

(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3)
Acquisition of useful micro-organisms strains by using the mutagenesis method
by synchrotron irradiation (Study 3).

木村圭・馬場嵩一郎・水戸誠也・中島菜々子・前田望愛・小林元太
Kei Kimura, Shuichiro Baba, Seiya Mito, Nanako Nakashima, Noa Maeda, 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)

清酒酵母が発酵過程で産生する代謝物は清酒の味や香りに大きく影響を与える。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。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実例は少ない。しかしながら、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、酵母、珪藻を実験対象に、シンクロトロン光による変異誘発によって、清酒の良好な香气成分とされるカプロン酸エチル高生産酵母の取得およびRNAウイルス抵抗性珪藻株の取得を試みた。まず、これまでの研究で確立した、各微生物に適した吸収線量ごとの死滅率を確認した。酵母については、カプロン酸エチル高生産候補株を135株取得することに成功し、取得株の発酵試験まで終えている。現在、培養液上清の成分分析を実施している段階である。珪藻については、RNAウイルス抵抗性能獲得候補株を複数取得している。今後、これらの変異株の性状解析、ゲノム解析等を実施する予定である。

(English)

The metabolites produced by sake yeasts during fermentation have a significant effect on the taste and flavour of sake. Diatoms, on the other hand, are important marine microorganisms involved in red tides and environmental purification. In the past, various mutagenesis methods have been used to obtain high production mutants of useful substances in microorganisms. However, there are few examples of using synchrotron radiation as a mutagen to introduce mutations into useful microbial strains. However, we have succeeded in obtaining yeast strains with useful traits by irradiation with synchrotron radiation. In this study, we attempted to obtain a high caproic acid ethyl producing yeast strain and an RNA virus resistant diatom strain by mutagenesis of yeast and diatom using synchrotron radiation. First of all, the death rates for each absorbed dose suitable for each microorganism, which have been established in previous studies, were confirmed. As for yeast, we have succeeded in obtaining 135 candidate strains for high caproic acid ethyl production, and have completed fermentation tests of the obtained strains. Component analysis of the supernatant of the culture liquid is currently being carried out. In the case of diatoms, we have acquired several candidate strains that have acquired RNA virus resistance. We plan to carry out characterisation and genome analysis of these mutant strains in the future.

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。

- <酵母> *Saccharomyces cerevisiae* Y5201株
- Saccharomyces cerevisiae* DMSS233 Nf-14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。)

清酒酵母 Y5201 株、DMSS233-14 株ともに、0.85%生理食塩水に懸濁し、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、各条件で照射を行なった。各試験管内の細胞数は 5.0×10^6 cells/mL に揃えた。珪藻 Cten2-10 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）

酵母については、先行研究の結果をもとに300 Gyの照射条件のみで変異誘発処理を行った⁽¹⁾。

清酒酵母Y5201株、DMSS233 Nf-14株ともに、照射試料の一部を段階希釈後、YPD寒天培地に塗布し、30°Cで2日間培養した。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試料の生育コロニー数を比較することで、死滅率を求めた。

珪藻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20°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）

<清酒酵母の生産するカプロン酸エチル高生産候補株の選抜>

清酒酵母のカプロン酸エチル高生産候補株の選抜は、セルレニン耐性株の取得および発酵試験のフローで行った。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生合成を阻害する。その為、セルレニン耐性試験により、カプロン酸エチル高生産株のスクリーニングが可能となる⁽²⁾。本研究では、300 Gyで変異誘発処理したY5201株およびDMSS233 Nf-14をセルレニン培地（2μg/mL）に塗布し、30°Cで4-5日間培養した。生育したコロニーを再度、セルレニン培地に植継ぎを行い、生育が良好であった株をセルレニン耐性株とした。これらのセルレニン耐性株について、麴エキス培地での発酵試験（12°C, 20日間）を行い、培養液上清の分析を行った。

<ウイルス抵抗性珪藻株の選抜>

珪藻*Chaetoceros tenuissimus* Cten2-10株は、珪藻ウイルスの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。

100 Gy, 300 Gyの線量のシンクロトロン光照射後のCten2-10株を滅菌プラスチックコ内に集め（約500 mL）、珪藻ウイルスのCten RNA virus type-IIを5 mL摂取し、48穴培養プレート10枚（各ウェルに1 mL）に分注して2週間培養した。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の分離を試みることにした。

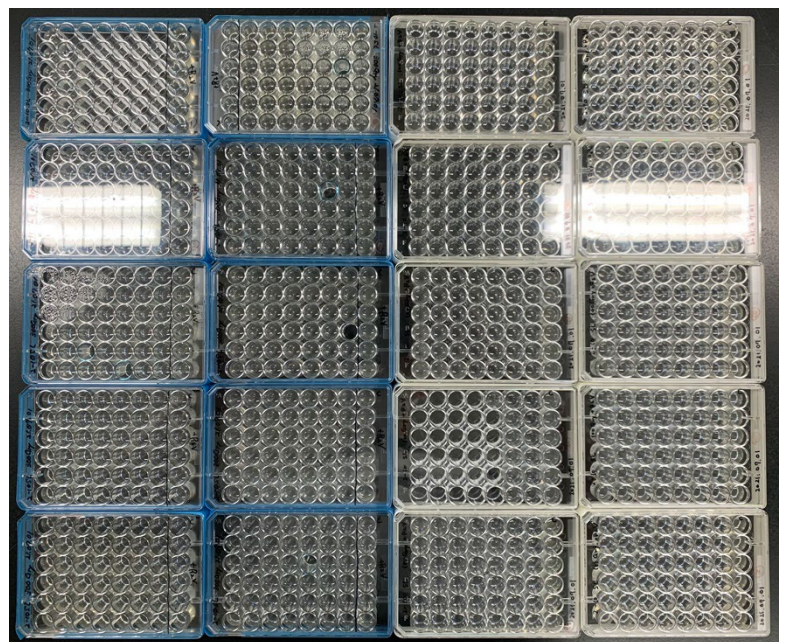


図 1：培養プレートによるウイルス抵抗性珪藻株の分離

4. 実験結果と考察

吸収線量毎の死滅率

<Y5201 株、DMSS233 Nf-14 株の死滅率>

清酒酵母 2 株の吸収線量 300 Gy での死滅率を算出した (図 2)。先行研究では同条件で 96.5% の死滅率だったが⁽¹⁾、本実験では 2 株とも 62.3% の死滅率であった。本実験では先行研究と比較して、菌数を 1 桁低く調整したため、その点が死滅率に影響したと考えられる。実験ロットで死滅率の変動はあったが、酵母においては吸収線量 300 Gy での実験が好ましいと思われる。

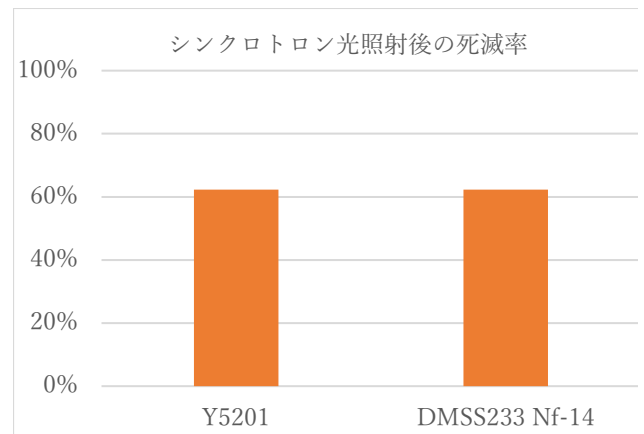


図 2 : 各清酒酵母株の 300 Gy 条件下での死滅率

<珪藻 Cten2-6 株、2-10 株の死滅率>

珪藻 2-10 株について、シンクロトロン照射を行った結果、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。これはこれまでの結果と同様である。前回、今回の実験結果において、300 Gy 以上で安定して 95%以上の死滅率があることが分かったが、100 Gy における死滅率は 40%台~80%台と実験によって変動があった。これは、毎回変化する培養条件や照射実験条件の影響であろう。いずれにせよ、本珪藻の変異誘発実験では、高効率で変異を起こす 300 Gy と、それよりは弱い条件となる 100 Gy で実験を行うことが良いと考えられる。

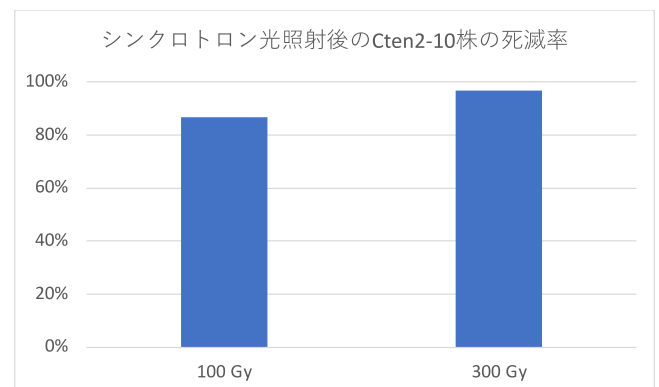


図 3 : Cten2-10 株の各吸収線量における死滅率

シンクロトロン光照射によるカプロン酸エチル高生産候補株のスクリーニング

<セルレニン耐性試験>

吸収線量 300 Gy のシンクロトロン光照射後の Y5210 株および DMSS233 Nf-14 株について、試験管内の細胞懸濁液を遠心分離により濃縮後、2 μ g/mL のセルレニン培地に塗布し、培養を行った。その結果、Y5201 株からの派生株 146 株、DMSS233 Nf-14 株からの派生株 3 株の生育を確認した。続いて同培地に植継ぎを行い、再度培養を行った結果、Y5201 株をからの派生株 132 株、DMSS233 Nf-14 株からの派生株 3 株はセルレニン培地上で生育が良好だったため、これら 135 株のセルレニン耐性株を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珪藻 Cten2-10株に、珪藻ウイルスCtenRNA virus type-IIを接種し、約2週間培養したところ、複数の48穴培養プレートのウェル中に、ウイルス感染から生残してきたコロニーが確認された。これらのコロニーを複数分離し、試験官にて形質が安定するまで継代培養を試みた。その中で成長が良く、安定して培養できている株を、RNAウイルス抵抗性能獲得候補株として分離した。現在までに、3回以上の継代を繰り返しており、一月以上の期間を通して維持できることを確認している(図4)。この株を、Cten 2-10-SL-R2VRシリーズ株と命名し、ウイルス抵抗性能獲得候補株として確立した。

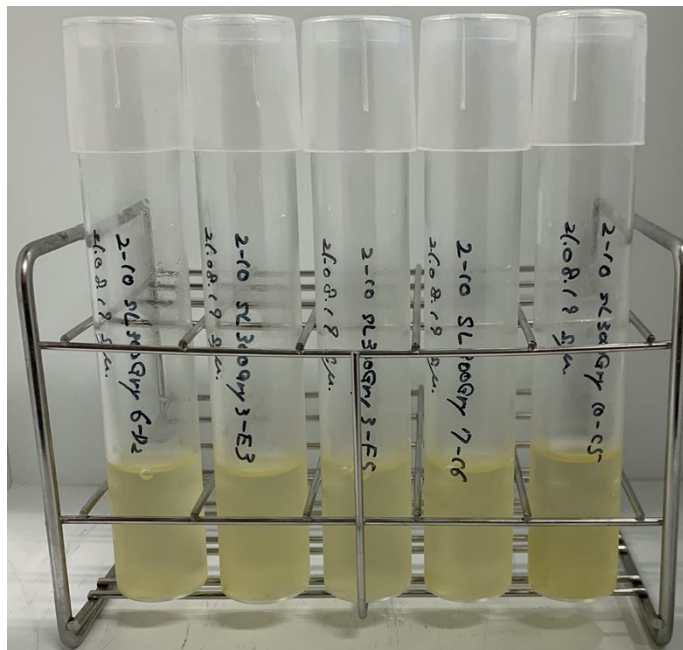


図4：分離したウイルス抵抗性能獲得候補株

前前回の実験では、実験中にバクテリアの増殖が確認され、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、バクテリアが混入したものと推察されていた。バクテリアの混入により、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³⁾、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バクテリアの大規模な混入は今のところ確認されていない。

5. 今後の課題

カプロン酸エチル高生産候補株の発酵試験および小仕込試験

本実験で取得した135株カプロン酸エチル高生産候補株について、麴エキス培地による発酵試験を行った。今後は、発酵試験の培養液上清について成分分析を行う。まずはHPLCにより、カプロン酸エチルの前駆体物質であるカプロン酸を分析し、その後GC-MSによりカプロン酸エチルの定量を行う。これらの分析結果でカプロン酸エチル高生産株を選抜後、小スケールでの醸造試験により、醸造特性を解析していく予定である。

珪藻 Cten2-10-SL-R2VR 株の性状解析

今回のシンクロトロン光照射によって、CtenRNA virus type-IIに対して抵抗性を示すCten2-10株の選抜に成功し、ウイルス抵抗性能獲得候補株のCten 2-10-SL-R2VRシリーズ株を確立した。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、RNAウイルス感染過程解明の生理学的研究に、本株を用いる予定である。

6. 参考文献

- (1) Baba, S., et al. (2021) Breeding sake yeast and identification of mutation patterns by synchrotron light irradiation. *J. Biosci. Bioeng.*, **132**, 265-270.
- (2) 市川英治. (1993) カプロン酸エチル高生産酵母. 日本醸造学会誌, **88**, 101-105.
- (3) 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）

清酒酵母、珪藻、カプロン酸エチル高生産酵母、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：2023年 3月 予定）