

## 研究論文

## 酵母の育種を目指したシンクロtron光の最適照射条件の検討

杉山信之<sup>\*1</sup>、三井俊<sup>\*2</sup>、家田明音<sup>\*3</sup>、野本豊和<sup>\*4</sup>、柴田佳孝<sup>\*5</sup>

## Optimization Study of Irradiation Conditions for Yeast Breeding by Synchrotron Radiation

Nobuyuki SUGIYAMA<sup>\*1</sup>, Shun MITSUI<sup>\*2</sup>, Akane IEDA<sup>\*3</sup>, Toyokazu NOMOTO<sup>\*4</sup> and Yoshitaka SHIBATA<sup>\*5</sup>Research Support Department<sup>\*1\*4\*5</sup> Food Research Center<sup>\*2\*3</sup>

あいちシンクロtron光センターBL8S2にて酵母に様々な条件でシンクロtron光照射実験を行い、突然変異株を取得することにより、シンクロtron光照射による菌体育種の最適な照射条件を検討した。酵母の生菌率は吸収線量の増加に伴ってほぼ指数関数的に減少するが、低エネルギーの割合が大きくなるフィルターを用いるとその減少が顕著になった。一方、シクロヘキシミド耐性変異が入る確率は吸収線量の3乗に比例して増加した。これらの結果から、変異率の極大値は線量率に相関して増加すると判明した。

## 1. はじめに

普通酒比率の高い愛知県清酒業界において、特徴のある酵母の育種は、県産の清酒の知名度を向上し、中小清酒企業の活性化のために重要である。当センターではこれまで、知の拠点あいち重点研究プロジェクトⅡ期等の研究課題において、シンクロtron光を用いた酵母の育種が行われてきており、尿素非生産性の酵母を取得することに成功するなど一定の成果が得られている<sup>1)</sup>。しかしながら、シンクロtron光照射による育種における系統的なデータの取得、最適な照射条件の検討は行われていなかった。本研究では、酵母を例に様々な条件でシンクロtron光照射実験を行い、突然変異株を取得することにより、シンクロtron光照射の特徴を抽出し、酵母へのシンクロtron光照射による育種の最適な照射条件を検討することを目的とした。

## 2. 実験方法

## 2.1 供試菌株と使用培地

実験には、愛知県吟醸酒用酵母(FIA2)を親株とし、2度のシンクロtron光照射にて尿素非生産性、高香気性を付与した菌株を用いた。酵母の照射前培養には麴エキス培地を使用した。酵母数の測定はYPD寒天培地を用いて行った。一方、シクロヘキシミド耐性菌数の測定は、シクロヘキシミド1 $\mu$ g/mL含有YM培地を用いた。

## 2.2 照射方法

酵母を48時間37℃で振とう培養することで増殖させ、

得られた酵母は遠心分離で上清を取り除いた後、滅菌水で洗浄した。洗浄後の酵母を再び滅菌水で懸濁させた後、0.5mLマイクロチューブに分注して再び遠心分離を行い、上清を除いたものを照射用の試料とした。なお、一部の実験では分注後のマイクロチューブをそのまま照射に用いた。照射の様子を概観を図1に示す。

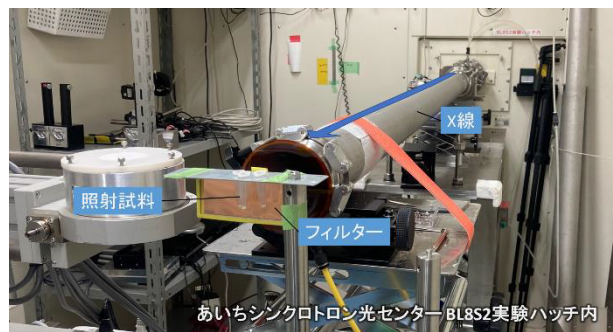


図1 照射の様子概観

照射はあいちシンクロtron光センターBL8S2の白色光を用いた。単位時間あたり照射される線量である線量率を制御するため、照射試料前に適切な金属箔フィルター(以下フィルター)を設置した。また、試料への照射はポリプロピレン製のマイクロチューブ越しに行い、1条件につき3本照射することで、誤差の評価を行った。総線量の影響を確認するため、照射時間は0秒(未照射)~300秒とした。

## 2.3 生菌率の計数方法

未照射試料・照射後試料に対し、それぞれ滅菌水

<sup>\*1</sup> 共同研究支援部 シンクロtron光活用推進室 <sup>\*2</sup> 食品工業技術センター 発酵・バイオ技術室(現産業振興課)

<sup>\*3</sup> 食品工業技術センター 発酵・バイオ技術室 <sup>\*4</sup> 共同研究支援部 シンクロtron光活用推進室(現あいちシンクロtron光センター) <sup>\*5</sup> 共同研究支援部 シンクロtron光活用推進室(現共同研究支援部 計測分析室)

0.5mL を加えて懸濁させたものを用意し、それぞれについて YPD 寒天培地を用いて酵母数を測定した。得られた酵母数について、未照射試料の酵母数に対する酵母数を生菌率とした。

#### 2.4 変異率の算出方法

未照射試料・照射後試料に対し、それぞれ滅菌水 0.5mL を加えて懸濁させたものを用意し、それぞれをシクロヘキシミド含有培地に接種した。37℃4 日間培養後、大きさが  $\phi 1\text{mm}$  を超えたコロニーをシクロヘキシミド耐性菌由来とし、その数を変異数として計数した。未照射試料の酵母数に対する変異数を変異率とした。

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 照射時の水の有無の評価

照射時に水が共存する場合としない場合について、生菌率と変異率にどのような影響を与えるか検討した。フィルターに 0.5mm の Al 板を用い、上清を取り除いたものと取り除かなかったものに同条件で照射試験を行った。得られた生菌率と変異率の照射時間との関係を図 2 に示す。生菌率については水の共存の有無にかかわらず、ほぼ同等に減少した。一方、変異率は水が共存する場合において、著しく低いという結果が得られた。少なくともシクロヘキシミド耐性の変異に関しては、水の共存は悪影響を与えることが示唆されたため、今後の実験はすべて上清を取り除いた状態で照射を行った。

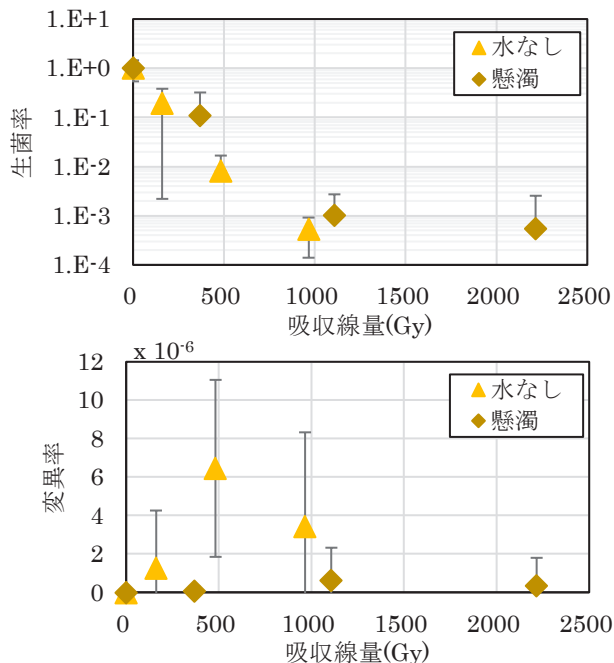


図 2 懸濁有無による生菌率と変異率の比較

#### 3.2 線量率の影響の評価

線量率を変化させるため、フィルターとして Al 板 (0.5mm 及び 2.0mm) を用いた場合における照射試験を

行った。各フィルターを用いた場合における酵母吸収エネルギーの X 線エネルギーとの関係(計算値)を図 3 に示す。各フィルターでの線量率は図 3 を積分することで得られ、それぞれ 16.6Gy/sec、4.2Gy/sec である。

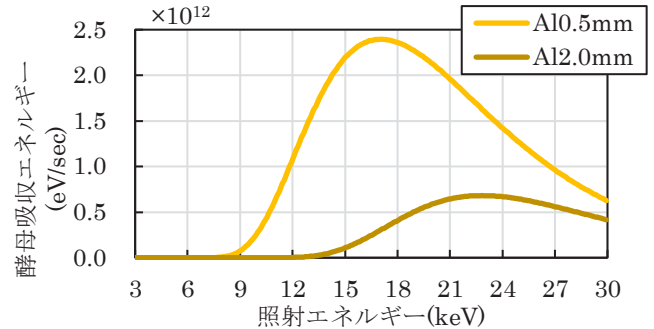


図 3 酵母吸収エネルギーの分布 (計算値)

照射試験の結果、得られた生菌率・変異率と照射時間との関係を図 4 に示す。大線量率の場合、単位時間当たりの生菌率の減少が著しく高かった。一方、変異率については、ピークとなる照射時間は違うものの、線量率による大きな違いは観察されなかった。なお、横軸を吸収線量としてグラフを作成したところ、図 5 のようになった。生菌率は線量率にかかわらず、吸収線量に従って減少したが、変異率に単純な相関関係は見られなかった。

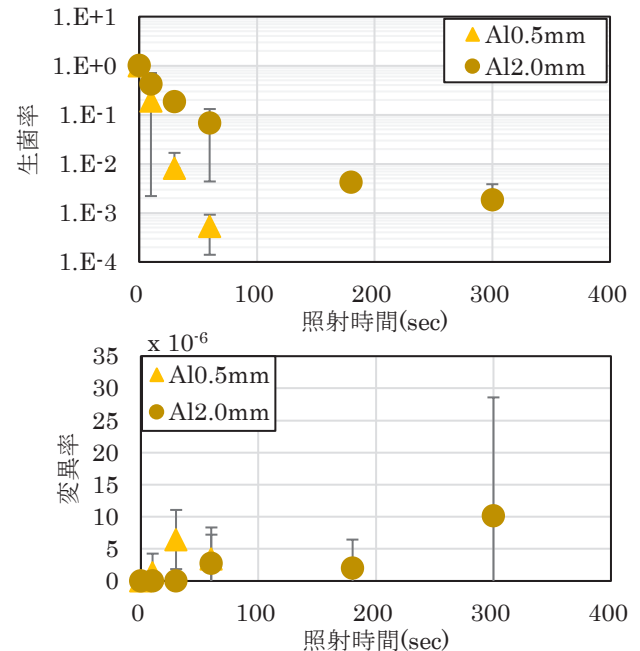


図 4 各フィルターでの生菌率と変異率の比較

#### 3.3 照射エネルギーによる違い

照射 X 線エネルギーによる影響を検討するため、フィルターとして Cu を用いた場合と Al を用いた場合で比較を行った。線量率が Al とほぼ同じになるように、Cu については 0.02mm と 0.07mm のフィルターを用いた。各フィルターを用いた場合における酵母吸収エネルギーの X 線エネルギーとの関係(計算値)を図 6 に示す。Cu は 9keV 付近に吸収端が存在するため、低エネルギー X

線の量が相対的に大きくなる。

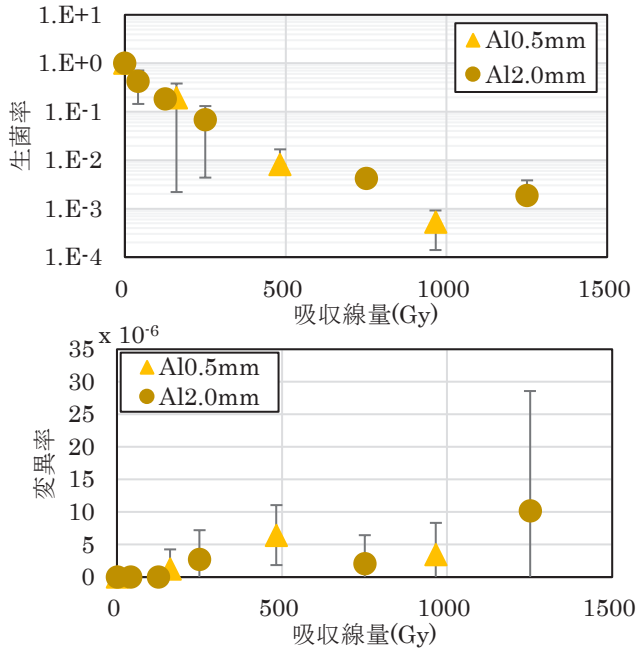


図5 各フィルターでの生菌率と変異率の比較(横軸が吸収線量の場合)

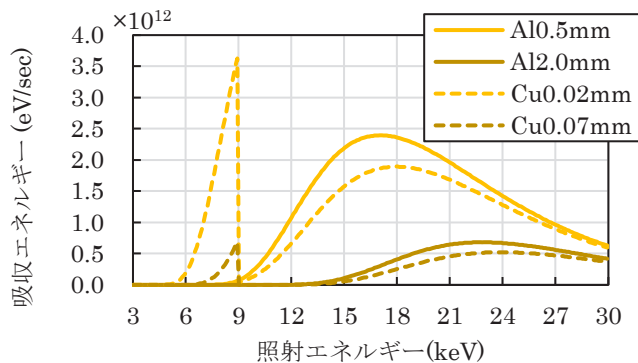


図6 各フィルターの酵母吸収エネルギー分布(計算値)

図7は各フィルターの線量率をグラフ化したものであるが、Cuは9keV以下のエネルギーのX線が比較的多くなっていることがわかる。各フィルターを用いた照射試験の結果を図8に示す。Cuフィルターは、Alフィルターと比較して生菌率の減少が著しく、低エネルギーX線は生菌率の減少に大きく寄与することが判明した。変異率についてはばらつきが大きく評価は難しいものの、

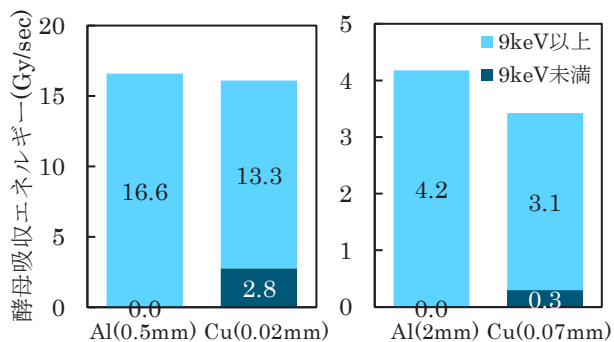


図7 各フィルターでの酵母吸収線量

少なくともCuの0.07mmのフィルターは微生物育種に不向きであることが示唆された。

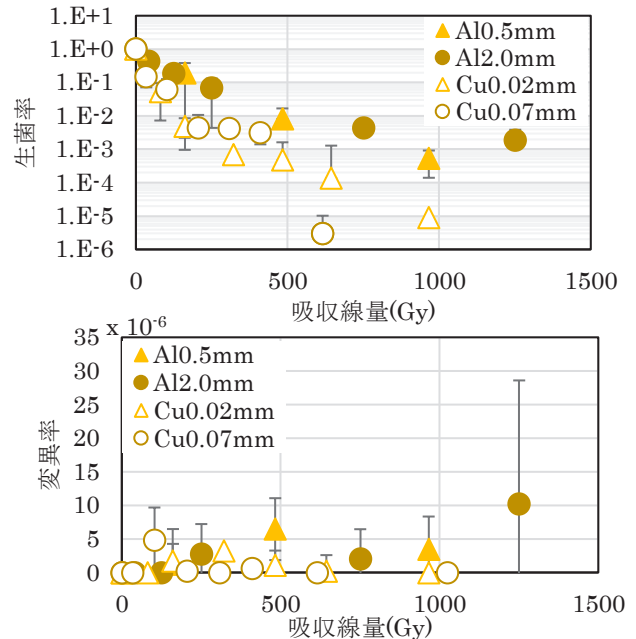


図8 各フィルターでの生菌率と変異率の比較

### 3.4 線量率と生菌率の関係

変異率を最大化する条件を検討するため、まずは生菌率の減少を数値化することを検討した。微生物の単位時間当たりの変化量は、照射による減少と遺伝子修復による増殖能の再獲得の合計であると思われる。つまり、

$$\frac{dC}{dt} = -\beta C + \alpha(C_0 - C)$$

ここで、 $\alpha$ は修復の確率、 $\beta$ は増殖能喪失の確率である。初期濃度  $C_0$  としてこの微分方程式を解くと、生菌率  $C(t)/C_0$  は

$$\frac{\alpha}{\alpha + \beta} + \frac{\beta}{\alpha + \beta} e^{-(\alpha + \beta)t}$$

となる。各フィルターについて、 $\alpha$ と $\beta$ を変数として最小二乗法を適用すると、表1のようになった。なお、Cu0.07mmの照射時間180秒のデータは外れ値として除外している。 $\beta$ の値はAlとCuのいずれのフィルターにおいても、およそ線量率に比例する形となった。また、AlとCuの $\beta$ の値は2.4倍程度となり、低エネルギーX線の生菌率への影響は大きいことが示された。一方、 $\alpha$ の値は、本来なら線量率に関係せず一定になると思われるが、今回の実験では明確な関係性は見られなかった。

表1 生菌率パラメータの決定

| 種類       | Al                   | Al                   | Cu                   | Cu                   |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 厚み       | 0.5mm                | 2.0mm                | 0.02mm               | 0.07mm               |
| $\alpha$ | $7.7 \times 10^{-5}$ | $1.3 \times 10^{-4}$ | $3.9 \times 10^{-5}$ | $3.7 \times 10^{-4}$ |
| $\beta$  | 0.163                | 0.0476               | 0.436                | 0.109                |

### 3.5 線量率と変異が入る確率の関係

微生物の生死にかかわらず、変異が入る確率を考える。対象となる遺伝子への変異は時間とともに増加し、変異が入っていない菌の濃度が下がるにつれて増加速度が鈍る形になると考えられる。つまり、変異が入る確率は、

$$1 - e^{-\lambda t}$$

のようになる。ただし、実際に変異率として観察されるのは、変異が入ってさらに増殖する菌体であるため、変異が入る確率は変異率を生菌率で割ったものとなる。

3.4 で得られた生菌率の理論値をもとに、変異が入る確率をグラフとしたものが図 9 である。Al フィルターの場合、下に凸の単調増加する曲線に載るように推移した。一方、Cu フィルターは法則性が見られなかった。Cu フィルターは単純な遺伝子変異とは違う現象が起こっている可能性が高く、今回の考察ではこれ以上検討しないこととした。

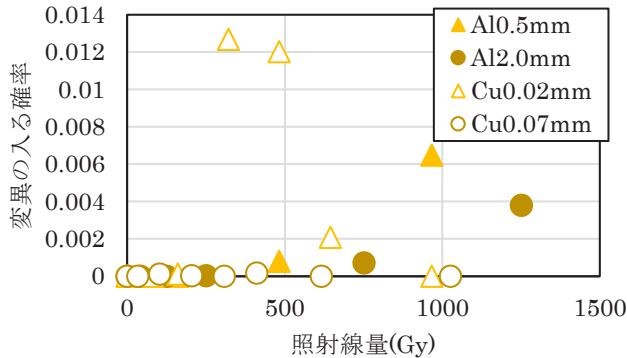


図 9 照射線量に対する変異の入る確率

### 3.6 変異率の変化の検討

1 遺伝子の変異が入る確率は、吸収線量が小さい場合、吸収線量に比例する形になると思われる。ところが、Al フィルターを用いた場合における変異が入る確率は、グラフの形状から吸収線量の 3 乗に比例する形をとっている。これは、シクロヘキシミド耐性の変異が 3 種類の遺伝子が改変されることで発現することを示唆している。図 9 への 3 次関数のフィッティングを行ったところ、その係数はやはり線量率に比例する形となり、線量率を  $d(\text{Gy/sec})$  とした場合の係数は  $4.3 \times 10^{-13}d$  であった。

これまでの結果から、一連の現象を見積もってみる。増殖能に著しい影響を与える低エネルギー X 線がない場合、微生物の増殖能喪失の確率  $\beta$  はおよそ線量率  $d$  に比例する形であった。一方修復の確率  $\alpha$  は、簡単のため Al フィルターで得られる値の中間値を用いる。変異が入る確率は吸収線量の 3 乗に比例し、その比例係数は  $4.3 \times 10^{-13}d$  とする。これらの条件から線量率 5Gy/sec の場合の変異率をグラフ化したものが図 10 となる。変異率は照射時間に従って上昇するものの、一度減少し、再度上昇する形をとる。この極大値の位置を線量率横軸で

プロットしたところ、図 11 のように単調に増加することが判明した。線量率が上がるほど変異率が上昇するという結果であり、最適な照射条件はグラフ上では存在しないことになる。ただし、線量率が上がるほど最適な照射時間は短くなり、シャッターの開閉時間などを考えると、物理的な限界は存在する。また、低エネルギー X 線の影響が無視できなくなるため、フィルターを薄くしすぎることはできない。

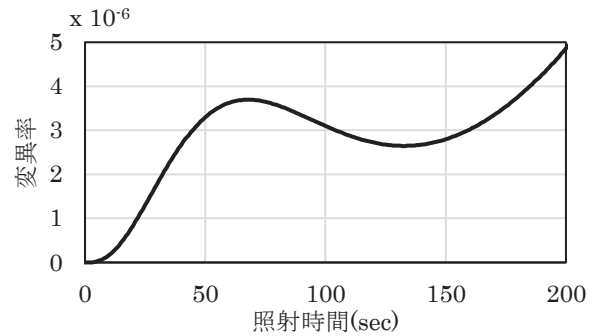


図 10 線量率 5Gy/sec の場合の変異率理論曲線

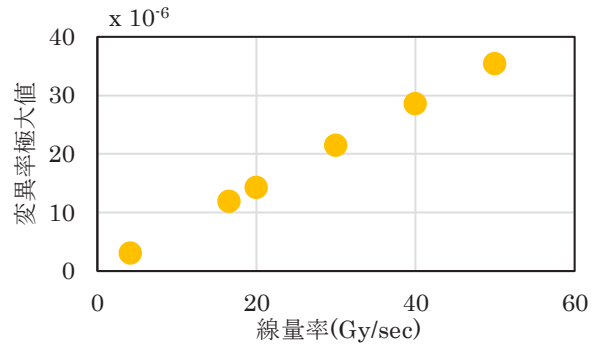


図 11 変異率極大値と線量率との関係

## 4. 結び

シンクロトロン光を用いた酵母の育種を検討し、以下の結果が得られた。

- (1) 照射時に水が存在する場合、変異率が著しく低くなった。
- (2) 酵母の生菌率は吸収線量の増加に伴ってほぼ指数関数的に減少した。
- (3) 低エネルギー X 線を透過するフィルターを用いた場合、上記現象が顕著になった。
- (4) シクロヘキシミド耐性の変異が入る確率は吸収線量の 3 乗に比例して増加した。
- (5) 変異率の変化は極大値を取る形になり、その極大値は線量率に相関して増加することが判明した。

## 文献

- 1) 三井俊, 山本晃司, 伊藤彰敏, 家田明音, 近藤徹弥, 杉山信之, 赤尾健, 吉村明浩, 榊原康彰, 船井秀哉, 原本直幸, 志水元亨, 加藤雅士: 日本醸造協会誌, 116(10), 703(2021)