

協会7号酵母で製造した清酒とかなり異なることがわかった。利き酒の結果では、この株で製造した清酒はマイルド、香りに深みがあるなどの評価を得た。⁸⁾

Y-1146株で製造した清酒の有機酸の量を協会7号酵母で製造した清酒と比較したところ、クエン酸は協会7号酵母の36% (50 ppm)、リンゴ酸は協会7号酵母の76% (195 ppm) と少なかった。一方、コハク酸の量は協会7号酵母で製造した清酒の3.5倍 (70 ppm)、乳酸の量は約1.5倍 (607 ppm) と多かった。利き酒では、この株で製造した清酒の香りはフルーティーとの評価を得た。⁹⁾ これらのことから、Y-1146株で製造した清酒は協会7号酵母で製造した清酒と異なるだけでなく、Y-1095株で製造した清酒とも異なることがわかった。

Y-1095株とY-1146株で製造した清酒は、海洋酵母で造ったことから汐音の商品名で1998年に発売された。

お わ り に

海水と海藻から合わせて13株の *S. cerevisiae* 分離し、それらの中から新しいパン酵母と清酒の製造に適した2株を見いだすことができた。したがって、海洋酵母 *S. cerevisiae* が多くの未知能力を持っているようにも思われ

る。海洋酵母でのワイン、焼酎やビールの製造などが考えられるが、それらのなかで酵母に耐塩性の要求される糖蜜からのアルコールの製造もおもしろい利用法のひとつと思われる。

われわれが利用できる酵母の生産物としては一次代謝産物のアルコールや有機酸だけではなく、二次代謝産物も考えられる。したがって、*S. cerevisiae* 以外の海洋由来の酵母の収集とそれら酵母の活用にも期待が持たれる。

文 献

- 1) 市川英治ら：酵母研究技法の新展開, p. 187, 学会出版センター (1991).
- 2) 山里一英：微生物の分離法, p. 126, R&D プランニング (1986).
- 3) 小玉健太郎ら：イースト技報, No. 60, 27 (1990).
- 4) Walt, J. P. van der and Yallow, D.: *The Yeasts, a Taxonomic Study*, p. 47, Elsevier (1984).
- 5) 小玉健太郎：マリンバイオテクノロジー研究会報, Vol. 7 No. 4, 25 (1985).
- 6) イースト工業会：パン用酵母試験法 (1975).
- 7) 小玉健太郎ら：特開平 6-52 (1994).
- 8) 小玉健太郎ら：特願平 9-226019 (1997).
- 9) 小玉健太郎ら：特願平 9-226021 (1997).

新たな微生物資源, ラビリンチュラ類による DHA の生産

中原 東郎*・横地 俊弘

1994年の夏、ヤップ島などのサンゴ礁海域の海水より単離した約400株の海生菌の1株に、DHA ともう1種の高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を含むと考えられる菌株 (SR21) が見いだされた。¹⁾ この菌株は約35%の (n-3) 系 DHA (22:6) の他に約8%の (n-6) 系 DPA (22:5) を含むものであった。その後 SR21 株は、その生活史に2本の長さの異なる鞭毛を持つ遊泳細胞 (遊走子) を有するラビリンチュラ類スラウストキトリウム科に属する *Schizochytrium* 属の新種と同定された (*Schizochytrium limusinum* Honda et Yokochi sp. nov.)²⁾ ラビリンチュラ類は熱帯から極域を含む多様な海域から見いだされており、海洋生物圏における腐食 (食物) 連鎖における役割とともに、その特異な脂肪酸代謝系から DHA など魚介類の必須脂肪酸の生産者としても注目されつつある。そこからシングルセルオイルと呼ばれる PUFA の微生物生産の有力な候補としても挙げられてきた。ここではラビリンチュラ類について紹介し、その代表としての SR21 株による PUFA 生産性について述べる。

1. ラビリンチュラ類

ラビリンチュラ類は最近の 18S rRNA 遺伝子解析により系統分類的にはカビ (菌界) ではなくクロミスタ界へテロコンタ門に組み入れられている。³⁾ ヘテロコンタ (Heterikonta) とは遊走子に2本の長さの異なる鞭毛のあること、すなわち不等毛類を意味している。前向きの長い方の鞭毛にはマスチゴネマといわれる中空のヘアが垂直方向についており、そのヘアの動きにより鞭毛の方向に進むことができる。ラビリンチュラ類は単一の門, 綱, 目から成り、さらにスラウストキトリウム科 (以下 Thra と記す) とラビリンチュラ科 (以下 Laby と記す) の2科から成り、前者は7属30数種から、後者はラビリンチュラ属1属8種から成るとされる。⁴⁾ Thra の栄養世代は球あるいは卵型であるが、Laby の栄養世代は紡錘型細胞であり、細胞外原形質のネットワーク上を滑走する。

1.1 スラウストキトリウム科 (Thra) 魚油には多くの場合、EPA (20:5), DHA が主要 PUFA として含ま

*著者紹介 (代表) 生命工学工業技術研究所微生物機能部 (主任研究官)

〒305-8566 つくば市東1-1 TEL. 0298-54-6162 FAX. 0298-54-6172 E-mail: nakahara@nibh.go.jp

れる他、より少ない DPA も含まれる。しかし魚油に含まれる PUFA の多くは (n-3) 系であり、SR21 株に見られる (n-6) DPA は生物圏においてまれにしか存在しない。それを根拠として、Ellenbogen ら⁵⁾が (n-6) DPA を Thra の指標物質として提案したのは 1969 年であった。その後、Findlay ら⁶⁾はマングローブの落葉の脂肪酸量を測定し、葉の分解過程の進行とともに、DHA とともに (n-6) DPA が見られ、増加することを見いだした。この結果は、マングローブの葉の分解に Thra の関与を示唆するものであった。^{7,8)}

SR21 株はヤップ島のマングローブ海域の海水からフィルター法により単離されたが、Thra は松花粉釣り餌法⁹⁾によりもっと選択的に検出される。この種の生物はマングローブやサンゴ礁海域で高い活性を示すだけでなく、世界中の広い海域に分布することが分かっている。松花粉 MPN 法により、海水中に 50~800 cfu/l (cfu: colony forming unit), 底質中に 1,000~18,500 cfu/l の Thra がいると見積もられている。¹⁰⁾ また海藻から表面積 10 mm² あたり 43 cfu の Thra が検出されたものの、その増殖は生細胞表面では阻害され、死滅した藻類では促進された。¹¹⁾ 一方サンゴ表面の粘性性デトリタス 1 g 中に 1.9×10^6 もの Thra が検出されている。¹²⁾ 他に海綿の中にも見いだされ、¹³⁾ 同時に死にかけた海綿で増えることも示された。¹⁴⁾ また珪藻類の寄生カビとしても検出され、¹⁵⁾ さらに貝殻などの石灰質の分解に関与するものも見いだされた。¹⁶⁾ 海域だけでなく塩分濃度 12% のグレートソルトレイクからも単離された。¹⁷⁾ これらの結果は、この生物が海の生態系において分解者、腐生者として重要な寄与をしていることを示唆するものであった。¹⁸⁾ 我々の調査によってもマングローブ海域の方が日本近海などより Thra の種類が多く、活性の高いものが得られた。¹⁹⁾

Thra がその生活史に遊走子を持ち、鞭毛により遊泳できることが、分解目標物へたどり着くために必須であるとも考えられる。松花粉による釣り餌法はこの特性を利用したものといえる。しかし実際にサンプリングを行う場合、どこから採水するかは以前から議論があったと見え、Sparrow は「スラウストキトリッドについて」²⁰⁾という講演において「これらの海生菌は湾内の中で、あまりきれい過ぎず、あまり汚れ過ぎない所に見られる」と述べた。サンプリングがうまく行くと松花粉に遊走子が集まるのが観察される (Fig. 1)。ここでは松花粉の周りに均等に集まっているが、松花粉の凹部の溝に、すなわち栄養を取り込みやすい所に集まりやすいことも示され

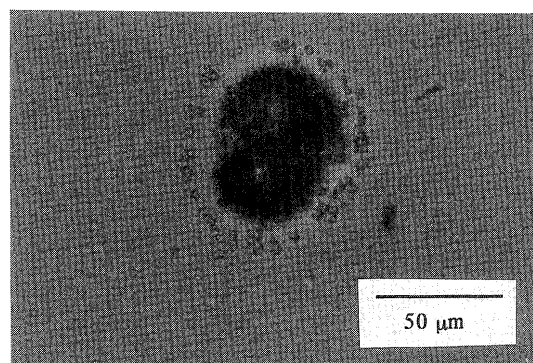


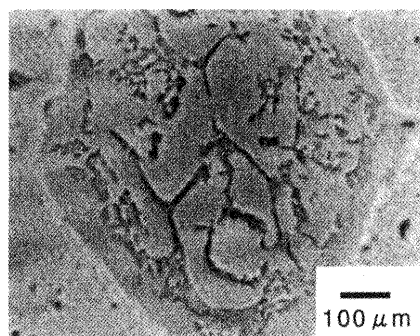
Fig. 1. Zoospore cells of Thraustochytrid gathering around pine pollen.

た。²¹⁾

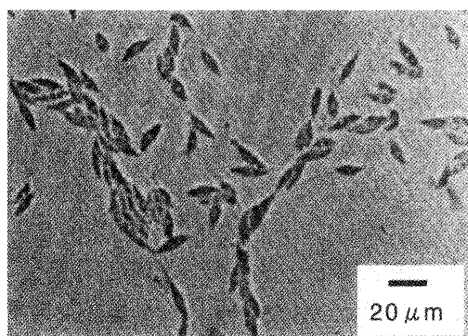
SR21 株の栄養細胞は球状であるが、なめくじ様のアメーバ型細胞にも成る。*Schizochytrium limacinum* の名も「なめくじ」に因っている。アメーバ型細胞はその後球状細胞に戻り、遊走子嚢へ分化する。Thra のアメーバ細胞には細菌捕食性のあることが報告されており、²²⁾ この生物の腐食連鎖以外にいわば生食連鎖の役割を示唆するものである。

1.2 ラビリントラ科 (Laby) Laby も、海藻・海草に寄生・腐生するが、その形状 (紡錘型)、細胞外ネットワークを滑走すること、細菌、酵母だけでなく Thra さえも捕食することに特徴がある。Laby も松花粉釣り餌法で単離された記録はあるが、有効な方法として SSA 培地 (serum sea water agar, 海水中 1% 馬血清, 1.2% 寒天) (さらに 250 mg/l のストレプトマイシンとペニシリンを添加) へ海草などを貼り付ける方法が提案されている。²³⁾ よく知られている Laby は、アマモ (*Zostera marina*) の枯渇病 (wasting disease) の病原菌として分離された *Labyrinthula zosterae* である。²⁴⁻²⁶⁾ この菌株は黒変したアマモの葉を SSA 培地に貼り付け、何度かの移植を経て単離された。しかしその保存には酵母 (*Rhodotorula rubra*) との二者培養 (monoxenic culture) を必要とする。ATCC から本菌の二者培養物を入手できるが、その保存管理は容易ではない。また珪藻類の分解者としての Laby も見いだされた。^{27,28)}

最近我々は、西表島の表層海水より分離した *Moraxella* 属細菌をあらかじめ生やした GPY 寒天培地 (90% 塩分濃度海水) に試料 (マングローブの葉など) を貼り付ける方法により Laby が効率よく分離されることを見いだした。²⁹⁾ 1 cm 角に切り取った葉を 2 回ほど無菌水で濯いだ後、GPY 寒天培地に貼り付け、常温で数日培養すると紡錘形細胞が数珠つながりあるいは塊状で滑走するの



Growth of Laby in the colony of *Moraxella*



Apparently purified Laby cells in liquid culture

Fig. 2. Labyrinthula cells isolated from mangrove leaves.

が顕微鏡で観察された。この二者培養物をさらに GPY 寒天培地に植え継ぐと、まず *Moraxella* 属細菌のコロニーが出現し、その中に Laby の細胞が見られた (Fig. 2 左)。Laby はその滑走運動により、細菌のコロニーを越えてシャーレの縁まで拡がるため単離が可能であった (Fig. 2 右) が、純粋株の継代培養は成功していない。その活性は *Moraxella* 属細菌との共存下で保持されると考えられた。西表島の浦内川などから採取したオヒルギの落ち葉の 5 割から Laby が検出されている。²⁹⁾ これらの Laby はアマモからは検出されず、抗生物質を加えた培地でも生きてこないことから *Labyrinthula zosterae* とは異なるものである。これらも DHA や EPA などの PUFA を含んでおり、適当な培養法が開発できればシングルセルオイルの有力な候補になる。

2. SR21 株による PUFA の生産

Thra の蓄積する PUFA およびその脂肪酸組成は、分

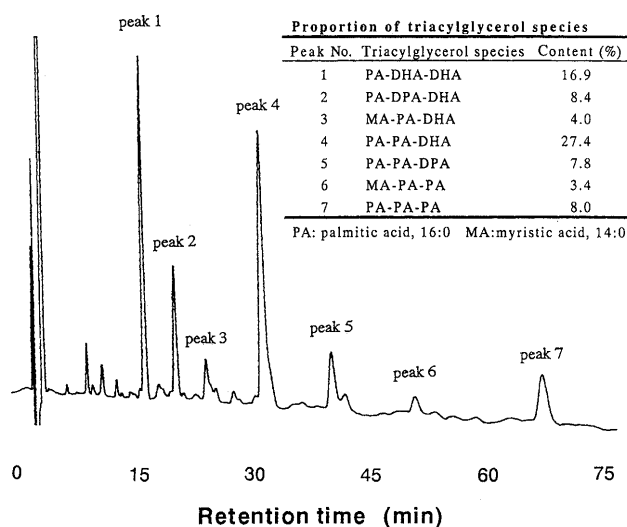


Fig. 3. HPLC analysis of triglycerol from SR21. Mobile phase: acetone/acetonitrile (3 : 2, v/v), RI detector.

離株によりさまざまであるが、DHA が主要成分であることは変わらない。³⁰⁾ Thra による DHA 生産に関する数例の報告³¹⁻³⁸⁾ は増殖性、DHA 生産性の多様性を示唆しており、炭素源要求性、塩分要求性なども菌株によって異なると考えられた。SR21 株の炭素源として、グルコース、フルクトース、グリセロール、オレイン酸が高い増殖を与えたが、オレイン酸では DHA への十分な変換が見られなかった。窒素源としては、酵母エキスとコーンステープリカーが適していたが、後者の方が脂質含有量が高かった。³⁹⁾ また SR21 株は広い塩分要求性を示した。すなわち、塩分濃度が海水比 50%~200% では高い増殖を示し、塩分濃度 0% でも 50% の場合の半分の増殖を示した。これに比べて Thra の代表的な菌株である *Thraustochytrium aureum* の塩分要求性は狭く、0% および 200% ではまったく増殖を示さなかった。³⁷⁾ そこでスケールアップと増殖向上のためのジャーによる培養実験はグルコースとコーンステープリカーを主成分とする海水比 50% の培地を用いた。さらにアンモニウム塩などの無機窒素も利用できることが分かり、ジャーにおける pH 制御を容易にするため、コーンステープリカーを減らして硫酸を加えた。グルコース初期濃度 60 g/l における培養の結果、56 時間でグルコースは完全に消費され、21.0 g/l の乾燥菌体量、4.7 g/l の DHA および 1.0 g/l の (n-6) DPA が得られた。¹⁾ これは DHA の生産性では 2.0 g/l・d に相当する。菌体内脂肪酸組成は比較的単純で、パルミチン酸、DHA, DPA で約 95% を占め、EPA やアラキドン酸などの他の PUFA 組成は 0.5% 以下であった。脂質含有量は乾燥菌体重の約 50%、脂質含有量の高い分だけトリアシルグリセリド (TG) 量が多く、脂質の約 95% が中性脂質、5% が極性脂質であった。*T. aureum* においては脂質含有量がせいぜい 20% であることと比べて、脂質生産性の観点からきわめて有利であった。また中性脂質の 98% が

TG であり、極性脂質の71%がホスファティジルコリン (PC), 11%がホスファティジルエタノールアミンであった。脂質の主要成分である TG 組成を Fig. 3 に示す。¹⁾ 比較的単純な脂肪酸組成から類推されるように TG 分子種も比較的単純な分布を示し、7 種のピークから成っていた。最大組成のピーク 4 は dipalmitoyl-DHA-TG で、次に大きいピーク 1 が monopalmitoyl-diDHA-TG であり、TG 分布中に DHA を含むものは全 TG 中の 56.7%, DPA を含むものは同じく 16.2% であった。また depalmitoyl-DHA-TG の結合位置を調べたところ、大部分が 1,3-dipalmitoyl-2-DHA-TG であることが分かった。また PC においても DHA は主として PC の 2 位に結合しており、PC の 70% は 1-palmitoyl-2-DHA-PC であった。⁴⁰⁾

SR21 株はさらに 100 g/l 以上のグルコース濃度でも増殖阻止を受けず、グルコースの高濃度培養の結果、より高い DHA 生産性が得られている。これも、*T. aureum* においては 20 g/l のグルコースで増殖阻害が見られることと比べて対照的である。また好気性微生物においては酸素供給速度の大きい、pH 制御の可能なジャーによる培養の方がフラスコ培養より有利であるが、DHA 組成の高い *Thra* では通例とは逆にフラスコ培養の方がより高い増殖性が得られている。SR21 株においてジャーにおいても高い増殖性を得られたのは、他の *Thra* より攪拌など機械的せん断応力に強いと考えられる。⁴⁰⁾ このように SR21 株は、その増殖性、脂質蓄積性、脂肪酸組成から DHA, DPA 生産微生物としてすぐれた特性を備えている。

以上のようにラビリンチュラ類は、脂質代謝の面からだけでなく、生態学的、形態学的 (生活史)、分子遺伝学的にも、さらに応用微生物学的にもきわめて興味深い生物である。

文 献

- 1) Nakahara, T. *et al.*: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 1421 (1996).
- 2) Honda, D. *et al.*: *Mycol. Res.*, **102**, 439 (1998).
- 3) Cavalier-Smith, T. *et al.*: *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **346**, 387 (1994).
- 4) Porter, D.: *Handbook of Protozoists*, p. 388, Jones and Bartlett Publishers, Boston (1989).
- 5) Ellennbogen, B. B. *et al.*: *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**, 805 (1969).
- 6) Findlay, R. H. *et al.*: *The Biology of Marine Fungi* (Moss, S. T.), Cambridge Univ. Press (1986).
- 7) Raghukumar, S. *et al.*: *J. Experi. Marine Biol. Ecol.*, **183**, 113 (1994).

- 8) Bremer, G. B.: *Hydrobiologia*, **295**, 89 (1995).
- 9) Gaertner, A.: *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, **11**, 65 (1968).
- 10) Fuller, M. S.: *Mycologia*, **69**, 1 (1977).
- 11) Raghukumar, C. *et al.*: *Mycol. Res.*, **96**, 542 (1992).
- 12) Raghukumar, S. and Balasubramanian, R.: *Ind. J. Marine Sci.*, **20**, 176 (1991).
- 13) Hohnk, W. and Ulken, A.: *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, **17**, 199 (1979).
- 14) Richer, W.: *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, **20**, 141 (1985).
- 15) Gaertner, A.: *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, **18**, 29 (1979).
- 16) Porter, D. and Lingle, W. L.: *Mycologia*, **84**, 289 (1992).
- 17) Amon, J. P.: *Mycologia*, **70**, 1299 (1978).
- 18) Miller, J. D. and Jones, E. B. G.: *Bot. Mar.*, **26**, 345 (1983).
- 19) Yokochi, T. *et al.*: *Abstracts of 4th Int. Marin Biotech. Con.*, p. 263 (1997).
- 20) Sparrow, V. F. K., Jr.: *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, **3**, 7 (1968).
- 21) Clokie, J. J. P.: *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, **5**, 159 (1974).
- 22) Raghukumar, S.: *Mar. Biol.*, **113**, 165 (1992).
- 23) Watson, S. W. and Ordal, E. J.: *J. Bacteriol.*, **73**, 589 (1957).
- 24) Renn, C. E.: *Nature*, **135**, 544 (1935).
- 25) Muehlstein, L. K. *et al.*: *Mycologia*, **83**, 180 (1991).
- 26) Short, F. T. *et al.*: *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 73 (1993).
- 27) Grell, K. G.: *Arch. Protistenkd.*, **144**, 343 (1994).
- 28) Sakata, T. and Iwamoto, K.: *Fisheries Science*, **61**, 173 (1995).
- 29) 中原東郎ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 101 (1998).
- 30) Nakahara, T. *et al.*: *Abstracts 2nd Asia-Pacific Mar. Biotech. Conference*, p. 29 (1997).
- 31) 湯不二夫ら, 公開特許, 平 1-199588.
- 32) Bajpai, P. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 706 (1991).
- 33) Bajpai, P. K. *et al.*: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 509 (1991).
- 34) Kendrick, A. and Ratledge, C.: *Lipids*, **27**, 15 (1992).
- 35) Barelay, W. R.: US Patent 5,130,242 (1992)/US Patent 5,340,742 (1994).
- 36) Li, Z. Y. and Ward, O. P.: *J. Indust. Microb.*, **13**, 238 (1994).
- 37) Iida, I. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 76 (1996).
- 38) Singh, A. *et al.*: *World J. Microb. Biotech.*, **12**, 76 (1996).
- 39) Yokochi, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotech.*, **49**, 72 (1998).
- 40) Yaguchi, T. *et al.*: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 1431 (1997).