

酵母由来の機能性糖脂質（バイオサーファクタント）の構造及び機能の拡充に関する研究

独立行政法人産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門

福岡 徳馬

Biosurfactants (BS) are functional amphiphilic compounds produced by a variety of microorganisms. They show unique properties (e.g. mild production conditions, multifunctionality, higher biocompatibility and environmental compatibility) compared to chemically synthesized counterparts. BS have thus been receiving increasing attention as environmentally advanced surfactants. Mannosylerythritol lipids (MELs), which are amphiphilic glycolipids abundantly produced by yeasts from vegetable oils, are one of the most promising BS because of their excellent surface-active properties and versatile biochemical actions. However, the structural variety of MELs hitherto discovered still remains limited; this makes the broad range of their applications difficult. We thus have continuously developed new types of MELs with different structures and functions.

In this study, we have newly prepared MEL-D, which has no acetyl groups in the hydrophilic sugar moiety, and new diastereomers having the carbohydrate configuration different from the conventional MELs. These novel MEL homologs show specific self-assembling properties and biological actions. Based on their unique properties, they would be expected to apply to pharmaceutical and cosmetic fields.

1. 緒言

バイオサーファクタント (BS) は、微生物が糖質や植物油などの再生可能資源から作り出す両親媒性物質であるが、その高い生体適合性や生分解性に加え、汎用の合成界面活性剤に比べ極少量 (1/100 ~ 1/1000) で優れた効果を発揮するなど、「持続可能な社会の構築・発展」に向けて、「環境適合性」と「高性能」を両立した「環境先進型の界面活性剤」として期待されている。

マンノシルエリスリトールリピッド (MEL、図1) は、ある種の酵母によって生産される親水基が糖鎖からなるBSの一種である。MELは、極めて低濃度 (10^{-6} M) で高い界面活性 (表面・界面張力低下能など) を示すばかりでなく、幅広い濃度 (0 ~ 90 wt%)、温度範囲で、単一成分で特異な液晶 (スポンジ、キュービク、ラメラなど) を形成し、様々な生理活性 (抗微生物活性、抗腫瘍活性、抗体結合能など) を有する。また、商業生産に対応可能なレベル (>100 g/L) まで生産収率が向上しており、既知のBS (数十種類) の中では、最も実用化の可能性が高いとされ、その研究開発が注目されている¹⁾。最近では、優れた液晶形成能を利用した液晶乳化技術²⁾や、皮膚や毛髪に対する高い保湿効果³⁾⁴⁾などが見出されたことを契機に、まずは化粧品素材 (高機能保湿剤) としてMEL製品化が達成

された。さらに医薬、化粧品分野をはじめ、幅広い用途への応用を目指した技術開発が活発に進められている⁵⁾。

MELには、マンノース上の置換基 (アセチル基) の結合数、結合位置の異なる同族体 (MEL-A、-B、-C; 図1) をはじめ、脂肪酸鎖の組成の異なるものなど、これまで数種の同族体が確認されている⁶⁾が、僅かな構造の違いで物性が劇的に変化するというユニークな特性が報告されている⁷⁾。したがって、新規構造の同族体を開発し、構造種のバラエティを拡張してその物性比較を行うことは、MELの用途の飛躍的な拡大に繋がるものと期待される⁶⁾。本研究では、微生物プロセスと化学・酵素合成プロセスを組み合わせ、糖鎖上の置換基や糖鎖の立体構造の異なる新規MEL誘導体を製造することで、医薬、化粧品用途を指向したMEL同族体の製品ラインナップの拡充を狙った。また、各化合物間で物性比較を行うことで構造-機能相関の解明を進め、目的の用途に対応したテーラーメイド的なMEL同族体の提供を目指した。

2. 実験

本研究では、従来技術では得られなかった2種類のMEL同族体を新たに開発し、その物性評価を進めた。

2. 1. 糖鎖の立体構造が反転したMEL『GL』の開発と従来型との機能比較

酵母の一種 *Pseudozyma crassa* が、従来のMELとは糖鎖の立体構造が異なるMEL同族体 (GL: 図2) を生産することを見出した⁸⁾。オレイン酸を原料として該酵母を培養することでGLを生産し、培養液から酢酸エチルで抽出後、カラムクロマトグラフィーを用いて分離・精製した。精製サンプルについて、既存のMELと界面物性の比較を



Expansion of structure and function of yeast glycolipid biosurfactants

Tokuma Fukuoka

Research Institute for Innovation in Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

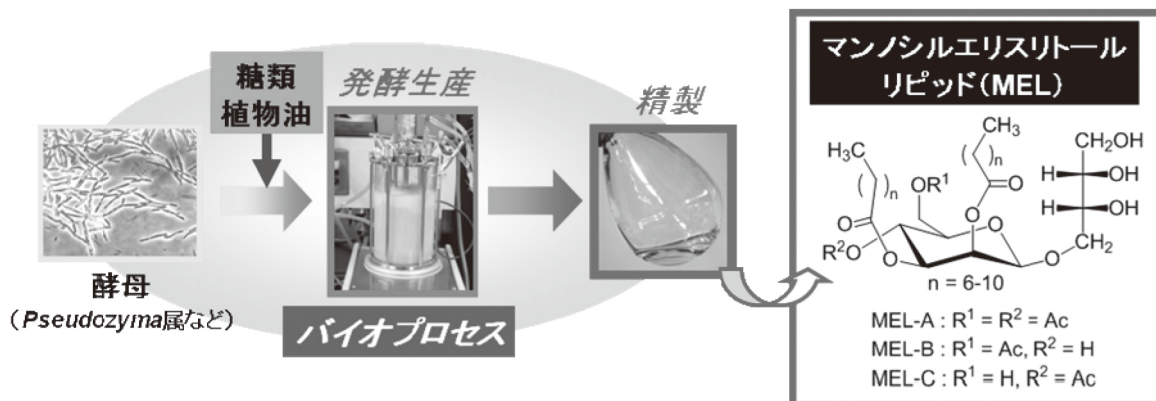


図1 マンノシルエリスリトールリピッドの生産スキームと構造例

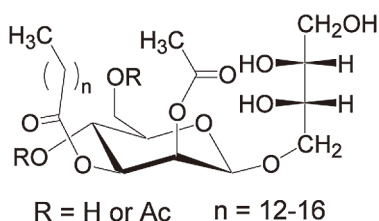


図2 GLの構造式

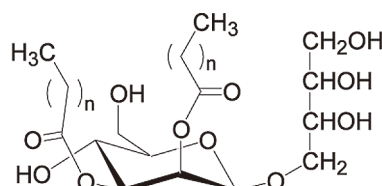


図3 MEL-Dの構造式

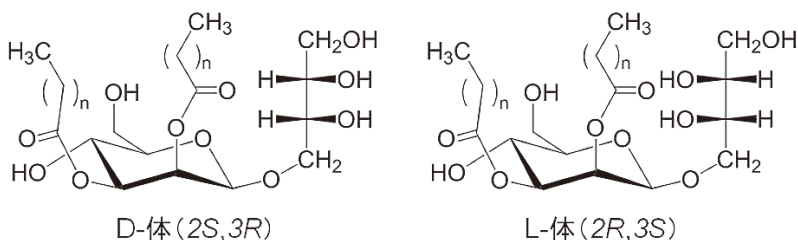


図4 MEL-D (D-体、L-体) の構造式

行ったほか、糖鎖の分子認識能の評価の一環として、表面プラズモン共鳴法 (SPR) により MEL 同族体 (自己組織化膜) と抗体タンパク (免疫グロブリン G; IgG) との結合親和性を調べた。さらに、医薬・化粧品などへの応用を考慮して、酵素 (リパーゼ) 反応に対するこれらの MEL 同族体の添加効果を検証した。

2.2. アセチル基を持たない新規 MEL『MEL-D』の開発

触媒にリパーゼを用い、既存の MEL 同族体から選択的にアセチル基のみを加水分解することで、糖鎖上にアセチル基を有さない MEL-D (図3) の合成を行った。生成物はカラムクロマトグラフィーを用いて分離・精製し、各種 NMR (^1H 、 ^{13}C 、 ^1H - ^1H COSY、HMQC、HMBC) 測定、分子量測定 (MALDI-TOF/MS)、脂肪酸組成分析 (GC-MS) などにより構造を同定した。精製サンプルについて、各種機器分析 (ウィルヘルミー法、光学顕微鏡観察、光散乱法、X線構造解析など) により、得られた MEL-D の界面物性について評価し、従来の MEL 同族体と比較した。

2.3. 糖鎖の立体構造が反転した MEL-D の合成と物性比較

出発原料に、MEL 及び上述の反転型 MEL を選び、それぞれからアセチル基を加水分解して糖鎖の立体構造が反転した MEL-D (D-体、L-体; 図4) を調製した。得られた MEL-D 間で表面張力低下能や会合体形成挙動を比較した。

3. 結果

3.1. 反転型 MEL (GL) の開発と従来型 MEL との機能比較

P. crassa が生産する糖脂質 (GL) は、詳細な構造解析の結果、従来の MEL に対してエリスリトールの結合向きが逆転した、糖鎖のキラリティーの異なる新しいタイプの MEL 同族体であることが見出された。また、2本結合している脂肪酸の一方が極端に短い擬一鎖型糖脂質であることも確認されており、親水基、疎水基ともに従来型とは組成が大きく異なるという特徴があった (図2)。

主成分であるジアセチル型の GL-A について、ウィルへ

ルミー法により表面張力低下能を評価した。GL-Aの室温での臨界面合体形成濃度 (CAC)、及びその時の表面張力 (γ_{CAC}) は、それぞれ 5.2×10^{-6} M、26.5 mN/mであり、従来のMEL-A (CAC = 2.7×10^{-6} [M]、 $\gamma_{CAC} = 28.4$ [mN/m]) に対してCACが上昇する一方で γ_{CAC} を低下させるといった特徴が見られた。また、GLは水との二成分系での相挙動が従来のMELと大きく異なる様子も観察された。以上の結果より、分子構造の違いが自己集合挙動や水親和性に大きな影響を与えることが示唆された。

これまでの報告から、従来型MELは、抗体タンパク(IgG)に対して強い結合親和性を示すことが分かっている⁹⁾。そこで、MELとGLから自己組織化膜を作製し、SPRを用いて抗体との相互作用を比較検討した。その結果、興味深いことにGLはIgGに対して全く結合性を示さなかった(図5)。両者の結合特性の違いは、糖鎖(エリスリトール部分)の立体構造の違いに起因していることが推定された。

続いて、リパーゼによるエステル加水分解反応に対するMELおよびGLの添加効果を検討した。その結果、MEL、GLとも、酵素種の違いに応じて、大きな反応促進、あるいは反応阻害効果を示すことが分かった。細菌(*Pseudomonas* sp.)由来のリパーゼに対しては、両者とも反応を大きく促進させ、特にGLは非添加系と比べて反応速度を11倍以上と大幅に促進した。一方、有機合成において汎用される酵母菌(*Candida antarctica*)由来のリパー

ゼBに対しては、MELのみが顕著な阻害効果を示した。さらに、生体内での脂肪分解モデルとしてよく利用される豚膵臓由来リパーゼに対しては、GLのみが大きな阻害効果を示した¹⁰⁾。

3.2. 新規 MEL 同族体 (MEL-D) の開発

マンノースの6位のみアセチル基を有するMEL-B(酵母により量産可能¹¹⁾)を出発物を選び、触媒に固定化リパーゼ(Novozym435)を用いて、90%エタノール中、大気下、50℃で1週間攪拌することで、既存のMELよりも高極性の糖脂質がほぼ定量的に得られた。NMR測定の結果、アセチル基由来のピークが消失し、6位のプロトン由来のピークが高磁場側にシフトしていることが確認された。また、分子量測定の結果、出発物からアセチル基の式量42分だけ分子量が減少したこと、脂肪酸組成分析の結果、反応前後で脂肪酸組成に変化がなかったことなどから、本反応によって選択的に6位のアセチル基のみが加水分解されて、目的のMEL-Dが得られたことが確認された。

精製したMEL-Dを用いて、表面張力低下能を評価した。室温におけるMEL-DのCAC = 1.2×10^{-5} [M]、及び $\gamma_{CAC} = 24.6$ [mN/m]であり、従来のMELと同様の優れた表面張力低下能を示すことが確認された。また、出発物(CAC = 3.1×10^{-6} [M]、 $\gamma_{CAC} = 26.1$ [mN/m])に対して、CACが上昇するなど、アセチル基の除去により親水性の向上が見られた。

続いて、水中におけるMEL-Dの分子集合体形成挙動について調べた。MEL-D水溶液の光学顕微鏡観察の結果、MEL-DはCAC値以上の濃度で容易にベシクル状の構造体を形成することが分かった。さらに、各濃度のMEL-D水溶液を調製し、小角X線散乱測定(SAXS)などを用いて相挙動を解析した結果、全濃度領域にわたって二分子膜構造から成るラメラ相を形成することが確認された(図6)。また、原料であるモノアセチル体のMEL-B (>60 wt%)と比較して、より低濃度(>50 wt%)までラメラ相単相領域が拡大し、さらにラメラ相の層間距離も拡張するなど、ア

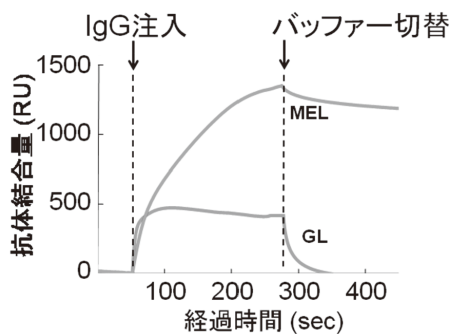


図5 SPR センサーグラム

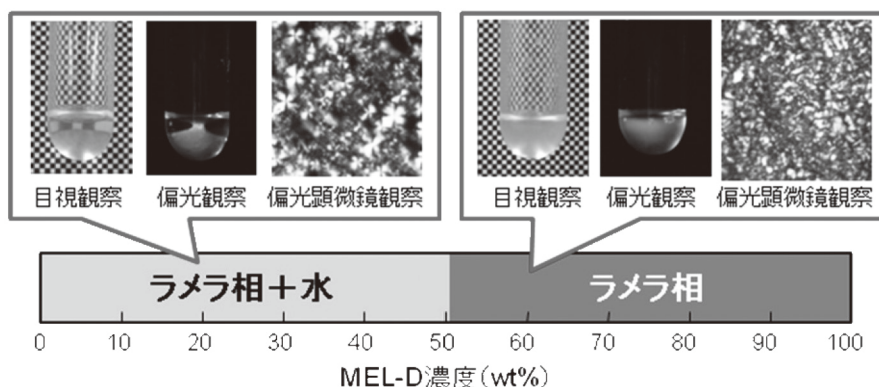


図6 MEL-Dの二成分系相図

セチル基の脱離により MEL 分子の水親和性や保水力が向上していることが示唆された¹²⁾。

一方、MEL-D は、有機溶媒中においても単独で自己集合体を形成することが新たに見出された。顕微鏡観察などから、これがベシクル（逆ベシクル）であることが示された（図7）。溶媒種について検討した結果、直鎖状炭化水素類をはじめ、環状炭化水素類、スクアラン、スクアレン、シリコンオイルなどでも逆ベシクルの形成が確認された。

3. 3. 糖鎖の立体構造が反転した MEL-D の合成と物性比較

2 種類の MEL 生産菌 (*Ustilago scitaminea*¹³⁾、*Pseudozyma tsukubaensis*¹¹⁾) を用いることで、エリスリトールの立体配置の異なる MEL-B (D-体、L-体) がそれぞれ得られる。これらを原料とし、上述と同様の方法で2種類の MEL-D を合成した。なお、D-体が従来の MEL と同じエリスリトールの立体配置であり、L-体が反転型に当たる。3. 2. で得た MEL-D は反転型であり、L-体に当たる。

D-体 の MEL-D の $CAC=7.1 \times 10^{-6}$ [M]、 $\gamma_{CAC}=25.7$ [mN/m] であり、L-体の方が高い CAC 値を示した。これは 3. 1. の GL-A の場合と同じ傾向であった。以上の結果より、エリスリトールの立体配置は、MEL の界面活性に大きく影響を及ぼすことが示された。

次に、各サンプルの水中での自己集合挙動を検討した。両者とも容易にベシクルを形成したが、L-体の方がD-体よりも粒子径の大きなベシクルを形成することが確認され

た。続いて、デカン中でも同様の検討を行った結果、D-体では逆ミセル、L-体では逆ベシクルを形成することが分かった（図8）。以上のように、エリスリトールの立体配置は、MEL の会合体形成挙動を大きく変化させることが示された。

4. 考 察

反転型 MEL は、最近新しく見出された新型 MEL であるが、今回検討を進めた *P. crassa* 由来の MEL⁸⁾ と、*P. tsukubaensis* が生産する MEL-B¹¹⁾ の二例しか今のところ見つかっていない。糖鎖のキラリティーの違いは生理活性に強く影響すると予想されるため、医薬・化粧品分野への応用を目指す上で、その物性データの蓄積は極めて重要である。

本研究で、これらの比較検討が初めて行われ、構成要素が同じ糖脂質でも、糖骨格や脂肪酸組成に差異があれば、界面物性、生理活性ともに大きく影響することが検証された。特に、今回 MEL 同族体にリパーゼ活性の阻害効果が見出されたことで、生体内での脂質分解が鍵となる「肥満防止」や「皮膚炎、肌荒れ改善」など、新しい医薬・化粧品用途への可能性が示唆された。

MEL-D は、これまで微生物生産物中からはその存在が確認されていなかったが、本研究では既存の MEL から選択的にアセチル基のみを加水分解する酵素法の利用により、初めて大量取得に成功した。これまで MEL には、アセチル基を2個有する MEL-A と、1個有する MEL-B、-C との

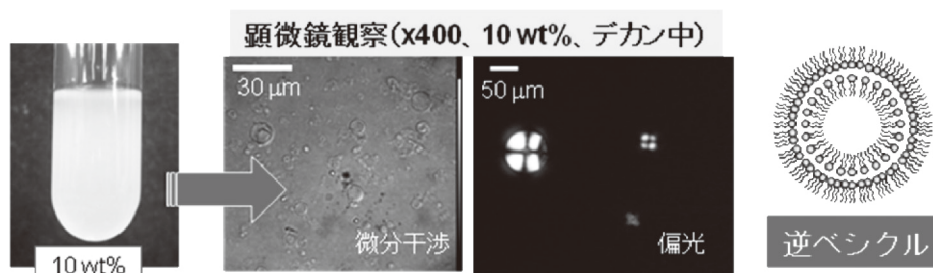


図7 MEL-D が形成する逆ベシクル

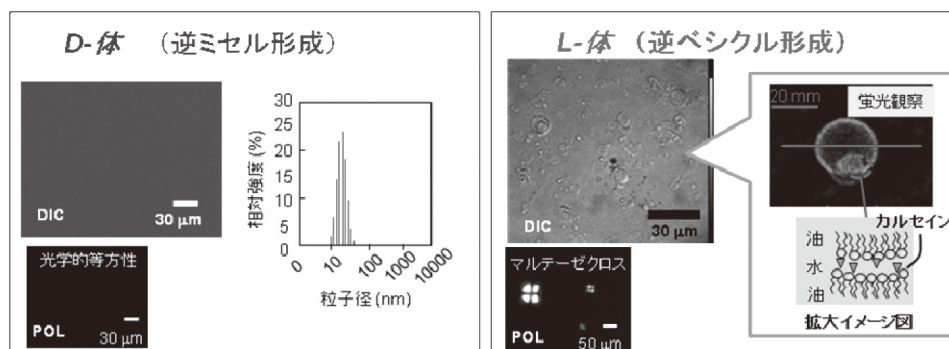


図8 MEL-D の自己集合挙動（10 wt%、デカン中）

間で、ただ一つのアセチル基の有無により物性が劇的に変化するという興味深い特徴が報告されていた¹⁾⁷⁾。したがって、今回新たにアセチル基を有さないMEL-Dが得られ、物性評価が行われたことは、MELの構造-機能相関の解明を進め、用途拡大を目指す上で極めて重要である。

実際に、MEL-Dは全濃度範囲にわたって優れたラメラ形成能を有することが確認された。これまで、同じくラメラ形成能に優れるMEL-Bには、セラミド様の優れた肌荒れ改善効果が見出されており³⁾、化粧品素材として製品化されている⁵⁾。MEL-Dは、その製品ラインナップを拡充する新素材としての可能性を秘めている。

さらに、L-体のMEL-Dには、油性物質中で「逆ベシクル」を形成するという新しい機能が見出された。逆ベシクルは、有機溶媒中で形成する新しい分子集合体であり、マイクロカプセル化、有用物質の放出制御、特異な反応場などへの応用が期待されている¹⁴⁾。逆ベシクルを形成する素材に関する報告例は極めて少なく、特に今回のように様々な油性物質中で、単一成分で逆ベシクルを形成する素材は、MEL-Dが初めての報告となる。これらの特性を活用して、乳液、クリームなど油系でのMELの応用が期待される。

以上のように、新規構造のMEL同族体の開発を通じて、特異な分子構造に起因するユニークな特徴を明らかにし、新しい機能利用の可能性を示すことができた。本研究から得られた知見は、BSの新たな用途展開、普及の促進に貢献するものである。

(引用文献)

- 1) D. Kitamoto, T. Morita, T. Fukuoka, et al., : Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications, *Curr. Opin. Colloid Interfac. Sci.*, 14, 315-328 (2009).
- 2) W. Worakitkanchanakul, T. Imura, T. Fukuoka, et al., : Phase behavior of ternary mannosylerythritol lipid / water / oil systems, *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 68, 207-212 (2009).
- 3) T. Morita, M. Kitagawa, M. Suzuki, et al., : A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows potential moisturizing activity toward cultured human skin cells: The recovery effect of MEL-A on the SDS-damaged human skin cells, *J. Oleo Sci.*, 58, 639-642 (2009).
- 4) T. Morita, M. Kitagawa, S. Yamamoto, et al., : Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, repair the damaged hair, *J. Oleo Sci.*, 59, 267-272 (2010).
- 5) 福岡徳馬, 森田友岳, 井村知弘, ほか2名, : 微生物由来の高機能界面活性剤 (バイオサーファクタント) の用途開発, *フレグランスジャーナル*, 37(8), 33-40 (2009).
- 6) 福岡徳馬, : 微生物由来の機能性脂質 (バイオサーファクタント) の構造および機能の拡充に関する研究, *オレオサイエンス*, 9(4), 127-133 (2009).
- 7) T. Imura, N. Ohta, K. Inoue, et al., : Naturally engineered glycolipid biosurfactants leading to distinctive self-assembled structures, *Chem. Eur. J.*, 12, 2434-2440 (2006).
- 8) T. Fukuoka, M. Kawamura, T. Morita, et al., : A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma crassa*, produces novel diastereomers of conventional mannosylerythritol lipids as glycolipid biosurfactants, *Carbohydr. Res.*, 343, 2947-2955 (2008).
- 9) T. Imura, S. Ito, R. Azumi, et al., : Monolayer assembled from a glycolipid biosurfactant from *Pseudozyma (Candida) antarctica* serve as a high-affinity ligand system for immunoglobulin G and M, *Biotechnol. Lett.*, 29, 865-870 (2007).
- 10) 特開2010-248186
- 11) T. Fukuoka, T. Morita, M. Konishi, et al., : A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a glycolipid biosurfactant; identification as a new diastereomer of conventional mannosylerythritol lipid-B, *Carbohydr. Res.*, 343, 555-560 (2008).
- 12) T. Fukuoka, T. Yanagihara, T. Imura, et al., : Enzymatic synthesis of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid-D, and its aqueous phase behavior, *Carbohydr. Res.*, 346, 266-271 (2011).
- 13) T. Morita, Y. Ishibashi, T. Fukuoka, et al., : Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a smut fungus, *Ustilago scitaminea* NBRC 32730, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 788-792 (2009).
- 14) H. Kunieda, K. Nakamura, D. F. Evans, : Formation of reversed vesicles, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1051-1052 (1991).