不稔性アオサ属植物（緑色植物）を利用した海域浄化施設とアオサ属植物有効成分の生理活性

Seawater Remediation by Sterile *ULVA* (Chlorophyta) and Physiological Activities of Valuable Products from *Ulva*

平山　伸[1]・大久保精二[2]・宮坂　政司[3]・天野　秀臣[4]
熊谷　嘉人[5]・下條　信弘[5]・柳田　晃良[6]・岡見　吉郎[7]

Shin HIRAYAMA, Seiji OOKUBO, Masashi MIYASAKA, Hideomi AMANO,
Yoshito KUMAGAI, Nobuhiro SHIMOJO, Teruyoshi YANAGITA and Yoshiro OKAMI

Abstract

Sterile Ulva, a green alga has the potential to grow stably, and is expected to be an efficient resource of functional food containing various nutrients such as proteins and sulfur amino acids. *Ulva lactuca* was isolated from the "Marine Park" in Yokohama, and its growth rate (g-dry/m^2・d) was evaluated using a model reactor at the surface of the sea. In these experiments, the growth rate of *Ulva lactuca* was recorded to be approximately 20 g-dry/m^2・d which is estimated to be 10 times greater than rice yield in paddy field. Based on these data, we newly designed a float production system. D-cysteinolic acid, which was contained in *Ulva lactuca* as major sulfur amino acid, showed both activities of active oxygen scavenging and triglyceride reduction. Hence, the facility using enriched deep seawater has a potential for the production of valuable resource to prevent diseases.

Key Words: Ulva lactuca, *growth rate*, *D-cysteinolic acid*, *active oxygen*, *triglyceride*

要　旨

富栄養化海水の有効利用の一環として，不稔性アオサ属植物（*Ulva*）からの有価物生産を狙いに，アオサ属植物の培養生産設備と有効成分について検討を行った．試作した培養装置により，実海域でアオサ属植物の増殖速度は 20 g/m^2・d と高い値を示した．また，アオサ属植物の有効利用法の開発のため，アオサ属植物に含まれるD-システノール酸の精製標品を用いて生理活性を評価したところ，活性酸素抑制効果と共に，中性脂肪（トリグリセリド）抑制効果が認められた．上記結果から，D-システノール酸は活性酸素や中性脂肪等の成人病初期原因物質に対し，抑制効果が存在することが認められ，健康食品や医薬品原料等として利用が期待される．

1. はじめに

近年，海洋深層水が各地で取水され，水産養殖等への利用研究が着手され始めてきており（科学技術庁研究開発局海洋地球課，1999；小善ら，2000），近い将来，膨大な養殖等で富栄養化した海洋深層水が各地で排出されることが予想される．海洋深層水は 0.3 ppm-N を含有するといわれており（科学技

[1]三菱重工業㈱　基盤技術研究所（〒236-8515　神奈川県横浜市金沢区幸浦一丁目 8-1）
[2]三菱重工業㈱　横浜研究所（〒231-8715　神奈川県横浜市中区錦町 12 番地）
[3]三菱重工業㈱　横浜製作所（〒231-8715　神奈川県横浜市中区錦町 12 番地）
[4]三重大学生物資源学部（〒514-8507　三重県津市上浜町 1515 番地）
[5]筑波大学社会医学系（〒305-8575　茨城県つくば市天王台一丁目 1-1）
[6]佐賀大学農学部（〒840-8502　佐賀県佐賀市本庄町 1 番地）
[7]微生物化学研究所（〒141-0021　東京都品川区上大崎 3114-23）

術庁研究開発局海洋地球課，1999)，これを養殖に用いた後の海洋深層水のN濃度はさらに高くなると考えられる．

一方，近年，国内外の富栄養化海域において不稔性アオサ属植物（*Ulva*）の増殖が多数報告され（能登谷，1999)，著者らはこのアオサ属植物の培養生産を提案し，これまで東京湾の海水で15 g/m^2・d以上の高い増殖速度が得られることを報告してきた（Hirayama *et al*., 1999；平山ら，2000)．さらに，このアオサ属植物には蛋白質やミネラル等の栄養素が含まれ，飼料効果試験が着手されていることから，将来の食糧・飼料源としても注目され始めている（能登谷，1999)．しかし，有用な生理活性物質の探索に関する検討は十分行われておらず，大規模培養の普及には到っていない．

本論文では，養殖に用いた後の海洋深層水の有効利用（再利用）とN等の富栄養化成分の回収を目的に，不稔性アオサ属植物の生産を兼ねた浮体式培養生産装置と，その有効利用法の一環として，不稔性アオサ属植物由来の生理活性物質の評価について述べる．

2.　材料と方法

安定に増殖可能なアオサ属植物として，横浜・海の公園から不稔性のオオバアオサ（*Ulva lactuca*）を選別して，実験に供した．実験は陸上での屋外培養結果を基に（Hirayama *et al*., 1999；平山ら，2000)，海上浮遊型アオサ属植物培養ミニプラントを試作し，普及型の概念設計を行った．また，アオサ属植物培養ミニプラント（容積100 Lの試作器）を三菱重工業㈱横浜製作所の岸壁に浮かべ，アオサ属植物の培養を行い，1日の単位照射面積当たりの増殖速度（g/m^2・d）を測定した．投入する不稔性のオオバアオサはφ66 mmに調製後，培養槽の水面上と底面の照度比が100：1となるよう300枚を培養初期に添加し，藻体が十分受光できるようエアレーションによって攪拌しながら培養を行った．

さらに，培養生産を想定したアオサ属植物の有効利用法開発の一環として，アオサ属植物に含まれるD-システノール酸を精製し，その活性酸素および脂質成分に対する抑制効果を，類似の含硫アミノ酸であるタウリン（$C_2H_7O_3S$）と比較・検討した．なお，D-システノール酸の精製はアオサ属植物のエタノール抽出物をDowex 50W-X8（H^+型）陽イオン交換クロマトと2回のDowex 2-X8（OH^-型）陰イオン交換クロマトに供した後，エタノール添加により結晶化させた（Ito，1963)．また，精製物の純度および物質の同定のためLC-Mass分析を行った．

精製したD-システノール酸の活性酸素に対する抑制効果の評価系として，キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系によるスーパーオキシド（O_2^-）（尾形，1996）を，ヒドロキシルラジカル（・OH）発生系としてH_2O_2に紫外線を照射する系と（Hirayama *et al*., 1994)，H_2O_2にFe^{2+}を加えるフェントン反応系（尾形健明，1996）の2種類を用い，電子スピン共鳴装置（ESR）によるスピントラップ法により，供試検体の活性酸素抑制率を測定した．なお，スピントラップ剤として5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide（DMPO）を用いた．

一重項酸素（$^1O_2$）の消去活性は$^1O_2$発生系としてリボフラビンに紫外線を照射する系を用いた．発生させた$^1O_2$とTMPD（2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone hydrochloride）の反応物TEMPONE（2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-1-oxyl）をESRで検出し，この検出したシグナルに対する供試検体（D-システノール酸，またはタウリン）による阻害率を測定した（尾形，1996)．

D-システノール酸とタウリンの中性脂肪，およびコレステロール抑制効果を調べるため，ヒト肝臓モデル培養細胞HepG2を用いて細胞内の中性脂肪（トリグリセリド：TG）とコレステロールの濃度を測定した．操作はHepG2細胞をCO_2インキュベターにて前培養後，D-システノール酸を含む同培地を添加して24時間培養し，細胞を回収した（Yanagita *et al*., 1999)．次に，細胞から脂質を抽出し，トリグリセリドとコレステロール濃度を定量した．なお，トリグリセリドの定量法はグリセロール3リン酸オキシダーゼ-DAOS法，コレステロー

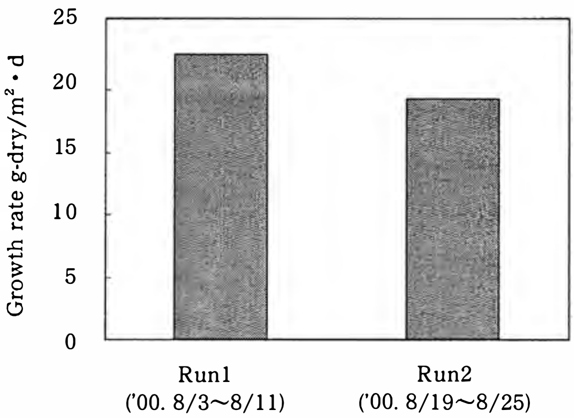

Fig.－1　Growth rate of *Ulva lactuca* in the surface of the sea

ルの定量法はコレステロールオキシダーゼ法で定量した.

3.　結果と考察

(1)　海上でのアオサ属植物の培養実験

1999年終わりから2000年初めにかけて行った海面を模擬した陸上培養試験を基に，アオサ属植物培養ミニプラント（容量100 L）を試作した．この試作器を実海域に浮かべ，2000年8月の約1週間におけるアオサ属植物の増殖速度を2度にわたって測定した.

その結果，Fig.－1に示すように試験1で23 g-dry/m^2・d，試験2で19 g-dry/m^2・dの増殖速度を示し，日射が強く，かつ，日中の水温が約29℃の条件では，このように高い増殖速度が得られることが解った.

一方，NO_3-N濃度は1 ppm程度と東京湾奥部で通常記録される濃度であり，この程度のN濃度と温度，エアー（CO_2）供給により穀類の10倍程度の高いバイオマス生産と共に，海水からN，Pの固定が可能と考えられた．なお，今後，他の季節でのアオサ属植物増殖速度の測定や長期培養でのアオサ属植物の安定生産の確認などが課題である.

(2)　培養装置

これらの結果を受け，Fig.－2に示すような7 m^3規模のミニプラントの概念設計を行った．この装置を各地の海域に設置することを当面の課題としており，この装置の設置によって富栄養化した海洋深層水の再利用試験に対応でき，各設置場所毎のアオサ属植物の培養安定性のチェックや増殖速度の計測が可能になるものと考えている.

(3)　アオサ属植物（*Ulva*）の有効利用法開発

イオン交換クロマト後のエタノール添加によって

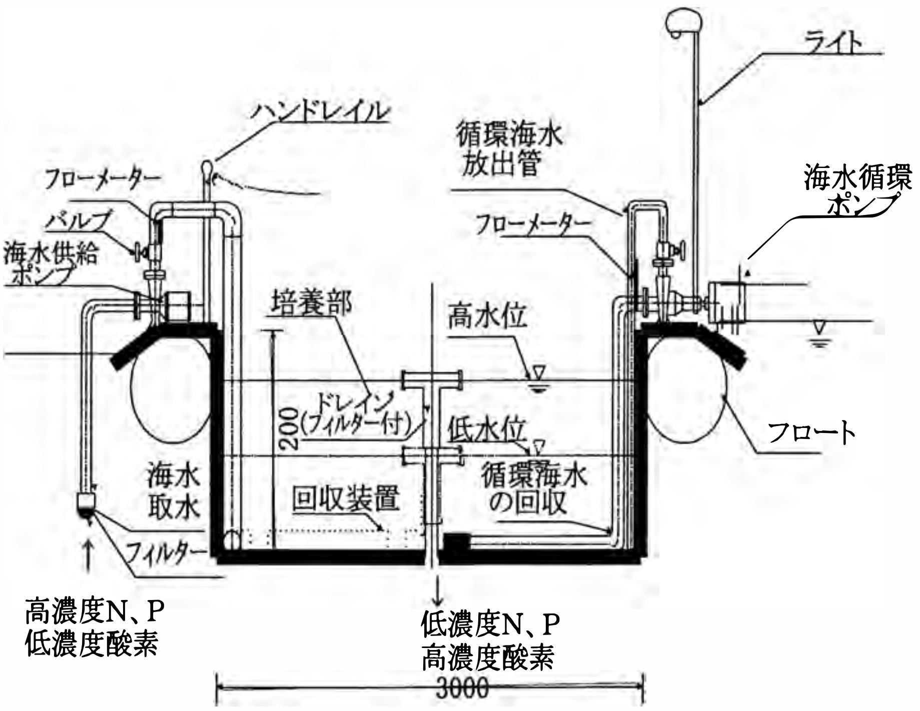

Fig.－2　Plan of a floating model mini-plant for *Ulva lactuca* production

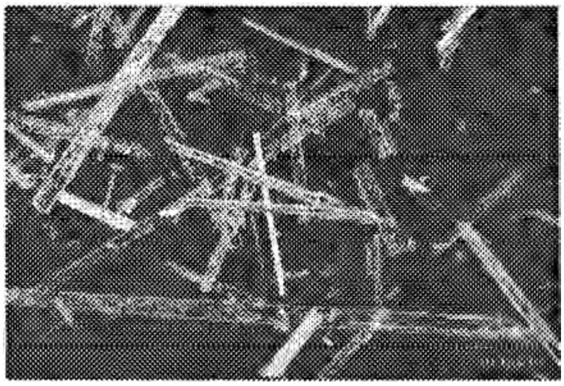

Fig.－3 Photograph of crystallized D-cysteinolic acid

Table－1 Active oxygen scavenging activity

	D-cysteinolic acid	Taurine
・OH by Fenton reaction	○	×
・OH by H_2O_2-UV system	×	×
O_2^-	×	×
$^1O_2$	○	○

Fig. －3 に示すような白色の針状結晶が得られた．この結晶について LC-Mass 分析を行った結果，脱プロトン化した 154 のピークと SO_3^- 由来と考えられる 80 のピークが検出されたため，この結晶は既に報告されている D-システノール酸（$C_3H_9O_4S$）(Ito, 1963) であると考えられた．そこで，この結晶を用いて以下の生理活性評価を行った．

含硫アミノ酸であるタウリンは近年，活性酸素抑制効果があることが報告され始めていることから (Fujitani, *et al.*, 1999; Devamanoharan, *et al.*, 1997)，D-システノール酸においても各種活性酸素の抑制効果が期待され，その効果について検証を行った．実験結果を Table－1 にまとめた．D-システノール酸には・OH 消去に関して，フェントン反応を抑制する効果が認められたが，H_2O_2 に紫外線を照射して発生する・OH は消去しなかった．このことから生じた遊離の・OH を消去するのではなく，フェントン反応そのものを抑制する効果があると考えられた．また，D-システノール酸には O_2^- を抑制する効果はなく，$^1O_2$ を抑制する効果があり，その強度はタウリンとほぼ同程度であった．上記結果から，D-システノール酸の活性酸素抑制効果はタウリンより幅広いものと考えられた．生体中で発生する多くの・OH はフェントン反応で生じることが指摘されており（小倉，1991；吉川ら，1990)，

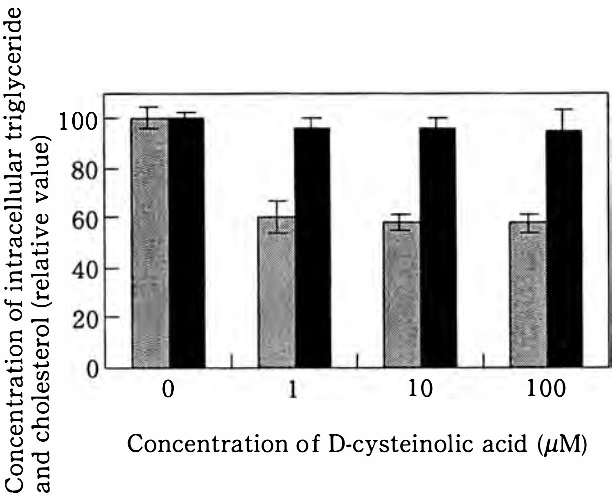

Fig.－4 Effect of D-cysteinolic acid on the concentrations of triglyceride and cholesterol in HepG2 cells

Date are expressed as mean of 4 experiments
▩ triglyceride; ■ cholesterol

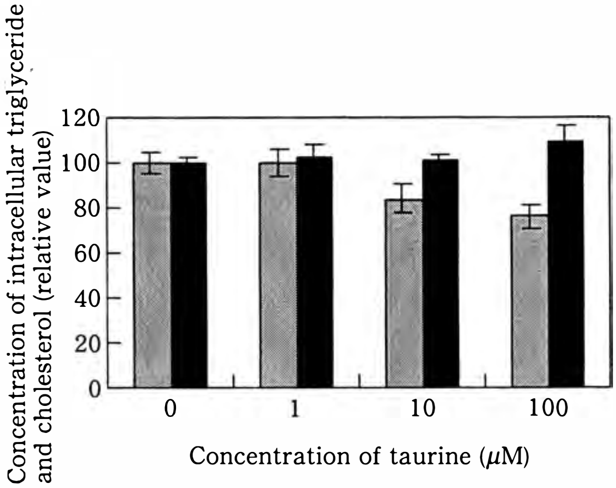

Fig.－5 Effect of taurine on the concentrations of triglyceride and cholesterol in HepG2 cells

Date are expressed as mean of 4 experiments
▩ triglyceride; ■ cholesterol

D-システノール酸に，このフェントン反応を抑制する効果があることは生理学的にも重要な効果が期待できるため，さらにその抑制機構について検証することが，次の課題と考えられた．

次に，D-システノール酸とタウリンについて HepG2 細胞の中性脂肪，およびコレステロールに対する抑制効果の比較を行った．その結果，Fig.－4 に示すように D-システノール酸に 1～10 μM の低濃度でも中性脂肪（トリグリセリド）を約 40 %と大幅に抑制する効果があることが判明した．ま

た，タウリンはFig.－5に示すように10～100 μMの濃度で，はじめて抑制効果を示し，抑制率は100 μMと高濃度でも24%程度にとどまった．また，コレステロールの抑制については，Figs.－4～5に示すようにD-システノール酸とタウリンにはコレステロールを抑制する効果は無かった．上記結果から，D-システノール酸は活性酸素や中性脂肪等の成人病初期原因物質に対し，抑制効果を持つことが明らかとなり，健康食品や医薬品原料等として利用が期待される．

高脂血症には，a）コレステロール由来，b）中性脂肪（トリグリセリド）由来，c）これらの複合由来の3種類があるといわれており（大塚・白井，2000；松島，2000），a）に関しては現在特効薬が市販され，大きな市場になっているが，b），c）は次世代の課題として研究段階にある．上記結果から，D-システノール酸には高脂血症の原因のうち，次世代の課題とされる中性脂肪を抑制する作用があることがわかった．*In vitro* の試験結果ではあるが，肝細胞内の中性脂肪抑制において，D-システノール酸は，低濃度（タウリンの1/250以下）で顕著な効果を期待できる．タウリンの有効摂取量は2,000 mg/d程度といわれており，タウリンと同程度の効果を発揮するにはD-システノール酸の摂取量は8 mg/d程度と推定される．また，この量をアオサ属植物から摂取するには2.6 dry-g/dの藻体の摂取が必要であり（藻体中のD-システノール酸含有率0.3%より試算），ヒトにとっても無理のない摂取量であると考えられる．この実際の効果について，今後動物レベルの実証が課題であるが，食糧品として中性脂肪や活性酸素抑制効果が確認されれば，非常に有望な機能性食品となり，アオサ属植物の付加価値向上に寄与できると考えられる．

上記のように収穫したアオサ属植物の新たな有効利用法が見つかりつつある．これらのアオサ属植物の培養からの有効利用によって，陸上養殖等で富栄養化した海洋深層水を再利用する物質生産システムが可能になると考えられる．さらに，大型化することにより未利用海洋資源を基盤とする食糧・飼料生産形態ができ，食糧自給率向上に寄与できるものと考えられる．

4. 結　論

不稔性アオサ属植物による海域浄化方式を考案し，屋内・屋外実験によるアオサ属植物の培養特性把握と，運用上の検討，海洋浮遊型培養生産装置の概念設計を行った．主な結果は以下のとおりである．

(1)横浜・海の公園産オオバアオサは，海上での培養制御により，15 g/m^2・d以上の増殖速度を示した．これは自然界での算出増殖速度1～2 g/m^2・dの約10倍の速度に相当し，培養制御により自然界よりもN，Pの吸収速度を速めることが可能である．

(2)培養生産可能なオオバアオサから，含硫アミノ酸であるD-システノール酸の結晶が精製可能で，D-システノール酸には *in vitro* での $^1O_2$ や・OH等の活性酸素抑制効果を有することが解った．

(3)D-システノール酸には *in vitro* での中性脂肪抑制効果を有することが認められ，活性酸素抑制効果を加味すると，成人病予防的な効果が期待される．

(4)以上により，オオバアオサによる海域浄化＝バイオリメディエーションと健康食品や医薬品原料として期待できるD-システノール酸などの資源生産を兼ね合わせた装置化技術の見通しを得た．

謝　辞

アオサ属植物の培養速度計測について助言を頂いた三重大学生物資源学部前川行幸教授に感謝致します．また，$^1O_2$ の抑制評価でご教示を頂いた山形大学工学部尾形健明助教授に深謝致します．

参考文献

Devamanoharan, P. S., A. H. Ali and S.D. Varma (1997)：Prevention of lens proteinglycation by taurine. Mol. Cell. Biochem., 177, 245-250.

Fujitani, Y., K. Kasai, S. Ohtani, K. Nishimura, M. Yamada and K. Utsumi (1999)：Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. J. Animal Sci., 75, 483-489.

Hirayama, S., R. Ueda and K. Sugata (1994)：Evalua

tion of hydroxyl radicals effect onsuperoxide dismutase activity. p. 117 - 119, In Magnetic Resonance in Medicine, ed. by H. N. Ohya, Nihon-Igakukan, Tokyo.

Hirayama, S., S. Ookubo and M. Miyasaka (1999)：Culture characteristics of the sterile *Ulva* sp. in enriched seawater and concept of its production facilities. p. 273 - 279, *In* Proceedings of the International OTEC/DOWA Association '99, ed. by H. Uehara, J. H. Wang and Y. Ikegami, IOA & Saga Univ., Saga.

平山　伸・大久保精二・宮坂政司（2000）：海水中の栄養塩を利用した不稔性アオサの培養と生産設備．海深研，1，19-22.

Ito, K (1963)：Distribution of D-cystenolic acid in marine algae. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 29, 771-775.

科学技術庁研究開発局海洋地球課（1999）：科学技術庁における海洋深層水利用の経緯と今後の展開．海洋開発ニュース，27（6），3-6.

松島照彦　(2000)：高脂血症治療薬の多剤併用療法．治療，82，1551-1555.

能登谷正浩編・著（1999）：アオサの利用と環境修復．成山堂書店，東京，171 頁.

尾形健明（1996）：食品からの抗酸化物質．123-131 頁，放医研シンポジュームシリーズ No. 27　活性酸素・フリーラジカル研究の新展開．小澤俊彦編，放医研，千葉．小倉良平（1991）：心筋障害とミトコンドリアの活性酸素．活性酸素・フリーラジカル，2，710-717.

大塚正毅・白井厚治（2000)：高コレステロール血症＋高中性脂肪血症の薬物治療法．治療，82，1547-1550.

小善圭一・堀田和夫・瀬戸陽一・辰巳　勲・本間昭郎（2000)：深層水排水の水質と再利用．海深研，1，63-69.

Yanagita, T., E. Hara, H. Yotsumoto, S. H. Rahaman, S. Y. Han, J. Y. Cha and K. Yamamoto (1999)：NK-104, a potent new 3-hydroxy-3-methylglutaryl co-enzyme A reductase inhibitor, enhances posttranslational catabolism of apolipoprotein B-100 and inhibits secretion of apolipoprotein B-100 and triacylglycerols from HepG2 cells. Curr. Therapeu. Res., 60, 423-434.

吉川敏一，内藤裕二，近藤元治（1990)：活性酸素種による生体の障害．163-175 頁，活性酸素種の化学，日本化学会編，学会出版センター，東京.

（2000. 12. 28 受付，2001. 2. 22 受理）