

リン高取り込み酵母の育種と利用の検討

広島大学大学院工学研究科 学生会員 ○渡部貴志 独立行政法人酒類総合研究所 家藤治幸
独立行政法人酒類総合研究所 岩下和裕 広島大学大学院工学研究科 正会員 尾崎則篤
埼玉大学大学院理工学研究科 正会員 小松登志子

1. はじめに

閉鎖水域などの富栄養化は主にリン、窒素などの栄養塩によるものである。これらの物質は生活排水、産業排水などに含まれているため、効率的な除去方法が必要となる。一方、リンは地球上では低濃度で分布しており、主要なリン資源であるリン鉱石の枯渇が懸念されているため、排水等から除去し、活性汚泥内に蓄積させたリンを回収、再利用することが考えられている。本研究ではリンを高濃度取り込む酵母の育種と利用の検討を行った。

2. 実験室酵母 *S. cerevisiae* NBW7 のリン酸吸収制御機構

リンは生命活動に関する物質(ATP、ADP、ポリリン酸、DNA、RNA など)の構成物質で全ての生物の必須物質であるため、細胞内にはリンの吸収を調整する機構が存在する。*S. cerevisiae* NBW7 は図 1 のように環境中にリンが少ない時、転写活性因子 Pho4 が酸性ホスファターゼ(酵母の体外に分泌され、リン化合物のリンを分離する)とリン酸トランスポーター(酵母の体外のリン酸を体内に輸送する)、そして Phm 複合体(液胞内にリン酸を蓄積する)を活性化し、リンを積極的に吸収しようとする。しかし環境中にリンが多い時、これらの活性は抑制されリンを吸収しなくなる。

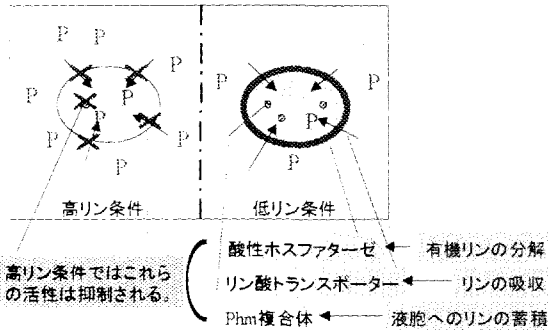


図 1 *S. cerevisiae* NBW7 のリン吸収モデル

3. 実験の概略

3-1. リン高取り込み酵母育種の概念

これまで我々のグループでは、実験室酵母 *S. cerevisiae* NBW7 からリン高取り込み酵母を得ている。しかし、*S. cerevisiae* NBW7 は実験用に改良された酵母で、特別な栄養素が必要であり実用には適さない。そこで、実用排水処理酵母からリン高取り込み酵母を育種できれば、実用に供することができる。

S. cerevisiae NBW7 から育種されたリン高取り込み酵母には、高リン条件においても図 1 の低リン条件のリン酸吸収系をとっているものがある。このような酵母は、高リン条件でも酸性ホスファターゼ活性を示す。同様に高リン条件でも、酸性ホスファターゼ活性(酸性ホスファターゼ常時活性)を示す実用排水処理酵母の変異株を数多く取得すれば、その中にはリン高取り込み酵母が含まれていると考えられる。

3-2. リン酸吸収制御機構をもつ酵母の選抜

S. cerevisiae NBW7 と同様なリン酸吸収制御機構をもつ酵母であれば、同様の遺伝子の変異によりリン高取り込み酵母を育種できると考えられる。本研究で用いた酵母を表 2 に示す。これらの中で *S. cerevisiae* NBW7 と同様なリン酸吸収制御機構をもつと思われる酵母を以下の 2 つの観点から選抜した。

- 1) リンの濃度により酸性ホスファターゼの活性が変化するならば、
リンの濃度によりリン吸収の制御を受けているためリン酸吸収制御機構が存在する。
- 2) リン酸吸収制御機構が存在するときは、低リン条件と高リン条件ではリン吸収系が異なる。このため低リン条件から高リン条件に急速に培養条件を変えれば、対応の遅れによって過剰にリンを吸収すると考えられる。

表 2 本研究の使用酵母

Strain	特徴など
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X-2180	実験室酵母
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K-9	協会清酒酵母
<i>Hansenula fabianii</i> J640	実用排水処理酵母
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	生澱粉を分解する酵母
<i>Hansenula anomala</i> J224-1	実用排水処理酵母

1)についての実験：酸性ホスファターゼの活性を示す酵母は、 α -ナフチルリン酸からリンを分離するため赤く染色される。このため、環境中のリン濃度の変化による酸性ホスファターゼ活性の変化が判別できる。0.1M 酢酸 Buffer100ml に α -ナフチルリン酸カルシウム 50mg、Fast Blue B Salt500mg を溶かし、これを予め加熱溶解させていた 3%寒天溶液 100ml と混合して染色液を作成した。そして、予めリンの濃度の異なるプレート培地 (T-Pi20、100、150、300) で培養した酵母を染色液で重層した。0.5hr 後、赤くなった酸性ホスファターゼ活性をしめす酵母を確認した。(T-Pi：全リンのリン酸換算濃度 mg/l)

本実験の結果より、*S. cerevisiae* X-2180、*H. fabianii* J640、*H. anomala* J224-1 にリンの濃度の変化で酸性ホスファターゼ活性の変化が見られた。

2)についての実験：予め低リン条件(T-Pi20)、高リン条件(T-Pi500)の液体培地で培養していた酵母を、遠心分離によって分離した。その後、高リン条件の培地の中に入れた。0.0、0.5、1.0、1.5hr 後の単位菌体量あたりのリン含有量を測定し、単位菌体量あたりのリン含有量について、前培養の低リン条件と高リン条件で比較した。

菌体のリンは、JIS K 0102 のモリブデン青(アスコルビン酸還元)吸光光度法に準拠し、全リンを測定した。図 2 に測定結果を示す。凡例の「低」は低リン条件、「高」は高リン条件で前培養を行ったものである。この結果より、高リン条件より低リン条件で前培養した方が単位菌体量中のリン含有量が多くなるという、リンの過剰の摂取が見られたものは *S. cerevisiae* X-2180、*S. cerevisiae* K-9、*H. fabianii* J640、*H. anomala* J224-1 であった。

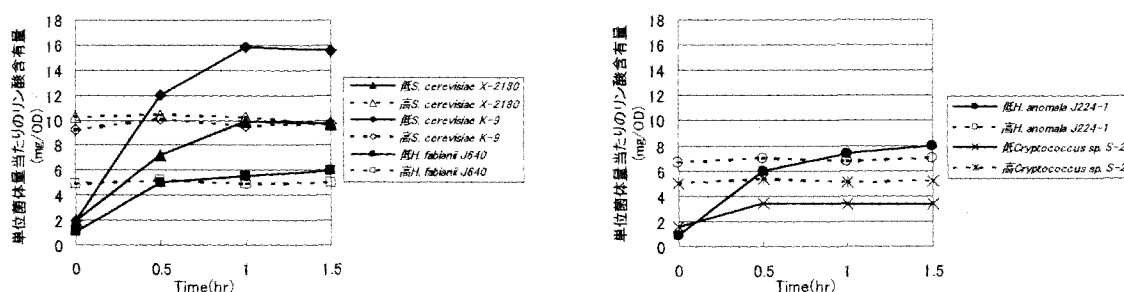


図 2 リン含有量の測定結果

1)、2)の結果より、*S. cerevisiae* X-2180、*H. fabianii* J640、*H. anomala* J224-1 を *S. cerevisiae* NBW7 と同様なリン吸収制御機構をもつ酵母と考え、選抜した。

3-3. 酸性ホスファターゼ常時活性変異株の分離と評価

酸性ホスファターゼ常時活性変異株は、X-リン酸(5-bromo-4-chloro-indolylphosphate)からリンを分離し、青く染色される。そこで前節で選抜した酵母に変異誘発剤の ethylmethanesulfonate を用い、突然変異を誘発させ、X-リン酸を 100mg/l 含有の高リン条件(T-Pi613)のプレート培地に植菌し、得られたコロニーの中で青色に染まっているものを分離した。

得られた酸性ホスファターゼ常時活性変異株が、リン高取り込み酵母であるかどうかを確認するため、高リン条件(T-Pi613)の液体培地で培養を行い、菌体増殖量、リン酸取り込み量について親株と比較を行った。

現在のところ、*S. cerevisiae* X-2180 から 19 株、*H. fabianii* J640 から 15 株、*H. anomala* J224-1 から 1 株ほど酸性ホスファターゼ常時活性変異株が得られたが、リン高取り込み酵母の育種には至っていない。

4. 結論

(1) 実験室酵母 *S. cerevisiae* NBW7 と同様のリン酸吸収制御機構をもつ酵母は、低リン条件から高リン条件に変化するにつれ、酸性ホスファターゼの活性が抑制されること、低リン条件から高リン条件へ培地を急に移した際、リンを過剰に摂取することが考えられる。本実験で用いた酵母から *S. cerevisiae* X-2180、*H. fabianii* J640、*H. anomala* J224-1 を選抜した。

(2) ethylmethanesulfonate を用いた突然変異誘発と X-リン酸を含有のプレート培地を用いることで、青く染色された酸性ホスファターゼ常時活性変異株が得られたが、現在のところ、これらの酵母の中からリン高取り込み酵母は得られていない。