

耐塩性キラー酵母の育種

鬼頭幸男・木村哲哉*・北本則行

清酒¹⁾、ビール²⁾、ワイン³⁾の醸造においては細胞融合などの手法を用いて、汚染野生酵母の撲滅を図るための醸造用酵母のキラー化が盛んに研究され、現在、一部では実用化もされている。

味噌、醤油、漬物などの食塩を多く含む発酵食品においてもキラー酵母の有効利用を目的とし研究がされるようになり、醤油諸味^{4) 5)}、漬物^{6)~8)}、味噌⁷⁾、味噌用麹⁷⁾、保存株^{9) 10)}などから耐塩性のキラー酵母が分離された。分離酵母の多くは食塩存在下においてキラー性を示し、味噌、醤油の主発酵酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の生育を阻害した^{4) 5) 7) ~10)}。

至適作用 pH と安定 pH 領域が広く、100℃の沸騰にも耐えるなど、高い蛋白安定性や広い抗菌スペクトルを示すキラー因子 HM-1 を分泌する *Williopsis mrakii* IFO 0895¹¹⁾ のキラー因子遺伝子 *HMK* 及び耐熱性がそれに比べて劣るものの類似したキラー因子 HYI を分泌する *Williopsis saturnus* var. *saturnus* IFO 0117¹²⁾ のキラー因子遺伝子 *HSK* をクローニングし、塩基配列を明らかにするとともに、両キラー因子遺伝子を酵母発現ベクター YEp51 の *GAL10* プロモーターの下流につなぎ、*Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 の HM-1 に耐性となった株 (*S. cerevisiae* KIT6) へ導入したところ、ガラクトース存在下でキラー活性を示し、そのキラースペクトルは HM-1 に関しては同じで、HYI に関してもほぼ同じであることを先に報告¹³⁾ した。また *S. cerevisiae* KIT6 に HM-1 遺伝子 (*HMK*) を多コピーで染色体に組み込むことにより、非選択培地での植え継ぎにおいても安定なキラー活性を有するキラー株を造成し、このキラー株が感受性株の生育を液体培地中での共存培養下、阻害することを示した¹⁴⁾。

HM-1 や、*Kluyveromyces lactis* IFO 1267 のキラー因子は 0~25% (w/v) の食塩濃度の範囲でキラー活性を有し味噌、醤油の主発酵酵母 *Z. rouxii*、後熟酵母 *C. etchellsii*、産膜酵母 *Z. rouxii* var. *halomembranis* の生育を阻害する¹⁵⁾。*W. saturnus* var. *saturnus* IFO 0117 も醤油産膜酵母 (*Z. sahsus*, *Z. japonicus*) などいくつかの産膜性酵母の生育を阻害することが無塩下で

認められている¹⁶⁾。HM-1 と類似している HYI も高濃度食塩存在下でキラー活性を示すことが予想される。従ってこれらのキラートキシン遺伝子を耐塩性酵母 *Z. rouxii* に導入しキラー化することができれば味噌醤油醸造への有効利用が期待できる。

醸造用耐塩性酵母のキラー化に関する研究は少なく、細胞融合法により味噌用耐塩性酵母 *Z. rouxii* へ *K. lactis* のキラープラスミド pGKL の導入が試みられたがキラー化株は得られなかった¹⁶⁾。

そこで今回、*Williopsis* 属や *Kluyveromyces* 属のキラー酵母と *Z. rouxii* の細胞融合あるいは *HMK* や *HSK* などのキラー因子遺伝子を導入した *S. cerevisiae* キラー化株と *Z. rouxii* の細胞融合による耐塩性キラー酵母の育種を試みた。

実験方法

1. 使用菌株

耐塩性酵母は醤油主発酵酵母である *Z. rouxii* IFO 0510 を用い、その遺伝マーカー付与株として用いた *Z. rouxii* IFO 0510 (tdr^r) は紫外線処理して得たロイシンアナログ耐性株¹⁸⁾ より選抜した香気生成能の高い株 (イソamilアルコール生成量: 親株の2倍) を用いた。*Z. rouxii* IFO 0510 (ρ^-) 株は小林らに準じた方法¹⁷⁾ で誘導した呼吸欠損株を用いた。*Z. rouxii* IFO 0510 (ρ^- , Can^r) は呼吸欠損株から自然誘発により取得した香気生成能 (イソamilアルコール生成量: 原株の2.1倍, ρ^- 株の1.4倍) の高いカナバニン耐性株¹⁹⁾ を用いた。

キラー酵母は *Williopsis* 属の *W. mrakii* IFO 0895 (旧 *H. mrakii*)、*W. saturnus* var. *saturnus* IFO 0117 (旧 *H. saturnus*)、*Kluyveromyces* 属の *K. lactis* IFO 1267、*K. lactis* ATCC 52934、*K. thermotolerans* IFO 1778 を用いた。加えて *S. cerevisiae* の実験室株 BJ1824 (半数体 a、ウラシル、ロイシン、トリプトファン要求性) を形質転換して得たキラー化株、すなわち *HMK* を YEp51 ベクターの *GAL10* プロモーターの下流に挿入して構築

*三重大学

したプラスミド YEp-*HMK*¹³⁾ を BJ1824 株に導入したキラー化株 (BJ1824 YEp-*HMK*)、YEp-*HMK* から *GAL10* プロモーターと *HMK* を含む遺伝子断片を pSEYC306 または YCp50 ベクターに挿入し構築したプラスミド pSEYC-*HMK*、YCp-*HMK* を BJ1824 株に導入したキラー化株 (BJ1824 pSEYC-*HMK*, BJ1824 YCp-*HMK*)、同様に BJ1824 株の HM-1 キラー因子耐性株 KIT5 にプラスミド YEp-*HSK* や YCp-*HSK* を導入したキラー化株 (KIT5 YEp-*HSK*, KIT5 YCp-*HSK*) を用いた。

キラー活性の検定には、標的菌として *Pichia anomala* IFO 0569 (旧 *H. anomala*) あるいは *Candida glabrata* IFO 0622 を用いた。

2. 培地

YPD 培地 (1% 酵母エキス, 2% ポリペプトン, 2% グルコース, pH5.4), グリセリン培地 (1% 酵母エキス, 2% ポリペプトン, 2% グリセリン, pH5.4), MG 培地 (生引溜を希釈して全窒素分を 0.2% とし, グルコース 4%, 食塩 5~15% とし pH5.4 に調整) を用いた。呼吸欠損株の検出にはグリセリン寒天培地の他に色素添加希薄栄養寒天培地 (エオシン 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, トリパンプル 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) あるいは TTC 寒天培地 (TTC 寒天重層法) を用いた²⁰⁾。

キラー抵抗性株の誘導に用いたキラー YPD 培地 (pH5.2~5.4) 及びキラー YPD プレートは以前に示した方法¹³⁾ で調製した。但し、プレートの調製において寒天溶液 1 容と混和するキラー YPD 培地 4 容へのグルコース、ペプトン、酵母エキスの添加量は 1.25 倍にした。

キラー性の検定に用いた MBMGal プレートは MBM プレート¹⁶⁾ に用いる YEPD 培地中のグルコースを 2% ガラクトースと 0.5% スクロースに置き換えたものを用いた。

細胞融合株と親株との違いを判別するために色素添加希薄栄養寒天培地の色素をアニリンブルー 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とボンソー R50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に変えた寒天培地を用いた。

通常、滅菌は 115°C, 15 分で行い、プレート用の寒天培地には寒天を 2% 添加した。細胞融合株再生用上層培地やキラー YPD プレートには、ナカライテスク製寒天末 (ゲル化温度 30~31°C) を使用した。

3. 酵母への遺伝マーカーの付与

3.1 呼吸欠損株の分離

20, 50, 100, 120, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の EtBr (エチジウムブロマイド) を含むように EtBr の口過滅菌液を添加して調製した YPD 培地中で 30°C, 静置培養 (初発菌数 10^6

/mL) し誘導した。

増殖 (濁度法, 660nm) がみられなかった EtBr 添加培養液は合併した後、又増殖がみられた EtBr 添加培養液は、それぞれの EtBr 添加濃度の培養液ごとに培養液を生理食塩水で希釈し、YPD プレート上での平板塗抹培養により単コロニー分離を行った後、グリセリンプレートを用いて呼吸欠損株をスクリーニングした。

EtBr 及びアクリフラビンと同濃度混合添加 (各 2, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) して呼吸欠損株を誘導した場合は、28°C, 振とう培養 (初発菌数 10^5 /mL) して行い、EtBr 単独添加の時と同様にして単コロニー分離を行った。

加えて、EtBr 処理した酵母を、ナスタチンが 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるように添加したグリセリン培地中で培養し、呼吸欠損株を濃縮する方法²⁰⁾ も併用した。

安定な呼吸欠損株の分離は、グリセリンプレート上で生育しない株もしくは極度に生育の悪い株を一次選抜し次いでその菌株について YPD プレートでの単コロニー分離を繰り返し、得られるコロニー全てが同培地で生育しなくなるまで純化を重ねる方法で行った。

また、取得した呼吸欠損株については、 10^7 個以上の細胞を含む滅菌水懸濁液をグリセリンプレート上に塗抹し、コロニーが生成しないことを確認した。また、色素添加希薄栄養寒天培地を用いて色調についても調べた。

3.2 栄養要求性変異株の分離

ウラシル要求性変異株及びリジン要求性変異株の分離は、北本の方法²¹⁾ に従った。なお、FOA (または AA) プレートで生育した大きなコロニーを再度同種のプレートで、ストリーク法により単コロニー分離してから、SD プレートと SD + Ura (SD+lys) プレートに接種し栄養要求性株を選別した。加えて、EMS (エチルメタンサルホネート) により突然変異誘発処理した酵母を、キラー YPD 液体培地中での培養処理を加えた後、ウラシル栄養要求性株を FOA プレートでポジティブセレクションする方法も行った。

これら栄養要求性の安定株の分離は、YPD プレートでの単コロニー分離を繰り返し、得られるコロニー全てが SD プレートで生育しなくなるまで純化を重ねる方法で行った。また取得した栄養要求性株については、 10^7 個以上の細胞を含む滅菌水懸濁液を SD プレートに塗抹し、コロニーが生成しないことを確認した。

4. *W. mrakii* IFO 0895 キラータンパク質抵抗性株の造成

キラー抵抗性株の分離は、EMS により突然変異誘発

処理もしくは無処理の酵母を、キラー YPD 培地中、25℃ で培養し、その増殖経過を濁度で測定しながら、増殖が開始されてから十分行われるまでの培養液をサンプリングしキラー YPD プレートに塗抹するか、液体培養をせず、直接酵母を高濃度にキラー YPD プレート上に塗抹し、生育したより大きなコロニーを選択する方法で行った。更にキラー YPD プレート上でストリーク法により単コロニー分離を繰り返して最も生育の良いコロニーを選別した。分離株から MBM プレート上における *W. mrakii* IFO 0895 とのクロスストリーク法による検定や、キラー YPD 培養液中での増殖性を検討し、キラー抵抗性のより強い株を選択した。

5. 細胞電気融合

5.1 細胞電気融合法

細胞融合に供するプロトプラストは、図1のような方法で調製した。融合させる2種類のプロトプラストの懸濁液をプロトプラスト数が同数となるように混合し、この混合懸濁液を融合用電極間に滴下し、表1に示したような融合条件で島津細胞融合装置 SSH-1 を用いて細胞電気融合した。



図1 プロトプラストの調整

表1 細胞電気融合の条件

融合菌株	<i>Z. rouxii</i> IFO 0510 の変異株 × <i>S. cerevisiae</i> BJ1824の変異株及び その形質転換株	<i>Z. rouxii</i> IFO 0510 の変異株 × <i>K. lactis</i> IFO 1267 及びその変異株
高周波電界		
周波数	2 MHz	2 MHz
電圧	40V	40V
印加時間	60s	60s
高圧パルス		
電界強度	3.8~4.5KV/cm + 3.42~4.05KV/cm + 3.08~3.65KV/cm	4.2~5.0KV/cm + 3.78~4.50KV/cm + 3.40~4.05KV/cm
パルス印加時間	60 μ s	60 μ s
パルス印加間隔	0.5s	0.5s
パルス印加回数	3	3
最終パルス印加後の 交流印加時間	2s	2s

電界強度について、各プロトプラストがどれくらいの強さで融合やバーストが生じるかを顕微鏡下で予めテストしておき、細胞融合に用いる株の両者の平均的強度で行った。また電界強度を、両株ともかなりバーストするまで順次上げて、細胞融合することも試みた。

5.2 融合プロトプラストの再生及び分離

浸透圧安定剤として1M ソルビトールを添加した再生寒天培地に融合処理した細胞懸濁液を広げ、同種の上層用寒天再生培地により混釈、埋理し融合株を再生した。遺伝マーカーがアミノ酸栄養要求性株と呼吸欠損株(ρ^-)との組合せの細胞融合では炭素源をグリセリンとしたSDプレートを選択再生培地として利用した。両親株ともアミノ酸栄養要求性株の場合はSDプレートを選択再生培地として利用した。加えて融合プロトプラストのみならず両親株のプロトプラスト全てが再生できる選択性のないYPD再生培地も再生に利用した。選択再生培地に生成したコロニーを釣菌し選択培地に平板塗抹培養し単コロニー分離して融合株を得た。選択性のないYPD再生培地での再生コロニーは上層寒天を剥離し滅菌水を加えホモゲナイズ、更に滅菌水で3回洗浄したのから、選択培地での選別により融合株を分離した。

遺伝マーカーのない*K. lactis* IFO 1267や*W. saturnus* var. *saturnus* IFO 0117と*Z. rouxii* IFO 0510 (*tfr*⁻, *lys*⁻株あるいは ρ^- , *Can*^r株)との間の融合では、前者はSD再生プレート、後者は炭素源をグリセリンとしたSD再生プレートで融合株及び*K. lactis*を再生した。再生コロニーを含む上層寒天を剥離し、滅菌水を加えホモゲ

ナイズ、3回洗浄した懸濁液を、17%食塩を含むMG培地に接種、増殖のみられた培養液より集菌、10%食塩水で3回洗浄後、前者は15%食塩を含むSDプレート、後者は10%食塩を含むグリセリンプレートに塗抹し、対照として塗抹培養した*K. lactis* IFO 1267 (*W. saturnus* var. *saturnus* IFO 0117) よりも1日以上早く形成したコロニーを融合株の可能性が高い株として単コロニー分離した。

このような方法で取得した融合株について、食塩耐性、キラー性やキラー抵抗性の有無、カラープレートでのコロニーの色調の違いなど両親株と種々の性質について比較した。

6. キラー性の検定

約 10^7 /mlの標的菌懸濁液0.1~0.2mlをMBMプレート(BJ1824キラー化株及びその融合株ではMBMGalプレート)に均一に塗抹し、プレートをよく乾燥させた後、検定株を接種し、25℃で培養してキラー性を検定した。すなわち、塗抹標的菌の生育を阻害した検定菌コロニーの周りの阻止帯や、メチレンブルーによって染色される死滅細胞の存在でキラー活性を検出した。阻止帯(帯)の直径を検定菌コロニーの直径で割った値をキラー活性度とした。

7. 培養液の成分分析

エタノール及び香気成分は培養液を遠心分離して除菌した上清を試料とし、グルコースとグリセリンは上清を更にメンブランフィルター(0.45 μ m)で濾過したものを試料とした。

エタノールは試料1mlと2%(v/v)イソプロピルアルコール内部標準水溶液1mlを加え50mlにメスアップした水溶液の直接注入法によるガスクロマトグラフ法(装置:(株)島津製作所製GC-6AMガスクロマトグラフ;カラム:Gasukuro-pack54 80/100, 3mm ϕ ×1m)で、香気成分は試料1.8ml、塩化ナトリウム1g、内部標準溶液(n-アミルアルコール, 1000ppm) 0.2mlを試料用バイアル瓶に入れパッキング後よく混合し、50℃で30分間加温するヘッドスペースガスクロマトグラフ法(装置:(株)パーキンエルマー製HSGC-63ヘッドスペースアナライザー;カラム:PEG1000 15% chromosorb WAW 80/100, 2mm ϕ ×6フィート)で分析した。

グルコースとグリセリンは高速液体クロマトグラフ法(装置:日本分光工業(株)製TRY ROTAR高速液体クロマトグラフ;カラム:Shodex Ionpak S-801, 5mm ϕ ×50cm;溶離液:水, 1ml/min;カラム温度:

40℃;検出器:Shodex RI)により分析した。

実験結果及び考察

1. 細胞融合供試株への遺伝マーカーの付与

1. 1 呼吸欠損株の誘導

Kluyveromyces 属及び *Williopsis* 属のキラー酵母5株(IFO 1267, ATCC 52934, IFO 1778, IFO 0117, IFO 0895)をEtBr添加YPD培地とEtBr及びアクリフラビン等量混合添加培地中で培養し呼吸欠損株を誘導、分離したが、*K. lactis* IFO 1267のみから呼吸欠損株を誘導することができた。EtBr単独添加の場合はナスタチン濃縮を併用することにより分離でき、EtBrとアクリフラビン混合添加の場合は50 μ g/mlと100 μ g/mlの培養液(7日間培養)の合併培養液(生菌数の総菌数に対する割合0.0004%)からナスタチン濃縮をせずに分離できた。分離した*K. lactis*の呼吸欠損株は誘導処理前と同様のキラー活性を有していた。

呼吸欠損株誘導培地中での生育は菌株により差がみられた。増殖可能な最大添加量とその濃度で増殖が開始されるのに要した日数から増殖阻害を判断すると、EtBr添加培地(初発菌濃度 10^6 /ml)中では、*W. mrakii* IFO 0895と*W. saturnus* IFO 0117が200 μ g/ml, 1日、*K. lactis* IFO 1267が200 μ g/ml, 3日、*K. thermotolerans* IFO 1778が50 μ g/ml, 4日、*K. lactis* ATCC 52934が20 μ g/ml, 5日であり、この順に生育阻害が大きくなった。EtBrとアクリフラビン混合添加培地中에서도IFO 0895, IFO 1267, IFO 0117, IFO 1778, ATCC 52934株の順に阻害が大きくなり同様の傾向を示した。

増殖可能な最大量のEtBrが単独添加された培地中で、増殖過程(吸光度が増加中)にある各菌株について総菌数に対する生菌数の割合を調べると、*W. mrakii* IFO 0895(200 μ g/ml)は1.4%(4日後)、*W. saturnus* IFO 0117(200 μ g/ml)は0.08%(4日後)、*K. lactis* IFO 1267(200 μ g/ml)は0.7%(4日後)、*K. thermotolerans* IFO 1778(50 μ g/ml)は12%(6日後)、*K. lactis* ATCC 52934は0.001%(5日後)であり、生菌数の割合が大きく減少していた。したがって呼吸欠損株の最適分離条件として、誘導率と生存率の2つの要因から規定される最適添加量と培養(接触)時間があるものと推定される。EtBrとアクリフラビン等量混合添加された培地での結果からも同様なことが推定された。

なお、本研究で用いている*Z. rouxii*の呼吸欠損株は生菌数の総菌数に対する割合が0.33%の時得られた。

1. 2 栄養要求性株の分離

Z. rouxii IFO 0510, IFO 0510 (td^r), IFO 0510 (ρ^-) 株からウラシル要求性変異株は得られなかった。酵母の醸造特性の損失が少ない高い生存率を示す穏やかな EMS 処理時間 (生存率80%) から、生存率が1%に至る時間までいくつかの処理を試みたが、いずれの場合も得られなかった。また EMS 処理後キラー YPD 液体培地中で培養した細胞を FOA プレートに塗抹する方法は、*S. cerevisiae* の3株 (K-7, 007, OC-2) から、常法より十倍から数十倍の取得頻度でウラシル要求性株が分離できる (未発表) が、この方法でも取得できなかった。

Z. rouxii IFO 0510, IFO 0510 (td^r), IFO 0510 (ρ^-) の3株中、IFO 0510 (td^r) からのみリジン要求性株 *Z. rouxii* IFO 0510 (td^r, lys⁻) が分離 (取得頻度 1.6×10^{-7}) できた。

Zygosaccharomyces 属の酵母では、この方法ではリジン要求性変異株は取得されないとされていた²¹⁾ が取得することができた。

2. *W. mrakii* IFO 0895 キラー蛋白質抵抗性株の造成

EMS 変異処理した酵母をキラー YPD 培養液中で培養した時、培養開始時の生菌数が *S. cerevisiae* BJ1824 では $6.0 \times 10^7 / \text{mL}$, *Z. rouxii* IFO 0510 では $4.0 \times 10^5 / \text{mL}$ であったものが、1日培養後にはその生菌数が前者では0.3%未満、後者では70%に減少し、特に *S. cerevisiae* BJ1824 はキラー感受性の高い株であることを示した。

キラー YPD 液体培養液中には、培養時間と共にキ

ラー抵抗性株が増え、生菌数に対する割合が大きく増加する。キラー抵抗性株の誘導されやすさにもよるが、生菌数が培養開始時 (表2) を上回るには、キラー抵抗性が比較的高い *Z. rouxii* で3日、BJ1824で5日程度であった。感受性を考慮すると、BJ1824株は抵抗性株が誘導されやすい株のように思われる。

キラー感受性の高い *S. cerevisiae* BJ1824 は初発菌数が $9.7 \times 10^7 / \text{mL}$ の時、キラー YPD 培養液中で1.5時間後に生菌数が32%、1日後に0.08%まで減少してしまうが、EMS 処理した株と同様に5日程度で培養開始時の生菌数を上回り、突然変異処理をしなくても自然誘発によりキラー抵抗性株が得られることを示した。

115℃、15分処理したキラー YPD 培地を用いた場合、生菌数の減少がみられず、*W. mrakii* IFO 0895 のキラータンパク質のキラー活性は消滅してしまうことを示した。

Z. rouxii IFO 0510 から、耐塩性を損傷することなく EMS 処理により抵抗性株が分離された。誘導分離された主なキラー抵抗性株とその特徴を表3に示した。

キラータンパク質 (HM-1) 抵抗性株が比較的容易に EMS 処理を経て誘導されることが明らかとなった。

半数体の BJ1824 株 (ウラシル、ロイシン、トリプトファン要求性) では自然変異によっても抵抗性株が得られ、変異処理では栄養要求性 (リジン、チロシン、アデニン) が1種類さらに付加された抵抗性株も得られた。それらの中で、キラー YPD プレート上でコロニーがピンク色を呈するアデニン要求性株のキラー抵抗性は弱

表2 キラー YPD 培地培養液中の生菌数及びキラー抵抗性株の変化

菌 株	培養時間 (日)			
	0	0.8	3.5	5.4
<i>S. cerevisiae</i> BJ1824	$2.0 \times 10^7 / \text{mL}$ (0.0001%)	$< 6.7 \times 10^4 / \text{mL}$ ($< 0.001\%$)	$< 6.6 \times 10^4 / \text{mL}$ (—)	$4.9 \times 10^7 / \text{mL}$ (57%)
<i>Z. rouxii</i> IFO 0510	$1.3 \times 10^5 / \text{mL}$ ($< 0.01\%$)	$9.3 \times 10^4 / \text{mL}$ (1.7%)	$8.7 \times 10^5 / \text{mL}$ (—)	$9.4 \times 10^6 / \text{mL}$ (47%)

供試酵母は EMS による突然変異誘発処理済、() 内の数値は生菌数中のキラー抵抗性株の割合 (キラー YPD プレート上で生育できる菌数の生菌数に対する割合)

表3 誘導された主なキラー抵抗性株の特徴

原 株 突然変異処理 キラー抵抗性株	<i>S. cerevisiae</i> BJ1824						<i>Z. rouxii</i> IFO0510	
	EMS KIT1	無 KIT2	EMS KIT3	EMS KIT4	EMS KIT5	EMS KIT6	EMS KITA	EMS KITB
キラー YPD プレート上での生育	++	++	+	++	++	++	++	++
クロスストリーク法によるキラー抵抗性		KIT6 > KIT5, KIT4 > KIT1 > KIT2 > KIT3						KITB > KITA
15%食塩含有 MG プレート上での生育	—	—	—	—	—	—	±	+
付加された栄養要求性	チロシン	無	アデニン	リジン	リジン	無	無	無

クロスストリーク法は MBM プレートとキラー酵母 *W. mrakii* IFO 0895 を使用
生育の度合: ++; かなり良い, +; 良い, ±; あまり良くない, —; 生育しない

表4 *S. cerevisiae* キラー化株のキラー抵抗性増強によるキラー活性の強化

キラー化株	キラー YPD 培養液中のキラー抵抗性株の割合	キラー抵抗性株中のキラー活性保持株の割合 ¹⁾	キラー活性保持株中の優良株のキラー活性度 ²⁾
BJ1824 pSEYC- <i>HMK</i>	76%	62%	3~4
BJ1824 YCp- <i>HMK</i>	75%	84%	2.5~3
BJ1824 YEp- <i>HMK</i>	73%	0%	—

1) キラー YPD プレートに生育したコロニーを各200株釣出し、その菌株について MBMGal プレートにより IFO 0569株を標的菌として検定した。

2) 活性度は、阻止円の直径を菌株コロニーの直径で除した値で示した。親株のキラー活性度は1.2~1.5, *W. mrakii* IFO 0895は2.5~2.8。

表5 耐塩性酵母とガラクトース資化性キラー酵母間の融合株

菌株	呼吸能	カナバニン耐性	リジン要求性	食塩培地15%MGでの生育	キラー性	カラープレート上でのコロニーの色調
① <i>Z. rouxii</i> IFO 0510 (trf ⁻ , lys ⁻)	正 常	—	+	+	—	青紫色
② <i>Z. rouxii</i> IFO 0510 (ρ^- , Can ^r)	欠 損	+	—	+	—	中央が赤紫
③ <i>K. lactis</i> IFO 1267	正 常	+	—	—	++	灰色っぽい水色
①×③融合株	正 常	—	—	—	++	周囲は肌色、中央は紫
②×③融合株	正 常	+	—	—	+	中央が青い

かった。キラー YPD 培養液中での増殖性によりキラー抵抗性を評価する方法と、クロスストリーク法によるキラー抵抗性を評価する方法のキラー抵抗性の強弱は必ずしも一致しなかった。

獲得されたキラー抵抗性は子孫に安定に受けつがれる性質を有していた。

3. BJ1824キラー化酵母のキラー抵抗性の付与とキラー活性

キラー化酵母のキラー因子遺伝子 *HMK* や *HSK* はベクター上のガラクトース代謝系遺伝子 *GAL10* プロモーターにより発現調節されているため、カタボライトリプレッションによりグルコース含有培地ではキラー性を示さない。従って HM-1 や HYI キラー感受性株を宿主とするキラー化株はグルコース含有培地で普通に生育可能である。

HM-1 キラー感受性 BJ1824株を遺伝子 *HMK* を用い形質転換して造成したキラー酵母 BJ1824 pSEYC-*HMK*, BJ1824 YCp-*HMK*, BJ1824 YEp-*HMK* は、糖質がガラクトース主体の培地ではキラー性を示すが、これらは宿主同様抵抗性がなく、自ら生産するキラータンパク質により自滅する傾向を有していた。そのためキラー活性は微弱であった。これらのキラー化株から自然変異によりキラー抵抗性株を誘導したところ、YCp系ベクターで形質転換した株 BJ1824 pSEYC-*HMK*, BJ1824 YCp-*HMK* では、得られた抵抗性株のキラー活性が大幅に増加した。すなわち、抵抗性誘導前のキラー活性度は1.2~1.5であったが2.5~4 となり、*W. mrakii* IFO 0895のキラー

活性度 (2.5~2.8) と同等かそれ以上となった。しかし YCp 系ベクターよりプラスミドコピー数が多い YEp 系ベクターで形質転換した株 BJ1824 YEp-*HMK* では、得られた抵抗性株のキラー活性が消滅してしまった (表4)。

BJ1824の HM-1 キラー抵抗性株 KIT5 を宿主として用い、HM-1 に類似した性質の HYI の遺伝子 *HSK* を導入してキラー化した株の場合、YEp 系ベクターを利用した株 KIT5 YEp-*HSK* はキラー活性が強く *W. saturnus* IFO 0117 とほぼ等しいものであったが、YCp 系ベクターを利用した株 KIT5 YCp-*HSK* ではキラー抵抗性があるにもかかわらずキラー活性が弱かった。これらの結果を単純に判断すると、YCp 系ベクターを用いる場合は形質転換してから形質転換株のキラー抵抗性を強化する方が有効であり、YEp 系ベクターでは宿主をキラー抵抗性株とした後、形質転換する方が有効であることを示しているが、なお詳細な検討が必要である。

これらキラー酵母を YPD 培地で培養 (28℃) した時の細胞数の倍化時におけるキラー酵母の残存率 (MBMGal プレートで検定) とキラー酵母の割合が50%を割る世代数 (増殖倍数) は BJ1824 pSEYC-*HMK* では91.4%, 7.7世代, BJ1824 YCp-*HMK* では96.3%, 18.4世代, KIT5 YEp-*HSK* では95.7%, 15.8世代であった。これらの結果は、保存株を植えつぐときにキラー酵母を選択して植えれば、保存上問題ない安定度があると考えられる。

表6 耐塩性酵母とガラクトース資化性キラー酵母間の融合株の発酵特性

菌 株	発酵液中の菌数 ¹⁾ (1 ml 中)	消費グルコース (w/v%)	アルコール ²⁾ (w/v%)	対消費グルコース アルコール収率(%)	グリセリン ²⁾ (w/v%)	酢酸エチル ²⁾ (ppm)	酢酸イソアミル ²⁾ (ppm)	イソアミルアルコール ²⁾ (ppm)
① <i>Z. rouxii</i> IFO 0510 (<i>tdf</i> ⁺ , <i>lys</i> ⁻)	5.1×10 ⁷	4.10	1.47 (2.88)	70.1	0.11 (0.22)	2.4 (4.7)	—	109 (213)
② <i>Z. rouxii</i> IFO 0510 (<i>p</i> ⁻ , <i>Can</i> ^r)	6.2×10 ⁷	4.15	1.75 (2.08)	60.7	0.11 (0.18)	1.9 (3.1)	—	64 (103)
③ <i>K. lactis</i> IFO 1267	1.6×10 ⁸	3.40	1.02 (0.06)	58.9	0.11 (0.01)	0.3 (0.0)	0.09 (0.01)	66 (4)
①×③融合株	7.7×10 ⁸	3.50	1.17 (0.15)	65.4	0.23 (0.03)	40.6 (5.3)	0.14 (0.02)	84 (11)
②×③融合株	7.4×10 ⁸	3.90	1.19 (0.16)	59.5	0.18 (0.02)	40.2 (5.4)	0.15 (0.02)	89 (13)

1) YM-5 培地に 1×10⁶/ml の菌濃度となるように接種し、25℃、4日間静置培養した発酵液の菌数
 2) 発酵液中の生成量。—は検出限界以下。() 内の数値は菌1個当りの成分濃度 (×10⁻³ppm)

表7 耐塩性酵母と BJ1824キラー化株間の融合株

菌 株	キラー活性		キラー YPD プレート 上での増殖	カラープレート上での コロニーの色調	MG プレート上での増殖食塩 (%)		
	MBMGal	MBM			5	10	15
① <i>Z. rouxii</i> IFO 0510 (<i>tdf</i> ⁺ , <i>lys</i> ⁻)	—	—	+	少し紫がかったピンク色	++	++	+
② <i>Z. rouxii</i> IFO 0510 (<i>p</i> ⁻)	—	—	+	濃赤紫色	++	++	+
③ <i>S. cerevisiae</i> BJ1824 pSEYC-HMK KIT	+	—	+++	赤桃色	+	—	—
④ <i>S. cerevisiae</i> BJ1824 YCp-HMK KIT	+	—	+++	赤桃色	+	—	—
①×③融合株 A	+	—	+++	ピンク色	++	++	+
B	—	—	+	—	++	++	—±
①×④融合株	+	—	+	—	++	++	+
②×④融合株	—	—	+	—	++	++	+

キラー活性の検定に用いた標的菌は IFO 0569株

4. *Z. rouxii* とキラー酵母 *K. lactis* や *W. saturnus* の細胞融合

Z. rouxii IFO 0510(*tdf*⁺, *lys*⁻)と *K. lactis* IFO 1267(*p*⁻), *Z. rouxii* IFO 0510(*p*⁻, *Can*^r)と *K. lactis* IFO 1267, *Z. rouxii* IFO 0510(*tdf*⁺, *lys*⁻)と *K. lactis* IFO 1267の三種類の組み合わせによる細胞融合の結果、一番目の組み合わせからはキラー性を有する融合株は得られなかった。しかしその他の組み合わせからはキラー性を有する融合株と推定される株が得られた(表5)。

親株である *K. lactis* に遺伝的マーカーが付与されていないため、食塩含有培地での生育速度でしか親株の *K. lactis* と分離ができなかった。またカラープレートでのコロニーの色調が *K. lactis* とは全く違うことから融合株と判断し、発酵試験を行った。発酵試験の結果は表6に示した。

発酵試験においては、融合株の対消費グルコースアルコール収率が親株の *K. lactis* よりも5%程度増加した。香気成分については酢酸エチル生成量が親株の *K. lactis* のそれより100倍以上も増加した。

取得した株は *K. lactis* の変異株の可能性も否定できないが *K. lactis* の融合株である可能性が高い。

5. *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* 形質転換キラー化株の細胞融合

Z. rouxii IFO 0510(*tdf*⁺, *lys*⁻)と BJ1824 pSEYC-HMK KIT, *Z. rouxii* IFO 0510(*tdf*⁺, *lys*⁻)と BJ1824 YCp-HMK KIT, *Z. rouxii* IFO 0510(*p*⁻)と BJ1824 YCp-HMK KITの三種類の組み合わせで細胞融合を行い、表7に示したような融合株が得られた。前記の一番目と三番目の組み合わせでは選択再生培地から直接融合株が分離できたが、三番目の組合せでは全てのプロトプラストを再生することができる YPD 再生プレートでの再生を経る方法で融合株が分離された。一番目と二番目の組み合わせからは BJ1824キラー化株と同様なキラー性やキラー抵抗性を有しかつ *Z. rouxii* と同様な耐塩性も示すキラー酵母が得られた。しかし三番目の組み合わせからの融合株は耐塩性を有するがキラー性は消失していた。細胞融合により得られた耐塩性キラー酵母について、プラスミ

ドの確認などの遺伝子解析をする必要があるが、グルコースを含む培地で発現調節されないプロモーターを有する BJ1824 キラー化株との細胞融合で、より実用性のある耐塩性キラー酵母が、将来育種できるものと思われる。

要 約

産膜性酵母などの有害な野生酵母の汚染を制御できる耐塩性キラー酵母の味噌、醤油醸造への利用を目的とし、主発酵酵母 *Z. rouxii* IFO 0510 とキラー酵母の細胞電気融合による耐塩性キラー酵母の造成を試み、以下の結果を得た。

- 1) ガラクトース資化性キラー酵母 *K. lactis* IFO 1267 との間に融合株と推定されるキラー酵母が得られた。耐塩性は親株の *Z. rouxii* より弱くなるものの、酢酸エチル生成量は親株の *K. lactis* より100倍以上も増加した。
- 2) *W. mrakii* IFO 0895 のキラー因子遺伝子を導入した *S. cerevisiae* BJ1824 キラー化株との間に、親株の BJ1824 キラー化株と同様なキラー性を有しかつ *Z. rouxii* IFO 0510 と同様な耐塩性を示すキラー酵母が得られた。

本研究を行うにあたり、研究生として熱心に実験に協力していただいた愛知工業大学の小関滋生氏と森裕喜氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 大内弘造：醗酵工学，59，517 (1981)
- 2) 高橋孝夫・福井宣之・中河原俊治・宮島啓爾・古賀那正・永見憲三・熊田順一：醸協，80，725 (1985)
- 3) 原昌道：農化，63，1888 (1989)
- 4) S. Kagiya, T. Aiba, T. Kadowaki and K. Mogi：Agric. Biol. Chem.，52，1 (1988)
- 5) 鬼頭幸男・北本則行・細川信男・大島克己・岡田安司・木村哲哉：愛知食品工技年報，33，9 (1992)
- 6) 三輪昭生・伊藤寛・姫野国夫：味噌の科学と技術，36，25 (1988)
- 7) C. Suzuki, K. Yamada, N. Okada and S. Nikkuni：Agric. Biol. Chem.，53，2593 (1988)

- 8) 宮代龍次・笹原浩幸：香川発食試報，81，19 (1988)
- 9) 青木幸彦・菅原久孝・安平仁美：信州味噌研究所報告，31，27 (1990)
- 10) 河野勇人・姫野国夫：醬研，19，75 (1993)
- 11) 山本哲郎・山口英世・嶋崎孝行・原昌道 (平野正編)：酵母のバイオテクノロジー・基礎と応用，学会出版センター，p9 (1988)
- 12) Y. Ohta, Y. Tsukada and T. Sugimori：Agric. Biol. Chem.，48，903 (1984)
- 13) T. Kimura, N. Kitamoto, K. Matuoka, K. Nakamura, Y. Iimura and Y. Kito：Gene，137，265 (1993)
- 14) T. Kimura, N. Kitamoto, Y. Iimura and Y. Kito：J. Ferment. Bioeng.，80，423 (1995)
- 15) 鍵山省吾・門脇清：日特公，平5-33025 (1993)
- 16) 太田泰弘・塚田陽二・杉森恒武：醬研，11，154 (1985)
- 17) 小林武子・関口順一・群家徳郎・安平仁美：信州味噌研究所報告，28，52 (1987)
- 18) 市川英治：醸協，84，166 (1989)
- 19) 秋田修：同上，84，96 (1989)
- 20) 大嶋泰治 (石川辰夫編)：微生物遺伝学実験法，共立出版，p189，192，196 (1982)
- 21) 北本勝ひこ：醸協，84，34，96 (1989)