

油糧微生物ラビリンチュラ

林 雅弘

ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などのオメガ3脂肪酸は循環器系や脳神経系に対する機能が数多く明らかにされ、我々の健康に大きく影響する脂肪酸である。海洋性の微生物や微細藻類の中には、高度に脂質を蓄積するものや、オメガ3脂肪酸を生産するものもいくつか知られており、機能性脂質生産やバイオ燃料生産への応用が検討されている。しかし、筆者の研究材料であるラビリンチュラ類は、一般的な海洋微生物や微細藻類より増殖性や脂質蓄積性が高いことから、さまざまな分野での産業利用が検討されている。

ラビリンチュラ類は従属栄養性の海洋性真核微生物で、科のレベルで2つの分類群が認識されており、ラビリンチュラ科に属するラビリンチュリッド (Labyrinthulids) と、ヤブレッツボカビ科に属するスラウストキトリッド (Thraustochytrids) に大別される。このうち、スラウストキトリッドの方が増殖性や脂質蓄積性の点から産業利用には適していると考えられる。スラウストキトリッドには、これまで応用面での検討例が多いオーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*)、シゾキトリウム (*Schizochytrium*) などの11属が含まれることが最近の分子系統解析^{1,2)}によって示されており、いずれの属のスラウストキトリッドもDHAやEPA、ドコサペンタエン酸 (DPA)、アラキドン酸 (ARA) などの多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を細胞内に蓄積する。そのため、ラビリンチュラ類の産業利用についてはオメガ3脂肪酸の生産を目指した研究が以前から活発に行われてきた。しかし最近ではその高い脂質蓄積性に注目してバイオ燃料生産を目指した研究にも用いられている。

新奇株の探索

ラビリンチュラは世界中の海域に幅広く生息が確認されており、その現存量は沿岸海域で 10^3 cells/L程度のオーダーであるとされている。中でも亜熱帯から熱帯にわたるマングローブ域にはラビリンチュラが豊富に分布することが知られており、これまで数多くの株が分離されている。

ラビリンチュラの分離には、これまでさまざまな方法が試みられてきたが、松花粉釣餌法がよく用いられる。

ラビリンチュラの遊走細胞はペクチンなどの多糖類に対する走化性を持つことが知られており、この性質を利用して水面に浮かべた松花粉の周囲にラビリンチュラの遊走細胞を選択的に濃縮することができる。筆者は天然海から採取した沿岸海水や、マングローブの落葉などの分離源を含む海水に少量の松花粉を撚いて、数日～1週間放置した後に松花粉とその周辺の海水を、抗生物質を添加した寒天培地に塗布することでラビリンチュラのコロニーを得ている³⁾。分離の目的により分離源はさまざま、海水、砂、サンゴ片、流木、落葉などの分離源を、沿岸から採集することもあれば、調査船から採水器を使って採水することもある。また、目的によっては水深数m～50mの海底で潜水作業により採集することもある。そのため筆者の研究室では、スタッフと大半の学生は潜水士免許を取得し、潜水業務に必要なスキューバ潜水のスキルを身につけている。分離に使用する寒天培地も目的によりさまざまな培地を用いるが、dGPY培地 (50%濃度の人工海水に0.2%グルコース、0.1%ポリペプトン、0.05%酵母エキスを溶解し、1.5%寒天で固化したもの) やdGY培地 (50%濃度の人工海水に0.3%グルコース、0.1%酵母エキスを溶解し、1.5%寒天で固化したもの) などが一般的である。あるいは乳酸菌用に市販されているライヒマニ培地を50%濃度人工海水で通常の5～10倍に希釈した培地も幅広いラビリンチュラを分離することができる。

培養特性・脂質特性

筆者の研究室ではこれまでにさまざまなラビリンチュ

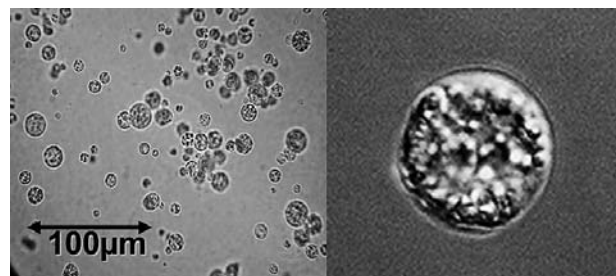
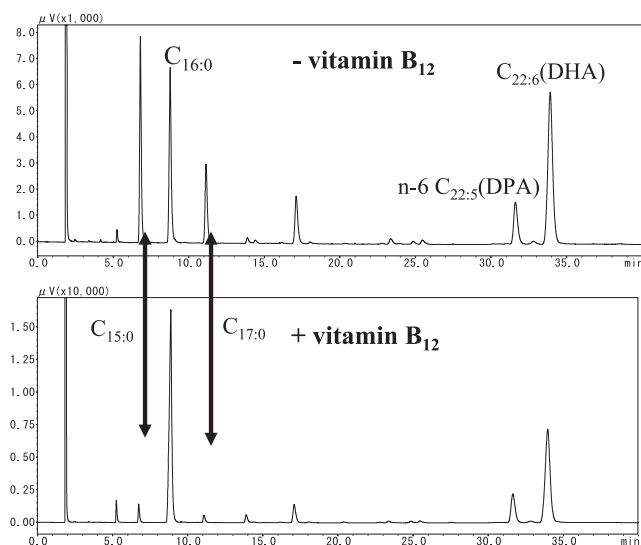


図1. *Aurantiochytrium limacinum* mh0186

図2. *A. limacinum* mh0186株の脂肪酸組成

ラを天然海から分離し、現在およそ2500株の菌株ライブラリーを保有しているが、代表的な分離株の培養特性・脂質特性を紹介する。

沖縄県波照間島の沿岸海水から分離した *Aurantiochytrium limacinum* mh0186株 (図1) は高い増殖性と著量のDHAを細胞内に蓄積することを特徴とする分離株である⁴⁾。二分裂で増殖するとともに遊走子嚢からの遊走細胞の放出や、アメーバ状の細胞の出現も確認され、形態的特徴と18S rRNA遺伝子の塩基配列から、*A. limacinum*と同定されている。グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、スクロースなど広い糖資化性を示すが、グリセロール、デンプンは資化しない。また、15%グルコースのような高い糖濃度でも増殖が可能で、グルコースの流加培養で100 g/L以上の高いバイオマス収量を得ることができる。さらに、培養温度については15～35℃の広い温度帯で良好な増殖を示し、増殖速度は落ちるものの、10℃でも増殖が認められる⁵⁾。

A. limacinum mh0186株の総脂肪酸のガスクロマトグラム (図2) をみると、培養条件にかかわらず細胞の主要な脂肪酸はパルミチン酸、n-6 DPA、DHAであり、EPAやARA、モノエン酸～トリエン酸はほとんど含まれない。培養温度が低いほど総脂肪酸中のDHAの割合が高くなる傾向にあり、10℃で培養した細胞では、総脂肪酸中に占めるDHAの割合は70%近くに達する。培養条件によってはC15:0やC17:0といった奇数鎖飽和脂肪酸が総脂肪酸中に数%～10%含有されるが、機能性脂質生産にはこれら奇数差脂肪酸は含有されない方が好ましく、これらは培地中にビタミンB₁₂を添加することで消失する⁶⁾。これはビタミンB₁₂無添加の場合、

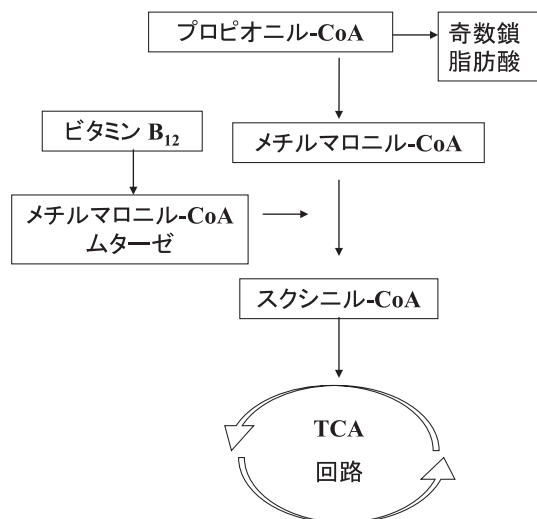


図3. 奇数鎖脂肪酸生成に及ぼすビタミンB12の影響

ビタミンB₁₂を補酵素とするメチルマロニルCoAムターゼがタンパクレベルでは細胞内に存在するが機能せず、プロピオニルCoAがTCAサイクルに流れずに脂肪酸合成のプライマーとして利用されることによる。ビタミンB₁₂を培地に添加することで、メチルマロニルCoAムターゼが補酵素であるビタミンB₁₂を利用可能になり、ホロ酵素として機能することによってプロピオニルCoAがTCAサイクルで消費されることにより奇数鎖脂肪酸が消失する (図2, 3)⁷⁾。

A. limacinum mh0186株の細胞脂質は大部分が中性脂質、特にトリグリセリド (TG) であり、培養条件などによって脂質含量が変動する場合はTG量の変動する。そのほか、少量の糖脂質とステロールやスクアレン、細胞重量の数%のグリセロリン脂質を含有し、主要なリン脂質クラスはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールなどである。

形質転換系の開発

発酵生産による「ものづくり」には、遺伝子改変による菌株の分子育種が不可欠な技術であるが、ラビリンチュラの遺伝子操作についてはこれまで断片的な報告が散見されるのみで形質転換系が確立しているとは言い難かった。筆者らの共同研究グループはラビリンチュラの分子育種を目指して、ここ数年形質転換系の開発を行ってきた。

ラビリンチュラの形質転換系では、多くのラビリンチュラが感受性を示すG418、ハイグロマイシン、プラスティシジン、ゼオシンに対する耐性遺伝子がマーカー遺伝子として使用可能である。たとえば *Thrausotochytrium*

aureum ATCC34304から単離したユビキチンプロモーターターミネーター，あるいはEF-1 α プロモーターターミネーターにネオマイシン耐性遺伝子を接続したDNA断片を，*Aurantiochytrium*属，*Thraustochytrium*属のラビリンチュラにエレクトロポレーション法やパーティクルガン法で導入すると，導入されたDNA断片はランダムインテグレーションによって染色体DNAに組み込まれる．得られた形質転換体はG418耐性を示すとともに，Neo^r遺伝子に対応したmRNAが転写されているのを確認した．また，*Parietichytrium*属，*Schizochytrium*属のラビリンチュラについても同様の手法で形質転換が可能である．また，18S rRNA遺伝子に対するターゲティングベクターを導入したラビリンチュラでは相同組換えによる外来遺伝子の染色体DNAへの組み込みも確認できている⁸⁾．

現在，我々の共同研究グループではこの形質転換系を駆使して脂肪酸生成系遺伝子の過剰発現やノックアウトを行い，スラウストキトリッドの脂肪酸生成経路の解明を進めている⁹⁻¹²⁾．

新たな脂質供給源として

ラビリンチュラは著量のDHAを細胞内に蓄積することから，DHAをはじめとする高度不飽和脂肪酸の生産者として注目されてきた．しかしながら，最近では高度不飽和脂肪酸以外の脂質素材の生産についても検討されはじめ，その高い脂質蓄積性を生かしてさまざまな脂質素材の生産に利用することが検討されている．

ラビリンチュラは少量のカロテノイドをもっており，属によって β -カロテンのみをもつグループ(*Schizochytrium*など)， β -カロテン，カンタキサンチンをもつグループ(*Oblongichytrium*など)， β -カロテン，カンタキサンチン，アスタキサンチンを持つグループ(*Aurantiochytrium*など)が知られており分類指標としても利用されてきた．しかしほとんどのラビリンチュラではカロテノイド含有量はわずかで，培養条件によってコロニーや培養液が若干黄色～ピンク色を呈する程度である．しかし我々が鹿児島県薩南諸島中之島近海から分離した*Thraustochytrium* sp. NE-03株は寒天培地上で赤色のコロニーを形成し，ジャーファーメンターで培養してもその培養液は濃い赤色を示す．細胞の主要なカロテノイドはアスタキサンチンで，若干のカンタキサンチン， β -カロテンをも含有する．現在，培養条件の最適化による生産量の改善を図るとともに，アスタキサンチン合成系の酵素遺伝子をクローニングして，過剰発現系による生産能の増強を進めている．

ラビリンチュラがもつステロール類やその前駆体であるスクアレンについても報告があり，特に最近はスクア

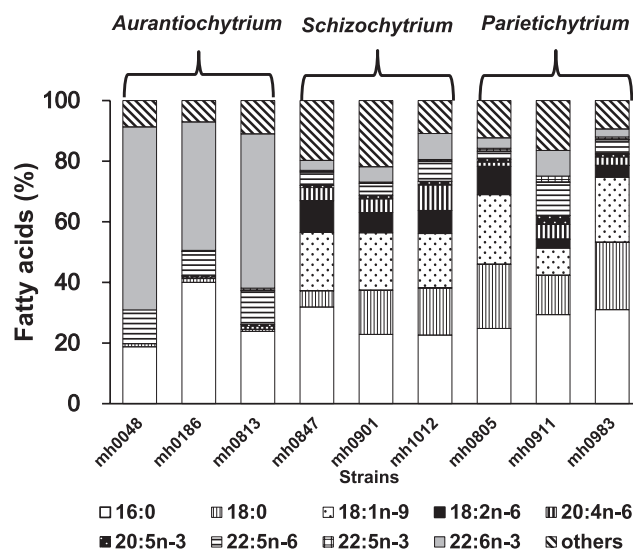


図4. *Aurantiochytrium*属，*Schizochytrium*属，*Parietichytrium*属の脂肪酸組成

レンをバイオ燃料として利用する検討が進められている¹³⁾．ラビリンチュラの分離株の中には，多くの株が細胞内にスクアレンを蓄積しているがその蓄積量は脂肪酸（あるいはトリグリセリド）と比較して少なく，蓄積に比較的時間がかかる株が多いため，ラビリンチュラの高い脂質蓄積性を生かして脂質素材を生産するには，やはり脂肪酸をターゲットとするのが効率が良いように思われる．

ラビリンチュラによるバイオ燃料生産を考えると，その蓄積性から脂肪酸メチルエステルを成分とするバイオディーゼル燃料（BDF）生産が有望であろう．しかし従来注目されてきたDHAのような高度不飽和脂肪酸はBDFに不適な脂肪酸であるため，オメガ3脂肪酸生産とは異なる株を分離する必要がある．南西諸島を中心に分離したスラウストキトリッドの脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで分析して，18S rRNA遺伝子の塩基配列から属レベルの分類を行った結果と合わせてみると，属により脂肪酸組成がずいぶん異なることがわかる（図4）．従来注目されてきたように*Aurantiochytrium*属の株はDHAやn-6 DPA，ARAに富んでおり高度不飽和脂肪酸の生産には適しているが，BDF生産には適していない．しかし*Schizochytrium*属，*Parietichytrium*属の株はパルミチン酸やステアリン酸，オレイン酸などが主要な脂肪酸であり，DHAをはじめとする高度不飽和脂肪酸は少量しか含まれないためBDF生産に適した脂肪酸組成であるといえる．このような比較的飽和度の低い脂肪酸組成を持つ分離株の中から，増殖性・脂質蓄積性に優れた株を選抜してグルコースを炭素源として流加培養を行ったところ，100 g/Lを超えるバイオマス収

量を得ることができ、脂肪酸の生産性も45 g/Lを超えることができた。今後、培養条件の最適化とより安価な炭素源の利用を検討して現実的なBDF生産の実現に取り組んでいきたい。

脂肪酸組成にかかわらず、ラビリンチュラの細胞内に蓄積する脂質の大部分はトリグリセリドである。ラビリンチュラの中でも脂質蓄積性の高い*A. limacinum* mh0186株のドラフトゲノム情報を利用して、トリグリセリド合成の最終ステップの酵素であるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼの遺伝子をクローニングして、別の*Aurantiochytrium*属ラビリンチュラ内で過剰発現させることによって脂質含量の向上が確認されている。ラビリンチュラの分離株のうち脂質蓄積性の高い株では乾燥細胞重量の60%以上の脂質含量を示す株がいるが、これらの株の分子育種によってさらに高い脂質蓄積性を示す株が得られる可能性があり、オメガ3脂肪酸素材の生産においても、BDF生産においても、さらなる生産性の向上が期待される。

さらに従属栄養的なバイオ燃料生産では、安価でカーボンニュートラルな炭素源の利用が必須になるため、植物性バイオマスの利用を検討した。コーンファイバーなどの植物性バイオマス分解物を炭素源として利用する際には、グルコースのみならずキシロースやアラビノースといったペントースの利用も重要になる。そのため、ペントースの資化能を有するラビリンチュラを探索し、キシロースやアラビノースといったペントースを資化できる株を分離した^{14,15)}。また、BDF廃液の利用を念頭に、高濃度のグリセリンを利用できる株を探索し、20%以上のグリセリンを含む培地で増殖可能な株も分離することができた¹⁶⁾。このように多様なラビリンチュラ類を天然海から分離することができるため、目的に応じた株を入手することで今後さらに産業利用の幅が広がることが期待される。

EPAやDHAなどのオメガ3脂肪酸の生理機能が注目されて以来、EPAは医薬・食品素材に、DHAは食品素材として利用されてきたが、現在のところその供給源は魚類に頼っている。海外のメーカーにおいては発酵生産したオメガ3脂肪酸を供給しているところがあるが、コスト的には魚由来の方がはるかにメリットがあるようだ。しかし、将来的に水産資源が減少・枯渇する可能性もあるし、各国の水産資源管理の状況によっては世界中からいつでも水産資源を調達できる時代がいつまで続かわからない。そういった水産資源を取り巻く状況を考えると、魚類からの抽出・精製にかわる生産技術の開発を進める意義は大きいと考えられる。またオメガ3脂肪酸を発酵生産するメリットとしては、持続的生産が可能

な点以外にも、複雑な脂肪酸組成を持つ魚油に比べて比較的シンプルな組成の脂肪酸を提供して精製コストを抑えることができる可能性もあげられる。

さらにラビリンチュラからのアウトプットとしてはオメガ3脂肪酸のみならず、さまざまな脂質の新たな供給源としても期待が膨らむ上、炭素源の資化性のようなインプットについても幅広い多様性が明らかになってきており、ラビリンチュラが産業的に活躍できるシーンが増えていくことが期待される。その反面、多様性ゆえの研究の難しさもある。ラビリンチュラはその生活史の中に栄養細胞、遊走細胞、アメーバ状細胞など複数の形態を示し、株によりその生活史が異なっている。核相がnの時期が特定されていないので、突然変異株の取得や遺伝子破壊についてはすべての株で自由に行える訳ではない。代謝系についても株により多様性が認められ、分子育種のハードルを上げている。いずれにせよ、これらの点もラビリンチュラという生物の理解が進むにつれ、この10年で大きく進歩してきたし、今後さらに理解が進むものと考ええる。ラビリンチュラのそのような特性や産業利用上のメリットを考えると今後、分子育種による脂質生産性の向上や、さらに高密度での効率的培養をめざして、この生物の持つポテンシャルに大きな期待を寄せていきたい。

文 献

- 1) Yokoyama, R. and Honda, D.: *Mycoscience*, **48**, 199 (2007).
- 2) Yokoyama, R. and Honda, D.: *Mycoscience*, **48**, 329 (2007).
- 3) Taoka, Y. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 562 (2008).
- 4) Nagano, N. et al.: *J. Oleo Sci.*, **58**, 623 (2009).
- 5) Taoka, Y. et al.: *Mar. Biotechnol.*, **11**, 368 (2009).
- 6) Hayashi, M. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 222 (2007).
- 7) Miyamoto, E. et al.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **53**, 471 (2007).
- 8) Sakaguchi, K. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 3193 (2012).
- 9) Matsuda, T. et al.: *J. Lipid Res.*, **53**, 1210 (2012).
- 10) Kobayashi, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 3870 (2011).
- 11) Matsuda, T. et al.: *J. Biochem.*, **150**, 375 (2011).
- 12) Nagano, N. et al.: *J. Oleo Sci.*, **60**, 475 (2011).
- 13) Kaya, K. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2246 (2011).
- 14) 松田綾子ら：第16回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, p. 77, (2014).
- 15) 林 雅弘ら：第16回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, p. 81, (2014).
- 16) 藤本綾乃ら：第16回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集, p. 80, (2014).