

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：2007077R

BL番号：BL09

(様式第5号)

シンクロトロン光照射を利用した微生物の有用株取得 (実験2)
Acquisition of useful micro-organisms strains by using the mutagenesis method
by synchrotron irradiation (Study 2).

木村圭・小島直樹・水戸誠也・馬場嵩一郎・後藤正利・小林元太
Kei Kimura, Naoki Kojima, Seiya Mito, Shuichiro Baba, Masatoshi Goto, 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)

紅麹菌は、豆腐のような発酵食品製造に使われる微生物で、ロバスタチンなどの有用物質を生産する特徴を持つ。白麹菌は焼酎製造に用いられる微生物であり、原料デンプンの分解のためのアミラーゼやクエン酸を高生産する特徴をもつ。一方で、珪藻類は赤潮や環境浄化等に関与する重要な海洋微生物である。過去の知見では、様々な突然変異誘発法によって、微生物の有用物質高生産変異株が取得されてきた。しかしながら、変異原としてシンクロトロン光を用いて有用微生物株に変異を導入した事例は少なく、酵母で数例見られるのみである。我々は、これまでにシンクロトロン光の照射によって有用形質を持つ酵母株の取得に成功してきた。今回は、紅麹菌、白麹菌と、2株の珪藻を新たな実験対象に加え、シンクロトロン光による変異誘発法の確立、および有用変異株の取得を試みた。本実験により、各微生物株の吸収線量ごとの死滅率の算出を行い、これらの生物での変異誘発法の確立に向けてさらに前進した。一方、各微生物の有用変異株取得に成功しつつあり、現在さらに分離を試みている段階である。今後、有用変異株を取得し、機能解析を実施する予定である。

(English)

Red koji mold, *Monascus* is a microorganism used in the production of fermented foods such as "tofu", and produces useful substances such as red pigments and monacolin K. White koji mold, *Aspergillus kawachii* has been used for making Japanese spirit, *shochu*, since the mold produces large amounts of amylase and citric acid during making *shochu*. On the other hand, diatoms are important marine microorganisms involved in red tide and environmental purification. According to past findings, mutants producing high levels of useful substances of microorganisms have been obtained by various mutagenesis methods. However, there are few examples of mutagenesis in useful microorganisms using synchrotron light as a mutagen, and only a few cases are found in yeast. We have succeeded in obtaining yeast mutant strains exhibiting pleasant phenotypes by irradiation with synchrotron light. This time we used two species of the filamentous fungi and two strain of diatoms to this experimental subjects, tried to establish a mutagenesis method using synchrotron light, and obtained useful mutant strains. In this experiment, we succeeded in calculating the killing rate of each microorganism strain for each absorbed dose, and proceeded to establish a mutagenesis method. On the other hand, We have succeeded in obtaining useful mutant strains of each microorganism, and are now in the process of further isolation. In the future, we plan to collect useful mutant strains and conduct functional analysis.

2. 背景と目的

本研究は、令和元年度に実施した研究「シンクロトロン光照射を利用した微生物の有用株取得」の継続実験である。

佐賀大学農学部応用微生物学研究室、藻類・ベントス学研究室では清酒酵母、麹菌、乳酸菌、微細藻類など様々な微生物を対象に研究を行なっている。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、また水圏環境分野ではその機能を解明する研究が行われている。酒類や発酵食品など、食品に微生物が関与する製品の場合、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。また水圏環境分野では、微細藻類などの微生物が環境浄化等にも関与しており、これらの機能解明、有用株作出も注目を浴びている。

我々は、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。

糸状菌などの微生物の場合、黄麹菌はシンクロトロン光による軟 X 線を変異源として用いた研究例があるが⁽¹⁾、紅麹菌、あるいは微細藻類の珪藻類においては前例がない。

そこで本実験では、紅麹菌、白麹菌、微細藻の珪藻を対象として、シンクロトロン光照射による変異誘発技術の確立を行う。さらに、紅麹菌では、実用菌を使用することで、シンクロトロン光照射により有用な特徴を有する紅麹菌の取得を目指す実験を実施する。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

実験材料

本実験に供する微生物株は、以下のものを用いた。

<紅麹菌> *Monascus purpureus* KT-1株

<白麹菌> *Apergillus kawachii* A株、B株、Kの3株

<珪藻> 有明海産 *Chaetoceros tenuissimus* Cten2-6株

<珪藻> 有明海産 *Chaetoceros tenuissimus* Cten2-10株

シンクロトロン光照射の条件

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)。(条件 (アルミ厚等) は、九州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、過去の実験条件を採用した。)

紅麹菌、白麹菌ともに、菌の孢子細胞を 0.01 % Tween 80 水溶液中に懸濁し、この液を 5ml ずつポリスチレン製プラスチック試験管内に入れ、キャップをした密閉状態で可動式作業台に粘着テープで固定し、各照射条件で照射を行なった。珪藻 Cten2-6 株、2-10 株についても同様に、珪藻細胞を Modified SWM-3 培地に懸濁し、この液を 5ml ずつ同試験管内に入れ、上記と同条件で照射を行なった。

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

表1. 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	1.70	0.92	0.52	0.30	none

シンクロトロン光照射後の培養（死滅率測定と変異処理手法の確立）

白麴菌A株については、各照射条件の試料の一部を段階希釈後、PDA培地に塗布し、30°Cで3日間培養した。培養後、生育したコロニー数を計測し、シンクロトロン光を照射しなかった試料と、照射した試料の生育コロニー数を比較することで、各吸収線量での死滅率を求めた。

珪藻Cten2-6株、2-10株については、照射後、各照射条件の試料をModified SWM-3培地で1/10ずつ段階的に希釈し、96穴培養プレート内に各希釈段階の液を100uLずつ分注して、7日間15°C100umol m⁻¹ S⁻¹の光（12:12=L:D）条件で培養した。培養後、96穴培養プレートで増殖細胞が確認できたwellを確認し、各条件で生育可能な希釈段階から計算によって照射直後の生残細胞数を求めた（限界希釈法）。照射した試料と照射していない試料の生残細胞数を比較することで、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（有用株の選抜）

<紅麴菌の生産するモノコリンK高生産候補株の選抜>

紅麴菌は、赤色色素、モノコリンK、シトリニンなどの低分子化合物である多様な二次代謝物質を生産する特徴を有する。モノコリンKは、摂取によりヒトのコレステロール値を低下させる作用をもつ有用な化合物である。本研究では、野生株に比べ、モノコリンKを高生産する変異株を取得するために、変異株のバイオアッセイによるスクリーニングを行なった。300 Gy のシンクロトロン光照射後に、寒天培地上で紅麴菌のプレート培養を行い、そこに酵母菌を懸濁した上層培地を注加した。モノコリンKは酵母菌の生育を阻止するため、モノコリンKをより高生産する紅麴菌コロニーは、野生株のコロニー周りに、より大きな阻止円をつくる。そこで親株よりも大きな阻止円を形成するコロニーを分離した。

<ウイルス抵抗性珪藻株の選抜>

珪藻は*Chaetoceros tenuissimus* Cten2-10株は、珪藻ウイルスのCten DNA virus type-II、およびCten RNA virus type-IIを接種する事で、約1週間後に完全に死滅することがわかっている。また、*C. tenuissimus* Cten2-6株は、Cten DNA virus type-IIを接種する事で、約1週間後に完全に死滅することがわかっている。

各線量のシンクロトロン光照射後のCten2-6株、2-10株に、珪藻ウイルスのCten DNA virus type-II、およびCten RNA virus type-IIを1ml摂取し、48穴培養プレートで2週間培養する事で、生残してきたコロニーをウイルス抵抗性能獲得候補株として分離し、さらに、形質が安定するまで継代することでウイルス抵抗性能獲得株を分離することとした。

4. 実験結果と考察

吸収線量毎の死滅率

<白麹菌 A 株の死滅率>

白麹菌 A 株の各種吸収線量での照射後の死滅率を測定した (図 1)。吸収線量を高くするに従って死滅率が高く、すなわち変異量が多くなっていると推定された。90%の死滅率を示した 300 Gy の吸収線量を与えるシンクロトン光照射条件を 3 株の白麹菌への変異導入に使用することに決定した。

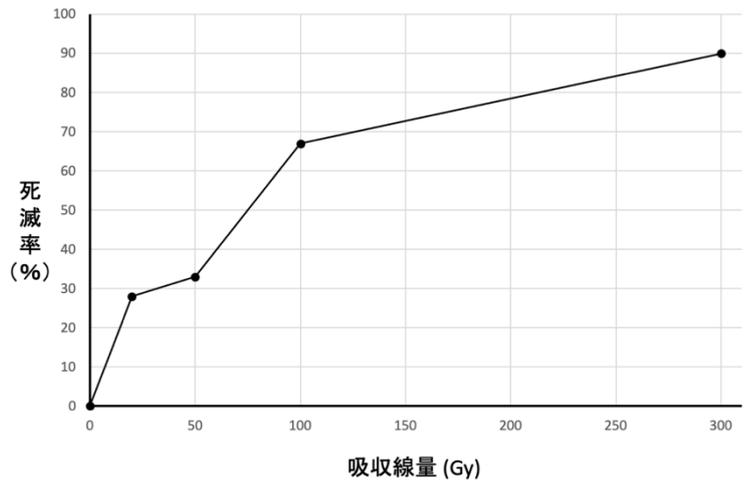


図 1 : 白麹菌 A 株の吸収線量による死滅率の違い

<珪藻 Cten2-6 株、2-10 株の死滅率>

珪藻 Cten2-6 株、2-10 株について、シンクロトンの照射を行った結果、図 2 に示すように、吸収線量が大きいくほど、死滅率が高くなることを確認した。本実験の結果から、300Gy 以上で安定して高い死滅率があることが分かった。前回実験でも、変異誘発を高効率で起こすため 300 Gy の吸収線量で実験を行うことが良いと結論づけたが、今回も同様の傾向を確認することができ、*C. tenuissimsu* では細胞や株等の状況によって照射エネルギーを変更する必要はないと考えられた。

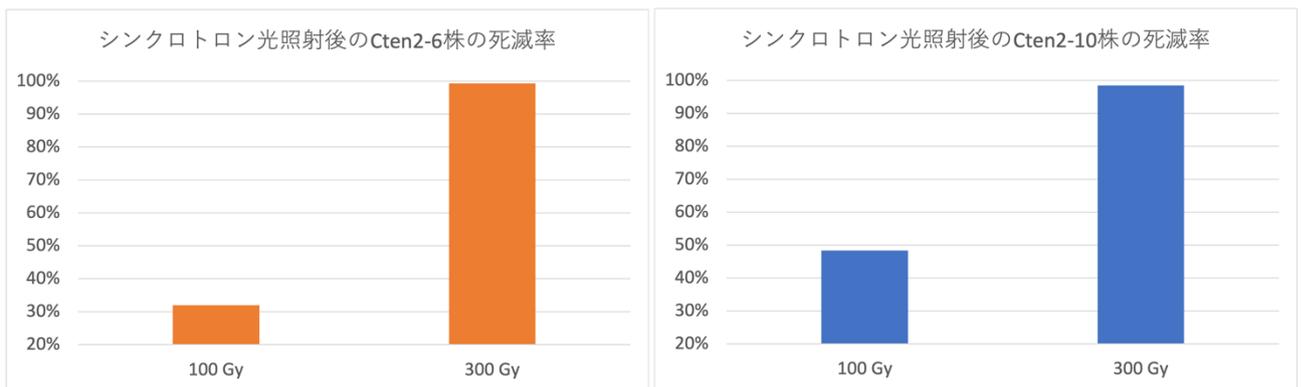


図 2 : 珪藻 Cten2-6 株、Cten2-10 株の吸収線量による死滅率の違い

シンクロトン光照射による候補株の分離

<紅麹菌モナコリン K 高生産候補株の選抜>

モナコリン K 高生産候補株は、寒天培地上で形成された紅麹菌約 1300 コロニーの中から、図 3 に示すように紅麹菌コロニーとそのまわりの透明な阻止円が大きい 6 株を選抜した (図 3 は 6 株のうち 1 株の結果)。これらの株を 5、6 回継代培養することで変異を固定化した。タイ米を用いて紅麹を作成した。野生株で作成した紅麹と比較して、130%~250% のモナコリン K 量を生産する 6 株のモナコリン高生産株を取得した

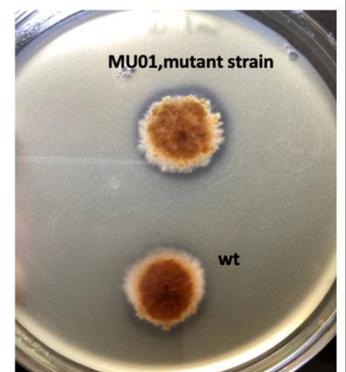


図 3 : 紅麹菌コロニー周辺の酵母菌育阻止円の形成

シンクロトロン光照射後の珪藻*Chaetoceros tenuissimus* Cten2-6株、2-10株に、珪藻ウイルスのCten DNA virus type-II、およびCten RNA virus type-IIを接種し、約2週間培養したところ、Cten 2-6株にCten DNA virus type-IIを接種して培養している複数の48穴培養プレート中で、1つのウェルのみにウイルスによる死滅後に生残してきたコロニーが確認された(図4)。これをウイルス抵抗性能獲得候補株として分離し、試験官にて形質が安定するまで継代培養を試みた。現在までに、3回以上の継代を繰り返しており、この期間を通して維持できることを確認した(図5)。この株を、Cten 2-6-SL-D2VR株と命名し、ウイルス抵抗性能獲得候補株として確立した。

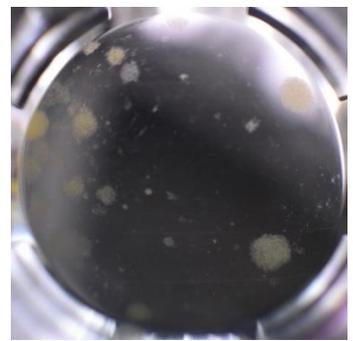


図4：コロニー状に生残した珪藻細胞

前回の実験では、実験中に細菌の増殖が確認され、珪藻株の増殖が不安定になることが確認された。これは煩雑な実験を実施する過程を簡略化するために、無菌系での実験を実施しなかった事により、細菌が混入したものと推察されていた。細菌の混入により、ウイルス感染性には変化が生じることが報告されていることから⁽²⁾、この事態を避けるため、今回の実験では、培養、照射、選抜培養の全ての過程で無菌を維持することに努めた。結果的に、シンクロトロン光照射後に細菌の混入は確認されなかった。

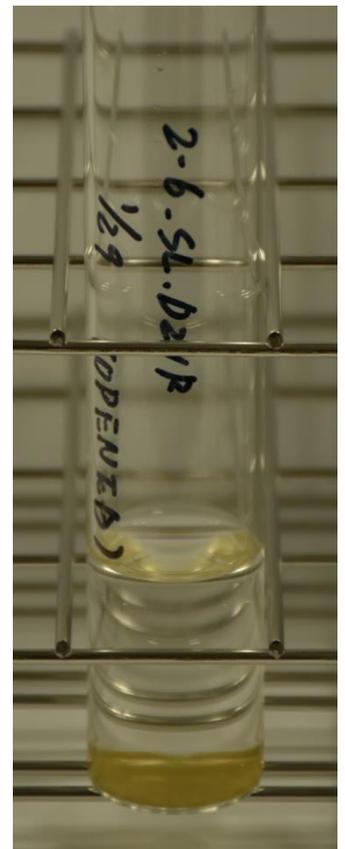


図5：ウイルス抵抗性能獲得候補株：
Cten 2-6-SL-D2VR株

5. 今後の課題

紅麹菌のモノコリンK高生産株の分離

紅麹菌については目的のモノコリンを高生産する株が取得できたので、ゲノム解析を行い変異点の同定とシンクロトロン光照射による変異の特性を明らかにしたい。また、他の二次代謝物の生産性等も調べ、発酵食品利用での可能性を明らかにする必要がある。

白麹菌のリパーゼ活性強化株の分離

白麹菌については、シンクロトロン光照射条件が決定できたので、目的であるリパーゼ高生産株の取得のためのスクリーニングを行う必要がある。プレート培養でのスクリーニング系は開発済みなので、野生株の2倍以上の高活性を示す株の取得をめざす。

珪藻Cten2-10株を対象としたウイルス抵抗性能を獲得した株の分離

今回のシンクロトロン光照射によって、Cten DNA virus type-IIに対して抵抗性を示すCten2-6株の選抜に成功し、ウイルス抵抗性能獲得候補株のCten 2-6-SL-D2VR株を確立した。今後は、この株と元株とのゲノム比較を実施することで、どの遺伝子の変異によってウイルス抵抗性が獲得されたのかを解明するとともに、DNAウイルスの感染過程解明に、本株を種々の解析に用いる予定である。

6. 参考文献

- (1) Chen Liang et al. (2007) The radiation effects of aspergillus oryzae spores with soft x-rays near the K shell absorption edges of C, N, O elements from synchrotron radiation. Journal of Radiation Research and Radiation Processing. 4:2-11.
- (2) Kimura K, Tomaru Y (2014) Coculture with marine bacteria confers resistance to complete viral lysis of diatom cultures. Aquat Microb Ecol. 73:69-80.

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）

紅麹菌、白麹菌、珪藻、モナコリン K 高生産株、ウイルス抵抗性株

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：2022年 3月 予定）