

塩濃度条件の変化に対するオーランチオキトリウム淡水順化株の脂質合成量の解析

谷 徳美 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鈴木 石根 (筑波大学 生命環境系)

研究背景

近年、藻類や微生物を用いて有用物質の生産を目指す研究が盛んである。海水性のラビリンチュラの一つ、*Aurantiochytrium* はトリアシルグリセロールを多量に蓄積し、特に必須脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) が豊富に含まれるため工業的な DHA 生産への利用が期待されている。また特に 18W-13a 株は、高付加価値炭化水素のスクアレンも多く蓄積することが知られている。我々の研究室では、もともと海水性で生育に塩分が必須な 18W-13a 株を低塩濃度条件に順化させることに成功した。この株は、低塩濃度条件で培養すると全脂質は元株以上に蓄積したが、スクアレンはほぼ蓄積しなかった。そこでこの原因を探るため、淡水順化株を異なる海水濃度条件で培養しスクアレンと脂肪酸を定量することで、培地中の海水濃度が油脂の生成にどう影響するかを調べることにした。

方法

Aurantiochytrium sp. 18W-13a の低塩濃度順化株(以下 LSA-1 と呼ぶ)を 3 日間前培養した後、5 日間本培養(102 rpm, 20°C)して毎日サンプルを回収した。海水濃度は 0.016, 1.6, 50% とし、比較のため元株 18W-13a 株(以降野生株と呼ぶ)も海水濃度 50% で同様に培養した。100 ml フラスコで 50 ml の培養液を振盪し、一度に全量を回収し、細胞の凍結重量を測定した。

脂質抽出には乾燥した細胞をすべて用いた。ガラス容器に乾燥細胞、クロロホルム/メタノール(2:1, v/v)、内部標品(スクアレン 1 mg、トリコサン酸 2 mg)を加え、超音波で細胞を破碎し、さらに一晩静置して脂質を抽出した。抽出したサンプルを濾過し、細胞の破片や水溶性タンパク質を取り除くため、9%NaCl 水溶液を 4 ml 加えて攪拌後、水層を除去した。

抽出した脂質溶液を 2 つのガラス容器に分け、濃縮遠心機にかけて溶媒を除いた。一方はヘキサンに溶解し直接ガスクロマトグラフィー (GC) によりスクアレンを定量し、もう一方は HCl-メタノール溶液を加えて 100°C で 1 時間反応し脂肪酸をメチルエステル化して脂肪酸を定量した。

結果と考察

細胞の増殖を示す培地中のバイオマス重量は、3 日目までは低塩濃度条件で LSA-1 の生育がやや遅れたが、その後はどの条件でも大きな差は見られず、5 日目まで増加が続いていた。

全脂肪酸量は、GC により検出された全ての脂肪酸量を合計して算出した。DHA が主要な脂肪酸で、どの条件でも 50-60% を占めたため、DHA の変動の傾向が全脂肪酸量の変動に反映されていた。LSA-1 株は 0.016%, 1.6% の海水条件で、どちらも 4 日目にかけて 100 mg/g 以上まで蓄積したが、50% の海水条件では約 50 mg/g に留まった。野生株では 2 日目以降 80 ~100 mg/g まで蓄積していた。

DHA 量は野生株と LSA-1 株の間でそれほど大きな違いはなかった。0.016%, 1.6% の海水条件では同じような傾向で、

どちらも 4 日目にかけて 50 mg/g 程度まで蓄積された。50% の海水条件では約 30 mg/g に保たれていた。野生株では 3 日目に 40 mg/g まで蓄積され一度落ち着いたが、4 日目から 5 日目にかけて 60 mg/g 近くまで増加した。

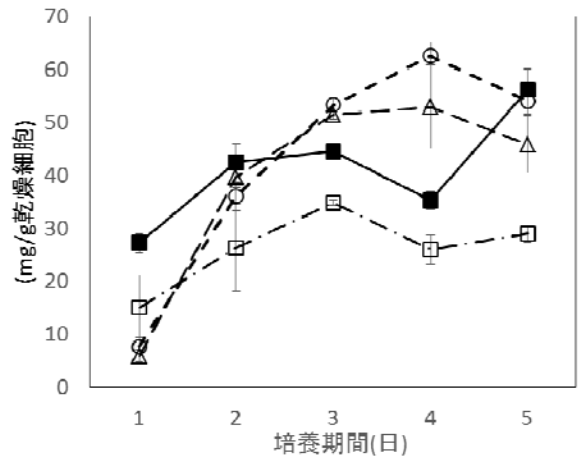


図1. DHA 量の経時変化 Δ:0.016%, ○:1.6%, □:50%の海水条件で培養したLSA-1 株, ■:50%海水条件で培養した野生株

野生株のスクアレン量は、2 日目にピークとなり、10 mg/ml 前後を推移した。LSA-1 株では、どの条件でも野生株より少なく、特に低塩濃度条件の 0.016% の海水条件ではほぼ蓄積されなかった。50% の海水条件で 3 日目、1.6% の海水条件で 4 日目まで蓄積量が増加し続け、以降は緩やかに減少した。

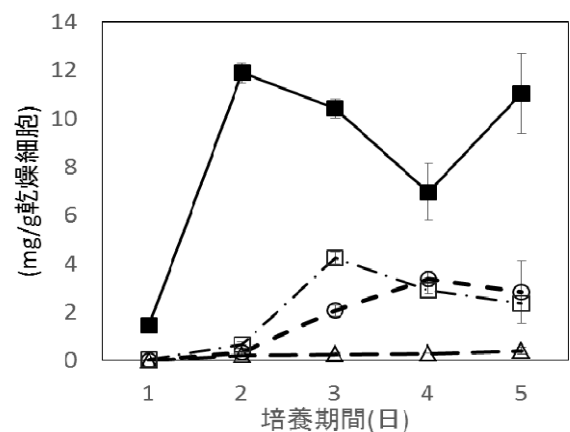


図2. スクアレン量の経時変化 Δ:0.016%, ○:1.6%, □:50%の海水条件で培養したLSA-1 株, ■:50%海水条件で培養した野生株

LSA-1 株で、野生株に比べてスクアレン合成量が低下し、特に低塩濃度ではそれが顕著であった。一方、全脂肪酸量は低塩濃度条件で培養した LSA-1 株で高かった。これらの結果は、培養の塩濃度条件でスクアレンと脂肪酸 (トリグリセリド) の合成が切り替わっている可能性を示している。この仕組みの解明により、脂肪酸・スクアレンの合成能の向上に繋がるのが期待される。