

■ 研究課題名

北海道の農畜産加工副産物を原料とした糖脂質セレブロシド発酵生産技術の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① 酵母セレブロシドの構造解析および生理機能の解明
（◎大西 正男／国立大学法人帯広畜産大学）
- ② ビートモラセスを原料としたセレブロシド高蓄積酵母培養技術の開発
（田村 雅彦／日本甜菜製糖(株)）
- ③ チーズホエーを原料としたセレブロシド高蓄積酵母培養技術の開発
（元島 英雅／よつ葉乳業(株)）
- ④ セレブロシド高蓄積乳酵母の探索およびセレブロシド分子種の解析
（荒井 威吉／国立大学法人帯広畜産大学）
- ⑤ セレブロシドおよび関連脂質高蓄積酵母の分子育種による作出
（◎小田 有二 [H14～17]、高桑 直也 [H18] / (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター）
- ⑥ 酵母菌体からのセレブロシドの抽出・精製方法の開発ならびにセレブロシド高蓄積酵母の食品素材への利用性の検討
（小野 治三郎 [H14～16]、間 和彦 [H17～18] / 日本製粉(株)）

■ 研究の目的

北海道東部で多量に生じている農畜産加工副産物であるビートモラセス(廃糖蜜)とチーズホエー(乳清)を原料として、新たに発見したセレブロシド蓄積酵母(*Saccharomyces kluyveri* と *Kluyveromyces lactis*)を培養して、セレブロシドを発酵生産する技術を開発する。また、酵母菌体中のセレブロシドを効率的に分離精製する工程を確立するとともに、セレブロシドの生理機能を解明し、新たな機能性食品素材等の活用方策を確立する(図1)。

■ 主要な成果

- ① *S. kluyveri* については、研究機関保存株の中からビートモラセスで培養したときにセレブロシドを高蓄積する菌株を選抜した(図2)。また、*K. lactis* については、国内外の乳製品から分離される乳糖資化性酵母(主に *K. lactis*)を探索し、宮城県産乳より分離した *K. lactis* M-11 株をチーズホエーを用いたセレブロシドの発酵生産に適した菌株として選抜した(図2)。
- ② セレブロシド高蓄積株の *S. kluyveri* CBS6546 については、ビートモラセスを含んだ培地で、また、*K. lactis* NBRC1267 については、チーズホエーを含んだ培地で、それぞれ培養法の最適化を検討した結果、CBS6546 については糖欠乏による栄養制限下での培養で、NBRC1267 についてはクエン酸と硫安の添加で、セレブロシドがビートモラセスまたはチーズホエーのみで培養した場合と比較してそれぞれ約2～3倍増加した(図3)。
- ③ セレブロシド含量と菌体収量のバランスが良い *S. kluyveri* CBS4800 (四倍体) の半数体(二倍体)を計30株分離し、この中から培養液当りのセレブロシド含量(セレブロシド収量)がより高いSP-25株を実用菌株として選択し、ビートモラセスを用いたセレブロシドの発酵生産に使用することとした(図4)。
- ④ セレブロシド合成に係るすべての酵素遺伝子群をクローニングし、各遺伝子の過剰発現株を作製してそれぞれのセレブロシド含量を測定したところ、セラミド合成酵素遺伝子(*LAC1*)を過剰発現することによってセレブロシドが対照群(ベクターのみの群)と比較して倍増することを見出した(図5)。

- ⑤セレブロシド構造を精査した結果、構成スフィンゴイド塩基において特徴的な真菌型セレブロシド(9-メチルスフィンガジエニン含有型)を蓄積する酵母の他に、植物型セレブロシドを蓄積する乳酵母(*K. marxianus*) および両者の中間を示す酵母を見出した(図6)。また、嫌気培養では中間型の *K. thermotolerans* がヒト型のセレブロシドを生産した。
- ⑥セレブロシドのガンに対する機能を検討し、酵母セレブロシドより精製した9-メチルスフィンガジエニン(9-Me d18:2^{4t, 8t})を含めたすべての構成スフィンゴイド塩基が大腸ガン細胞(Caco-2)へのアポトーシス誘導作用を有することを確認した(図7)。また、ジメチルヒドラジン投与による大腸腺腫(ポリープ)誘発マウスにおいて、食餌性セレブロシドが大腸腺腫の発症を抑制することを見出し、酵母セレブロシドのガン予防効果を細胞および実験動物レベルで実証した(図8)。
- ⑦胆癌移植マウスでは、セレブロシドの経口投与によって脾細胞でのサイトカイン(インターフェロン- γ とインターロイキン-2)の誘導促進が認められ、免疫賦活効果を有することが明らかとなった(図9-A)。また、皮膚移植腫瘍細胞の縮小効果が観察された(図9-B)。
- ⑧ビートモラセスおよびチーズホエーを用いて培養した酵母菌体から、エタノール抽出、アルカリ分解、濃縮・精製などを行ってセレブロシド素材(10%含有の粉末とソフトカプセル)を生産する技術を確認するとともに(図10)、セレブロシド蓄積乾燥酵母の製剤化技術も確立した。
- ⑨皮膚に対する生理機能として、B16メラノーマ細胞におけるセレブロシドのメラニン生成抑制効果を実証した(図11)。また、セレブロシド摂取によるヒト皮膚での保湿性向上(図12)ならびにアトピー性皮膚炎モデルマウス(NCマウス)での血漿IgEの低下などを明らかにした。
- ⑩このように、本研究によって、ビートモラセスおよびチーズホエーを用いたセレブロシド高蓄積酵母培養技術を開発した。また、セレブロシドのガンに対する効果を明らかにするとともに、皮膚美白・保湿素材としての実用化の可能性を提示した。

■ 公表した主な特許と論文

- ①特願 2003-430388:大腸ガン抑制剤およびそれを含む食品 日本製粉(株)、日本甜菜製糖(株)
- ②特願 2004-240263:セレブロシドの発酵生産方法 よつ葉乳業(株)
- ③Tamura, M., *et al.*: Production of cerebroside from beet molasses by the yeast *Saccharomyces kluyveri*, *Food Biotechnology*, **19**, 95-105, 2005.
- ④Sugai, M., *et al.*: Selection of lactic yeast producing glucosylceramide from cheese whey, *Bioresource Technology*, 2007, in press.

■ 今後の展開方向

- ①酵母セレブロシドの工業的生産技術の開発(工場での培養時におけるセレブロシド収量の安定化、分離精製段階での低コスト化)。酵母抽出残渣の高度利用技術の開発。
- ②皮膚保湿ならびに美白作用を訴求した機能性食品や外用スキンケア品の試作品の作製。
- ③ガンに対する機能研究を医学系研究機関とともに開始。

■ 問い合わせ先

- ①酵母セレブロシドの工業的生産技術の開発:日本甜菜製糖(株)清水バイオ事業所(01566-2-2104)、よつ葉乳業(株)中央研究所(011-377-5561)、(独)農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター(0155-62-9281)
- ②皮膚への効用に関する研究:日本製粉(株)中央研究所(046-222-6963)
- ③ガンに対する機能研究:国立大学法人帯広畜産大学(0155-49-5546)

■ 研究成果の具体的図表

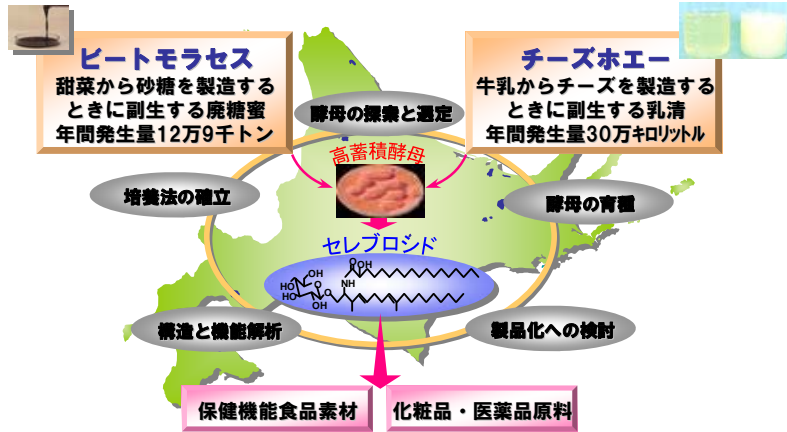


図1 研究の目的

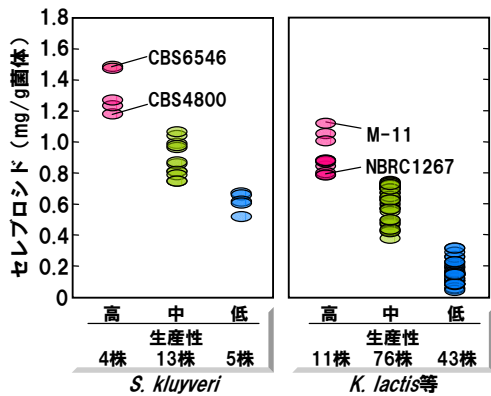


図2 酵母菌株によるセレブロシド生産性の検討

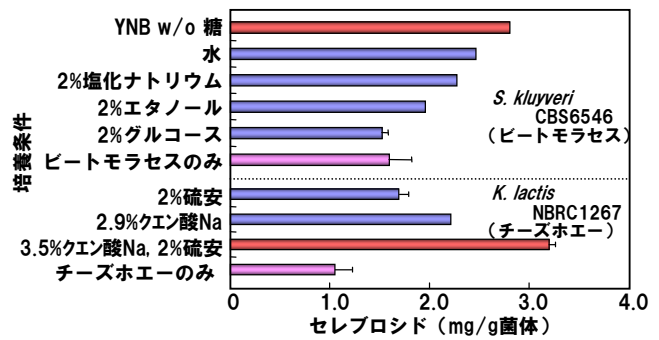


図3 ビートモラセスとチーズホエーを用いた培養条件によるセレブロシド含量の違い

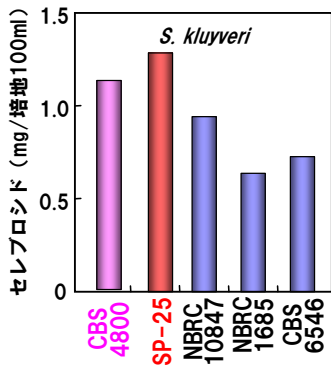


図4 胞子分離により得られた実用菌 (SP-25 株) と研究機関保存株のセレブロシド収量

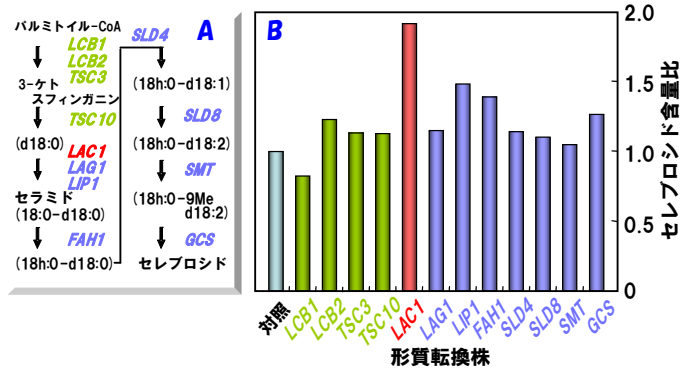


図5 セレブロシド高生産性 *K. lactis* 形質転換株の造成
A, セレブロシド合成経路と代謝関連遺伝子
B, 各遺伝子過剰発現株のセレブロシド含量

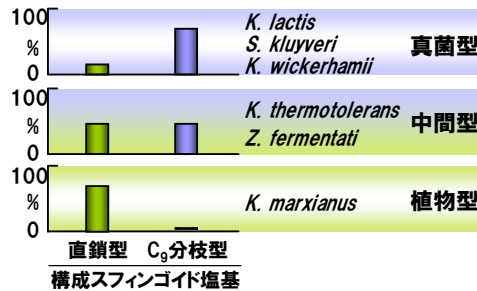


図6 酵母が生産するセレブロシドのタイプ

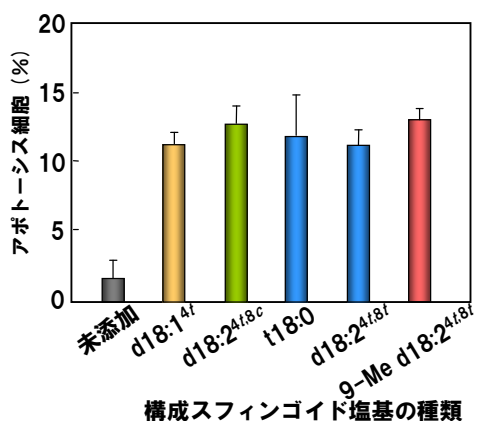


図7 各種スフィンゴイド塩基によるヒト結腸ガン(Caco-2)細胞へのアポトーシス誘導

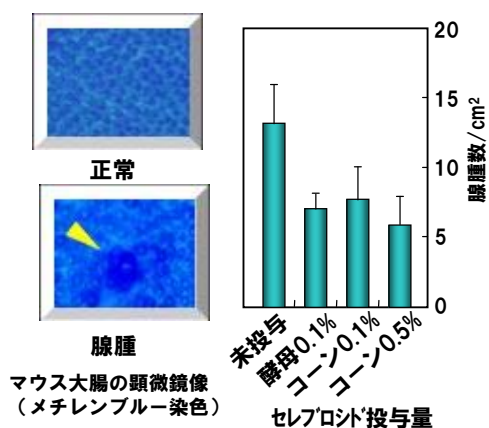


図8 大腸腺腫(ポリープ)誘発マウスにおける食餌性セレブロシドの腺腫発症抑制効果(大腸ガン予防効果の実証)

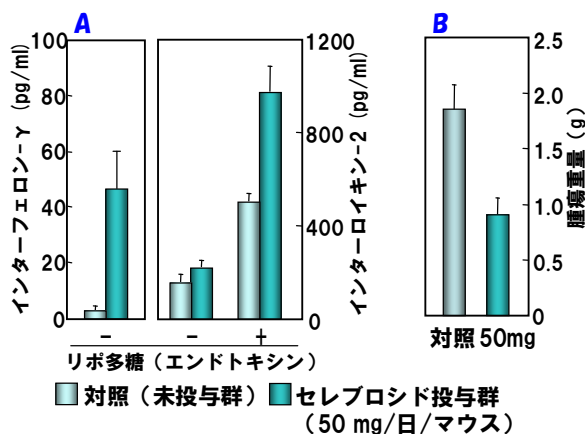


図9 経口摂取によるセレブロシドの免疫賦活作用
A, 脾細胞でのサイトカイン誘導促進能
B, 皮膚への移植腫瘍細胞の縮小効果



図10 酵母菌体からのセレブロシドの分離精製法

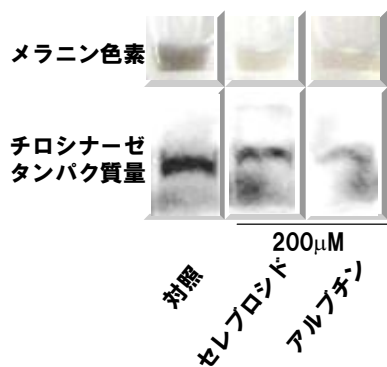


図11 B16メラノーマ細胞における酵母セレブロシドのメラニン生成抑制効果(美白効果)
アルブチン:チロシナーゼの発現抑制剤

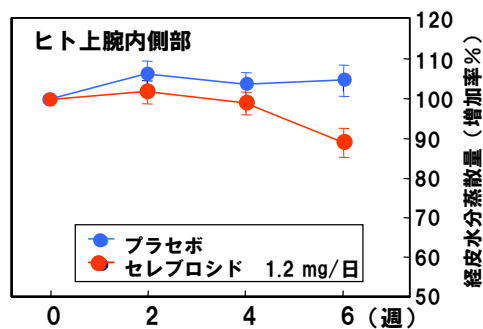


図12 経口摂取によるセレブロシドの皮膚保湿効果
プラセボ:セレブロシドを含まず、賦形剤等のみ