

課題番号	Q19L-03
課題名（和文）	皮膚保湿改善作用をもつ機能性脂質を発酵粕から抽出する方法の開発
課題名（英文）	Extraction of sphingolipids having skin moisture improving action from sake lees
研究代表者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部 生命科学系 准教授 氏名 安部 智子
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 理工学部 生命科学系 教授 氏名 長原 礼宗
共同研究者	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名
	所属（学部、学科・学系・系列、職位） 氏名

#### 研究成果の概要（和文）

皮膚に存在する酵素であるカスパーゼ 14 は角質層のバリア機能や水分保持機能の維持に関与しており、カスパーゼ 14 の発現上昇を誘導することにより皮膚保湿機能を改善できる可能性がある。共同研究者である長原はセラミド類縁体であるスフィンゴイド塩基、特に植物や菌類に含まれるフィトスフィンゴシンやスフィンガンニンが非常に低濃度でカスパーゼ 14 の発現を増加させることを明らかにした。本研究では、植物や微生物が含まれる発酵粕中に存在するスフィンゴイド塩基類について解析した。さらに、解析結果をもとに発酵粕中のスフィンゴイド塩基類の含有量を増加させる方法を開発した。

#### 研究成果の概要（英文）

In Japanese sake brewing process, the sake mash is divided into liquid and solid parts after alcoholic fermentation. The solid part is called sake lees. More recently, Nagahara *et al.* demonstrated that cell-permeable sphingolipids act not only as a barrier in the stratum corneum but also by modulating cellular functions and inducing differentiation. In this study, it has been demonstrated that several sphingolipids and sphingoid bases are contained in the sake lees.

## 1. 研究開始当初の背景

カスパーゼ 14 は皮膚に存在する酵素であり、フィラグリンと呼ばれるタンパク質の前駆体を分解して天然保湿因子を生成し、角質層のバリア機能や水分保持機能の維持に関与することが近年明らかにされている。つまり、カスパーゼ 14 の発現を効果的に誘導したり、カスパーゼ 14 の働きを活性化したりする化合物を使用することで皮膚保湿機能を改善できる可能性がある。共同研究者である長原はスフィンゴイド塩基、特にフィトスフィンゴシンやスフィンガニンが非常に低濃度でカスパーゼ 14 の発現を増加させることを明らかにした。

フィトスフィンゴシンは植物や菌類に多く含まれる物質であり、酒類の製造の際に残渣として生じる発酵粕（植物由来成分と麹や酵母など微生物の菌体成分、その代謝産物等を含む）にはスフィンゴ脂質が含有されている。このような発酵粕の多くは費用をかけて廃棄されているのが現状であり、廃棄物である発酵粕からカスパーゼ 14 の発現を誘導するスフィンゴイド塩基類を効率的に抽出することができれば、化粧品材料としての有効利用が期待される。

## 2. 研究の目的

現状その大半が産業廃棄物として廃棄されている発酵粕中に含有されるスフィンゴイド塩基類の種類と含有量を明らかにし、有機溶媒等を使用せずにカスパーゼ 14 の合成を促進するスフィンゴイド塩基類を発酵粕から効率的に抽出する方法を開発することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 発酵粕中のスフィンゴイド塩基類の解析

市販の清酒粕数種を試料として用いた。清酒粕は清酒製造の際に作られる、もろみ（原料が発酵した柔らかい固形物）を圧搾し、その後に残る白色の固形物である。クロロホルム:メタノール:水の体積比が 1:2:0.8 となる溶媒を試料に加えて攪

拌し、その後さらにクロロホルム:メタノール:水の体積比が 1:1:1 になるようにクロロホルムと水を加えて 2 層に分離した後、有機溶媒層を回収した。

回収した画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) により展開した。展開溶媒としてクロロホルム:メタノール:酢酸:水=20:3.5:2.3:0.7 を用いた。展開後、ニンヒドリン反応により呈色し、スフィンゴイド塩基類を検出した。呈色箇所のシリカゲルを TLC プレートからかき取り、その後、シリカゲルから溶出させた画分を回収した。回収した画分を 70%メタノールに溶解し、Mono spin カラムに供し、溶出画分を回収した。溶出画分を遠心エバポレーターを用いて濃縮し、LC-MS/MS (Zaprous ADV Q-Exactive system, AMR) 分析に供した。カラムは COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II、移動相として溶媒 A(メタノール:5 mM 酢酸アンモニウム=85:15) を用いた。

### (2) 発酵粕中のスフィンゴイド塩基類の増量

①清酒粕にミリ Q 水を加えてオートクレーブ滅菌した後、滅菌した清酒粕に緑膿菌を植菌し、2 日間 30°C で振とう培養した。(1)と同様の方法で緑膿菌を植菌した清酒粕から脂質を抽出し、TLC で展開した後、ニンヒドリン反応により呈色した。

②PY 液体培地を用いて緑膿菌を振とう培養（前培養）した。清酒粕にミリ Q 水を加えてオートクレーブ滅菌した後、ろ過滅菌した緑膿菌の培養上清を添加し、2 日間 30°C で振とうした。その後、(1)と同様の方法で脂質を抽出して TLC で展開した後、ニンヒドリン反応により呈色した。

## 4. 研究成果

### (1) 発酵粕中のスフィンゴイド塩基類

清酒粕から抽出した脂質画分をそれぞれ TLC により展開し、ニンヒドリン反応により呈色した結果、用いた酒粕すべてで、標品として用いたいくつかのスフィンゴイド塩基類と同じ位置に呈色スポットが確認された。用いた市販の清酒粕中に

それぞれいくつかのスフィンゴイド塩基類が含まれることがわかった。さらに、酒粕から抽出した2種類の脂質画分をLC-MS/MS分析に供した結果をFig. 1に示した。スフィンゴイド塩基標品と同様のフラグメントが確認され、清酒粕に含有されるスフィンゴイド塩基類が同定された。

インゴ脂質が分解されてスフィンゴイド塩基が生成したと考えられる。

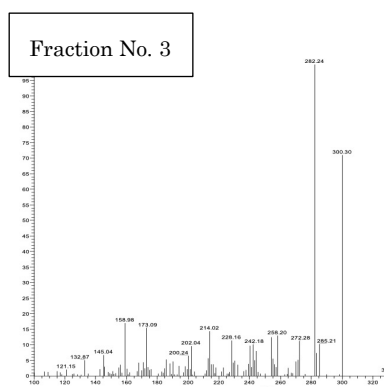
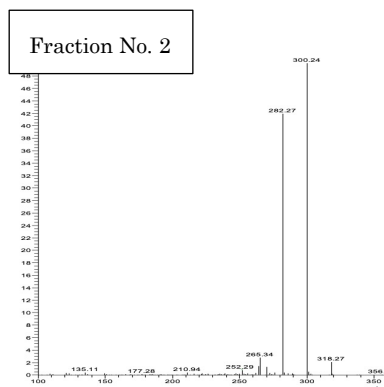


Fig. 1 MS/MS spectrum of fraction 2 or 3 from the sake lees.

## (2) スフィンゴイド塩基類の発酵生産

セラミダーゼを分泌することが知られている緑膿菌を清酒粕に加えて培養し、遊離のスフィンゴイド塩基が増加するかを確認した。その結果、緑膿菌を酒粕に添加することによって、遊離のスフィンゴイド塩基量が顕著に増加することがわかった。また、緑膿菌の培養液をろ過滅菌した培養上清のみを清酒粕に添加した場合でも、スフィンゴイド塩基量は有意に増加した。セラミダーゼはセラミドなどのスフィンゴ脂質を分解してスフィンゴイド塩基を生成する酵素である。緑膿菌が分泌したセラミダーゼにより清酒粕中のスフ