

群馬KAZE酵母のカナバニン感受性が抑えられている原因調査

渡部貴志・佐藤勝也*・大野 豊*・田島 創

Study on the mechanism to repress the canavanine sensitivity of Gunma KAZE yeast
WATANABE Takashi, SATOH Katsuya, Oono Yutaka and TAJIMA So

清酒中のカルバミン酸エチルは、発がん性が疑われているため、その前駆物質である尿素を生産しない酵母の育種が進められている。尿素非生産性酵母は、カナバニン耐性を指標に選抜されるが、群馬KAZE酵母はカナバニン感受性が抑制されている。そこで本研究では、群馬KAZE酵母のアルギニン代謝遺伝子とアルギニン取り込み、硫黄代謝関連遺伝子について解析した。また、セルレニン耐性株が多剤耐性にならないようにグリセロールを炭素源に用いられることに着目し、群馬KAZE酵母3号に適したCAO培地を作成した。

キーワード：清酒、カナバニン、尿素非生産性酵母、アルギニン

Because ethyl carbamate, included in sake, is considered as probably the cause of cancer, breeding yeasts which do not produce urea, a precursor of ethyl carbamate, are being promoted. Although, non-urea producing yeast strains can be selected as canavanine resistant yeast, the growth of Gunma KAZE yeast cannot be repressed on the CAO medium. In this study, we investigated the arginine and sulfur metabolite genes and arginine uptakes of the Gunma KAZE yeast. By focusing the use of glycerol as a carbon source to prevent cerulenin resistant yeasts acquiring multi-drug resistant, we improved a CAO medium suitable for KAZE3.

Keywords: Japanese sake, canavanine, non-urea producing yeasts, arginine

1 はじめに

群馬KAZE酵母は、(公財)日本醸造協会の清酒酵母きょうかい901号(K901)を親株とし、セルレニン耐性により育種したカプロン酸エチル高生産性株であり¹⁾、群馬県内の酒造会社に広く頒布している。ところで、清酒中に含まれるカルバミン酸エチルは、発がん性が疑われているため、清酒の海外輸出促進の妨げになると考えられている。カルバミン酸エチルは、酵母細胞内でアルギニンをオルニチンと尿素に分解し、その尿素と清酒中のアルコールから縮合して生成する。清酒中のカルバミン酸エチル含量を下げるためには、尿素非生産性酵母を用いることが有効である。

食品化学開発係

*量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所

以前我々は、北本らの報告²⁾による、アルギニンのアナログ物質であるカナバニンを含むCAO培地を用いた選抜方法により、群馬KAZE酵母2号(KAZE2)の尿素非生産性を試みた。しかしながら、報告の組成では生育抑制がかかりにくく、カナバニン硫酸塩を用いたときは、生育抑制のかかり難さがより顕著であった³⁾。検討の結果、前培養菌体を無窒素YNB培地で培養して窒素飢餓状態にし、アルギニンとオルニチンの添加量を半分にした改変CAO培地を用いることで、KAZE2の生育を抑えることが可能となった³⁾。また、自然変異によるKAZE2の尿素非生産性株は、発酵力が下がった³⁾。そこで、イオンビームを用いた変異誘発処理により、発酵力の低下しないKAZE2の尿素非生産性株を取得⁴⁾し、実用化に成功している。

一方、群馬県独自酵母は、群馬KAZE酵母1号～4号だけでなく、群馬227酵母(No. 227)⁵⁾、群馬G2酵母⁶⁾などがある。群馬KAZE酵母のカナバニン感受性が抑えられている原因を解明することは、他の群馬県独自酵母の尿素非生産性を推進するだけでなく、各県の独自酵母の尿素非生産性に重要な情報提供となり、清酒の海外輸出の促進に繋がると考えた。

これまでの検討結果や既存の報告から、群馬KAZE酵母のカナバニン感受性が抑えられている原因として、以下の2つのことが仮説として考えられた。

仮説①カプロン酸エチル高生産化の過程で行ったEMS処理によって、脂肪酸合成遺伝子*FAS2*の変異だけでなく、アルギニン代謝関連遺伝子にも変異が入っている。

仮説②カナバニン耐性化には窒素飢餓とは直接的には関係なく、セルレニン耐性化と共通の遺伝子が関与している。

本研究では、上記2点の仮説の検証を行った。また、イオンビーム照射により群馬KAZE酵母3号(KAZE3)の尿素非生産性化に取り組んだので報告する。

2 実験材料と方法

2.1 供試酵母

群馬県独自酵母であるKAZE1～KAZE4、No. 227は、県内酒蔵に頒布しているスラントのものを使用した。KAZE1の親株は、平成4年度に頒布していたK901-H4BYであるため、冷凍保存していたものを用いた。また、(独)酒類総合研究所から分譲していただいたK901-RIB、K10-RIBおよびK1701-RIBを用いた。

2.2 遺伝子の配列解析

KAZE1～KAZE4、K901-RIBのゲノムDNAは、GenとるくんTM酵母用(High Recovery)(タカラバイオ(株)製)を用いて抽出した。K701の公開ゲノム情報を基に、アルギニントランスポーター遺伝子*CAN1*とアルギナーゼ遺伝子*CAR1*の上流600 bp、下流300 bpを含む遺伝子断片を増幅できるようにプライマーを設計した(表1、2)。PCR反応は、KOD-FX(東洋紡(株)製)を用いて行った。

表1 *CAN1*用プライマー

NAME	Nucleotide
CAN1 F -600	5'-GCAAAGGCCACAGAACCGTATTCATG-3'
CAN1 F -50	5'-TCTTCAGACTTCTTAACCTCCTGTAATAA-3'
CAN1 F +500	5'-CGGCCAATGGTTACATGTATTGGTTTT-3'
CAN1 F +1050	5'-TTCCAAGAGCCATCAAAAAAGTTGTTTT-3'
CAN1 F +1600	5'-ATTTTCCTGTTCTTAGCTGTTTGGATC-3'
CAN1 R +2073	5'-ACGAAAAATGAGTAAAAATTATCTTC-3'
CAN1 R +1523	5'-GATCGTCATAAATGTGGCCGCATAATA-3'
CAN1 R +973	5'-ACAACTTTTTTGTAGTCTTGTGAACG-3'
CAN1 R +423	5'-CACCCAAGGACTGCGTGACAGAATATG-3'
CAN1 R -127	5'-TTCTGTTCCAGATATATACGTAATAA-3'

表2 *CAR1*用プライマー

NAME	Nucleotide
CAR1 F -600	5'-GATTTTTACATACCGTATATCCAATT-3'
CAR1 F -100	5'-AAGATCTAAGACTGTTTCTCTTCTCTT-3'
CAR1 F +400	5'-TTGACAAATACCCCGATGCTGGTCTT-3'
CAR1 F +900	5'-TGAATGTAACCCGTGATCTGGCATTTCA-3'
CAR1 R +1302	5'-AAAGGCCCCACCGTTGGTGCAGGTGG-3'
CAR1 R +802	5'-GTAGCAGGAATGTATAATGGGTCTACA-3'
CAR1 R +302	5'-CAACTTGGTGGCTTCCACCAACCAATC-3'
CAR1 R -198	5'-ATTGCCATTAGCAGCACGGTGGCTTTC-3'

PCR産物は、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up(タカラバイオ(株)製)を用いて精製した。精製したPCR産物にBigDye Terminator Cycle Sequence V3.1 Kit(Applied Biosystem社製)を用いて蛍光標識を付加した後、エタノール沈殿により精製し、ABI3100 automatic DNA sequencer directly(Applied Biosystem社製)を用いて塩基配列の解析を行った。

2.3 アルギニン取り込み試験

前培養では、試験管に5 mLのYM培地(酵母エキス3 g/L、麦芽エキス3 g/L、ペプトン5 g/L、グルコース10 g/L)を加え、酵母を一白金耳接種し、30℃にて24時間、150 rpmの振盪培養を行った。

本培養は、AO培地(YNB w/o amino acids and ammonium sulfate 1.7g/L、オルニチン塩酸塩0.84g/L、アルギニン塩酸塩0.21g/L、グルコース20g/L)、またはYD培地(酵母エキス10 g/L、グルコース20 g/L)30 mLを300 mL容三角フラスコに加え、滅菌蒸留水に置換した前培養液30 μLを接種し、30℃で200 rpmの振盪培養を行った。培養12、24、32時間後に培養液を1 mL採取し、菌体増殖量をOD₆₆₀で測定した。また、遠心上清(10,000 rpm×1分間)のアルギニン濃度をOPA(o-phthalaldehyde)ポストカラム誘導

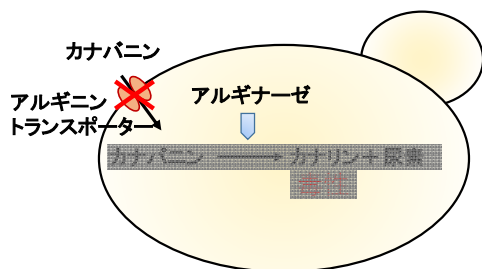
体化-蛍光検出法により分析した。

2. 4 尿素非生産性株の選抜方法

酵母菌体を酢酸セルロースメンブランフィルターに固定化後、滅菌済みシャーレ内に設置し、カプトン膜で上面を覆ったものをイオンビーム照射用試料とした。量研機構高崎量子応用研究所TIARAにて、AVFサイクロトンをを用いて加速した炭素イオンビーム ($^{12}\text{C}^{5+}$, 220MeV) を200~300 Gyの線量で照射した。

10 mLのYPD培地 (酵母エキス10 g/L、ペプトン20 g/L、グルコース20 g/L) を照射試料に加え、室温で静置による回復培養を3時間行った後、遠心分離 (3,000 rpm × 1分間) により菌体を回収した。窒素飢餓処理は、無窒素YNBD培地 (YNB w/o amino acids and ammonium sulfate 1.7 g/L、グルコース20 g/L) を5 mL加えて菌体を懸濁し、30°Cで150 rpmの振盪培養を3時間行った。得られた培養液をKAZE3用改良CAO培地 (YNB w/o amino acids and ammonium sulfate 1.7 g/L、カナバニン5 mg/L、カナバニン硫酸塩7.5 mg/L、アルギニン塩酸塩0.105 g/L、オルニチン塩酸塩0.42 g/L、グリセロール20 g/L、寒天20 g/L) に塗布した。

カナバニン耐性となり改良CAO培地に生育した候補株について、Arg培地 (YNB w/o amino acids and ammonium sulfate 1.7 g/L、アルギニン塩酸塩0.105 g/L、グルコース20 g/L、寒天20 g/L) で生育できず、且つOrn培地 (YNB w/o amino acids and ammonium sulfate 1.7 g/L、オルニチン塩酸塩0.42 g/L、グルコース20 g/L、寒天20 g/L) で生育できるものを尿素非生産性酵母として選抜した。



仮説1
アルギニントランスポーター (*CAN1*) が
不活性化 (発現が低下) している

図1 仮説①のイメージ

3 結果と考察

3. 1 アルギニン代謝遺伝子の解析

酵母細胞外のアルギニンは、アルギニントランスポーター*Can1p*により細胞内に取り込まれ、アルギナーゼ*Car1p*によりオルニチンと尿素に分解され、窒素源として利用される。カナバニンは、同じく*Can1p*により菌体内に取り込まれ、*Car1p*によりカナリンと尿素に分解されるが、カナリンには毒性があるため、酵母細胞が死滅する。このことから、群馬KAZE酵母のカナバニン感受性が抑えられている原因の仮説①として、アルギニン代謝関連遺伝子に変異が生じている可能性を考えた (図1)。

そこでまず、群馬KAZE酵母の*CAN1*、*CAR1*の配列解析をしてみたところ、KAZE1~KAZE4の各遺伝子配列は、上流下流領域含めて全て親株K901-H4と同じ配列であり、変異は生じていなかった。なお、カナバニンはジェネラルアミノ酸トランスポーター*Gap1p*やもう一つのアルギニントランスポーター*Alp1p*からは取り込まれにくいことが知られている。

3. 2 アルギニン取り込みの解析

遺伝子配列には変異が入っていなかったが、*CAN1*の発現を制御する遺伝子群に何らかの変異が入っており、*CAN1*の発現が抑制されている可能性は残されている。

そこで、それぞれの株の*CAN1*の発現解析を行うため、アルギニンとオルニチンのみを窒素源としたAO培地で培養したところ、親株K901-H4に比べてKAZE酵母はいずれも増殖の遅延があった (図2)。

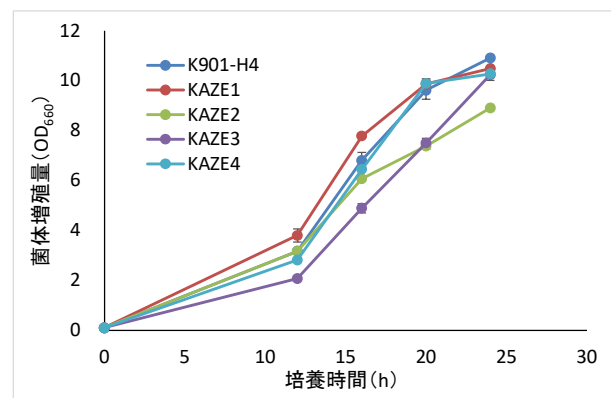


図2 AO培地での酵母の増殖曲線
3回の独立した試験の平均値を示す。

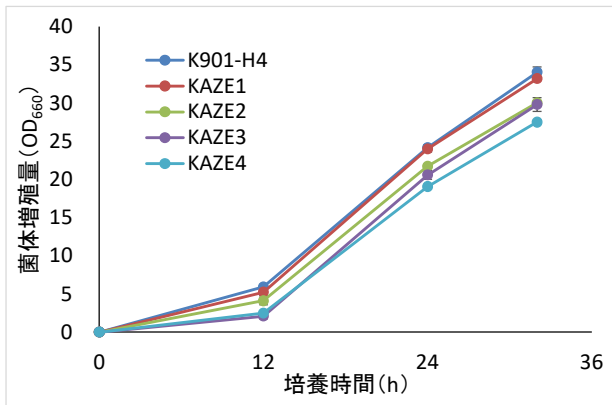


図3 YD培地での増殖曲線

3回の独立した試験の平均値を示す。

表3 KAZE酵母のアルギニン取り込み量

	Arginine ppm/OD ₆₆₀	
K901-H4	4.9 ± 0.3	
KAZE1	5.0 ± 0.4	
KAZE2	5.9 ± 0.3	
KAZE3	6.3 ± 0.2	
KAZE4	6.8 ± 0.3	

3回の独立した試験の平均値を示す。

一方、AO培地での培養で、12時間から16時間の菌体増殖とアルギニン取り込み量の比は、株間で差は認められなかった（データ省略）。そこで富栄養培地であるYD培地で培養を行ったところ、群馬KAZE酵母3号と4号の増殖が培養初期に遅れがちであり、32時間後の2～4号の菌体量は親株K901-H4より2割程度低くなっていた（図3）。また、12時間から24時間の菌体増殖とアルギニン取り込み量の比は、親株K901-H4が一番低かったことから（表3）、KAZE酵母のアルギニン取り込みは抑制されていないことが分かった。これは、親株の方がKAZE酵母より増殖速度が速く、12時間後までのアルギニン取り込み量も多くなり、培地中に残存するアルギニンの量が少なくなり、24時間後との差分が少なくなったためと考えられる。KAZE酵母のCAN1の発現量は、RT-PCRなどで解析してはいない。しかしながら、以上のことから、CAN1の発現が弱くなってアルギニンの取り込み活性が下がり、カナバニン感受性が下がっているという仮説①は成り立たないことが分かった。

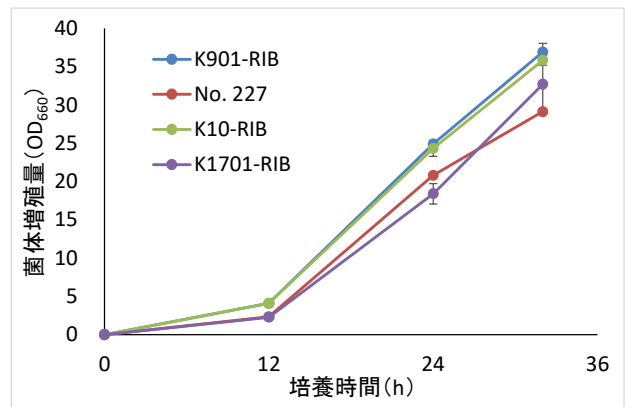


図4 他の酵母での増殖曲線

3回の独立した試験の平均値を示す。

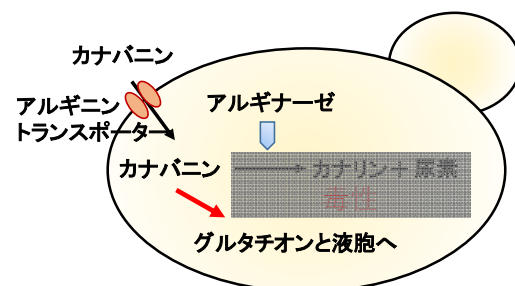
表4 他の酵母のアルギニン取り込み量

	Arginine ppm/OD ₆₆₀	
K901-RIB	6.7 ± 0.3	
No. 227	7.8 ± 0.8	
K10-RIB	6.7 ± 0.3	
K1701-RIB	8.9 ± 0.3	

3回の独立した試験の平均値を示す。

3.3 カプロン酸エチル高生産性が増殖に与える影響

先の3.2の検討で、カプロン酸エチル高生産性（カプエチ高生産性）株は、親株に比べて菌体増殖が下がっていることが推測された。そこで、カプエチ高生産性株No. 227と親株K901-RIB、カプエチ高生産性株K1701-RIBとその親株の泡あり株K10-RIBをYD培地で培養した。その結果、群馬KAZE酵母と同様にカプロン酸エチル高生産性株は親株より菌体量が低くなっており（図4）、12時間から24時間の菌体増殖とアルギニン取り込みの比は親株の方が低くなっていた（表4）。



仮説2

硫黄成分がグルタチオンに変換され、カナバニンを液胞へ輸送して無害化
図5 仮説②のイメージ

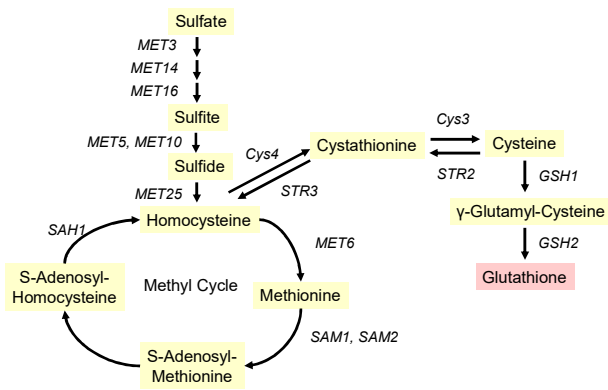


図6 酵母の硫黄代謝とグルタチオン合成

3. 4 硫黄代謝に着目した解析

以前の我々の研究³⁾では、KAZE酵母に対するカナバニン感受性の抑制は、カナバニン硫酸塩を用いたときの方が顕著であった。酵母は、硫黄を含むグルタチオンにより、有害物質を液胞へと輸送し、無害化することが知られている⁷⁾。そこで、カナバニン耐性化には窒素飢餓とは直接的には関係なく、セルレニン耐性化と共通の遺伝子が関与しているという仮説²⁾の中で、グルタチオンがカナバニンを液胞に輸送して無害化していることを考えた(図5)。

そこで、KAZE1~KAZE4、K901-H4に加え、No. 227、K901-RIB、K1701-RIB、K10-RIBを用い、酵母の硫黄代謝とグルタチオン合成(図6)に関わる3つの遺伝子(SAH1、GSH1、GSH2)の配列解析を行ってみたが、変異はなく全て一致していた(データ省略)。各遺伝子の発現解析

は行っていないため、グルタチオンの合成が促進され、カナバニン感受性が抑制されたという仮説は、まだ確認できていない。

3. 5 選抜培地の炭素源の検討

一方、3. 3までの検討で、カプエチ高生産性株は、親株に比べて菌体増殖が下がっていることが分かった。さらに、後藤らの報告⁸⁾によると、セルレニン耐性株は多剤耐性になりやすいことや、呼吸欠損による多剤耐性株の分離を避けるために炭素源をグリセロールに変えることがあることが分かった。このことから、カプロン酸エチル高生産性であるセルレニン耐性株は、呼吸欠損の多剤耐性株に変異しやすく、カナバニン耐性の擬陽性株が出現しやすいという新たな仮説³⁾が考えられた。

そこで、CAO培地の炭素源をグルコースからグリセロールに変えてKAZE3号塗布したところ、擬陽性株が出てこなくなった。しかしながら、イオンビーム照射による変異処理をしてもKAZE3のカナバニン耐性株は得られなかった。この要因は、選択圧が強くなりすぎたためと考え、カナバニンの半量をカナバニン硫酸塩に置換し、イオンビーム照射した群馬KAZE酵母3号を塗布したところ、尿素非生産性候補株を17株取得することができた(図7)。

一方で、グルコースを炭素源とした場合に生えてくる擬陽性株が呼吸欠損であるか確認しておらず、今後、上記仮説³⁾についての検証を行う必要がある。

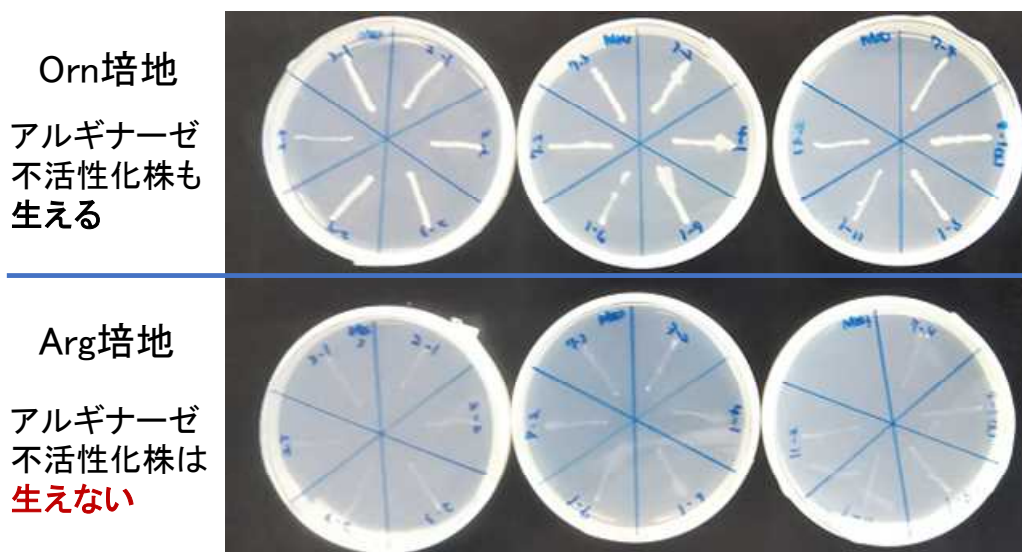


図7 群馬KAZE酵母3号の尿素非生産性(アルギナーゼ不活性)候補株の選抜の様子

4 まとめ

清酒の海外輸出量は平成20年から毎年平均10%の増加が続いており、特に地方の酒造会社が製造する地酒に対する人気が高い。一方、発がん性が疑われているカルバミン酸エチルの清酒中の含有量を規制する国が今後増え、好清酒の海外輸出の阻害要因となることが懸念されている。カルバミン酸エチルは、清酒酵母が排出する尿素とエタノールから生成する。本研究では、尿素非生産性化の選択に用いられているカナバニンに対し、群馬KAZE酵母の感受性が抑えられている原因を解明することを目的に検討を行った。

まず、群馬KAZE酵母のアルギニン代謝系遺伝子に変異が入っている可能性について検討を行ったところ、*CAN1*や*CAR1*遺伝子に変異は入っておらず、アルギニン取り込み速度も親株より下がっているということではなかった。次に、セルレニン耐性株は呼吸欠損の多剤耐性株に変異しやすく、カナバニン耐性の擬陽性株が出てきやすいという新たな仮説を考え、CAO培地の炭素源をグルコースからグリセロールに変えてみた。その結果、KAZE3の生育を抑えることができ、尿素非生産性候補株を17株取得することができた。

今後は、これらの候補株の醸造特性を評価し、KAZE3の尿素非生産性株の実用化を進めたい。また、今回得られた知見は、群馬KAZE4号の他にK1601、K1701、K1801などの（公財）日本醸造協会が頒布するカプエチ高生産性株の尿素非生産化につながられると期待される。

謝 辞

本研究の一部は、2019年度NPO 法人酵母細胞研究会地神芳文記念研究助成金により行った。

文 献

- 1) 上山 修ら：平成13年度群馬県工業試験場研究報告、39-43
- 2) 北本勝ひこら：日本醸造協会誌、106-114（1993）
- 3) 渡部貴志ら：平成28年度群馬産業技術

センター研究報告、11-14

- 4) 渡部貴志ら：平成29年度群馬産業技術センター研究報告、10-14
- 5) 増淵 隆ら：平成21年度群馬産業技術センター研究報告、12-14
- 6) 増淵 隆ら：平成24年度群馬産業技術センター研究報告、38-41
- 7) 渡辺文太ら：化学と生物、354-351（2015）
- 8) 後藤奈美ら：本醸造協会誌、533-539（2000）