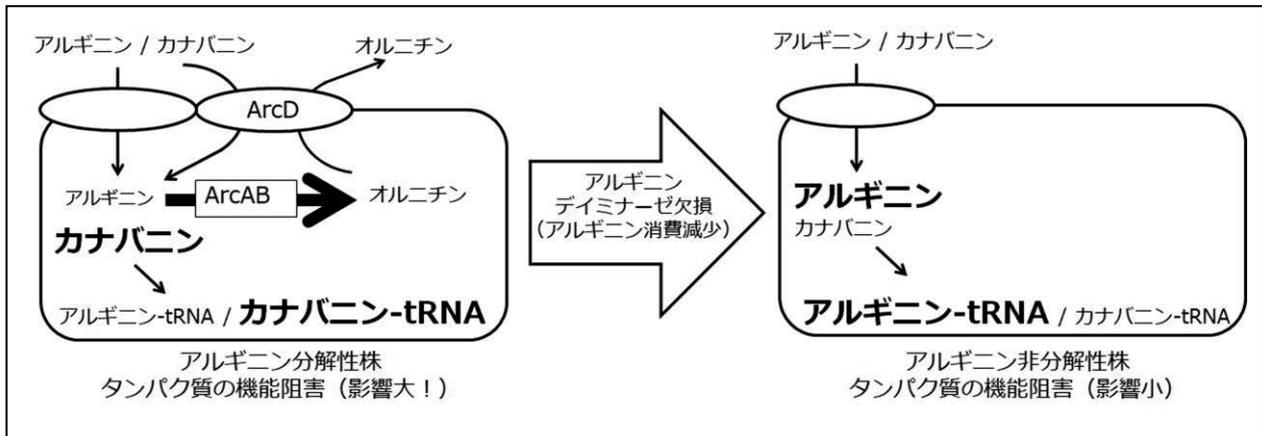


# カナバニンを用いたアルギニンデイミナーゼ破壊株の育種

脇中 琢良<sup>1\*</sup>・渡部 潤<sup>1,2</sup>・茂木 喜信<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ヤマサ醤油株式会社, <sup>2</sup>福島大学 農学群食農学類  
 〒288-0056 千葉県銚子市新生町 2-10-1 ヤマサ醤油株式会社  
 Tel: 0479-22-0095 Fax: 0479-22-9865  
 E-mail: wakinaka@yamasa.com

*Tetragenococcus halophilus* は醤油醸造において乳酸発酵を担う乳酸菌であるが、自然界から分離される菌株の多くはアルギニンデイミナーゼ経路を有する。この経路の代謝物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ことから、醤油醸造用スターターとしてはこの経路を有しない菌株が好まれる。そのため、アルギニンデイミナーゼ破壊株の簡便な育種法が求められていた。本研究において、アルギニンのアナログであるカナバニンを用いた育種法を考案した。アルギニンデイミナーゼ活性を有する菌株がカナバニンの毒性を受けやすい理由は、アミノ酸を大量に消費する経路が存在することで菌体内のアナログ存在比が上昇するためと考えられ、このような経路の破壊は新奇なアミノ酸アナログ耐性機構である可能性がある



## はじめに

好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* は、醤油醸造において乳酸発酵を担う。*T. halophilus* はアルギニンを分解するアルギニンデイミナーゼ経路を有しており、この経路の代謝物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ため、醤油醸造においてアルギニンが分解される反応は好まれない<sup>1)</sup>。演者らは以前に、トランスポゾンの転移を利用してアルギニンデイミナーゼ経路を不活化した変異株を育種できることを報告したが<sup>2)</sup>、数千株を個別に培養して活性を確認し変異株を探すという、非常に手間のかかる方法であった。そのため、アルギニン非分解性株の効率的なスクリーニング法を検討することとした。

## 方法と結果

### カナバニンを用いた育種法

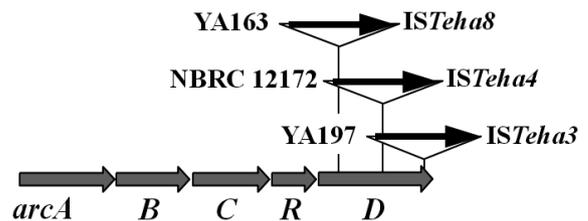


図 1. 変異株のトランスポゾン転移位置

アルギニンのアナログであるカナバニンを含む培地で *T. halophilus* NBRC 12172 株を培養したところ、ア

ルギニン非分解性の変異株が優先的に生育することを見出した。その後、YA163株、YA197株においても同様の現象が観察された。このようにして取得した変異株は、従来の方法で取得した変異株と同様に、アルギニンデイミナーゼオペロンにトランスポゾンが転移していることが確認された(図1)。

### 生育へのカナバニンの影響

NBRC 12172株から取得した変異株と親株を、様々なアルギニン、カナバニン濃度の培地で培養し生育を比較した(図2)。

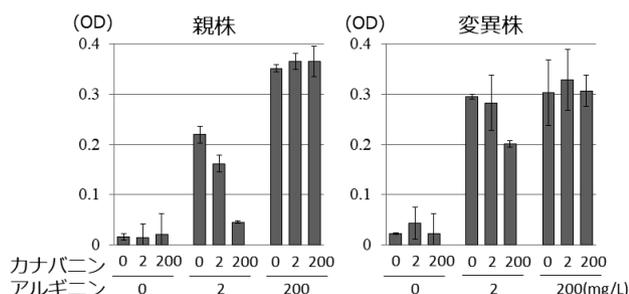


図2. 培地組成の違いによる生育比較

親株、変異株ともアルギニン非存在下では生育しなかった。NBRC 12172株のゲノム情報からも、アルギニンの生合成経路を有しないことが予想される。

アルギニンが十分量存在すれば、親株・変異株ともカナバニンが存在しても生育し、カナバニンの影響は認められなかった。

アルギニンが微量存在する場合に、親株・変異株ともカナバニンによる生育阻害を受けたが、その影響は変異株に対するより親株に対する方が大きかった。

この生育阻害効果の違いによって、カナバニン存在下ではアルギニンデイミナーゼ破壊株が優先的に生育したのだと考えられる。

### カナバニン取り込み量の評価

NBRC 12172株の親株と変異株の菌体を、アルギニンとカナバニンを含む食塩水に入れ、24時間静置後に分析してアルギニンとカナバニンの取り込み量を評価した(図3)。親株では食塩水中にアルギニンが検出できなくなるまでアルギニンを取り込んだ一方、変異株のアルギニン取り込みは確認できなかった。そして、カナバニンの取り込みは、親株でも変異株でも確認できなかった。

つまり、アルギニンデイミナーゼオペロンにコードされたアルギニン-オルニチン交換輸送体(ArcD)は、アルギニンに対する選択的な取り込み能力を有していることが示された。

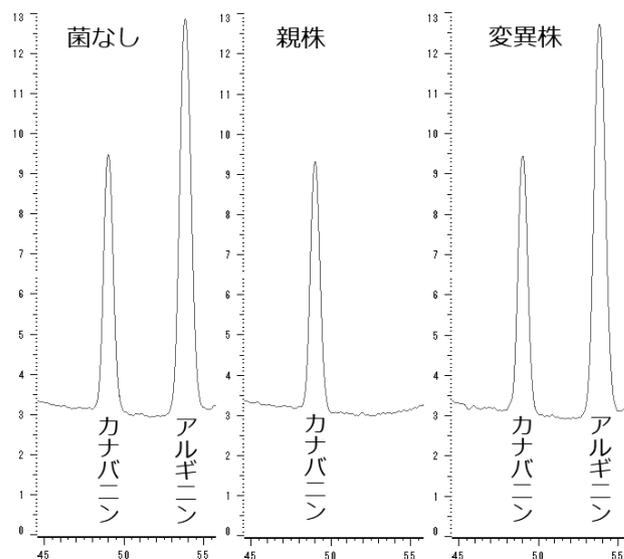


図3. アルギニン、カナバニンの取り込み

### 考察

NBRC 12172株はアルギニンの生合成経路を有しない。アルギニンの取り込み経路として、ArcDがあるが、ArcDを破壊してもアルギニンを取り込んで生育することから、ArcDとは別の経路も存在する。アルギニンが十分量存在すればカナバニンが毒性を発揮しないことから、いずれの経路でも、カナバニンに対しアルギニンが選択的に取り込まれる。しかし、アルギニンが微量だとカナバニンが毒性を発揮することから、いずれの経路でも、わずかながらカナバニンは取り込まれると考えられる。

カナバニンは、アルギニンの代わりにタンパク質合成に用いられることで、タンパク質が機能阻害を受けて毒性を発揮する。アルギニンデイミナーゼの有無にかかわらず、カナバニンは一定量菌体内に取り込まれるが、アルギニンデイミナーゼを有する菌株は、アルギニンを大量に消費することにより菌体内でカナバニンの存在比が高まり、カナバニンの毒性をより強く受けると推測された。

このように、アミノ酸を大量に消費する経路が破壊されることで、菌体内のアナログ存在比が低下してアナログ耐性が向上するという機構は、従来知られていなかった新奇なアナログ耐性機構である可能性がある。

### 文献

- 1) Matsudo, T. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 352-356 (1993).
- 2) Wakinaka, T. and Watanabe, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e00208-19 (2019).