プロスタグランジン生産微生物のスクリーニング

中島 一郎^{*1}・砂崎 和彦^{*2}・大場 健吉^{*3}

^{*1} ライオン株式会社研究開発本部生物科学センター (〒256-0811 神奈川県小田原市田島 100)

^{*2} ライオン株式会社薬事部 (〒130-0004 東京都墨田区本所 1-3-7)

^{*3} ライオン株式会社研究開発本部 (〒132-0035 東京都江戸川区平井 7-13-12)

Screening of Prostaglandin Productive Microorganisms

Ichiro NAKAJIMA^{*1}, Kazuhiko SUZAKI^{*2}, and Kenkichi OBA^{*3}

^{*1} Life Science Research Center, Lion Corporation

(100, Tajima, Odawara-shi, Kanagawa-ken 256-0811)

^{*2} Pharmaceutical Affairs Department, Lion Corporation

(1-3-7, Honjo, Sumida-ku, Tokyo 130-0004)

^{*3} Research & Development Headquarters, Lion Corporation

(7-13-12, Hirai, Edogawa-ku, Tokyo 132-0035)

Abstract : Prostaglandins (PG) regulate many physiological reactions and three natural PGs are presently in use for preparing obstetric and blood circulatory drugs. The chemical synthesis of these compounds is quite difficult owing to their complicated and unstable structure.

This study was carried out to determine whether biological PG synthesis could be conducted through the use of microorganisms. PG screening tests with the cultured medium were examined on 275 strains of microorganisms using the HPLC-bioassay system.

Eleven species of bacteria and fungi were found to produce PGE₁, PGE₂ and PGF_{2α}. Five of these species converted arachidonic acid added to the culture medium into PGE₂ and/or PGF_{2α}.

Key words : prostaglandin, production, bacteria, fungi

1 緒 言

炎症や血液循環の重要なメディエーターとして知られるプロスタグランジン (PG) には、多彩な機能を持つ数多くの種類が存在する。このうち、医薬品として承認され、現在治療に用いられている天然型 PG は、PGE₁、PGE₂ および PGF_{2α} の 3 種である。これら医薬品 PG の製造方法として、これまで以下に示すような種々の方法が提唱され、実用化が検討されてきた。

主なものとして、動物臓器を酵素源とした酵素反応法¹⁾、サンゴの抽出物から一部構造変換する半合成法²⁾そして化学合成法があげられる。前 2 法は大量生産に不適、あるいは環境保護の観点から実用化にいたらず、現在工業的な製法として用いられているのは Corey らが考案した化学合成法³⁾である。

しかし、この優れた化学合成法も、PG の構造の複雑さ (たとえば PGF_{2α} は 5 個の不斉炭素を持つ) から反応ステップが非常に多く、最終生成物の収率が極めて低いという難点を持つ。

連絡者：中島一郎

筆者らは、生物の反応特異性を利用し、しかも大量生産可能な製造法を目指した微生物による PG 生合成法の開発を試みた。本報ではその第一段階として、現行医薬品に用いられている 3 種の PG を対象に、HPLC とバイオアッセイを組み合わせた評価系により PG 生産微生物のスクリーニングを行ったので報告する。

2 実 験

2.1 微生物の収集

下記のジーンバンクからバクテリア 77 株、酵母 18 株、糸状菌 180 株、計 275 株の微生物を収集し、PG 生産微生物の候補とした。

①アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)

②東京大学応用微生物研究所 (IAM)

③財団法人発酵研究所 (IFO)

④ライオン株式会社分析センター (LARC)

2.2 培養方法

培地は、バクテリアには Nutrient Agar (Difco 社製)、酵母と糸状菌にはブドウ糖ペプトン培地 (日水製薬社製) を用いた。これらの培地 100 mL を入れた 500

mL 容坂口フラスコに、前培養して十分に生育した微生物懸濁液 3 mL を注入し、26°C で振とう培養した。

培養期間は、バクテリアおよび酵母は 1 あるいは 7 日間、糸状菌は 3 あるいは 10 日間とし、培養液中の PG 発酵生産量を後述の方法で測定した。

一方、PG の前駆体と考えられる多価不飽和脂肪酸の PG への変換能力を調べるため、10 mg/mL のアラキドン酸エタノール溶液を調製し、その 100 μ L を上記と同様に培養した各種微生物培養液中に培養終了の 4 時間前に添加し、培養液中の PG 量を測定した。

2.3 抽出

培養液の一部 20 mL を 1 M 塩酸で pH 3~4 に調整した後、等量の酢酸エチルで 2 回抽出した。酢酸エチル層を合わせ、水洗した後、窒素気流下減圧濃縮した。以下、濃縮操作は全て窒素気流下で行った。

2.4 予備精製

抽出物は Powell の方法⁴⁾に準じ、予備精製を行った。

すなわち、少量の 15% エタノールに溶解した抽出物を SEP-PAK C₁₈ カートリッジ (Waters 社製) に負荷した後、15% エタノール、n-ヘキサン、酢酸エチルで順次溶出し、酢酸エチル溶出画分を濃縮して PG 粗画分とした。

2.5 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

PG 粗画分は Terragno ら⁵⁾の方法に準じた以下の条件で HPLC に供し、PGE₁、PGE₂ および PGF_{2 α} 各々の PG 標品 (Sigma 社製) と重複する溶出位置を分取した。

機種：日立 655 A-12

カラム：ODS-AQ (YMC 社製) 5 μ m, 6 $\times$ 150 mm

移動相：0.017 M リン酸/アセトニトリル (65 : 35)

流速：1.5 mL/min

検出：UV 196 nm

2.6 バイオアッセイ⁶⁾

6~10 週齢の雄性ラット胃底部を摘出し、冷却タイロッド液中で 5 $\times$ 40 mm の組織切片を作製した。この

切片を 37°C のタイロッド液を常に流下する表面還流装置⁷⁾に取り付け、トランスデューサーを通じて組織切片の収縮を記録した。自発運動が低下した後、試料のエタノール溶液 10 μ L を切片に滴下し、筋収縮の強度を測定した。

バイオアッセイの模式図を Fig. 1 に示す。

2.7 ラジオイムノアッセイ (RIA)⁸⁾

プロスタグランジン RIA キット (AMI 社製) を用い、PG の特異的定量を行った。

HPLC で分取した PG 画分を RIA チューブに取り、緩衝液 100 μ L に溶解した。これに ³H ラベル PG 溶液 100 μ L を加え、さらに抗 PG 抗体 100 μ L を加えて室温で 2 時間抗原抗体反応を行わせた。反応後、PG 抗体と結合していない遊離 PG を Magnetic Dextran Coated Charcoal 溶液 750 μ L を加えて吸着除去し、遠心上清の結合 PG をシンチレーションカウンターで計測した。試料中の PG 量は PG 標品を用いて作製した標準曲線から算出した。

3 結果

3.1 バイオアッセイによるスクリーニング

微生物培養液から PG の抽出・精製過程を Fig. 2 に、各段階のバイオアッセイの結果を Table 1 に示す。

HPLC により PG 画分を分取した段階で、バクテリア 77 株中 3 株、糸状菌 180 株中 8 株、合計 11 株の微生物抽出物に筋収縮活性が認められた。11 株の微生物はいずれも、3 種の PG (PGE₁、PGE₂、PGF_{2 α}) 画分すべてで活性を示した。

供試した酵母 18 株の培養液は、SEP-PAK C₁₈ による二次精製段階ですべて陰性となった。

3.2 PG 発酵生産微生物

第 3 段階のバイオアッセイで陽性を示した 11 株の微生物の各 PG 画分は、RIA でも反応性が認められ、これらの微生物の PG 発酵生産が確認された。11 株の微生物について、RIA で測定した各 PG の培地中含有量を Table 2 に示す。

Fig. 1 Bioassay for Prostaglandins.

Fig. 2 Extraction and Fractionation of Prostaglandins from Culture Mediums.

Table 1 The Number of Positive Strains in Bioassay at Each Screening Stage.

Stage	Bacteria	Fungi	Yeast	Total
1st	41/77	57/180	9/18	107/275
2nd	4/41	16/57	0/9	20/107
3rd	3/4	8/16	NT	11/20

Values represent the number of positive/tested.
NT: not tested.

培養期間はバクテリア、糸状菌ともに長い方が生産性が高かった。Table 2の数値はバクテリアで7日間、糸状菌は10日間培養したときの結果である。

3.3 アラキドン酸のPGへの変換

培地に添加したアラキドン酸から PGE₂ あるいは PGF_{2α} への変換が認められた5株の微生物を Table 3に示す。

Table 3の数値は、アラキドン酸を添加した際のPG測定値から Table 2で示した発酵生産量を減じたもの

Table 3 Conversion of Arachidonic Acid into Prostaglandins.

Strain	PG produced (μg/L)	
	PGE ₂	PGF _{2α}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 17904	2.79	1.14
<i>Aspergillus niger</i> IAM 3001	0.90	ND
<i>Mortierella alpina</i> IFO 8568	ND	3.65
<i>Mortierella elongata</i> IFO 8570	8.45	16.50
<i>Mortierella humicola</i> IFO 8289	0.16	ND

ND: not detected.

である。

アラキドン酸からPGへの変換率は、*Mortierella elongata* IFO 8570が最も高く、約0.25%であった。

4 考 察

微生物を用いたPG生産に関する研究事例として、

Table 2 Prostaglandin Production by Microorganisms.

Strain	PG produced (μg/L)		
	PGE ₁	PGE ₂	PGF _{2α}
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var. <i>anitrutus</i> LARC 129	0.11	0.28	0.08
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 17904	0.35	0.48	0.18
<i>Acinetobacter</i> sp. LARC 104	0.18	0.58	0.08
<i>Aspergillus candidus</i> IFO 4389	0.21	0.68	0.06
<i>Aspergillus cellulosae</i> IFO 4040	0.12	0.24	0.04
<i>Aspergillus niger</i> IAM 3001	0.12	0.60	0.05
<i>Mortierella alpina</i> ATCC 36965	0.29	2.55	0.93
<i>Mortierella alpina</i> IFO 8568	0.59	5.45	2.70
<i>Mortierella elongata</i> IFO 8570	2.52	5.55	5.10
<i>Mortierella humicola</i> IFO 8289	0.20	0.26	0.02
<i>Hypocrea splendens</i> IFO 7711	0.21	0.75	0.06

Pseudomonas aeruginosa が PGE, PGF, および PGA を発酵生産することが報告されている⁹⁾。しかしこの報告では、重要な意義を持つ PG の構造に対し、E₁ や E₂ などサブクラスの同定がなされていない。また、アラキドン酸などの前駆脂肪酸から PG への微生物による変換反応に関しても、*Fusarium sambucinum*¹⁰⁾ や *Trichothecium roseum*¹¹⁾ の事例があげられるぐらいで、過去の研究例は数少ない。研究の障害となっている大きな要因の一つは、PG の分離分析が困難なためと思われる。

PG は数ナノグラムという極微量で生理活性を示す物質であり、その種類も多いことからスクリーニングにあたっては高感度で特異的な検出法が要求される。この要求を満たす優れた検出法として RIA 法あるいは ELISA 法があげられるが、操作がやや煩雑であり多数の検体の処理には不適である。

PG 生産微生物の探索に当たり、まず最初のスクリーニング法として、筆者らはラットの胃底部組織切片を用いるバイオアッセイを採用した。この方法は PG 特異性はないが極めて高感度であり (PGE₂ 検出限界約 2 ng), 1 切片で連続的に多数の検体を測定できるという特長を持つ。さらに、HPLC 分離をバイオアッセイと組み合わせることにより、対象とした 3 種の PG (PGE₁, PGE₂, PGF_{2α}) に特異的な評価系を設定することができた。

培養方法に関しては、基本的な市販培地を用い、培養期間は対数増殖期と二次代謝産物を期待した比較的長期の 2 点をとった。また、外部から加えた基質の変換能力を調べるため、アラキドン酸の添加実験も実施した。4 時間という変換時間の設定は、本実験条件におけるアラキドン酸の安定性を考慮したものである。

以上の方法により、275 株の微生物から最終的に 11 株 (バクテリア 3 株、糸状菌 8 株) と比較的高い確率で PG 生産微生物を捕らえることができた。また、5 株の微生物 (バクテリア 1 株、糸状菌 4 株) に、培地中に加えたアラキドン酸を PGE₂ や PGF_{2α} に変換する能力もあることが明らかとなった。

本研究で見出した 11 種の PG 生産菌に共通する点は、いずれも不飽和脂肪酸の生産菌ということである。

たとえば、*Acinetobacter* 属の菌はパルミトオレイン酸を、*Aspergillus* 属の菌はリノール酸およびアラキドン酸を、さらに *Mortierella* 属の菌に関しては、アラキドン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸など様々な脂肪酸を生産するという報告がある^{12)~14)}。

不飽和脂肪酸がこれらの微生物にとって最終的な目的産物かどうかは明らかではない。しかし、その生成量は本実験の PG 生成量と比較すると圧倒的に多量であり、不飽和脂肪酸を PG 生成のための中間産物と考えるのは

やや無理がある (たとえば *Mortierella alpina* は、総脂肪酸の 68.5~78.8%、乾燥菌体重量の約 25% のアラキドン酸を生成する¹²⁾)。微生物にとって PG の生理的意義は過去に研究例もなく不明であるが、生物の物質生産においては同化経路があれば当然異化経路も存在し、単に不飽和脂肪酸の酸化的分解産物の一つとして PG が生成されている可能性も考えられる。

もう一つ共通する特徴は、11 種の微生物が量の多少はあれいずれも、本報告で測定対象とした 3 種の PG (PGE₁, PGE₂, PGF_{2α}) すべてを生産していた点である。

哺乳動物の PG 生合成酵素として知られるシクロオキシゲナーゼは、親和性に若干差はあるが、PGE₁, PGE₂, PGE₃ いずれの前駆脂肪酸 (すなわち、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸) も基質とみなして変換するといわれる¹⁵⁾。本報告の PG 生産微生物も、シクロオキシゲナーゼと同様の特性を持つ酵素により異なる種類の PG を生成しているのではないかと推察される。

このように、生合成経路など PG の生化学的研究ツールとしての利用という視点からも、PG 生産微生物は大いに興味を持たれる。

また、最近、脂肪酸の不飽和化酵素の阻害剤や欠損変異株の利用により、特徴的な PG 前駆脂肪酸組成を持つ油脂生産が可能となっている^{16),17)}。これらの知見を応用すれば、選択的な PG 種の微生物生産の可能性もある。

一方、アラキドン酸から PG への変換反応では、*Mortierella elongata* IFO 8570 が高生産株という点で PG 発酵生産と一致していたが、他の株では特に相関性は認められなかった。本来アラキドン酸を生産する株が多く、基質としての添加効果が表れにくかったと考えられる。ジホモ- γ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸など、他の PG 前駆脂肪酸での検討が今後必要と思われる。

本研究は医薬品 PG 原体の微生物生産の可能性を探ることを目的とし、現行医薬品に使用されている 3 種の PG、すなわち、PGE₁, PGE₂ および PGF_{2α} の生産菌候補となる 11 種の微生物を見出した。なお、微生物による PGE₁ の生産は本報告が初めてである。今回のスクリーニングで得られた微生物の PG 生産性は、発酵法、脂肪酸変換法ともに工業的見地からするとまだ低いレベルにある。今後の生産性向上策としては、最適培養条件の検討や微生物そのものの変異による育種、遺伝子操作などの検討が考えられる。近年のこの研究分野の技術的進歩から、生産性の飛躍的向上も十分可能と期待している。

(受付: 1998 年 3 月 25 日, 受理: 1998 年 6 月 30 日)

文 献

- 1) E.G. Daniels, J.E. Pike, "PG Symposium of the Worcester Foundation for Experimental Biology", Interscience Publisher (1968) p. 379.
 - 2) E.J. Corey, H.E. Ensley, *J. Org. Chem.*, **38**, 3187 (1973).
 - 3) E.J. Corey, N.M. Weinshenker, T.K. Schaaf, W. Huber, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5675 (1969).
 - 4) W.S. Powell, *Prostaglandins*, **20**, 947 (1980).
 - 5) A. Terragno, R. Rydzik, N.A. Terragno, *Prostaglandins*, **21**, 101 (1981).
 - 6) 鹿取 信, "プロスタグランジン研究法(上)" 山本尚三, 鹿取 信編, 東京化学同人(1986) p. 108.
 - 7) J.H. Gaddum, *Br. J. Pharmacol.*, **8**, 321 (1953).
 - 8) 稲川寿夫, "プロスタグランジン研究法(上)" 山本尚三, 鹿取 信編, 東京化学同人(1986) p. 97.
 - 9) Experimental Biology Inc., *US Pat.*, **3 843 467** (1974).
 - 10) L.M. Bragintseva, T.K. Ustynyuk, V.A. Kovalenko, N.R. Ievleva, *Farmatsiya (Moscow)*, **33**, 48 (1984).
 - 11) L.M. Bragintseva, T.K. Ustynyuk, V.A. Kovalenko, N.R. Ievleva, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **22**, 22 (1986).
 - 12) N. Totani, K. Oba, *Lipids*, **22**, 1060 (1987).
 - 13) 新免芳史, 清水 昌, 山田秀明, 公開特許, 昭 63-14 696.
 - 14) 新免芳史, 清水 昌, 山田秀明, 公開特許, 昭 63-14 697.
 - 15) D.F. Reingold, P. Needleman, *Trends in Pharmacological Science*, September, 359 (1980).
 - 16) S. Shimizu, K. Akimoto, H. Kawashima, Y. Shinmen, H. Yamada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 237 (1989).
 - 17) S. Jareonkitmongkol, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 997 (1992).
-

[報文] プロスタグランジン生産微生物のスクリーニング

中島 一郎*¹・砂崎 和彦*²・大場 健吉*³

*1 ライオン株式会社研究開発本部生物科学センター (〒256-0811 神奈川県小田原市田島 100)

*2 ライオン株式会社薬事部 (〒130-0004 東京都墨田区本所 1-3-7)

*3 ライオン株式会社研究開発本部 (〒132-0035 東京都江戸川区平井 7-13-12)

プロスタグランジン (PG) は様々な生体反応の制御物質として知られ、現在 3 種の天然型 PG が産科領域や血液循環改善の医薬品として使用されている。しかし、これらの化合物の構造は複雑でしかも不安定なため、その化学合成は非常に困難である。

本研究は微生物を利用した PG の生物生産の可能性を探るため、HPLC とバイオアッセイを組み合わせた評価系を用い、275 株の微生物に対し培養液の PG スクリーニングを実施した。

その結果、11 種のバクテリアあるいは糸状菌が、各々 PGE₁, PGE₂ および PGF_{2α} を生産することを見出した。このうち 5 種の微生物は、培地に添加したアラキドン酸を PGE₂, PGF_{2α} に変換した。

(連絡者：中島一郎) Vol. 47, No. 9, 867 (1998)

[報文] エイコサペンタエン酸の自動酸化により 生ずる揮発性成分に及ぼすトリアシル グリセリン構造の影響

遠藤 泰志・青柳 貴子・藤本健四郎

東北大学農学部 (〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

高度不飽和脂肪酸の自動酸化で生じる揮発性成分に及ぼすトリアシルグリセリン (TG) 構造の影響を知るため、エイコサペンタエン酸 (EPA) とパルミチン酸をモル比で 1:2 で含む TG 試料を 25℃ で自動酸化させた後、ヘッドスペース中の揮発性成分を固相マイクロ抽出法を用いたガスクロマトグラフィーで分析した。EPA 含有 TG の自動酸化で生成するヒドロペルオキシド量は酸化時間、並びに TG 1 分子中の EPA 濃度に従って増加した。総揮発性成分量は EPA 含有 TG の中ではトリエイコサペンタエノイルグリセリンとトリパルミトイルグリセリンの 1:2 混合物 (EEE/PPP (1:2)) が最も高かった。未酸化の場合、全ての TG とも、主な揮発性成分は 2,4,7-decatrional であった。ジエイコサペンタエノイルパルミトイルグリセリンとトリパルミトイルグリセリンの 1:1 混合物 (EEP/PPP (1:1)) やジパルミトイルエイコサペンタエノイルグリセリン (EPP) の未酸化と酸化後で揮発性成分に大きな違いは見られなかったが、酸化 EEE/PPP (1:2) では、多種類の揮発性化合物が生成した。特に 1-propanal, 2-butenal, 2-pentenal が酸化 EEE/PPP (1:2) で検出された。以上より、TG 構造が EPA の自動酸化で生じる揮発性成分の生成に影響を及ぼすことが示された。

(連絡者：遠藤泰志) Vol. 47, No. 9, 873 (1998)