

ラビリンチュラ類による ω3-docosapentaenoic acid (ω3-DPA) の生産

安藤 晃規^{1,2*}・奥田 知生¹・波多野文美¹・菊川 寛史¹・松山 恵介³・小川 順^{1,2}

はじめに

ω3高度不飽和脂肪酸(ω3-PUFA)であるエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA), α-リノレン酸(ALA)を高含有する食用油脂は, エビデンスが明らかになっている機能性食品素材であり, 健康維持・増進のために毎日の摂取が推奨されている。また, これらのω3-PUFAの高純度誘導体は, 医薬品としても年々需要が高まり市場が拡大している。

一方, ω3-ドコサペンタエン酸(ω3-DPA)やステアリドン酸(SDA), エイコサテトラエン酸(ETA)といった天然に希少なω3-PUFAは, 他のω3-PUFAと同様に有用な生理機能が期待されているものの, 供給が不十分であるために研究が進んでいないのが現状である(図1)。こ

れまでにω3-DPAの生理活性機能に関して, 動物体内でのDHAの不足の代償としてω3-DPAが増加することや, ヒトの母乳に特異的にω3-DPAが含まれていることが報告されていた¹⁻³⁾。加えて最近, DPA誘導体がアレルギー疾患を抑制すること⁴⁾などが報告され, EPAやDHAと同様に高い生理活性を有するω3脂肪酸として期待を集めつつある。天然供給源としては, タテゴトアザラシの抽出油などが知られているが, ω3-DPA含有量は総脂肪酸の5%以下であり, 供給量および純度の面で十分とは言えない。このため, 高純度ω3-DPAを安定かつ大量に供給できる新規供給源が, 基礎研究および応用開発の両面から求められている。

これまでに海水域または汽水域に生息する微生物に, DHAやEPAなどのω3-PUFAを高含有する油脂を生産するものが存在することはすでに知られており, 特に*Aurantiochytrium*や*Schizochytrium*をはじめとするラビリンチュラ類微生物がω3-PUFA高含有油脂生産菌として活用されてきた⁵⁻⁷⁾。そこで, 筆者らは希少ω3-PUFAであるω3-DPAに関して, ラビリンチュラ類微生物を対象にω3-DPA高含有油脂生産菌(ω3-DPA生産菌)の探索を行い, *Aurantiochytrium* sp. T7株を見いだしたので紹介する。

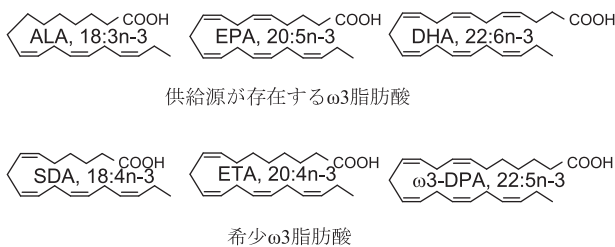


図1. 種々のω3脂肪酸

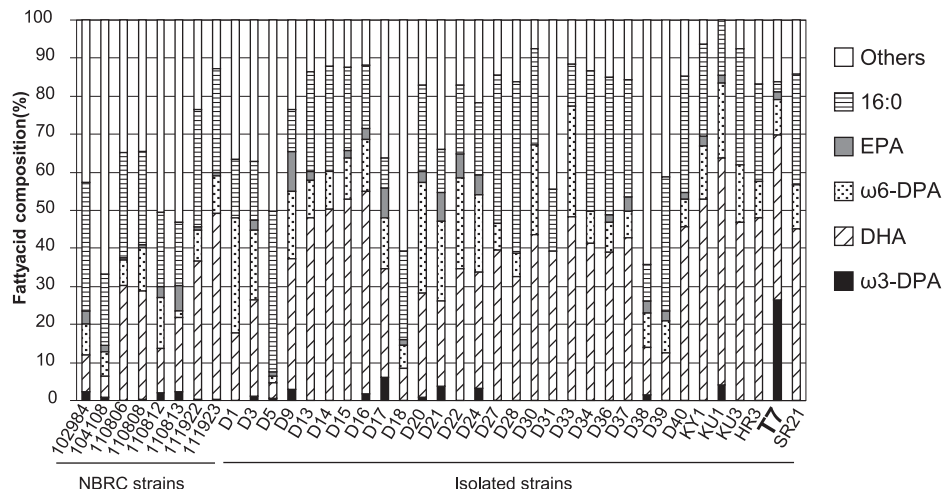


図2. ラビリンチュラ選抜株の脂肪酸組成(28℃, 7日間培養)

* 著者紹介 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻(助教) E-mail: ando.akinori.6n@kyoto-u.ac.jp

¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻, ² 京都大学学際融合教育推進センター生理化学研究ユニット

³ 長瀬産業株式会社ナガセ R&Dセンター企画開発課

ω3-DPA 生産菌 *Aurantiochytrium* sp. T7 株の取得

汽水域から採集した水・土壌・落葉などのサンプルに対して花粉釣菌法による集積，単離を行い⁸⁾，ω3-PUFA 含有油脂生産株31株を取得した。これら単離菌とNBRC 分譲株152株の計183株を対象に脂肪酸分析を行ったところ，汽水域単離株よりω3-DPAを総脂肪酸あたり約25%蓄積するT7株を見いだした(図2)。ラビリンチュラ類においてDHAまたはEPAを生産する株は多く存在するが，ω3-DPAを生産する株は少なく，またそのω3-DPA含有率も総脂肪酸の5%以下のものがほとんどであった。これに対し，T7株はω3-DPA含有トリアシルグリセロールを高生産し，そのω3-DPA含有率も20%を超えるきわめて特異な性質を示した。このT7株は蓄積脂肪酸組成，18S rRNA塩基配列解析により，*Aurantiochytrium*属に分類されることを明らかにしている。

Aurantiochytrium sp. T7株による ω3-DPA 生産への培養条件の影響

種々の炭素源の影響 *Aurantiochytrium* sp. T7株に対し，炭素源の影響を評価した。炭素源の濃度を2%とし，

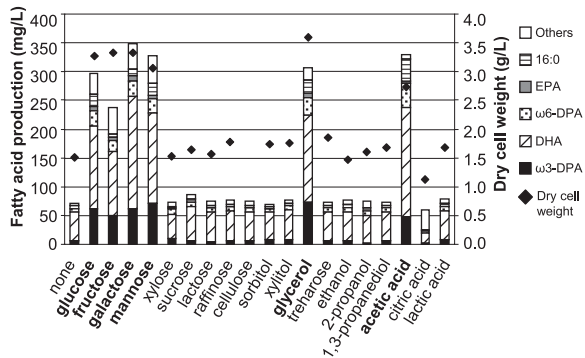


図3. T7株の脂肪酸生産に及ぼす炭素源濃度2%，28℃，培養期間7日。

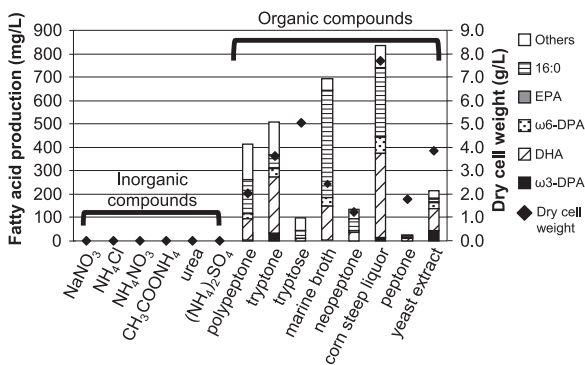


図4. T7株の脂肪酸生産に及ぼす窒素源濃度1%，28℃，培養期間7日。

Yeast extract 1%，塩濃度を海水濃度の半分(人工海水塩1.8%)とした培地で，28℃，7日間培養を行った。その結果，グルコース，フルクトースといった単糖，グリセロール，酢酸を用いた場合に高いω3-DPA生産が認められた。一方で，それら以外の二糖，アルコール類，有機酸などの資化は困難であり，油脂生産量も低いことがわかった(図3)。

種々の窒素源の影響 グルコースの濃度を2%，窒素源1%，海水成分の半分の塩濃度1.8%とした培地にて，28℃，7日間培養を行い，ω3-DPA生産に与える窒素源の影響を評価した。有機窒素源を用いた場合にのみ生育とω3-DPA生産が観察され，特にYeast extractを用いた場合に高いω3-DPA生産が観察された。一方で，無機窒素源は資化されなかった(図4)。

炭素源ならびに窒素源の濃度の影響 グルコース2%，Yeast extract 1%，塩濃度1.8%の培地を基準に，炭素源，窒素源の濃度がω3-DPA生産に与える影響の評価を行った。グルコース濃度に関して，0.5%，2%，5%の各濃度で28℃，6日間培養を行い，培養2日目，4日目，6日目に菌体から脂肪酸を回収し分析を行った。結果，グルコース濃度の増加に伴って総脂肪酸量は増加し，また，培養の経過に従い蓄積脂肪酸を分解する傾向が観察された。一方で，ω3-DPA生産量はグルコース2%濃度，培養4日目にて最大となった。また，グルコースの濃度が高いほどω3-DPAの蓄積が遅れる傾向が観察された。Yeast extractの濃度に関しては，1%，2%，3%の各濃

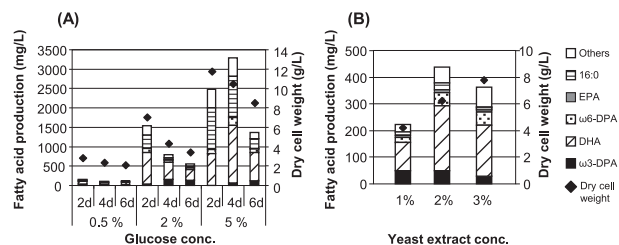


図5. T7株の脂肪酸生産に及ぼす(A)炭素源濃度，(B)窒素源濃度の影響

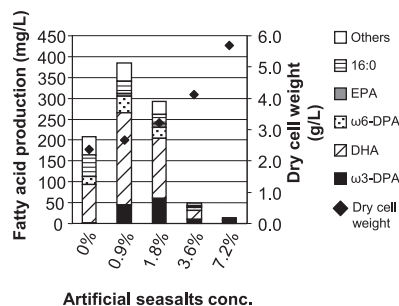


図6. T7株の脂肪酸生産に及ぼす塩濃度の影響。28℃，培養期間7日。

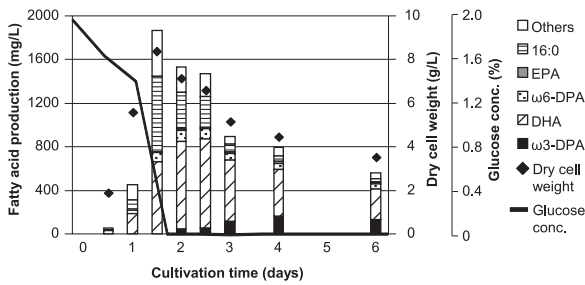


図7. 最適培養条件におけるT7株の脂肪酸生産性の経時変化

度で28℃, 7日間培養を行った結果, Yeast extract 1%でω3-DPA生産量が最大となった(図5).

塩濃度の影響 グルコース2%, Yeast extract 1%, 塩濃度を0~海水の2倍とした培地にて, 28℃, 7日間培養を行った. 結果, 海水の半分の塩濃度, 1.8%が最適であることがわかった(図6).

培養温度の影響 グルコース2%, Yeast extract 1%, 塩濃度1.8%の培地において, 28℃と16℃にて培養を行い, 培養温度の影響を評価した. 結果, 培養2日目と5日目において, 生育, 総脂肪酸量, ω3-DPA生産量すべてにおいて28℃で培養した場合の方が良好な結果を示した. 糸状菌などでは, 低温条件下にて蓄積脂肪酸の不飽和度が上がる報告があるが, T7株においてはその傾向は見られなかった.

培養初発pHの影響 グルコース2%, Yeast extract 1%, 塩濃度1.8%の培地を用いる28℃での培養において, 培養初発pHを3~11に調製し, その影響を検討した. 結果, 培養初発pH 5.5以下の酸性条件下で, 安定したω3-DPA生産を示すことが明らかとなった.

至適培養条件におけるT7株によるω3-DPA生産 上述の結果から得られたT7株のω3-DPA生産における至適培養条件, グルコース2%, Yeast extract 1%, 塩濃度1.8%, 培養温度28℃, 初発pH 5.5以下のもと, ω3-DPA生産の経時変化を評価した. 結果, ω3-DPAの蓄積は培養初期にはあまり見られず, 培養後期に蓄積量が増加する傾向が見られた. 培地中のグルコースが培養2日目には枯渇していることや, 炭素源濃度の検討の際にグルコース濃度を上げるほどω3-DPAの蓄積が遅れたことなどから, T7株においては, グルコースの枯渇が, ω3-DPA蓄積に関与していることが予想された(図7).

培養時のグルコース添加が脂肪酸生産に及ぼす影響 前項より, T7株においてω3-DPAは他の脂肪酸種が減少する培養後期に増加することが明らかとなった. そこで, 培養時の炭素源の動態とω3-DPA蓄積の関係を評価した. グルコースが完全に枯渇した培養3日目に再度グルコースを添加したところ, ω3-DPA以外の脂肪酸の減少が抑

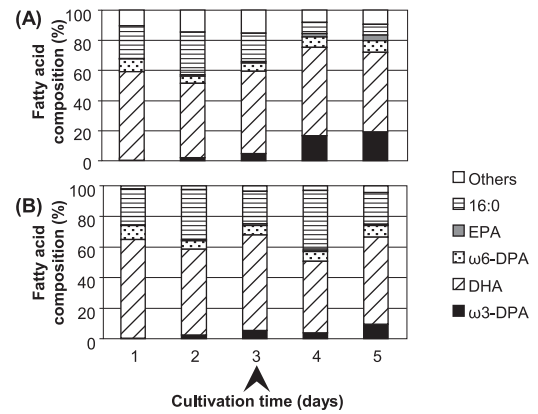


図8. T7株の脂肪酸組成に及ぼすグルコース添加の影響. (A) 培養中のグルコース添加なし, (B) 培養3日(矢印)でグルコース添加(終濃度2%).

えられるとともに, ω3-DPAの蓄積も同時に抑制されることが明らかとなった(図8).

おわりに

近年になり, 希少ω3-PUFAの一種ω3-DPAの生理機能が徐々に明らかにされつつある. ヒトの母乳に無視できない量の存在が報告されているものの, ヒトに対する生理活性は未だ十分には解明されていない²⁾. 本稿で紹介した*Aurantiochytrium* sp. T7株は, 既存の天然資源にはない高いω3-DPA組成比の油脂(トリアシルグリセロール)を遺伝子組換え技術に頼ることなく生産できるポテンシャルを有している. 将来的には, 食品素材や医薬品への利用など多様な産業利用への展開が期待される.

一方で, これまでに脂肪酸合成経路として, 不飽和化/鎖長延長化酵素系が関与するスタンダード経路と, ポリケチド合成酵素系が関与するPKS経路が知られているが, 本菌のω3-DPAの蓄積量の経時変化から, 通常とは異なる生合成経路の存在が示唆される. 今後, ω3-DPAの生合成メカニズムの解析から, 希少脂肪酸分子種の特異的生産技術開発への展開が期待される.

文 献

- 1) Rebhung, F. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 314 (1994).
- 2) 磯村晴彦: *母性衛生*, **48**, 54 (2007).
- 3) Koletzko, B. *et al.*: *J. Pediatr.*, **120**, S62 (1992).
- 4) Hirata, S. *et al.*: <https://doi.org/10.1111/all.14217> (2020).
- 5) Bowles, R. D. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **70**, 193 (1999).
- 6) Lewis, T. E. *et al.*: *Mar. Biotechnol.* (NY), **1**, 580 (1999).
- 7) Mendes, A. *et al.*: *J. Appl. Phycol.*, **21**, 199 (2009).
- 8) Bowles, R. D. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **70**, 193 (1999).