

醤油乳酸菌における活性型トランスポソンの発見とアルギニン非分解性株育種への利用

寄稿

ヤマサ醤油・製造本部
脇中琢良氏

はじめに

好塩性乳酸菌Tetragenococcus halophilusは、醤油調味で乳酸発酵を担う乳酸菌であり、醤油乳酸菌とも呼ばれる。醤油が乳酸発酵食品であることはあまり認知されていないが、醤油に含まれる乳酸の濃度は、製品によって0%に近い場合から、

ヨーグルトの乳酸濃度を上回る2%近い場合まであり、注意深く味わえば製品ごとに酸味の強さが異なることに気づくであろう。乳酸菌が生産する乳酸は、醤油に酸味や味の深みをもたらすだけでなく、醤油調味のpHを低下させて酵母によるアルコ

ール発酵を促すなど、おいしい醤油を造る上で重要な役割を果たしている。一方で、乳酸が多すぎると醤油にきつい酸味が付与されてしまう上に、酵母によるアルコール発酵も阻害されるため、香味の悪い醤油になりやすいため、乳酸発酵を適切にコントロールすることは、醤油醸造上の重要な課題である。

伝統的な醤油醸造では、醤油蔵の壁などに住むいわゆる蔵付き菌が、乳酸発酵を担っていた。しかし近年、洗浄性に優れた大型調味発酵タンクの普及で蔵付き菌が排除され、特定の乳酸菌株を発酵スターターとして添加することが多くなってきて

いる。さらに最近の研究で、醤油乳酸菌の性質は菌株間で全く同じではなく、アミノ酸・糖・有機酸代謝などにおいて多様な性質を示し、それらの性質の違いが醤油の品質にも大きな影響を及ぼすことが明らかになってきた。そのため、多様性に満ちた醤油乳酸菌の個性を理解した上で、望ましい性質の菌株を選ばしたり、望ましくない性質を改変・育種したりする技術が求められている。

醤油乳酸菌においては未だ簡便な遺伝子操作手法が確立されていないが、近年、全ゲノムのDNA配列が解析され、インサージョンシーケンスという小さなトランスポソン（動

く遺伝子）らしき配列が存在することが明らかにされた。トランスポソンは、トランスポサゼというDNAを切り出し挿入する酵素遺伝子を含む配列で、動く遺伝子と言われる通り、DNA上にある場所から別の場所へ移動することができる。インサージョンシーケンスが他の遺伝子の上に動く（転移する）と、その遺伝子は機能を破壊されるため、しばしば細菌の変異導入にインサージョンシーケンスは利用される。しかしながら、醤油乳酸菌で実際に転移活性のあるインサージョンシーケンスの存在は、これまで確認されていなかった。

上のいずれかの箇所にインサージョンシーケンスが転移していることが見出された（図2）。

いずれの株も、アルギニンの分解に関与する酵素遺伝子や、細胞内へのアルギニンの取り込みに関与する遺伝子、各遺伝子の発現に必要な転写調節領域などが、転移したインサージョンシーケンスによって破壊されたため、アルギニンを分解しなくなったと考えられる。M1~M5で転移したインサージョンシーケンスは3種類あり、ISTeha3、ISTeha4、ISTeha5と名付けた。いずれもNBRC 12172株のゲノム上の別の箇所に全く同じ配列が存在しており、その箇所からアルギニンデヒドロゲナーゼ経路に関与する遺伝子クラスター領域へ転移したと考えられる。

アルギニン非分解性株の育種

醤油調味から分離される醤油乳酸菌には、アルギニンを分解する菌株と分解しない菌株が存在する。乳酸菌のアルギニン分解性に関与するのは、アルギニンデヒドロゲナーゼ経路という代謝経路である。この経路では、アルギニンがオルニチンへと変換され、その際にアンモニアが遊離する。醤油調味中でアルギニンが分解されると、乳酸発酵で生産された乳酸をアンモニアが中和してpH低下を抑制するため、結果的に乳酸過多の調味になりやすい。また、アルギニンとオルニチンの代謝中間体であるシトルリンは、発がん性が指摘されるカルバミン酸エチルの前駆体となる（図1）。

低下するのに対し、アルギニンが分解されアンモニアが生じるとpHが上昇する。培地にpH指示薬を添加しておけば、pHの変化を色の違いによって視覚的に捉え、培養した菌株がアルギニンを分解するかどうか簡単に判別することができる。この方法を用いて、NBRC 12172株に紫外線を照射した株の中からアルギニン分解性を失った変異株を5株選別し、M1~M5と名付けた。

アルギニンデヒドロゲナーゼ経路に関与する遺伝子クラスター領域のDNAシーケンス解析を実施したところ、5株の変異株全てで、クラスター

育種株を用いた醤油醸造

親株であるNBRC 12172株と、育種したアルギニン非分解性変異株を発酵スターターとして用い、試験的に醤油を醸造した。発酵スターターを添加しない調味と比べ、親株、変異株をスターターとして添加した調味では、いずれも速やかにpHが低下した。スターターを添加しない調味では乳酸はほとんど生産されなかったのに対し、スターターを添加した調味では著量の乳酸が生産された。

乳酸濃度を比較すると、アルギニンを分解しアンモニアを生産する親

株の方が、アルギニンを分解しない変異株よりも多くなっていた。アミノ酸濃度を分析したところ、親株をスターターとして用いた調味ではアルギニンが減少してオルニチンが生じていた一方で、変異株を用いた調味ではアルギニンは分解されず残存していた。変異株は、親株と比べ過剰な乳酸を生産せず、アルギニンも分解しないという、期待通りの醸造特性を示した（図3）。

図2 アルギニンデヒドロゲナーゼ経路に関与する遺伝子クラスター領域周辺のインサージョンシーケンス転移位置

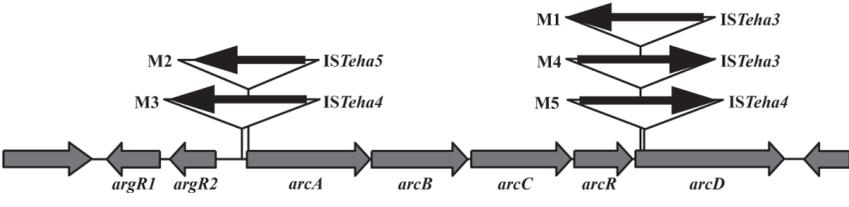
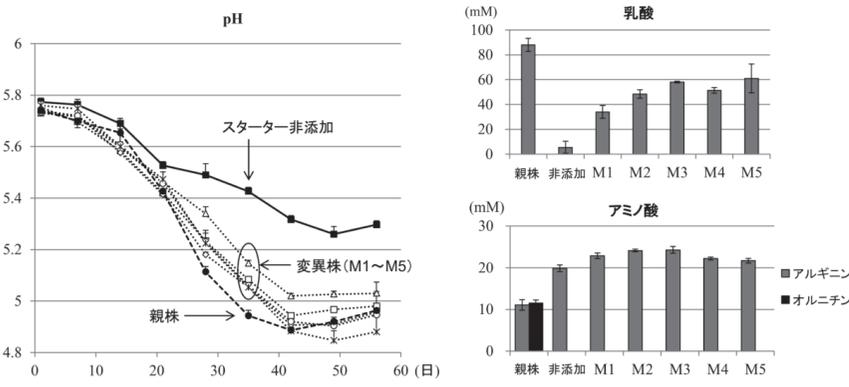


図3 各スターター株を添加した調味のpH推移と、乳酸・アミノ酸の分析値



おわりに

本研究では、醤油乳酸菌においてトランスポソンの一種であるインサージョンシーケンスが活発に転移していることを発見し、それを利用してアルギニン非分解性の変異株を育種することに成功した。本研究で見出したISTeha3、ISTeha4、ISTeha5という3種類の新規なインサージョンシーケンスは、Tetragenococcus属の乳酸菌において転移活性が確認された初めてのトランスポソンである。M1~M5の変異株は紫外線照射した上で得られたが、その後

の研究からは、これらのインサージョンシーケンスの転移に紫外線照射は必須でなく、単に継代・培養するだけで醤油乳酸菌のゲノム上を活発に転移していることが判明している。

育種は、農作物では一般的な技術であり、例えば果物では、より甘く、収量が多く、病気に強く、種のない品種などが育種されている。微生物においても同様で、清酒酵母では、優れたアルコール生産能力を有し、吟醸香成分を多く作り、不快臭成分を作

らず、醗が泡立ちにくいといった性質の菌株が育種されている。しかし醤油乳酸菌を育種した事例は、麹菌や酵母と比べて少なく、変異を導入するための技術も確立されていなかった。今回報告したインサージョンシーケンスを利用した育種は、薬剤処理による農作物の育種などと同様に、遺伝子組み換え技術を用いない、自然変異も利用した育種技術である。

本研究が、今後の醤油乳酸菌の育種・研究の基盤技術として活用され、醤油の品質・安全性・生産性の向上に寄与することを願ってやまない。

Advertisement for Yamasa Soy Sauce featuring a woman and various products like 'Yamasa Freshness Series' and '300ml Freshness Bottle'.