

## 9354 耐塩性微生物の代謝制御機構に関する研究

助成研究者：富田 房男(北海道大学 農学部)

共同研究者：横田 篤(北海道大学)

味噌は醸造後に品質とは無関係に色調が悪くなるくすみの問題があり、色の悪い味噌は売れにくいので色調の安定性が求められている。現在は色調改善のために着色料としてリボフラビン(Rib)を添加しているが、新しい添加物表示(全面表示)により、添加物として表示することが必要になった。消費者は添加物を好まないで添加物によらない色調および栄養の改善が必要となる。そこで味噌の色調および栄養性の改善を目的として味噌醸造用耐塩性酵母*Zygosaccharomyces rouxii*にRib生産能を付与し、この酵母を用いて味噌を醸造することにより黄色味のあざやかな、しかも栄養の強化された淡色味噌を得ることを計画した。

Rib生産株を得る手段として、Ribアナログ耐性変異株の利用を企画している。そこで今回の研究ではまず実用味噌酵母を取り寄せ、それらの栄養要求性を決定し、最少培地を確立した。また変異処理による変異株造成の基礎検討として、強力な変異誘起物質であるニトロソグアニジン(NTG)による変異処理条件を確立した。またRibアナログ耐性株誘導のための基礎検討として、アナログによる生育阻害実験を行った。Ribアナログとしてロゼオフラビン(RoF)、Rib生合成中間体アナログとして8-アザグアニン(8AG)、3-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール(TZ)、5-フルオロウラシル(5FU)について生育阻害実験を行い、TZと5FUに生育阻害作用を見いだした。8AGはRib生合成前駆体であるグアノシン3リン酸の塩基部分であるグアニンのアナログであり、TZと5FUはRib生合成の中間体に含まれるピリミジン塩基構造に対するアナログとして作用することが期待される。またTZは構造上ヒスチジン(His)アナログとしても作用することが考えられる。特に5FUについては、最近これに耐性の細菌がRib生産能を獲得することが報告されている。そこでNTG処理による耐性株の誘導を行ったところ、5FU耐性株の中に黄色変異株No. 3-3を見いだすことができた。本株のコロニーの色は最少培地では黄色であり、鉄を含まない最少培地では黄色が濃くなった。従ってこの黄色物質はリボフラビンあるいはその生合成中間体である可能性がある。完全培地でのコロニーはやや赤みがかかった黄色を呈した。一方、親株はいずれの培地でも白色であった。

以上のように、味噌酵母から5FU耐性株を誘導することで、コロニーが黄色を呈する変異株を分離することができた。今後はこの黄色化合物を同定すると共に、さらに変異処理を繰り返してより多くの黄色変異株を分離し、色素生産能と醸造特性に優れた株を選抜する。また色素生産株の代謝制御の変化について、生産メカニズムの観点から生化学的な解明を行う予定である。



## 9354 耐塩性微生物の代謝制御機構に関する研究

助成研究者：富田 房男（北海道大学 農学部）

共同研究者：横田 篤（北海道大学）

## 1. 研究目的

味噌は醸造後に品質とは無関係に色調が悪くなるくすみの問題があり、色の悪い味噌は売れにくいので色調の安定性が求められている。現在は色調改善のために着色料としてリボフラビン（Rib）を添加しているが、新しい添加物表示（全面表示）により、添加物として表示することが必要になった。消費者は添加物を好まないため添加物によらない色調および栄養の改善が必要となる。そこで味噌の色調および栄養性の改善を目的として味噌醸造用耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* に Rib 生産能を付与し、この酵母を用いて味噌を醸造することにより黄色味のあざやかな、しかも栄養の強化された淡色味噌を得ることを計画した。

Rib 生産株を得る手段として、Rib アナログ耐性変異株の利用を企画している。そこで今回の研究ではまず実用味噌酵母を取り寄せ、それらの栄養要求性を決定し、最少培地を確立した。また変異処理による変異株造成の基礎検討として、強力な変異誘起物質であるニトロソグアニジン（NTG）による変異処理条件を確立した。また Rib アナログ耐性株誘導のための基礎検討として、アナログによる生育阻害実験を行った。Rib アナログとしてロゼオフラビン（RoF）、Rib 生合成中間体アナログとして 8-アザグアニン（8AG）、3-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール（TZ）、5-フルオロウラシル（5FU）について生育阻害実験を行い、TZ と 5FU に生育阻害作用を見いだした。8AG は Rib 生合成前駆体であるグアノシン 3 磷酸の塩基部分であるグアニンのアナログであり、TZ と 5FU は Rib 生合成の中間体に含まれるピリミジン塩基構造に対するアナログとして作用することが期待される。また TZ は構造上ヒスチジン（His）アナログとしても作用することが考えられる。特に 5FU については、最近これに耐性の細菌が Rib 生産能を獲得することが報告されている。<sup>1)</sup> そこで NTG 処理による耐性株の誘導を行ったところ、5FU 耐性株の中に黄色変異株を見いだすことができた。以下にこれらの結果について述べる。

## 2. 研究方法

菌株としては、北海道内の味噌醸造会社、日本清酒（株）から取り寄せた味噌醸造用酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* を単コロニー分離したものを使用した。分離した株はポテトデキストロース寒天（PDA）培地（栄研化学（株）パールコアポテトデキストロース寒天培地 39g/l、酵母エキス 3g/l、NaCl 50g/l、伊那寒天 5g/l）に27℃で十分生育させた後4℃で保存し、2カ月おきに植え継いだ。なお、本研究では培養温度は全て27℃とし、振盪培養の際は振盪数326rpm、振幅2cmで行った。その他の実験方法は結果と共にその都度記述した。

## 3. 研究結果および考察

### 3. 1. 最少培地の検討

本菌の栄養要求性を検討したところ、本菌はビオチン、パントテン酸、チアミンを要求することが分かった。そこで最少培地として、これらのビタミンを添加したA培地（表1）を用いることにした。

### 3. 2. NTG処理条件の検討

NTGで本酵母を変異処理する際の条件を検討した。PDA斜面培地で3日間培養した菌を、試験管(21φ×200mm)に10mlずつ分注したYPD培地（表2）に一白金耳ずつ10本接種し、一夜振盪培養したものを一つにまとめて9000rpm、3分で集菌、pH6.0の0.1Mリン酸緩衝液10mlで3回洗浄後、10mlの同緩衝液に再懸濁した。菌懸濁液を1mlずつ遠心管に分注し、同緩衝液に溶解したNTG溶液1mlを遠心管に添加して、30℃の恒温水槽中で静置反応させた。一定時間後遠心管を水槽から取り出し、氷冷しておいた同緩衝液10mlを加えてから9000rpm、5分で集菌、同緩衝液10mlで2回洗浄後、10mlの同緩衝液に再懸濁した。これを生理食塩水で適当に希釈して0.1mlずつPDA平板培地に塗抹接種し、一週間培養後にコロニー数を数え、NTG未処理に対する生残率（%）を求めた。その結果、NTG処理を行うといずれの場合でもコロニーのサイズが不均一になり、変異が起こっているものと思われた。表3に示したように、生残率が20%程度になるNTG濃度200μg/mlで30分間の処理条件が適当であると判断し、今後の処理は全てこの条件で行うことにした。

### 3. 3. アナログ耐性変異株の誘導

#### 3. 3. 1. アナログ感受性試験

PDA斜面培地で3日間培養した菌を10mlのYPD培地に一白金耳接種し、一夜振盪培養した。9000rpm、5分で集菌、10mlの生理食塩水で3回洗浄後、10mlの生理食塩水に再懸濁し

たものを0.5mlずつ10mlのA培地6本に接種して、48時間振盪培養した。6本をひとまとめにして9000rpm、5分で集菌、10mlの生理食塩水で3回洗浄後2mlの生理食塩水に再懸濁した。一平板培地あたりの菌数が $10^5 \sim 10^7$ 程度になるように希釈して、A培地に各種アナログ及び回復物質などを加えた平板培地に0.1mlずつ塗抹接種し、生育を観察した。アナログとしてはRoF、8AG、TZ、5FU、回復物質としては、Rib、Hisを使用した。5FUは水に溶解して除菌したものを固化前の滅菌済みのA培地に加えた。それ以外の物質は培地と共に滅菌した。

まず8AGは0~600mg/lまでの濃度範囲で、A培地のNaClの添加、無添加両条件で、また一平板当りの生菌数が $1.2 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^7$ 個の範囲で試験したが、生育阻害はほとんど観察されなかった。RoFについては30mg/l、一平板培地あたりの生菌数 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ で1~3日間培養したが、生育阻害は観察されなかった。さらにRoF30mg/lに8AG500mg/lを加えた培地（一平板培地あたりの生菌数 $2.4 \times 10^3 \sim 2.4 \times 10^5$ 、1~3日間培養）や、RoF30mg/lに透過性を高める目的で界面活性剤Tween20あるいはTween80を0.2%加えた培地（一平板培地あたりの生菌数 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 、1~2日間培養）においても、生育阻害は観察されなかった。TZについては、一平板培地あたりの生菌数 $2.4 \times 10^6 \sim 2.4 \times 10^8$ の範囲で表4に示したようなTZ、His、Rib、の濃度範囲で調べた。表4には $2.4 \times 10^7$ の結果だけを示したが、TZによる生育阻害とHisによる回復は観察されたが、Ribによる回復は見られなかった。5FUについては表5に結果を示した。一平板培地あたりの生菌数にもよるが、5FU濃度が0.1mM~1mMのときに生育阻害が観察された。またコロニーの大きさは、5FUの濃度の増大と共に小さくなる傾向があった。しかしRibによる回復は見られなかった。これは5FUの作用点がRib生合成経路でないためか、核酸生合成を含めて複数あるためと考えられた。表4、5より、アナログ耐性株を誘導する時のアナログ濃度はTZについては10mM~100mM、5FUの場合は0.1mM~1mMが適当であると判断した。

### 3. 3. 2. NTG処理によるアナログ耐性変異株の誘導

3.2.と同様にNTG処理後、2回洗浄した。その後菌体を10mlの生理食塩水に再懸濁し、1mlは希釈して0.1mlずつPDA平面培地に塗抹接種して生菌数を求めるために用い、残りの9mlは9本の10mlのA培地に1mlずつ接種して3日間、変異固定のために振盪培養した。9本をひとつにまとめて9000rpm、5分で集菌、洗浄後、TZの場合は6mlの生理食塩水に再懸濁し、TZを含んだA培地の平板培地に0.1ml接種した。また、5FUの場合は2mlの生理食塩水に再懸濁し、アナログを含んだA培地の平板培地に0.1ml塗抹接種した。1週間培養後、平板培地上の大きなコロニーを鈎菌した。NTG処理はTZについては1回、5FUについては3回行い、NTG処理による生残率はTZでは36.3%、5FUでは12.5~42.1%であった。また、一平板培地あたりの生菌数はTZでは $1 \times 10^4 \sim 2.9 \times 10^7$ 、5FUでは $1.4 \times 10^3 \sim 3.2 \times 10^6$ 、アナログ濃度はTZが10、20、50、100mM、5FUが0.05、0.075、0.1、1mMであった。ただし3回目の5FU耐性変異株の誘導実験の際、一般的に鉄がRib生合成を阻害する傾向があることを考慮して、最

少培地としてA培地から $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を除いたB培地を使用した。これらの実験で、20mMと50mMのTZを含む平板培地から約6000株、0.1mMと1mMの5FUを含む平板培地から20000株以上の耐性株が得られ、さらに第一回目のNTG処理での1mMの5FU含有平板培地から得られた耐性株の中に、黄色変異株(No. 3-3、他2株、計3株)を見いだすことができた。

#### 3. 4. 黄色変異株No. 3-3の若干の性質

No. 3-3株をコロニー分離して得られた株と親株をPDA平板培地とB平板培地に接種し、14日間培養した時のコロニーの色を比較した。図1に示すように親株はいずれの培地でも白色であったが、No. 3-3ではB培地では黄色、PDA培地ではB培地に比べて色調がやや赤みがかかった黄色であった。また鉄がリボフラビン生合成を阻害する傾向がある<sup>2)</sup>ことも考慮して、鉄を含むA培地と鉄を含まないB培地とで培養を行ってコロニーの色調を比較した。図2に示したように親株はいずれの培地でも白色であったが、No. 3-3ではA培地よりB培地に形成されたコロニーの方が濃い黄色であった。従ってこの黄色物質はリボフラビンまたはリボフラビン生合成の中間物質かもしれない。なお、他に得られた2株は、色調が薄いと生育が悪いので試験しなかった。

## 4. 今後の課題

味噌酵母から5FU耐性株を誘導することで、コロニーが黄色を呈する変異株を分離することができた。今後はこの黄色化合物を同定すると共に、さらに変異処理を繰り返してより多くの黄色変異株を分離し、色素生産能と醸造特性に優れた株を選抜する。また色素生産株の代謝制御の変化について、生産メカニズムの観点から生化学的な解明を行う予定である。

## 5. 参考文献

- 1) Yamane, Y., et al.: Enzyme microbiol. Technol., 15, 877-880 (1993).
- 2) E. M. Logvinenko, G. M. Shavlovskii, N. Yu. Kontorovskaya and A. E. Zakal'skii : Mikrobiologiya, 57, 181-186 (1988).

Table 1. Composition of medium A

Glucose	50	g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6	
KCl	0.4	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.15	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.15	
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.0037	
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0042	
<u>d</u> -Biotin	0.01	mg/l
Ca-pantothenate	0.5	
Thiamine · HCl	0.25	
NaCl	50	g/l
Agar(as required)	20	
pH 5.0 (NaOH)		
Autoclave	120°C	10 min

Table 2. Composition of YPD medium

Yeast extract	10	g/l
Polypepton	20	
Glucose	20	
NaCl	50	
pH 5.7 (No adjustment)		
Autoclave	120°C	15 min

Table 3. Effects of NTG concentration and treatment time on surviving fraction

NTG concentration ( $\mu$ g/ml)	Treatment time (min)	Surviving fraction (%)
200	0	100
	15	30.6
	30	19.4
	60	18.8
500	0	100
	15	36.0
	30	5.2
	60	1.1



Table 4. Inhibition of growth by TZ and its recovery by His.

Inoculum size (cells/plate)	Addition			Growth (+~+++)			
	TZ (mM)	His (mg/l)	Rib (mg/l)	Culture days			
				1	2	3	5
$2.4 \times 10^7$	0	0	0	±	+	+	++
	0.5	0	0	-	±	+	++
	0.5	50	0	±	+	+	++
	0.5	0	10	-	±	±	+
	1	0	0	-	±	±	+
	1	50	0	±	+	+	++
	1	0	10	-	±	±	±
	5	0	0	-	-	-	±
	5	50	0	-	±	+	++
	5	0	10	-	-	-	±
	10	0	0	-	-	-	-
	10	50	0	-	±	+	++
	10	0	10	-	-	-	-

Table 5. Growth inhibition by 5FU

Inoculum size (cells/plate)	Addition		Growth (+~+++)				
	5FU (mM)	Rib (mM)	Culture days				
			1	2	3	5	
$3.3 \times 10^6$	0	0	+	++	+++	+++	
	0	0.1	+	++	++	++	
	0.05	0	±	++	++	++	
	0.05	0.1	±	++	++	++	
	0.1	0	-	±	±	+	
	0.1	0.1	±	±	±	++	
	1	0	-	-	-	-	
	1	0.1	-	-	-	-	
	$3.3 \times 10^5$	0	0	+	+	+	++
		0	0.1	-	+	+	++
		0.05	0	-	+	+	++
		0.05	0.1	-	+	+	+
0.1		0	-	±	±	+	
0.1		0.1	-	±	±	+	
1		0	-	-	-	-	
1		0.1	-	-	-	-	

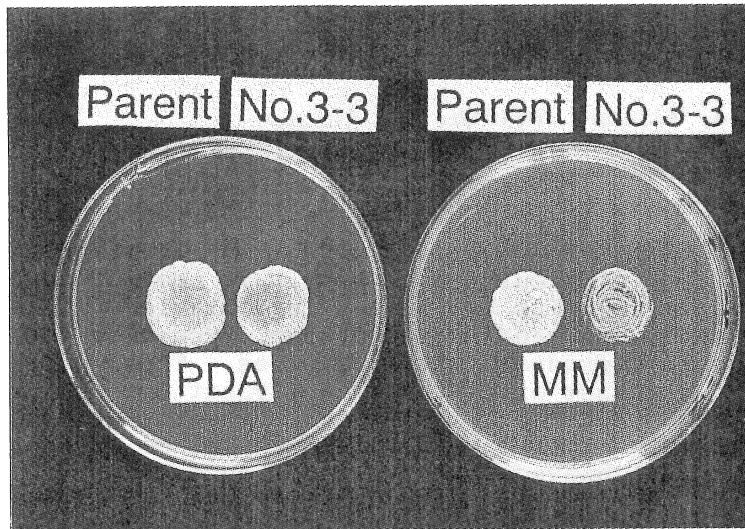


Fig. 1. Color of colonies of parent strain and strain No.3-3 on PDA and medium B. MM stands for medium B. Cultures were done for 14 days.

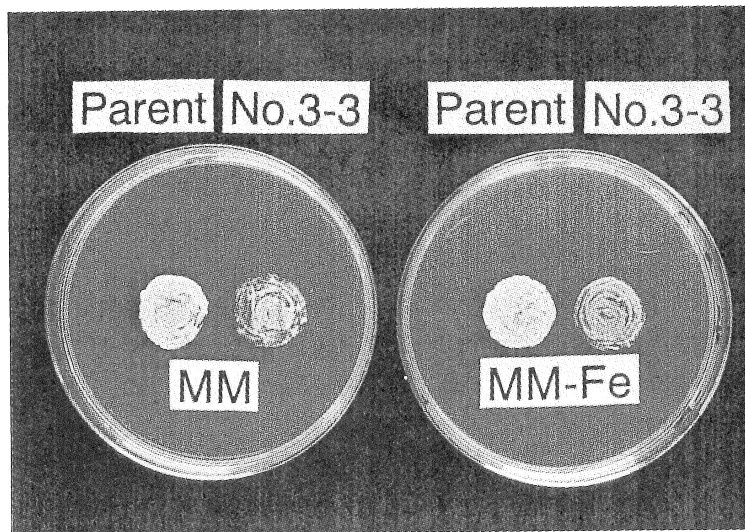


Fig. 2. Color of colonies of parent strain and strain No.3-3 on media A and B. MM stands for medium A. MM-Fe stands for medium B. Cultures were done for 14 days.

Studies on the mechanism of metabolic regulation in salt-tolerant yeast  
(Riboflavin production by salt-tolerant yeast for miso fermentation)

Fusao Tomita, Atsushi Yokota  
Department of Bioscience and Chemistry, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University

#### Summary

The color of miso changes to dark with time after production, which makes miso difficult to be sold. To prevent the change of color and to improve its brightness, riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>), a yellow compound, has been added to miso. However, the consumers generally dislike products with additives. Thus, it was planned to construct a mutant of salt-tolerant yeast for miso fermentation with productivity of riboflavin. By using such kind of yeast, production of miso with bright yellow color without the additive can be achieved. In addition, such kind of miso is nutritionally strengthened with high vitamin B<sub>2</sub> content. In the present report, construction of a yellow mutant No.3-3 by the derivation of 5-fluorouracil-resistant mutants is described. Strain No.3-3 formed yellow colony on minimal medium, while the parent strain formed colony with white color.