

ラビリントラ培養における磁場印加の影響*

山崎隆志**伊佐一馬*** 越村匡博** 里見暢子**** 重松利信*****

Influence of the magnetic field applied in Labyrinthula culture

Takashi YAMASAKI, Kazuma ISA, Masahiro KOSHIMURA, Masako SATOMI,
Tosinobu SHIGEMATSU

1. はじめに

海洋性の微生物であるラビリントラ類は、クロミスタ界の生物で、細胞内に高度不飽和脂肪酸を蓄積する特徴を持っている¹⁾。そのラビリントラ類の中でも *Aurantiochytrium* sp. KH105 株 (以後 KH105 株) は、細胞中の油滴内に高度不飽和脂肪酸の一種であるドコサヘキサエン酸(22:6n-3; DHA)やエイコサペンタエン酸(20:5n-3; EPA)を高蓄積するとともに、アスタキサンチンやカンタキサンチンなどのカロテノイドも同時に生産するという特徴を持っている²⁾。また、本株はラビリントラ類の他の株に比べて、せん断応力に高い耐性があり、魚油に代わる DHA 供給源として、工業規模の生産が期待されている³⁾。この他、本株を水産餌料としてワムシやアルテミアに与えると体内に DHA やカロテノイド等の脂質を蓄積したことから、栄養強化飼料として水産養殖への応用の可能性もあることが報告されている⁴⁾。また、この微生物のカロテノイドや脂肪酸の生産は、培地成分の種類や量または pH や温度など培養時の環境を変えることで DHA 生産性が大きく変化することも報告されている^{3,4)}。

近年、正田⁵⁾は大腸菌や枯草菌などの原核微生物の培養時に磁場を印加することで大腸菌の死滅抑制効果があることを明らかにしている。また、小田部⁶⁾は、磁場中において酵母の増殖抑制効果があることを報告している。そこで、本研究では、先に示した機能性脂質を生産するラビリントラ類の KH105

株を用いて、培養時にネオジウム磁石や超伝導マグネットにより磁場を印加することにより、この微生物の増殖や高度不飽和脂肪酸やカロテノイドなどの機能性脂質の生産にどのような影響を与えるかについて検討した。

2. 材料と方法

2.1 使用した培地と微生物の培養

KH105 株の培養には 50% 濃度の人工海水にグルコース 30 g/L, ポリペプトン 15 g/L, 酵母エキス 5 g/L を含むものをオートクレーブで滅菌したものを調整した液体培地を用いた。この培地に微生物を植菌し、25℃で 48 時間、振とう培養(150 rpm)を行い、種培養を行なった。種培養液を本培養液に接種し、25℃で 48 時間培養を行った。

2.2 磁場印加による菌体増殖および脂質発酵生産への影響

KH105 株の菌体増殖および脂質発酵生産への磁場印加の影響を調べるため、ネオジウム磁石及び超伝導マグネットによって磁場印加培養実験を行った。培養後、乾燥菌体重量を測定することにより菌体増殖を調べ、菌体中の脂肪酸とカロテノイドを分析することによりそれぞれの脂質の生産性について調べた。磁場を印加せずに地磁気下で培養した試料(コントロール; 0 T)と磁場を印加しながら培養した試料と比較した。図 1 に磁場印加装置概要図を示した。この時、コントロールに対して有意な差であるかを調べるため、乾燥菌体重量、脂肪酸生産量、カロテノイド生産量に対してスチューデント t 検定を行った。

2.2.1 ネオジウム磁石による磁場印加

図 2 に示す 0.38 T のネオジウム磁石を組み込んだ培養装置を用い、10 ml の液体培地に 1 ml の種培養

* 原稿受付 平成 26 年 10 月 8 日

** 佐世保工業高等専門学校 物質工学科

*** 佐世保工業高等専門学校 専攻科

**** 佐世保工業高等専門学校 技術室

***** 佐世保工業高等専門学校 電子制御工学科

液を接種し、25°Cで48時間の振とう培養(150 rpm)を行った。

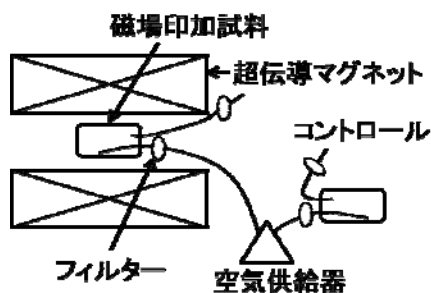


図1 磁場印加装置概要図



図2 ネオジウム磁石による磁場印加培養装置

2. 2. 2 超伝導マグネットによる磁場印加

九州大学河江研究室の超伝導マグネット (Oxford Instruments 社) (図3) を用いて1 ~ 3 Tの磁場強度で培養実験を行った。それぞれの実験では、磁場を印加したものと地磁気下で培養したものを同時に培養し比較した。培養容器は図4に示したものを使用し、通気培養(750 mL/min)を行った。48時間後に菌体を回収した。

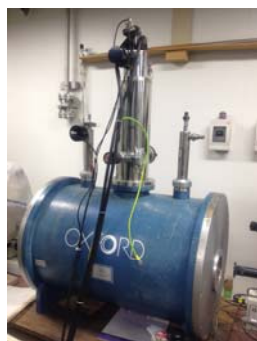


図3 超伝導マグネット

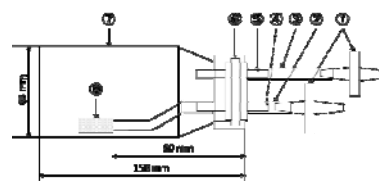


図4 培養容器

①フィルター(Tokyo Roshi Kaisha, Ltd.); 直径: 50 mm, 細孔径: 0.5 μ m ②シリコンチューブ; 内径: 4 mm ③シリコンチューブ; 内径: 2 mm ④ガラス管; 内径: 4 mm ⑤ガラス管; 内径: 2 mm ⑥シリコン栓 ⑦250 mLガラス容器 (PYREX®) ⑧エアストーン; 長さ: 28 mm, 直径: 15 mm

2. 3 分析

2. 3. 1 菌体の回収と乾燥菌体重量の測定

本培養した培養液5 mLをねじ口試験管に取り、遠心分離 (2500 rpm, 10 min) し、上清を取り除き、洗浄後、菌体を回収した。また、乾燥菌体重量は、回収した菌体を105°Cで8時間乾燥することによって求めた。

2. 3. 2 脂肪酸の分析

回収した菌体からクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)により脂質を抽出した後、10%塩酸メタノールでメチルエステル化を行った。メチルエステル化された脂肪酸は、ヘキサンにより抽出して、キャピラリーカラム(TC-70, 0.25 mm \times 30 m; GL Science)および flame-ionization detector (FID) を装備したガスクロマトグラフィー (Autosystem XL, パーキンエルマー-ジャパン) を用いて分析した。

2. 3. 3 カロテノイドの分析

回収した菌体を5~10倍量のアセトン/メタノール(7:3, v/v)に懸濁することでカロテノイドを抽出した。抽出液は、高速液体クロマトグラフィー (日本ウォーターズ) に供し、アスタキサンチン、カンタキサンチン等の分析を行った。移動層溶媒は5%トリフルオロ酢酸/メタノール(3/97)、カラムは Shim-pack VP-ODS (150 \times 4.6 mm I.D.) (SHIMAZU) を使い、波長475 nmで分析した。本研究では、アスタキサンチン、カンタキサンチンのほか、フェニコキサンチン、 β -カロテン、エキネノンの5種類のカロテノイド分析を行った。

3 結果および考察

3. 1 ネオジム磁石による磁場印加

図5にネオジム磁石による磁場印加が菌体増殖に及ぼす影響を示した。これより、0.38 Tの磁場印加では菌体増殖にほとんど影響を与えないことが分かった。また、図6にネオジム磁石による磁場印加が脂肪酸生産に及ぼす磁場の影響を示した。DHAおよび総脂肪酸の生産量はコントロールと比較して $P < 0.05$ と統計学的に有意に増加しており、またその増加の割合はほとんど同じで15%程度であった。さらに、図7にネオジム磁石による磁場印加がカロテノイド生産に及ぼす磁場の影響を示した。図7より、アスタキサンチンとカンタキサンチンの生産量はコントロールとの差がほとんど見られないことが分かる。0.38 Tの磁場強度ではカロテノイド生産に及ぼす影響は見られなかった。

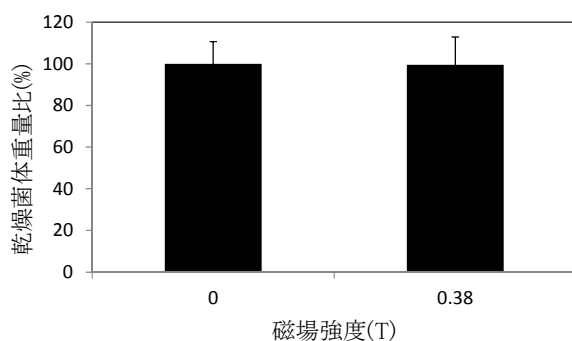


図5 ネオジム磁石による磁場印加による乾燥菌体重量への影響

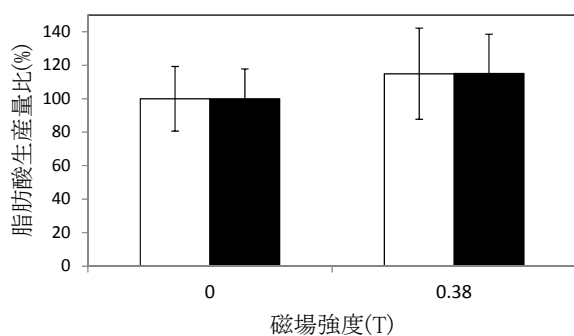


図6 ネオジム磁石による磁場印加による脂肪酸生産量への影響

□ : 総脂肪酸, ■ : DHA

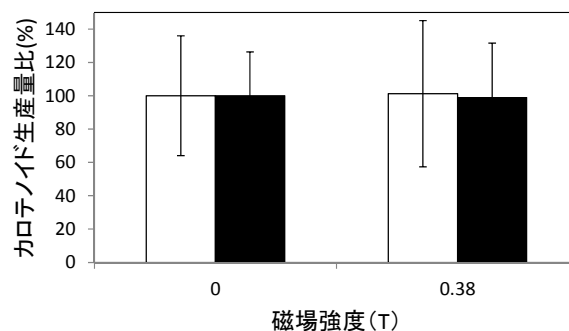


図7 ネオジム磁石による磁場印加によるカロテノイド生産量への影響

□ : アスタキサンチン, ■ : カンタキサンチン

3. 2 超伝導マグネットによる磁場印加

図8に超伝導マグネットによる磁場印加が菌体増殖に及ぼす影響をコントロール(0 T)の分析結果を100%として示した。1 Tの磁場強度において菌体増殖に及ぼす磁場の影響は見られなかったが、2 Tの磁場強度では減少が若干見られ、3 Tになると菌体増殖を大きく減少させることが分かった。

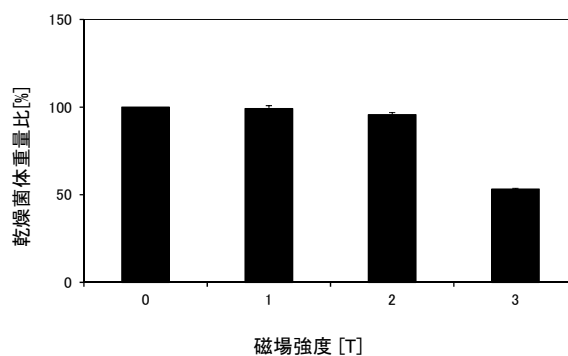


図8 超伝導マグネットによる磁場印加による乾燥菌体重量への影響

次に超伝導マグネットによる磁場印加が脂肪酸生産に及ぼす磁場の影響を図9に示した。1 Tの磁場強度では脂肪酸に増加が見られ、3 Tの磁場強度では脂肪酸の生産が大きく減少した。さらに、表1に超伝導マグネットによる磁場印加が脂肪酸生産割合に与える影響としてコントロール(地磁気下)に対するそれぞれの脂肪酸生産量の割合を示した。2 T以上の磁場強度では全体的に脂肪酸の生産は減少した。図5と図8より、0.38 Tおよび1 Tの磁場強度では、乾燥菌体重量に変化が見られなかったが、図6と図9では脂肪酸の生産量の増加が見られた。こ

これらの結果より、微生物個体あたりの脂肪酸生産能が高められたことがわかった。正田らは、大腸菌への磁場印加実験によって、RNAポリメラーゼの酵素活性が高められたと報告している⁵⁾。本研究においても、磁場が脂質合成する酵素の活性を高めるなどの影響を与えた可能性が考えられた。また、表1の3Tの磁場強度に着目すると、C14:0とC16:0は生産量がコントロールとあまり変わらないが、EPA、DPA、DHAは生産量が大きく減少している。高度不飽和脂肪酸の生産量が減少し、高度不飽和脂肪酸の前駆体であるC14:0とC16:0の生産量が相対的に増加したとすれば、3Tの磁場強度は炭素数18以上の高度不飽和脂肪酸への鎖延長酵素や不飽和化酵素を不活化させたことが示唆された。

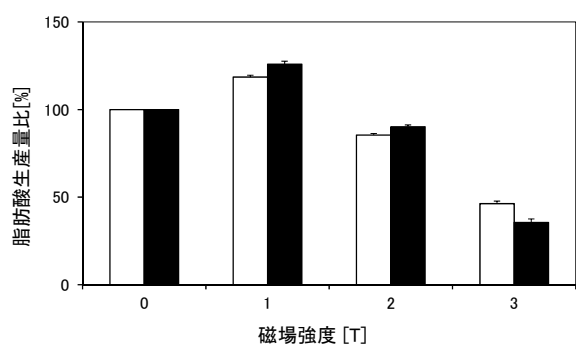


図9 超伝導マグネットによる磁場印加による脂肪酸生産量への影響

□ ; 総脂肪酸, ■ ; DHA

また、図10に超伝導マグネットによる磁場印加がカロテノイド生産に及ぼす磁場の影響を示した。1 Tおよび2 Tの磁場強度ではアスタキサンチン生産量に顕著な増加が見られた。3 Tの磁場強度ではカンタキサンチン、アスタキサンチンともに生産量が大きく減少した。さらに、表2に超伝導マグネットによる磁場印加がカロテノイド生産割合に与える影響としてコントロール（地磁気下）に対するそれぞれのカロテノイ

ド生産量の割合を示した。カロテノイドは1 Tから2 Tの磁場強度では生産量が増加するが、3 Tになると全てのカロテノイド生産量が減少した。地磁気下で培養した時と比較して2 Tの磁場を印加して培養した時のアスタキサンチン生産量は増加していたが、カンタキサンチン生産量は減少していた。KH105株のカロテノイド合成経路は、前駆体であるβ-カロテンが酸化され、ケト基が付加し、エキネノン、その後、カンタキサンチンを合成する。連続的な水酸化反応によりフェニコキサンチンの合成、そしてアスタキサンチンの合成が進む²⁾。2 Tの磁場強度では水酸化酵素が活性化された可能性が考えられた。また、図10および表2より、3 Tの磁場強度ではすべてのカロテノイドにおいて微生物個体あたりの生産能が低下していた。3 Tの磁場印加は、KH105株が生産するすべてのカロテノイド合成酵素を不活化させたことが示唆された。また、0.38 Tの磁場強度ではカロテノイド生産量に変化はなかったが、1 Tおよび2 Tの磁場強度ではアスタキサンチン生産量に顕著な増加が見られた。3 T以上の磁場強度ではカンタキサンチン、アスタキサンチンともに生産量が大きく減少した。カロテノイドは1 Tから2 Tの磁場強度では生産量が増加したが、3 T以上になると全てのカロテノイド生産量が大幅に減少した。これらのことより、カロテノイドの水酸化酵素が活性化することが示唆された。

4 総括

機能性脂質を生産するラビリンチュラ類のKH105株に3 Tの磁場を印加すると菌体の増殖が阻害されることが明らかになった。また、1 Tの磁場を印加しながら培養することにより高度不飽和脂肪酸の合成酵素やカロテノイドの水酸化酵素を活性化させることがわかった。さらに、2 Tの磁場を印加することでアスタキサンチンの生産が活性化された。これらのことが、磁場の印加がある特定の酵素活性を高めることが示

表1 超伝導マグネットによる磁場印加が脂肪酸生産割合に与える影響

磁場強度[T]	脂肪酸生産量割合 [%]							総脂肪酸
	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C20:5n-3	C22:5n-6	C22:6n-3	
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	130	107	128	110	118	117	126	119
2	82	80	87	83	91	82	90	85
3	107	47	96	39	11	30	36	46

表 2 超伝導マグネットによる磁場印加がカロテノイド生産割合に与える影響

磁場強度[T]	カロテノイド生産量割合 [%]				
	アスタキサンチン	フェニコキサンチン	カンタキサンチン	エキネノン	β -カロテン
0	100	100	100	100	100
1	127	109	105	96	81
2	137	116	87	99	97
3	4	8	21	25	4

唆されることとなった。今後は、これらの酵素を単離し in vitroでの酵素反応時に磁場を印加させ酵素反応が活性化されることを確認することや、磁場を印加することで酵素をコードする遺伝子が発現されるかなどを検討する。

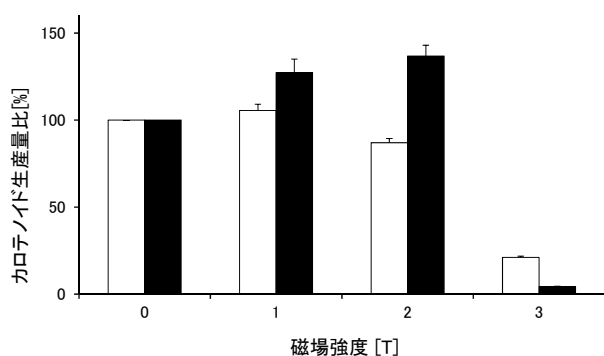


図 10 超伝導マグネットによる磁場印加によるカロテノイド生産量への影響

□ ; カンタキサンチン, ■ ; アスタキサンチン

5 参考文献

- 1) 本多太輔, ラビリinchuラ類の系統と分類, 海洋と生物132, 23(2), 7-18, 2001
- 2) Tsunehiro Aki, Kazutaka Hachida, Megumi Yoshinaga, Yuko Katai, Takashi Yamasaki, Seiji Kawamoto, Toshihide Kakizono, Takashi Maoka, Seiko Shigeta, Osamu Suzuki, and Kazuhisa Ono, Thraustochytrid as a Potential Source of Carotenoids, J. Am. Oil Chem. Soc., 80(8), 789-794, 2003
- 3) Takashi Yamasaki, Tsunehiro Aki, Masami Shinozaki, Masahiro Taguchi, Seiji Kawamoto, and Kazuhisa Ono, Utilization of Shochu Distillery Wastewater for Production of Polyunsaturated Fatty Acids and Xanthophylls using Thraustochytrid. J. Biosci. Bioeng. 102(4), 323-327, 2006

- 4) Takashi Yamasaki, Tsunehiro Aki, Yusuke Mori, Takeki Yamamoto, Masami Shinozaki, Seiji Kawamoto, and Kazuhisa Ono, Nutritional Enrichment of Larval Fish Feed with Thraustochytrid Producing Polyunsaturated Fatty Acids and Xanthophylls, J. Biosci. Bioeng., 104(3), 200-206, 2007
- 5) 正田誠, 高磁場は微生物にどのような影響を及ぼすか, 現代科学, 393, 12-21, 2003
- 6) 小田部荘司, 強磁場中における酵母の増殖抑制効果, ケミカル・エンジニアリング, 4, 62-67, 2009