



九州シンクロトロン光研究センター 県有ビームライン利用報告書

課題番号：1905040T

BL番号：BL09

(様式第5号)

酵母を対象としたシンクロトロン光照射による変異誘発機構の解明および育種による有用微生物の取得 Identificaton of mutagenesis point by synchrotron irradiation and breeding of sake yeasts.

木村圭・濱崎友宏・馬場嵩一朗・小林元太

Kei Kimura, Tomohiro Hamasaki, Shuichiro Baba, Genta Kobayashi

佐賀大学農学部

Faculty of Agriculture, Saga University

- ※1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より1人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

清酒製造において、清酒酵母は清酒の味や香りに大きく影響を与える。これまで突然変異誘発法によって種々の特徴ある清酒酵母株が取得されてきた。これまで、酵母に対してシンクロトロン光を変異源として用いた例は1例しかなく、その変異誘発に関する知見が乏しかった。本研究では清酒酵母を対象に、シンクロトロン光による変異誘発機構の解明に取り組むとともに、清酒の香り成分を高生産する株の取得を試みた。これまでの実験により、変異誘発機構解明の為の一倍体酵母から4株、香り成分高生産候補株を120株取得することに成功している。今後、これらの株を用いて、変異誘発機構解明と香り成分高生産株取得を進める予定である。

(English)

In sake production, sake yeast greatly affects the taste and flavor of sake. Various characteristic sake yeast strains have been obtained by mutagenesis. So far, there has been only one example of using synchrotron light as a mutagen for yeast, and knowledge on mutagenesis has been poor. In this study, we tried to elucidate the mechanism of mutagenesis by using synchrotron light in sake yeast, and tried to acquire a strain that produces high flavor components of sake. As a result of experiments so far, we have succeeded 120 candidates of high flavor component production strains and 4 haploid yeasts to elucidate the mechanism of mutagenesis. In the future, we plan to use these strains to elucidate the mechanism of mutagenesis and to acquire strains that produce high flavor components.

2. 背景と目的

佐賀大学農学部応用微生物学研究室では清酒酵母、麹菌、乳酸菌など様々な微生物を研究対象にしている。これらの微生物は産業・工業分野において広く利用されており、中でも発酵食品をはじめとする食品産業においては非常に重要な役割を果たしている。消費者が食品に対して求める良好な香味、あるいは機能性は、微生物が産生する物質に起因することが多い。そのため、有用な特徴を有する微生物の探索は、食品分野での産業利用に直結する。

著者らは、有用微生物の取得のために、自然界からの微生物を分離し、分離株の育種を行っている。微生物の育種改良法には、選抜育種、遺伝子組換え技術、変異処理技術等があるが、食品に利用される微生物の育種改良には、変異処理技術を用いる例が多く見られる。微生物に対する変異処理では、エチルメタンスルホン酸 (EMS) やニトロソグアニジン (NTG) 等の化学薬品変異剤の利用、紫外線 (UV) の照射等が一般的であり、他にイオンビーム照射による変異誘発も散見される。しかしながら、シンクロトロン光の照射による変異誘発事例の報告は非常に少なく、またシンクロトロン光照射による変異誘発機構も十分に解明されていない。一方で、シンクロトロン光照射は、既存の変異処理技術とは異なる手法であるため、変異の起こり方が他の手法と異なり、特有の変異株を取得できる利点も期待できる。

酵母などの微生物の場合、ゲノムサイズが小さい為に、変異処理後に変異が起こっている箇所を、ゲノムワイドに特定することが容易である。一方で、酵母においてシンクロトロン光を変異源として用いた研究例は 1 例しかなく、シンクロトロン光照射による変異誘発機構の解明だけでなく、変異誘発の有用性等に関する知見すら乏しい状況である。

そこで本実験では、清酒酵母を対象として、シンクロトロン光照射による変異誘発技術の確立、変異誘発機構の解明を行うと共に、実用清酒酵母を使用することで、シンクロトロン光照射により有用な特徴を有する酵母の取得を目指すトライアル実験を実施する。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

実験材料

本実験に供する酵母株は、以下の2株を用いた。

- ・ 悠々知酔酵母 Y5201-47株
- ・ 一倍体酵母 RIB2001株

一倍体株は、染色体を 1 セットしか持たない為、変異箇所の特定が容易になるという利点がある。そこで、シンクロトロン光照射による変異誘発機構の解明については、一倍体酵母 RIB2001 株を対象に実験を行った。また、シンクロトロン光照射により有用な特徴を有する酵母を取得する実験では、実用化されている悠々知酔用清酒酵母 Y5201-47 株を用いた。

シンクロトロン光照射実験

変異誘発の為のシンクロトロン光照射では、入射エネルギーを一定に保ちつつ、光の照射強度をフィルター (アルミ厚) により調整することで、照射エネルギーを変えて実験を行った (表 1、2)。(条件 (アルミ厚等) は、適宜、佐賀県シンクロトロン光研究センターのスタッフと相談により決定した。)

清酒酵母 Y5201-47 株は、ポリスチレン製プラスチックシャーレ (直径 6 mm) 内で固めた寒天培地 (YPD Agar 培地 (Difco)) 上に塗布し、蓋をして密閉した状態で照射実験に用いた。シャーレをシンクロトロン光照射用の可動式作業台に粘着テープで固定し、各条件で照射を行った (表 1)。

他に、清酒酵母 Y5201-47 株、および RIB2001 株を、ポリスチレン製プラスチック試験管内の生理食塩水中に懸濁し、密閉状態で可動式作業台に粘着テープで固定し、各条件で照射を行なった (表 2)。

表 1. シャーレ内の寒天培地塗布試料に対する照射条件

吸収線量 (Gy)	0	5	20	50	100	300
アルミ厚 (mm)	照射なし	1.70	0.92	0.52	0.30	none

表 2. プラスチック試験管内の懸濁液試料に対する照射条件

吸収線量 (Gy)	0	5	20	50	100	300
アルミ厚 (mm)	照射なし	2.30	1.42	1.02	0.78	0.47

実験終了後、酵母試料は佐賀大学農学部の研究室へ速やかに持ち帰り、次の作業を行なった。

シンクロトロン光照射後の培養（変異処理手法の確立と死滅率測定）

シャーレ内の寒天培地塗布試料は、30°Cで2日間培養し、照射後に生残するコロニー数の計測、コロニーの形態観察を行った。

プラスチック試験管内の懸濁液試料のうち、Y5201-47株については、各照射条件の試料の一部を段階希釈し、YPD寒天培地に塗布し、30°Cで1-2日間培養し、生えたコロニーの数を計測した（n=3（塗布シャーレ数））。シンクロトロン光を照射しなかったコントロール試料でのコロニー数と各試料のコロニー数を比較し、各吸収線量での死滅率を求めた。

シンクロトロン光照射後の培養（香氣成分高生産候補株の選抜）

清酒酵母の香氣成分高生産株の選抜に当たり、tert-Butyl Hydroperoxide (TBHP)、およびセルレニン培地中に添加して、株の選抜を行った。TBHPは過酸化脂質の一種で、細胞膜の不飽和度が減少し、トランスフェラーゼ活性の抑制を解除する。その為、TBHP耐性を持つことで、香氣成分の酢酸イソアミル高生産になると報告されている^[1]。セルレニンは、*Cephalosporium caerulens*が生産する抗生物質の一種で、脂肪酸合成酵素を阻害し脂質合成を阻害する。その為、セルレニン耐性を持つことで、香氣成分のカプロン酸エチル高生産となると報告されている^[2]。

プラスチック試験管内のY5201-47株懸濁液試料のうち、死滅率測定実験の残り試料について、遠心による集菌を行い、TBHPを4mM含む寒天培地に塗布し、30°Cで3-4日間培養した。また、シンクロトロン光を寒天培地塗布試料に直接照射した実験については、照射後に生残してきたコロニーを、TBHPを4mM含む寒天培地に接種し、30°Cで3-4日間培養した。これらの培養処理により、生育してきたコロニーを香氣成分の酢酸イソアミルを高生産する候補株として分離した。さらに、生育した株を、5mM TBHP培地、6mM TBHP培地へと継代し、6mM TBHP培地で生育したものを、最終的な酢酸イソアミル高生産候補株とした。

上記の死滅率測定実験で、100Gy、および300Gyのシンクロトロン光照射後に、YPD寒天培地で生育してきたコロニーを、25μMのセルレニンを含む寒天培地（Cer培地）に接種し培養した。さらに、生育したコロニーを、50μMのCer培地に継代し、この培地で生育したものを、最終的なカプロン酸エチル高生産候補株とした。

シンクロトロン光照射後の培養（変異誘発機構解明用の一倍体変異株の選抜）

プラスチック試験管内の懸濁液試料のうち、RIB2001株については、遠心による集菌の後、変異誘発の確認に用いる試薬 5-Fluoroorotic Acid (5-FOA) を含む培地に塗布し、30°Cで3-4週間培養した。この培養処理により、生育したコロニーを、変異誘発機構解明用の酵母一倍体変異株として分離した。

4. 実験結果と考察

シンクロトロン光の吸収線量毎の酵母株の死滅率

シャーレ中の寒天培地に塗布した試料へのシンクロトロン光照射は、死滅率の測定に適さないことが判明した為、試験官に懸濁した試料を用いて、吸収線量による死滅率を測定した（図1）。吸収線量を高くするほど死滅率が高く、線量が高いほど、変異量が多くなっていると予想された。

シンクロトロン光照射による香氣成分高生産候補株の分離

酢酸イソアミル高生産候補株は、プラスチック試験管内の懸濁液試料から 4mM TBHP 培地への接種によって 782 株の取得に成功した。4mM TBHP 生育株を 5mM、6mM TBHP 培地へと順次継代し、最終的に 65 株の酢酸イソアミル高生産候補株を取得した。

カプロン酸エチル高生産候補株は、照射株後 YPD 培地に生育した約 3000 株の中で、168 株が 25μM Cer 培地において生育した。この生育した株を 50μM Cer 培地に継代し、最終的に 55 株のカプロン酸エチル高生産候補株を取得した。

変異誘発機構解明用、一倍体変異株の取得

シンクロトン照射後の試験管 RIB2001 株懸濁液試料を、5-FOA を含む培地に接種し、3-4 週間培養した結果、4つのコロニーが生育した。これらを分離することで、最終的に4株の変異誘発機構解明用の酵母一倍体変異株の取得に成功した。香氣成分高生産株の取得数が少なかったのは、通常の二倍体酵母に比べて、シンクロトン光による変異が、致死遺伝子に起こる確率が高いと予想できること、生育が二倍体酵母に比べ遅いこと、使用した5-FOA培地が *ura3* 遺伝子欠損株、あるいはウラシル非要求性株のみ生育できる培地であり、厳しい選抜条件であることが要因として考えられる。

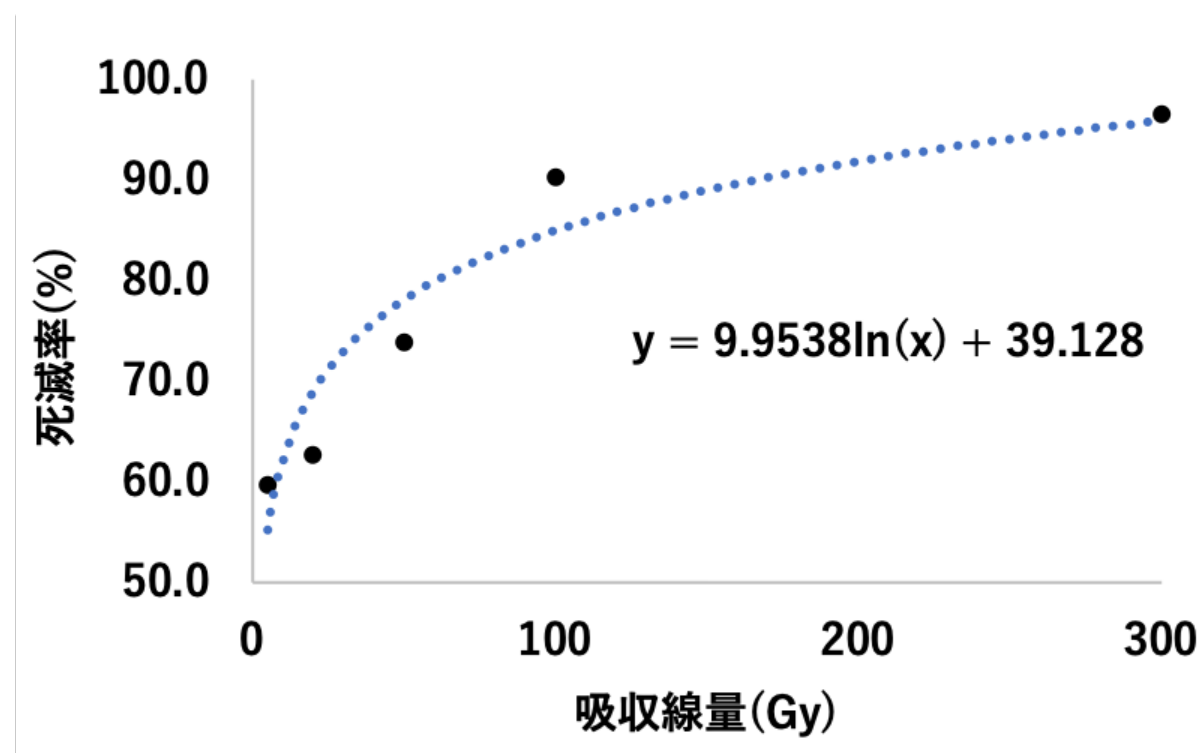


図1：吸収線量による死滅率の違い

5. 今後の課題

発酵試験による、香氣成分高生産株の分離

現在までに、酢酸イソアミル高生産候補株、カプロン酸エチル高生産候補株を合計で120株取得しているが、数が多い為に解析が難しい状況にある。また、実際に香氣成分を高生産するかどうかの裏付けができていない。その為、発酵試験と香氣成分分析を行い、実際に香氣成分を高生産する株を絞り込む必要がある。その為、本実験で香氣成分高生産候補株として選抜した株を対象に、選抜した候補株、変異前の親株、比較用株を用いて、発酵試験を行い、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル高生産株をそれぞれ選抜する予定である。発酵試験では、試験株を麴エキス培地に接種し、3日間25℃で静置する前培養の後、前培養液1mlを麴米10g、麴エキス29mlの培養液に加え、12℃で2週間静置培養を行う。培養終了後、醪を遠心分離し、上澄みに含まれる香氣成分を測定する。

現在までに、酢酸イソアミル高生産候補株、カプロン酸エチル高生産候補株（それぞれ用いた選択培地の頭文字を使ってT系（65株）とC系（55株）とする）、比較株のY5201-47株（親株）、K701株、K901株を用いた発酵試験を実施している。今後、発酵試験を継続しその成分分析を実施することで、酢酸イソアミル高生産株、カプロン酸エチル高生産株を取得する予定である。取得した香氣成分高生産株は、総米1kg小仕込み試験など種々の実用試験を経過した後に、実用に耐えうるものであれば、「悠々知酔」等への実製造へ応用することを検討する。

一倍体変異株を用いた変異誘発機構解明

変異誘発機構の解明では、一倍体変異株を4株取得している。この株は、5-FOA培地で生育する為、*ura3* 遺伝子領域に欠損等が生じていると予想されるが、現時点では、実際に欠損等が生じているかの確認ができていない。今後、*ura3* 遺伝子領域の DNA 配列を決定し、変異がどのように起こっているのかを解析する予定である。同時に、変異株のゲノム解析を行い、シンクロトロン光照射によってゲノム全体にどのように変異が起こっていたのかも特定する予定である。

また、本実験では、一倍体 RIB2001 株について、シンクロトロン光照射による死滅率の計測が出来ていなかった為、再度シンクロトロン光照射実験を行い、RIB2001 株での死滅率を求める予定である。

6. 参考文献

- (1) T. Ishikawa et al. (1979) Effects of cellular fatty acids on the formation of flavor esters by Sake yeast. Agric. Biol. Chem. 43:45-53
- (2) 市川英治 (1993) カプロン酸エチル高生産酵母. 日本醸造協会誌. 88:101

7. 論文発表・特許 (注: 本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

現在、投稿中の論文等はないが、研究成果が得られれば速やかに論文にて公表する予定である。

8. キーワード (注: 試料及び実験方法を特定する用語を2~3)

清酒酵母、変異誘発機構解明、香気成分高生産変異株取得

9. 研究成果公開について (注: ※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後2年以内です。例えば2018年度実施課題であれば、2020年度末(2021年3月31日)となります。

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文(査読付)発表の報告 (報告時期: 2021年 3月)