

36

助成番号 0136

円石藻の栄養成分強化に関する研究

助成研究者：渡辺文雄(高知女子大学 生活科学部健康栄養学科)

共同研究者：宮本恵美(高知女子大学 生活科学部健康栄養学科)

円石藻 (*Pleurochrysis cartera*; 旧名 *Hymenomonas carterae*) 細胞は人工消化率が97%と極めて消化されやすく、食用としての安全性も確立している。現在、*P. carterae*の外皮に多量に固定されている炭酸カルシウムはヒトのカルシウム補助食品として商品化されている。栄養補助食品として利用されている乾燥*P. carterae*細胞には多量のビタミンB₁₂(B₁₂あるいはCN-B₁₂)が含まれており、B₁₂欠乏ラットを用いた実験から*P. carterae*細胞に蓄積されたB₁₂は高等動物にとって生理的に有効であり、ヒトのフードサプリメントとしてカルシウムと同様にB₁₂のよい供給源として利用できることが明らかとなった。*P. carterae*はB₁₂を生育必須因子として要求することが知られているが、B₁₂の取込み系や代謝系に関する知見はない。本研究では*P. carterae*のB₁₂要求性と生理機能について検討した。

これまで我々の研究で使用した*P. carterae*はB₁₂に対してレスポンスが低いようであったのでB₁₂除去人工海水を用いてできるだけ細胞内B₁₂含有量を減少させた*P. carterae*細胞で検討した。その結果、B₁₂無添加の培地では*P. carterae*の生育がB₁₂添加細胞(10 µg/L)に比べ顕著に減少した。また、生育9日目の定常期におけるB₁₂添加(2および10 µg/L)*P. carterae*の細胞数はB₁₂無添加細胞の約3倍であった。この結果からこれまで我々の研究で使用した*P. carterae*もB₁₂を生育必須因子として要求することが明らかとなった。B₁₂添加(2および10 µg/L)*P. carterae*の細胞内B₁₂含有量はB₁₂無添加細胞の約3倍量となり、上述の結果とよく一致していた。

*P. carterae*の細胞内に蓄積されたB₁₂が補酵素型B₁₂に変換されているかどうかを検討するために、C18逆相HPLCを用いて補酵素型B₁₂の分離・定量を行った。その結果、OH-B₁₂(20.1%)、CN-B₁₂(7.8%)、AdoB₁₂(26.0%)、MeB₁₂(46.1%)となり、培地中に添加されたB₁₂の約72%が細胞内に取込まれた後、補酵素型B₁₂に変換されていた。これらの結果は、*P. carterae*の細胞内には補酵素型B₁₂の合成系が存在しており、B₁₂は生体内で補酵素として機能していることを示唆している。

*P. carterae*におけるB₁₂の生理機能を検討するために、広く生物界に分布する3種のB₁₂依存性酵素活性を測定した。その結果、AdoB₁₂依存性酵素としてリボヌクレオチドレダクターゼ活性は検出されなかったが、メチルマロニルCoAムターゼ活性(2.6±0.4 nmol/min/mg protein)が検出された。また、MeB₁₂依存性酵素としてメチオニンシンターゼ活性(85.1±38.9 pmol/min/mg protein)も検出され、*P. carterae*の細胞内に存在するAdoB₁₂とMeB₁₂はそれぞれメチルマロニルCoAムターゼとメチオニンシンターゼの補酵素として機能していることが明らかとなった。

36

助成番号 0136

円石藻の栄養成分強化に関する研究

助成研究者：渡辺文雄（高知女子大学 生活科学部健康栄養学科）

共同研究者：宮本恵美（高知女子大学 生活科学部健康栄養学科）

1. 研究目的

円石藻は海水中のカルシウムを取込み細胞を覆う外皮に炭酸カルシウムを固定する¹⁾。細胞の死後、炭酸カルシウムの外皮は海底に沈み石灰岩となって二酸化炭素を半永久的に固定する。二酸化炭素増加による地球温暖化問題の観点から円石藻は多くの研究者の注目を集めている。

また、円石藻 (*Pleurochrysis cartera*; 旧名 *Hymenomonas carterae*) 細胞は人工消化率が97%と極めて消化されやすく、食用としての安全性も確立している²⁾。現在、*P. carterae* の外皮に多量に固定されている炭酸カルシウムはヒトのカルシウム補助食品として商品化されている。栄養補助食品として利用されている乾燥 *P. carterae* 細胞には多量のビタミンB₁₂ (B₁₂あるいはCN-B₁₂) が含まれており、B₁₂欠乏ラットを用いた実験から *P. carterae* 細胞に蓄積されたB₁₂は高等動物にとって生理的に有効であり、ヒトのフードサプリメントとしてカルシウムと同様にB₁₂のよい供給源として利用できることが明らかとなった³⁾。

P. carterae はB₁₂を生育必須因子として要求することが知られているが⁴⁾、B₁₂の取込み系や代謝系に関する知見はない。本研究では *P. carterae* のB₁₂要求性と生理機能について検討した。

2. 研究方法

2.1. 実験生物と培養条件

円石藻 *P. carterae* は、500 mL 容平板培養ビンを用いて500 mLのEppley培地(0.2 µg/L B₁₂を含む)で22°C、光照射下(40 µmol photon/m²/s)で空気を通気して培養した²⁾。Eppley培地は市販の人工海水(SWING Hi-Marine, Hipet)を用いて調製した。

2.2. B₁₂添加培養実験

C18カートリッジ(Sep-Pak Vac 20 cc, Waters社製)を用いて人工海水中に存在するB₁₂を除去したB₁₂除去人工海水で培地を調製し実験に用いた。*P. carterae*は細胞内に蓄積されているB₁₂をできるだけ減少させるためにB₁₂無添加のEppley培地で前培養した細胞を用いた。

500 mLのB₁₂無添加Eppley培地に0.2~10 µg/LになるようにB₁₂を添加し、上述の

前培養液 1.0 mL を無菌的に植え継ぎ定常期 (9 日間) まで通気培養した。

P. carterae の細胞増殖度は、培養液を 2.0 mL サンプルングし血球盤を用いて細胞を測定した。培養 9 日目で定常期に達した培養液を 3000 g 10 分間の遠心分離することで細胞を集めた。集めた細胞は B₁₂ 除去人工海水で洗浄した後、-80°C で貯蔵した。

2.3 B₁₂ の抽出法と定量法

P. carterae 細胞から B₁₂ の抽出は KCN 法を用いて行った。凍結貯蔵した細胞 (湿重量 0.3 g) を 20 mg/L の KCN を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 10 mL に懸濁後、超音波破碎機で細胞を破碎した。この細胞破碎液をドラフト内沸騰浴中で 30 分間加熱抽出した。室温まで冷却後、5000 g 10 分間の遠心分離上清液を回収し B₁₂ 抽出液として B₁₂ の定量に用いた。B₁₂ の定量は、*Lactobacillus delbrueckii* (旧名 *L. leichmannii*) ATCC7830 による微生物学的定量法で行った⁵⁾。

2.4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による補酵素型 B₁₂ の分析

P. carterae 細胞から補酵素型 B₁₂ の抽出は 80% エタノール法を用いて行い、Wakosil 5C18RS-II (4.6 x 150 mm) カラムによる HPLC 分析を行った。HPLC カラムからの溶出液をフラクションコレクターで 1.0 mL ずつ分取し、減圧下で遠心エバポレーターにて乾固させた。蒸留水 1 mL を各画分に加え攪拌した後、微生物学的定量法により各画分の B₁₂ 含有量を測定した。

2.5. B₁₂ 依存性酵素活性の測定

凍結貯蔵した細胞に 10% 蔗糖を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 10 mL に懸濁後、超音波破碎機で細胞を破碎した。この細胞破碎液を 5000 g 10 分間の遠心分離にかけ、その上清液を回収し粗酵素液として用いた。上記の操作はすべて 4°C で行った。

B₁₂ 依存性酵素リボヌクレオチドレダクターゼ (EC 1.17.4.2)⁷⁾、メチオニンシンターゼ (EC 2.1.1.13)⁸⁾、メチルマロニル CoA ムターゼ (EC 5.4.99.2)⁹⁾ 活性は各引用文献に従い測定した。

3. 研究結果と考察

3.1. *P. carterae* の生育に及ぼす B₁₂ の影響

一般的に *P. carterae* は B₁₂ を生育必須因子として要求することが知られているが、これまで我々の研究で使用した *P. carterae* は B₁₂ に対してレスポンスが低いようであったので今回 B₁₂ を要求するかどうかを詳細に検討するため B₁₂ 除去人工海水を使用しできるだけ細胞内 B₁₂ 含有量を減少させた *P. carterae* 細胞を用いて検討した。その結果、B₁₂ 無添加の培地では *P. carterae* の生育が B₁₂ 添加細胞 (10 µg/L) に比べ顕著に減少した (Fig. 1)。また、生育 9 日目の定常期における B₁₂ 添加 (2 および 10 µg/L) *P. carterae* の細胞数は B₁₂ 無添加細胞の約 3 倍であった。この結果からこれまで我々の研究で使用した *P. carterae*

も B₁₂ を生育必須因子として要求することが明らかとなった。

3.2. *P. carterae* の細胞内 B₁₂ 含有量に及ぼす B₁₂ の影響

各種培養条件下で9日間生育させた *P. carterae* 細胞から B₁₂ を抽出し、微生物学的定量法で B₁₂ 含有量を測定した。その結果、培地中に B₁₂ を 2 および 10 μg/L 添加することにより細胞内 B₁₂ 含有量は有意に増加した (Fig.2)。B₁₂ 添加 (2 および 10 μg/L) *P. carterae* の細胞内 B₁₂ 含有量は B₁₂ 無添加細胞の約 3 倍量となり、上述の *P. carterae* の生育に及ぼす B₁₂ の影響の結果とよく一致していた。

3.3. *P. carterae* に含まれる補酵素型 B₁₂ の分析

B₁₂ 添加 (2 μg/L) *P. carterae* の細胞内に蓄積された B₁₂ が補酵素型 B₁₂ に変換されているかどうかを検討するために、C18 逆相 HPLC を用いて補酵素型 B₁₂ の分離・定量を行った。その結果、OH-B₁₂ (20.1%), CN-B₁₂ (7.8%), AdoB₁₂ (26.0%), MeB₁₂ (46.1%) となり、培地中に添加された B₁₂ の約 72% が細胞内に取込まれた後、補酵素型 B₁₂ に変換されていた。これらの結果は、*P. carterae* の細胞内には補酵素型 B₁₂ の合成系が存在しており、B₁₂ は生体内で補酵素として機能していることを示唆している。

3.4. B₁₂ 依存性酵素活性

P. carterae における B₁₂ の生理機能を検討するために、広く生物界に分布する 3 種の B₁₂ 依存性酵素活性を測定した。その結果、AdoB₁₂ 依存性酵素としてリボヌクレオチドレダクターゼ活性は検出されなかったが、メチルマロニル CoA ムターゼ活性 (2.6 ± 0.4 nmol/min/mg protein) が検出された。また、MeB₁₂ 依存性酵素としてメチオニンシンターゼ活性 (85.1 ± 38.9 pmol/min/mg protein) も検出された。この結果はから *P. carterae* の細胞内に存在する AdoB₁₂ と MeB₁₂ はそれぞれメチルマロニル CoA ムターゼとメチオニンシンターゼの補酵素として機能していることを示唆している。

3.5. B₁₂ 結合タンパク質

P. carterae 細胞に取込まれた B₁₂ が遊離で存在するのか、タンパク質と結合して存在するのかを検討するために Superdex 200 による *P. carterae* 細胞抽出液のゲルろ過を行った。その結果、*P. carterae* の細胞内に取込まれた B₁₂ の約 60% が遊離で存在しており、約 40% が分子量約 150,000 の高分子画分に存在していた (Fig.3)。メチルマロニル CoA ムターゼ活性は、分子量約 150,000 の画分のみ検出され、哺乳動物の酵素¹⁰⁾ と同一の分子量を有することが明らかとなった。この結果は、本酵素が *P. carterae* の細胞内において B₁₂ 結合タンパク質の 1 つであることを示している。

また、メチオニンシンターゼ活性ほどの画分からも検出することはできなかったが、本酵素は非常に不安定であるためゲルろ過中に失活した可能性が考えられる。哺乳動物の本酵素は分子量約 150,000 の単一ポリペプチドからなることが報告されており¹¹⁾、*P.*

carterae の細胞内 B₁₂ 結合タンパク質の分子量ともよく一致しており、今後詳細な検討が必要である。

4. 今後の課題

海洋微細藻類である円石藻の *P. carterae* において B₁₂ 酵素が検出されたのは今回が最初であり、今後各酵素を精製し詳細な酵素化学的性質を解明する必要がある。また、生物進化の観点から *P. carterae* 細胞から各酵素遺伝子クローン化し、他の生物と比較生化学的・分子生物学的に詳細な検討を行う必要がある。

5. 引用文献

- 1) Takano, H., Jeon, J., Burgess, J. G., Manabe, E., Izumi, Y., Okazaki, M., and Matsunaga, T., Continuous production of extracellular ultrafine calcite particles by the marine coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 946-950 (1994).
- 2) Takenaka, H., Yamaguchi, Y., Teramoto, S., Tanaka, N., Hori, M., Seki, H., and Hiwatari, T., Evaluation of the mutagenic properties of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyceae) as a potential human food supplement. *J. Appl. Phycol.*, **8**, 1-3 (1996).
- 3) Miyamoto, E., Watanabe, F., Ebara, S., Takenaka, S., Takenaka, H., Yamaguchi, Y., Tanaka, N., Inui, H., and Nakano, Y., Characterization of a vitamin B₁₂ compound from unicellular coccolithophorid alga (*Pleurochrysis carterae*), *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3486-3489 (2001).
- 4) Provasoli, L. and Pintner, I. J., Ecological implications of in vitro nutritional requirements of algal flagellates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56**, 839-851 (1953).
- 5) Watanabe, F., Takenaka, S., Abe, K., Tamura, Y., and Nakano, Y., Comparison of a microbiological assay and a fully automated chemiluminescent system for the determination of vitamin B₁₂ in food. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1433-1436 (1998).
- 6) Watanabe, F., Takenaka, S., Katsura, H., Miyamoto, E., Abe, K., Tamura, Y., Nakatsuka, T., and Nakano, Y., Characterization of vitamin B₁₂ in the edible purple laver, *Porphyra yezoensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1075**, 36-41(1991).
- 7) Suto, R. K., Whalen, M. A., and Finke, R., Adenosylcobalamin-dependent ribonucleoside triphosphate reductase from *Lactobacillus leichmannii*. Rapid, improved purification involving dGTP-based affinity chromatography plus biophysical characterization studies demonstrating enhanced, "crystallographic level" purity. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **29**, 273-309 (1999).
- 8) Drummond, J. T., Jarrett, J., Gonzalez, J., Huang, S., and Matthews, R., Characterization of nonradioactive assays for cobalamin-dependent and cobalamin-independent methionine synthase enzymes. *Anal. Biochem.*, **228**, 323-329 (1995).
- 9) Gaire, D., Spone, I., Drosch, S., Charlier, A., Nicolas, J. P., and Lambert, D., Comparison of two methods for the measurement of rat liver methylmalonyl-coenzyme A mutase activity: HPLC and radioisotopic assays. *J. Nutr. Biochem.*, **10**, 56-62 (1999).

- 10) Fenton, W. A., Hack, A. M., Willard, H. F., Gertler, A., and Rosenberg, L. E., Purification and properties of methylmalonyl coenzyme A mutase from human liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 815-823 (1982).
- 11) Chen, Z., Crippen, K., Gulati, S., and Banerjee, R., Purification and kinetic mechanism of a mammalian methionine synthase from pig liver. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27193-27197 (1994).

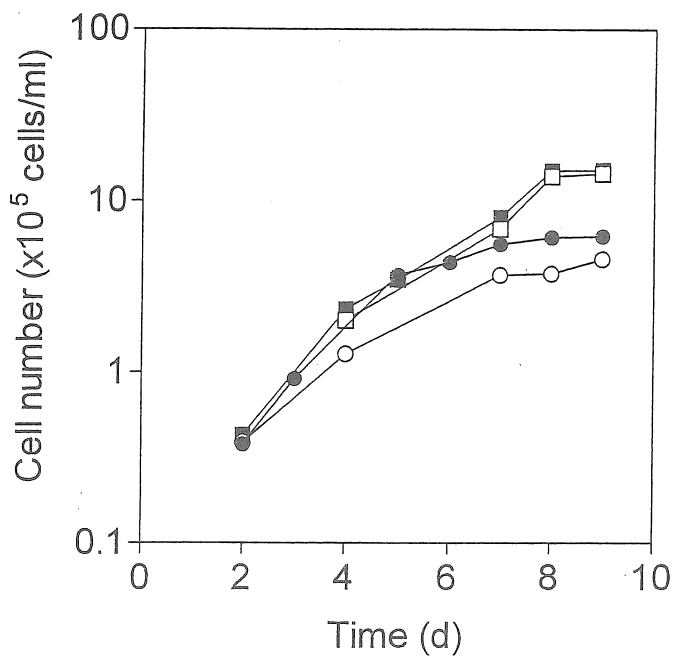


Fig. 1 Effects of B₁₂ on Growth of *P. carterae*.

CN-B₁₂ at 0 (○), 0.2 (●), 2 (□), and 10 (■) µg/L medium were added to the Eppley medium prepared with the B₁₂-free synthetic sea water. At the indicated times, 2.0 mL of the cell culture was sampled and used to count cell number in a hemocytometer. Detailed procedures are described in the text. The data are the typical growth pattern of *P. carterae* grown in the presence or absence of B₁₂ from three independent experiments.

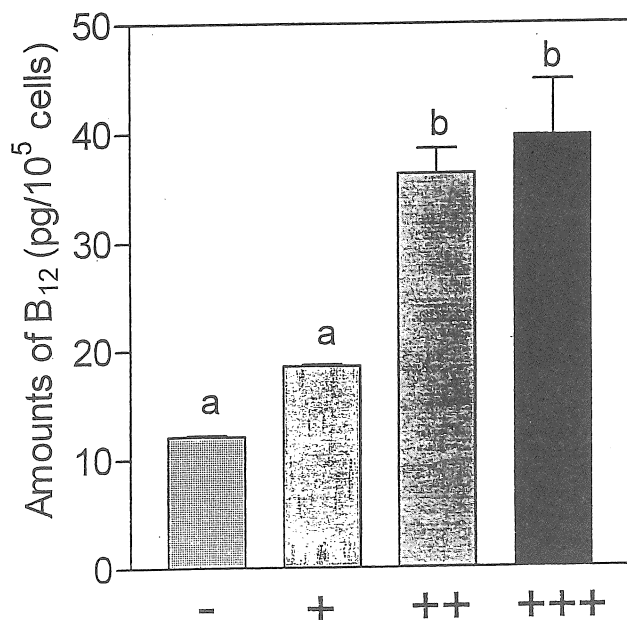


Fig. 2 B₁₂ Concentration of *P. carterae*.

The amounts of B₁₂ in the 9 d-*P. carterae* cells grown in the B₁₂-deficient (-) and -supplemented medium (+, 0.2; ++, 2; and +++, 10 μg/liter medium). Extraction and assay of total B₁₂ from these *P. carterae* cells are described in the text. The values represent means ± SEM ($n = 3$). The mean values within columns with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

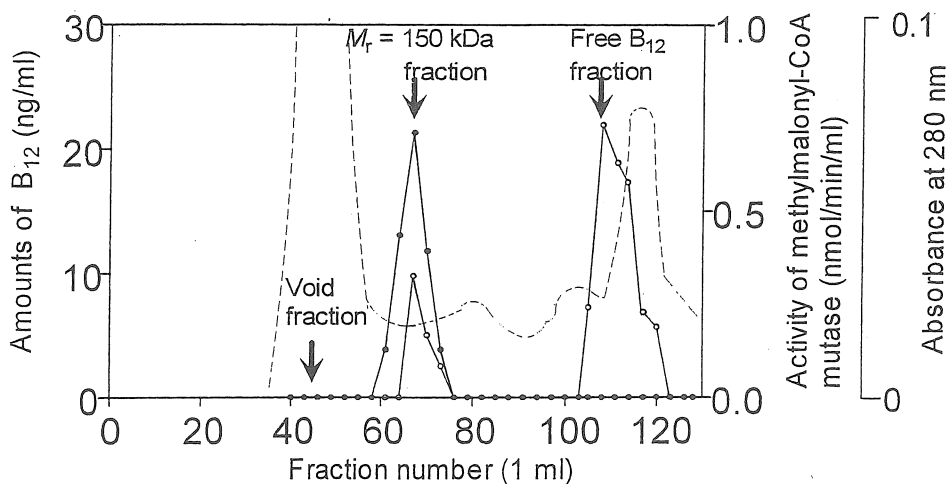


Fig. 3 Elution Profile of B₁₂ Taken up by the 9 d-*P. carterae* during Superdex 200 Gel Filtration.

The M_r of the B₁₂-binding macromolecule was calibrated with blue dextran (average M_r 2000,000), apoferritin from horse spleen (M_r 480,000), alcohol dehydrogenase from yeast (M_r 150,000), albumin from bovine serum (M_r 66,000), and cytochrome *c* from horse heart (M_r 12,400). Blue dextran and these proteins were monitored by measuring absorbance at 280 nm. A portion (1.0 mL) of the crude homogenate of the B₁₂ (2 μ g/liter)-supplemented cells was analyzed by the HiLoad 16/60 Superdex 200 pg gel filtration column. The fractions (1.0 mL) were collected. Each fraction (0.1 mL) was added to 0.9 mL of 0.1 M acetate buffer, pH 4.8, containing 0.2 g of KCN/L, boiled for 15 min, and centrifuged at 10,000 \times g for 10 min. The supernatant fraction was used for the B₁₂ assay. The remaining fractions (0.9 mL) were used for assay of the B₁₂-dependent enzymes. A portion (1.0 mL) of the crude homogenate of the B₁₂ (2 μ g/liter)-supplemented cells was analyzed by the HiLoad 16/60 Superdex 200 pg gel filtration column. (○) B₁₂, (●) methylmalonyl-CoA mutase activity, and (-----) absorbance at 280 nm. The data are the typical elution patterns of the B₁₂-binding macromolecule and MCM activity from three independent experiments.

Study on Preparation of Nutrient-fortified *Pleurochrysis carterae*
(Uptake and Physiological Function of Vitamin B₁₂ in *Pleurochrysis carterae*)

Fumio WATANABE (Department of Health Science, Kochi Women's University)

Emi MIYAMOTO (Department of Health Science, Kochi Women's University)

Summary

The photosynthetic coccolithophoid alga, *Pleurochrysis (Hymenomonas) carterae*, could take up and accumulate exogenous vitamin B₁₂, most of which was converted into the coenzyme forms of vitamin B₁₂. Two vitamin B₁₂-dependent enzyme activities (methylmalonyl-CoA mutase, 2.6 ± 0.4 nmol/min/mg protein and methionine synthase, 85.1 ± 38.9 pmol/min/mg protein) could be found in a cell homogenate of the vitamin B₁₂-supplemented alga. Most of the methylmalonyl-CoA mutase activity and 19.2% of the vitamin B₁₂ accumulated by the algal cells were recovered in the macromolecular fractions with M_r of 150 kDa, although the remaining vitamin B₁₂ was found only in free vitamin B₁₂ fractions.