動物プランクトン，マイクロネクトン及び海洋微生物 によるワックス・エステルを生合成に関する研究

鹿山 光・池田 康行・万倉 三正

広島大学水畜産学部（広島県福山市緑町 2-17）

Studies on the Biosynthesis of Wax Ester by Zooplankton, Micronekton and Marine Microorganism

Mitsu KAYAMA, Yasuyuki IKEDA, and Mitsumasa MANKURA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima
University (2-17 Midori-machi, Fukuyama-shi, Hiroshima-ken)

As the results of the previous studies on the lipids of micronektonic fishes and shrimps and zooplankton, it has been recognized that one of the most characteristic constituents of the midwater marine animals' lipids is the wax esters. Moreover, a reversed relation between the triacylglycerol and wax ester contents has been observed, namely, the former is the main lipid class in the surface living animals, whereas the latter becomes the major one in the meso- and bathypelagic animals.

In order to study the biosynthesis of wax ester by marine animal and microorganism the *in vivo* and *in vitro* experiments were carried out. By using intact zooplankters which were caught from different depths, 50 m, 400 m, 1000 m, by a net, the incorporation of hexadecyl alcohol [$^{14}\text{CH}_2\text{OH}$], -palmitic and -acetate into the wax esters was examined. In either cases, the higher radioactivity percentages were measured by the deeper zooplankters. Among the substrates used the highest incorporation was resulted from the use of hexadecyl alcohol. The inverse proportion between the triacylglycerol and wax ester formations with depth was recognized in the case of acetate incorporation. Furthermore, a limited interconversion of fatty acid and fatty alcohol moieties of the wax ester was demonstrated.

The homogenate supernatants of myctophids, *Diaphus glandulifer*, decapods, *Sergestes prehensilis*, and copepods, *Pareuchaeta elongata*, synthesized the wax esters from [^{14}C] hexadecyl alcohol, -palmitic and -oleic acids, -tripalmitoylglycerol and -acetate. The addition of cofactors, ATP and CoA, enhanced the incorporation of acids into the wax esters as much as 2 to 3 times, but did not for the case of albumin complex of oleic acid [$^{14}\text{COOH}$].

Marine microorganisms from different depths were collected on Millipore HA filters by filtrating 5 m, 50 m, 300 m, 1000 m layer waters. A tentative experiment on the biosynthesis and hydrolysis of wax esters by microorganisms was done on board. Unexpectedly high activities were detected in the classes of wax esters as well as of aldehydes and phospholipids. There were no clear relation of wax ester formation with depth. As the cofactors, ATP and CoA did not activate the synthesis of wax ester, but the addition of carnitine worked. Moreover, it was found that marine microorganisms also hydrolyzed oleyl [$^{14}\text{COOH}$] palmitate used for substrate.

As the conclusion from the results obtained here, all of these midwater animals and microorganisms biosynthesize the wax esters from the universally available precursors, acetate, fatty acids, as well as from long-chain alcohols. The data are discussed why wax esters are biosynthesized by them in midwater.

1 緒 言

深海系の生物は表層性のものと比較して化学的組成においても幾つかの点で特徴がみられ¹⁾、魚類では浮力調節機構の類別等によって組成上の差異が報告されてい

る²⁾。すなわち、浮力獲得のため主として筋肉運動、ガスの入った浮袋、脂質の貯蔵^{3,4)}、体液の希釈化によるものに分類され、それぞれに水分、脂質、タンパク質、骨格灰分含量の特徴が指摘されている。一方甲殻類では浮袋とか低浸透圧調節機構を欠いているから、主として

脂質の蓄積⁵⁾によって浮力の調節を行っていると考えられる。

このように、動物プランクトンおよびマイクロネクトンにとって浮力獲得に重要な役割を果たしている脂質は、単に含量としてだけではなく、さらにそれを構成している脂質クラスを検討するとき大変興味が持たれる⁶⁾。深海性のものに特徴的な脂質組成は、表層性の主要成分であるトリアシルグリセリンに替わって、ワックス・エステルが主要クラスとなっていることである。筆者らは、前報までに相模-駿河湾で採集したマイクロネクトン魚類⁷⁾ およびエビ類⁸⁾、また日本海産および瀬戸内海産を含めた動物プランクトン⁹⁾の脂質、とくにそれらのワックス・エステルの分布と組成に関して報告してきた。本報はそれら動物プランクトン、中深層性のマイクロネクトンおよび海洋微生物によるワックス・エステルの *in vivo* および *in vitro* 生合成について検討した結果を報告する。

2 実験と結果

2.1 *in vivo* 実験によるワックス・エステルの生合成

前報⁹⁾で深度別動物プランクトンの脂質クラス組成を検討したところ、5 m 層、100 m 層、300 m 層、500 m 層、1000 m 層のプランクトンでは深度が増加するともにワックス・エステルの含量が増加し、それとは逆にトリアシルグリセリンの含量の減少する傾向がみられた。そこで、生息深度を異にする動物プランクトンによるワックス・エステルの生合成を検討するため、広島大学水

畜産学部所属の豊潮丸に乗船し、1972 年 10 月 25 日～27 日の研究航海で紀伊水道沖 (33°31.0'N, 134°58.4'E) の 1000 m 層、また 1973 年 9 月 18 日～21 日の同航海で豊後水道沖 (32°33.0'N, 132°14.2') の 400 m と 50 m 層から深度別に標準プランクトンネットを用いてプランクトンを採集し、植物プランクトンを粗い網目を通して除いた動物プランクトンを供試動物として用いた。これら動物プランクトンの組成を計数して求めると、前者ではかい脚類が約 60%、おきあみ類が 20%、十脚類が 15%、その他が 5%であり、後者ではおよそかい脚類が 70%、おきあみ類が 10%、十脚類が 10%、その他が 10%であった。

反応容器を乾熱殺菌し、それぞれに基質として 2 μ Ci ヘキサデシルアルコール-1-¹⁴C, パルミチン酸-1-¹⁴C (両者とも非放射性化合物で 3 μ mol に希釈し、同時に前者に対して非標識パルミチン酸、また後者に対して非標識ヘキサデシルアルコールを 3 μ mol ずつ加え、さらにタウロコール酸ナトリウム 1.5 mg と Triton X-100 10 mg を添加) および 80 μ Ci の酢酸ナトリウム-1-¹⁴C (3 μ mol) を入れ、1 容器ごとにあらかじめオートクレーブで殺菌した汙過海水 20 ml とともに各層から採集した動物プランクトン約 0.5 g を加えて 25°C, 90 min のインキュベーションを行った。クロロホルム-メタノール (1:1) の添加によって反応を停止し、ホモジナイズ後クロロホルム層より脂質を得た。各脂質はジエチルエーテル-石油エーテル-酢酸 (12.5:87.5:1, vol/vol/vol) で薄層クロマトグラフ展開後、薄層クロマトグラムスキャンナー (Aloka, Model TRM-1B) を用いて放射能を測

Table-1 Incorporation of labelled substrates into wax esters and other lipid classes by intact zooplankters caught from various depths.

Substrate	Zooplankter*	Lipid class in radioactivity (%)					
		WE	ALD	TG	FFA	FAL	PL
Hexadecyl alcohol -1- ¹⁴ C (2 μ Ci, 3 μ mol) plus palmitic acid (3 μ mol)	1000 m	42.2	—	—	—	57.8	—
	400 m	6.3	—	—	—	93.7	—
	50 m	3.9	—	—	—	96.1	—
Palmitic acid -1- ¹⁴ C (2 μ Ci, 3 μ mol) plus hexadecyl alcohol (3 μ mol)	1000 m	18.7	8.0	—	59.3	9.0	5.0
	400 m	Tr.	Tr.	—	90.0	—	10.0
	50 m	Tr.	—	—	94.8	—	5.2
Sodium acetate-1- ¹⁴ C (80 μ Ci, 3 μ mol)	1000 m	14.3	16.3	Tr.	37.6	Tr.	31.8
	400 m	4.4	5.6	7.8	20.0	10.0	52.2
	50 m	3.3	5.9	11.8	19.7	9.3	50.0

* Zooplankter from 1000 m depth was collected by a net at 33° 31.0' N, 134° 58.4' E and consisted approximately of Copepoda (60%), Euphausiacea (20%), Decapoda (15%), and others (5%) in number, and zooplankters from 400 m and 50 m were collected at 32° 33.0' N, 132° 14.2' E and consisted of Copepoda (70%), Euphausiacea (10%), Decapoda (10%), and others (10%) in the respective orders. Approximately 0.5 g zooplankter in wet weight was used for incubation. Incubation was carried out in a vial containing the indicated substrate, sodium taurocholate (1.5 mg) and Triton X-100 (10 mg) except for the case of sodium acetate-1-¹⁴C, and 20 ml of sterilized sea water at 25°C for 90 min.

Abbreviation: WE, wax ester; ALD, aldehydes; TG, triacylglycerols; FFA, free fatty acids; FAL, free fatty alcohols; PL, phospholipids.

定し、脂質クラスの放射能百分率を計測し、その値を **Table-1** に示す。

表中 1000 m 層の値は前報⁹⁾ で予報的に示した。基質として添加したヘキサデシルアルコール-1-¹⁴C およびパルミチン酸-1-¹⁴C は大部分が未反応の形で回収されたが、ワックス・エステル中へのとり込みは確実であり、1000 m 層動物プランクトンでは顕著であった。また両基質を比較すると、ヘキサデシルアルコールのワックス・エステル中へのとり込みはパルミチン酸のそれより高い値が示されているが、パルミチン酸はワックス・エステルおよびリン脂質へのとり込みのほかにアルデヒドおよびアルコールへと還元¹⁰⁾ されていることが認められる。アセタート-1-¹⁴C を基質とした場合、かなりのとり込みがワックス・エステルにみられるが、リン脂質および遊離脂肪酸には高い。またアルデヒド、トリアシルグリセリンおよびアルコールにも相当量のとり込みがみられる。全体的にいずれの基質を用いても、ワックス・エステルへのとり込みは 1000 m > 400 m > 50 m の傾向があり、さらに興味あることはアセタートのワックス・エステルとトリアシルグリセリンへのとり込みについて、前者へは 1000 m で 14.3%、400 m で 4.4%、50 m で 3.3% であったのが、後者へは 1000 m でこん跡、400 m で 7.8%、50 m で 11.8% と深度に関して逆相関の関係が得られたことである。

なお、上記実験のうち 1000 m 層の動物プランクトンによって生成された脂質を薄層プレート (20×20 cm) 上に展開し、ワックス・エステルを単離し、それをエチルアルコール 5 ml に溶解し、金属ナトリウム 5 mg を加えて 1 h、さらに 0.3 ml の 45% KOH 水溶液を添加して 30 min 還流し、ワックス・エステルのけん化を完了した後、6 N-HCl を滴下して pH 2~3 に調整してから石油エーテルで 2 回、ジエチルエーテルで 2 回抽出し、それら抽出液を合わせて水洗脱水後、窒素ガス気流下で溶媒を除去し、加水分解物を得た。それを薄層プレート (5×20 cm) で展開して脂肪酸とアルコールに分離後、薄層クロマトグラムスキャナーで放射能の分布を求めた。その結果を **Table-2** に示す。ヘキサデシルアルコール-1-¹⁴C から合成されたワックス・エステルの脂肪酸部には 49.2%、アルコール部には 50.8% の放射能が検出され、パルミチン酸-1-¹⁴C の場合は脂肪酸部には 34.9%、アルコール部には 65.1% がみられ、

それぞれ基質の一部が酸化・還元¹⁰⁾ を受けてワックス・エステル中へととり込まれていることをみた。

2.2 *in vitro* 実験によるワックス・エステルの生合成

次いで駿河湾の中深層より採集したハダカイワシ科の *Diaphus glandulifer*、十脚類の *Sergestes prehensilis* およびかい脚類の *Pareuchaeta elongata* を用いての船上ホモジネート実験を行った。*D. glandulifer* の場合は肝すい臓と消化器官、*S. prehensilis* と *P. elongata* の場合は全動物体を試料とし、氷冷下に Potter 型のテフロン棒ガラス製組織ホモジナイザー中で前二者に対しては 5 倍量、後者に対しては 10 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いてそれぞれのホモジネートを調製し、約 500×g、2 min の遠心分離によって上澄み液を得、それらの酵素液 1 ml を各種基質、補助因子とともに 30 °C で 4 h の振とう培養を行った。脂質クラス・とくにワックス・エステルへのとり込みに関する結果を **Table-3** に表示する。

放射性基質の脂質中へのとり込みは、アセタート-1-¹⁴C では 0.1% 程度がそれ以下であったが、ヘキサデシルアルコール-1-¹⁴C、パルミチン酸-1-¹⁴C、オレイン酸-1-¹⁴C およびトリパルミトイルグリセリン-1-¹⁴C の場合はほとんどが 50% 以上回収され、それらの多くは 70~80 % であった。脂質中における放射能の多くは未代謝の脂質クラスとして存在したが、ワックス・エステルその他クラスへの放射能分布も認められた。全般的にみてワックス・エステルへのとり込みは、ヘキサデシルアルコールの方がパルミチン酸、オレイン酸よりも大きく、トリパルミトイルグリセリンでも値は小さいが検出された。またアセタートを基質として用いると、すべての脂質クラスへのとり込みが認められ、リン脂質、遊離のアルコール、脂肪酸、トリアシルグリセリン、アルデヒドのほかかなり高いワックス・エステルの *de novo* 合成がみられた。さらに脂肪酸を基質とした場合に、アルデヒドおよびアルコールへのとり込みが認められ、*in vivo* の時と同じように還元反応¹⁰⁾ を受けていることが明らかである。なお補助因子としての ATP および CoA の添加は、いずれの場合にも 2~3 倍に賦活された。しかしオレイン酸-1-¹⁴C のアルブミン複合体を基質とした場合は、これら補助因子によるワックス・エステルへのとり込みの促進効果は認められなかった。

Table-2 Distribution of radioactivity between fatty acid and alcohol moieties of the wax esters, which were synthesized from labelled substrates by intact zooplankters from 1000 m depth.

Substrate	Distribution of wax ester radioactivity (%)	
	Fatty acid moiety	Fatty alcohol moiety
Hexadecyl alcohol-1- ¹⁴ C	49.2	50.8
Palmitic acid-1- ¹⁴ C	34.9	65.1

Table-3 Incorporation of precursors into wax esters and other lipid classes by homogenate supernatants of myctophids, decapods and copepods.

Animal and tissue	Substrate	Addition		Recovered activity (%)	Lipid class in radioactivity (%)					
		ATP (μ mol)	CoA (μ mol)		WE	ALD	TG	FFA	FAL	PL
Myctophids <i>Diaphus glandulifer</i> Hepatopancreas and digestive organ were used for homogenate preparation	Hexadecyl alcohol-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus unlabelled substrate(-)	2.5	2.0	72.1	20.3	—	—	—	79.7	—
		—	—	80.0	10.9	—	—	—	89.1	—
	Palmitic acid-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus oleyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	79.5	4.1	1.0	—	86.8	—	8.1
		—	—	62.1	2.1	1.0	—	89.6	—	7.3
	Oleic acid-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus hexadecyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	32.9	6.2	—	—	67.7	Tr.	26.1
		—	—	65.4	4.9	—	—	69.1	—	26.0
Decapods <i>Sergestes prehensilis</i> Whole animals were used for homogenate preparation	Oleic acid-1- 14 C* (2 μ Ci, 2 μ mol) plus hexadecyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	80.4	3.0	—	—	57.1	8.0	31.9
		—	—	87.0	2.7	—	—	57.3	8.0	32.0
	Glycerol-1- 14 C tripalmitate (2 μ Ci, 2 μ mol) plus hexadecyl alcohol (2 μ mol)	—	—	50.3	2.0	Tr.	85.6	4.9	—	7.5
	Sodium acetate-1- 14 C (80 μ Ci, 2 μ mol) plus unlabelled substrate (-)	—	—	0.12	12.3	2.5	5.2	34.9	8.3	36.8
	Hexadecyl alcohol-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus unlabelled substrate (-)	2.5	2.0	73.1	6.0	Tr.	—	—	94.0	—
		—	—	43.7	2.1	—	—	—	97.9	—
Copepods <i>Pareuchaeta elongata</i> Whole animals were used for homogenate preparation	Palmitic acid-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus oleyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	79.2	1.9	1.1	—	85.9	—	11.1
		—	—	56.9	Tr.	1.1	—	88.0	—	10.9
	Oleic acid-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus hexadecyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	78.3	3.4	—	—	77.2	—	19.4
		—	—	70.9	1.7	1.1	—	73.6	—	23.6
	Oleic acid-1- 14 C* (2 μ Ci, 2 μ mol) plus hexadecyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	78.5	2.9	—	—	72.2	Tr.	24.9
		—	—	58.0	3.5	—	—	72.9	5.6	18.0
Copepods <i>Pareuchaeta elongata</i> Whole animals were used for homogenate preparation	Glycerol-1- 14 C tripalmitate (2 μ Ci, 2 μ mol) plus hexadecyl alcohol (2 μ mol)	—	—	57.0	1.0	Tr.	88.0	5.0	—	6.0
	Sodium acetate-1- 14 C (80 μ Ci, 2 μ mol) plus unlabelled substrate(-)	—	—	0.06	2.9	Tr.	Tr.	1.1	Tr.	96.0
	Hexadecyl alcohol-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus unlabelled substrate(-)	2.5	2.0	56.4	2.0	Tr.	—	—	98.0	—
	Palmitic acid-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus oleyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	70.1	Tr.	11.9	—	77.2	—	10.9
	Oleic acid-1- 14 C (2 μ Ci, 2 μ mol) plus hexadecyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	46.2	1.8	0.9	—	69.5	—	27.8
	Oleic acid-1- 14 C* (2 μ Ci, 2 μ mol) plus hexadecyl alcohol (2 μ mol)	2.5	2.0	76.4	0.9	0.9	—	69.7	Tr.	28.5
Copepods <i>Pareuchaeta elongata</i> Whole animals were used for homogenate preparation	Sodium acetate-1- 14 C (80 μ Ci, 2 μ mol) plus unlabelled substrate(-)	—	—	0.05	2.9	Tr.	9.5	5.8	9.7	72.1

* Albumin complex. Homogenates were prepared in a Potter tissue homogenizer in 5 volumes (*D. glandulifer* and *S. prehensilis*) and 10 volumes (*P. japonica*) of 0.1M phosphate buffer of pH 7.0 and centrifuged (approximately 500 $\times$ g for 2 min).

The resulting supernatant (1 ml) was incubated in a vial containing appropriate substrates, sodium taurocholate (1.5 mg) and Triton X-100 (10 mg) except for the substrates of albumin complex and sodium acetate, and with or without the additions at 30°C for 4 h in a motor-driven shaker.

Abbreviations are as for **Table-1**.

Table-4 Incorporation of palmitic acid [$^{14}\text{COOH}$] or hexadecyl alcohol [$^{14}\text{CH}_2\text{OH}$] into wax esters and other lipid classes and hydrolysis oleyl palmitate [$^{14}\text{COOH}$] by marine microorganisms.

Microorganism	Labelled substrate (2 μCi , 2 μmol)	Unlabelled substrate (2 μmol)	Addition (μmol)			Radioactivity incorporated into various lipid classes (%)					
			ATP	CoA	Carnitine	WE	ALD	TG	FFA	FAL	PL
1000 m*	Palmitic acid-1- ^{14}C	Oleyl alcohol	2.5	2.0	—	8.5	15.6	—	72.2	—	3.7
		—	—	—	—	34.8	12.6	—	44.1	—	8.5
300 m**	Palmitic acid-1- ^{14}C	Hexadecyl alcohol	—	—	—	19.0	12.2	—	31.0	2.6	35.2
	Hexadecyl alcohol-1- ^{14}C	Palmitic acid	—	—	—	9.0	—	—	—	88.6	2.4
50 m*	Palmitic acid-1- ^{14}C	Oleyl alcohol	2.5	2.0	—	11.4	9.2	—	73.4	—	6.0
		—	—	—	—	31.4	9.6	—	44.9	—	14.1
5 m**	Palmitic acid-1- ^{14}C	Hexadecyl alcohol	—	—	—	9.5	13.9	—	34.0	1.6	41.0
			2.5	—	—	3.2	6.8	—	12.1	6.3	71.6
			2.5	2.0	—	9.7	7.0	—	20.5	0.1	62.7
			2.5	2.0	2.0	12.2	12.2	—	43.1	0.8	31.7
5 m**	Oleyl palmitate [$^{14}\text{COOH}$]	—	—	—	—	37.6	8.4	—	50.9	—	3.1

* For each experiment 10 l of sea water from indicated depth in Suruga Bay on June 12, 1973 were collected by a Van Dorn type water sampler sterilized with 70% alcohol, of which 6 l were filtered with a Millipore HA filter (pore size 0.45 μ).

** For each experiment 5 l of sea water from indicated depth in Bungo Channel on Oct. 14, 1976 were collected by a Van Dorn type water sampler sterilized with 70% alcohol, of which 2.5 l were filtered with a Millipore HA filter (pore size 0.45 μ).

Incubation was carried out in a vial containing the substrate, cofactors, Triton X-100 (5 mg), and the Millipore filter in 20 ml of filtered sea water at 25°C for 24 h.

Abbreviations are as for Table-1.

2.3 海洋微生物によるワックス・エステル の 生 成

淡青丸の共同利用研究航海 (KT-73-6) に際し、駿河湾において 1000 m と 50 m 層の深度別に、70% エタノールで消毒した Van Dorn 型採水器をもってそれぞれ 10 l を採水し、その 6 l ずつをミリポア HA フィルター (孔径 0.45 μ) で汙過し、フィルター上に微生物を捕集した。あらかじめ乾熱殺菌し、各種の標識基質および補助因子の入った反応容器に、上記ミリポアフィルターをオートクレーブ殺菌汙過海水 20 ml とともに入れ、25°C で 24 h の振とう培養を行った。結果は Table-4 の一部として表示されているように、顕著なワックス・エステルの合成を示すものであったが、その再現性を確かめるために、さらに豊潮丸の研究航海 (1976 年 10 月 13 日～16 日) に際し、豊後水道において 300 m と 5 m 層の深度別に 1 回ごと 5 l を採水し、各反応試験ごとにその 2.5 l をミリポア HA フィルターで汉過し、同種実験の追試を行った。以上の海洋微生物を用いた結果をまとめて Table-4 に示す。

脂質中における放射能の分布をみると、基質として加えたパルミチン酸の場合は遊離脂肪酸、またヘキサデシルアルコールの場合は遊離アルコールに高いピークがみられたが、とくに前者の場合はワックス・エステルへの比較的高いとり込みとともにリン脂質、アルデヒド、少量

ではあるがアルコールへのとり込みもみられた。深度との関係は動物プランクトンを用いた *in vivo* 実験のように明りょうな結果は得られなかったが、最高で 34.8% のワックス・エステルへのとり込みがみられ、またリン脂質へのとり込みも高く、とくに表層で高い値を示した。なお海洋微生物の場合は、先のホモジネート上澄み液にみられた補助因子の賦活効果と異なり、ATP および CoA の添加はかえってワックス・エステルの合成を阻害しているような結果が得られ、補助因子を添加していない方がワックス・エステルへのとり込みの高い値を示した。しかし、一例ではあったが 5 m 層の実験でカルニチンをさらに補助因子とし添加すると、それを加えていないものよりもワックス・エステルの合成割合が増加していた。またヘキサデシルアルコールを基質としても、300 m 層の一例にみられるようにワックス・エステルへのとり込みが認められたが、パルミチン酸を基質とした場合よりも低い結果が得られた。このように海洋微生物は活発にワックス・エステルを生合成するが、また表の最下段に示されるようにパルミチン酸オレイル [$^{14}\text{COOH}$] を基質とした場合は、ワックス・エステルを加水分解¹¹⁾して遊離脂肪酸の高い放射能が認められた。

3 考 察

以上の結果よりかい脚類プランクトン、中深層性のマイクロネクトン魚類およびエビ類、海洋微生物等は、海洋系に普遍的に存在すると思われる前駆物質、長鎖の脂肪酸およびアルコールあるいはトリアシルグリセリンからワックス・エステルを生成していると考えられる。トリアシルグリセリンからの合成は、おそらくリパーゼによってトリアシルグリセリンから先ず脂肪酸が遊離し、その後エステル化酵素¹²⁾によってワックス・エステル中へとり込まれると思われる。しかし、レシチン・コレステロール・アシルトランスフェラーゼ (LCAT) にみられるようなトリアシルグリセリンあるいはリン脂質と長鎖アルコールからワックス・エステルの生成を触媒するアシルトランスフェラーゼの存在を否定することはできず、今後の検討を要する。ワックス・エステルの *de novo* 生合成はアセタート-1-¹⁴C のとり込みによって *in vivo* および *in vitro* 実験から証明された。したがって、これら中深層性動物は体内アセチル CoA のプールから活発なワックス・エステルの合成を行っていると考えられる。Sargent ら¹³⁾ はグルコース-U-¹⁴C、 α -アラニンおよびアスパラギン酸を基質として、ワックス・エステルへのとり込みをみており、糖もアミノ酸もそれらの炭素骨格は解糖あるいはアミノ酸の各種代謝経路を経てアセチル CoA プールに入り、ワックス・エステルへとり込まれることが明らかである。アセタートを基質とした場合¹⁰⁾ も糖、アミノ酸を基質とした場合¹³⁾ も、合成されたワックス・エステルを構成する脂肪酸部およびアルコール部の両者が標識されていることから、アセチル CoA およびそれからアセチル CoA カルボキシラーゼによって生ずるマロニル CoA (厳密にはいずれも酵素化合物として) を経てパルミチン酸およびその変換脂肪酸が生合成され、その後脂肪酸が還元されてアルデヒドを経てアルコールを生成し¹⁰⁾、両者のエステル化によってワックス・エステルが生ずると考えられる。その際、グリセリル・エーテルの生合成¹⁴⁾でも考察されたように、アルコール部がかなりの長鎖モノエンアルコール⁷²⁻⁹⁾ を含有しているから、ワックス・エステルの生成前に脂肪酸としてあるいはアルコールとしての鎖長延長、不飽和化が起こるのかどうか解決すべき問題であろう。

海洋は気界と境する表層より下層に行くに従い、次第に溶存酸素が減少し、酸素ミニマム層が存在するから、そこに生息する動物は嫌氣的代謝を強いられることになる。反応液における溶存酸素の減少はワックス・エステルの合成に影響しないが、溶存酸素が高いとその合成を著しく阻害¹⁵⁾する。また、脂肪酸およびアルコールを基質とした場合に生合成されたワックス・エステル中の

放射能分布をみると、脂肪酸が還元されてアルコール部にとり込まれる割合は、アルコールが酸化されて脂肪酸部にとり込まれる割合よりも大きい。このことは前報のハダカイワシを用いた *in vivo* 実験¹⁰⁾ の場合にも一層明りょうに認められたことであり、脂肪酸のアルデヒドを経てのアルコールへの還元、ひいてはワックス・エステルの前駆体として長鎖アルコールの生成が律速段階となって第一義的意義をもつものと解釈されよう。著者ら¹²⁾はコイ肝すい臓のホモジネート Sephadex G-200 をカラムで分画し、リパーゼの後に溶出される画分が基質脂肪酸を還元してアルデヒド、アルコールの生成を触媒することを認めたが、中深層性の動物でも、このような酵素活性が強く働いていると考えられ、今後さらに検討して行きたい。

深度別に採集された動物プランクトンによるアセタートのとり込みをみた *in vivo* の実験において、50 m、400 m、1000 m と深度が増すとともにワックス・エステルへのとり込みの比率が増加し、一方トリアシルグリセリンの方は減少する逆相関の関係をみた。この結果は前報⁹⁾の深度別脂質クラス分析の結果に一致するもので、表層の動物プランクトンにおいてはトリアシルグリセリンが主成分であるが、深層になるに従いワックス・エステルがトリアシルグリセリンに替わって増加する傾向を証明する一例であろう。海洋の表層においては、太陽光をいっぱい受けて植物プランクトンによる光合成が盛んに行われ、炭水化物の生産が高い。したがって、表層に生息する草食性動物プランクトンは直接に、また肉食性のものでも間接に糖を摂取することができるが、下層となるに従い植物プランクトンとの距離が遠くなって、動物プランクトンの多くは肉食性となり、糖の摂取はタンパク質、脂質に比較して極端に少なくなる。このような中深層性動物の栄養条件下では、主として糖から代謝されて生ずるグリセロリン酸の量は制限されるであろうから、トリアシルグリセリンを合成する際のグリセリン部の供給が不足するであろう。しかも前述のように、嫌氣的条件下に脂肪酸からのアルコールの生成が進めば、結果として中深層性動物においてはトリアシルグリセリンの生成よりもワックス・エステルの生成が適していると推察される。さらに、ワックス・エステルの鍵前駆物質とも考えられる長鎖アルコールは、実験で示されたように海洋微生物によっても供給される。すなわち、これら微生物は *de novo* 生合成、脂肪酸の還元を行うとともに、ワックスをもつ生物死体に付着してワックス・エステルを加水分解するであろう。

さてワックス・エステルは、中深層の動物にとって浮力獲得の機能を有することを述べた。Lewis¹⁵⁾はワックス・エステル、ジアシル・グリセリル・エーテル、トリアシルグリセリンについて密度を測定し、ワックス・エ

ステルはスクワレンと同程度に浮力獲得に効果的であり、ジアシル・グリセリル・エーテルはトリアシルグリセリンよりは勝れていると述べている。この事実は古く辻本¹⁶⁾によってサメ肝油の比重測定から指摘されており、著者ら³⁾によっても生態的に生息深度を異にするサメ類の肝油分析から確認されている。表層に比べてえさの希薄なまた供給の不安定な中深層⁵⁾においては、それら生体の比重をできる限り海水の比重に近づければ、それだけ浮力獲得のためのエネルギー消費を最少にすることができるわけで、それら生物にとって好都合であろう。また Benson ら⁶⁾は、ワックス・エステルはトリアシルグリセリンに比し熱膨脹率が大きいことをみており、確かにこれら中深層性の動物は日周性の垂直遊泳をするものが多く、水温の高低によって回遊を容易ならしめることになり、それによって Vinogradov¹⁷⁾の説くように海洋における垂直の物質移動をてい(梯)状の食物連鎖を通してさらに可能ならしめる効果が期待できる。浮力とワックス・エステルに関し、筆者らは荷重負荷による試験的研究を試みている。

最後にホモジネート上清液を用いた *in vitro* の実験において、ワックス・エステルの生合成に補助因子として ATP と CoA を加えると未添加のものに比べて 2~3 倍に賦活されることをみた。ということは、エステル化に先立って脂肪酸がアシル CoA 合成酵素によってチオエステルとなり活性化される必要があるであろう。[1-¹⁴C] オレイン酸のアルブミン複合体を基質とした場合は、そうでない場合と比べて ATP と CoA の促進効果は認められなかった。さらに海洋微生物によるワックス・エステルの生合成実験においては、これら補助因子の促進効果は認められず、かえって阻害効果がみられ、さらにカルニチンの添加が促進的に働くことをみた。膜の透過に関し、アシル CoA よりもアシルカルニチンの方が有利である可能性が考えられる。

おわりに本研究を行うに当たり、種々御協力頂いた東京大学

海洋研究所の淡青丸および広島大学水畜産学部の豊潮丸乗組員ならびに関係者の方々に深く感謝申し上げます。なお、本研究費の一部は文部省科学研究費の補助によった。

(昭和 52 年 1 月 24 日受理)

文 献

- 1) T.R. Parson, M. M. Takahashi, "Biological Oceanographic Processes", (1973) Pergamon Press, Oxford
- 2) J.J. Childress, M.H. Nygaard, *Deep-Sea Res.*, **20**, 1093 (1973)
- 3) M. Kayama, Y. Tsuchiya, J.C. Nevenzel, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **35**, 653 (1969)
- 4) J.C. Nevenzel, W. Rodegker, J.S. Robinson, M. Kayama, *Comp. Biochem. Physiol.*, **31**, 25 (1969)
- 5) R.F. Lee, J. Hirota, A.M. Barnett, *Deep-Sea Res.*, **18**, 1147 (1971)
- 6) A.A. Benson, R.F. Lee, *Sci. Am.*, **232** (3), 77 (1975); 鹿山 光沢, サイエンス, **5** (5), 98 (1975)
- 7) 鹿山 光, 池田康行, 油化学, **24**, 435 (1975)
- 8) 鹿山 光, 中川平介, 油化学, **24**, 441 (1975)
- 9) 鹿山 光, 池田康行, 小牧勇蔵, 油化学, **25**, 329 (1976)
- 10) M. Kayama, J.C. Nevenzel, *Mar. Biol.*, **24**, 279 (1974)
- 11) M. Kayama, "Biogenesis of Marine Lipids and Their Decomposition" (1973), *Proc. Symp. Hydrogeochem. Biogeochem.*, **2**, 571-593, Clarke Co., Washington, D. C.
- 12) 鹿山 光, 池田康行, 日本生化学大会 (1974), 1-G-19, 岡山
- 13) J.R. Sargent, R. McIntosh, *Mar. Biol.*, **25**, 271 (1974)
- 14) M. Kayama, Y. Tsuchiya, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **34**, 640 (1968)
- 15) R.W. Lewis, *Lipids*, **5**, 151 (1970)
- 16) 辻本満丸 "肝油の研究" 丸善, 東京 (1936), p. 189-190
- 17) M.E. Vinogradov, *Trudy Inst. Okean.*, **13**, 71 (1955)