

学 位 論 文 題 名

Studies on Free Fatty Acids and Galactolipase in Red-Tide Flagellates

(赤潮藻に存在する遊離脂肪酸とガラクトリパーゼに関する研究)

学位論文内容の要旨

動植物を問わず、遊離脂肪酸(FFA)が生体内に多量に存在することは稀だが、*Chattonella marina*, *Heterosigma akashiwo* などの赤潮を形成するプランクトンやある種の珪藻は、FFA を藻体内に蓄積することが知られている。一般に FFA は、赤血球を破壊し、溶血活性を示す。赤潮藻の産生する高度不飽和 FFA は魚の鰓の上皮組織にダメージを与えることから、FFA が魚介類のへい死原因物質の一つであると考えられている。しかし、赤潮藻を含む藻類の FFA 生成に関する研究はこれまでほとんど実施されていない。

C. marina 及び *H. akashiwo* に蓄積する FFA は藻体内に存在するガラクトリパーゼ (GLase, EC 3.1.1.26) の作用によって細胞膜を構成する主要脂質成分であるグリセロ糖脂質からアシル基が加水分解されて生成すると考えられる(Fig.1)。GLase はグリセロリン脂質に対しても活性を持つことから、非特異的脂質アシル基加水分解酵素とも呼ばれており、高等植物の葉や塊茎を中心に盛んに研究されている。しかしながらこれまで海洋生物の GLase に関する報告は無い。

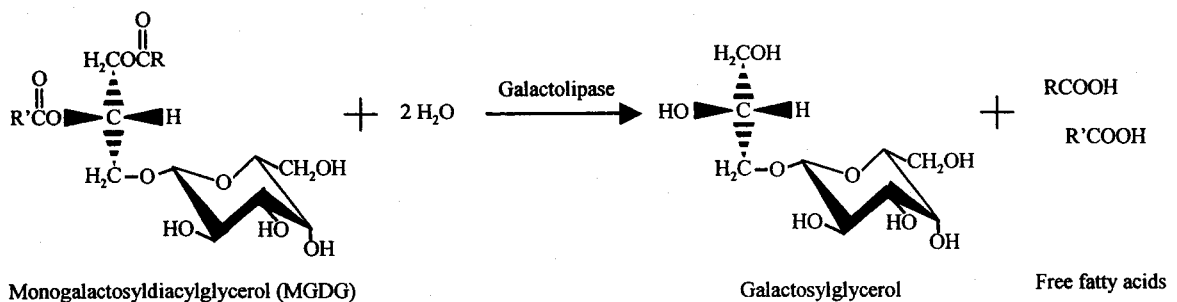


Figure 1. Galactolipase hydrolysis of MGDG.

本研究では、赤潮藻における FFA の生成機構を明らかにすることを目的とし、以下の項目について研究を行った。(1) 赤潮藻の産生する FFA の高感度組成分析法の確立。(2) 比較的入手の容易な食用藻を用いた GLase 活性の測定とその精製法の確立。(3) 前項で確立した方法を用いた赤潮藻 GLase 活性の測定とその部分精製。(4) FFA の由来と考えられるグリセロ糖脂質分子種の迅速・高感度分析法の開発。(5) 赤潮藻における FFA の産生条件。

(1) 蛍光検出 HPLC による赤潮藻の FFA 組成の高感度分析法の確立

FFA を含む総脂質 (50-100 μg) に 9-アンスリルジアゾメタン(ADAM)を反応させて蛍光誘導体を調製し、これを逆相 HPLC で分析して FFA 組成を求める方法を検討した。その結果、一度の分析で 60 分以内に C12~C22 (二重結合数 0~6) の 19 種の FFA を明瞭に分離できた。本手法は FFA をフェムト (10^{-12}) モルレベルで検出できるため、赤潮藻 FFA の組成分析と GLase 活性の測定にきわめて有用であることが認められた。

(2) 褐藻オキナワモズク及び 紅藻オゴノリに存在する GLase

オキナワモズクとオゴノリの両藻体から GLase 活性を初めて見出した。オキナワモズクの粗酵素は 37°C, pH 9 (Tris buffer) で、オゴノリは 37°C, pH 8 (phosphate buffer) で最も強い GLase 活性を示した。両藻体の粗酵素はモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) とホスファチジルコリン (PC) に対して高い活性を示した。両藻体内の脂質成分中、MGDG は主要成分であるが PC は少量成分であるため、GLase の加水分解作用によって生成する FFA は主に MGDG 由来であることが強く示唆された。オゴノリの粗酵素から硫酸沈殿・イオン交換・ゲル濾過・FPLC・SDS-PAGE を用いて GLase を精製した結果、比活性は 3.2 倍になり、分子量がおよそ 20 kDa の二量体 (40 kDa) であることが明らかとなった。

(3) 赤潮藻 *Chattonella marina* 及び *Heterosigma akashiwo* に存在する FFA と GLase

C. marina と *H. akashiwo* は、生育が進むにつれて藻体の FFA が増加し、グリセロ糖脂質が減少した。MGDG の加水分解物の一つであるモノガラクトシルモノアシルグリセロール (MGMG) が検出されたことから、藻体内の FFA は、GLase の作用によって主に

MGDG から加水分解されて生成すると推測された (Fig. 1)。事実、両種の粗酵素から GLase 活性が見出された。*C. marina* は 25°C, pH 9 (Tris buffer) で、*H. akashiwo* は 37°C, pH 7 (phosphate buffer) で最も強い GLase 活性を示した。両種の粗酵素は MGDG に対して最も強い活性を示し、MGDG の両アシル基を加水分解することが明らかとなった。前項で適用したイオン交換クロマトグラフィーを用いて GLase の部分精製を試みた結果、*C. marina* と *H. akashiwo* の GLase の比活性はそれぞれ 14.0 倍と 8.1 倍になった。さらなる精製は、原料となる赤潮藻粗酵素を大量に必要とし、今後の課題として残された。

(4) グリセロ糖脂質の分子種分析

グリセロ糖脂質の分子種を迅速かつ高感度に分析することは FFA の生成機構を明らかにする上で必要である。MGDG 分子中に存在する 4 つの OH 基に UV ラベル試薬 3,5-ジニトロフェニルイソシアネートを反応させて調製したテトラキス(3,5-ジニトロフェニルウレタン)誘導体は、100 pmol レベルで HPLC による分析が可能であった。また、この誘導体の検出限界(S/N=3/1)は、0.5 pmol であり、負イオン LC/ESI/MS では明瞭な $[M+Cl]^-$ と分子種の同定に有用な幾つかの分子量関連イオンが得られた。本誘導体は調製が容易であり、逆相 HPLC で分子種を明瞭に分離でき、定量性に優れていることから、赤潮藻の MGDG の分子種組成を明らかにする上で役立つ。この方法を用いて *C. marina* の生育期間中の MGDG の分子種を調べた結果、主要分子種は 16:0/16:1 (対数増殖期 28% → 定常期後期 26%), 18:4/18:4 (25 → 1%), 20:5/18:4 (19 → 8%) 及び 20:5/20:5 (2 → 12%) であった。一方、生育期間中の FFA の主要成分は 16:0 (31 → 27%), 18:4 (17 → 5%), 20:5 (19 → 34%) であった。従って、GLase が作用する MGDG 分子種の組成は生育期間中変動し、藻体内に蓄積する FFA の組成も変わることが分かった。

(5) FFA の産生条件

C. marina の総脂質中の FFA 含量は 50% 以上との報告があるが、本研究で単一培養して FFA 含量を調べた結果、定常期後期の試料であっても 15% にすぎなかった。このため、本研究では FFA が多量に生成する条件を種々検討した。定常期前期の *C. marina* と *H. akashiwo* からホモジネートを調製して FFA 含量を測定した結果、ホモジナイズ直後とホモジネートを長期凍結保存 (-30°C) した後の FFA 含量は数% にすぎなかった。しかしホモジネートを室温で放置した結果、FFA は劇的に増加して両種とも 24 時間で総脂質中 60% に達した。一方、グリセロ糖脂質は徐々に減少し、24 時間後にはほぼ消失し

た。また、細胞ホモジネート及び藻体の脂質成分 (MGDG, FFA など) は生細胞を殺す殺藻効果を示した。特に FFA は最も強い殺藻効果を示した。従って、通常生体膜中に存在し、活性が抑えられている GLase が、膜の破壊に伴って活性化してグリセロ糖脂質を徐々に加水分解すると推測される。これまで赤潮藻は細胞内に FFA を多量に蓄積すると言われてきたが、これは細胞の一部がホモジネートになっているか、あるいは実験中に急速に GLase が活性化した可能性が考えられる。また藻体内の脂質成分自体に殺藻効果があることから、細胞膜の破壊による細胞内容物の漏出が同種の壊死を引き起こし、かつ GLase の活性化によって FFA が増加して、壊死をさらに促進するものと推測される。

本研究では赤潮藻 *C. marina* と *H. akashiwo* について FFA の産生条件と GLase の諸性質を初めて明らかにした。本研究で得られた成果は、今後赤潮藻における GLase の生理的役割を明らかにする上で重要な知見となる。褐藻オキナワモズク及び紅藻オゴノリからも GLase が見出されたことから、GLase は海洋の光合成を行う生物に広く存在していると考えられる。蛍光検出 HPLC による FFA の微量定量分析法は今後、種々の生物の FFA 組成及び脂質加水分解酵素活性を調べる上で役立つ。テトラキス(3,5-ジニトロフェニルウレタン)誘導体を用いる HPLC 分析法は、他の様々な生物に含まれる MGDG の分子種を迅速に分析する上で有用である。赤潮藻ホモジネートにおける GLase 活性の急激な上昇は、生体膜に結合している GLase がどのような生理条件下で活性化するのかを今後解明する上で重要な知見となると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 板 橋 豊
副 査 教 授 原 彰 彦
副 査 教 授 宮 下 和 夫
副 査 助 教 授 安 藤 靖 浩

学 位 論 文 題 名

Studies on Free Fatty Acids and Galactolipase in Red-Tide Flagellates

(赤潮藻に存在する遊離脂肪酸とガラクトリパーゼに関する研究)

通常、生物組織に遊離脂肪酸 (FFA) が多量に存在することはないが、赤潮藻を含む微細藻の多くは、これを藻体内に著量蓄積すると言われている。FFA は赤潮による魚介類へい死の原因物質の一つであると考えられているが、微細藻が何故多量の FFA を産生するかは明らかにされておらず、生化学的にも興味をもたれている。本研究は、赤潮藻の *Chattonella marina* と *Heterosigma akashiwo* における FFA の生成機構を明らかにするために行われたものである。得られた成果は以下のように要約される。

- (1) FFA を 9-アンスリルジアゾメタン (ADAM) と反応させて、9-アンスリルメチルエステル誘導体を調製し、これを蛍光検出 HPLC を用いて測定する簡便な高感度分析法を確立した。この方法により、赤潮藻に存在する FFA (炭素数 12-22、二重結合数 0-6) と酵素実験で生成する FFA の含量と組成をフェムトモルレベルで求めることが可能となった。
- (2) 赤潮藻を無菌的に培養して、生育過程における脂質組成を調べた結果、FFA の他にグリセロ糖脂質 (主に、モノガラクトシルジアシルグリセロール) とその加水分解物と考えられるリゾ体が主要成分として藻体内に存在することを見出した。この結果から、赤潮藻体内にグリセロ糖脂質を加水分解して FFA を生成するガラクトリパーゼ (GLase) の存在することを推定した。
- (3) 赤潮藻体から調製した粗酵素中に pH 7-9、37℃付近に至適活性をもつ GLase の存在することを見出し、イオン交換クロマトグラフィー等を用いて酵素の部分精製を試みた。その結果、酵素の比活性は 8~14 倍になり、微細藻からの GLase の精製の可能性を示した。
- (4) GLase 活性を海藻 (紅藻オゴノリと褐藻オキナワモズク) からも見出した。オゴノリの粗酵素から、硫酸沈澱、イオン交換、ゲル濾過、FPLC 及び

SDS-PAGE を用いて GLase を精製したところ、比活性は 3.2 倍になり、分子量がおよそ 20kDa の二量体 (40kDa) であることが明らかになった。これらの結果から、GLase は海洋の植物に広く分布するものと考えられた。

- (5) GLase を含む粗酵素は種々のグリセロ糖脂質とリン脂質 (ホスファチジルコリン) を加水分解したが、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) に対して最も高い活性を示したことから、赤潮藻に存在する FFA の由来は主に MGDG であることを明らかにした。
- (6) 赤潮藻の生育につれて総脂質中の FFA 含量は徐々に増加したが、定常期後期の試料でも、その含量は十数%にすぎず、組織に多量に蓄積する (50% 以上) という従来の報告と大きく異なる現象を見出した。
- (7) 赤潮藻の細胞膜を破壊 (ホモジナイズ) することによって FFA は急激に増加し、GLase 活性も著しく高くなることを見出した。このことから、藻体を培地から遠心分離によって回収した場合、条件によっては細胞膜が破壊し、その結果 FFA が多く生成する可能性を指摘した。また、藻体から抽出した総脂質や構成成分にも殺藻効果が認められたことから、細胞膜の破壊による細胞内容物の漏出が同種の壊死を引き起こし、かつ GLase の活性化によって FFA が増加し、壊死をさらに促進するとの仮説を提案した。
- (8) MGDG を 3,5-ジニトロフェニルイソシアネートと反応させて、テトラキ (3,5-ジニトロフェニルウレタン、DNPU) 誘導体に変換し、逆相 HPLC/ESI-MS によって、分子種をピコモルレベルで決定する簡便な HPLC 法を開発した。反応は 15 分程度で完了し、HPLC での分離は良好であった。負イオン MS では $[M+Cl]^-$ や $[M-DNPU]^-$ などの分子種の同定に役立つ明りょうなイオンが得られた。この方法を用いて、藻体の MGDG 分子種の組成を調べた結果、18:4-18:4、20:5-18:4、20:5-20:5 などの高度不飽和脂肪酸を含む分子種が主要成分であることが明らかとなった。この分子種組成と構成脂肪酸の位置特異分析の結果から、赤潮藻に存在する FFA は藻体内の GLase の作用により、MGDG 分子種の *sn*-1 位と *sn*-2 位の両位置から生成すると結論した。

以上の成果は、赤潮藻 *Chattonella marina* と *Heterosigma akashiwo* に存在する FFA の生成機構を構成成分 (グリセロ糖脂質) と関連酵素 (ガラクトリパーゼ) の視点から明らかにしたものであり、審査員一同は本研究が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。