



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：1908065R

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 Acquisition of useful micro-organisms strains by using the mutagenesis method by synchrotron irradiation.

木村圭・松中南・濱崎友宏・馬場嵩一郎・後藤正利・小林元太
Kei Kimura, Minami Matsunaka, Tomohiro Hamasaki, 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。また清酒酵母は清酒製造に欠かせない微生物であり、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。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実例は少なく、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、酵母株のほか、紅麹菌、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に成功し、変異誘発法の確立に向けて前進した。一方で、各微生物の有用変異株取得については、現在分離を試みている段階である。今後、有用変異株取得を引き続き継続する予定である。

(English)

Monascus is a microorganism used in the production of any fermented food such as "tofuyo", and produces useful substances such as lovastatin. Sake yeast is a microorganism that is indispensable for sake production and greatly affects the taste and aroma of sake. 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 a yeast strain having a useful character by irradiation with synchrotron light. This time, in addition to yeast strains, we used monascus and diatoms to new 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 are currently trying to isolate useful mutants of each microorganism. In the future, we will continue to acquire useful mutants.

2. 背景と目的

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) やニトロログアニジン (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、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> タイの市場の紅麹菌 KT-1株

<清酒酵母> 一倍体酵母 RIB2001株

<清酒酵母> 有明海干潟分離株 H3-1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、適宜、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。)

紅麹菌 KT-1 株では、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 Cten2-10 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。

清酒酵母 RIB2001 株、および H3-1 株は、同試験管内の 5ml 生理食塩水中に懸濁し、同様の条件で照射を行った。

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）

紅麹菌KT-1株については、各照射条件の試料の一部を段階希釈後、*Monascus*用合成デンプン寒天培地に塗布し、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Cten2-10株については、10倍に濃縮して照射する系と濃縮せずに照射する系を準備した。照射後、各照射条件の試料をModified SWM-3培地で段階希釈し、96穴培養プレート内に各希釈段階の液を100 μ Lずつ分注して、7日間15°C100 μ mol m⁻² 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。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。

清酒酵母はRIB2001株を段階希釈後、YPD寒天培地に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（有用株の選抜）

<紅麹菌アミラーゼ高生産候補株の選抜>

麹菌は、一次代謝を行うためにデンプン等の炭素栄養源を分解するアミラーゼを分泌する。アミラーゼの生産が多いほど一次代謝の進行が早くなり、二次代謝への移行が早まると期待される。そこで、二次代謝物であるロバスタチン等の有用物質を早期に生産する株の取得のため、アミラーゼ活性の高い株の選抜を試みた。紅麹菌のアミラーゼ高生産株の選抜に当たり、培地の炭素栄養源を不溶性デンプンとした*Monascus*用合成デンプン寒天培地を使用し、株の選抜を行った。アミラーゼは、菌体外に分泌され、コロニー周辺のデンプンを分解する。不溶性デンプンを用いることで、アミラーゼによるコロニー周辺のクリアゾーンを確認することが可能であるため、この手法を糖化力の指標とした。

上記の死滅率測定実験で、100 Gy、および300 Gyのシンクロトロン光照射後に、*Monascus*用寒天培地で生育してきたコロニーから、クリアゾーンが比較的大きいものを、アミラーゼを高生産することが期待される株として分離した。さらに、生育した株を4、5回に渡って継代し、形質が安定化したものをアミラーゼ高生産候補株とした。

<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を摂取する事で、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Cten2-10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。

< 香気成分高生産候補株の選抜 >

清酒酵母の香気成分高生産株の選抜に当たり、tert-Butyl Hydroperoxide (TBHP) を用いて選抜を行った。プラスチック試験管内のH3-1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で培養した。

4. 実験結果と考察

吸収線量毎の死滅率

< 紅麹菌 KT-1 株の死滅率 >

紅麹菌 KT-1 株の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。

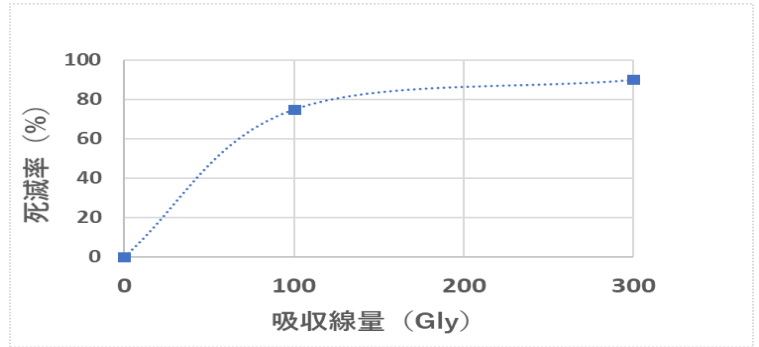


図1 : KT-1 株の吸収線量による死滅率の違い

< 珪藻 Cten2-10 株の死滅率 >

珪藻 Cten2-10 株については、細胞数を 10 倍に濃縮して照射した実験系(濃縮実験系)と濃縮していない実験系(非濃縮実験系)の2系統で実験を行なった。シンクロトロン照射を行った結果、図2に示すように、吸収線量が増加することで死滅率が上昇する傾向を確認した。本実験の結果から、300 Gy の吸収線量において、それぞれ 96、99%の死滅率があることが分かり、高効率で変異を誘導する場合は、300 Gy の吸収線量で実験を行うことが良いと結論づけられた。一方で、より弱い線量の 5 Gy での実験の方が、より強い線量の 20 Gy の場合よりも死滅率が高くなっており、実験におけるばらつきが生じる可能性も考えられた。

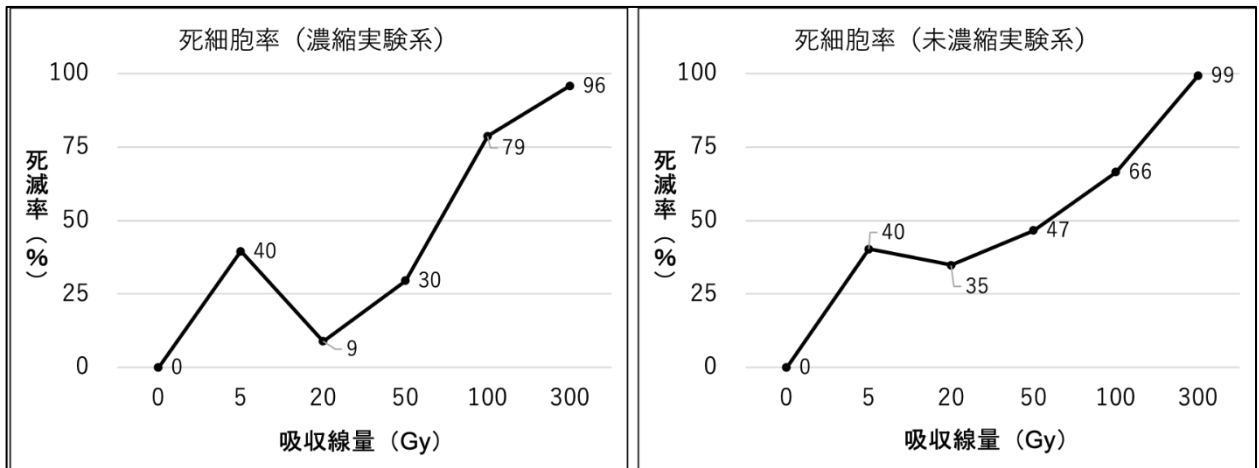


図2 : Cten2-10 株の吸収線量による死滅率の違い

< 清酒酵母 RIB2001 株の死滅率 >

RIB2001 株についてシンクロトロン光照射を行った結果、図3に示すような死滅率の違いがあることが分かった。前回のトライアル実験で用いた報告と比較すると 5Gy の吸収線量において 99%ほどの死滅率があることから 2 倍体酵母よりも高い確率で死滅していることがわかり、倍数性の違いによって死滅率が増加したと考えられる。

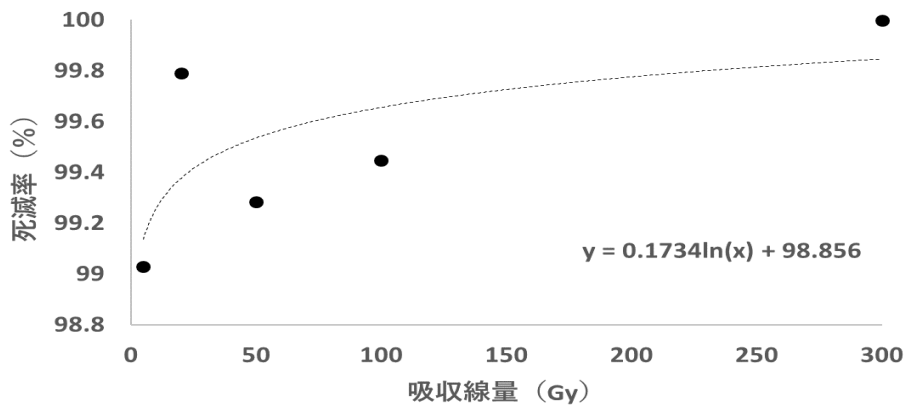


図3：RIB2001株の吸収線量による死滅率の違い

シンクロトロン光照射による候補株の分離

<紅麹菌 アミラーゼ高生産候補株の選抜>

アミラーゼ高生産候補株は、照射後 *Monascus* 用合成デンプン寒天培地に生育した約 4500 株の中で、コロニーとハローが比較的大きい 225 株を選抜した。これらの株を 5、6 回継代し、コントロールと比較してハローが 1.1~1.3 倍大きいアミラーゼ高生産候補株を取得した。

<清酒酵母の香り成分高生産候補株の分離>

珪藻 *Chaetoceros tenuissimus* Cten2-10 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 週間後に観察すると、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、形質が安定するまで継代培養を試みたが、その後十分に生育することはなかった。

一方で、実験中に細菌の増殖が確認され、Cten2-10 株の増殖が不安定になることが確認された。Cten2-10 株は本来無菌株であるが、今回は煩雑な実験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、細菌がシンクロトロン光照射から培養に至る過程で過程で混入したものと推察される。これまでに、珪藻は細菌存在下でウイルス抵抗性を示すことを報告しており⁽²⁾、今回の生残細胞は変異によるものだけでなく、細菌の存在でウイルスから生残してきたものも多く含んでいることが予想された。また、生残細胞の不安定性は、混入している細菌の影響によるものとも示唆された。

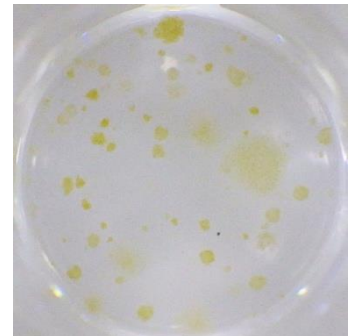


図4：コロニー状に生残した珪藻細胞

<清酒酵母の香り成分高生産候補株の分離>

香り成分高生産候補株は、プラスチック試験管内の懸濁液試料から 4mM TBHP 培地への接種し培養を行ったところ、50 日ほど培養を続けたが候補株の取得には至らなかった。

前回と同様の操作で香り成分高生産候補株を分離した際には、親株に対して TBHP の最小生育阻害濃度の試験を行ったうえでこの分離方法を用いていたが、今回は行っておらず、適切な濃度での選抜が行えていなかったため候補株の取得に至らなかったと考えられる。

5. 今後の課題

麦を使った紅麹の培養によるアミラーゼ高生産株の選抜

現在までに、アミラーゼ高生産候補株を合計で 24 株取得しているが、実際にアミラーゼを高生産するかどうかの裏付けができていない。その為、本実験でアミラーゼ高生産候補株として選抜した株を対象に、候補株と変異前の株を用いて、麦の固体培養による糖化力測定を行い、実際にアミラーゼを高生産

する株を絞り込む必要がある。同時に、照射によってロバスタチン生産能が低下している可能性も考慮し、ロバスタチン生産能の確認を同時に行う。今後、この2つの分析を実施することで、ロバスタチンを高生産し、アミラーゼも高生産する有用株を取得する予定である。

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、および Cten RNA virus type-II に対して抵抗性を示す Cten2-10 細胞の増殖を確認した。しかしながら、この生残はバクテリアの混入が原因である可能性も浮上している。今後は、実験過程でのバクテリアの混入を避けるため、完全無菌系で実験を実施することが必要である。本実験によって、珪藻 Cten2-10 株に対する最適な照射条件を確立したため、今後は条件を限定することで実験を簡素化することで、無菌系で実験を行いやすくする予定である。

香気成分高生産候補株の分離

今回、香気成分高生産候補株を取得することができなかった。今後、改善点を精査したのちに、再度シンクロトロン光照射を行い、有用株の分離を試みる予定である。

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、珪藻、酵母、アミラーゼ高生産株、ウイルス抵抗性株、香気成分高生産株

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)