ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* sp. T7 株による ω3-docosapentaenoic acid (ω3-DPA) の生産 ω3-Docosapentaenoic Acid (ω3-DPA) Production by *Labyrinthulea Aurantiochytrium* sp. T7

安藤 晃規

¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学研究分野
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

〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Akinori ANDO

¹ Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.
² Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan

奥田 知生

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学研究分野
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Tomoyo OKUDA
Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.

Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan

波多野 文美

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学研究分野
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Ayami HATANO

Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan

菊川 寛史

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学研究分野
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Hiroshi KIKUKAWA

Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan

松山 恵介

長瀬産業株式会社ナガセ
R&D センター企画開発課
〒651-2241
神戸市西区室谷 2-2-3

Keisuke MATSUYAMA

Strategic Development Section,
Nagase R&D Center,
NAGASE & CO., LTD.
Kobe High Tech Park 2-2-3, Murotani,
Nishi-ku, Kobe, Hyogo, 651-2241,
Japan

小川 順

¹ 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学研究分野
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
〒606-8502
京都市左京区北白川追分町

Jun OGAWA

¹ Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.
² Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502, Japan

論文要旨：ω3 高度不飽和脂肪酸 (ω3-PUFA) は、脳機能の発達促進やアレルギー抑制など多彩な生理機能を有することが知られており、哺乳類では生理活性物質の前駆体ともなることから、医薬品原料や食品添加物としての需要が高まっている。ω3-PUFA のうち、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) は、天然資源に比較的多く存在することから、生理機能解析や商業利用がすでに進められている。一方、ステアリドン酸 (SDA) や ω3-ドコサペンタエン酸 (ω3-DPA)、ω3-エイコサテトラエン酸 (ω3-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。例えば、ω3-DPA はタテゴトアザラシなどの抽出油に含まれていることが報告されているが、含有量は総脂肪酸の 5% 以下であり十分な供給は望めない。

近年、細菌や真菌、植物、微細藻類などによる ω3-PUFA の生産に注目が集まっているなか、我々は特に希少 ω3-PUFA に着目し、安価で大量かつ安定的に生産できる供給源として期待されている *Aurantiochytrium* や *Schizochytrium* をはじめとするラビリンチュラ類微生物を対象にスクリーニングを行った。本稿では、希少 ω3-PUFA の生産株探索に関して、新たに見出した *Aurantiochytrium* sp. T7 株による ω3-DPA 生産に関する研究について紹介する。

Abstract: Omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω3-PUFAs) have attracted attention because of their unique physiological function. The considerable abundances of eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and α-linolenic acid in nature made possible the studies on their bioactivities. On the other hand, there are few reports on the other ω3-PUFAs, such as stearidonic acid, ω3-eicosatetraenoic acid and ω3-docosapentaenoic acid (ω3-DPA), because their supply has been limited to date. These minor ω3-PUFAs have been expected to possess beneficial function as precursors of bioactive substances as well as DHA and so on. Therefore, sufficient supply of such rare PUFAs has been required for elucidation of their physiological function.

ω3-DPA has been reported to be present in several natural oils obtained from harp seal and so on, but the content of ω3-DPA was no more than 5 % in total fatty acids. Thus, recent investigations have focused on ω3-PUFAs production by alternative source such as oleaginous microbes, fungi, plants and microalgae. In particular, we focused on Labyrinthulea, one of representative oleaginous microbes, as stable and rich source of ω3-DPA. In this paper, we introduce the study of production of ω3-DPA by isolated Labyrinthulea, *Aurantiochytrium* sp. T7.

Key words: PUFA, omega-3 polyunsaturated, ω3-docosapentaenoic acid, ω3-DPA, Labyrinthulea, *Aurantiochytrium*

1 はじめに

ω3 高度不飽和脂肪酸 (ω3-PUFA) は、多彩な生理機能を有することが知られており、哺乳類では生理活性物質の前駆体ともなることから、医薬品原料や食品添加物としての需要が高まっている (Fig. 1)。ω3-PUFA のうち、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) は、魚油や植物油といった天然資源に比較的多く存在することが知られている。特に DHA に関しては、魚油の中でもマグロの眼窩脂肪などの DHA 高含有原料が発見されており、DHA の生理活性機能の解明、およびその実用化の研究が活発に進められている。DHA の生理活性機能としては、コレステロール低下作用、抗血液凝固作用、および制癌作用などが明らかになっているほか、脳代謝系についても、記憶学習能力の向上、老人性認知症の予防、アルツハイマー病などに効果があることが報告されている^{1, 2)}。また、

DHA や EPA は、海水魚の成長に必須の脂肪酸であることも明らかとなっている。

一方、ω3-ドコサペンタエン酸 (ω3-DPA) やステアリドン酸 (SDA)、ω3-エイコサテトラエン酸 (ω3-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。例えば ω3-DPA は、タテゴトアザラシ、ライオンタテガミクラゲ、マンボウなどの抽出油に含まれていることが報告されているが、いずれも含有率は総脂肪酸の 5% 以下であり、量および純度の面で十分な供給は望めない。ω3-DPA の生理機能については未だ不明な点が多く、薬剤を脳へ運びやすくする担体として機能することなどがわずかに知られているにすぎないが³⁾、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⁴⁾、ヒトの母乳に特異的に ω3-DPA が含まれていることから^{5, 6)}、ω3-DPA もまた、他の ω3-PUFA と同様に動物

Fig. 1 種々の ω 3高度不飽和脂肪酸

Fig. 2 スクリーニング結果。28℃, 培養期間7日

体内で高い生理活性を示すことが予想されている。このため、高純度 ω 3-DPAを安定的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。

ω 3-DPAの代替供給源として、 ω 3-DPA生産能を有する微生物が考えられる。海水域または汽水域に生息する微生物の中に、DHAやEPAなどの ω 3-PUFA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 ω 3-PUFA生産源として注目を集めている⁷⁻⁹⁾。そこで、筆者らは希少 ω 3-PUFAである ω 3-DPAに着目し、ラビリンチュラ類微生物を対象に ω 3-DPA生産菌の探索を行なった。その結果取得した*Aurantiochytrium* sp. T7株による ω 3-DPA生産に関する研究について紹介する。

2 新規 ω 3-DPA生産菌*Aurantiochytrium* sp. T7株の取得

日本全国の汽水域から採集した水・土壌・落葉等のサンプルに対して花粉釣菌法による単離を行い¹⁰⁾、ラビリンチュラ類をはじめとする ω 3-PUFA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 ω 3-DPAを総脂肪酸あたり約25%蓄積するT7株を見出した(Fig. 2)。Fig. 2に見られるように、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、 ω 3-DPAを生産する株は少なく、またその含有率も総脂肪酸の5%以下のものがほとんどであり、T7株のように ω 3-DPAを20%以上蓄積する株は稀であった。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(Fig. 3)。以下、培養条件がT7株の ω 3-DPA生産性に及ぼす影響について紹介する。

3 *Aurantiochytrium* sp. T7株による ω 3-DPA生産における培養条件の影響の評価

3・1 ω 3-DPA生産性に及ぼす種々の炭素源の影響

ω 3-DPA生産菌、*Aurantiochytrium* sp. T7株に対し、資化可能な炭素源についての検討を行った。炭素源の濃度を2%とし、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と、グリセロール、酢酸を用いた場合に高い ω 3-DPA生産性を示した。一方で、それら以外の二糖、

Fig. 3 *Aurantiochytrium* sp. T7 株 (培養3日目) の顕微鏡写真

アルコール類、有機酸などの資化は困難であり、蓄積脂肪酸量も低いことがわかった (Fig. 4)。

3・2 ω3-DPA 生産性に及ぼす種々の窒素源の影響

良好な生育を示したグルコースの濃度を2%, その他、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、種々の窒素源がω3-DPA 生産性に与える影響を評価した。結果、有機窒素源を用いた場合にのみ生育とDPA生産が観察され、特にYeast extractを用いた場合に高いω3-DPA蓄積が観察された。一方で、無機窒素源は資化することができなかった (Fig. 5)。

3・3 ω3-DPA 生産性に及ぼす炭素源と窒素源の濃度の影響

グルコース2%, Yeast extract 1%, 塩濃度1.8%の培地を基本とし、炭素源、窒素源の濃度がω3-DPA 生産性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%それぞれの濃度で28℃, 6日間培養し、培養2日目, 4日目, 6日目に培養液を回収して分析を行った。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、培養の経過にしたが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%それぞれの濃度で28℃, 7日間培養を行い、Yeast extract 1%でω3-DPA生産量が最大となることがわかった (Fig. 6)。

3・4 ω3-DPA 生産性に及ぼす塩濃度の影響

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。この結果から、海水の半分の塩濃度、1.8%が最適であることがわかった (Fig. 7)。

3・5 ω3-DPA 生産性に及ぼす培養温度の影響

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、培養温度がω3-DPA 生産性に与える影響を評価した。結果、培養2日目と5日目の比較では、生育、脂肪酸生産性、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PUFAの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 (Fig. 8)。

3・6 ω3-DPA 生産性に及ぼす培養初発pHの影響

グルコース2%, Yeast extract 1%, 塩濃度1.8%の培地において、培養温度28℃にて培養初発pHの検討を行った。培養初発pH 5.5以下の酸性条件下で、高いω3-DPA 生産性を示すことが明らかとなった (Fig. 9)。

Fig. 4 T7 株の脂質生産性に及ぼす炭素源の影響。炭素源濃度2%, 28℃, 培養期間7日

Fig. 5 T7 株の脂質生産性に及ぼす窒素源の影響。窒素源濃度 1%, 28℃, 培養期間 7 日

Fig. 6 T7 株の脂質生産性に及ぼす (A) 炭素源濃度, (B) 窒素源濃度の影響。

Fig. 7 T7 株の脂質生産性に及ぼす塩濃度の影響。28℃, 培養期間 7 日

3・7 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, 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 生産量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

Fig. 8 T7 株の脂質生産性に及ぼす培養温度の影響。

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 (Fig. 10)。

Fig. 9 T7 株の脂質生産性に及ぼす初発 pH の影響。28℃, 培養期間 7 日

Fig. 10 最適培養条件における T7 株の脂質生産量の経時変化。

Fig. 11 T7 株の脂質生産性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%)

3・8 培養時のグルコース添加が脂質生産性に及ぼす影響

前項より、T7株において ω 3-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 ω 3-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、 ω 3-DPA以外の脂肪酸の減少が抑えられる一方で、 ω 3-DPAの蓄積も同時に抑制されることが明らかとなった (Fig. 11)。

4 おわりに

本稿では、希少 ω 3-PUFAである ω 3-DPA生産に関する取り組みを紹介した。 ω 3-DPAは希少ゆえに解析研究が進んでおらず、その生理機能はほとんど明らかになっていないものの、ヒトの母乳に無視できない量の存在が報告されているなど、ヒトにおける生理活性が期待されるPUFAである⁵⁾。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 ω 3-DPA組成比の油脂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。これまでにも我々の研究室では ω 3-DPA以外のPUFAについても同様の取り組みを行い、アラキドン酸を蓄積する糸状菌 *Mortierella alpina* を見出し、粉ミルクの必須要素として商業的展開に成功した実績を有している。本菌に関しても、同様のスキームで食品素材や医薬品への利用など新たな産業利用への展開が期待できる¹¹⁾。

一方で、これまでに脂肪酸合成経路としてスタンダード経路 (不飽和化/鎖長延長化酵素系)、PKS経路 (ポ

リケチド合成系) が知られているが、本菌の ω 3-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、 ω 3-DPAの蓄積メカニズム解析から、多様な脂肪酸の特異的生産への新たな展開が期待される。

文 献

- 1) Fard, S. G.; Wang, F.; Sinclair, A. J.; Elliott, G.; Turchini, G. M. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 1684-1727 (2019).
- 2) Cole, G. M.; Frautschy, S. A. *J. Nutr.* **140**, 869-874 (2010).
- 3) 牧野悠治, 松木秀夫, 鈴木嘉樹, 特公平 07-005484 (1995). (Makino, Y. *et al.* Examined Patent Publication (Kokoku) H07-005484 (1995).)
- 4) Rebhun, F.; Miyazawa, T.; Fujimoto, K.; Kaneda, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 314-318 (1994).
- 5) 磯村晴彦, 落合富美江, 齊本美津子, 清水嘉子, 北村キヨミ. 母性衛生, **48**, 54-65 (2007). (Isomura, H. *et al.* *Japanese Journal of Maternal Health* **48**, 54-65 (2007).)
- 6) Koletzko, B.; Thielab, I.; Abiodunab, P. O. *J. Pediatr.* **120**, S62-S70 (1992).
- 7) Bowles, R. D.; Hunt, A. E.; Bremer, G. B.; Duchars, M. G.; Eaton, R. A. *J. Biotechnol.* **70**, 193-202. (1999).
- 8) Lewis, T. E.; Nichols, P. D.; McMeekin, T. A. *Mar. Biotechnol.* (NY) **1**, 580-587 (1999).
- 9) Mendes, A.; Reis, A.; Vasconcelos, R.; Guerra, P.; Lopes, D. S. T. *J. Appl. Phycol.* **21**, 199-214 (2009).
- 10) Bowles, R. D.; Hunt, A. E.; Bremer, G. B.; Duchars, M. G.; Eaton, R. A. *J. Biotechnol.* **70**, 193-202 (1999).
- 11) Kikukawa, H.; Sakuradani, E.; Ando, A.; Shimizu, S.; Ogawa, J. *J. Adv. Res.* **11**, 15-22 (2018).