

メバロノラクトンの研究と応用

The Study of Mevalonolactone and its Applications

山下治之*¹ 小池誠治*² 杉山 宏*³

旭電化工業では、天然型のメバロノラクトンの量産化技術を確認した。メバロノラクトンは皮膚の老化防止作用が確認され、1999年秋から基礎化粧品に配合されている。メバロノラクトンはコレステロールを始め、各種イソプレノイドの重要な生合成原料であることが知られているが、光学活性物質でもあり今後各種の応用が期待される。

1. はじめに

旭電化工業では以前より微生物を利用した酵素や生理活性物質等の発酵生産および生産物の利用などの企業化研究に取り組んできている。この一環として今回、微生物を利用した発酵法による天然型メバロノラクトンの量産化技術を確認した。メバロノラクトンの実用例としては、皮膚のコレステロール生合成系を活性化することから老化防止作用が確認され¹⁾、1999年秋に鐘紡からメバロノラクトンを配合した基礎化粧品の新ブランド「ルシオル」が新発売²⁾されるに至っている。

メバロノラクトンは、メバロン酸が分子内エステル(ラクトン)化した物質(図1)であり、水溶液中では容易に水と反応してメバロン酸となる。また無水環境では脱水しラクトンとなる。本稿では、指定する場合を除いて、メバロン酸という表現でメバロノラクトンを含めて記述する。

メバロン酸は、1956年の発見以来イソプレノイド生合成の重要な中間体として基礎研究が精力的に行われ、多くの知見が得られてきている。特に1985年にはM. S. BrownとJ. L. Goldsteinによるノーベル生理学・医学賞受賞といった研究も生まれている。メバロン酸由来の重要な生体物質であるコレステロール代謝の研究では、肝臓のメバロン酸の生合成酵素を直接阻害する新しいコレステロール低下剤が1987年以降実用化され、最大のブロックバスターに成長している³⁾。

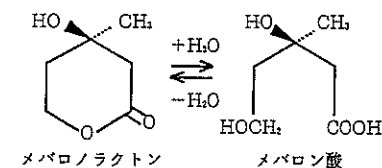


図1 メバロノラクトンおよびメバロン酸の構造

*1 Haruyuki YAMASHITA 旭電化工業(株) 基礎研究所 主任研究員 農学博士

*2 Seiji KOIKE 旭電化工業(株) 基礎研究所 主任研究員

*3 Hiromu SUGIYAMA 旭電化工業(株) 基礎研究所 主席研究員

一方、物質としてのメバロン酸については、動植物細胞中や血液中、発酵食品中など生物界に広く存在することが確認⁴⁾されている。工業的には、化学合成されたメバロノラクトン(ラセミ体)が研究用試薬として試薬メーカー数社から市販されている。従来、生理的に有用な天然型(光学活性)のメバロン酸を入手するためには、微量にしか存在しない微生物培養液または動植物体から精製する必要があった。しかし、比較的大量に含まれていると報告されているワインやビール中でも、存在濃度は3~8 μM (0.4~1.0 μg/ml)⁹⁾とのことから、利用可能な量を入手することは事実上困難であった。

2. メバロン酸の研究経緯

2.1 発見

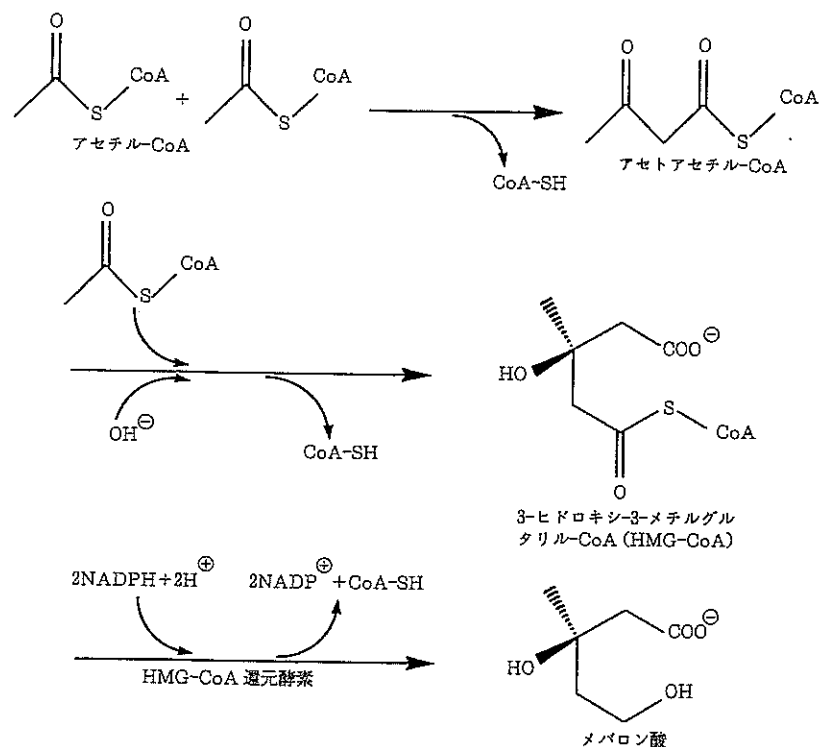


図2 メバロン酸の生合成

従来清酒の製造工程では、清酒が酸敗する“火落ち”という現象が知られ、火落菌の生産する原因物質によるものと考えられていた。1956年に東京大学の田村は、この原因物質を単離⁵⁾し「火落酸」と命名した。また、ほぼ同時期に米国メルク社のM. R. Skeggsらは、ワインの蒸留残渣中に乳酸菌増殖における酢酸代替因子を探索して新規物質を発見⁶⁾し「メバロン酸」と命名した。後に火落酸とメバロン酸は同一と同定された。メバロン酸発見後にはメバロン酸の生合成およびメバロン酸以降の生合成経路の研究が盛んに行われ、研究が発展していった。これらについては関連総説⁷⁾を参照していただきたい。

2.2 構造

メバロン酸の構造上の特徴は、分子内に不斉炭

素を持つ光学活性物質である点である。このためメバロン酸は、2種類の光学異性体が存在するが、生理的に利用可能で天然に存在する異性体はR(-)体である⁸⁾。通常の化学合成法で調製したメバロン酸はラセミ体となる。

生物の生産する複雑な炭素骨格をもつ化合物に注目すると、主に2種類の生合成系、すなわち炭素原子が2個単位で直線的に連なったポリケチドと呼ばれるものと、イソプレノ単位を基本骨格とするイソプレノイドが知られている。両者はともに酢酸から生合成されてくるが、イソプレノイド骨格はアセト酢酸と酢酸からメバロン酸骨格が生合成され(図2)、さらに脱炭酸し複雑な生体物質が形成される。ここで興味深い点は、生体内でいったん合成された光学活性なメバロン酸から、不斉部分の水酸基が脱水されて不斉炭素のないイソペンテニルピロリン酸(IPP)が生合成される点である(図3A)。

2.3 物性

表1にメバロノラクトンの物理化学的性質を示した。常温では粘性のある透明な液体であるが、

開放系での取り扱いには強い吸湿性があるため注意が必要である。また、表2に安全性データを示した。メバロン酸は生体物質であり、コレステロールとして1~1.5 g/日生合成される(食餌由来は0.3~0.5g)と報告⁹⁾されていることから安全性は高いと考えられるが、これを裏づける結果となっている。

2.4 非メバロン酸経路

最近のトピックとして、メバロン酸を経由しないイソプレノイド合成系について述べる。

イソプレノイドの出発物質であるIPPは、従来全てメバロン酸を経由して生合成されると信じられていたが、M. Rohmerらはまったく別の経路からIPPが生合成されることを明らかにした¹⁰⁾。この非メバロン酸経路(図3、文献11)c)から引用)が存在するのは、高等植物の葉緑体、緑藻、大部分の真核細胞であり、動物や植物の細胞質などの真核細胞ではメバロン酸経路(A)によりイソプレノイドが生合成されている。瀬戸ら¹¹⁾によれば、非メバロン酸経路(B)はピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から2-C-メチル-

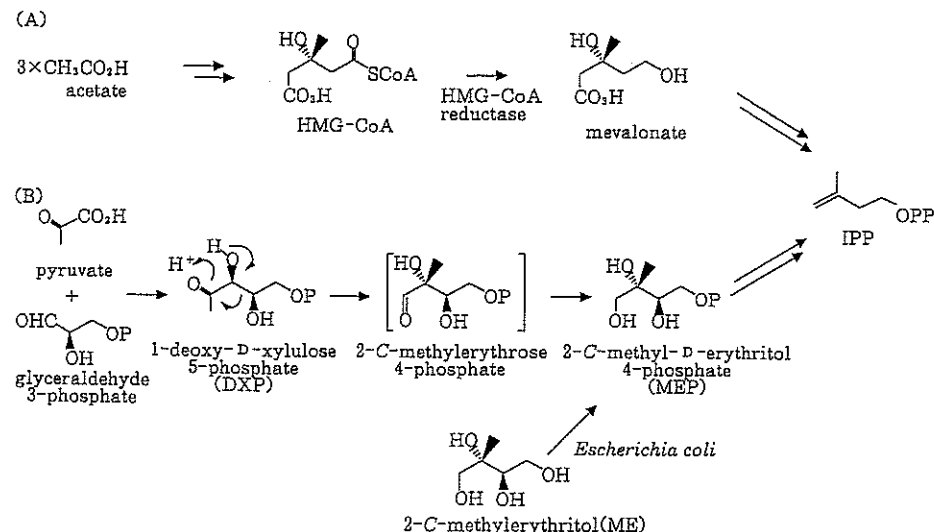


図3 メバロン酸経路(A)と非メバロン酸経路(B)(文献11)c)より引用)

表1 メバロノラク톤の物理化学的性質

分子量および分子式	C ₆ H ₁₀ O ₅ (130.14)
比旋光度 (20°C, D線)	-19° (4%, イソプロパノール)
旋光度 (20°C, D線)	-32° (直接測定)
粘度 (25°C)	170 (cp)
屈折率 (25°C)	1.473
比重 (28°C)	1.18
溶解度	水, エタノール, アセトン等の極性溶媒と任意の割合で混合, ヘキサン, 流動パラフィンに不溶
pH (10% 水溶液)	2.7
自然発火性	なし
引火点 ^甲 (閉鎖系)	なし

注) アルドリッチ総合カタログ (1998-1999) では110°Cと記載。

表2 メバロノラク톤の安全性データ

項目	判定
急性毒性 (ラット, 経口)	LD ₅₀ : 2,000mg/kg 以上
急性毒性 (ラット, 皮下)	LD ₅₀ : 2,000mg/kg 以上
皮膚刺激性 (ラビット)	無刺激性
目刺激性 (ラビット)	無刺激性
皮膚感作性 (ピッグ)	無感作性
変異原性 (Ames Test)	陰性
生分解性 (修正 Sturm 法)	易分解性

D-エリスリトール-4-リン酸 (MEP) を経由して IPP に至るが, 特に MEP から IPP までの反応経路は不明の点が多いため, 今後の研究課題と報告している。図3の A, B 両経路を比べると B 経路では非常に複雑な反応を経て IPP が生成することが分かる。

非メバロン酸経路は, ヒトを含めた動物ではまったく認められず, 病原菌等の多くの真正細菌および藻類で利用されていることから, 新しい抗菌剤および除草剤への応用が可能と考えられる^{13) d)}。

3. メバロン酸発酵

メバロン酸を微生物により生産する試みは,

1968年の田村らによる報告¹²⁾が最初である。従来醸造分野では, 火落酸は麹菌 (*Aspergillus oryzae*) により作られると考えられていたが, この研究によりカビや酵母類も生産することが明らかとなった。しかし, その生産性は *Endomycopsis fibuliger* NRRL-Y7069 株を用いた場合でも培養液中に 0.939mg/ml であり, 実用化にはさらに生産性を上げる必要があった。

遠藤らは, カビ (206 株) や酵母 (294 株) についてメバロン酸の生産性を検討した結果, 酵母の一種である *Saccharomycopsis fibuliger* IFO 0107 株が培養液中に大量のメバロン酸を生産することを見出した¹³⁾。この研究により, メバロン酸は培養液中に 8.3mg/ml 蓄積され, 工業生産が可能な水準に達した。

旭電化工業では, さらに高生産株の探索を行い, 同じ *S. fibuliger* に分類されるが, IFO 0107 株

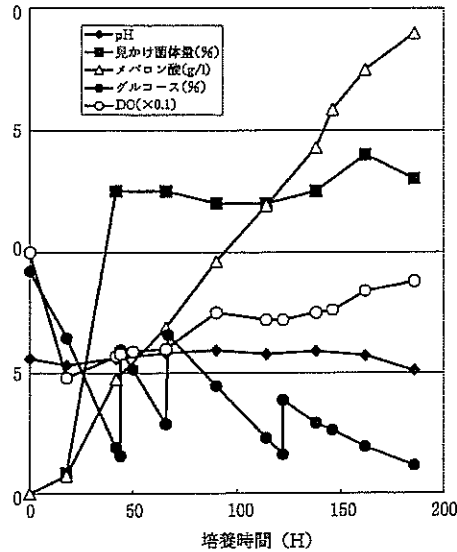


図4 メバロン酸発酵経過

グルコース 10%, ポリペプトン 0.5%, コーンステイプリカー 1.0%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, CaCO₃ 1.0%, アデカノール LG-294 0.05% よりなる培地を使用。

よりも高い生産性を示す菌株 (ADK 8107 および ADK 8108) を見出した¹⁴⁾。以下にメバロン酸発酵の一例を示す。

図4の説明に示した組成の培地 200ml を 1l 容フラスコに入れ, *S. fibuliger* ADK 8107 株¹⁴⁾ を 1 白金時接種し, 28°C で 24 時間培養を行った (種培養)。次に同様の培地 20l (30l 容培養装置) に種培養液を接種し 28°C, 300rpm, 通気量 20l/分で培養を行った。培養 2 日目, 3 日目および 7 日目にそれぞれグルコースを 1kg, 1kg, 0.5kg 添加し, 約 200 時間培養を行った。発酵の経過を図4に示すが, これにより旭電化工業では, メバロン酸を培養液中に 19.0mg/ml まで生産させることに成功した。

培養液中に蓄積したメバロン酸は一般的に知られている精製方法, 例えばシリカゲル等のカラムクロマトグラフィー, 極性溶媒による抽出, 溶解度を利用した結晶化などにより精製可能である。

4. 応用と展望

4.1 皮膚の老化防止効果¹⁵⁾

コレステロールは細胞膜の物質移送機能の発現に必須の成分であり, 生命維持に必要な物質である。副腎や精巣・睾丸ではコレステロールから性ホルモン等のステロイドホルモンが合成され, 皮膚ではラメラ構造を形成するうえで重要な役割を持っている。

皮膚ではセラミド, 脂肪酸, コレステロールにより形成されるラメラ構造が皮膚のバリア機能に重要な役割をになっている¹⁶⁾。特にコレステロールは細胞間脂質がバリア機能を発揮する上で重要な役割を持っており, 表皮でのコレステロール合成能が低下すると肌荒れからの回復力が低下すると考えられる。これが, 皮膚においてコレステロールが重要な役割を持っている理由である。従って, 皮膚のコレステロール合成能を上げることが課題であった。

メバロン酸の皮膚への効果としては, 従来皮膚に適度な潤滑感および柔軟性を付与できることが知られていた¹⁵⁾。しかし, メバロン酸はコレステ

表3 表皮透過バリアに及ぼすメバロノラク톤の効果 (文献 1)c) より一部改変)

群	処理回数 (回)
老 齢 基 剤	35±3
メバロノラクトン	63±3 (p<0.05 vs 基剤)
若 齢	57±4

値は平均値±標準誤差 (n=5)

ロール生合成の前駆物質であることから, 皮膚のコレステロール代謝を盛んにする効果が期待された。これについては, 京都府立医大と鐘紡の共同研究が報告されている^{17) a) ~ d)}。その実例を以下に紹介する^{17) a)}。

コレステロール合成能が低下した高齢皮膚にメバロノラクトンを塗布し, 表皮透過バリア強度試験を行った結果を表3に示した。試料の塗布を 1 日 1 回, 5 日間行った。そして, 最終塗布から 72 時間目に, TEWL (皮膚からの水分の不感蒸散量) が 0.15mg/cm²/分になるまでアセトンを用いて皮膚表面を拭く処理回数を測定した。その結果, メバロノラクトンを含合した試料を高齢皮膚に塗布することにより, 明らかな表皮透過バリアの強化効果が認められた。しかし, 若齢皮膚では影響は認められなかった。また, 高齢皮膚にメバロノラクトンを塗布して皮膚のコレステロール合成能を測定したところ, 図5に示したようにコレステロール合成能が活性化された。従って, メバロノラク톤の作用は老化した皮膚において顕著に発揮された。さらに, 副作用はまったく認められなかった, とのことである。

4.2 乳酸菌・ビフィズス菌の増殖効果¹⁷⁾

ビフィズス菌は母乳栄養児の腸内で特異的に存在し, 乳幼児の感染防止や栄養生理の面から重要視されてきたが, 近年になって成人から老人に至るまで広く分布していることが明らかとなり, ヒトにとって有益な役割を果たしていることが知られるようになった¹⁸⁾。一方, メバロン酸が火落菌等の乳酸菌 (*Lactobacillus homohiochi*, *L. heterohiochi*¹⁹⁾, *L. acidophilus*²⁰⁾) の増殖作用を持

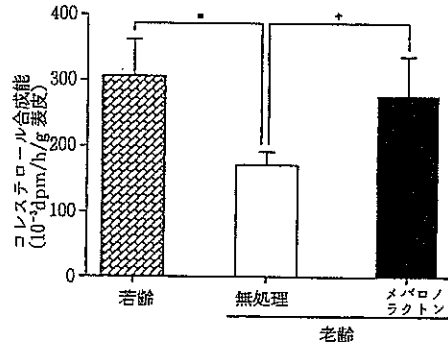


図5 コレステロール合成能に及ぼすメバロノラクトン塗布の影響 (文献1) c) より一部改変) 値は平均値±標準誤差。
*: $p < 0.05$, +: $p < 0.1$

表4 メバロン酸のビフィズス菌増殖効果

ビフィズス菌名	増殖効果 (濁度)	
	無添加	0.3%添加
<i>Bifidobacterium breve</i> bs46	1.33	1.87
<i>B. infantis</i> S12	1.92	2.13
<i>B. infantis</i> 30127 1-18-4	1.67	1.92
<i>B. infantis</i> 30125 1-14-2	1.92	2.13
<i>B. adolescentis</i> A205-14	0.82	1.23
<i>B. adolescentis</i> cE298b	0.54	0.90
<i>B. longum</i> 1-13-12	1.51	1.82
<i>B. parvulum</i> bS17C	1.46	1.72

トマレーリ培地に0.3%メバロノラクトンを添加後、光岡らの方法¹⁹⁾に従い、培地1g当たりビフィズス菌 2×10^4 個程度接種し、37°Cで24時間培養後の550nmの濁度を測定した。

つことは1956年から知られていた。そこで、微生物学的な性質はかなり異なるが腸内の有用細菌ということからメバロン酸のビフィズス菌に対する増殖作用について検討を行った。その結果、表4に示すように、メバロン酸は各種ビフィズス菌に対して増殖促進効果が認められた¹⁹⁾。

4.3 非ステロール系イソプレノイド

生体内で合成されたメバロン酸の多くは図6に

示すように、スクアレンを経由してコレステロールに合成されるが、一方ではメバロン酸は非ステロール系のイソプレノイドの生体原料としても機能している。HMG-CoA還元酵素の特異的阻害剤であるML-236B²⁰⁾を用いた哺乳類の培養細胞系による研究²¹⁾により、非ステロール系イソプレノイドの生体内での定量的な知見が得られている。これによると、生合成されるメバロン酸の98%はコレステロールになると報告²¹⁾されている。

メバロン酸由来の非ステロール系物質には、特に生命維持に必須の生体物質であるイソペンテニルアデニン²²⁾、ドリコール²³⁾、ユビキノ²⁴⁾等が知られている。イソペンテニルアデニンは、tRNAの構成塩基であり、IPPからジメチルアリルピロリン酸を経由して生合成される。また、サイトカイニン(植物ホルモン)活性があることも知られている。ドリコールは、N型糖タンパク質の生合成に関与する物質である。N型糖タンパク質は糖結合ドリコールとタンパク質のコンセンサス配列(-Asn-X-Ser(Thr)-)が結合することで合成される。ユビキノ(coenzyme Q)は脂溶性ビタミンにも分類され、医薬品としても利用されているが、ミトコンドリアにおける呼吸鎖(電子伝達系)の構成要素として、エネルギー産生に重要な役割を演じている物質である。

哺乳類では肝臓で合成されたコレステロールはLDL (low density lipoprotein) の形で血中に放出され抹消細胞へ供給されるが、HMG-CoA還元酵素の生体内での活性調節は、LDLおよび非ステロール系のイソプレノイド化合物による多価フィードバックと呼ばれる複雑な機構で行われている²⁵⁾。メバロン酸はステロール系イソプレノイドと非ステロール系イソプレノイドの両方の生体原料としての側面をもつ重要な生体物質であることを強調しておきたい。

4.4 光学活性素材

医薬品やビタミン等の生理活性物質や液晶材料等の光学材料は多くの場合光学活性物質であるが、

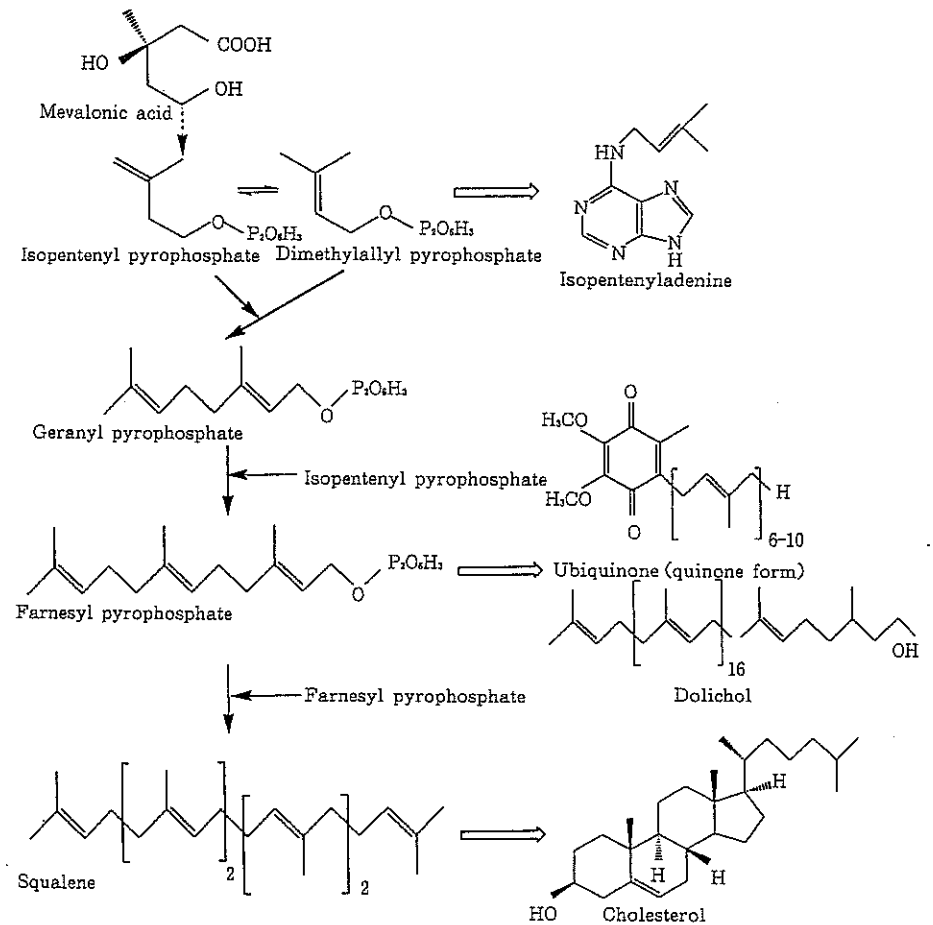


図6 メバロン酸から各種イソプレノイドへの生合成

これらを化学合成するためには高い光学純度のキラルシントンや、不斉触媒を利用する必要がある。このような物質を大量生産する方法としてはバイオテクノロジーの利用が最も有望と考えられる。メバロノラクトンは発酵法により製造していることから非常に高い光学純度を有しており、不斉部位を構築するキラルシントンとしての利用も考えられる²³⁾。

5. おわりに

これまで、メバロン酸はイソプレノイド合成の重要な生合成中間物質として知られていた。メバロン酸自身の利用は研究用試薬以外ではほとんど行われていなかった。この最大の理由は、天然型であるR(-)体のメバロン酸を必要十分な量として入手できなかったためと考えられるが、今回当社の発酵法による量産化技術の確立によって初

めて容易に利用可能となった。実用的には、皮膚の老化防止作用が認められ化粧品に配合されるようになった。今後メバロン酸が、さまざまな分野で有効利用されることを期待したい。

本稿を終わるに際し、適切なご指導を戴いた遠藤章先生に深く感謝致します。本研究は多くの関係者の協力により行ったものです。この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) a) 原武昭憲, 池永健治, 加藤則人, 打和秀世, 平野眞也, 安野洋一, 日本研究皮膚科学会第24回年次学術大会講演要旨(1999); b) A. Haratake, K. Ikenaga, N. Katoh, H. Uchiwa, S. Hirano, H. Yasuno, The Society for Investigative Dermatology, 60th Annual Meeting(1999); c) A. Haratake, K. Ikenaga, N. Katoh, H. Uchiwa, S. Hirano, H. Yasuno, *J. Invest. Dermatol.*, 114, 247-252(2000); d) 公開特許公報, 特開平10-338626
- 2) 1999年9月17日付け日経産業新聞および化学工業日報
- 3) 石田史明, 亀井敏夫, *ファインケミカル*, 27, 16-24(1998)
- 4) G. Popják, G. Boehm, T. S. Parker, J. Edmond, P. A. Edwards, A. Fogelman, *J. Lipid Res.*, 20, 716-728(1979)
- 5) G. Tamura, *J. Gen. Applied Microbiol.*, 2, 431-434(1956)
- 6) M. R. Skeggs, L. D. Wright, E. L. Cresson, G. D. E. MacRae, C. H. Hoffman, D. E. Wolf, K. Folkers, *J. Bact.*, 72, 519-524(1956)
- 7) a) 田村学造, 津田恭介, *化学の領域*, 12, 412-420(1958); b) A. F. Wagner, K. Folkers, *Endeavour*, 1961, 177-187(1961); c) G. Popják, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 54, 647A-655A(1977); d) G. Popják, DeW. S. Goodman, J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, R. Ryhage, *J. Biol. Chem.*, 236, 1934-1947(1961); e) M. S. Brown, J. L. Goldstein, *J. Lipid Res.*, 21, 505-517(1980); f) K. Bloch, *Science*, 150, 19-28(1965); g) E. D. Beytia, J. W. Porter, *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 113-142(1976); h) D. P. Gough, F. W. Hemming, *Biochem. J.*, 118, 163-166(1970); i) R. E. Olson, *In Vitamins and Hormones*, Academic Press, New York, 24, 551-574(1968)
- 8) M. Eberle, D. Arigini, *Helv. Chim. Acta*, 43, 1508-1513(1960)
- 9) 武内望, 脂質代謝異常のすべて, 南江堂(1979)
- 10) a) M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.*, 295, 517-524(1993); b) M. Rohmer, M. Seemann, S. Horbach, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 2564-2566(1996)
- 11) a) 瀬戸治男, 蛋白質・核酸・酵素, 42, 2590-2600(1997); b) 瀬戸治男, バイオサイエンスとバイオインダストリー, 57, 449-453(1999); c) 葛山智久, 瀬戸治男, *日本油化学会誌*, 49, 119-125(2000)
- 12) a) G. Tamura, K. Ando, K. Kodama, K. Arima, *Applied Microbiol.*, 16, 965-972(1968); b) USP 3617447
- 13) a) S. Koike, S. Murakawa, A. Endo, *J. Ferm. Bioeng.*, 86, 58-59(1989); b) 特許公報 第2015165号, 第2054799号, 第2054800号, 第2054801号
- 14) 特許公報第2792600号
- 15) 国際商業, 32(379), 56-63(1999)
- 16) 特許公報第2925266号
- 17) 特許公報第2876541号
- 18) 光岡知足, ピフィズ菌の研究, 財団法人学会事務センター(1999)
- 19) N. Azuma, K. Yamauchi, T. Mitsuoka, *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2159-2162(1984)
- 20) a) A. Endo, M. Kuroda, Y. Tsujita, *J. Antibiotics*, 29(12), 1346-1348(1976); b) 特許公報 第1072043号
- 21) a) M. S. Brown, J. R. Faust, J. L. Goldstein, I. Kaneko, A. Endo, *J. Biol. Chem.*, 253, 1121-1128(1978); b) J. R. Faust, J. L. Goldstein,
- 22) R. H. Hall, *In Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Academic Press, New York, 10, 57-86(1970)
- 23) 北爪智哉, 季刊化学総説, 33, 89-95(1997)