

研究論文

シンクロtron光の微生物育種への利用

三井俊^{*1}、伊藤彰敏^{*1}、杉山信之^{*2}、榊原康彰^{*3}、船井秀哉^{*3}、水野善文^{*4}、
木村伸一^{*4}、小栗宏次^{*5}、山本晃司^{*1}

Use of Synchrotron Radiation for Microbial Breeding

Shun MITSUI^{*1}, Akitoshi ITO^{*1}, Nobuyuki SUGIYAMA^{*2}, Yasuaki SAKAKIBARA^{*3},
Hideya FUNAI^{*3}, Yoshihumi MIZUNO^{*4}, Shinichi KIMURA^{*4}, Koji OGURI^{*5} and
Koji YAMAMOTO^{*1}

Food Research Center^{*1} Aichi Science and Technology Foundation^{*2} Nakano Shuzo Co., Ltd^{*3}
Kintora Shuzo Co., Ltd^{*4} School of Information Science and Technology, Aichi Prefectural
University^{*5}

シンクロtron光を変異原とした突然変異法による酵母の育種事例として、清酒中カルバミン酸エチル低減化を目的に、その前駆物質である尿素非生産性の酵母の育種を試みた。酵母 M1-12 株にシンクロtron光を照射して変異を誘発した後、CAO 培地上で培養し、良好な生育を示す株から、Arg 培地では生育できず Orn 培地で生育できるアルギナーゼ欠損株を分離した。照射試験区は未照射試験区と比較して、アルギナーゼ欠損株の取得率が高くなり、シンクロtron光が変異原として利用可能であることがわかった。取得したアルギナーゼ欠損株の発酵試験を行った結果、尿素非生産性酵母を取得することができた。

1. はじめに

酵母育種法の一つとして、突然変異法が挙げられる。本法は自然突然変異の発生が低頻度であることから、人工的に突然変異を誘発する手法である。従来は物理的変異原である紫外線や化学的変異原である EMS 等の薬剤が変異原として用いられてきた。近年、植物育種の分野において、物理的変異原としての有効性が明らかにされた重イオンビームを酵母育種に活用した事例が報告され¹⁾²⁾、新たな変異原の開拓が始まっている。

一方、愛知県では 2013 年にあいちシンクロtron光センターの共用が開始され、その利用が進められている。シンクロtron光は広い波長範囲を持ち、高輝度、高指向性といった特徴を有しているため、微細構造の解析等における最先端の分析ツールとなっている。しかし最近では、植物育種の際の変異原としての利用が活発に進められており³⁾、酵母育種においても有効な変異原となることが期待される。

そこで本研究では、シンクロtron光を変異原とした突然変異法による酵母育種を検討した。具体的には、清酒の海外輸出において、一部の国で規制値が設定されているカルバミン酸エチルの低減化を目的に、その前駆物質である尿素を生成しない尿素非生産性の酵母を育種することとした。北本らが清酒酵母のアルギナーゼ遺伝

子を破壊することで尿素非生産性酵母を作出できることを報告⁴⁾していることから、シンクロtron光変異によるアルギナーゼ欠損株の取得を試みた。

2. 実験方法

2.1 供試菌株

萬三商店(愛知県半田市)敷地内の半田市指定天然記念物「萬三の白モッコウバラ」から分離⁵⁾・育種した酵母 *Saccharomyces cerevisiae*(M1-12 株)を使用した。

2.2 使用培地

酵母の培養は麴汁培地(ボーメ 5.0、pH4.0)を使用した。シンクロtron光照射による変異処理前後の酵母の生存率の評価には YPD 平板培地(1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース、2%寒天)を使用した。アルギナーゼ欠損株の単離には CAO 培地(0.17%イーストニトロゲンベース(YNB) w/o amino acid and ammonium sulfate、10ppm カナバニン、5mM オルニチン、1mM アルギニン、2%グルコース、2%寒天)を使用した。アルギナーゼ欠損性の確認には Arg 培地(0.17%YNB w/o amino acid and ammonium sulfate、5mM アルギニン、2%グルコース、2%寒天)および Orn 培地(0.17%YNB w/o amino acid and ammonium sulfate、5mM オルニチン、2%グルコース、2%寒天)を

^{*1} 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 ^{*2}(公財)科学技術交流財団 ^{*3} 中埜酒造(株) ^{*4} 金虎酒造(株)

^{*5} 愛知県立大学 情報科学部

使用した。

2.3 シンクロトロン光照射による変異誘発

2.3.1 照射試料

M1-12 株を麹汁培地 25mL で 30℃、48 時間培養後、遠心集菌し、滅菌水で菌体を 2 回洗浄した。滅菌水 25mL を加えて懸濁し、ポリプロピレン製容器(1.5mL 容)に 0.5mL ずつ分注した後、遠心分離し、上清を除いた酵母菌体をシンクロトロン光照射試料とした。

2.3.2 シンクロトロン光照射試験

シンクロトロン光による変異誘発は、あいちシンクロトロン光センターの BL8S2(X 線トポグラフィビームライン)にて行った。シンクロトロン光は、白金コートミラーにより高エネルギー成分(10keV 以上)をカットした白色光を利用した。照射試料を図 1 のように設置してシンクロトロン光を照射した。照射時間は 10 秒、30 秒、1 分、5 分、10 分、30 分に設定した。なお、酵母菌体の吸収線量は、酵母菌体重量と照射試料通過後の光路上に設置した Si PIN フォトダイオード(浜松ホトニクス(株))により測定した電流値より概算した。また、シンクロトロン光照射前後の酵母菌体を適宜希釈し、YPD 平板培地に塗抹、培養することで計測した酵母数より、M1-12 株の生存率を算出した。

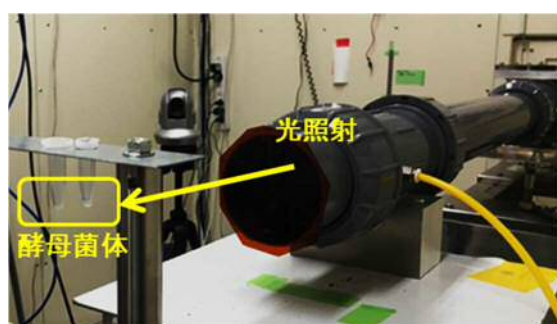


図 1 照射試料設置時の様子

2.4 アルギナーゼ欠損株の取得

北本らの方法⁴⁾を参考にアルギナーゼ欠損株の分離を行った。すなわち、シンクロトロン光を照射した酵母菌体を CAO 培地に塗抹し、30℃で培養した。3 週間後、直径 1mm 以上のコロニーを CAO 培地生育株として釣菌した。これら CAO 培地生育株のコロニーを Arg 培地と Orn 培地に爪楊枝を用いてスポットし、30℃で 5 日

間培養後、コロニーの生育状態を観察した。Arg 培地では生育できず、Orn 培地で生育できる株をアルギナーゼ欠損株として分離した。

2.5 アルギナーゼ欠損株を用いた発酵試験

乾燥麹(60%白米、徳島製麹(株))20g、乾燥 α 化米(60%白米、徳島製麹(株))80g、蒸留水 180mL に取得したアルギナーゼ欠損株の前培養液 10mL を添加して、15℃で 16 日間或いは 17 日間発酵させた。対照酵母として、親株である M1-12 株を用いた。醪を遠心分離(10,000rpm、20 分)にて上槽し、得られた上清液を製成酒とした。

2.6 製成酒の成分分析

尿素は F-キット法((株)J.K.インターナショナル)を用いて測定した。アルコール分はアルコメイト AL-2 型(理研計器(株))を用いて測定した。日本酒度は密度比重計 DA-520(京都電子工業(株))を用いて測定した。酸度、アミノ酸度、吟醸香成分は酒類総合研究所標準分析法⁶⁾に準拠して分析した。

3. 実験結果及び考察

3.1 シンクロトロン光照射試験

シンクロトロン光照射試料(試料数 18)中の酵母菌体の平均重量は 4.8mg であった。酵母菌体重量及び Si PIN フォトダイオードにより測定した電流値より、酵母菌体の吸収線量は 1 秒当たり 39Gy と概算された。

酵母は菌株によって変異処理に対する変異の度合いが異なるため、変異処理に対する生存率を求める必要がある。変異処理条件が強すぎると多数の変異が入るが死滅しやすくなり、逆に変異処理条件が弱すぎると変異が入らず目的とする変異株が取得できない。変異原によって異なるが、生存率が 50%程度になる変異処理条件が望ましいと報告⁷⁾されている。シンクロトロン光照射時の照射時間に伴う M1-12 株の酵母数及び生存率の変化を表 1 に示す。照射時間の増加と共に M1-12 株の生存率はおおよそ低下した。今回のシンクロトロン光照射試験では、95%以上の酵母が死滅する 5 分以上の照射は変異処理条件に適さないことがわかった。

3.2 アルギナーゼ欠損株の取得

各照射時間について、2 枚の CAO 培地を用い、計 62

表 1 M1-12 株の生存率に対するシンクロトロン光照射の効果

シンクロトロン光照射時間	0秒 (未照射)	10秒	30秒	1分	5分	10分	30分
光照射後の酵母数(cfu/mL)	2.7×10^7	8.5×10^6	2.3×10^6	3.8×10^6	1.2×10^6	6.1×10^5	1.4×10^5
光照射後の生存率	—	32%	9%	14%	4%	2%	0.5%

株の CAO 培地生育株を取得した。取得数の内訳は、10 秒で 33 株、30 秒で 20 株、1 分で 4 株、5 分で 2 株、10 分で 3 株、30 分で 0 株であった。これら CAO 培地生育株のうち、Orn 培地で生育するが、Arg 培地では生育できなかった 27 株がアルギナーゼ欠損株と判定された。アルギナーゼ欠損株の取得数の内訳は、10 秒で 14 株、30 秒で 9 株、1 分で 1 株、5 分で 1 株、10 分で 2 株であった。一方、シンクロトロン光未照射試験区(自然変異試験区)では 6 枚の CAO 培地を用い、計 5 株の CAO 培地生育株が得られたが、これらの株からアルギナーゼ欠損株は取得できなかった。

このように、アルギナーゼ欠損株の取得率(CAO 生育株中のアルギナーゼ欠損株数)がシンクロトロン光照射試験区では 62 株中 27 株と、未照射試験区の 5 株中 0 株に対して高くなったことから、シンクロトロン光が変異原として利用可能であることがわかった。シンクロトロン光照射試験区のうち、照射時間が 10 秒及び 30 秒の試験区で 23 株と大部分のアルギナーゼ欠損株が得られた。このことから、今回のシンクロトロン光照射試験では、照射時間は 30 秒以内とすることが適当と考えら

れる。

3.3 アルギナーゼ欠損株を用いた発酵試験

取得したアルギナーゼ欠損株 27 株に関して、親株である M1-12 株を対照に発酵試験を行い、尿素生成能を評価した。各株の尿素濃度を含めた製成酒の成分値を表 2 に示す。M1-12 株の製成酒(以降、M1-12 株区と記載。他の菌株も同様)と比較して、取得したすべてのアルギナーゼ欠損株の製成酒において尿素濃度は著しく低下していた。その中でも特に、M1-12-S5、M1-12-S8、M1-12-S15、M1-12-S19、M1-12-S22、M1-12-S26 株を除いた株の製成酒で尿素濃度が検出限界以下(0.3mg/L 以下)となり、計 21 株の尿素非生産性酵母を取得することができた。

その他の成分値に関して、アルコール分より、M1-12-S8、M1-12-S11、M1-12-S18、M1-12-S20、M1-12-S21、M1-12-S27 株を除いた 21 株で親株 M1-12 株と同程度のアルコール生成能であった(M1-12 株区のアルコール分 $\pm$ 1%以内)。酸度は M1-12-S22 株を除いた 26 株の製成酒で、M1-12 株区より低くなった。シンクロトロン光変異により有機酸生成に関わる代謝系が変化し

表 2 製成酒の成分値

発酵試験区 ^a	醸日数 (日)	菌株	尿素 ^b (mg/L)	アルコール分 (%,v/v)	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	カブロン酸 エチル (ppm)	酢酸イソ アミル (ppm)
試験区①	16	M1-12(親株)	21.3	12.3	-42.1	3.85	0.95	1.5	2.9
		M1-12-S1	N.D.	11.9	-44.9	3.45	1.10	1.5	3.2
		M1-12-S2	N.D.	11.9	-46.2	3.60	0.80	1.7	3.1
		M1-12-S3	N.D.	11.8	-42.0	3.55	0.90	2.1	3.8
		M1-12-S4	N.D.	11.6	-48.3	3.40	1.10	1.6	3.9
		M1-12-S5	0.5	12.6	-36.1	3.75	0.90	1.7	4.2
		M1-12-S6	N.D.	12.8	-35.3	3.70	0.85	2.4	5.3
試験区②	17	M1-12(親株)	24.2	12.9	-39.5	3.95	1.00	1.8	2.3
		M1-12-S7	N.D.	12.0	-38.0	3.30	0.80	0.7	3.2
		M1-12-S8	2.9	11.7	-42.2	3.40	1.25	1.7	3.8
		M1-12-S9	N.D.	13.2	-33.1	3.85	1.30	1.5	3.5
		M1-12-S10	N.D.	12.9	-36.0	3.70	1.40	1.6	3.7
		M1-12-S11	N.D.	11.7	-45.6	3.40	0.95	2.0	3.5
		M1-12-S12	N.D.	13.0	-34.4	3.80	0.90	1.5	3.5
		M1-12-S13	N.D.	13.0	-34.3	3.85	1.30	1.6	3.7
		M1-12-S14	N.D.	12.4	-40.6	3.75	1.50	1.9	3.3
		M1-12-S15	0.5	13.2	-31.1	3.85	1.30	1.6	4.0
		M1-12-S16	N.D.	12.5	-39.7	3.55	1.00	1.6	4.3
		M1-12-S17	N.D.	12.9	-35.5	3.80	1.35	1.9	3.5
試験区③	16	M1-12-S18	N.D.	11.2	-50.6	2.90	1.35	1.4	3.4
		M1-12-S19	1.4	13.0	-35.5	3.75	1.35	1.6	3.8
		M1-12(親株)	22.7	12.6	-41.5	3.90	0.95	1.5	2.6
		M1-12-S20	N.D.	9.8	-59.0	3.00	1.25	1.8	3.3
		M1-12-S21	N.D.	10.9	-52.9	3.40	1.20	1.7	3.0
		M1-12-S22	1.0	13.0	-32.2	4.05	1.25	2.0	3.8
		M1-12-S23	N.D.	12.8	-37.6	3.75	1.20	1.7	5.1
		M1-12-S24	N.D.	12.1	-41.4	3.50	0.90	0.9	3.0
		M1-12-S25	N.D.	12.7	-36.5	3.80	1.35	1.8	3.3
		M1-12-S26	1.4	12.0	-43.6	3.45	1.15	1.7	5.2
		M1-12-S27	N.D.	11.0	-49.1	3.30	1.35	1.8	3.5

^a 試験区①、試験区②、試験区③は独立した小仕込試験の結果を示している。

^b N.D.は検出限界 0.3mg/L 以下を示す。

ていることが推測される。アミノ酸度は27株中19株の製成酒で、親株 M1-12 株以上となった。吟醸香成分に関しては、カプロン酸エチル濃度が M1-12-S6 株区で最も高く、M1-12-S7 株区で最も低くなったが、M1-12 株区と大差はなかった。秋田らによりカナバニン耐性株は酢酸イソアミル高生産性を示すことが報告⁸⁾されているが、酢酸イソアミル濃度は、27株中18株の製成酒で、親株 M1-12 株区より 1ppm 以上高くなった。

4. 結び

清酒中のカルバミン酸エチル低減化を目的として、既存の酵母 M1-12 株から、シンクロトロン光を変異原とした突然変異法により、その前駆物質である尿素非生産性の酵母の取得を試みた。集菌した M1-12 酵母菌体にシンクロトロン光を照射して変異を誘発した後、CAO 培地に塗抹して培養し、良好な生育を示す CAO 培地生育株を計 62 株分離した。これら分離株から、Arg 培地では生育できず Orn 培地で生育できるアルギナーゼ欠損株を計 27 株取得した。シンクロトロン光照射試験区では未照射試験区と比較して、アルギナーゼ欠損株の取得率が高く、シンクロトロン光が変異原として利用可能であることがわかった。取得したアルギナーゼ欠損株に関して、発酵試験を行った結果、製成酒の尿素濃度が検出限界以下となった尿素非生産性酵母を計 21 株取得することができた。

今後は取得した尿素非生産性酵母のスケールアップした発酵試験を行い、アルコール生成能及び吟醸香生成

能を指標として酵母の選抜を進めていく予定である。

謝辞

本研究を遂行にするにあたり、シンクロトロン光照射試験でご協力頂いたあいちシンクロトロン光センターの池野様、花田様に厚くお礼申し上げます。

付記

本研究は知の拠点あいち重点研究プロジェクト(Ⅱ期)「シンクロトロン光の清酒製造プロセスへの活用」により行った。

文献

- 1) 増渕隆, 上山修, 佐藤勝也, 長谷純宏, 鳴海一成: 群馬県立産業技術センター研究報告, 12-14(2009)
- 2) 横堀正敏, 高橋友哉, 増田こずえ, 阿部知子: 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 8, 45-47(2010)
- 3) 坂本健一郎, 高取由佳, 千錦龍志: 九州シンクロトロン光研究センター年報, 24-25(2013)
- 4) 北本勝ひこ: 日本醸造協会誌, 88, 106-114(1993)
- 5) 三井俊, 小野奈津子, 安田(吉野)庄子, 伊藤彰敏, 山本晃司: あいち産業科学技術総合センター研究報告, 3, 68(2014)
- 6) 独立行政法人酒類総合研究所: 酒類総合研究所標準分析法(平成 29 年 4 月 6 日)
- 7) 大矢禎一: 日本醸造協会誌, 84, 774-779(1989)
- 8) 秋田修, 蓮尾徹夫, 原昌道, 吉沢淑: 醗酵工学, 67, 7 (1989)