

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07723

研究課題名(和文) 海洋生物の腸管に共生する海洋性微生物を利用した希少脂質生産法の開発

研究課題名(英文) Development of rare lipid production methods using marine microorganisms symbiotic with the intestinal tracts of marine organisms

研究代表者

櫻谷 英治 (SAKURADANI, Eiji)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：10362427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：海洋生物はオメガ3脂肪酸やスクワレンといった生理学的に有用な脂質を含むものが多い。また、一部の海洋性微生物にもそれら脂質を生産することが報告されている。そこで、本研究では、海洋生物に共生する有用脂質生産性微生物の探索を試みた。その結果、スクアレン、ジピコリン酸、長鎖アルコール、または、アルキルグリセロールを蓄積する微生物の単離に成功した。これらの希少脂質を生産する微生物が海洋生物と共生する意義を今後明らかにする必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

保湿機能を持つ脂質は化粧品や化成品用途に、魚油に由来する脂肪酸は健康食品に利用されている。具体的には、深海サメの肝臓から抽出したスクアレンやイワシ油に含まれるオメガ3脂肪酸が挙げられる。海洋生物の希少脂質生産は単に食餌や環境だけに依存するのではなく、腸管に共生する微生物にも影響を受けていると考えた。そこで、希少脂質を生産する共生微生物の解析を試みた。これら微生物を利用した希少脂質生産は社会的意義が大きく、また、新たな脂質生合成経路発見は学術的意義が大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：Many marine organisms contain physiologically useful lipids such as omega-3 fatty acids and squalene. It has also been reported that some marine microorganisms also produce these lipids. Therefore, in this study, we tried to search for useful lipid-producing microorganisms symbiotic with the intestinal tracts of marine organisms. As a result, we succeeded in isolating microorganisms that accumulate squalene, dipicolinic acid, long-chain alcohols, or alkyl glycerol. It is necessary to clarify the significance of the microorganisms that produce these rare lipids in symbiosis with marine organisms.

研究分野：応用微生物学

キーワード：共生微生物 脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

保湿機能を持つ脂質であるスクワレンはサメ肝油やオリーブ油由来のものが化粧品に利用され、ファルネセンは海外企業において組換え酵母を利用した生産が検討されている。代表者らはこれまでに油糧微生物 *Mortierella alpina* (カビ) の分子育種により様々な高度不飽和脂肪酸の生産に成功した (Sakuradani et al., J. Biosci. Bioeng., 2013, 116(4): 417-422)。また、*Mortierella* 属糸状菌からステロール生産性の高い菌株を見出し、分子育種によりスクワレン蓄積菌へと改良することにも成功した (島田ら、日本農芸化学会 2012 年大会)。一方、筑波大学の研究グループは、スクワレン生産性海洋性微細藻類を報告した (Nakazawa et al., Biores. Technol., 2012, 109: 287-291)。今後スクワレンの安定供給を目指してバイオテクノロジーを駆使した生産が期待されていた。

本研究では、海洋性微細藻類や珪藻類のスクリーニングだけでなく、スクワレンを多く含む深海ザメや海洋生物の共生微生物に焦点をあて、腸管からのこれら微生物の単離と脂質組成分析を行うことで、新たなスクワレン合成経路の発見やスクワレン合成酵素遺伝子の単離を目指した。さらに、新たに見出す微生物の最適培養条件下でスクワレンの高生産を目指した。

ファルネセンは近年化粧品や化成品へと多目的に利用される有用脂質である。Amyris 社により組換え酵母を利用した研究が報告されている (Chandran et al., 2011, Process Biochem., 46: 1703-1710)。ファルネセンはスクワレン生合成の中間体であるファルネシルジリン酸からファルネセン合成酵素により生合成される。スクワレン生産菌のスクリーニングにおいて同時にファルネセンも検出できることから並行して生産菌を探索する計画である。組換えでない野生種によるファルネセン生産や、代表者ら独自の技術として、新たな遺伝子資源を利用した油糧微生物の分子育種によりファルネセン生産を検討する。

2. 研究の目的

保湿機能を持つ脂質は化粧品や化成品用途に利用されている。本研究において、需要が拡大し今後供給不足が懸念されるスクワレンの発酵生産系確立と新たなファルネセン生産プロセスの開発を目指す。深海ザメや海洋生物にはユニークな中性脂質が多く含まれ、共生微生物による脂質改善が行われていると予想される。また、海洋生物特有の脂質を共生微生物が蓄積することも考えられたため、希少脂質生産菌の探索も行う。これら共生微生物群とそれぞれの海洋生物油脂との比較から生物種ごとに变化する脂質組成との相関を調べるとともに、新たな脂質生合成経路の解明とそれら関連酵素遺伝子を活用した油糧微生物での発酵生産へと連動する。

3. 研究の方法

(1) 海洋生物に共生する微生物のスクリーニング：スクワレンの原料となる肝油はアイザメといわれる深海 1,000 m 程度に生息する小型のサメから抽出されたものが利用されている。また、深海魚のなかにもアブラソコムツやバラムツなどは体内の脂質含量が高いとされる。これら深海ザメ、深海魚、あるいは近海の海洋生物から共生微生物を単離する。また、徳島県沿岸に生息するさまざまな海水魚の腸管から共生微生物を単離した。腸管サンプルを好気、微好気、嫌気条件でそれぞれ培養し、微生物の単離を試みる。単離した菌株はそれぞれ適した条件で培養し、脂質の定性定量分析をガスクロマトグラフで行った。

(2) 自然界より単離した脂質生産微生物の培養条件検討と生産性評価：通気量、pH、培地組成の検討などにより、生育密度が高く、単位時間当たりの脂質生産性が最も高くなる培養条件を見出す。また培養スケールもスケールアップできるように検討する。深海ザメや深海魚から単離した菌株の場合、酸素要求性に依存して培養条件が大きく異なると予想された。pH や培地組成だけでなく、培養環境の気相条件も検討した。対象となる脂質の生産性に関しては高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーを用いて定性・定量的に解析した。

(3) 希少脂質の構造決定：希少脂質の構造決定に関しては、主にガスクロマトグラフィーとガスクロマトグラフィー質量分析を用いて行った。それらで構造が決めかねた場合は、粗脂質画分を高速液体クロマトグラフィーで分取精製し、NMR に供した。

4. 研究成果

(1) 魚をはじめとした様々な海洋生物の臓器および生息海域の海水を単離源として、好気性菌 928 株、嫌気性菌 429 株を単離した。また、海水からは好気性菌 58 株を単離した。単離菌株については好気 (振盪培養) あるいは嫌気 (静置培養) 条件で 3 日間培養後、メチルエステル化およびけん化脂質をガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) により解析した。その結果、ジピコリン酸やスクアレン、長鎖アルコール、または、アルキルグリセロールを有する脂質を蓄積する微生物を新たに見いだした。

(2) スクワレンを蓄積するバクテリアのスクアレン蓄積量は 3 mg/l 程度であった。anteiso の奇数鎖脂肪酸を蓄積したことからバクテリアであることが推測された。総脂肪酸に占める anteiso 奇数鎖脂肪酸の割合は 65% に達した。本菌はグルコースだけでなく、スクロースやトレ

ハロースでも良好に生育することが分かった(図1)。バクテリアのスクアレン生合成については不明な点も多く、生合成経路の解明と蓄積されるスクアレンの機能性について今後研究する必要がある。また、スクワレン蓄積株のスクワレン生産性は低いものの、その生合成系に関わる酵素遺伝子群を油糧微生物の分子育種に今後応用することで当初目的の脂質生産プロセスの開発に貢献することが期待される。

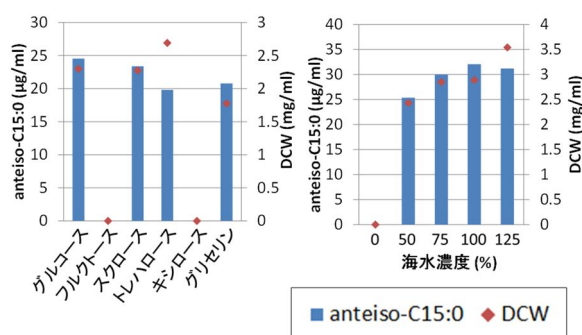


図1. スクアレン生産株のanteiso脂肪酸生産量 (DCW, 生育度)

(3) アルキルグリセロール骨格を有する脂質を蓄積する微生物に関しては、まず、培養条件の検討を行った。炭素源の違いによるアルキルグリセロールの蓄積量を調べたところ、トレハロースと炭素源とした場合、蓄積量が最大となり、特に炭素鎖長16のアルキルグリセロールの蓄積量が44 μg/mlとなった(図2)。次に、アルキルグリセロールの構造解析を行った。分取精製後、GC-MSやNMR分析に供し、アルキルグリセロールのsn-1位に分岐鎖のC16あるいはC17の炭素鎖を有することが示唆された。希少脂質の生合成の解明が今後期待される。アルキルグリセロール骨格を有する脂質を蓄積する微生物の報告は限られている。サメの肝油にはアルキルグリセロール骨格を有する脂質のひとつであるバチルアルコールが含まれていることから共生菌に由来する脂質が肝油に蓄積していることも考えられた。

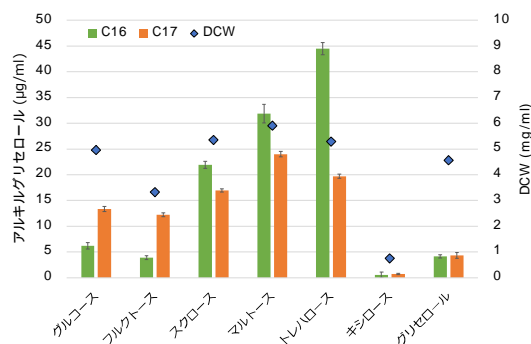


図2. アルキルグリセロール蓄積に及ぼす炭素源の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阪本鷹行、太田里咲、楠 美波、高野仁美、櫻谷英治
2. 発表標題 スクアレン生産性酵母の探索と培養条件の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 櫻谷英治
2. 発表標題 さまざまな生物資源から単離された微生物の活用
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻谷英治
2. 発表標題 真核微生物がつくる多様な機能性脂質
3. 学会等名 第13回 日本ゲノム微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂口悠香、中川香澄、高野仁美、服部結衣、阪本鷹行、櫻谷英治
2. 発表標題 海洋生物共生菌によるアルキルグリセロール生産
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国支部 2019年度合同大会（第55回講演会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	阪本 鷹行 (SAKAMOTO Takai ku) (90740332)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・助教 (16101)	