

# 博士論文

## Studies on Functional Analysis and Application of Useful Resources Derived from Marine Organisms

(海洋生物由来有用資源の機能性解析と応用に関する研究)

(Summary)

March, 2024

Program of Food and AgriLife Science

Graduate School of Integrated Sciences for Life

Hiroshima University

Nobuhiko DOMOTO

(堂本信彦)

## 第 1 章

2030 年を間近に控える現在、世界は大きな課題に直面している。世界人口の急増に伴い、食糧問題がより深刻になることが予想されており、これは国際的な懸念事項となっている。国連の持続可能な開発目標 (SDGs) の中で、特に飢餓の撲滅が焦点となっており、人口問題と食料問題が複雑に結びついている。国連は SDGs の目標 14 として「海の豊かさを守ろう」を掲げている。海は地球表面の 75% を占める広大な領域であり、SDGs の掲げる飢餓の撲滅も海にヒントがあると期待される。

本論文は、海洋資源が我々に新たな希望をもたらす可能性があることを明らかにし、特に海洋資源の有効な活用に焦点を当て、4 つの章によりその重要性について探究した。

## 第 2 章 醤油発酵法を用いた新しいタイプの魚醤の研究開発と機能性研究

本章の目的は、酢酸やプロピオン酸などの有機酸、含窒素化合物、含硫黄化合物に由来する不快臭の問題を解決した魚醤油の製造方法を確立することである。まず、3 種類の魚介類を原料に、麹菌 (*Aspergillus sojae*)、乳酸菌 (*Tetragenococcus halophilus*)、酵母

(*Zygosaccharomyces rouxii*) を用い、日本の味噌や醤油の製造技術を応用することで、不快臭の低減を確認した。次に、実用化を目指して本手法の確立を試みるため、主原料を南極オキアミ *Euphausia superba* として、発酵条件を検討した。発酵において重要な要素となる発酵温度と食塩濃度の条件を検討した結果、発酵温度 20°C、食塩濃度 15% が最も好ましい条件であることが判明し、南極オキアミが魚醤油のタンパク質源として有効であることを確認した。製品化に向けて 2.5 kL 規模での製造試験を行った結果、15 kg 試作時と同様の発酵経過を示し、最終製品の化学成分も同様なものとなり、官能評価でも従来の魚醤油の不快臭が低減され、事業化規模での製法を確立した。さらに、50 kL 規模へのスケールアップを試み、その際、主原料を生南極オキアミから乾燥南極オキアミに変更して行った。その結果、15 kg および 2.5 kL 規模での製造の再現性を確認した。各種魚醤および穀醤油との味・風味・香りの比較分析から、南極オキアミ醤油は、酸味が強いことが特徴で、それ以外は穀醤油に近い味・風味を示した。

南極オキアミには、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を示し、血圧降下作用を持つペプチドの存在が知られている。そこで、脱塩した南極オキアミ醤油を使って、ACE 阻害活性試験を行い、同活性を確認した。次に、高血圧自然発症ラット (SHR) を用い、脱塩南極オキアミ醤油の血圧降下作用を調べたところ、ACE 阻害活性を示す既知ペプチドを含む市販の鰹ペプチドと同レベルの血圧降下作用を示した。さらに、南極オキアミ醤油の食材への軟化作用を調べた。まず、軟化作用の測定系を検討し、鶏ササミを使った系で官能評価と物性試験で相関が認められたことから、南極オキアミ醤油の軟化活性測定法とした。本測定系を使って測定したところ、南極オキアミ醤油に食材への軟化作用があることを確認した。南極オキアミ醤油には穀醤油の 2 倍程度の乳酸が存在している。ワインにも軟化効果があることが報告されているが、ワイン由来の乳酸にその効果があることが報告されていることから、南極オキアミ醤油の

軟化効果も乳酸による可能性が示唆された。

### 第3章 脂肪構造によるエイコサペンタエン酸（EPA）のバイオアクセシビリティについて

南極オキアミ抽出油は、リン脂質に結合した高度不飽和脂肪酸に富んでいる。この構造はトリグリセライド（TG）に結合した高度不飽和脂肪酸を含む魚油とは異なる脂質構造である。そこで本章では、この構造が高度不飽和脂肪酸の1つであるEPAのバイオアクセシビリティへ影響を与えるか調べた。試験は、オランダTNO社にて、ヒト成人の平均的な消化管状態をシミュレートしたシステム（TIMシステム）を用いて行った。供試原料はいずれもEPAを含むイワシ由来のモノアシルグリセロール（EPA-MAG）、トリアシルグリセロール（EPA-TAG）とオキアミ由来のリン脂質（EPA-PL）の3つの形態とし、試験はミルクとヨーグルトとの混合物へ添加する形で行った。その結果、EPA-PLを含む試験食（75～80%）は、EPA-MAG（30%）およびEPA-TAG（38%）と比較して、最も効率的に胃から空腸へ移行した。この結果は、EPA-PLの構造が有意（ $P < 0.05$ ）にEPAのバイオアクセシビリティを高めていることを示している。その理由として、リン脂質の乳化剤としての機能が働き、試験食中のEPA-PLがより安定な乳化状態であったためと考えられた。本研究の結果から、EPA-PLは、試験条件下において、MAGやTAGよりも脂質バイオアクセシビリティが高く、吸収のためにより効果的なEPAの形態であることが示された。

### 第4章 乾燥肌の被験者におけるオレンジラフィー*Hoplostethus atlanticus*油の有効性の評価

保湿剤は乾燥肌の治療に有益な効果をもたらす。本章では、海洋由来のワックスエステルであるオレンジラフィーオイルの皮膚乾燥に対する効果を、市販のワセリンベースの保湿剤および未処理の対照と比較して評価することを目的とした。脚の下肢に中等度から重度の皮膚乾燥のある被験者（試験1）と、顔と前腕にある程度の皮膚乾燥のある被験者（試験2、 $n=22$ ）を対象に、無作為臨床試験で試験製品を1日2回、連続42日間使用した。経表皮水分喪失量（TEWL）は試験1の開始時と終了時に測定し、皮膚の水分量は試験2の開始時、塗布3週間後、6週間後（試験終了時）に測定した。皮膚の乾燥の変化は、皮膚科医がビデオ顕微鏡を用いて評価した。試験1では、オレンジラフィーオイルを塗布した皮膚の乾燥度スコアは、6週間で有意に改善した（ $P < 0.01$ ）。皮膚は滑らかで、乾燥した鱗状の皮膚は全く、あるいはほとんど見られなかった。専門家による評価では、オレンジラフィーオイルの皮膚乾燥に対する有効性は60%であり、ワセリン（ペトロラタム）（68%）と同等であった。また、TEWLはオレンジラフィーオイルでもペトロラタムでも有意な変化は認められなかった。試験2における皮膚静電容量の結果では、3週間後および6週間後に皮膚症状の有意な改善が認められた。これらの結果から、オレンジラフィーオイルの皮膚乾燥に対する効果がペトロラタムに匹敵することが示された。

## 第5章 日本海から分離された新規海洋性イガイ系分解菌

本章では、発電所取水設備や船底などに付着し、これらの機能を損なう海洋汚損生物の1つであるムラサキイガイ *Mytilus edulis* を生化学的手法で忌避あるいは除去することを目的とし、日本近海およびパラオ近海にてムラサキイガイ足糸分解菌のスクリーニングを行った。ムラサキイガイから分離した足糸を唯一の炭素源として各地で採水した海水から微生物を探索した。その結果、採取した1,000株のうち、約10株が高いムラサキイガイ足糸分解活性を示し、特に、日本海の水深100mで採取された海水試料から分離された1株(F12-50-A1株)は、65%のイガイ足糸分解活性を示した。この菌株は好気性、極性鞭毛、グラム陰性、および桿状生物で、GC含量は42.4 mol%で、*Alteromonas* 属の細菌に類似していた。この菌株は少なくとも3種類のプロテアーゼを分泌し、その3種類の酵素の1つのEnz-F20は分子量44,000のセリンプロテアーゼで、ムラサキイガイ足糸タンパク質を構成するデカペプチドのDopaの両側を切断することが明らかになった。

次に、この菌株の表現型の解析と、16S rRNA コード遺伝子およびジャイレース B (*gyrB*) 遺伝子の配列解析を行った。16S rDNA 配列の解析および脂肪酸プロファイルから、*Pseudoalteromonas* 属との高い類似性が認められた。中でも *Pseudoalteromonas piscicida* 株との16S rDNA 配列の類似性は非常に高かった(99.1%)。一方で、DNA-DNA ハイブリダイゼーションと、*gyrB* 遺伝子の配列解析から、この株が *Pseudoalteromonas* 属内で独立した新種であることが示された。この株はムラサキイガイ足糸の複雑なタンパク質配列を切断する特異なプロテアーゼを分泌することにより、基準株 F12-50-A1<sup>T</sup> 株 (=MBICC F12-50-A1<sup>T</sup> 株) とし、*Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov. と名付けた。

## 第6章

本論文では、海洋資源の4つの有効利用の可能性を明らかにした。すなわち、まず第1章の南極オキアミ醤油に関する研究において、50 kL 規模で実装実験に成功し、本魚醤油が味・風味に特徴をもち、食品軟化効果や血圧降下作用を示すことを明らかにした。次に、第2章の南極オキアミ油のバイオアクセシビリティの研究では、EPA-PLの構造がEPAのアクセシビリティを高めていることを示した。第3章のオレンジラフィー油の乾燥肌への影響に関する研究では、同油がワセリンと同程度の乾燥肌への改善効果があることを明らかにし、さらに第4章のムラサキイガイ足糸タンパク質を分解する海洋微生物の研究では、海洋環境より、足糸を分解する酵素を産生する微生物をスクリーニングし、同分解酵素の性状を明らかにするとともに、分解菌が新規の細菌であることを示した。これらの成果は、国連のSDGsの目標14の達成を後押しするだけでなく、目標2、3、7、9、13の達成、すなわち貧困、健康、エネルギー対策、技術革新および地球温暖化を含む環境問題の解決に向けた取り組みを支援するものである。これら4つのさらなる研究と、研究成果の社会への還元により、より良い未来へ繋がっていくことを期待する。