学会賞および進歩賞受賞論文要旨

平成15年度日本油化学会進歩賞

総説 バイオサーファクタントの生産と機能利用に関する研究

北本 大

産業技術総合研究所 環境調和技術研究部門 (〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1 中央第 5-2)

バイオサーファクタント (BS) は、微生物によって作り出される両親媒性の機能性脂質である。BS は、優れた界面活性や高い生分解性を示すばかりでなく、様々な界面で合成界面活性剤とは異なる挙動、機能を発現する。マンノシルエリスリトールリピッド (MEL) は、酵母によって大量に生産される糖脂質型の BS である。MEL は、優れた自己集合特性 (表面・界面張力低下能、巨大ベシクル形成能) を示すばかりでなく、抗微生物活性や動物細胞に対する分化誘導活性も有している。MEL は、氷粒子に対して優れた凝集抑制効果を示すため、氷スラリーを利用した冷熱蓄熱システムの高効率化にも有効である。さらに、ヒト抗体に対して高い結合性や結合容量を示すことから、そのアフィニティ分離担体としての利用の可能性もある。最近、MEL を組み込んだリボソームが、腫瘍細胞に対して非常に高い遺伝子導入効率 (リボソーム法としてはこれまでの最高レベル) を示すことが判った。このように糖脂質型 BS は、環境適合性と多機能性を併せ持つため、グリーンテクノロジーばかりでなく、ナノテクや先端医療技術など幅広い産業分野で、その機能利用が期待される。

(連絡者: 北本 大) Vol.3, No.12, 663 (2003)

平成 15 年度日本油化学会進歩賞

バイオサーファクタントの生産と機能利用に関する研究

Production of Glycolipid Biosurfactants and Their Functional Development

北本 大

産業技術総合研究所 環境調和技術研究部門
〒305-8565
茨城県つくば市東 1-1 中央第 5-2

Dai KITAMOTO

Research Institute for Green Technology,
National Institute of Advanced Science and
Technology
Central 5-2, Higashi 1-1, Tsukuba, 305-8565,
JAPAN

Abstract: Biosurfactants (BS) produced by various microorganisms show unique properties (e.g. mild production conditions, lower toxicity, and environmental compatibility) compared to their chemical counterparts. The numerous advantages of BS have prompted applications not only in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries but in energy and environmental technologies as well. A yeast strain of *Candida antarctica* was found to produce a large amount of mannosylerythritol lipids (MEL) from different vegetable oils or hydrocarbons. MEL exhibited not only excellent surface-active properties but also versatile biochemical actions, including antimicrobial activity and differentiation-inducing activity against human leukemia cells. Interestingly, MEL showed a remarkable anti-agglomeration effect on ice particles in an ice-water slurry system used for cold thermal storage, and attained a high ice-packing factor to improve the system efficiency and environmental load. MEL also displayed high binding affinity and capacity toward human immunoglobulin G on polymer beads, indicating a great potential as a new affinity ligand for the protein. In addition, MEL showed excellent self-assembling properties to form giant liposomes. More significantly, the cationic liposomes bearing MEL increased dramatically the efficiency of gene transfection into mammalian cells. The yeast BS should thus be a new nano-bio-material, and broaden their applications in various advanced technologies.

Key words: Biosurfactants, Glycolipid, Surface-active Property, Ice Slurry, Cell Differentiation, Immunoglobulin, Protein Binding, Liposome, Gene Delivery.

1 はじめに

界面活性剤は国内だけでも年間 100 万トン以上生産され、その 1/3 が家庭用に、残りの 2/3 が繊維、製紙、ゴム・プラスチック、医薬・化粧品、食品、土木・建築、機械・金属など、ほとんどの産業に利用されている¹⁾。その機能は、乳化・分散、洗浄、起泡・消泡、湿潤・浸透、防錆、均染・固着、帯電防止と多種多様であり、現在 6,000 品目以上が用途に応じて使い分けられている。界面活性剤は最も身近な化成品の一つであり、例えば、

携帯電話、ボールペン、缶コーヒーといった日用品から食品にわたる広範囲において、大切な働きをしている。

大部分の界面活性剤は、石油由来であるが、石鹼をはじめ、レシチンやサポニンなど動植物由来の界面活性剤も古くから利用されている。近年、化学物質のリスク削減、循環型社会の育成といった観点から、より環境に調和した界面活性剤の開発・利用が望まれており、こうした天然系の界面活性剤が一層注目を集めている。

天然系の界面活性剤のうち、特に微生物によって生産されるものはバイオサーファクタント（以下 BS）と呼ばれる²⁻⁴⁾。BS は、1960 年代後半に始まった炭化水素（石油）発酵の研究途上、菌体外に分泌される両親媒性物質として発見された。発見以来、しばらくは生分解

連絡者：北本 大
TEL : 029-861-4664 FAX : 029-861-4660
E-mail : dai-kitamoto@aist.go.jp

性・安全性の高い“界面活性剤”として研究されていた。しかし、最近になって、高い自己組織化能、抗腫瘍活性など既存の界面活性剤には見られないユニークな特性が発見され³⁾、“環境に適合し、かつ多彩な機能を持つ新材料”，として各種産業への利用が期待されている。

本稿では、筆者らが研究を進めてきた酵母が生産するBS，マンノシルエリスリトールリピッド（MEL，Fig. 1）について、その大量生産や生合成、物性の解析、機能利用等を紹介したい。

2 バイオサーファクタントの種類と特徴

BSは、その親水基の構造から、1) 糖脂質型、2) 脂肪酸型、3) リポペプチド型、4) 高分子型に分類され、現在では数十種類のものが知られている。Table 1 に代表的なBSとその生産菌を示した。特に、糖質型BSは、微生物生産性が高く、原料面（糖質系バイオマスの利用が可能）、機能面（生体に対して糖鎖に由来する特性を示す）でも優位にあるため、最も良く研究されている。例えば、ソホロリピッド³⁾は、既に化粧品素材や食器洗浄機用洗剤として実用化されているが、その微生物生産量は、現在では $400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上に達している²⁾。

合成界面活性剤に比べた場合、BSの構造的な特徴は、1) 複数の官能基や光学活性点、2) 複雑でかさ高い（bulkyな）構造、3) 生分解を受けやすい構造、などを有することである。一方、機能的な特徴としては、1) 低濃度で大きな界面活性、2) 緩やかで持続的な作用、3) 優れた分子集合体（液晶）形成能、4) 特異な生理活性、などを発揮することである。要は、生物の長い進化の過程で「選抜・淘汰され、洗練された」BSの構造（親水基と疎水基のベストマッチ）が、合成界面活性剤には見られない「離れ技」を生み出している。

3 MELの大量生産：休止菌体法

筆者らが研究を開始した当初、トレハロースリピッドやラムノリピッドなど既知BSの多くが細菌由来であ

Table 1 Major Types of Biosurfactants²⁾

Biosurfactant	Microorganisms
<i>Glycolipid-type</i>	
Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trehalose lipid	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Sophorose lipid	<i>Candida bombicola</i>
Mannosylerythritol lipid	<i>Candida antarctica</i>
Cellobiose lipid	<i>Ustilago maydis</i>
<i>Fatty acid-type</i>	
Corynomycolic acid	<i>Corynebacterium lepus</i>
Spiculisporic acid	<i>Penicillium spiculisporum</i>
Agaricic acid	<i>Poryporus officinalis</i> Fris
<i>Lipopeptide-type</i>	
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp.
Lichenysin	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Polymer-type</i>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

り、酵母によって大量に生産されるものは、ソホロリピッドだけであった。また、食品や化粧品等への応用を考慮した場合、酵母生産物の方が安全性や商品イメージの点で有利な場合が多い。そこで、BSを生産する酵母の分離を目的として、大豆油を唯一の炭素源に使い、自然界からスクリーニングを行った。その結果、筑波山の樹木（樹液）より分離した酵母菌（*Candida antarctica* T-34株，Fig. 2）が、複数のMELを著量生産することを見出した⁶⁾。

MELは、それまで *Ustilago* 属や *Shizonella* 属のカビの菌体内脂質や、イタコン酸生産酵母から誘導された *n*-アルカン資化性変異株（*Candida* sp. B-7株⁷⁾）の生産物として知られていた。しかし、筆者らが見出したMELは、これら既知のものとは構造が異なり新規なものであったので、その大量生産手法の検討に着手した。

フラスコによる培養条件を種々検討した結果、各種の天然油脂からの生産が可能となった。特に大豆油の場合、1週間の培養で、MELの蓄積量は培養液1L当たり40gに達し（基質重量当たりの収率は、50%）、発酵法としては相当に高い生産性が得られた⁸⁾。培養経過の観察から、本酵母では菌体の増殖期とMEL生産期が連動していないことが判明した。そこで、菌体生産とMEL生産を分離し、休止（静止）菌体法を用いて、MELの効率的な生産を試みた。興味あることに、グルコースを

Fig. 1 Structure of Mannosylerythritol Lipid.

Fig. 2 Production Scheme of Mannosylerythritol Lipid by Resting Cells.

原料として得られた菌体を、非水溶性の基質（植物油や脂肪族炭化水素）と混合・攪拌するだけで、MEL は容易に高収率で生産された⁹⁾。この際、基質以外の栄養塩類（窒素源、無機塩）の添加や、pH の調整は一切不要であった。また、調製した休止菌体は、少なくとも数週間程度は安定であり、反応容器中への基質の間欠的な添加により、MEL 蓄積量をより増加させることが可能であった。植物油を用いた場合、収率は 65% 程度であったが、n-オクタデカンの場合には 87% まで向上し、蓄積量も $140 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ にも達した¹⁰⁾。休止菌体法による MEL 生産のスキームを Fig. 2 に示す。

一般に BS の実用化のためには、少なくとも生産物の収率が 70% 以上、蓄積量が $140 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上のプロセスが必要といわれている¹¹⁾。この点で、MEL の生産性は合格ラインであり、工業的な生産も充分可能である。

これらの基質の場合とは異なり、糖類などの水溶性の基質からは、ほとんど MEL は生産されなかった。即ち、MEL の分泌・生産には、非水溶性の基質と菌体の接触が必須であることが判った。しかし面白いことに、糖類を基質とした場合、MEL は「菌体外」にではなく、「菌体内」に大量に蓄積されることが判った¹²⁾。その菌体内 MEL 量は、驚くべきことに、乾燥菌体重量の 10% 以上に達していた（通常、微生物では、糖脂質は主に膜

成分として極微量に存在する程度である）。さらに、この菌体内 MEL は、培養期間中トリグリスリセロールと同様な増減傾向を示した。従って、MEL には、界面活性物質以外にエネルギー貯蔵物質としての機能も存在することが推定された。

4 MEL の生合成：脂肪酸代謝経路

微生物による BS の生産性を改善したり、酵素反応を利用して BS を合成しようとする場合、その生合成機構に関する知見は、最も重要な情報の一つである。そこで、MEL の大量生産に関する検討と併行して、その生合成経路について研究を開始した。糖脂質の生合成は、関与している酵素反応だけでも数十段階に及ぶと考えられる。まず、与える基質と生産される MEL の構造の關係に着目し、MEL の脂肪酸部分の代謝経路について調べてみた。

炭素鎖長が C_n ($n = 12 \sim 18$) の直鎖脂肪酸を基質に用いると、MEL には、主に C_{n-2} , C_{n-4} , $C_{n-6} \dots$ の鎖長を持つ脂肪酸が導入されていた。例えば、炭素鎖長が偶数の基質の場合 (C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18})、生産される MEL の脂肪酸は C_8 と C_{10} が主成分となり、奇数の基質の場合 (C_{13} , C_{15})、 C_7 と C_9 が主成分となっていた¹³⁾。一方、基質を変化させても糖骨格の構造、脂肪酸やアセチル基の数および結合位置には、変化は見られなかった。

次に、各種の酵素阻害剤を用いて、基質と MEL の脂肪酸の構造を比較検討した。セルレニン（脂肪酸の *de novo* 合成阻害剤）の存在下でも、MEL の生産量、および脂肪酸組成には、ほとんど変化が見られなかった¹⁴⁾。これに対し、2-プロモオクタン酸（脂肪酸の β -酸化阻害剤）の存在下では、MEL の生産量は激減し、脂肪酸組成にも大きな変化が見られた（平均鎖長が $C_8 \sim C_{10}$ から、 $C_{10} \sim C_{12}$ へ増大）¹⁵⁾。以上の結果から、MEL 中の脂肪酸は、*de novo* 合成によって生合成されたものではなく、投入した基質の直接の β -酸化中間体であることが判明した (Fig. 3)。

微生物では、これまでに 3 つの脂肪酸代謝経路 (1. *de novo* 合成経路, 2. 鎖長伸長経路, 3. 直接取り込み経路, Fig. 3) が知られている。通常、脂肪酸の β -酸化系では一度サイクルに基質が取り込まれると完全にアセチル-CoA まで分解され、その中間体が酸化系外にリークすることはない。ところが、本酵母の場合、なんらかの原因で基質の β -酸化中間体が系外に輸送され、MEL の生合成に利用されている。従って、この「鎖長短鎖化経路」は、これまでにないユニークな脂肪酸代謝経路と考えられた。

従来、高等動物では、2 つの β -酸化系（完全分解型 =

Fig. 3 Presumptive Biosynthetic Pathway of Mannosylerythritol Lipids in *Candida antarctica* T-34.

ミトコンドリアに存在, 部分分解型 = ペルオキシソームに存在) が知られている。部分型 β -酸化系は, 主に長鎖, 極長鎖脂肪酸などの「鎖長短鎖化」に働いており, その β -酸化中間体 (C_6 程度の脂肪酸) は系外に輸送され, 完全型 β -酸化系でアセチル-CoA まで分解される。Zellweger 症候群や Adrenoleukodystrophy などいくつかの重篤な遺伝病は, この部分型 β -酸化系の欠損に起因している¹⁶⁾。上記の酵母の「鎖長短鎖化経路」は, 高等動物の部分型 β -酸化系に類似しており, 分子遺伝学や脂質生化学的の観点からも興味を持たれる。

さらに, 基質として炭化水素を用いた場合についても, MEL の脂肪酸代謝経路を検討した。脂肪酸の場合と同様に, 炭素鎖長が 12~18 の炭化水素, アルコール, ケトンを経質としても, MEL は良好に生産された^{10, 17)}。この時, 二級アルコールも一級アルコールと同様に利用されることから, 本酵母は末端 (ω 位) 酸化系だけでなく非末端酸化系も有することが推定された。非常に興味深いことに, 同じ炭素鎖長でも 2-ケトンと 3-ケトンでは, MEL の脂肪酸組成が大きく異なることが判明した。例えば, 2-tridecanone を基質とすると, C_9 と C_{11} の脂肪酸が主成分となるのに対し, 3-tridecanone の場合は, C_8 と C_{10} の脂肪酸が主成分となる。以上のことから, 本酵母では長鎖長のアルコールやケトンの酸化の際に, 長鎖二級アルコール脱水素酵素や Baeyer-Villiger 酸化型酵素¹⁸⁾ が関与していることが考えられた (Fig. 4)。これらの酵素は, BS の生合成に重要であるばかりでなく, 立体選択的な有機合成試薬としても非常に有用であり, その特性の解明は次なる重要課題の一つである。

Fig. 4 Presumptive Oxidation Pathway of Alkanols in *Candida antarctica* T-34.

5 MEL の界面活性

MEL は, 一般の界面活性剤に比べ, 側鎖脂肪酸の鎖長が短い (平均鎖長は C_{10}) にもかかわらず, 非常に小さな臨界ミセル濃度で, 大きな界面活性作用を示した¹⁹⁾ (Table 2)。代表的な糖型の合成界面活性剤であるショ糖脂肪酸エステルでは (側鎖が C_{10} の場合), 臨界ミセル濃度は 2.5×10^{-3} M, 表面張力が 34 mN/m であり, MEL の界面活性が相当に大きいことが判る。さらに MEL は, 大豆油や n-ヘキサデカン, 2-メチルナフタレンなど各種の油層に対して, やはり代表的な糖型の合成界面活性剤であるポリオキシエチレン-ソルビタン脂肪

Table 2 Interfacial Properties of Mannosylerythritol Lipids at 25°C¹⁹⁾

Biosurfactant	Surface tension		Interfacial tension** (mN/m)
	cmc* (M)	γ cmc (mN/m)	
MEL-A	2.7×10^{-6}	28.4	2.1
MEL-B	4.5×10^{-6}	28.2	2.4

*Critical micelle concentration.

**n-Tetradecane.

酸エステル (Tween 80) よりも、数倍程度大きな乳化活性を示した¹⁵⁾。また、水-空気界面での MEL-A 分子の占有面積は約 $60 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ と、石鹼と同程度であり、「かさ高い分子」でありながら非常にパッキング性が良いことが推定された。

6 MEL の氷粒子に対する凝集抑制：省エネルギー技術への利用

近年、氷を利用した冷熱蓄熱 (エコ・アイス) が、「地球に優しい」冷房システムとして広がっている。氷蓄熱は、氷が冷媒であるため他の化学冷媒に比べて、安全性とエネルギー密度が高く、システムのコンパクト性にも優れている²⁰⁾。しかし、冷熱効率を上げようとして貯蔵タンク内での氷の充填率を上昇させると、氷粒子の凝集・塊状化が起き易くなり、逆に採熱効率の低下、配管の閉塞を招くといった問題がある。現状技術では、氷の凝集を高濃度の化学系添加物 (溶剤や塩類) により抑制しており、排水処理まで考慮すると、そのシステムの環境負荷は非常に大きくなってしまふ。

界面活性剤の代表的な機能の一つに、固体粒子の溶液中での分散・分散安定化作用がある。そこで、氷粒子の凝集・塊状化を界面活性剤により抑制することを考え、各種界面活性剤の氷蓄熱システムへの影響を検討した。即ち、微量の界面活性剤により氷粒子が安定に分散すれば、高濃度の添加物を一切加えることなく、氷の充填率を上昇させ、かつシステムの環境負荷を低減することが可能になる (Fig. 5)。

面白いことに、合成界面活性剤の中では、非イオン性、しかも糖型の界面活性剤に優れた凝集抑制効果が認められた (Fig. 6)。例えば、食品用界面活性剤としても広く利用されているソルビタン脂肪酸エステル (Span 80) では、 $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の添加で、凝集を招くことなく

Fig. 6 Effect of Surfactant Concentration on Maximum IPF in Ice-water Slurry System.

IPF, ice packing factor. ● MEL-A; ○ sorbitan monooleate; □, *N,N,N*-tripoly (oxyethylene) stearyl ammonium chloride; △, lauryldimethylamino oxide.

30%の氷充填率が得られた。次いで、MEL の効果を調べたところ、 $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の添加で 35%の氷充填率が、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の添加でも 30%の氷充填率が得られ、極めて優れた抑制効果が見られた²¹⁾。

システムの環境負荷やメンテナンス、排水処理を含めたトータルコストを考えた場合、BS の利用は上記のような高濃度の添加物に対して非常に優位と考えられる。これらは、BS が省エネルギー技術へ利用可能であることを、初めて明らかにした例といえる。

7 MEL の抗微生物活性、細胞分化誘導活性

脂質類に対して可溶化能を持つ BS は、何らかの抗微生物作用を示す場合が多い^{2, 3)}。そこで、MEL の抗微生物

Fig. 5 Scheme of Anti-agglomeration of Ice Particles in Ice-water Slurry System by Surfactants.

物活性について検討してみた¹⁹⁾。比較対照としてショ糖脂肪酸エステル (SE 10), およびソルビタン脂肪酸エステル (Span 20) を用いた (Table 3)。

MEL-A および B は, 枯草菌や黄色ブドウ球菌などのグラム陽性細菌に対して強い生育阻害作用を示し, その作用濃度は, SE 10 や Span 20 に比べると, 著しく低いことが判った。

ショ糖脂肪酸エステルは, 食品乳化剤として広く使われており, ほとんどの缶コーヒーにおいて, 乳化の安定とフラットサワー変敗菌 (*Bacillus stearothermophilus* などのグラム陽性細菌) の生育抑制を図るため添加されている。従って, MEL は抗菌作用を兼ね備えた乳化剤としても利用可能であることが示唆された。

糖脂質型 BS は, 生体に対して糖鎖に基づく特異的な作用を発現する場合がある。そこで, MEL を始めとする各種の BS の哺乳類の腫瘍細胞に対する作用を調べてみた。試験には, MEL の他にソホロリピッド (SL), サクシノイルトレハロースリピッド (STL-1, 3), ポリオールリピッド (PL) を用いた。その結果, これらいずれの BS も, ヒト白血病細胞系 (慢性骨髄性白血病細胞 K 562, 急性前骨髄性白血病細胞 HL 60, 幼若性好塩基球細胞 KU 812 など) に対して優れた増殖抑制, および分化誘導活性を示すことが判った²²⁾。MEL-A の場合, 添加濃度 5~10 μM で, HL 60 細胞の増殖が抑制され, 形態の劇的変化と培養フラスコ底面への付着が観察された (Fig. 7)。

ここで興味ある点は, BS の種類によって細胞の分化誘導の方向が顕著に異なることである。例えば, HL 60 細胞に対して, MEL-A, MEL-B および PL は顆粒球への分化を誘導するが, SL, STL-1 および STL-3 は単球への分化を誘導していた (Fig. 8)。また, 上記 6 種の BS はいずれも, HL 60 細胞のプロテインキナーゼ C (PKC) に対して阻害活性を示すことから (一般に, PKC は腫瘍プロモーターで活性化を受け, 抗腫瘍プロモーターで阻害を受ける), これらの BS は細胞内情報伝達系 (リン酸カスケード系) を介して作用を発現することが推定された²³⁾。

最近, 横山らは, MEL がラット褐色細胞腫由来細胞 (PC 12) に対して神経突起の伸展促進, 分化誘導を示すことを報告している²⁴⁾。この際, MEL は, NGF (神経成長因子) による突起伸展作用をさらに増強する効果もある。さらに, MEL は悪性腫瘍であるマウスメラノーマ細胞 (B 16) に対しても, 増殖抑制, 分化誘導 (メラニン生産およびチロシナーゼの活性化), アポトーシスを示すことが報告されている²⁵⁾。

SL や MEL のように大量に生産される酵母の糖脂質が, 分化誘導のような高度な生理作用を有することは驚くべきことである。一方, 同じ糖脂質でもショ糖脂肪酸エステルのような合成界面活性剤には全くその作用が見られない。従って, BS は動物細胞膜上で特異な分子集合体を形成し, この集合体と細胞膜 (特に膜上に局在しているガングリオシド糖脂質のミクロドメイン) との相

Table 3 Antimicrobial Activities of Glycolipid Surfactants¹⁹⁾

Microorganism	Glycolipid surfactant			
	MEL-A	MEL-B	SE10 ^a	Span20 ^b
	MIC* (mg·l ⁻¹)			
Gram-positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i>	6.2	25	800	400
<i>Micrococcus luteus</i>	3.1	12.5	400	400
<i>Mycobacterium rhodochrous</i>	25	25	>800	400
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	25	>800	>800
Gram-negatives bacteria				
<i>Escherichia coli</i>	>400	>400	>800	>800
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>400	>400	>800	>800
<i>Pseudomonas rivoflavina</i>	12.5	25	>800	>800
Yeasts				
<i>Candida albicans</i>	>400	>400	>800	>800
Fungi				
<i>Aspergillus niger</i>	>400	>400	>800	>800

* Minimum inhibitory concentration.

^aSucrose monocaprates.

^bSorbitol monolaurate.

Fig. 7 Differentiation of Human Leukemia Cell HL60 by Mannosylerythritol Lipids. HL60 cells were cultured in the ERDF-ITES medium with or without MEL-A for 2 days. (a) Without MEL-A. (b) With MEL-A (10 μ M)

Fig. 8 Differentiation-inducing Activities of Glycolipid Biosurfactants against Human Leukemia Cells. PKC, Protein kinase C; PL, polyol lipids; SL, sphorolipids; STL, succinoyl-trehalose lipids.

相互作用が細胞内情報伝達系，分化誘導に影響していると考えられる。

8 MEL の糖タンパク質結合能：分離技術への利用

動物細胞表層の糖脂質であるガングリオシド類は，各種のレクチンや抗体（いずれも糖タンパク質）と特異的に結合することが知られている。そこで，MEL と抗体との相互作用を酵素免疫測定法（ELISA）を用いて調べてみた。その結果，MEL はヒト抗体（免疫アルブミン，IgG）に対して優れた結合親和性を示すことが判った²⁶⁾。次いで，MEL を IgG のアフィニティ担体へ利用することを考え，生体適合性の高分子であるポリメタクリル酸ヒドロキシエチル（PHEMA）のビーズ上に MEL を吸着担持させ，MEL-PHEMA 複合体を作製した。

この複合体は，IgG に対して非常に大きな結合定数と結合容量を示した。PHEMA 自体は，IgG と血清アルブミン（血清中の最も主要なタンパク質）に対して全く結合選択性を示さなかった。しかし，MEL を担持させる

と IgG に対する結合選択性が発現し，その担持量の増加に伴い選択性も上昇した。この複合体の IgG に対する結合定数 ($1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) は，プロテイン A（アガロースに固定化したもの）の場合に比べ，4 倍以上であった。一方，複合体の IgG に対する結合容量（複合体 1 g 当たりの結合量）は，供給溶液の IgG 濃度の増加に伴い上昇し，最終的に 100 mg 以上に達した (Fig. 9)²⁷⁾。

さらに興味あることに，複合体からの IgG の溶離は，中性条件下で容易に行えた。プロテイン A は，現在 IgG のアフィニティクロマトに最も広く利用されている担体であるが，製造コストが高く，IgG の溶出に強酸性条件が必須である。従って，この複合体の結合選択性や安定性等をさらに上昇できれば，プロテイン A に替わる新しいアフィニティ担体となり得るかもしれない。

MEL と IgG の結合様式は検討中であるが，少なくとも 1 分子同士の結合ではなく，複数の MEL が自己組織化して分子集合体（糖脂質クラスター）を形成し，これが IgG と相互作用していることが推定される。

9 MEL ベシクル形成能

界面活性物質のうち，特に親水基-疎水基バランスや分子の配向性が優れている場合，水中で「自己集合」してミセルを形成するばかりでなく，「自己組織化」してベシクル（二分子膜）を形成する場合がある。例えば，糖脂質型の BS であるラムノリピッド（RL-A，RL-B）は，分子末端にカルボキシル基を有するため pH 依存性の自己集合性を示し，弱酸性下（pH 4.3~5.8）ではベシクル（数十 nm ~ 数 μ m）を，中性付近（pH 6.0~6.5）

Fig. 9 Binding of Human IgG to MEL-PHEMA Composite. The composite (0.33 ± 0.08 g) bearing MEL-A (7.1 μ mol per g of composite) was suspended in 3 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 4.6, 1M Na_2SO_4) in a polypropylene tube. Different amounts of human IgG (1.0 to 36.0 mg) were added to the tube, and then the tube was incubated for 1 hr.

Fig. 10 Phase Contrast (a) and Fluorescent (b) Microscope Images of Giant Vesicles Prepared from Mannosylerythritol Lipid-C stained with Nile Red. The bar represent 10 μ m.

ではラメラ液晶を、pH 6.8 以上ではミセルを形成する²⁸⁾。そこで、MEL のベシクル形成能について調べてみた。

各 MEL の薄膜をガラス基板上に作製し、水あるいは緩衝液で水和させたところ、すべての MEL において、巨大ベシクル (10 μ m 以上) の自発的な形成が観察された (Fig. 10)²⁹⁾。

レシチンなどのリン脂質がベシクルを形成することは良く知られているが、糖脂質の場合、構造や形成条件の制約が多く、天然物、合成物を問わず、単独系で巨大ベシクルを形成することは稀である。また、微生物由来の糖脂質のうち、単独系でベシクルを形成するものは、ラムノリビッドと MEL 以外ほとんど知られていない。このことから、MEL が如何に優れた自己集合性、配向性、パッキング性等を有しているかが判る。ベシクル形成能があれば、リン脂質や他の機能性材料と組み合わせ、各種の薬剤や遺伝子輸送担体へと応用することが可能である。

10 MEL の遺伝子導入活性：先端医療技術への利用

ガンや遺伝病の 21 世紀の治療法として、外来の遺伝子を体内に導入する「遺伝子治療」が注目を集めている。これまでの遺伝子治療では、遺伝子の「運び屋」として主にウイルスが使われているが、常にその病原性が懸念されている。一方、リボソームを「運び屋」とする新しい方法は、ウイルス法に比べ格段に操作が簡便で安全性も高いが、遺伝子の導入効率が非常に低いことが最大の問題点である。遺伝子 (DNA) は陰イオンを持つため、これまでリボソーム素材として様々な陽イオン性の高分子、脂質、アミノ酸などが検討されてきた。しかし、陽イオン性素材だけでは、導入効率の飛躍的なブレークスルーは困難であった。

上述のように、MEL は優れたベシクル形成能や抗腫瘍作用、糖タンパク質結合性を示す。従って、MEL を

Fig. 11 Effect of MEL-A on the Transfection Efficiency Mediated by Cationic Liposomes. Cells were transfected with luciferase gene (pGL3) using two different cationic cholesterol derivative (I): cholesteryl-3 β -carboxyamido ethylene-*N*-hydroxyethylamine and (II): cholesteryl-3 β -carboxyamido ethylene-*N,N*-dimethylamine). Liposomes containing MEL-A (filled column). Liposomes lacking MEL-A (open column). (a) NIH3T3 cells. (b) COS-7 cells. (c) HeLa cells.

新たなリボソーム素材として利用すれば、これまでになく特性が発現され、導入効率を改善できる可能性がある。そこで、名古屋市立大学の中西 守教授らのグループと共同で、新しいタイプの遺伝子導入用リボソームの開発に取り組んだ。

Fig. 12 Scheme of Gene Delivery into Mammalian Cells Using Cationic Liposomes Containing Mannosylerythritol Lipids.

基膜となるリン脂質にはL- α -ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) を、陽イオン性脂質にはコレステロール誘導体³⁰⁾ を選び、MEL と所定の割合で組み合わせた後、リポソームの調製を行った。作製されたリポソームを用いて、ヒト子宮頸部ガン (HeLa) 細胞など代表的な哺乳類の培養細胞に対して遺伝子導入を行ったところ、極めて高い導入効率が得られた (Fig. 11)。従来の市販のリポソーム (リポフェクチンなど) に比べると、その導入効率は50~70倍であり、リポソーム法としては世界最高レベルに達していた³¹⁾。

詳細な導入機構は検討中であるが、MEL 含有リポソームは従来のものに比べ、1) DNA に対する結合性が高い、2) DNA-リポソーム複合体のサイズがコンパクト (適正) である、3) 複合体の細胞への付着や取り込みが起こり易い、ことなどが推定された (Fig. 12)。

この新しいリポソームによって、今後遺伝子導入操作が効率化され、遺伝子機能の研究や、遺伝子治療の研究がスピードアップされることに期待したい。

11 おわりに

BSの実用化にとって生産コストは依然大きな問題であるが、最近のバイオテクノロジーの飛躍的革新、さらには循環型社会、ライフサイクルアセスメントといった考え方の導入に伴い、BSは“地球に優しい新世紀の機能性材料”として多方面から一層の注目を集めている。

筆者らが明らかにしてきた MEL の特性や機能は、基

本的にその「特異な構造」、即ち「自己組織化能」に基づくものである。現在、ナノテク領域では、物質が持つ「自己組織化能」を巧みに利用して、ナノ粒子からボトムアップにより新しい材料を創製しようという試みがある。しかし、現状では、そのようなアプローチが可能で、再生可能資源から容易に調製でき、しかも環境に調和した素材・材料は、極めて限定されている。このような観点で考えれば、BSは優れた機能素子、「ナノバイオ素子」であり、ボトムアップにおけるリード化合物として材料創製技術にも新たな貢献ができるかもしれない。BSの研究が発展し、近い将来グリーンテクノロジーやナノテクノロジーのフラッグシップ製品となることを期待したい。

謝 辞

本研究を推進するにあたり御助言を頂きました、筑波大学名誉教授田淵武士先生、同教授中原忠篤先生 (現・流通経済大学)、岩手県立大学教授川島英城先生、北海道東海大学教授平田博文先生に御礼申し上げます。また、研究環境の構築・整備にご協力頂きました産業技術総合研究所中根 堯博士 (現・三井物産 (株) BNRI)、および柳下 宏博士、原谷賢治先生に深謝申し上げます。さらに、共同研究者として多大なご協力を頂きました、ルイ・パスツール大学教授中谷陽一先生、名古屋市立大学教授中西 守先生、および国立環境研究所磯田博子博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 日本界面活性剤工業会編, “界面活性剤等統計年報” (2003)
- 2) 北本 大, オレオサイエンス, 1, 17 (2001)
- 3) D. Kitamoto, H. Isoda & T. Nakahara, *J. Bioeng. Biosci.*, 94, 187 (2002).
- 4) S. Lang, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 7, 12 (2002).
- 5) 木村義晴, フレグランスジャーナル, 20, 22 (1992).
- 6) D. Kitamoto, S. Akiba, T. Hioki & T. Tabuchi, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 31 (1990).
- 7) T. Nakahara, H. Kawashima, T. Sugisawa, U. Takamori & T. Tabuchi, *J. Ferment. Technol.*, 61, 19 (1983).
- 8) D. Kitamoto, K. Haneishi, T. Nakahara & T. Tabuchi, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 37 (1990).
- 9) D. Kitamoto, T. Fujishiro, H. Yanagishita, T. Nakane & T. Nakahara, *Biotechnol. Lett.*, 14, 305 (1992).
- 10) D. Kitamoto, T. Ikegami, T. Suzuki, A. Sasaki, Y. Takeyama, Y. Idemoto, N. Koura & H. Yanagishita, *Biotechnol. Lett.*, 23, 1709 (2001).
- 11) バイオインダストリー協会編, “発酵ハンドブック”, p. 106 (2001).
- 12) D. Kitamoto, T. Nakane, N. Nakao, T. Nakahara & T. Tabuchi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 768 (1992).
- 13) D. Kitamoto, T. Nemoto, H. Yanagishita, T. Nakane & H.K. Kitamoto, T. Nakahara, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (J. Oleo Sci.)*, 42, 346 (1993).
- 14) D. Kitamoto, H. Yanagishita, K. Hayara & H.K. Kitamoto, *Biotechnol. Lett.*, 17, 25 (1995).
- 15) D. Kitamoto, H. Yanagishita, K. Hayara & H.K. Kitamoto, *Biotechnol. Lett.*, 20, 813 (1998).
- 16) R.J.A. Wander, P. Vreken, S. Ferdinandusse, G.A. Jansen, H.R. Waterham, C. W. T. van Roermund & E. G. van Grunsven, *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 250 (2001).
- 17) D. Kitamoto, T. Yokoshima, H. Yanagishita, K. Haraya & H.K. Kitamoto, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (J. Oleo Sci.)*, 48, 1377 (1999).
- 18) V. Alphand, G. Carrea, F. Wohlgemuth, R. Frustoss & J.M. Woodley, *Trends Biotechnol.*, 21, 318 (2003).
- 19) D. Kitamoto, H. Yanagishita, T. Shinbo, C. Kamisawa, T. Nakane & T. Nakahara, *J. Biotechnol.*, 29, 91 (1993).
- 20) 稲葉英男, 冷凍, 73, 98 (1998).
- 21) D. Kitamoto, H. Yanagishita, A. Endo, M. Nakaiwa, T. Nakane & T. Akiya, *Biotechnol. Progress*, 17, 362 (2001).
- 22) H. Isoda, D. Kitamoto, H. Shinmoto, T. Matsumura & T. Nakahara, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 609 (1997).
- 23) H. Isoda, H. Shinmoto, D. Kitamoto, T. Matsumura & T. Nakahara, *Lipids*, 32, 263 (1997).
- 24) Y. Wakamatsu, X. Zhao, C. Jin, N. Day, M. Shibahara, N. Nomura, T. Nakahara, T. Murata & K.K. Yokoyama, *Eur. J. Biochem.*, 268, 374 (2001).
- 25) X. Zhao, T. Murata, S. Ohno, N. Day, J. Song, N. Nomura, T. Nakahara & K.K. Yokoyama, *J. Biol. Chem.*, 276, 39903 (2001).
- 26) J.-H. Im, T. Ikegami, H. Yanagishita, T. Nakane & D. Kitamoto, *BMC Biotechnology*, 1: 5, 1-7 (Web journal, <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/1/5>).
- 27) J.-H. Im, T. Ikegami, H. Yanagishita, Y. Takeyama, Y. Idemoto, N. Koura & D. Kitamoto, *J. Biomed. Mater. Res.*, 65, 379 (2003).
- 28) Y. Ishigami, Y. Gama, H. Hagahora, M. Yamaguchi, H. Nakahara & T. Kamata, *Chem. Lett.*, 763 (1987).
- 29) D. Kitamoto, G. Sangita, G. Ourisson & Y. Nakatani, *Chem. Commun.*, 2000, 860 (2000).
- 30) M. Nakanishi, *Curr. Medic. Chem.*, 10, 1289 (2003).
- 31) K. Inoh, D. Kitamoto, H. Hirashima & M. Nakanishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 57 (2001).