルスポンジにおいて、スポンジに吸着するタイプの微生物は生菌数としてはおおきな違いは見られなかったものの、中層もしくは下層の部分で有色菌株が得やすいことがわかった。高知の黒潮研究所では、生体のサンゴを採取した。海水に比べ、生菌数が極めて多い結果が得られた、また、有色菌株も海水より多く得ることができた。

上記の有色微生物を単離した結果、334株の有色菌株を得た(Table 2-5)。

全体に採取できた深度は中層域が多かった。採取したダイビングポイントと生菌数および有色菌の関係について検証してみたところ、沖縄慶良間諸島において内湾のような海流が安定し、しかも微弱なポイントから有色の菌株をおおく得ることができた。また、サンゴ被度の違いが菌株数にも影響していることが示唆された。ブツブツサンゴのような特定のサンゴ種(ユビハマエダサンゴ)が多いポイントにおいては、有色菌株が多く採取され、一方、隣り合った場所でサンゴ被度の比較的小さい阿真ビーチでは、有色菌株が少ない結果となった。今回のサンプリングにおいて有色菌株が採取できたダイビングポイントを示した(Fig. 2-9)。海流が速いポイントや流れのないようなポイントでは有色菌株を得ることができなかつた。これは、光量が豊富であることと、潮汐によりある程度菌が海中を移動できることが有色菌株の生育に好影響をおよぼしたものと考えられる。

2-4 まとめ

2001年から2007年にかけて、フィリピン、沖縄、高知県を中心に海水や海洋性小動物を採取しカロテノイド生産菌を得るため有色菌株をスクリーニングした。その結果、総計で334株の有色菌株を得ることができた。

集中的に海水採取を続けていた沖縄では、有色菌株を得られるダイビングポイントには偏りが見られ、その数も異なっていた。内湾のような潮流の穏やかなポイントが適していると考えられる。

第3章 カロテノイド物質の分析

微生物には代謝物質を体外に分泌するものと、物質を菌体内に貯蔵するものが知られている。カロテノイドは菌体内に蓄積される物質で極めて高い抗酸化活性を持っている。活性酸素やラジカルが極めて発生しやすい海洋、特に亜熱帯の表層で生息する微生物が産生するカロテノイドは興味深い研究対象である。

3-1 カロテノイドとキサントフィル

カロテノイドは、発色団として共役二重結合が重複した長鎖状ポリエン構造を有する。(Fig. 3-1) 基本的に8個のイソプレノイド (C_5) 単位からなるテトラテルペノイド (C_{40}) であるが、炭素数の異なるものもある。カロテノイドのうち炭化水素化合物をカロテン、酸素官能基を含むものをキサントフィルと総称する。カロテン類 (carotenes) とキサントフィル類 (xanthophylls) の性質の違いは、水酸基を有するかどうかによる各種溶媒への溶解度の差異が挙げられる。すなわち、水酸基を有するキサントフィル類はメタノール類への親和性が高く、一方、カロテン類は炭化水素類への親和性が高い。また、一般的にカロテノイドは脂溶性であるが、水溶性のものも存在する。一例として、クチナシ (*Gerdenia augusta* MEER. var. *grandiflora* HORT) ならびにサフラン (*Crocus sativus* L.) の主要色素成分である Crocin は、両末端のカルボン酸部分に gentiobiose がエステル結合しているため水溶性である⁵³⁾ (Fig. 3-2)。

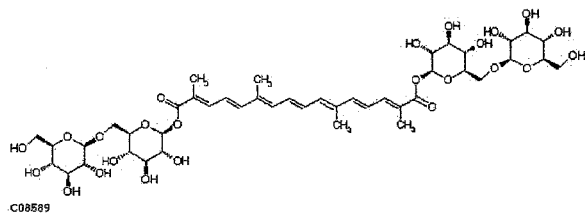
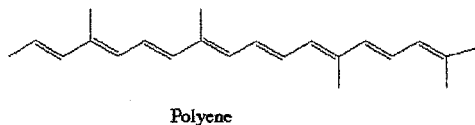


Fig. 3-1 Polyene

Fig. 3-2 Crocin

カロテノイドの生合成経路は、メバロン酸経路もしくは非メバロン酸経路（1-デオキシキシルロース経路）（Fig. 3-3, 3-4）を経てイソペンテニルピロリン酸（IPP、 C_5 ）となり→異性化してジメチルアリルピロリン酸（DMAPP、 C_5 ）となる。多量化してゲラニルピロリン酸（GPP、 C_{10} ）、ファルネシルピロリン酸（FPP、 C_{15} ）、ゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP、 C_{20} ）となりさらに二量化し、脱ピロリン酸化してフィトエン（無色カロテノイド、 C_{40} ）となる。脱水素化してフィトフルエン（ C_{40} ）から β -カロテン（ C_{40} ）を経てニューロスポレン（ C_{40} ）、リコピン（ C_{40} ）となり、様々な官能基がついて各カロテン類となり、さらにそれらが酸化してキサントフィル類となる。また、動物は体内で GGPP を作る事ができないので、ビタミン類と同様にカロテノイドを体外から摂取する必要がある。現在確認されているカロテノイドのうち約 10% はプロビタミン A であり、動物に摂取されると体内でビタミン A となる⁵⁴⁾。（Fig. 3-5）

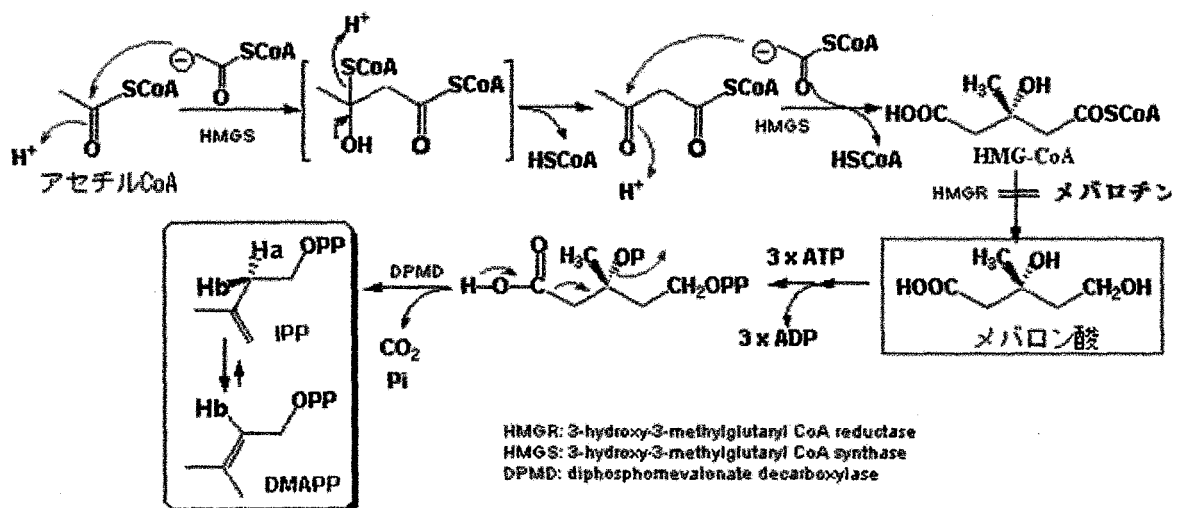


Fig. 3-3 Mevalonate pathway

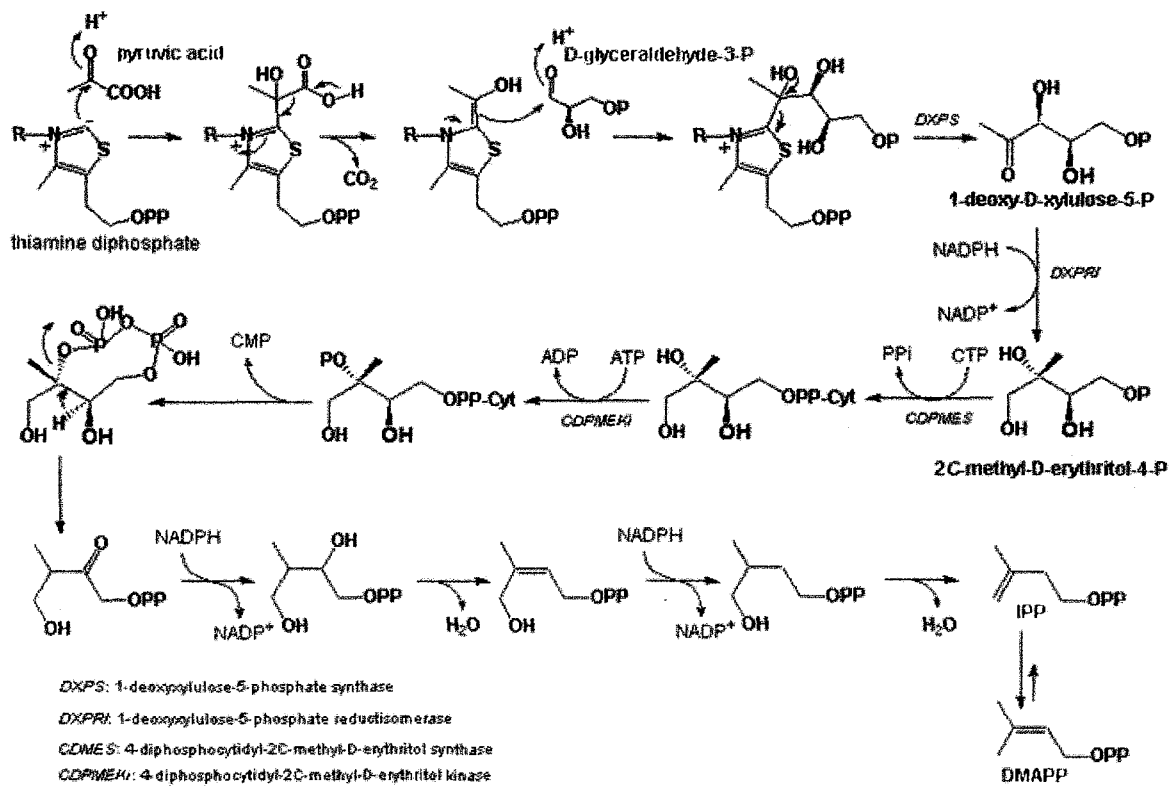


Fig. 3-4 non-Mevalonate pathway

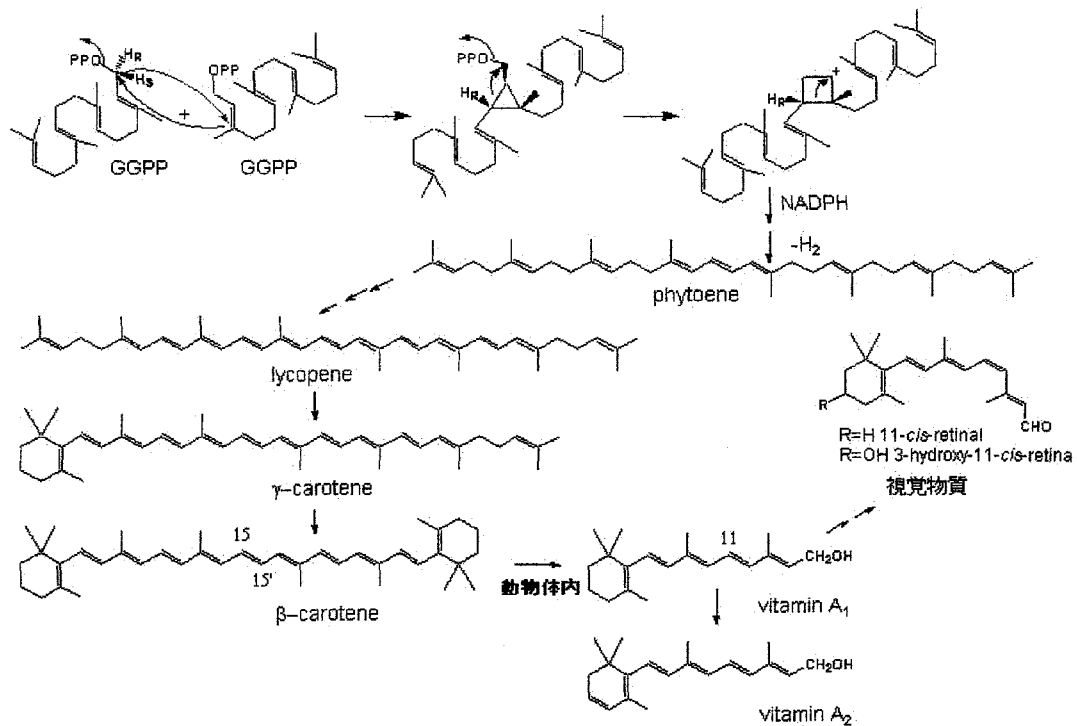


Fig. 3-5 Carotenoid biosynthetic pathways

3-2 カロテノイド物質の分析

3-2-1 カロテノイドの抽出法

- 1) 分離菌株は Table 3-1 に示した培地を使用し 2 日間前培養した後、Table 3-1 に示す液体培地 (100/500ml 振盪培養フラスコ) を用いて、培養 (25°C、5days) 後、遠心分離 (6000rpm、10min) を行って菌体を得た。
- 2) 集めた菌体に Acetone : MeOH (1:1) 混合溶液を加え、ガラスビーズ (直径 1mm、0.5mm) を少量入れ細胞破碎機により攪拌物理破碎する方法を行い、色素を抽出した。
- 3) 遠心分離 (6000rpm、10min) 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、抽出液の色が無くなるまで抽出操作を繰り返した。
- 4) 集めた上清は減圧乾固し、油状残留物をヘキサンに転溶した後 -80°C で保存した。

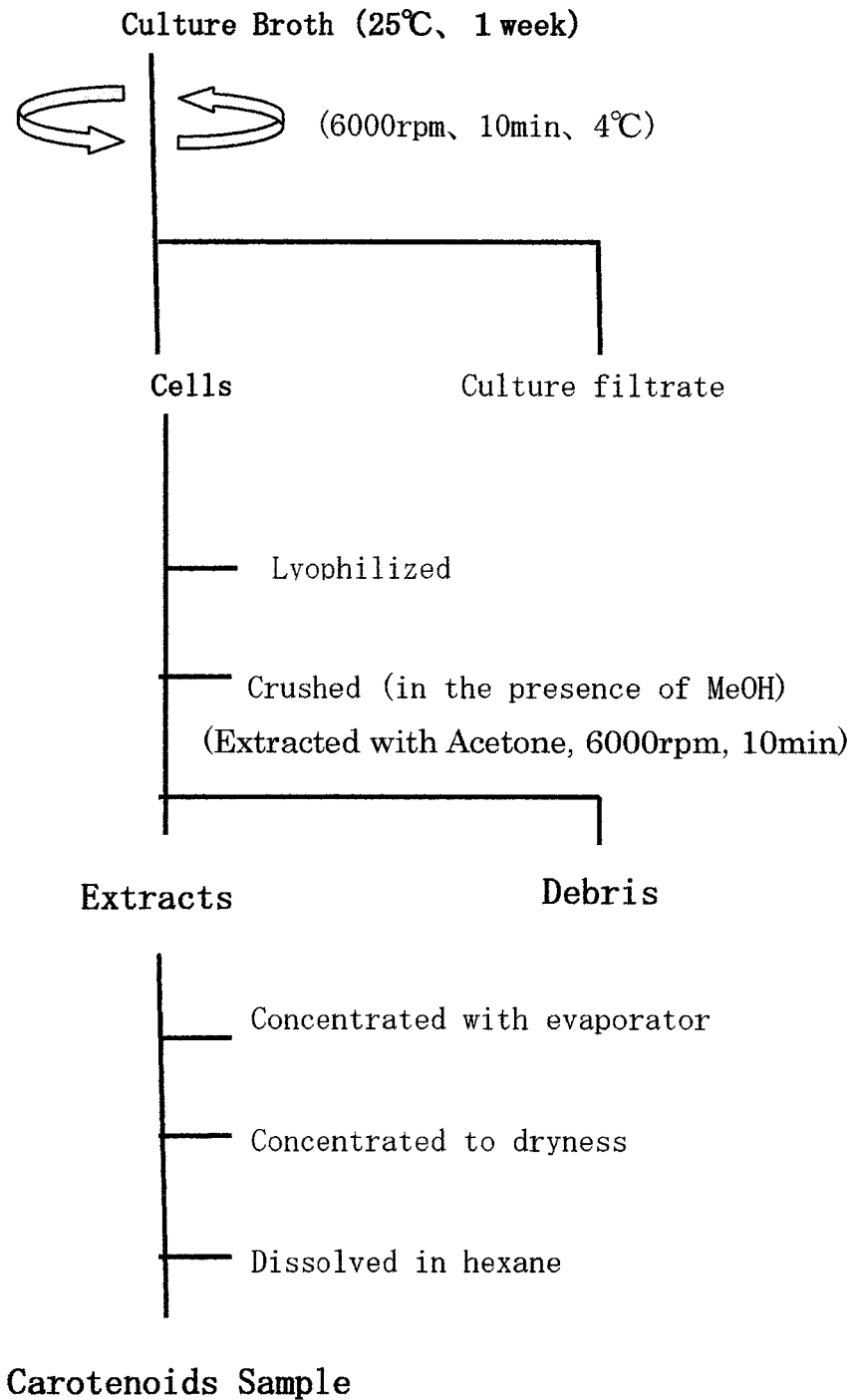


Fig. 3-6 Extract procedure of Carotenoids from carotenoids extract

Table 3-1 Composition of Artificial sea water medium

Peotone	5.0g
Yeast ex.	1.0g
Glucose	2.0g
MARINE ART SF-1	36.0g
Distilled Water	1000ml
pH	7.0

After sterilization at 121°C for 15min this medium was used in this experiment.

3-2-2 カロテノイドの定量

得られたカロテノイドサンプルは、有機溶媒に溶解し、吸光度を測定、McBethの式⁵⁵⁾に従って定量した。

Carotenoid contents(mg)	O.D × Vol × 10 ³	
100g tissue	E $\frac{1\%}{1\text{cm}}$	× 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⁵⁶⁾。

β -carotene (2 3 3 7 Benzene、 2 5 9 2 Light petroleum)
 γ -carotene (3 1 0 0 Light petroleum)
tolulene (3 2 4 0 Light petroleum)
neurosporaxanthin (2 2 1 0 Benzene、 1 7 1 5 Light petroleum)
astaxanthin (2 1 8 0 Benzene)

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

3-2-4 カロテノイド組成の検討

カロテノイドサンプルに含まれるカロテノイドの組成を検討するため、まず 30%アセトン含有ヘキサンを展開溶媒とし、Merck 社製シリカゲル 60 を担体とする薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離した。標準標品はシグマ社製アスタキサンチンと β -カロテンおよび研究室保存株 T-1 株由来のカロテノイド試料を使用した。

クロマトグラフのスポットを観察し、アスタキサンチン様カロテノイドや、カロテノイド配糖体物質および新規カロテノイドを産生していると推定される菌株を選択した。

3-2-4 結果

カロテノイド生産菌の選抜

使用した 334 株中、沖縄の海水からは 84 株、フィリピンの海水からは 24 株、生物からは 65 株と全体で 173 株のカロテノイド生産菌を得ることができた (Fig. 3-6)。

なお、上記以外の培養後に色素の生産を確認できない株もしくは微量で分析が不可能な株は除外した。

カロテノイド生産菌の選択

全 173 株とデータ量が多いため、沖縄で採取された株の一部についてカロテノイド含有量などの結果を以下に示す。

今回得られたカロテノイド生産菌を年度ごとにまとめた結果を Table 3-2 に示す。各菌株のカロテノイド含有量のグラフを Fig. 3-7 に、薄層クロマトグラフィの結果を Fig. 3-8 に、また PDA の分析による可視吸光スペクトルの λ_{\max} の値を Table 3-2 に示した。

Table 3-2 Number of carotenoid producing microorganisms by year

年度	沖縄	フィリピン	高知	生物 (近畿)
2001	17	-	-	-
2002	9	-	-	-
2003	36	-	-	16
2005	14	-	-	36
2006	4	19	-	11
2007	4	5	0	2
計	84	24	0	65

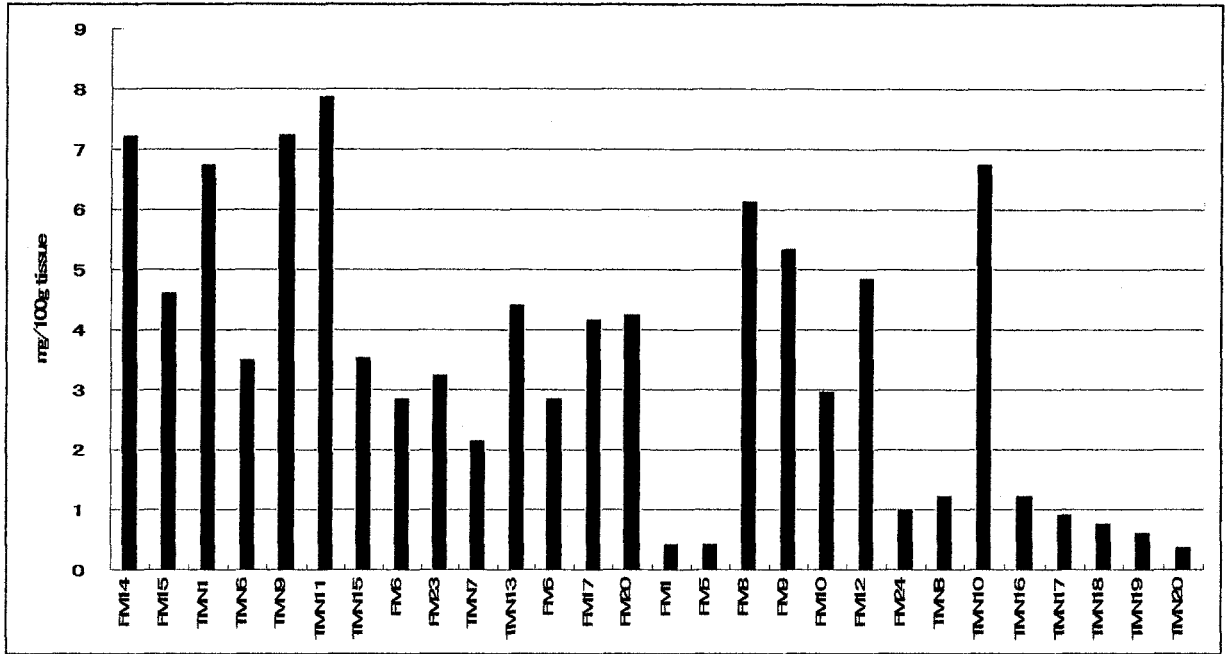


Fig. 3-7 Carotenoids content of the new search microbe stocks in Okinawa

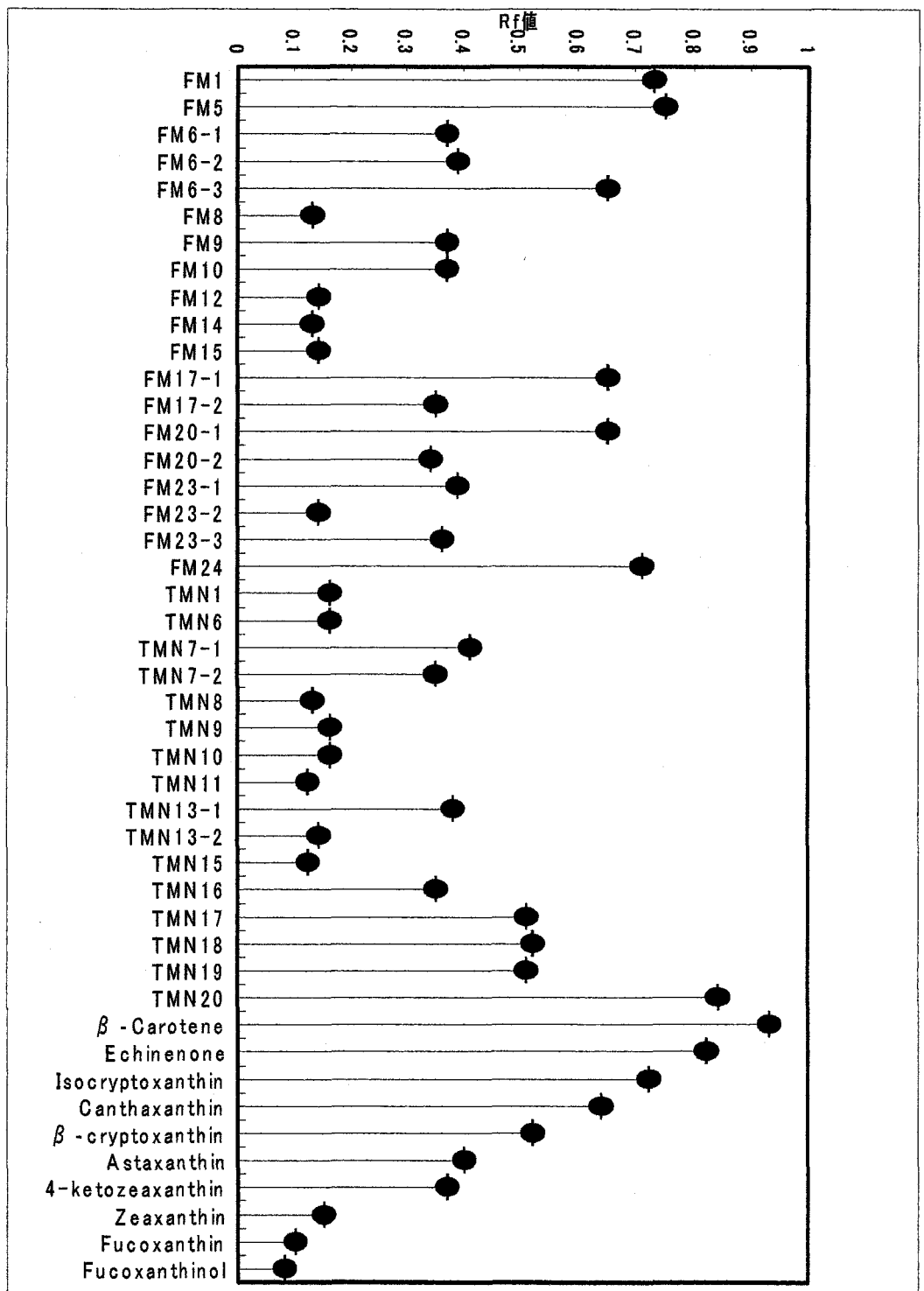


Fig. 3-8 TLC for carotenoids of microbe stocks in Okinawa
Solvent: acetone/hexane (30:70)

Table 3-3 Absorption maxima (λ max) of carotenoids producing microbes

stocks in Okinawa

Sample	Band Pattern	λ max (nm)			Retentions
					Time (min)
FM1	ダブルバンド	450	477		10.65
FM5	ダブルバンド	450	477		10.02
FM6-1	シングルバンド	471			15.73
FM6-2	シングルバンド	464			19.00
FM6-3	シングルバンド	463			25.00
FM8	ダブルバンド	449	476		20.00
FM9	シングルバンド	465			19.00
FM10	シングルバンド	464			19.00
FM12	ダブルバンド	449	477		18.33
FM14-1	ダブルバンド	449	477		18.33
FM14-2	トリプルバンド	420	443	471	17.03
FM15-1	トリプルバンド	422	444	471	17.00
FM15-2	ダブルバンド	450	477		18.76
FM17-1	シングルバンド	467			23.80
FM17-2	ダブルバンド	481	504		32.15
FM20-1	シングルバンド	467			23.80
FM20-2	ダブルバンド	481	504		32.15
FM23-1	シングルバンド	471			14.44
FM23-2	ダブルバンド	450	477		18.43
FM23-3	シングルバンド	465			19.41
FM24	ダブルバンド	451	477		10.11
TMN1	ダブルバンド	451	477		18.97
TMN6-1	トリプルバンド	420	443	472	17.02

TMN6-2	ダブルバンド	449	476		18.54
TMN7-1	シングルバンド	471			13.57
TMN7-2	シングルバンド	462			16.96
TMN8	ダブルバンド	450	477		22.44
TMN9	ダブルバンド	450	477		18.76
TMN10	ダブルバンド	449	476		18.60
TMN11-1	トリプルバンド	420	443	472	16.59
TMN11-2	ダブルバンド	450	477		18.54
TMN13-1	シングルバンド	471			15.72
TMN13-2	ダブルバンド	449	477		18.54
TMN15-1	トリプルバンド	420	442	473	16.82
TMN15-2	ダブルバンド	449	477		18.55
TMN16	ダブルバンド	450	476		22.20
TMN17・18・19-1	トリプルバンド	416	440	469	15.00
TMN17・18・19-2	トリプルバンド	416	440	469	27.00
TMN17・18・19-3	トリプルバンド	416	440	469	34.95
TMN20	シングルバンド	458			30.20

3-2-5 考察

有色菌株約 334 株中、カロテノイドの抽出が行えたものは 173 株であった。菌体に色が残り、今回の抽出法では抽出できなかった菌株に関しては抽出の溶媒に工夫を加えるなどさらなる改善が必要だと推定される。そこで、3-4 では抽出に関し温度条件や破碎回数などについて、統計手法の一つである実験計画法を用いて検証を行なった。

今回、標準標品として astaxanthin、 β -carotene、neurosporaxanthin、neurosporaxanthin β -D- glucopyranoside を用い比較した結果、分離株には赤色のケトカロテノイドおよび黄色の β -カロテンに類似した Rf 値を示す色素生産株が数多く認められた (Table 3-4)。

Table 3-4 Main producing carotenoid of microorganisms

Carotenoid	Strain	
Zeaxanthin	FM8, FM12, FM14, FM15, FM23, TMN1, TMN6, TMN8, TMN9, TMN10, TMN11, TMN13, TMN15, TMN16	13
Astaxanthin	FM6, FM23, TMN7, TMN13	4
4-Ketozeaxanthin	FM6, FM9, FM10, FM23, TMN7	5
Canthaxanthin	FM6, FM17, FM20	3
Isocryptoxanthin	FM1, FM5, FM24	3
Isozeaxanthin	TMN8, TMN16	2

3-3 カロテノイド抽出における物理的条件の比較

3-3-1 目的

集菌細胞からのカロテノイド抽出の効率化を目的として、物理的条件である温度や破砕機にかける回数などについて実験計画法を用いて検証する。

3-3-2 実験材料

供試菌株として *Rhodosporidium toruloides* IFO 11012 (No. 21) を用いた。

供試菌株 *Rhodosporidium toruloides* IFO 11012 (No. 21)

使用した供試菌株は、低 pH で乳酸を単一炭素源として生育可能な微生物を分離することを目的として、1985 年 5 月から 10 月に採取した近畿圏内の砂、土、腐敗土などの一般土壌を対象酵母の分離源として当研究室で分離された酵母である。当初 *Rhodotorula glutinis* と同定されたが、2001 年に財団法人発酵研究所に再同定を委託した結果、*Rhodosporidium toruloides* と判明した。

当研究室で乳酸資化性酵母として分離された *R. toruloides* No. 21 は、窒素源の違いによっては生産カロテノイドの含有比率が異なる。窒素源を減らすほど最終カロテノイド生産物である β -Carotene および Torularhodin 量が増加した。このことより、窒素源を極端に減らした培地で培養すると大量の脂質粒を生じ、時には乾燥菌体量の 50% に達するという報告から、カロテノイドは脂肪組織に蓄積されるものと考えられた⁵⁷⁾。

以下に *R. toruloides* No. 21 のカロテノイド生合成経路を示す (fig. 3-9)。この生合成経路において特徴的な部分は、 γ -Carotene から枝分かれする箇所である。 γ -Carotene の一方の末端は環化せずに共役二重結合が増えて Torulene になり、さらに Torulene の末端のメチル基がカルボキシル基に置換されて Torularhodin になる。

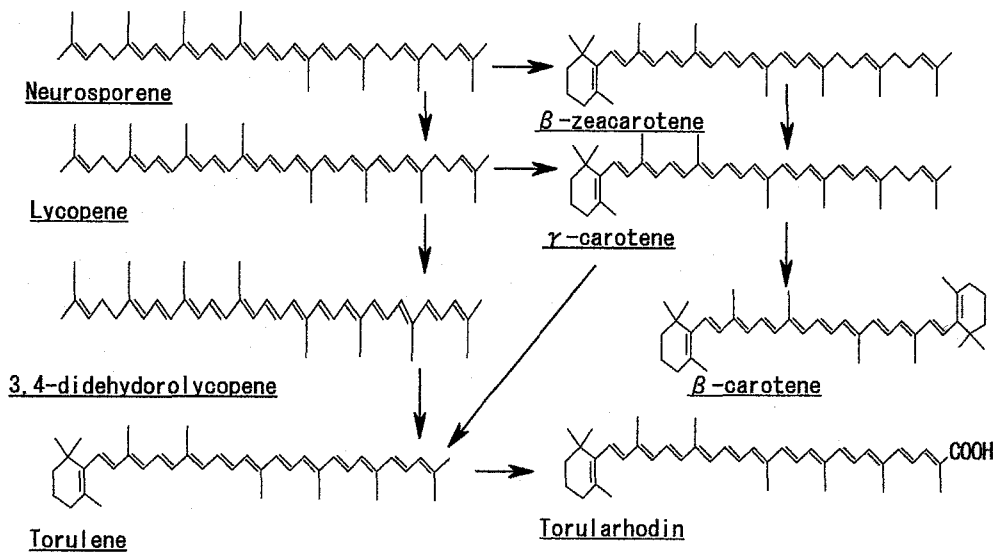


Fig. 3-9 Carotenoid biosynthetic pathways of *R. toruloides* No. 21

3-3-3 実験条件

因子を加温温度 (A)、加温時間 (B)、細胞破碎機による破碎の回数 (C) および菌体の凍結解凍の繰り返しの有無 (D) と設定し実験を行なった。

以下に各因子ならびに水準を示した。(Table 3-5)

Table 3-5 Experiment condition

因子	水準
A 加温温度	4 常温 30 度 50 度 70 度
B 加温時間	2 30 分 60 分
C 細胞破碎の時間	2 3 分×1 3 分×2
D 凍結と解凍の繰り返し	2 あり なし

3-3-4 実験方法

- 1) フラスコ (培地量/フラスコの容積: 100ml/500ml) を用いて、25℃、100rpm、5 日間培養した後に、菌体を回収した。
- 2) 集めた菌体を 25ml のコニカルチューブ 16 本に同量ずつ分けた。
- 3) 一晚凍結処理を行なった。
- 4) 因子Dの凍結解凍の繰り返しありのみ取り出し常温で解凍、解凍後再び凍結処理した。
- 5) 以下L16直交配列表に従い、カロテノイドの抽出を行なった。
- 6) 抽出したカロテノイドは吸光度計を用い 470nm の吸光度を測定し、Mcbeth の式よりカロテノイド量を測定した。
- 7) 得られた結果を分散分析した。

今回用いたL16直交配列表を以下に示した(Table 3-6)。

割付	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	date
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	0.2432
2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0.152
3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	0.0836
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0.3106
5	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	0.1188
6	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	0.1748
7	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	0.094
8	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	2	2	0.22
9	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0.048
10	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	0.188
11	2	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	0.1572
12	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0.1552
13	2	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	0.1128
14	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	0.3272
15	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2	0.1568
16	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1	0.2312

Table 3-6 Design by L16 ORTHOGONAL DESIGN

結果として、以下の分散分析表を得ることが出来た(Table 3-7)。

Table 3-7 Analysis of variance table

		平方和 (S)	自由度 (ϕ)	平均平方 (V)	F0	
加温温度	A	0.01393	3	0.00464	3.20229	
破碎回数	C	0.03465	1	0.03465	23.89781	**
凍結解凍	D	0.02807	1	0.02807	19.36069	**
誤差	e	0.01450	10	0.00145		
計		0.09115	15			

破碎の回数と凍結解凍の繰り返しの効果が有意となった。また、凍結解凍の繰り返しも有意となっている。温度に関しては、若干の効果は見られたが、有意とはならなかった。

各要因における効果について、結果を以下に示した。(Fig. 3-10, 11)

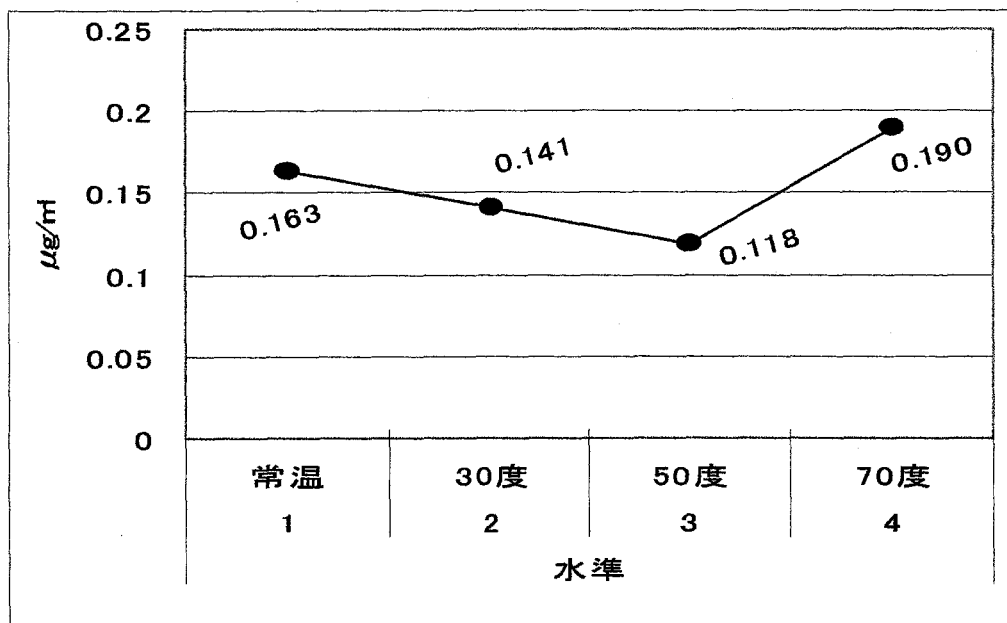


Fig. 3-10 Influence of warming exerted on carotenoid content

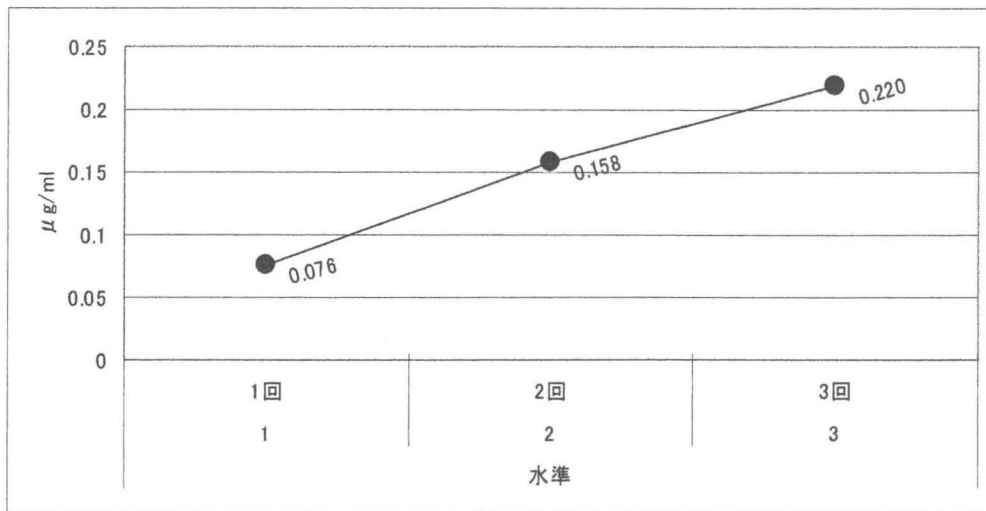


Fig. 3-11 Influence of times of cell crushing exerted on carotenoid content

3-3-5 考察

各要因を合わせ、まとめた結果を以下に示した (Fig. 3-12)。

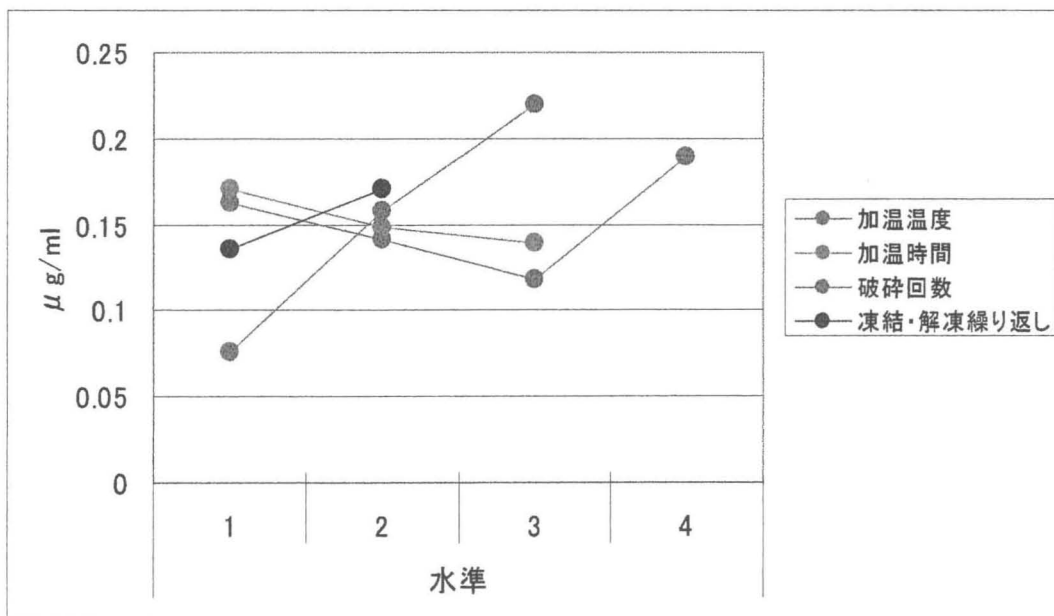


Fig. 3-12 A comprehensive result

因子Aの温度では、大きな違いが見られなかったものの、高温の70度での処理で効果があると思われることから、効果的な組み合わせを検証する必要がある。

因子Dの凍結解凍の繰り返しの効果だが、凍結解凍の繰り返しを行なわない方がより効果的な結果となった。これまでの研究では、凍結解凍は繰り返したほうが、細胞内の水分が凍ることで膨張し細胞膜を傷つけることで、破碎の際抽出が容易になると考えられていた。しかし、加温処理を行なう場合、凍結解凍の繰り返しでカロテノイドが溶出しやすい状態での加温がカロテノイドを壊してしまい抽出効率を下げる結果に繋がったと考えられる。

また、因子Bの加温処理の時間も長時間になるほど抽出効率は低下する。これは、長時間の処理は細胞内タンパクの変性を引き起こし菌体がペースト状に固めてしまったことによるものと考えられる。

今回の検証で、加温温度は70度、加温時間は10分、凍結解凍の繰り返しは行わず、破碎機で3回の処理を行なうことが最も効果的な抽出方法であると考えられた。

3-4 まとめ

2章において、カロテノイドを生産していると思われる有色菌株を沖縄やフィリピンの海水や近畿圏の海洋性小動物から334株得ることができた。そこで、個々の菌株を純粋培養し、得られた色素を λ -max、TLC、PDAを用いて分析を行った。

その結果、沖縄の海水からは84株、フィリピンの海水からは24株、生物からは65株と全体で173株のカロテノイド生産菌を得ることができた。得られたカロテノイドを分析したところ、ZeaxanthinやAstaxanthin生産株が多い結果となった。

また、今回カロテノイドの抽出の際、菌体に色素が残ってしまい、完全に抽出が行えない株が一部に見られ、抽出工程に改善の必要性が考えられた。そこで、温度や破碎回数などの条件を統計学的手法のひとつである実験計画法を用いて検証を行った。

その結果、加温温度は70度、加温時間は10分、凍結解凍の繰り返しは行わず、破碎機で3回の処理を行なうことが最も効果的な抽出方法であると考えられた。

第4章 培養特性

4-1 物理的環境条件 -音波の影響-

現在まで、当研究室ではカロテノイド生産菌の培養特性（温度、溶存酸素量、炭素量および光照射など）について研究が行なわれ、成果を得ている。なお、これまでの研究から、培養時のストレス因子がカロテノイド生産能に影響することがわかってきた。

そして特にストレス因子と思われる条件の中でも、とくに物理的な条件に着目した。当研究室では、光の照射や、溶存酸素量、超音波の照射などについて、カロテノイドの生産に与える影響を検討してきた。

超音波とは、周波数が20kHz以上の音波で、水中通信装置（ソナー）、魚群探知機、超音波診断装置、超音波洗浄器など様々な分野で利用されている。また、微生物の分野において、超音波はストレスとして働き、殺菌効果が確認されている。超音波は、光や電波に比べ伝搬速度が著しく遅く、物質や温度、圧力によって変化するという性質をもつ。超音波の菌液に与える最も大きな影響は、空洞化と考えられる。液体に疎密波である超音波を照射すると、キャビテーションバブルと呼ばれる気泡が生成する。また、その気泡が圧縮崩壊を繰り返し崩壊する瞬間、局所的に数千度、数百気圧という、きわめて高温高压の反応場が出来る。

その結果、水中では水分子の熱分解反応がおこり、OHラジカルとHラジカルが生成する。OHラジカルはきわめて高い反応性をもつラジカルであり、求電子性をもつ強力な酸化剤である。OHラジカルの反応としては、このような電子移動反応のほか、二重結合や芳香核への付加反応など拡散律速に近い速度での反応や、C-H結合からの水素引き抜き反応などがある。ここで、この気泡の作用は、物理的作用と化学的作用に分類できる。キャビテーション現象における化学的作用は、三領域で起る（Fig. 4-1）。

第一領域は気泡の内部である。ここでは、瞬間的に数千度、数百気圧の状態となる為、内部気相中で熱分解反応がおこる。そのため、揮発性の高い物質は気泡内部に入り込み、気泡の崩壊時におこる燃焼によって分解される。水を溶媒とした時は、OHラジカルや水素原子などの活性ラジカルが生成する。

第二領域は気泡と溶媒の間の界面である。気泡内の高温高压の状態は、気泡中心か

ら、界面、溶媒液へと離れるにしたがって低くなっていく。しかし、気泡界面では温度勾配があるものの、その平均温度は約 1900K と高く、超臨界状態であるとも考えられており、この領域でも、主に熱分解反応がおこる。また、気泡内部から抜け出してきた活性ラジカルとのラジカル反応も進行する。

第三領域は、溶媒液中である。気泡内で生成し再結合せず、さらに界面領域で捕捉されずに気泡界面から抜け出してきた活性ラジカルとの反応が進む。次に、キャビテーション現象における物理的作用としては、気泡が固体表面で圧壊する際に、衝撃波により微視的な流動が生じ、局所的に高圧な状態が生ずることがあげられる⁵⁸⁾。これらと強い衝撃波が連動して細胞壁へのダメージと細胞膜浸透性の可逆変化を引き起こし、基質物質と分泌物輸送が促進される。また、細胞膜破壊をおこす静水圧を細胞膜上で発生させ、物質輸送を促進する。これにより、菌体量、色素収量が増えるという報告もある⁵⁹⁾。

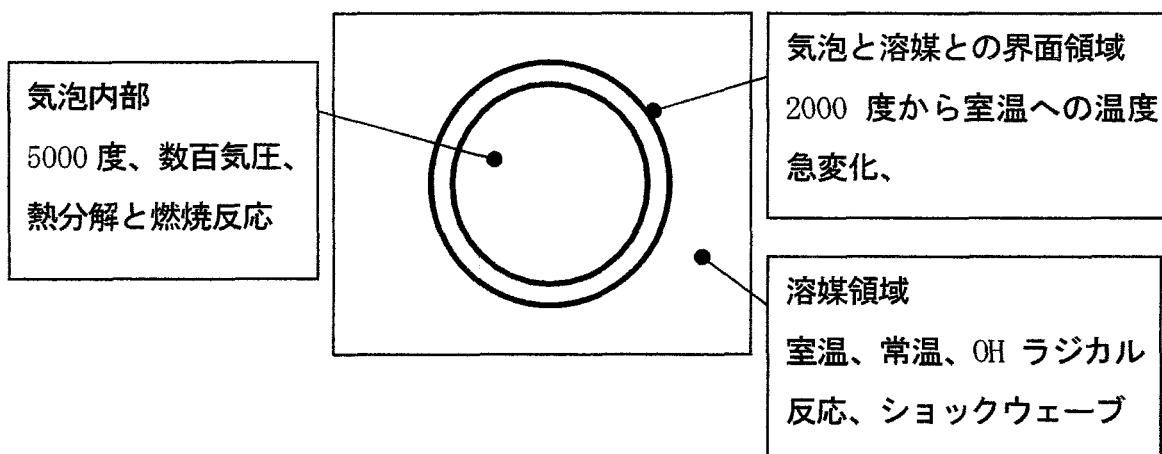


Fig. 4-1 Three ranges in an ultrasonic reaction

4-1-1 供試菌株

供試菌株として、以下の三株を使用した。

1) *Rhodospiridium toruloides* IF011012 (No. 21)

3-3 で使用したものと同様の株である。

2) *Paracoccus* sp.

Paracoccus はアスタキサントンを生産する微細藻類である。リコペン・シクラーゼ (CrtY) がリコペンをβ-カロテンにする。その後、水酸化酵素 (CrtZ)、β-カロテンケト化酵素 (CrtW) が働き、最終的にはアスタキサントンにする。そのとき、CrtZ と CrtW が働く順番は決まっておらず、可能性のある大部分の中間体が見つまっている。すなわち、CrtZ はβ末端基だけでなく4-ケト-β末端基も、CrtW はβ末端基だけでなく3-ヒドロキシ-β末端基も基質にできる。*Paracoccus* sp. のカロテノイド生合成経路を Fig. 4-2 に示す⁶⁰⁾。

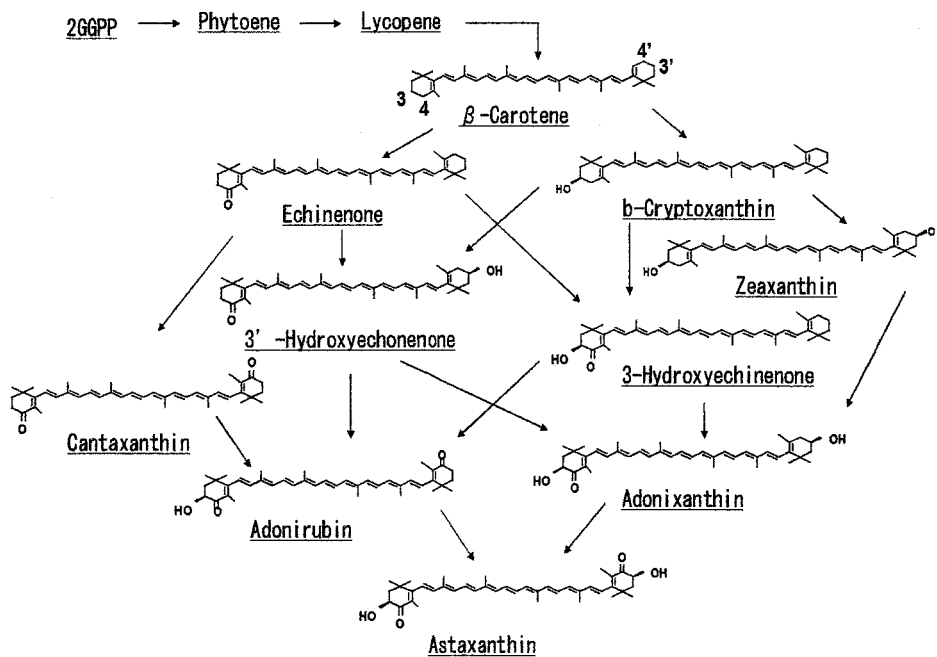


Fig. 4-2 Carotenoid biosynthetic pathway of *Paracoccus* sp.

3) *Erythrobacter* sp.

偏性好気性菌 *Erythrobacter* は乾燥菌体 1mg 当たり 0.1-0.5 μ g 近くのバクテリオクロロフィルをつくる。この値は嫌氣的に培養した紅色細菌の生産量に匹敵する。*Erythrobacter* による色素の合成には O_2 が必要で、増殖の条件を微好気性とする、バクテリオクロロフィルの合成は極度に抑制され、カロテノイドの合成もかなり抑制される。光合成に関与するカロテノイドはスピリロキサニン経路により合成され色素タンパク質複合体に結合していて、一方多量に含まれるカロテノイド酸などは、光合成に関与せずに抗酸化作用をもつと考えられる⁶¹⁾。*Erythrobacter* sp. のカロテノイド 生合成経路を Fig. 4-3 に示す⁶²⁾。

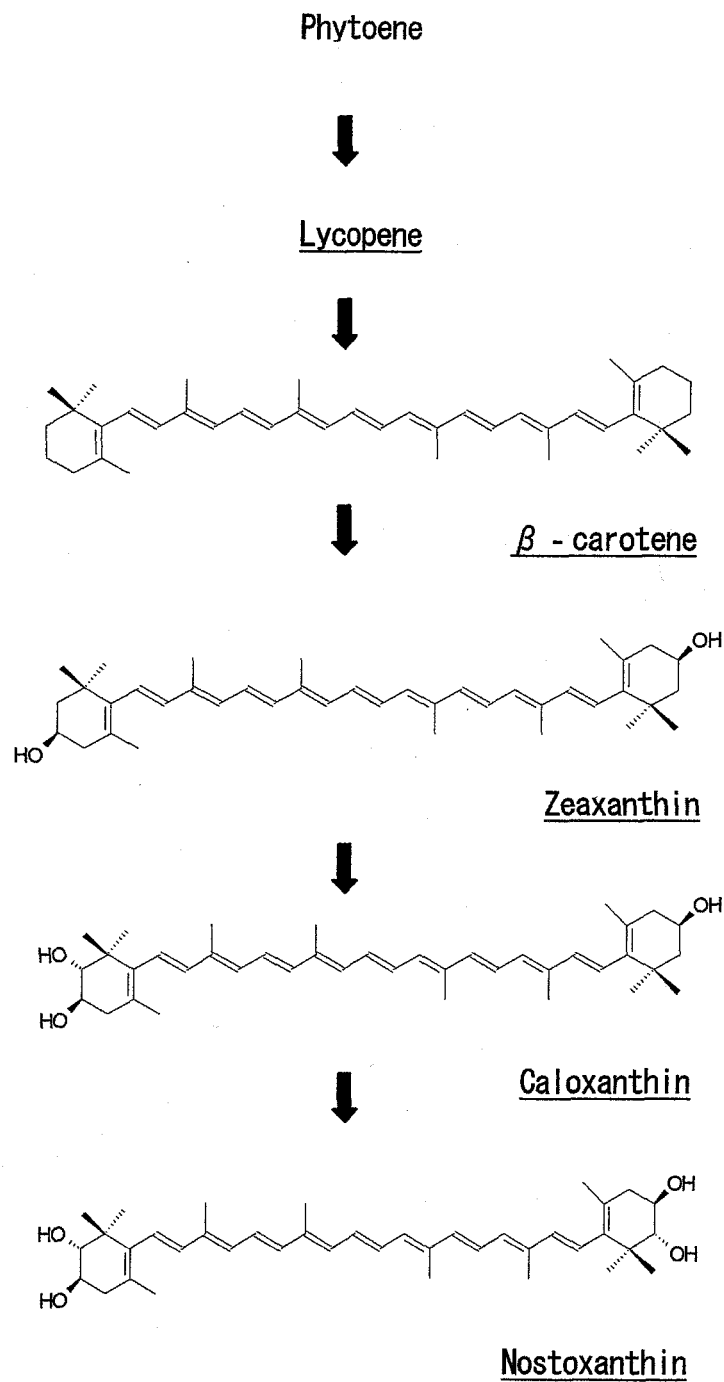


Fig. 4-3 Carotenoid biosynthetic pathway of *Erythrobacter* sp.

4-1-2 実験装置作成

超音波発生装置は部品類を集め、研究室で組み立て作製した。以下に配線図を示す。

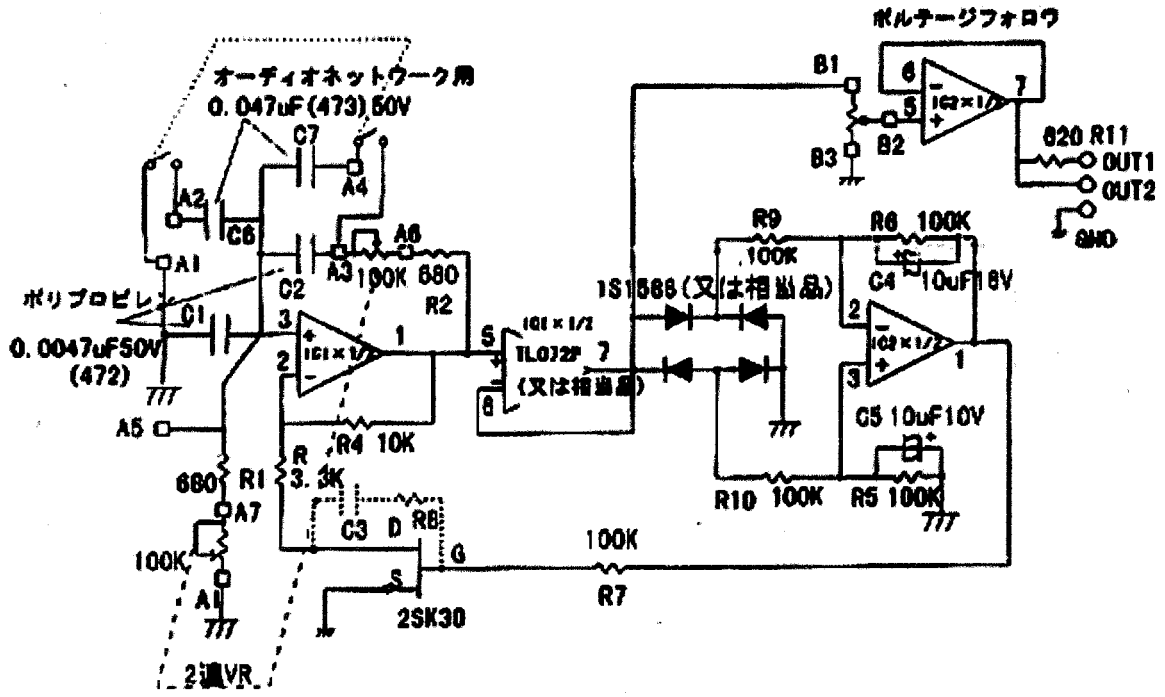


Fig. 4-4 Wiring diagram of sine wave oscillator

発振周波数範囲が 10Hz-20kHz であるソフトウェア、Realtime Analyzer (吉正電子株式会社) のシグナルジェネレータ (Fig. 4-5) を使い、パソコンとツイーター (SANYO、Φ5cm、6Ω、80W) をつなぎ、超音波 (20kHz) の出力を行なった。

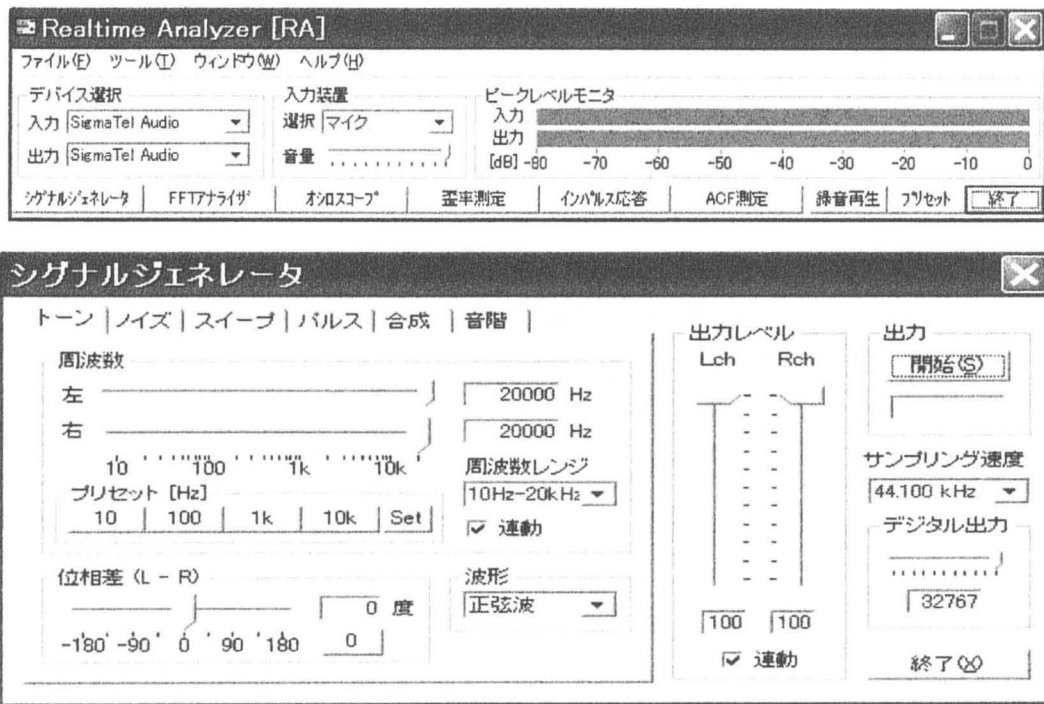


Fig. 4-5 Realtime analyzer and Signal generator

4-1-2 培養方法、超音波照射及び色素抽出

1) TL 株は GP 培地 (Table 4-1) を用いて、FM6 株各々を、細菌用培地 I (Table 4-2) を用い、前培養 (100rpm、25°C、2days) 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に 1 ウェル 5ml の培養液中へ 50 μ l の割合で植菌し、本培養を行なった。

Table 4-1 Composition of GP medium

Peotone	1.0g
Yeast ex.	0.25g
Glucose	20.0g
$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	0.05g
$(NH_4)_2SO_4$	1.0g
K_2HPO_4	1.0g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g
Distilled Water	1000ml
pH	7.0

After sterilization at 121°C for 15min this medium was used in this experiment.

Table 4-2 Composition of Artificial sea water medium

Peotone	5.0g
Yeast ex.	1.0g
Glucose	2.0g
MARINE ART SF-1	36.0g
Distilled Water	1000ml
pH	7.0

After sterilization at 121°C for 15min this medium was used in this experiment.

- 2) 本培養中(90rpm、25°C、5days)に 6 ウェルマイクロプレートとツイーターの距離を 1mm として、超音波(20kHz)を、前培養後に 1 時間のみ照射、毎日 1 時間照射の条件で照射した。この際、超音波の指向性を考慮し、6 ウェルマイクロプレートを A、B、C に区分した(Fig. 4-6)。培養終了後、吸光度(620nm)を測定し、直ちに遠心分離(8000rpm、4°C、10min)により集菌し、窒素充填後に凍結保存した。

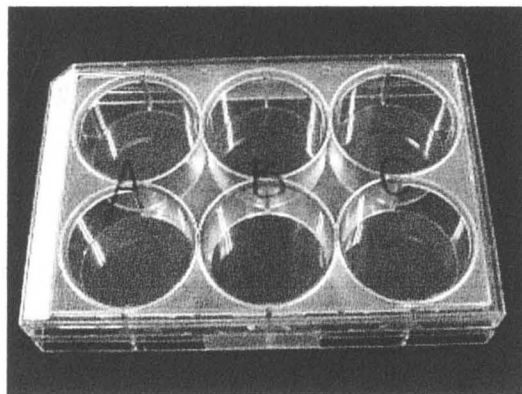


Fig. 4-6 Micro plate

- 3) 凍結した菌体を解凍し色素抽出を行なった。菌体にガラスビーズとアセトン:メタノール(7:3)を 20ml 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(8000rpm、4°C、10.0min)にかけ上澄みをろ過した。これを 2, 3 回繰り返し、37°Cで減圧乾固し色素回収を行なった。これを窒素充填、-5°C以下で遮光保存した。

4-1-3 結果

TL 株およびFM6 株の各条件でカロテノイド含有量を Fig. 4-7, 8 に示した。

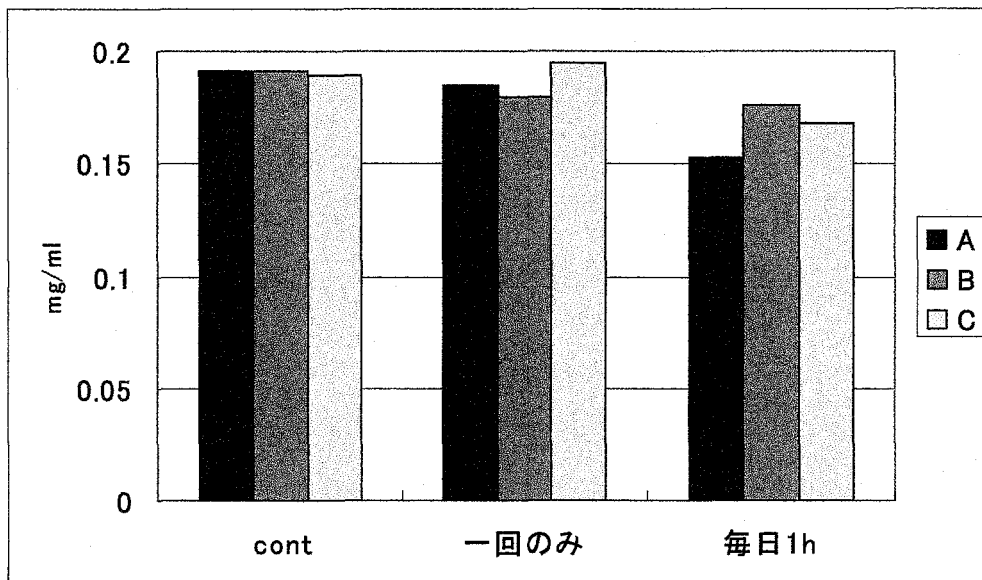


Fig. 4-7 Carotenoids content of TL strain

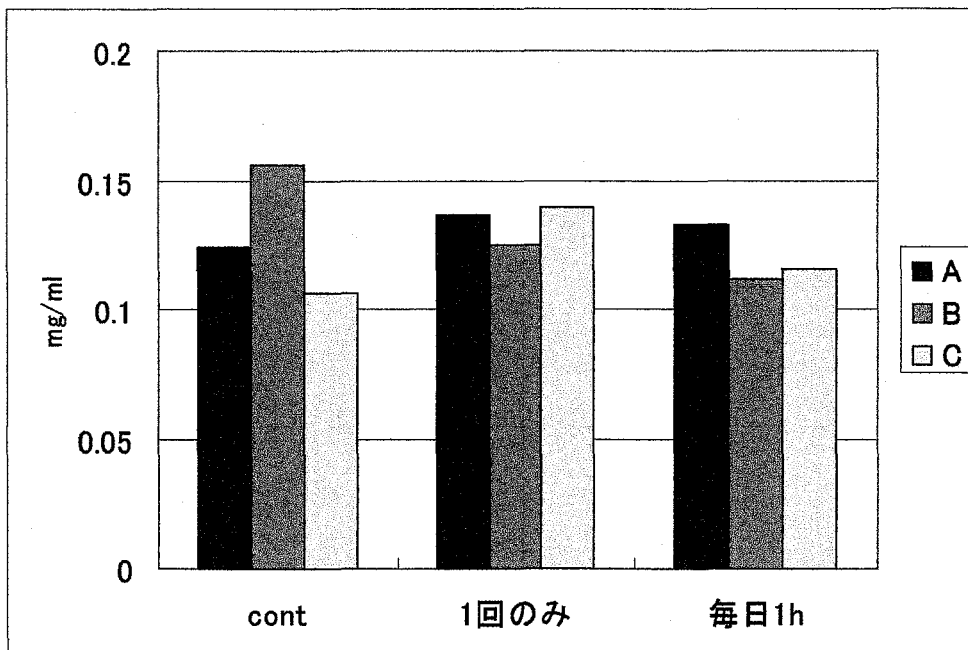


Fig. 4-8 Carotenoids content of FM6 strain

TL 株および FM6 株の各条件でのカロテノイド含有比率を Fig. 4-9, 10 に示した。

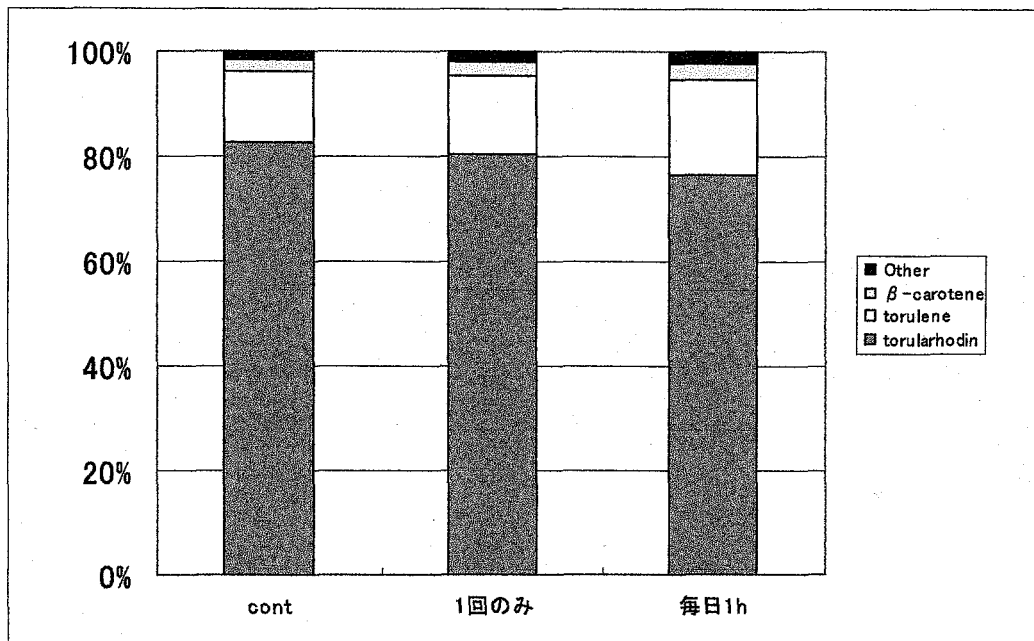


Fig. 4-9 Carotenoid contents ratio of TL strain

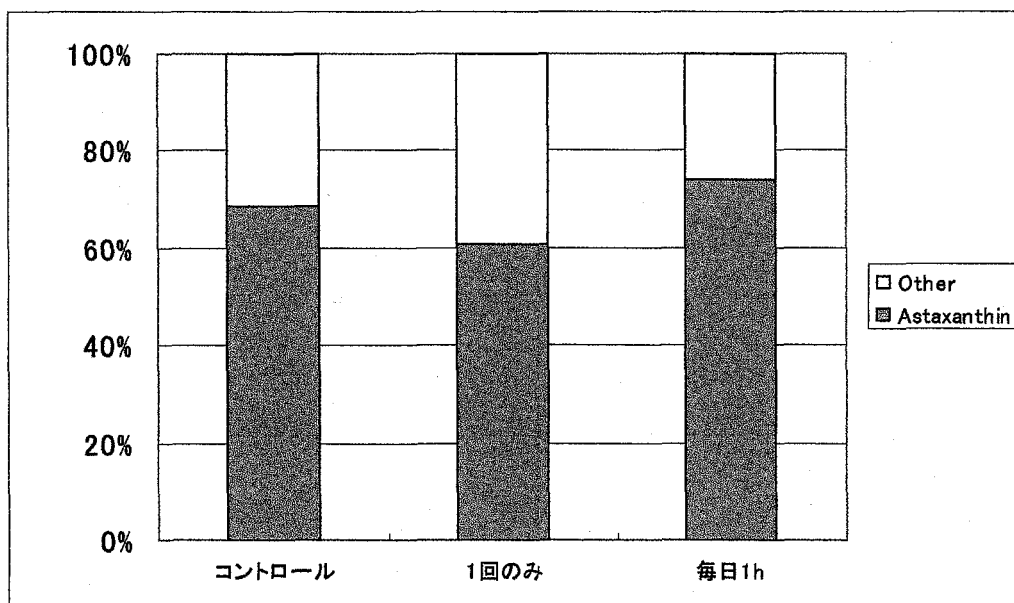


Fig. 4-10 Carotenoid contents ratio of FM6 strain

4-1-4 考察

TL 株はカロテノイド含有量においてコントロール、1 回のみ照射、毎日 1h 照射の順に Torularhodin が減少するが、それとは反対に、Torulene が増産されている。これは Torularhodin の合成が超音波によって阻害され、その前駆体である Torulene が蓄積されたと考えられる。

FM6 株は毎日 1h 照射に対してカロテノイド含有量が減少したが、含有率において Astaxanthin が増加した。これは、FM6 株は TL 株に比べ細胞壁が薄く、超音波による膜破壊がおこり、抗ストレス物質として Astaxanthin を増産したためではないかと考えられる。

また、照射装置がスピーカーであることを考慮し、マイクロプレートを A, B, C と分けてカロテノイド量の計測を行なった。その結果、TL、FM6 株ともに毎日照射したサンプルで若干の違いが現れた。これらは、スピーカーの特性上、真下に近い場所により多くの超音波が当たったためと考えられる。

今後、膜破壊を確認するために β -galactosidase 活性の測定や電子顕微鏡による細胞膜の変化の有無など観察などが必要である。

4-2 物理的環境条件 -光波長の影響-

本研究では Torularhodin を主に生産する *Rhodosporidium toruloides* IF011012 の色素生産変異株である *Rhodosporidium toruloides* IF011013 (TL 株) を使用し、カロテノイド生産能に及ぼす光照射の影響について検討した。TL 株のカロテノイド生産性については青色光などの短波長の可視光が Torularhodin 生産量を増強させることが、以前より榊、中西および日置らによって報告されていた。

近年、単一波長光を発生する LED の技術革新により、紫外部に及ぶ短波長側から赤外部に及ぶ長波長側までの特定波長の光照射が可能となった。そこで、本研究では、光源として、発光ダイオード (LED) を用い、395 (紫), 470 (青), 562 (緑), 590 (橙) および 630 (赤) nm と白色の 6 波長を使用し、TL 株の光応答について検討した。また、395, 470nm の短波長域の光照射について、より詳細に検討を行なった。

4-2-1 供試菌株

供試菌株として、光合成細菌であり Zeaxanthin 生産株である *Erythrobacter* sp. (TMN11 株) と Astaxanthin 生産株である *Paracoccus* sp. (以下 FM6 株) を用いた。

4-2-2 実験装置の作製

基盤を 10cm×13cm にカットし、後から 6 ウェルマイクロプレートの蓋を取り付けるため、下図のように 1 ウェル中に 5 個または 2 個 LED が入るようにはんだ付けをした。

3.5 または 3.6V の LED5 本の場合は、5 個ずつ LED を直列につなげたところに 2 個の定電流ダイオードを並列につなげた (Fig. 4-11)。また、2~3 個ずつ LED を直列につなげたところに 1 個の定電流ダイオードをつなげた。

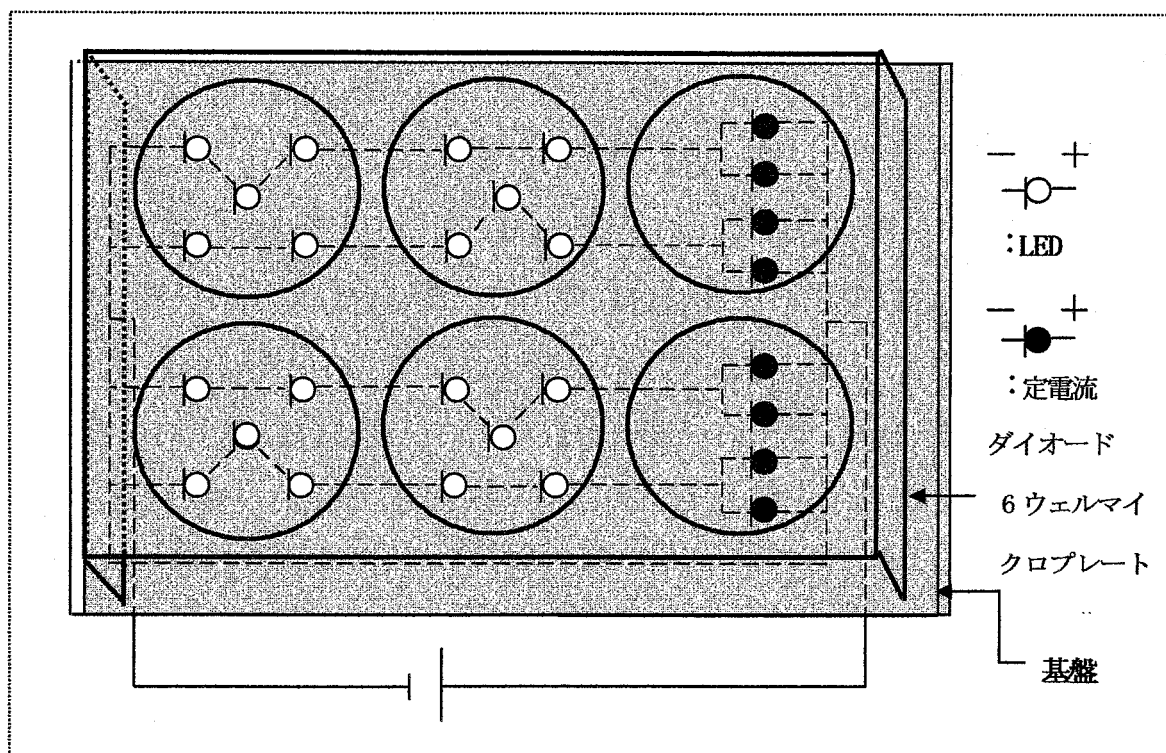


Fig. 4-11 Wiring diagram of LED device

4-2-3 培養および抽出

- 1) 供試菌株を YPD 培地 (Table 4-3) で 24h 振盪培養 (125rpm、27°C) した。菌懸濁液 (OD=1.0) 500 μ l を 50ml の SC 培地 (Table 4-4) に入れ、6 ウェルマイクロプレートの LED の光が当たる 4 ウェルに 5ml ずつ分注した。

Table 4-3 Content of YPD medium

Bacto Yeast extract	10
Polypeptone	20
D-Glucose	20
Distilled Water	1000ml

pH 7

After sterilization at 121°C for 15min this medium was used in this experiment.

Table 4-4 Content of SC medium

Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids & $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.7			
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.00	D-Glucose	20.0
Adenine	0.019	L-Alanine	0.076
L-Arginine	0.076	L-Asparagine	0.076
L-Asparaginic acid	0.076	L-glutaminic acid	0.076
L-Cystein	0.076	L-Glycine	0.076
L-Glutamine	0.076	L-Histidine	0.076
L-Inositol	0.076	L-Leucine	0.076
L-Isoleucine	0.076	L-Methionine	0.076
L-Lysine	0.076	L-Proline	0.076
L-Phenylalanine	0.076	L-tryptophan	0.076
L-Serine	0.076	L-Valine	0.076
L-Threonine	0.076	L-Tyrosine	0.076
Uracil	0.076	p-Aminobenzoic acid	0.076
Distilled Water		1000ml	

After sterilization at 121°C for 15min this medium was used in this experiment.

- 2) 作製した実験装置に入れ、4日間本培養(120rpm、25°C)した。
- 3) 凍結した菌体を解凍し色素抽出を行なった。菌体にガラスビーズとアセトン:メタノール(7:3)を20ml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(8000rpm、4°C、10.0min)にかけ上澄みを濾過する。これを2、3回繰り返す、37°Cで減圧乾固し色素回収を行なった。これを窒素充填、-5°C以下で遮光保存した。

4-2-4 結果

以下に、培養液あたりのカロテノイド量と細胞数あたりのカロテノイド量の結果を示す(Fig. 4-12, 13)。LED2本、5本ともに培養液あたりのカロテノイド量には大きな違いがないように思われる。しかしながら、本実験ではLEDから照射される波長の影響を見ることを目的としており、このグラフでは光のもつ粒子と量子の特性を見ることができない。これは、LEDの規格の問題が挙げられる。通常の蛍光管のように国際標準規格が定められているものは問題ないが、LEDには標準規格がない。そのため、同じ会社の製品でも色(波長)が異なれば、照射する光の強度が異なる。

そこで、光の粒子の単位である光量子を用いて再計算を行い、4-2-5において評価した。

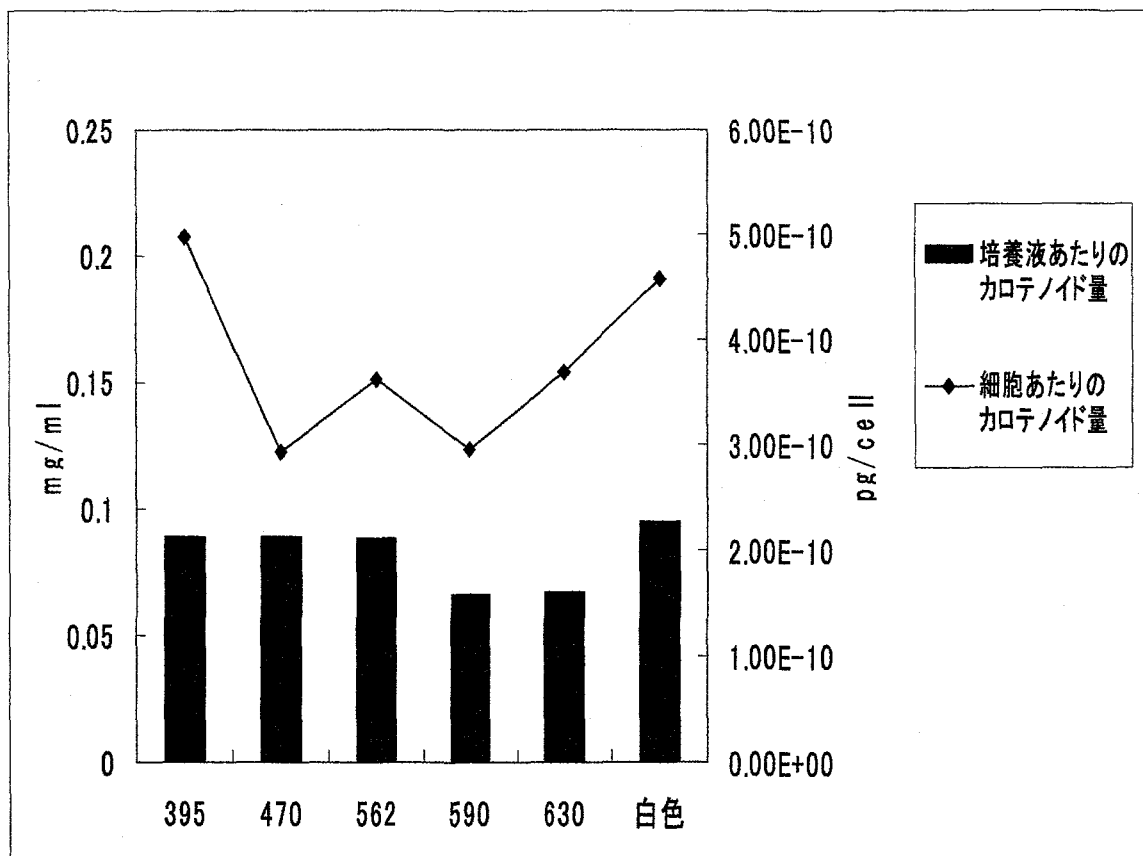


Fig. 4-12 Carotenoid content of Two LEDs per cell and medium

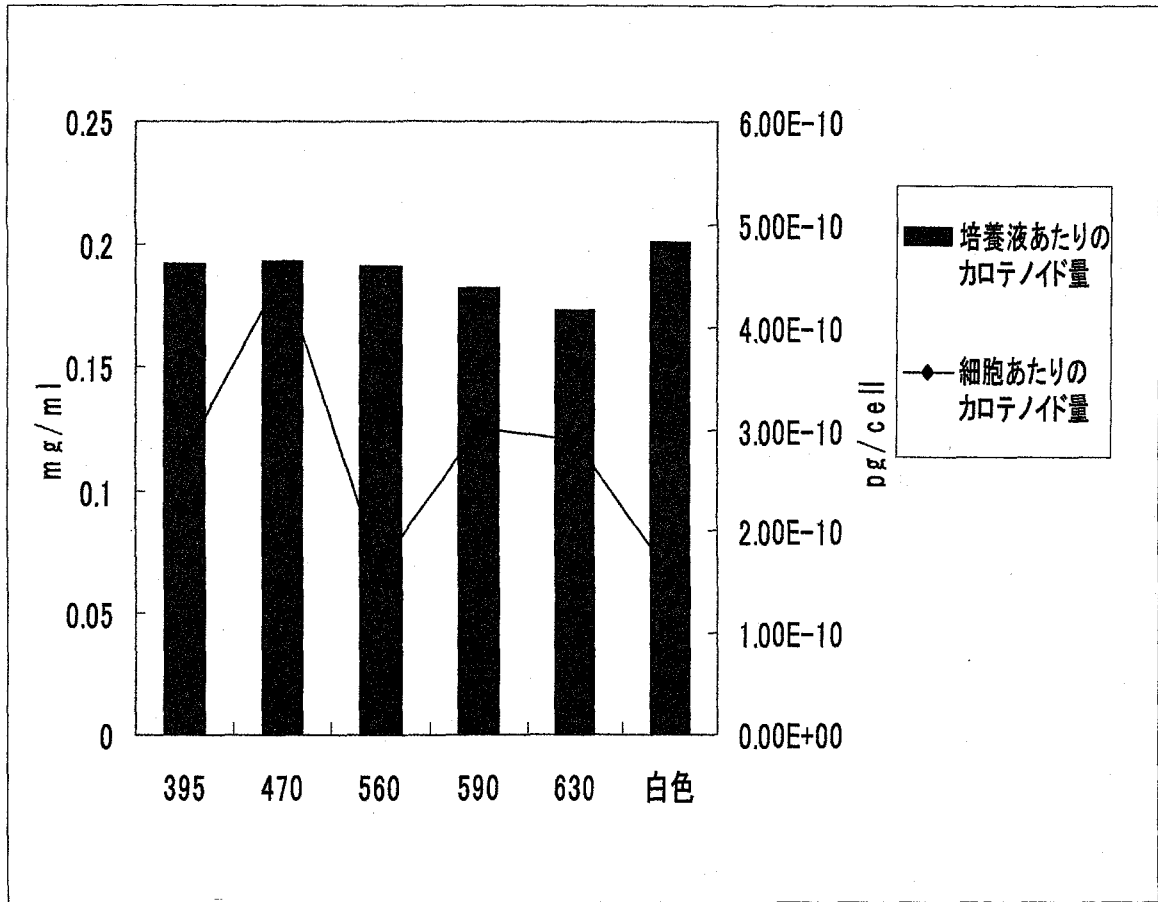


Fig. 4-13 Carotenoid content of Five LEDs per cell and medium

4-2-5 光の単位

<光の計測法>

光量の計測法として、培養面あたりの照度をフォトダイオードの受光素子に用いた。デジタル照度計 IM-3 (株式会社 トプコム製) で計測した。

<光の単位変換>^{63), 64)}

光の単位系は、SI 単位系で定義されているが、人間の視感に合わせた心理統計量とエネルギー単位を中心とした物理量の二通りに分かれる。また、両単位系は、放射束を、人の目の標準比視感度と人間の最大視感度に基づいて評価した量、すなわち、光束(luminous flux ; lm) Φ_v を介して、物理量である放射束 Φ_e (単位時間当たりの放射エネルギー ; $W = J/s$) との間で分光密度 $\Phi_{e, \lambda}$ を用いて次のように表される。

$$\Phi_v = K_m \times V(\lambda) \times \Phi_e \quad [1]$$

光の波長が単一波長ではないとき、それを積分した値

$$[2] \quad \Phi_v = K_m \int_0^{\infty} \Phi_{e, \lambda}(\lambda) V(\lambda) d\lambda$$

であらわされる。

ここで $V(\lambda)$ は標準比視感度、 K_m は最大視感度 (683 lm/W)、 λ は波長である。標準比視感度は、CIE (国際照明委員会) により定義され、可視光領域における人間の目というセンサーの感度に合わせた各波長の効率を表した関数である。通常、人間の目で最も感度のよい 555nm の緑色光周辺を 1 とし、波長が、それよりも短波長側、長波長側になるに従って、標準比視感度は低下していく。(Fig. 4-14) 各波長における標準比視感度を Table 4-5 に示す。 K_m は、 $540 \times 10^{12} \text{Hz}$ (540nm) の単色放射光の光度より定義される。

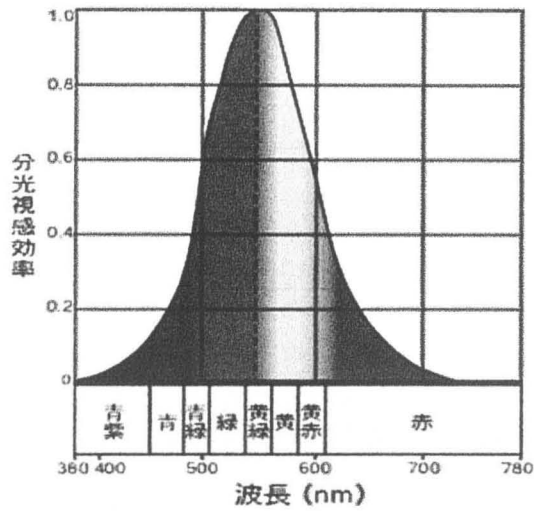


Fig. 4-14 Spectral luminous efficiency. $V(\lambda)$

Table 4-5 Spectral luminous efficiency. $V(\lambda)$

[nm]	$V(\lambda)$	[nm]	$V(\lambda)$	[nm]	$V(\lambda)$
380	0.0000	520	0.710	660	0.061
390	0.0001	530	0.862	670	0.032
400	0.0004	540	0.954	680	0.017
410	0.0012	550	0.995	690	0.0082
420	0.0040	560	0.995	700	0.0041
430	0.0116	570	0.952	710	0.0021
440	0.023	580	0.870	720	0.00105
450	0.038	590	0.757	730	0.00052
460	0.060	600	0.631	740	0.00025
470	0.091	610	0.503	750	0.00012
480	0.139	620	0.381	760	0.00006
490	0.208	630	0.265	770	0.00003
500	0.323	640	0.175	780	0.000015
510	0.503	650	0.107		

また、SI 単位系において、心理統計量である照度 (lx) と光束 (lm) の間には次の

関係が成り立つ。

$$L_x \text{ (照度)} = I_m \text{ (光束)} / m^2 \quad [3]$$

すなわち、 $1m^2$ の単位面積あたりの照度計の計測値と $1m^2$ の単位面積あたりの放射束(放射照度; E_e , W/m^2)の間においては、次式の関係が成り立つ。

$$E_e = I_x / \{K_m \times V(\lambda)\} \quad (J/m^2/s) \quad [4]$$

ただし、照度計の分光検出感度を加味し、色補正係数 a による補正を行なう。補正係数は Table 4-6 に示す。

Table 4-6 Correction factor of digital illuminometer IM-3

光源波長	色補正係数 a
400~760nm	0.99
450~500nm	1.06
500~560nm	0.96
550~600nm	0.95
600~650nm	1.11

よって、当照度計による[4]式のエネルギー単位変換関数は、

$$E_e = a \times I_x / \{K_m \times V(\lambda)\} \quad [5]$$

となる。

また、アインシュタインによると、光は振動数 ν という固有のベクトル性を有する波動である。すなわち、振動子であるとともに、エネルギーを有する量子 (Photone ; 光量子) としての性質を持つ²⁶⁾。

振動子は、量子で説明できる不連続なエネルギー単位を取ることは、有名なプラン

クの式[7]で表される。また、振動数 ν (Hz: s^{-1}) は、と波長 λ (m) との関係は、[7]式で表される。

$$\varepsilon = h\nu \quad [6]$$

$$\nu = c / \lambda \quad [7]$$

このとき、 ε は、エネルギー量子、 h は、プランク定数で $6.62606876 \times 10^{-34}$ ($J \cdot s$) で表され、 c は、光速で、 $c = 2.99792458 \times 10^8$ ($m \cdot s^{-1}$) で表される。また、このとき、波長の単位は、m となる。よって、このときの、 ε の単位は、J である。

また、前述したように、エネルギー量子は不連続なエネルギーをとることから、光のエネルギー量子、光量子 1mol の持つエネルギー E_m は、アボガドロ数 N (6.02×10^{23}) をかけた

$$E_m = N \times ch / \lambda \quad [8]$$

である。

よって、[5] 式と [8] 式より、照度計で計測された照度 I_x での、単一波長 λ (m) の単位面積での一秒あたりの光量子の mol 数すなわち、光量子束密度 (PPF) は、

$$PPF = a \times I_x \times \lambda / \{ (Km \times Nch \times V(\lambda)) \} \quad [9]$$

と定義できる。

<光のエネルギーと量子数>

前項をまとめると、

光のエネルギー量：放射照度 ($J/m^2/s$)

$$E_e = a \times I_x / \{K_m \times V(\lambda)\} \quad [5]$$

光量子数： 光量子束密度 (mol/m²/s)

$$PPF = a \times I_x \times \lambda / \{ (K_m \times N_{ch} \times V(\lambda)) \} \quad [9]$$

一般的に後者の単位は、 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ で表されることが多い。

<日常光の光エネルギーの変換>

日常的な光源を用いた光や環境光では、各波長の光がその光源に応じた強さで放射されており、そのためには、光を分光し、特定各波長光のエネルギーを捕らえる受光素子（フォトダイオード。ここでは、可視光誘電素子、あるいは、GaAsP 素子を用いるのが適当と思われる²⁸⁾）を測定原理とする分光放射照度（輝度）計。あるいは、光エネルギーによる温度上昇を計測する日射計などを用い計測することができる。しかしながら、これらの機械は高価であることや、装置の大きさなどの問題から、現在、用いることが不可能である。そのため、測定感度や誤差は非常に大きい。今回の実験では、測定法を簡略化し、デジタル照度計で、照度を計測し、光のうち 400-700nm の放射束量を変換し、典型的な環境光・人工光の分光放射分布などを参考にした光の換算を考えた。使用した蛍光光源として、ニッポ電機社製、ELA-520C に同社製、e Line ランプ光 FHA455T5 (ED、昼光色、6700K、平均評価数 Ra90) を用いた。

単位変換法については、日立製昼光色の蛍光灯の分光放射スペクトルを参考に稲田の式⁶⁵⁾を用いた東海大学星研究室のインターネットサイトの自動変換式⁶⁶⁾により変換した。

上記に示した計算式を用いて、今回の実験で用いた LED の照度を放射照度および光量子束密度の値に変換した。以下の結果を示す。(Table 4-7, 8)

Table 4-7 Photon flux density and Irradiance of Two LEDs

波長 (nm)	395	470	562	590	630
放射照度 (J/m ² /s)					
$E_e = a \times I_x / \{K_m \times V(\lambda)\}$	104.36	4.61	1.40	1.84	6.13
光量子束密度 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)					
$\text{PPF} = a \times I_x \times \lambda / \{ (K_m \times N_{ch} \times V(\lambda)) \}$	344.72	18.10	6.57	9.07	32.31

Table 4-8 Photon flux density and Irradiance of Five LEDs

波長 (nm)	395	470	560	590	630
放射照度 (J/m ² /s)					
$E_e = a \times I_x / \{K_m \times V(\lambda)\}$	359.47	27.85	2.28	3.00	10.02
光量子束密度 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)					
$\text{PPF} = a \times I_x \times \lambda / \{ (K_m \times N_{ch} \times V(\lambda)) \}$	1187.36	109.46	10.73	14.80	52.76

4-2-6 光量子束密度(PPF)に変換した培養結果

LED2 本および5本の光量子あたりのカロテノイド収量、細胞収量の相対値を(Fig. 4-15)以下に示す。

LED2本およびLED5本の光量子あたりのカロテノイド収量、光量子あたりの細胞収量は、共に562nmで高く395nmで低くなった。また、395nm~470nmではLED2本の光量子あたりのカロテノイド収量および光量子あたりの細胞収量が高く、562nm以上はLED5本の方が高くなった。これは、LED5本の場合、波長のエネルギーが高い395nm~470nmの波長が静菌的に働いたためと考えられる。以上の結果より、近紫外線域の波長が高エネルギーで静菌的・殺菌的効果を持つことがわかった。

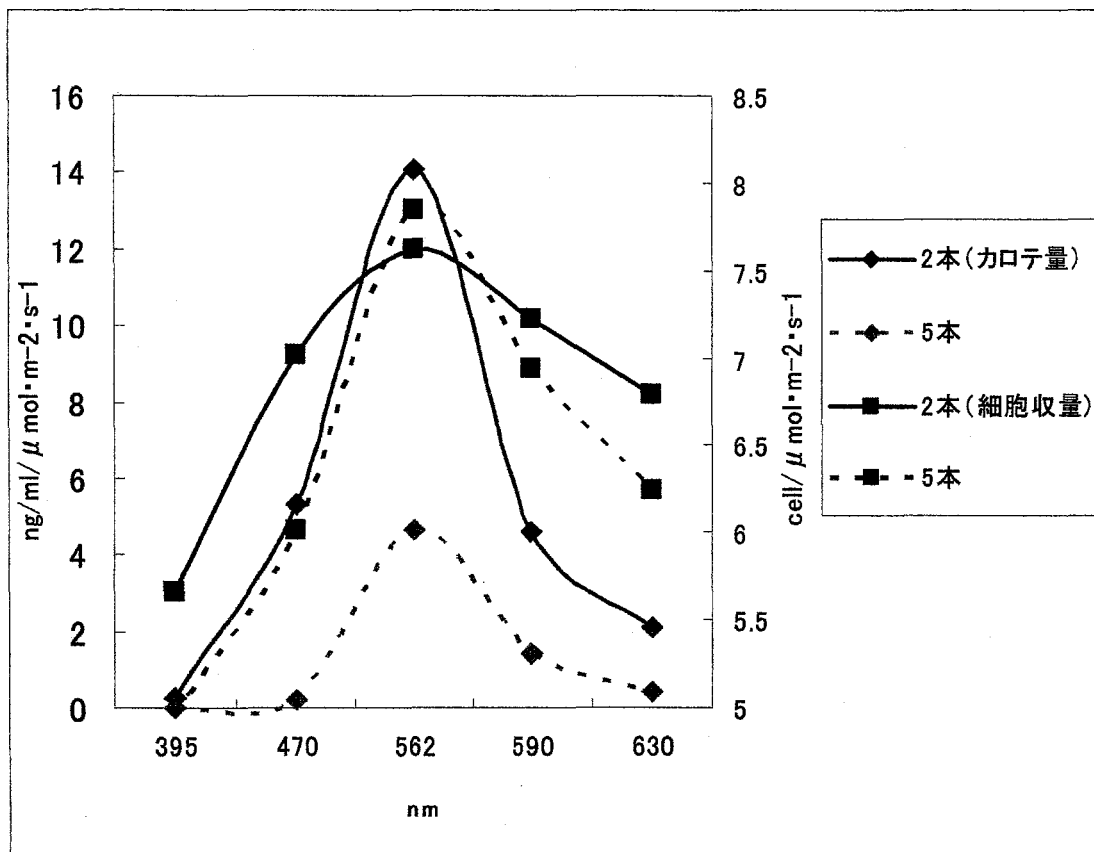


Fig. 4-15 Carotenoid content and Cell amount per photon of Two and Five LEDs

4-2-7 考察

得られたデータを、光の単位 Lx から、光の強さと波長が持つエネルギー特性を評価することができる、光を量子としてとらえる光量子に変換して各波長の関係を検討した結果、LED2 本および 5 本の光量子あたりのカロテノイド収量および細胞収量は、562nm で高く、395nm で低かった。また、395nm~470nm までの光量子あたりのカロテノイド収量および細胞収量は、LED2 本が高く 562nm 以降は、LED5 本で高くなった。

近紫外線域での光照射は殺菌作用を有するため、菌体増殖がある程度阻止されるものと考えられる。一方、菌体は防御のためにカロテノイド生産性を向上させる方向にエネルギーを注ぐことが推定され、その結果カロテノイドの生産性が増強したものと考えられる。また、光量子あたりのエネルギーが低く、地球上に大量に降り注いでいる 562nm の光照射は、カロテノイド生産の効率が良いことが考えられる。

以上より、有用な高極性カロテノイド増産には、近紫外領域から緑色にかけての波長が有効であることがわかった。その中でも、近紫外線が効果的であると考えられる。

4-3 物理的環境条件 -紫外線領域の波長の影響-

前項において、カロテノイド生産には近紫外~緑色(562nm)付近の波長が有効であり、とくに高極性カロテノイド生産においては、近紫外領域の波長が効果的であることが判明した。そこで、より短波長である UV-A を含む紫外線領域の波長について、カロテノイド生産微生物にあたえる影響について検証した。

4-3-1 実験装置

現在、LED では UV-A のような短波長を出すことはできないので、蛍光管を使用することにした。UV-A(400-315nm)照射にはブラックランプ(TOSHIBA, 10W)、UV-C 照射(280-200nm)には殺菌ランプ(TOSHIBA, 10W)を用いて、Fig. 4-16 に示した実験装置で紫外線照射を行なった。

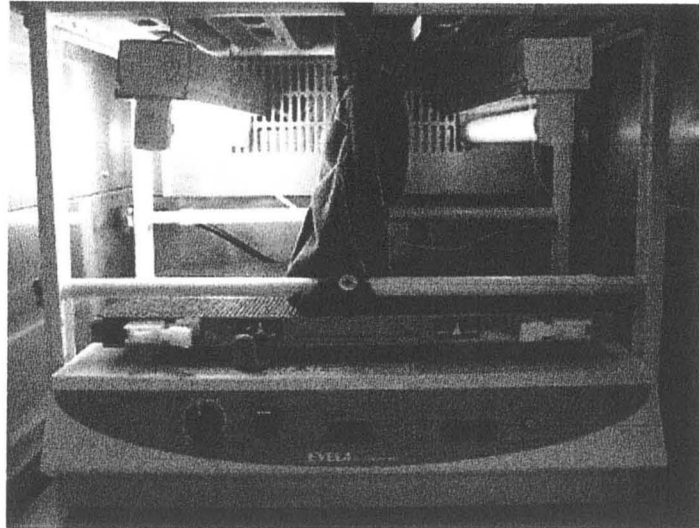


Fig. 4-16 Experimental device of ultraviolet radiation

4-3-2 供試菌株

供試菌株として、光合成細菌であり Zeaxanthin 生産株である *Erythrobacter* sp. (TMN11 株) と Astaxanthin 生産株である *Paracoccus* sp. (以下 FM6 株) を用いた。

4-3-3 培養と抽出方法

- 1) TMN11 株、FM6 株各々を、細菌用培地 I (Table 4-2) を用い、前培養 (100rpm、25°C、2days) 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 5ml の培養液中へ 50 μ l の割合で植菌した。
- 2) 紫外線照射装置に入れ、本培養 (90rpm、25°C、5days) を行なった。培養終了後、吸光度 (620nm) を測定し、直ちに遠心分離 (8000rpm、4°C、10min) により集菌し、窒素充填後に凍結保存した。
- 3) 凍結した菌体を解凍し色素抽出を行なった。菌体にガラスビーズとアセトン:メタノール (7:3) を 20ml 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 (8000rpm、4°C、10.0min) にかけて上澄みを濾過する。これを 2, 3 回繰り返す、37°C で減圧乾固し色素回収を行なった。これを窒素充填、-5°C 以下で遮光保存した。

4-3-4 結果

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. 4-17, 18 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. 4-19, 20 に示した。

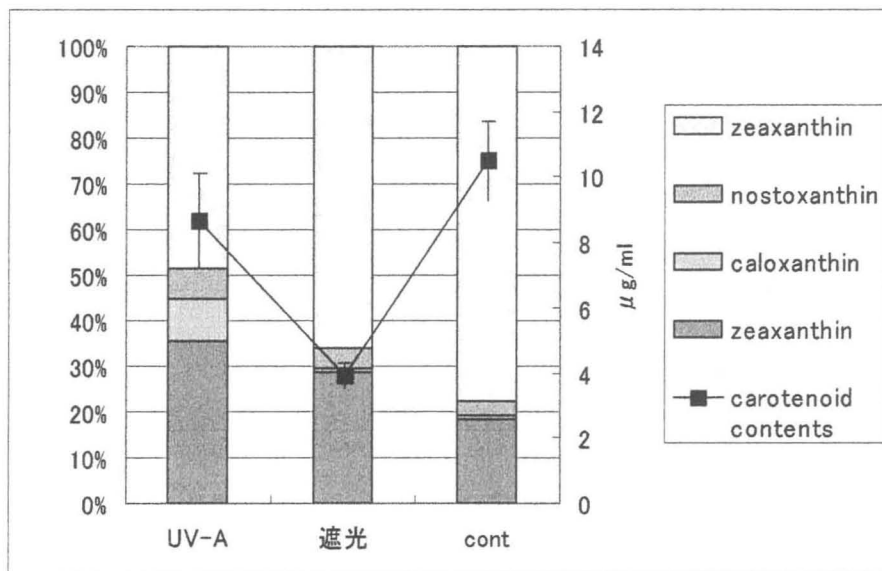


Fig. 4-17 Carotenoid content and contents ratio of TMN11 strain by UV-A

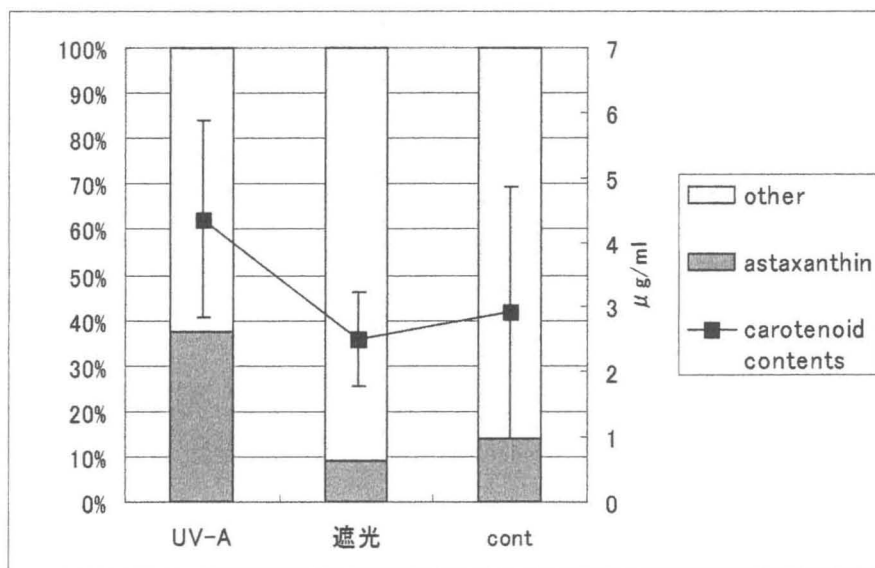


Fig. 4-18 Carotenoid content and contents ratio of FM6 strain by UV-A

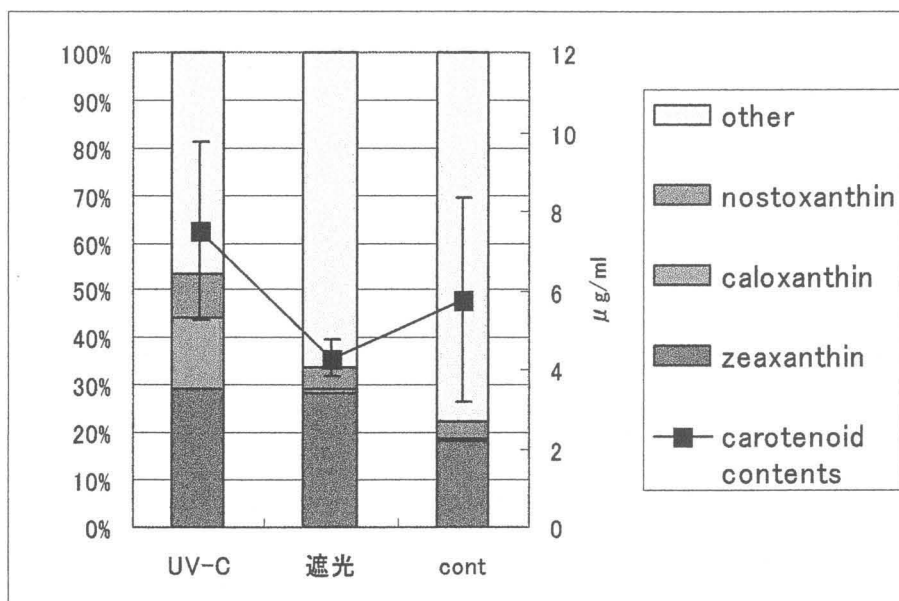


Fig. 4-19 Carotenoid content and contents ratio of TMN11 strain by UV-C

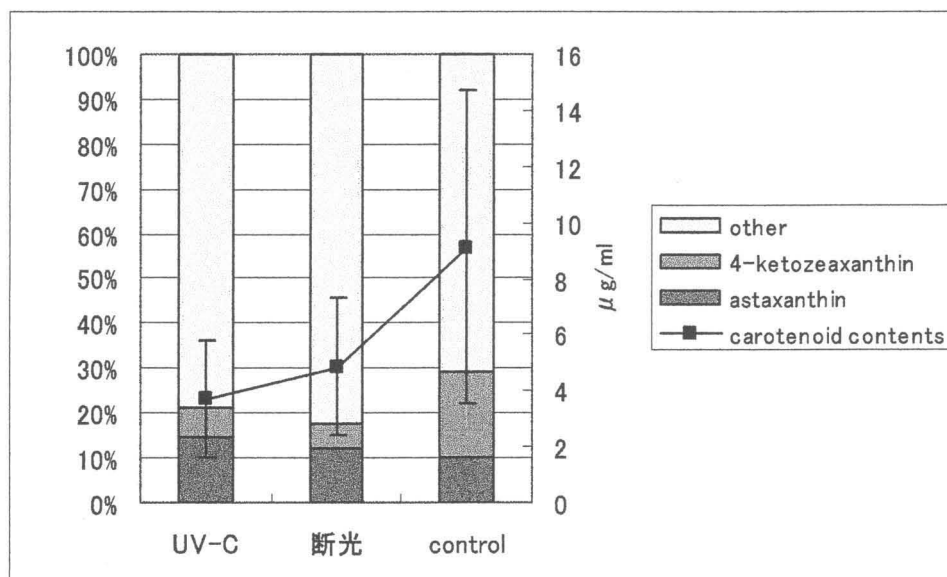


Fig. 4-20 Carotenoid content and contents ratio of FM6 strain by UV-C

4-3-5 考察

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 には殆どみられなかった 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コントロールと比べ増加したが、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見られた。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。

4-4 まとめ

カロテノイド生産微生物の物理的培養環境について、音波の周波数、光の周波数に関して実験し、カロテノイド生産に与える影響について検証した。

まず、音波の超音波域の波長に着目し超音波発生装置を作成し実験を行なった。その結果、酵母である TL 株では、超音波の照射によって Torulene が増産され、Torularhodin の合成が超音波によって阻害された。細菌である FM6 株では、カロテノイド含有量が減少したが、含有率において Astaxanthin が増加した。これは FM6 株は TL 株に比べ細胞壁が薄く、これによって超音波による膜破壊がおこり、抗ストレス物質として増産したのではないかと考えられる。よって、超音波を照射することで適切な条件を整えれば有用なカロテノイドを増産できる可能性があることがわかった。

次に、LED を用いて近紫外から可視光の波長について LED 照射装置を作成し実験を行なった。得られたカロテノイド生産量のデータを光量子の単位に置き換えた結果、近紫外線域の波長でカロテノイド生産が増した。また、光量子あたりのエネルギーが低く、地球上に大量に降り注いでいる 562nm の光照射は、カロテノイド生産の効率が良いことが考えられる。

以上より、有用な高極性カロテノイドの増産には、近紫外領域から緑色にかけての波長が有効であることがわかった。その中でも、近紫外線が効果的であると考えられる。

そこで、紫外線領域について UV-A や UV-C の波長を発する蛍光灯を用いて実験装置を作成し、さらに実験を行なった。その結果、TMN11 株において UV-A 照射によって Caloxanthin、Nostoxanthin 含有比率が増加し、TMN11 株の生合成経路が促進された。また、FM6 株において UV-C 照射によって、カロテノイド含有量に明らかな減少が見られた。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。

以上の結果より、光合成細菌や非光合成細菌において、菌の特徴を捉えた上で、よ

り効率的に有用なカロテノイドを量産させることが可能であると分かった。

今後は、装置の改良などを行い、ジャーファメンターのような大量培養装置への応用を検討している。

第5章 カロテノイド生産微生物の遺伝学的特性

菌株特性の系統解析方法は、通常行われている「菌株の属レベルまでの同定」と今回新たに試みた「色素組成の差異による検討」の2つから構成される。前者は菌株について、16S リボソーム DNA (16S r DNA) の塩基配列解析にて属レベルの同定^{67,68)}を行い、Clustal W^{69,70)}により系統樹を作成した。一方、後者は、抽出により得たカロテノイド試料を、TLC 分析、PDA-HPLC 法による色素組成の検討を行い、各色素のリテンションタイムおよびピーク面積値を多変量解析にて cos 係数により類似度を求めてから距離行列を算出し、UPGMA 法により連結して代謝系の系統解析を行なった。

これら2つの特性の系統解析を比較し、菌株が生産する色素と菌種の関連性の有無を検討するとともに採取したカロテノイド生産微生物のライブラリーを作成した⁸⁾。

5-1 16S rDNA によるカロテノイド生産微生物の同定

5-1-1 コロニーダイレクトシーケンシング法

1) Template の準備

PCR 用チューブに、滅菌ミリQ水を $10\mu\text{l}$ 注入し、滅菌爪楊枝で釣菌した。着菌後、予め起動させておいた PCR thermal cycler (TaKaRa Bio 社製) に移し、ホットスタートで DENATURATION (熱処理 $95^{\circ}\text{C}20$ 秒) を行なった。次に PCR 反応液の調製を実施した。すなわちチューブ当たり以下の組成になるように、あらかじめ必要本数分の mixture を作成し、各チューブに $20\mu\text{l}$ ずつ分注した (Table 5-1)。

Table 5-1 Preparation for Template

①Milliq water	$12.9\mu\text{l}$	} ×サンプル数量
②10×Taq buffer	$2.0\mu\text{l}$	
③0,2nM dNTPs	$2.0\mu\text{l}$	
④10pmol 27F primer	$1.0\mu\text{l}$	
⑤10pmol 1492R primer	$1.0\mu\text{l}$	
⑥Blend Taq	$0.1\mu\text{l}$	
⑦(Template	$1.0\mu\text{l}$	
Total	$20.0\mu\text{l}$	

2) Polymerase Chain Reaction(PCR)

94.0°Cで2分間反応後94.0°Cを30秒、50.0°Cを30秒、72.0°Cを1分30秒の30サイクル条件後に72.0°Cを2分間で16S rDNAの増幅を行なった。

3) アガロースゲル電気泳動

50×TAE緩衝液(Tris-acetate;2M 氷酢酸;2M 0.5MのEDTA;0.05M pH8.0)から1×TAE緩衝液を調製したものをを用いて作製した0.8%のアガロースゲルにPCRによって得られたloading Dyeを含むアンプリコンを付加し、100V定電圧で25分間電気泳動を行なった。DNAサイズマーカーとしては0.2-10kbp Smart Ladder(Wako 純薬)を用いる。400bp付近に確認されたバンドをメスで切り出し、NucleoSpin Extract II (DNA抽出キット)を用いてゲルからDNAの抽出を行なった。

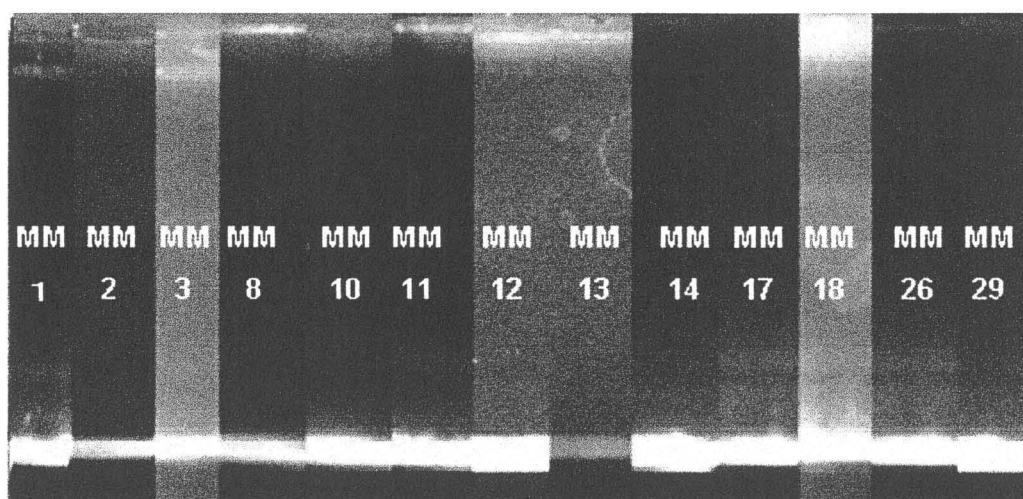


Fig. 5-1 Electrophoresis

4) サイクルシーケンシング

上記の方法で抽出されたゲノムDNAを鋳型としてTable 5-2に示したf1L、f2L、f3L、rE1L、r1L、r2L、r3Lおよびr4Lの各プライマーを使用しDYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit(AP社製)を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer(ABI)、Bio Edit (free software) および Chromas proを用いて16SrDNA塩基配列を決定した。なお、シーケンス反応は95.0°Cで20秒、50.0°Cで15秒、60.0°Cで1分を30サイクルの条件下で行い、用いたプライマーの合成は株式会社日本バイオサービスに委託した。

Table 5-2 Primer for amplification of 16S rDNA

Primers	Direction	Position	Sequences	Length(mer)
27F	Forward	8-27	5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	20
1492R	Reverse	1509-1491	5' -GGCTACCTTGTTACGACTT-3'	19
f1L	Forward	9-27	5' -GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	19
f2L	Forward	517-535	5' -CCAGCAGCCGCGGTAATAC-3'	19
f3L	Forward	1093-1111	5' -GTCCC GCAACGACGGCAAC-3'	19
rE1L	Reverse	344-326	5' -GTAGGAGTCTGGACCGTGT-3'	19
r1L	Reverse	535-517	5' -GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'	19
r2L	Reverse	804-785	5' -GACTACCAGGGTATCTAATC-3'	20
r3L	Reverse	1110-1092	5' -TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'	19
r4L	Reverse	1405-1308	5' -ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'	18

5-1-2 結果

<16S rDNA 遺伝子配列解析>

増幅した 16S rDNA は、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer(ABI)、Bio Edit (free software) および Chromas pro を用いて遺伝子配列解析を行い、国立遺伝子研究所の BLAST 法で相同性検索を行なった結果を Table 5-3 に示した。本研究で決定した株の塩基配列と GenBank に登録されている株の塩基配列との相同性が 100%を示したものは、暫定的に同属同種であると判断し、相同性が 97% から 99%の株は、同属の近縁な細菌であると判断した。

一部、相同性が 88~93%と 8 株が低い値を示したものの、他はいずれも 97%以上の相同性が得られた。

Table 5-3 List of Carotenod producing microorganisms

株	ポイント名	属	近縁種	相同性
L7	ブツブツサンゴ	<i>Mrthylobacterium</i>	<i>Mrthylobacterium</i> sp	98%
L8	アリガーケーブル	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter-like</i> sp	98%
FM1	アムロ漁礁	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i> sp	97%
FM6-1	アザハタの根	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus</i> sp	99%
FM6-2	アザハタの根	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus</i> sp	99%
FM6-3	アザハタの根	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus</i> sp	99%
FM8	嘉比前	<i>sphingomonas</i>	<i>sphingomonas</i> sp	98%
FM10	アザハタの根	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i> sp	98%
FM12	ウミウシ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter-like</i> sp	99%
FM14-1	アリガーケーブル	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	99%
FM14-2	アリガーケーブル	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	99%
FM15-1	嘉比前	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter-like</i> sp	99%
FM15-2	嘉比前	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter-like</i> sp	99%
FM17-1	ウミウシ	<i>Marinicola seohaensis</i>	<i>Marinicola seohaensis</i> strain	97%
FM17-2	ウミウシ	<i>Marinicola seohaensis</i>	<i>Marinicola seohaensis</i> strain	97%
FM20-1	ウミウシ	<i>Marinicola seohaensis</i>	<i>Marinicola seohaensis</i> strain	95%
FM20-2	ウミウシ	<i>Marinicola seohaensis</i>	<i>Marinicola seohaensis</i> strain	95%
TMN1	ギナ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	99%
TMN7-1	ブツブツサンゴ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
TMN7-2	ブツブツサンゴ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
TMN8	ブツブツサンゴ	<i>Maribacter</i>	<i>Maribacter dokdoensis</i> strain	99%
TMN9	ブツブツサンゴ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	99%
TMN10	ブツブツサンゴ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	98%
TMN11-1	ブツブツサンゴ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
TMN11-2	ブツブツサンゴ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
TMN13-1	嘉比前	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%

株	ポイント名	属	近縁種	相同性
TMN13-2	嘉比前	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
TMN15-1	古座間味	<i>Marinobacter</i>	<i>Marinobacter</i> sp	99%
TMN15-2	古座間味	<i>Marinobacter</i>	<i>Marinobacter</i> sp	99%
TMN16	古座間味	<i>Flexibacter</i>	<i>Flexibacter aggregans</i>	<u>95%</u>
TMN17・18・19-1	阿真ビーチ	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium</i> sp	99%
TMN17・18・19-2	阿真ビーチ	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium</i> sp	99%
TMN17・18・19-3	阿真ビーチ	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium</i> sp	99%
TRO4	マテ貝 (内臓)	<i>Janthinobacter</i>	<i>Janthinobacter</i> sp	98%
MM1	スミロン	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
MM2	スミロン	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	98%
MM8	スミロン	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
MM10	スミロン	<i>Janthinobacter</i>	<i>Janthinobacter lividum</i>	<u>88%</u>
MM11	バンタヤンビーチ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	99%
MM12	バンタヤンビーチ	<i>Janthinobacter</i>	<i>Janthinobacter</i> sp	<u>95%</u>
MM13	バンタヤンビーチ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	98%
MM14	バンタヤンビーチ	<i>polarobacter</i>	<i>polaribacter dokdonensis</i> DSW-5	<u>98%</u>
MM17	バンタヤンビーチ	<i>Algoriphagus</i>	<i>Algoriphagus marincola</i> SW-2	<u>98%</u>
MM18	ギナ	<i>Arenibacter</i>	<i>Arenibacter palladensis</i>	<u>96%</u>
MM26	アボ島	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
MM29	アボ島	<i>Citromicrobium</i>	<i>Citromicrobium</i> sp	<u>96%</u>
MM41	サン ホセ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	98%
MM42	サン ホセ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	98%
MM45	サン ホセ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	98%
MM46	サン ホセ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
MM48	サン ホセ	<i>Erythrobacter</i>	<i>Erythrobacter</i> sp	97%
BT01	嘉比前	<i>sphingomonas</i>	<i>sphingomonas</i> sp. <i>KT02ds20</i>	96%
BT02	嘉比前	<i>sphingomonas</i>	<i>sphingomonas</i> <i>baekryungensis</i>	96%

5-1-3 考察

3章より得られたカロテノイド生産菌について16S rDNAをもちいて遺伝子同定(属同定)を行なった。

その結果、53株の遺伝子配列が決定し属同定した。*Erythrobacter*属が最も多く26株が得られた。*Erythrobacter*属の*E. citoreus*は、地中海(カルビ、コルシカ湾)からの水深35mの海水から単離され、黄色素を産生し黄色コロニーを形成することが報告されている⁷¹⁾。また、高知医科大学の研究により608Y2株に免疫細胞を活性化する作用があることが報告されている⁷²⁾。フィリピンのパンタヤンビーチから得られたMM-14株は*Polarobacter sp.*(近縁種*polaribacter dokdonensis DSW-5*)と同定された。この近縁種は日本では竹島、韓国では独島と表現され、両国が権利を主張している島で採取された株である。韓国の研究者が発見し、種名の由来も独島から来ている。竹島由来の菌株がフィリピンで採取されたことは興味深い。

遺伝子同定の操作において、電気泳動でテーリング部位が見られたり、泳動時間に違いがあることから、今後はPCR増幅時のアニーリング温度を調整したり⁷³⁾、アガロースゲルをできる限り均一に作成し、電気泳動時間を一定にするなどの改善が必要であると考えられる。また、16S rDNA遺伝子配列解析による属同定においては、リバースプライマー(r2L)から5'末端側の360塩基配列による属同定と16S rDNA塩基配列の全長による属同定の結果がほぼ同一の結果が得られる場合もあり、今後は属レベルでの同定がより簡便に行えるようになるであろう。

5-2 沖縄県慶良間諸島におけるカロテノイド生産菌の分布

5-2-1 方法

5-1より得られた遺伝子同定の結果から、沖縄県慶良間諸島のデータについてサンプリングを行なったダイビングポイントと照合し、分布傾向を検討した。

5-2-2 結果

カロテノイド生産菌を遺伝子同定した結果をTable 5-4に示した。また、ダイビングポイントのマップをFig. 5-2に示した。なお、菌株が得られたポイント名は濃色で囲い表現した。

Table 5-4 Carotenoid producing microorganisms of Kerama Islands, Okinawa

ポイント名	株	属	ポイント名	株	属	
アザハタの根	FM6-1	<i>Paracoccus</i>	ナツナツサンゴ	L7	<i>Mitthylobacterium</i>	
	FM6-2	<i>Paracoccus</i>		TMN7-1	<i>Erythrobacter</i>	
	FM6-3	<i>Paracoccus</i>		TMN7-2	<i>Erythrobacter</i>	
	FM10	<i>Janthinobacterium</i>		TMN8	<i>Maribacter</i>	
阿真ビーチ	TMN17*18* 19-1	<i>Microbacterium</i>		TMN9	<i>Erythrobacter</i>	
	TMN17*18* 19-2	<i>Microbacterium</i>		TMN10	<i>Erythrobacter</i>	
	TMN17*18* 19-3	<i>Microbacterium</i>		TMN11-1	<i>Erythrobacter</i>	
アムロ漁礁	FM1	<i>Janthinobacterium</i>		TMN11-2	<i>Erythrobacter</i>	
アリガーケーブル	L8	<i>Erythrobacter</i>		嘉比前	FM8	<i>Sphingomonas</i>
	FM14-1	<i>Erythrobacter</i>			FM15-1	<i>Erythrobacter</i>
	FM14-2	<i>Erythrobacter</i>	FM15-2		<i>Erythrobacter</i>	
ギナ	TMN1	<i>Erythrobacter</i>	TMN13-1		<i>Erythrobacter</i>	
	MM18	<i>Arenibacter</i>	TMN13-2		<i>Erythrobacter</i>	
古座間味	TMN15-1	<i>Marinobacter</i>	BT01		<i>Sphingomonas</i>	
	TMN15-2	<i>Marinobacter</i>	BT02		<i>Sphingomonas</i>	
	TMN16	<i>Flexibacter</i>				

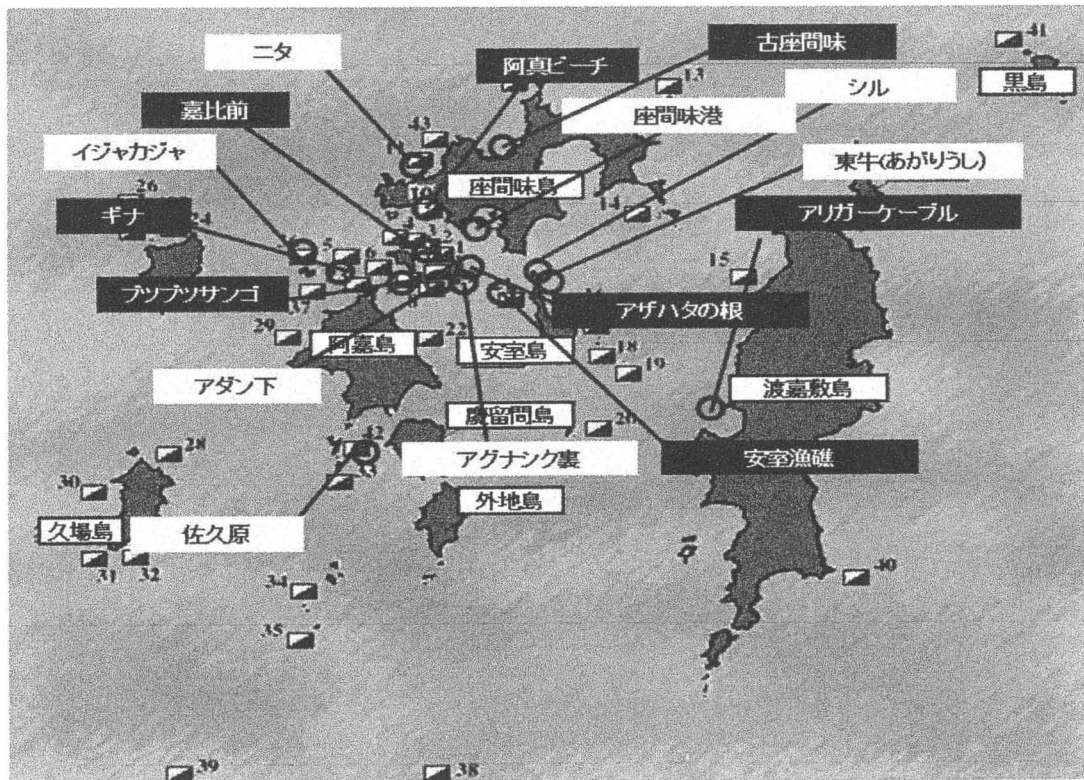


Fig. 5-2 Diving sites of Kerama Islands which obtained carotenoid producing microorganisms

5-2-3 考察

16S rDNA を用いて遺伝子同定を行なった結果を沖縄県慶良間諸島において海水のサンプリングを行なったダイビングポイントと照合した。

その結果、内湾である嘉比前やブツブツサンゴで *Erythrobacter* 属が多数採取されていることがわかった。一般的に *Erythrobacter* 属は海洋に優位に存在し、採取しやすい菌ではあるが、同じ内湾でわずか場所がずれているアザハタの根や阿真ビーチ前では採取できなかつた。これは、潮汐や海流の流れなどの環境要因が微生物叢に影響を与えたと考えられる。

また、通常海洋では見ることのできない *Janthinobacterium* 属も一株ではあるが得ることができた。慶良間諸島は世界的に有数の透明度を誇る海と 300 種類を超えるサンゴ種が生存し貴重な生態系を維持している場所である。これらの要因が微生物叢にも影響を与え、多様な微生物が生存している可能性があり、今後とも継続して調査を行い、5-4 で行なったデータベース化を進めていく必要性があると考えられる。

5-3 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

5-3-1 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^{74,75)}により連結した。得られた結果を統計学の多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。

5-3-2 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なった。16SrDNA 遺伝子配列を国立遺伝子研究所の Clstal 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。

5-3-3 結果

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学的にクラスター解析した。得られた系統樹を Fig. 5-2 に示した。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. 5-3 に示した。

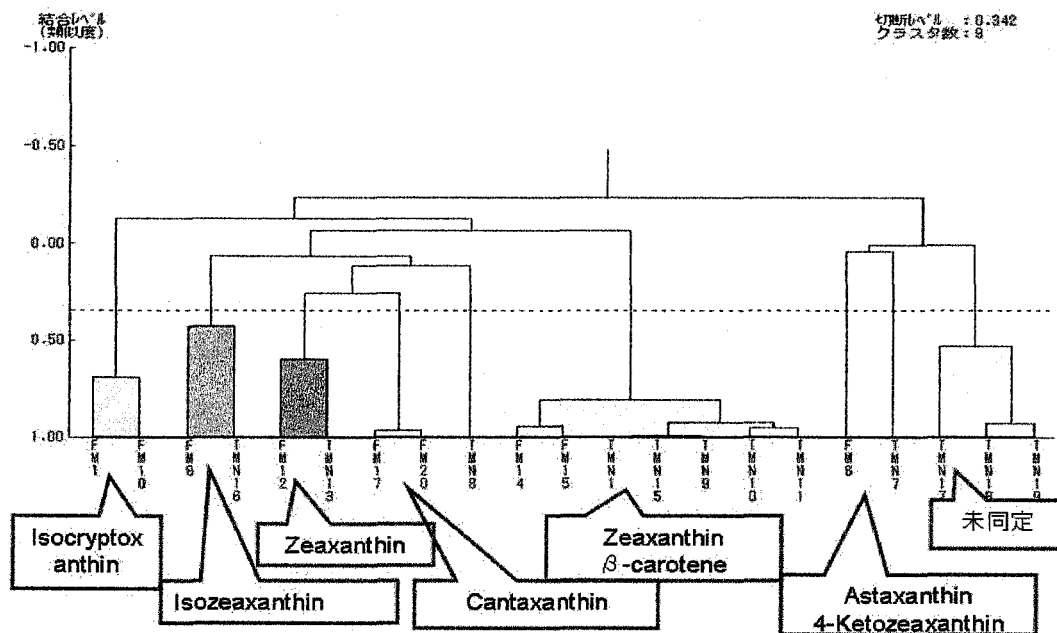


Fig. 5-2 Cluster analysis by the PDA chart pattern of production carotenoid

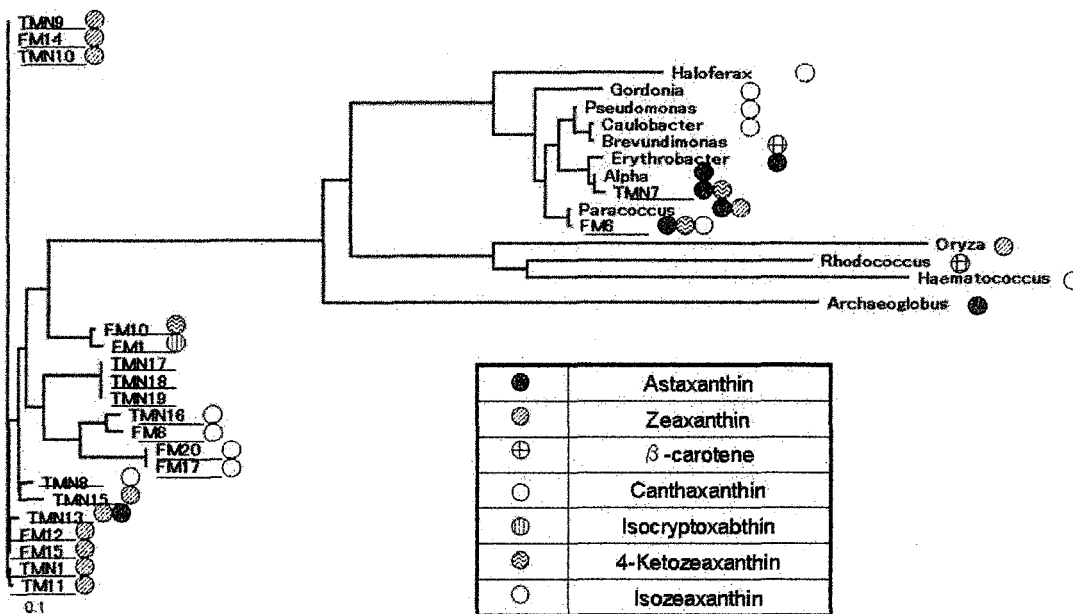


Fig. 5-3 Phylogenetic tree of Carotenoid producing microorganisms. The main carotenoid-producing bacteria are marked by circles.

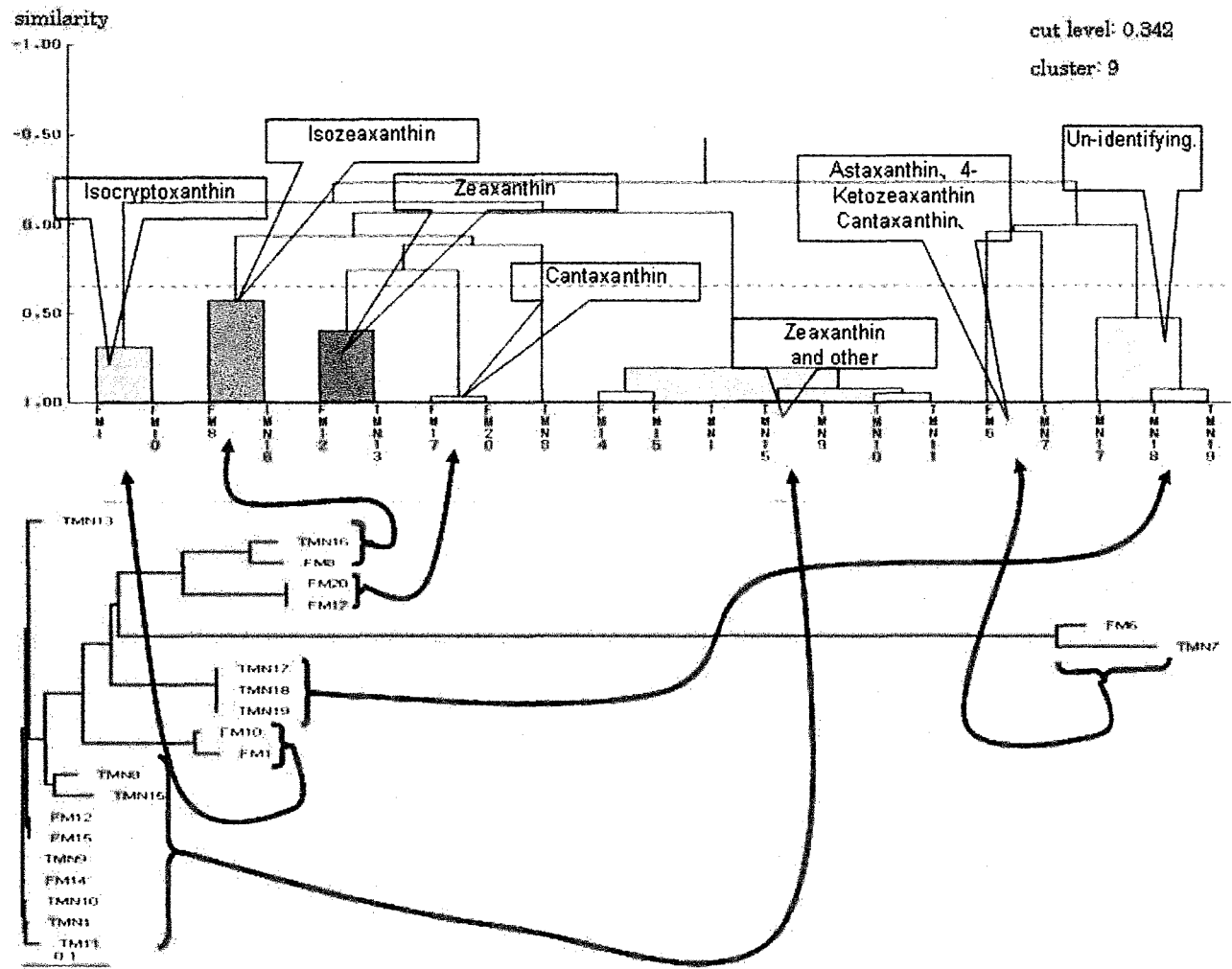


Fig. 5-4 Correlation between carotenoids contents of bacteria and the phylogenetic tree by the cluster analysis

5-3-4 考察

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。なお、今後はさらにサンプル数を増やし、細かい分類を行なうことにより、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。

5-4 海洋由来カロテノイド生産微生物ライブラリーの構築

5-4-1 目的

遺伝子同定を行なった海洋由来微生物をより有効かつ効率的に利用するには、海洋由来カロテノイド生産微生物ライブラリーを作り上げることが肝要である⁵⁾。研究を行なう上で、日々さまざまな写真や計測データなどを作成している。これらの情報をデータベース化しネットワーク上で公開すれば、学術研究に役立つ重要な知的基盤となるはずである。

以上のことから、海洋由来微生物ライブラリーの構築およびそれらのデータベース作成への活動を目的とした。

5-4-2 海洋微生物ライブラリーの構築図と実験作業標準書 (SOP) の作成

海洋由来微生物ライブラリーを構築するにあたって、海洋由来微生物ライブラリー構築図および実験作業標準書 (SOP) を作成した (Fig. 5-5)。

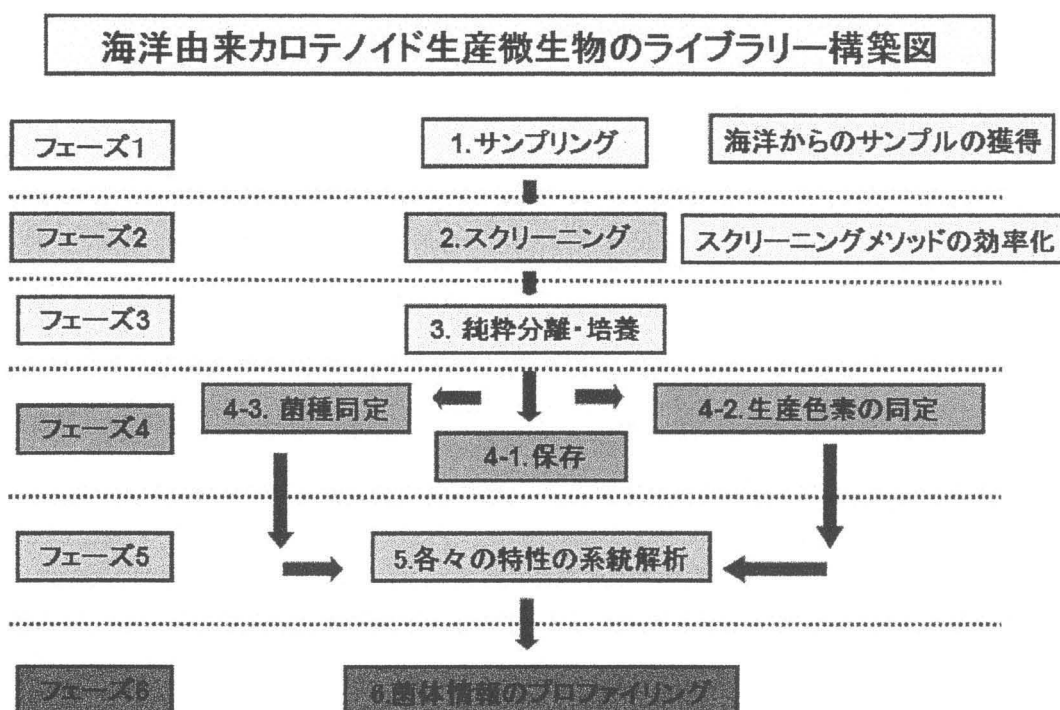


Fig. 5-5 Library construction figure of sea origin carotenoid producing microorganisms

5-4-3 データベースの作成

本研究で単離したカロテノイド生産菌のコロニーの写真、PDA 分析結果、単離源、単離培地、グラム染色結果、カロテノイド含有量、生産色素、近縁種、バンドパターン、16S r RNA 塩基配列および分類学的系統樹をデータベースとして載せた (Fig. 5-6)。

今回得られた 53 株中のデータベースの一例を以下に示した。今後、随時データベース化を進め、データの蓄積を行っていく予定である。

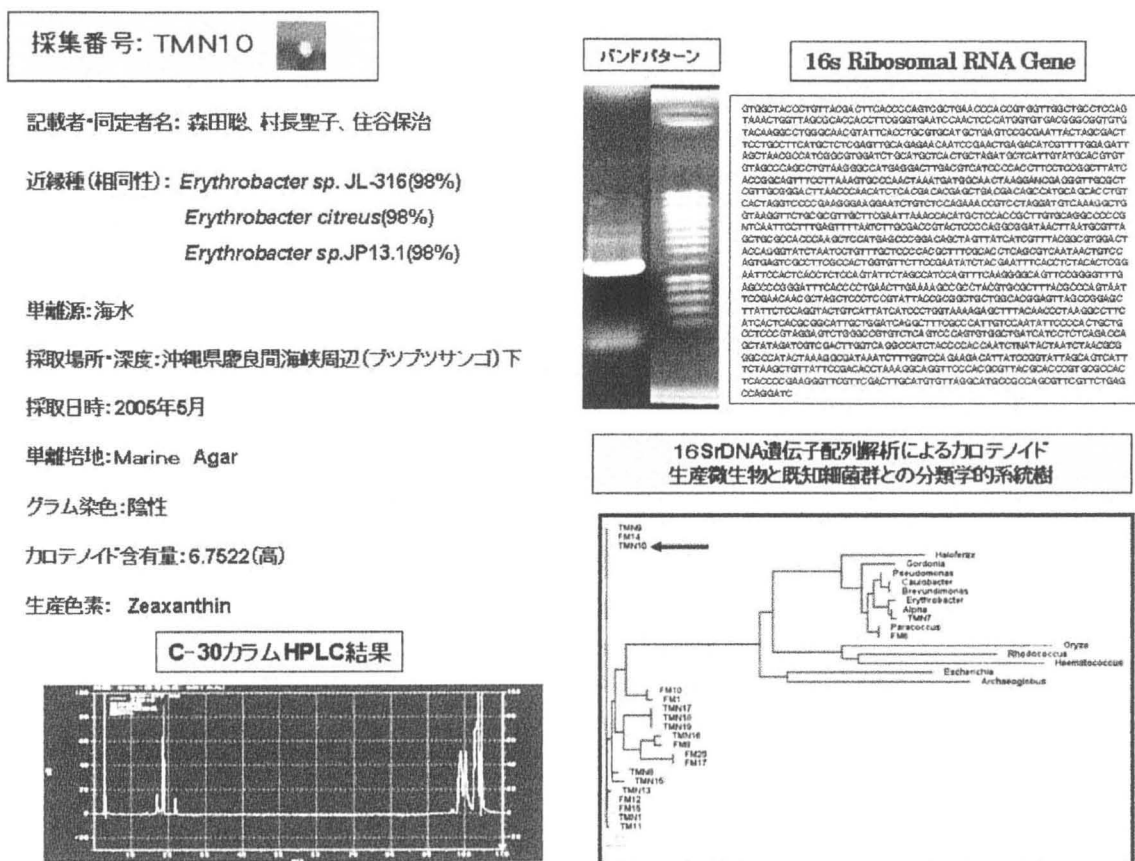


Fig. 5-6 Carotenoid producing microorganisms database

5-5 まとめ

3章で得られたカロテノイド生産菌について16S rDNAをもちいて遺伝子同定(属同定)を行なった。その結果、53株の遺伝子配列が決定し属同定した。*Erythrobacter*属が最も多く26株が得られた。また、フィリピンのパンタヤンビーチから得られたMM-14株は*Polarobacter* sp. (近縁種 *polaribacter dokdonensis* DSW-5)と同定され、領土問題になっている竹島由来の菌株である。日本の竹島由来の株がフィリピンで採取されたことは興味深い。

しかし、電気泳動においてテーリング部位が見られたり、泳動時間に差異があることから、今後はPCR増幅時のアニーリング温度を調整したり²⁸⁾、アガロースゲルをできる限り均一に作成し、電気泳動時間を一定にするなどの改善が必要であると考えられる。また、16S rDNA遺伝子配列解析による属同定においては、リバープライマー(r2L)から5'末端側の360塩基配列による属同定と16S rDNA塩基配列の全長による属同定の結果がほぼ同一の結果として得られる場合もあり、今後は属レベルでの同定がより簡便に行えるようになると考えられる。

次に、16S rDNAを用いて遺伝子同定を行なった結果を沖縄県慶良間諸島のダイビングポイントと照合した。その結果、内湾である嘉比前やブツブツサンゴで*Erythrobacter*属が多く採取されていることがわかった。また、通常海洋では見ることのできない*Janthinobacterium*属も一株ではあるが得ることができた。

次に、本研究で単離したカロテノイド生産菌のデータベースを作成した。コロニー写真、PDA分析結果、単離源、単離培地、グラム染色結果、カロテノイド含有量、生産色素、近縁種、バンドパターン、16S rRNA塩基配列および分類学的系統樹を情報として載せた。今後、随時データベース化を進め、さらなるデータの蓄積を行っていく予定である。

第6章 総括

近年、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天然に広く分布する色素である「カロテノイド」系化合物に着目し研究を行なった。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。そこで優れた生理活性を示す新規カロテノイドのスクリーニングを行なった。

2001年から2007年にかけて、フィリピン、沖縄、高知県を中心に海水や海洋性小動物を採取し、カロテノイド生産菌を得るための有色菌株のスクリーニングを実施した。その結果、総計で334株の有色菌株を得ることができた。

そこで、個々の菌株を純粋培養し、得られた色素を λ -max、TLCおよびPDAを用いて分析を行なった。その結果、沖縄の海水からは84株、フィリピンの海水からは24株、生物からは65株と全体で173株のカロテノイド生産菌を得ることができた。得られたカロテノイドを分析したところ、ZeaxanthinやAstaxanthin生産株が多い結果となった。ただし、カロテノイドを抽出する際、菌体に色素が残ってしまい、完全に抽出が出来ない株が一部に認められ、抽出工程に改善の必要性が考えられた。そこで、温度や破砕回数などの条件を統計学的手法のひとつである実験計画法を用いて検証した。その結果、加温温度は70度、加温時間は10分、凍結解凍の繰り返しは行わず、破砕機で3回の処理を行なうことが最も効果的な抽出方法であると考えられた。

次に、より有用なカロテノイドを量産するために、微生物の物理的培養環境について、音波の周波数、光の周波数に関して実験し、カロテノイドの生産性に与える影響を検証した。音波の超音波域の波長に着目し超音波発生装置を作成し実験を行なった。その結果、酵母であるTL株では、超音波照射によってToruleneが増産され、Torularhodinの合成が超音波によって阻害された。一方、細菌であるFM6株では、カロテノイド含有量が減少したが、含有率においてAstaxanthinが増加した。次に、LEDを用いて近紫外から可視光の波長についてLED照射装置を作成し実験を行なった。得られたカロテノイド生産量のデータを光量子の単位に置き換えた結果、近紫外線域の波長でカロテノイド生産が増加することが分かった。以上より、有用な高極性カロテノイドの増産には、近紫外領域から緑色にかけての波長が有効であることがわかった。その中でも、近紫外線が効果的であると考えられた。そこで、紫外線領域についてUV-AやUV-Cの波長を発する蛍光灯を用いて実験装置を作成し、さらに実験を行なった。

その結果、TMN11株においてUV-A照射によってCaloxanthinおよびNostoxanthin含有比率が増加し、TMN11株の生合成経路が促進された。また、

FM6 株において UV-C 照射によって、カロテノイド含有量に明らかな減少が見られた。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。

次に、上記より得られたカロテノイド生産菌について 16S rDNA をもちいて遺伝子同定(属同定)を行なった。その結果、53 株の遺伝子配列が決定し属同定した。*Erythrobacter* 属が最も多く 26 株得られた。また、遺伝子同定を行なった結果を沖縄県慶良間諸島のダイビングポイントと照合した。その結果、内湾である嘉比前やブツブツサンゴで *Erythrobacter* 属が多数採取されていることがわかった。また、通常海洋では見ることのできない *Janthinobacterium* 属も得ることができた。

また、生産カロテノイドの PDA チャートを用い作成した系統樹と、遺伝子の配列結果を用い作成した系統樹を比較したところ、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、生産カロテノイドと遺伝子配列の両特性の関連性が高いことが認められた。

以上のことより、沖縄県慶良間諸島を中心として海水を採取しカロテノイド生産微生物のスクリーニングを行ってきた。その結果、慶良間諸島では *Erythrobacter* 属をはじめ、通常では海洋で見られない *Janthinobacterium* 属など多様なカロテノイド生産菌が生息していることが分かった。また、その分布状況も環境要因(海流他)に左右されることが認められた。

慶良間諸島は世界的に見ても有数の透明度を誇る海と 300 種類を超えるサンゴ種が生存し貴重な生態系を維持している場所である。これらの要因が微生物叢にも影響を与え、多様な微生物が生息している可能性があり、今後も継続して調査を行っていく必要があると考えられる。

参考文献

1. 鈴木泰二、新世紀百科辞典第二版、53、学研、1983
2. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, 1995. Carotenoid vol. 1A. Birkhouser, Swizerland.
3. Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, 2004. Carotenoids Handbook. Birkhouser, Swizerland.
4. Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lenderer MO, Breithaupt DE, Von Linting J, 2001. Identification and characterization mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative of provitamin A. J Biol Chem. 276(17):12110-6
5. 橘和夫、生物工学会誌第4号、160-164、1999
6. 森徹：養殖魚の体色改善、水産学シリーズ 94 海洋生物のカロテノイド—代謝と生物活性、幹渉編、日本水産学会監修、p59-p68、1993、恒星社厚生閣、東京。
7. Steven, D.M. : Studies on animal carotenoids, J. Exp. Biol., 1948, 25, 369-387.
8. Mori, T., Makabe, K., Yamaguchi, K., Konosu, S., Arai, S. : Comparison between krill astaxanthin diester and synthesized free astaxanthin supplemented to diets in their absorption and seposition by Juvenile Coho Salmon (*Onchorynchus kisutch*), 1989, 93B, 225-258.
9. Smith, B.E., Hardy, R.W., Torrissen, O.J. 1992. Synthetic astaxanthin deposition in pan-size coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Aquaculture, 104, 105-119.
10. Fujita, T., Satake, M., Watanabe, T., Kitajima, C., Miki, W., Yamaguchi, K., Konosu, S. : Pigmentation of cultured red sea breeam with astaxanthin disaster purified from krill oil, Bull. Jap. Sos. Sci. Fish., 1983, 49, 1855-1861.
11. 与賀田稔久：マダイの養殖と体色調製、長崎水試登録, 1968, 287, 1-17.
12. Johnson, E.A., Conklin, D.E., Lewis, M.J. : The yeast *Phaffia rodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans, J. Fish Res. Boad. Can., 1977, 34, 2427-2421.
13. Johnson, E.A. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey, Int. Microbiol. 6, 169-174.

14. Young A, Britton G, 1993. Carotenoids in Photosynthesis Chapman and Hall, UK
15. Stermer BA, Bianchini GM, Korth KL. 1994. Regulation of HMG-CoA reeducate activity in plants. *J Lipid Res.* 35(7):1133-40.
16. Schafer L, Sandmann M, Woitsch S, Sandmann G. 2006. Coordinate up-regulation of carotenoid biosynthesis as a response to light stress in *synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Environ.* 29(7):1349-56.
17. Simkin AJ, Zhu C, Kuntz M, Sandmann G. 2003. Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (*Capsicum annuum*) leaves. *J Plant Physiol.* 160(5):439-43.
18. Von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleining H. 1997. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.* 12(3):625-34
19. Bohne F, Linden H, 2002. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta.* 1579(1):26-34
20. Ryu JY, Song JY, Lee JM, Jeong SW, Chow WS, Choi SB, Pogson BJ, Park YI. 2004. Glucose-induced expression of carotenoid biosynthesis genes in the dark is mediated by cytosolic pH in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol. Chem.* 279(4):25320-5
21. Steinbrenner j, Linden H. 2001. Regulation of two carotenoid biosynthesis gene coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol.* 125(2):810-7.
22. Lotan T, Hirschberg J. 1995. Cloning and expression in *Escherichia Coli* of the gene encoding beta-C-4-oxygenase, that converts beta-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett.* 364(2):125-8.
23. Schmidhouser TJ, Lauter FR, Schumacher M, Zhou W, Russo VE, Yanofsky C. 1994. Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J Biol Chem.* 269(16):12060-6.

24. Schmidhouser TJ, Lauter FR, Russo VE, Yanofsky S. 1990. Cloning, Sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics*. 10(10):5064-70.
25. Thewes S, Prado-Cabrero A, Prado MM, Tudzynski B, Avalos J. 2005. Characterization of a gene in the *car* cluster of *Fusarium fujikuroi* that codes for a protein of the carotenoid oxygenase family. *Mol Genet Genomics*. 274(3):217-28.
26. Velayos A, Blasco JL, Alvarez MI, Iturriaga EA, Eslava AP. 2000. Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta*. 210(6):938-46.
27. Ramakrishnan L, Tran HT, Federspiel NA, Falkow S. 1997. A *crtB* homolog essential for photochromogenicity in *Mycobacterium marinum*: isolation, Characterization, and gene disruption via homologous recombination. *J Bacteriol*. 179(18):5862-8.
28. Ruiz-Hidalgo Mj, Benito EP, Sandmann G, Eslava AP. 1997. The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol Gen Genet*. 253(6):734-44.
29. Madhour A, Anke H, Mucci A, Davoli P, Weber RW. 2005. Biosynthesis of the xanthophyll plectanixanthin as a stress response in the red yeast *Dioszegia* (Tremallales, Hetero Basidiomycetes, Fungi). *Phytochemistry*. 66(22):2617-26.
30. Sakaki H, Nakanishi T, Satonaka K, Miki W, Fujita T, Komemushi S. 2000. Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *J Biosci Bioeng*. 89(2):203-5
31. Thewes S, Prado-Cabrero A, Prado MM, Tudzynski B, Avalos J. 2005. Characterization of a gene in the *car* cluster of *Fusarium fujikuroi* that codes for a protein of the carotenoid oxygenase family. *Mol Genet Genomics*. 274(3):217-28.
32. Velayos A, Pappa T, Aguilar-Elena R, Fusntes-Vicente M, Eslava AP, Iturriaga EA, Alvarez MI. 2003. Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase, is up-regulated by blue light in *Mucor Circinelloides* *Curr Genet*. 43(2):112-20.
33. Verdoes JC, Misawa N, van Ooyen AJ. 1999. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng*. 63(6):750-5.

34. Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. 2005. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J. Biol. Chem.* 187(5):1825-32
35. Schroeder WA, Johnson EA. 1995. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* 270(31):18374-9.
36. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research 1997 Food, Nutrition and the Prevention of Cancer; a global perspective. 6.3 Vegetables and fruits. 436-446
37. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Comparative Risk Assessment collaborating group(cancers). 2005. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* 366(9499):1784-93.
38. Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li Gy. 1993. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific Vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl. Cancer Inst.* 85(18):1483-92.
39. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. 1994. The effect of Vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Eng J Med.* 330(15):1029-35
40. Omenn GS, Goodman G, Thornquist M, Grizzzle J, Rosenstock L, Barnhart S, Balmes J, Cherniack MG, Cullen MR, Glass A, 1994. The beta-carotene and asbestos-exposed workers. *Cancer Res.* 54(7 Suppl):2038s-2043s
41. Mannisto S, Smith-Waner SA, Spiegelman D, Albanes D, Anderson K, van den Brandt PA, Cerhan JR, Colditz G, Feskanich D, Freugdengheim JL, Gionavannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Rohan TE, Virtamo J, Willet WC, Hunter DJ. 2004. Dietary carotenoid and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies. *Cancer Epidemiol Bioarkers Prev.* 13(1):40-8.
42. Cook NR, Stampfer MJ, Ma J, Manson JE, Sacks FM, Burning JE, Hennekens CH. 1999. Beta-carotene supplementation for patients with low baseline

- levels and decreased risks of total and prostate carcinoma. *Cancer*. 86(9):1783-92
43. Russell RM. 2004. The enigma of beta-carotene in carcinogenesis: what can be learned from animal studies. *J Nutr*. 134(1):262s-268s.
 44. Kleinjans JC, van Herwijnen MH, van Maanen JM, Maas LM, de Kok TM, Moonen HJ, Briede JJ. 2004. In vitro investigations into the interaction of beta-carotene with DNA: evidence for the role of carbon-centered free radicals. *Carcinogenesis*. 25(7):1249-56
 45. Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*. 91(4):317-31.
 46. Giovannucci E. 2002. A review of epidemiologic studies, lycopene, and prostate cancer. *Exp Biol Med*. 227(10):852-9.
 47. Boileau TW, Liao Z, Kim S, Lemeshow S, Erdman JW Jr, Clinton SK. 2003. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. *J Natl Cancer Inst*. 95(21):1578-86
 48. Siler U, Barella L, Spitzer V, Schnorr J, Lein M, goralczyk R, Wertz K. 2004. lycopene and vitamin E interfere with autocrine/paracrine loops in the Dunning prostate cancer model. *FASEB J*. 18(9):1019-21.
 49. Kucuk O, Sarkar FH, Sakr W, Djuric Z, Pollak MN, Khachik F, Li YW, Banerjee M, Grignon D, Bertram JS, Crissman JD, Pontes EJ, Wood DP Jr. 2001. Phase II randomized clinical trial of lycopene supplementation before radical prostatectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10(8):861-8.
 50. Age-Related Eye Disease Study Research Group, SanGiovanni JP, Chew EY, Clemons TE, Ferris FL 3rd, Gensler G, Lindblad AS, Milton RC, Seddon JM, Sperduto RD. The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. *Arch Ophthalmol*. 2007 Sep;125(9):1225-32.
 51. 灘岡和夫・二瓶泰雄・花田岳・藤井智史・佐藤健治・池間健晴・鹿熊信一朗・岩尾研二・若木研水：HF レーダ・漂流ブイ・数値シミュレーションによるサンゴ幼生の広域輸送解析，土木学会海岸工学論文集，Vol. 48，No. 1，pp. 431-435，2001.

52. A. Yokoyama, H. Izumida, Y. Shizuri, New carotenoid Sulfate Isolated from a Marine Bacterium, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(11), 1877-1878, 1996
53. 清水考重：「概説食用天然色素」9、59-72(1992)
54. T. W. Goodwin, “*The Biochemistry of the Carotenoids*”, Vol. I, Chapman and Hall, London, (1980)
55. J. W. McBeth, Carotenoids from nudibranchs, *Comp. Biochem. Physiol.*, 41, 55-68, 1972
56. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, *Carotenoids Vol. 1B: Spectroscopy*
57. K. L. Simpson, C. O. Chichester, H. J. Phaff: “The Yeasts”, p493, 1971
58. 畑中信一、超音波による化学反応と気泡挙動の関係 電気通信大学、超音波テクノ、2002年、7-8月号
59. Shengli Yang, Hui Zhang, Yaqin Li, Junqing Qian, Wu Wang. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 139-144(2005)
60. 高市真一他：カロテノイド-その多様性と生理活性-, 裳華房, 139-140, 2006
61. R. Y. Stanier 他：高橋甫他訳：The Microbial World 5th Edition, 培風館, 65-66, 1978
62. Yasuhiro Nishida, Kyoko Adachi, Hiroaki Kasai, Yoshikazu Shizuri, Kazutoshi Shindo, Akiyoshi Sawabe, Sadao Komemushi, Wataru Miki, Norihiko Misawa: Elucidation of a Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster Encoding a Novel Enzyme, 2, 2' - β -Hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. Strain SD212 and Combinatorial Biosynthesis of New or Rare Xanthophylls, *Appl. Environment. Microbiol.*, vol. 71, (No. 8), P4286-4296, 2005
63. 多賀光彦ら, 物質化学の基礎, 三共出版, 1993
64. 国立天文台編, 理科年表, 平成 11 年度版, 丸善, 1999
65. 石川嘉隆, 村松徳之, 光センサ用 フォトダイオードの基礎知識, トランジスタ技術 2003 年, 12 月号, CQ 出版社, 171-172, 2003
66. 稲田勝美: 光と植物生育, 養賢堂, 1984
67. Butler, J.M., Buel, E., Crivellente, F., and McCord, B.R. (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, 25, 1397-412
68. Sgueglia, J.B., Geiger, S., and Davis, J. (2003) Precision studies using the ABI prism 3100 genetic analyzer for forensic DNA analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 1247-1254.

69. Higgins, D. G., Thompson, J. D., and Gibson, T. J. (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.*, **266**, 383-402.
70. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
71. Dietmar, V., et al., 1999. "Polyphasic classification of 0.2 μ m filterable bacteria from the western Mediterranean Sea" *System. Appl. Microbiol.* **22**, 635-646.
72. 渡部嘉哉, 富永明, 松本健治, 倉繁隆信, 2000. "炎症細胞に対する作用の解明" 平成 11 年度科学技術総合委託費地域先導研究研究成果報告書 室戸海洋深層水の特長把握および機能解明 pp. 147-156.
73. 佐藤留美、蒲生卓磨、島 純、川本伸一 食総研報 No. **66**, 9-14 (2002)
74. Sourdís, J., and Krimbas, C. (1987) Accuracy of phylogenetic trees estimated from DNA sequence data. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 159-166.
75. Saitou, N. (1988) Property and efficiency of the maximum likelihood method for molecular phylogeny. *J. Mol. Evol.*, **27**, 261-73.

謝辞

本研究を取りまとめるにあたり、終始ご懇篤なご指導、ご助言を賜りました、近畿大学農学部米虫節夫教授および坂上吉一教授に厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるに際し、ご懇切な校閲の労をお取りいただきました近畿大学農学部細谷和海教授および若月利之教授に心より感謝申し上げます。

また、実験遂行および本稿をまとめるにあたって、貴重なご助言をいただきました、近畿大学農学部のジン・タナンゴナン講師、澤邊昭義准教授ならびに千寿製薬株式会社の榊秀之氏に深く感謝致します。

沖縄県座間味島での海水のサンプリングには、ダイビングショップ「Cats in KERAMA」のスタッフの皆様にご協力をいただきました。また高知県柏島での海水サンプリングには、ダイビングショップ「AQUAS」のスタッフの皆様にご協力をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

また本研究の実行にあたり、ご協力いただきました、西田康弘氏、竹田竜嗣氏、原田昌之氏、永末有美氏、村長聖子氏、橘 聖氏、東島弘幸氏、梶田智子氏、平川理恵氏、平林幹大氏、鮫島直己氏、大澤早希氏、間寫祥子氏を初めとする近畿大学農学部環境管理学科 環境化学研究室の諸氏に深く感謝致します。

最後に、黒潮生物研究所 岩瀬文人氏にはサンゴ礁域での海水採取を行うにあたり、本研究の遂行と指針について終始有益な御助言ならびに暖かい励ましをいただきました。この場をお借りして深く御礼申し上げます。

海洋は地球全体の面積の約 70%をしめており、そこには多種多様な生物が生息している。人類は古くから食料をはじめ海洋資源を利用しており、また海洋生物からの天然色素も有効に利用してきた。もっとも古い例では、エジプトのミイラの着衣がすでにインジゴで染められていた。また、ある種の色素には薬理作用があり、また色は人間の情緒的ならびに心理的効果に対しても活用されてきた。

カロテノイドは、自然界に広く分布する脂溶性の色素である。一部の例外を除いて、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。カロテノイドの研究の歴史は、意外に古く 19 世紀初頭から研究が行なわれ、はじめにパプリカ (*Capsicum annuum*)、少し遅れてニンジンから脂溶性色素として単離されている。 β -carotene を中心とした多くのカロテノイドは生体内でビタミン A となるプロビタミン A 活性を有している。現在では、750 種類を超えるカロテノイドが自然界から単離されているが、産業的に利用されているものは極少数である。陸上の生物は生産するカロテノイドの種類が少なく大量培養が困難であることが知られている。そこで、カロテノイドの生産資源として、安定した大量培養が容易な微生物が期待されている。しかしながら、海洋性微生物のカロテノイド生産菌に関する知見は少なく、カロテノイド生産性をもつ新規微生物の発見、あるいは、新規カロテノイドの発見の可能性を秘めている。

海洋、特に熱帯・亜熱帯の海洋表層や夏期の海岸などは極めて強い太陽光線に晒され、容易に活性酸素やフリーラジカルが発生し易い環境である。陸上生物と海洋生物の生息環境の差異を考慮すると、陸上とは異なり太陽光線に直接晒されながら生活している海洋生物は活性酸素に対する何らかの防御機能を獲得していると考えられる。

そこで、生体脂質の酸化に対する生体防御機能としてカロテノイドなどを生産していると考えられる海洋性微生物に着目した。本研究では、亜熱帯海域に棲息するカロテノイド生産微生物の探索を行い、その諸特性について研究した。亜熱帯サンゴ礁域の海水から微生物の単離を行い、さらにカニや二枚貝などの海洋性動物に常在する細菌についても対象を広げて研究を進めた。そして、採取した菌株のカロテノイド類の組成、培養条件および遺伝学的な特性について検討した。

1) 海洋資源からのカロテノイド生産微生物の探索

2001 年から 2007 年にかけて、フィリピン、沖縄、高知県や近畿圏を中心に海水や海洋性小動物を採取しカロテノイド生産菌を得るための有色菌株のスクリ

ーニングを行った。結果、総計で 334 株の有色菌株を得ることができた。そこで、個々の菌株を純粋培養し、得られた色素を λ -max、TLC、PDA を用いて分析を行った。その結果、沖縄の海水から 84 株、フィリピンの海水から 24 株、また海洋生動物からは 65 株と、全体で 173 株のカロテノイド生産菌を得ることができた。生産カロテノイドを分析したところ、Zeaxanthin や Astaxanthin 生産株が多い結果となった。ただし、カロテノイドを抽出する際、菌体に色素が残り完全に抽出が行えない株が一部に見られた。そこで、抽出工程の改善を目的に、抽出の際の物理的条件について統計学的手法のひとつである実験計画法を用いて検証を行った。その結果、70°C の加温処理が効果的な抽出方法であると考えられた。

2) 培養特性

次に、より有用なカロテノイドを量産するために、微生物の物理的培養環境について、音波の周波数、光の周波数に関して実験し、カロテノイド生産に与える影響を検証した。音波の超音波域の波長に着目し、超音波発生装置を作成し実験を行った。その結果、細菌である FM6 株ではカロテノイド含有量が減少したが、含有率において Astaxanthin が増加した。次に、LED を用いて近紫外から可視光の波長について実験を行った。得られたカロテノイド生産量のデータを光量子の単位に置き換えた結果、近紫外線域の波長でカロテノイド生産が増加することが分かった。

そこで、紫外線領域について UV-A や UV-C の波長について、さらに実験を行った。その結果、光合成細菌である TMN11 株において Caloxanthin および Nostoxanthin の含有比率が増加し、カロテノイドの生合成経路が促進された。一方、非光合成細菌である FM6 株において、カロテノイド含有量に明らかな減少が見られ、カロテノイドの生産も阻害された。これは、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。以上より、適切な条件下で抗酸化性の高い有用なカロテノイドを量産させることが可能であることが分かった。

3) カロテノイド生産微生物の遺伝学的特性

次に、上記より得られたカロテノイド生産菌について 16S rDNA をもちいて遺伝子同定(属同定)を行った。その結果、53 株の遺伝子配列が決定し属同定した。*Erythrobacter* 属が最も多く 26 株得られた。また、遺伝子同定を行った結果を沖縄県慶良間諸島のダイビングポイントと照合した。その結果、内湾である嘉比前やブツブツサンゴで *Erythrobacter* 属が偏って採取されていることがわかった。また、通常海洋で見られない *Janthinobacterium* 属など多様なカロテノ

イド生産菌が生息していることが分かった。

また、生産カロテノイドの分析結果である PDA チャートをクラスター解析し、その結果を、16S rDNA を用いた遺伝配列の結果から得た進化系統樹と比較した。そして、2つの解析の間には、若干の相関が認められた。

最後に、本研究で単離したカロテノイド生産菌のデータベースを作成した。コロニーの写真、PDA 分析結果、単離源、単離培地、グラム染色結果、カロテノイド含有量、生産色素、近縁種、バンドパターン、16S rRNA 塩基配列、分類学的系統樹を情報として載せた。なお、今後はこのデータベースをもとにデータの更なる蓄積を目指す予定である。

The ocean occupies about 70% of the area of planet earth. And is home to a variety of living organisms. Human beings have been using the marine resources including food since ancient times. The natural pigments from the ocean were also used. Clothes of the mummy of Egypt were dyed by the indigo. There are pharmacological action and psychological effect in some kind of coloring materials.

Carotenoid are liposoluble pigments distributed widely in the nature. The research history of carotenoid started at the early of 19th century. Carotenoid was isolated from paprika (*Capsicum annuum*) at first. Almost all carotenoids such as β -carotene possess the provitamin A activity which metabolite to vitamin A in the living body. Although above 750 carotenoids are isolated from the nature, only few kinds of them are used industrially. Then production of carotenoid by microorganisms would be expected, but there are few kinds of carotenoid originated from living thing on land. And there is little knowledge about the carotenoid producing microorganisms in the oceanic. It has the possibility of discovery on the new carotenoid-producing microorganisms.

In the subtropical region there are very strong sunlight. The surface of the sea and coral reefs in this area is a severe environment for the growth of microorganisms. While this condition produces reactive oxygen species, the continuing strong irradiation can also lead to damaging and lethal photooxidative reactions. Many other undiscovered microorganisms would possess protective mechanisms such as antioxidative activity for survival in this environment. On above mentioned aspect, this study focused on the marine microorganisms around the coral reefs, especially the carotenoid-producing bacteria possessing antioxidative activity.

In this research, we searched for carotenoid producing microorganisms from subtropical ocean areas. We extended our search to include oceanic animals such as crabs and bivalves. Chemical composition, culture condition and genetic characteristics of the carotenoid from carotenoid-producing microorganisms were also examined.

1) Search of carotenoid producing microorganisms from marine resources

From 2001 to 2007, sea water and oceanic small animals were extracted in the Philippines, Okinawa and Kochi. And the colored strains are screened

in order to obtain carotenoid-producing microorganisms.

As a result, 334 colored strains were obtained. After each strain was grown in pure culture medium, carotenoid was extracted, and analyzed by using λ -max, TLC and PDA. Carotenoid-producing microorganisms 173 strains were collected.

There were many Zeaxanthin and Astaxanthin producing strains. Moreover, the extraction procedure has also been improved. The experimental design, one of the statistical techniques, was used for the education of carotenoid production ability.

2) Culture characteristics

In order to collect mass-production of useful carotenoid, the physical culture environment of the microorganisms are tested.

The effect of the sound wave and light on the carotenoid production of microorganisms was investigated. First, the effect supersonic wave was experimented. In FM-6 strain (bacteria) carotenoid content decreased, which Astaxanthin content increased.

Next, the effect of the wavelength (from ultraviolet to a visible light) was tested. As a result, carotenoid production increased on irradiation of the wavelength near the ultraviolet ray region.

Then, experiments were made with irradiation of UV-A and UV-C (ultraviolet radiation). TMN-11 strain (photosynthetic bacterium) was promoted, the biosynthetic path of carotenoid. On the other hand, in FM-6 strain (a non-photosynthetic bacterium) are production of carotenoid was inhibited. This phenomenon would be based on the difference of membrane structure between photosynthetic bacteria and non-photosynthetic bacteria. In suitable condition, mass production of the useful carotenoid would be expected.

3) Genetic characteristics of a carotenoid-producing microorganism

Identification of the carotenoid-producing microorganisms was performed genetically by using 16S rDNA. Gene sequences 53 strains became to be clear, and genus was clear determined. Many *Erythrobacter* sp. (dominant bacteria: 26 strains) were obtained.

The result of gene identification was compared with the diving point of Okinawa Kerama Islands. *Erythrobacter* sp. was extracted partially from

gahimae and bustubustusango. Moreover, various carotenoid-producing microorganisms also survived, such as a *Janthinobacterium* sp. which is not usually got from the ocean. Distributions of microorganisms were found to be influenced by water environment.

Cluster analysis was also performed by stratification results of the ratio of carotenoids detected with PDA (Photo diode alley). The result of the statistical analysis was compared with the phylogenetic tree.

Finally, a database of the carotenoid producing microorganisms in this research was also created.