



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Studies on the practical production of docosahe x aenoic acid using thraustochytrid microorganisms [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | Bin Haji Mohd Taha, Ahmad Iskandar                                                                                                                                    |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                 |
| Degree Name         | 博士(環境科学)                                                                                                                                                              |
| Dissertation Number | 甲第11348号                                                                                                                                                              |
| Issue Date          | 2014-03-25                                                                                                                                                            |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/55456">https://hdl.handle.net/2115/55456</a>                                                                                     |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a>                                             |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                       |
| File Information    | Ahmad_Iskandar_Bin_Haji_Mohd_Taha_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                   |



## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

生物圏科学専攻 博士（環境科学） 氏 名 Ahmad Iskandar Bin Haji Mohd Taha

|         |         |                                    |
|---------|---------|------------------------------------|
| 審査委員 主査 | 特任准教授   | 奥山英登志                              |
| 副査      | 教 授     | 森川 正章                              |
| 副査      | 教 授     | 木村 正人                              |
| 副査      | 准 教 授   | 東條 元昭（大阪府立大学大学院・<br>生命環境科学研究科）     |
| 副査      | 研究グループ長 | 森田 直樹（（独）産業技術総合<br>研究所・生物プロセス研究部門） |

## 学 位 論 文 題 名

Studies on the practical production of docosahexaenoic acid using  
thraustochytrid microorganisms

（スラウストキトリッド類微生物を用いたドコサヘキサエン酸の  
実用的生産に関する研究）

ドコサヘキサエン酸（DHA）は人の脳、視細胞などに高濃度に分布し、その機能に深く関わる長鎖多価不飽和脂肪酸である。DHAは人体ではほとんど合成されないため、必須脂肪酸の1つとみなされている。DHAは脂肪成分として、カツオ、マグロなど魚類に多く含まれることから、古来人類は魚を食料とすることで知らずにDHAの必要量をまかなってきたことになる。しかし、世界規模で見ると、例えば、マグロの消費量が近年著しく増大し、その乱獲をもたらしているように、漁業資源そのものの減少、枯渇が懸念されている。また、魚類は食物連鎖によって、海水中の重金属、砒素などの汚染物質を蓄積する傾向にあり、DHAの供給源としての魚油の安全性は特に大きな問題となっている。

スラウストキトリッド類微生物は、DHAなどの長鎖多価不飽和脂肪酸を脂肪として高濃度に合成、蓄積し、DHAの発酵生産が可能であることから、海洋汚染や漁獲高変動の影響を受けない、新しい DHA源として活発に研究されている。しかし、これらの微生物は海産または汽水産で、従属栄養性であるため、培養には通常1/2濃度の海水（NaClとして約1.5%）をベースに、ペプトンや酵母抽出物に加え、炭素源として高濃度（8% 程度）のブドウ糖などの有機物からなる培地が用いられる。このため、DHAの発酵生産のコストは魚油に比べてはるかに高く、実用化し難い要因の1つとなっている。さらに、海水の使用は培養用タンク（ステンレス）の劣化を早め、この防止のためより高品質の培養機材を必要とする点も高コスト化の要因である。

以上の背景から申請者はまず、スラウストキトリッド類微生物 12B株（12B株）を材料にステンレスの腐食の主因である塩素イオンを可能な限り低下させ、一方で DHA収量を最大にする培地組成を明らかにすることを目指した。海水中の主要塩類が NaCl、MgSO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub> などであることに注目して、培地中の無機塩の組成及び濃度の最適化を詳細に検討した。その結果、0.1% NaClと1.0% MgSO<sub>4</sub> からなる溶液が 1/2 濃度の海水の代替となり、この溶液で調製した培地を用いた場合、

既存の培地に比べて、培養時間が短縮され、DHA収量は0.7 g/Lから2.4 g/Lへと約3倍増加した。CaCO<sub>3</sub>など他の塩類は、有機栄養分に由来する程度の微量が存在すれば十分であると結論した。この0.1% NaClと1% MgSO<sub>4</sub>からなる溶液をベースとする培地をNM培地と名付けている。

スラウストキトリッド類微生物は一般的に孢子体、遊走子、アメーバー状細胞などのステージからなる複雑な生活史をもつ。また、DHAを含む脂肪の蓄積は孢子体で顕著である。申請者はNM培地の有用性を明らかにするため、さらに組成を変えた培地で12B株を培養し、その細胞構造を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、NaClとMgSO<sub>4</sub>のいずれか一方を欠く培地では、孢子体の細胞壁が顕著に厚くなり、NaClとMgSO<sub>4</sub>が至適濃度で共存することが、培地からの炭素の流れをDHAを含む脂肪の合成へと導いている可能性を見出した。NM培地による培養時間の短縮化、DHA含量の増加は *Aurantiochytrium limacinum* SR21でも見られることから、NM培地は類似微生物に広く使用可能であるとしている。

12B株を実用に供するためには、DHA生産性をより高くする必要がある。申請者はこれを達成するため、殺菌効果の最も高い紫外線（UV-C）下で培養することを試みた。その結果、紫外線照射下で培養した12B株は対照（暗黒下）に比べて60%高いDHA生産性を示した。この現象は、12B株の生活史で脂肪を専ら消費する遊走子ステージの時間が、紫外線照射によって短縮するためであると考察している。

12B株は、遊走子が二本の不等長鞭毛と多層のラメラからなる細胞壁をもつことに加え、18S rRNA遺伝子の塩基配列が *Aurantiochytrium limacinum* SR21と高い相同性をもつなどから *A. limacinum* SR21の近縁種であると予想されていた。申請者は18S rRNA遺伝子の塩基配列を詳細に再解析するとともに、ミトコンドリアCOX II遺伝子塩基配列の比較によってそれを確認した。一方、12B株が、遊走子の前鞭毛が管状の毛状構造をもつ点で、前鞭毛が直線的な先細構造をもつ *A. limacinum* SR21の遊走子とは異なることや、既知のスラウストキトリッド類微生物で未報告である細胞融合（ないしは食作用）と思われる現象を示すことなどから、12B株は *Aurantiochytrium* 属の新種であると結論している。

本研究によって12B株の分類学的帰属が明らかとなり、また低コスト培地によるDHAの生産性の向上も可能なことから、12B株のサプリメント化、アクアカルチャーなどへの利用が考えられる。また培養過程における紫外線照射の効果は、今後その分子メカニズムを明らかにすることによって多様な有用物質の発酵生産への応用も期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。