

2A-Ea01 大麦焼酎製造に適した焼酎酵母 BAW-6 の醸造適性に関する研究

○高下 秀春
(三和酒類)
takashita-h@kokuzo.co.jp

当社焼酎工場内の大麦焼酎醗において、親株に鹿児島酵母 (Ko) を使用して差しもとを繰り返した際に、酵母の構成性酸性ホスファターゼ (cAPase) の有無を目視にて判定するジアゾカップリング (DC) 染色法にて酵母純度を確認したところ、差しもと前はすべてのコロニーが茶色 (cAPase 活性有り) であったが、差しもとを繰り返すうちに白色 (cAPase 活性無し) の割合が増加し、アルコール取得量も増加する現象が認められた。そこで本研究では、差しもとを繰り返した大麦焼酎醗から分離された焼酎酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BAW-6 の焼酎醸造適性と cAPase の遺伝的不安定性について明らかにすることを目的とした。

大麦焼酎醗に適した焼酎酵母を分離することを目的として、初発種酵母として Ko を使用し、差しもとを約 2 ヶ月間繰り返した大麦焼酎醗を分離源とし、大麦麹汁培地において増殖速度が速く、アルコール耐性を有するアルコール高生産酵母の選抜を行った。その結果、選抜した BAW-6 は、アルコール耐性、クエン酸耐性が増強されており、これらが大麦麹汁において良好な増殖を示す原因の一つと考えられた。また、小仕込試験の結果、BAW-6 はアルコールのストレスが大きい二次醗後半でも発酵力が旺盛であった。BAW-6 は Ko に比べ蒸留前醗のアルコール度数が 0.5% 増加し、アルコール取得量も 11l/ton 向上した。Ko を培養すると、YPD 培地では 0.3%、大麦焼酎醗では 1% の割合で cAPase 株が出現したことから、Ko の cAPase 活性に不安定性が確認された。Ko の *PHO3* 遺伝子を解析すると、野生型と欠失型のヘテロ接合型 (*PHO3/pho3*) であった。しかし、DC 染色で白色の cAPase 株では欠失型のホモ接合型 (*pho3/pho3*) になっていた。欠失型株の *PHO5-PHO3* 遺伝子領域の塩基配列を調べた結果、キメラ遺伝子 (*pho5/3*) が生成しており、*PHO3* プロモーターと *PHO3* 遺伝子の上流部分が欠失したため、*pho3Δ* となったことがわかった。Ko の cAPase の遺伝的不安定性の原因は、ヘテロ接合型 *PHO3/pho3* の LOH またはループアウトによるホモ化であると推定した。Ko の *PHO3* 遺伝子破壊株並びに *PHO3* 及び *pho3* の単胞子一倍体株の発酵試験を実施した。cAPase 活性の有無とアルコール生産性に関連性は認められなかったが、酢酸エチルの生産性に違いが認められたことから酒質への影響が示唆された。

大麦焼酎仕込による競合培養試験を実施した結果、BAW-6 は親株である Ko より増殖が速く、アルコール生産量も多くなった。大麦または大麦麹に由来する成分による増殖阻害効果に対して、BAW-6 は Ko よりも耐性があることが示唆された。BAW-6 は SD 培地では cerulenin、YPD+8% ethanol (pH 4.5) 培地では diethylstilbestrol に対して耐性を示した。BAW-6 の H⁺-ATPase 活性を測定すると Ko より高いことがわかったが、*PMAI* の高発現によるものではなかった。

今後、本研究で明らかとなった、A. 大麦・大麦麹由来の培地にて継代培養を繰り返し実施する、B. 親株がヘテロ変異株 (*PHO3/pho3*) である場合は、DC 染色法による白色コロニー出現率が高まるまで継代培養を繰り返す、C. *cerulenin* と diethylstilbestrol に対して多剤耐性が付与された変異株を取得する、などの方法を組み合わせることによってさらなる有用形質を獲得した醸造用酵母の取得が期待できる。

Studies on characteristics of shochu yeast BAW-6 suitable for barley shochu making

○Hideharu Takashita
(Sanwa Shurui Co., Ltd)

Key words barley shochu, shochu yeast, constitutive acid phosphatase

2A-Cp01 ビフィズス菌における実用的な遺伝子変異導入系の開発

○吹谷 智
(北大院・農・生物機能)
s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp

近年の菌叢解析技術の発展により、腸内に共生する腸内細菌が私達の生理や健康に大きく関与していることが明らかになってきた。その分子機構を解明するために、腸内細菌に対する宿主側の応答が幅広く解析されている。一方で腸内細菌の遺伝子レベルの研究が進んでいないため、腸内での共生や宿主への影響に寄与する腸内細菌側の因子はほとんど分かっていないのが現状である。この現状を打破するためには、腸内細菌の多くが嫌気性で形質転換が困難であるという壁を乗り越え、腸内細菌への遺伝子変異導入を可能にすることが不可欠である。そこで演者らは、ヒトの健康に有用な腸内細菌であるビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* を用いて、代表的な二つの変異導入系の開発に取組み、世界に先駆けて実用レベルの技術開発に成功した。

1. 標的遺伝子への欠失変異導入系

ビフィズス菌の中で例外的に高い形質転換効率を示す *B. longum* 105-A 株 (以下 105-A 株) を宿主株として選定し、完全長ゲノム配列を決定した。さらに大腸菌とビフィズス菌の両方で複製可能なシャトルベクターを構築し、形質転換系を整備した。

二重相同組み換え法を用いた欠失変異導入系を確立するにあたって、2 回目の相同組み換え体の取得効率が低いという問題を解決する必要があった。そこで演者らは、シャトルベクターとそれに依存して複製可能な欠失導入ベクターの二種類のベクターを構築し、染色体複製への干渉作用を利用した欠失変異導入系を開発した。この系では、105-A 株の染色体上の標的遺伝子部位に欠失導入ベクターを挿入後、シャトルベクターの導入により欠失導入ベクターの複製を誘起することで、染色体複製への干渉を起こし、染色体からの欠失導入ベクターの強制的な切り出し、すなわち 2 回目の相同組み換えが高頻度起こることを想定した。実際に 105-A 株でこの系をテストしたところ、2 回目の相同組換え体の取得効率はほぼ 100%、シャトルベクターを導入しない場合に比べて 960 倍に向上させることに成功し、系の有用性を実証した。

2. トランスポゾン変異導入系

ビフィズス菌染色体からプラスミドへの転移を検出することにより、転移能を持つ転移因子 *ISBlo11* を単離した。しかし native の *ISBlo11* の転移頻度はトランスポゾン変異導入系の構築には不十分だったため、転移頻度を向上させることが不可欠であった。そこでまず独自に構築したレポーターアッセイ系を用いて、強力な発現誘導が可能なビフィズス菌プロモーターを同定した。これを用いて転移酵素発現ベクターを構築し、転移酵素の発現を強化した。次に、*ISBlo11* と類似の因子が転移の際に形成する転移中間体の構造に着目し、転移酵素に効率的に認識されるよう、これを模した構造のトランスポゾンベクターを構築した。これら二種類のベクターを用いて、転移酵素を十分に供給した後にトランスポゾンを細胞に導入するという、二段階の形質転換で転移を誘導した結果、これらの改良を行わなかった場合に比べて大幅に高い効率 (10³ cfu/μg DNA) でトランスポゾン変異株を作出することに成功した。

本研究により、健康に有用な腸内細菌の代表格であるビフィズス菌において、変異株を用いて遺伝子機能を解明する道が拓かれた。今後菌叢解析の更なる進展により、宿主の健康や疾病に寄与する新たな腸内細菌が同定されることが予測され、それらの遺伝子機能の解明は継続的な課題になると考えられる。そのため将来的には、本研究で開発した手法をビフィズス菌だけでなく、他の腸内細菌種にも拡充する道を探っていくことで、腸内細菌の生物工学的な解析技術を確立し、腸内細菌の側から共生の分子機構を解明していきたい。

Development of practical gene-mutagenesis systems in bifidobacteria

○Satoru Fukiya
(Dept. Biosci. Chem., Res. Fac. Agr., Hokkaido Univ.)

Key words *Bifidobacterium*, gene mutagenesis, intestinal bacteria