実験室酵母からのフェルラ酸耐性株の取得

我部政晴・小関卓也*

(関東信越国税局鑑定官室, 国税庁醸造研究所*)

平成11年7月13日受理

Isolation of Ferulic Acid Tolerant Mutants from *Saccharomyces cerevisiae*

Masaharu GABE, and Takuya KOSEKI*

(Office of Brewing Technology, Kanto shinetsu Regional Taxation Bureau 1-1-15

Kudan minami, Chiyoda ku, Tokyo 102-0083

*National Research Institute of Brewing, 2-6-30,

Takinogawa, Kita ku, Tokyo 114-0023)

Aromatic compounds, such as cinnamic, *p*-coumaric (4-hydroxycinnamic), and ferulic (4-hydroxy-3-methoxycinnamic) acids, have antimicrobial activity toward microorganisms, including yeast and fungi. To evaluate the mechanism for ferulic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, mutants which could grow in medium containing 0.08% (w/v) ferulic acid were isolated and characterized.

The *Saccharomyces cerevisiae* strain X 2180-1B (*MAT α*) was treated with ethylmethane sulfonate and selected on 0.5% malt extract, 0.01% yeast extract agar medium (MYE) containing 0.8 g per ℓ ferulic acid.

By primary screening in MYE liquid medium containing 0.08% ferulic acid and by secondary screening on the same agar medium, two mutant strains, designated α -1 and α -2, were isolated and further characterized. The two mutants were insensitive to the cell wall lysis enzyme Zymolyase 20 T and to cycloheximide, but were sensitive to cerulenin. The two mutants also converted ferulic acid into 4-vinylguaiacol, and the decarboxylase activity of the mutants was greater than that of the wild type, the wine yeast strain W-1, and the sake yeast strain Kyokai No. 7. These results suggest that the decarboxylation of ferulic acid by biotransformation is related to the ferulic acid tolerance.

Key words: フェルラ酸耐性, 酵母, フェルラ酸脱炭酸活性

緒 言

フェルラ酸は植物細胞壁に存在する¹⁾。筆者らは先にこのフェルラ酸が、泡盛醸造工程中に香り成分の4-ビニルグアヤコール及びバニリンに変換されることを報告した²⁾。フェルラ酸はフェノール化合物であり、環境中のフェノール化合物の一つとしてフェルラ酸の微生物による分解に関する報告がある³⁾。また、フェルラ酸は酵母等微生物に対する抗菌活性を有し、ある濃度以上では増殖が停止する。フェルラ酸に耐性

のある酵母のフェルラ酸感受性を相補する遺伝子として、フェルラ酸から4-ビニルグアヤコールに変換させる脱炭酸酵素遺伝子が見いだされたが⁴⁾、ワイン酵母のフェルラ酸脱炭酸酵素遺伝子はこれとは異なることも報告された⁵⁾。酵母のフェルラ酸に対する耐性と脱炭酸酵素活性との関連については、まだ解明されていない。そこで、フェルラ酸耐性株を取得し、その耐性機構を明らかにすることを目的とした。本稿ではフェルラ酸感受性の実験室酵母からフェルラ酸耐性株を取得し、その性質を調べたので報告する。

実験方法

1. 供試酵母および使用培地

Saccharomyces cerevisiae X 2180 1 B (*MAT α*) を親株として用いた。また、清酒酵母協会 7 号 (K 7) 及び協会ワイン酵母 W 1 株 (W 1) も用いた。

酵母の培養には MYE 培地 (0.5 % 麦芽エキス, 0.01 % 酵母エキス) を用い、必要に応じて 1.5 % 寒天を加えた平板培地とした。なお、培地 pH は pH 5.0 に設定した。フェルラ酸耐性株の取得には、800 mg/l のフェルラ酸 (以下 FA と省略する) を含む MYE 液体培地 (0.08 % MYEF 培地)、フェルラ酸脱炭酸酵素活性の測定には、200 mg/l の FA を含む MYE 液体培地 (0.02 % MYEF 培地) で培養した菌体を用いた。

2. フェルラ酸耐性変異株の分離法

5 ml の MYE 液体培地に供試酵母を接種し、30°C、24 時間培養後、滅菌水で 2 回洗浄した菌体に突然変異処理を施した。突然変異処理は、3 % エチルメタンスルホン酸 (以下 EMS と省略する) で 70 分処理を行った。処理菌体は MYE 液体培地に接種し回復させた後、0.08 % MYEF 培地で培養し、生育が認められたサンプルを 0.08 % MYEF 平板培地に塗布し、30°C、24~48 時間培養後、出現したコロニーを釣菌し、フェルラ酸耐性株とした。

3. 細胞壁溶解性試験方法

細胞壁溶解性試験は、酵母生菌体溶解酵素として Zymolyase 20 T を用い、大内ら⁶⁾の方法に従った。また、菌体の溶解度は、660 nm における吸光度の減少で示した。

4. 薬剤耐性試験方法

FA 耐性に加えて、シクロヘキシミド (CYH) およびセルレニン (CE) に対する耐性試験を行った。突然変異株および対照として親株を MYE 液体培地で前培養後、1 mg/l の CYH を含む MYE 液体培地 (MYECH 培地) および 1 mg/l の CE を含む MYH 液体培地 (MYEC 培地) に接種し 30°C で 3 日間振とう培養し、菌の増殖を 660 nm で調べた。

5. 細胞質膜の脂肪酸分析法

供試株を MYE 液体培地および 0.01 % MYEF 液体培地にて 30°C、2 日間の静置培養を行なった。細胞質膜の脂肪酸組成は吉沢ら⁷⁾の方法に従って細胞質膜を調整し、ガスクロマトグラフィー (GC-14 A,

Shimadzu) を用いて分析した。GC の条件は次のとおりである。カラム: ULTRA PERFORMANCE (0.32 mm×50 m)、検出器: FID、キャリアーガス: He (40 ml/min)、初期温度: 120°C、初期温度保持時間: 5 min、昇温プログラム 2.5°C/min、最終温度: 280°C、最終温度保持時間: 10 min、注入口温度 250°C、検出器温度 250°C。

6. 4-ビニルグアヤコール (4-VG) 生成能の測定法

供試株を MYE 液体培地で培養後、100 mg/l の FA を含む MYE 液体培地 (0.01 % MYEF 培地) に菌体を約 10^5 個/ml になるように接種し、30°C で振とう培養 (100 rpm, 3 日間) あるいは静置培養 (7 日間) した。なお、両培養法で菌体量は、ほぼ等しくなるようにした。FA から 4-VG への変換は、培養液を遠心分離により菌体を分離し、上澄液 10 ml を sep-pakC 18 カートリッジ (Waters 社製) を用いて固相抽出後⁸⁾、抽出液を 50 倍に希釈し、4-VG に特異的な 258 nm における吸光度で示した⁹⁾。

7. フェルラ酸脱炭酸酵素活性の測定法

FA 脱炭酸酵素活性の測定は、0.02 % MYEF 培地により、30°C、100 rpm で 3 日間振とう培養した酵母の培養液及び菌体内の酵素活性を測定した。各々の菌株における菌体量はほぼ等しくなるようにし、菌体の調整は集菌後、Zymolyase 20 T を作用させ菌体を溶解させた。次に、超音波破碎装置により菌体を破碎させ、遠心上澄画分を酵素溶液として用いた¹⁰⁾。測定方法は Degraassi ら⁹⁾の方法に従った。

実験結果および考察

1. FA 耐性変異株の分離

実験方法に示した方法で、2 株分離し、 α -1 および α -2 とした。なお、突然変異処理による生存率は 17 % であった。生存率が低かったのは、EMS の処理時間が長かったため致死的な変異が導入されたものと思われる。

0.02 % および 0.08 % MYEF 液体培地での FA 変異株、親株、K 7 および W 1 の増殖を Fig. 1 に示した。0.02 % MYEF 培地では FA 耐性株はほぼ 2 日目には定常期に達し、良好な増殖を示した。一方、親株、K 7 および W 1 でも FA 耐性株には及ばないものの FA 存在下で増殖した。0.08 % MYEF 培地では FA 耐性株を除き、いずれの株も増殖できなかった。

Figure 1 Growth of *S. cerevisiae* X 2180 1 B (*MATα*), the mutant strains α 1 and α 2, the sake yeast Kyokai No. 7 and the wine yeast W1 in liquid medium containing ferulic acid. A, 0.02 % (w/v) ferulic acid; B, 0.08 % (w/v) ferulic acid.

Figure 2 Lysis of yeast cells with Zymolyase 20 T.

なおデータには示さないが、FA 耐性株では、FA 濃度が 1000 mg/ℓ まで増殖が認められた。

2. 細胞壁溶解性及び薬剤耐性

Zymolyase による酵母細胞壁の溶解性試験を行い、その結果を Fig. 2 に示した。耐性株の α 1 および α 2 株は 240 分でもほとんど OD₆₆₀ 値が減少せず、

Table 1 Growth on the medium containing cycloheximide or cerulenin

Strain	Growth	
	Cycloheximide	Cerulenin
X 2180 1 B	—	—
α 1	+	—
α 2	+	—
K 7	—	—
W 1	—	—

Zymolyase に対して非感受性を示した。清酒酵母協会 11 号酵母はエタノール耐性酵母で Zymolyase 非感受性と報告されており¹¹⁾、細胞壁構造との関連が指摘されている¹²⁾。FA 耐性株は細胞壁構造が、何らかの変化を起こしていると推察された。

CYH および CE に対する耐性試験の結果を Table 1 に示した。いずれの FA 耐性株も、MYECH 培地では増殖し、MYEC 培地では増殖できず、CYH に対して非感受性を示したが、CE に対しては感受性であった。本耐性株が、タンパク質合成の阻害剤である CYH に対しても耐性を示したことは、興味を持たれる。酵母において、細胞外への薬剤排出に関わる細胞質膜 ATPase をコードする *PDR 5* 遺伝子の高発現株が CYH 耐性を有することが報告されており¹³⁾、*PDR 5* の高発現によって CYH 耐性になったとも考えられる。

3. 細胞質膜の脂肪酸組成

細胞質膜の主要な構成脂肪酸であるパルミチン酸 (C_{16:0})、パルミトオレイン酸 (C_{16:1})、ステアリン酸 (C_{18:0})、オレイン酸 (C_{18:1}) を分析し、その組成比 (C_{16:1}/C_{16:0}、C_{18:1}/C_{18:0} および U/T) を示した (Table 2)。親株では細胞質膜中の脂肪酸は、MYE 培地および 0.01 % MYEF 培地での培養でいずれも C_{18:0} < C_{18:1} < C_{16:0} < C_{16:1} の順に多く、また、各々 C_{16:1}/C_{16:0} が 4.2 および 5.3、C_{18:1}/C_{18:0} が 3.1 および 2.4、U/T がともに 0.8 で、FA 添加の影響はなかった。MYE 培地及び 0.01 % MYEF 培地で培養した耐性株では、不飽和脂肪酸の比率が多くなり、C_{18:1}/C_{18:0}、C_{16:1}/C_{16:0} 及び U/T 値は親株よりも大きくなった。また、0.01 % MYEF 培地で培養した場合には、MYE 培地で培養した場合に比べ C_{16:1}/C_{16:0} が大きくなり、C_{18:1}/C_{18:0} が小さくなる傾向があった。細胞質膜の不飽和脂肪酸比率が大きくな

Table 2 Ratio of fatty acid composition in yeast cell membrane.

Strain	MYE medium ¹⁾			MYEF medium ²⁾		
	C _{16:1} /C _{16:0}	C _{18:1} /C _{18:0}	U/T ³⁾	C _{16:1} /C _{16:0}	C _{18:1} /C _{18:0}	U/T ³⁾
X 2180 1 B	4.2	3.1	0.80	5.3	2.4	0.82
α 1	16.5	8.1	0.93	35.0	4.6	0.92
α 2	16.8	7.2	0.93	32.7	4.8	0.92

1) MYE medium : 0.5 % malt extract, 0.01 % yeast extract, pH 5.0.

2) MYEF medium : MYE containing 100 mg/ℓ ferulic acid.

3) U/T : ratio of unsaturated fatty acids to total fatty acids.

Figure 3 Biotransformation of ferulic acid into 4 vinylguaiacol by *S. cerevisiae*.

■, aerobic culture ; ▨, anaerobic culture.

たことは、膜の透過性が親株よりも大きくなっていることが考えられ、細胞外への排出も大きくなると推察される。また、FA 耐性株はセルレニン感受性株で、脂肪酸合成系の変異ではないことが示唆され¹⁴⁾、不飽和脂肪酸が親株より多くなることから不飽和化の段階に影響していると推察された。

4. 4-VG の生成

Fig. 3 に振とう培養および静置培養を行った場合の 4-VG の生成を示したが、親株及び K 7 株では 4-VG の生成は見られなかった。ワイン酵母は FA 脱炭酸酵素活性を有することが知られており¹⁵⁾、W 1 株においても 4-VG の生成が見られたが、FA 耐性株の α -1 および α -2 株においては 4-VG 生成が W 1 株よりも大きくなった。また、静置培養と振とう培養とでは、振とう培養した場合 4-VG の生成が多くなった。

5. フェルラ酸脱炭酸酵素活性

培養液中におけるフェルラ酸脱炭酸酵素活性はなかった。菌体内の酵素活性は、親株ではほとんどなかったが、耐性株においては酵素活性が上昇した (Table

Table 3 Ferulic acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*

Yeast strain	Ferulic acid decarboxylase activity (OD ₂₅₈)	
	Supernatant	Intracellular
X 2180 1 B	0.05	0.08
α 1	0.09	0.46
α 2	0.11	0.50
K 7	N.D.	0.04

N.D., not detected

3)。なお、K 7 株においても酵素活性はなかった。このように FA 耐性株は、脱炭酸酵素活性が大きくなり、FA 代謝と密接に関連していることが示唆され、今後この酵素遺伝子を取得し詳細に検討したい。FA 脱炭酸酵素活性の強い醸造用酵母はビール酵母及びワイン酵母で、それ以外の醸造用酵母は酵素活性を欠いていると言われているため、その発現制御についても興味を持たれるが、清酒酵母においても、変異株を取得し諸性質を検討する予定である。

要 約

Saccharomyces cerevisiae X 2180 1 B (*MAT α*) からフェルラ酸に耐性を示す突然変異株の取得を試み、以下の結果を得た。

1. X 2180 1 B 株および清酒酵母 K 7、ワイン酵母 W 1 は 200 mg/ℓ の FA を含む MYE 培地で増殖が抑制されたが、変異株は 800 mg/ℓ の FA を含む MYE 培地上でも増殖した。

2. 細胞壁溶解試験を行ったところ、FA 耐性株は、Zymolyase に対して比感受性を示した。また、シクロヘキシミドに対しても非感受性であったが、セルレニンに対しては感受性であった。

3. FA 耐性株の細胞質膜の脂肪酸組成は、高級不

飽和脂肪酸の比率が親株より高くなる傾向があった。

4. FA 耐性株は、親株では見いだされなかった FA から 4 VG への変換能を有し、その変換能はワイン酵母 W1 株よりも強いことが推察された。

文 献

- 1) 加藤陽治：醸協，**87**，(2) 107-115 (1992)
- 2) 小関卓也，岩野君夫：醸協，**93**，(7) 510-517 (1998)
- 3) 原田恭，彭学，北山裕隆，片山義博，政井英司，福田雅夫：日本農芸化学会講演要旨集，p 220 (1999)
- 4) M. Clausen, C. J. Lamb, R. Megnet, and P. W. Doerner : Gene, **142**, 107-112 (1994)
- 5) 吾郷昇志，川崎秀紀，菊地泰弘：日本生物工学会講演要旨集，p 24 (1998)
- 6) 大内弘造，田中良彦，布川弥太郎，秋山裕一：醸協，**67**，(2) 167-172 (1972)
- 7) 吉澤潔，大島秀隆，角田潔和，小泉武夫：醸協，**91**，(4) 284-289 (1996)
- 8) 小関卓也，伊藤康朗，伊藤清，岩野君夫，蓼沼誠：醸協，**89**，(5) 408-411 (1994)
- 9) G. Degrassi, P. P. de Laureto, and C. V. Bruschi : Appl. Environment. Microbiol., **61**, 326-332 (1995)
- 10) 岡田雅人，宮崎香：タンパク質実験ノート上，p 55, 羊土社 (1996)
- 11) 原昌道，溝田晴彦，小幡孝之，飯村譲，戸塚昭，野白喜久雄：醸協，**73**，(5) 408-411 (1978)
- 12) 伊野本真彦，山田修，五味勝也，飯村穰：醸協，**93**，(3) 224-230 (1998)
- 13) S. Meyers, W. Schauer, E. Balzi, M. Wagner, A. Goffeau and J. Golin : Curr. Genet., **21**, 431-436 (1992)
- 14) 市川栄治：醸協，**88**，(2) 101-105 (1993)
- 15) P. Chatonnet, D. Dubourdieu, J. N. Boisdron, and V. Lavigne : J. Sci. Food. Agric., **62**, 191-202 (1993)