

【序論】

これまで様々な社会的な要請により清酒酵母は育種されてきた。その代表例がもろみ中で分厚い泡の層(高泡)を形成せずに醸造効率が良くなった泡なし酵母の育種である(図1)。自然

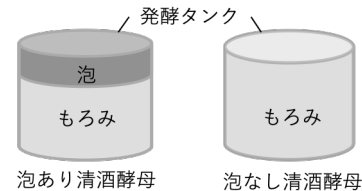


図1 泡あり酵母と泡なし酵母による清酒発酵タンクの様相

突然変異の導入により代表的な清酒酵母きょうかい酵母7号(K7)から高泡形成原因遺伝子 *AWAI* が一部欠損した泡なし酵母 K701 などが作製されている(Ouchi, Akiyama. 1971)。その後 K7 と K701 の SNP (一塩基多型)の比較から、K701 にオフターゲットな変異が蓄積していることが明らかになった。育種株におけるオフターゲットな変異の存在は親株の優良な醸造特性の損失につながる懸念される。このため、当研究室ではオフターゲットな変異を持たない理想的な清酒酵母の作製を目的として、CRISPR-Cas9 システム(Ryan *et al.* 2014)を用いた清酒酵母の遺伝子破壊株の作製を行ってきた。その結果、世界にさきがけて K7から泡なし表現型を持つ *awa1Δ/awa1Δ* 株、K7GE01 を単離した(山田駿一 修士論文 2018, Ohnuki *et al.* 2019)。そこで本研究では、清酒酵母の育種におけるゲノム編集技術の有用性と汎用性を検証するために、以下の実験を行なった。①K7GE01 にオフターゲットな変異が存在するかどうかを調べるため、K7GE01、K7、K701 株の全ゲノムシーケンス、②*AWAI* が機能欠損した際の醸造への影響を明らかにするため、小仕込み試験による K7GE01 の醸造特性の調査、③ゲノム編集による泡なし酵母の育種が K7 以外の株でも可能であることを示すため、清酒酵母 K6、K9、K10 由来の *awa1Δ/awa1Δ* 株の取得、④泡なし酵母の作製以外でもゲノム編集が応用可能かどうかを調べるため、K7、K6、K9、K10 由来の尿素を生成できない *car1Δ/car1Δ* 株の取得。

【結果】

1、K7、K701、K7GE01 株の全ゲノムシーケンス

ゲノム編集により作製した泡なし酵母 K7GE01 にオフターゲットな変異が存在しているかどうかを調べるために、K7GE01、K7、K701 株の全ゲノムシーケンスを行った。その結果、K7 と比較すると K7GE01 は *awa1Δ/awa1Δ* に加えて一つだけヘテロな点突然変異を持っていることが明らかになった(図 2)。変異が確認された *YLF2* 遺伝子では 311 番目のロイシン残基がフェニルアラニン残基に置換されていた。この *YLF2* 遺伝子は機能不明の非必須遺伝子で、*YLF2* の欠損は適応度や細胞の形態に影響を及ぼさないこと、ロイシンとフェニルアラニンの性質には大きな違いが無いこと、当研究室の Ghanegolmohammadi により予想された変異後のタンパク質構造に大きな変化が無かったことから、*YLF2* 遺伝子の点突然変異の表現型への影響はほとんど無いと推察された。一方で、K701 と K7 のゲノムの比較では 73 のヘテロの突然変異と 5 のホモ突然変異が確認された(図 2)。これらの結果から、K7GE01 は K701 よりも K7 にはるかに近いゲノムを

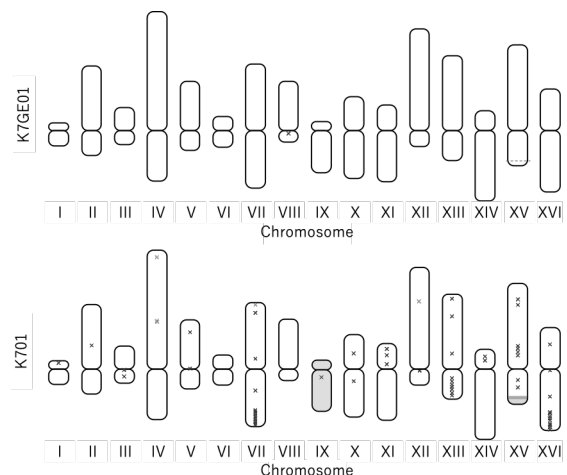


図2 全ゲノムシーケンスによるK7GE01とK701の比較

持ち、オフターゲットな変異をほとんど持たない理想的な *awa1Δ/awa1Δ* 株であると結論づけた。

2. K7、K701、K7GE01 を用いた小仕込み試験による表現型比較

awa1Δ/awa1Δ 株の真の表現型を確認し、*AWA1* の機能が欠損した際の醸造への影響を明らかにするため、酒類総合研究所の赤尾博士のグループと共同で小仕込み試験を行い、K7 株 (K7 と別の時期に単離された K7S09)、K7GE01 と K701 の CO₂ 発生量と生成酒の成分の変化を調べた。泡なし酵母である K7GE01 と K701 によって生成される CO₂ ガスの量は、醸造 4 日目付近のピーク時で比較すると、泡あり酵母である K7 よりも有意に少ないことが確認された(図 3)。また、生成酒の成分分析では、K7GE01 と K701 による生成酒は K7 による生成酒よりも酢酸エチル、リンゴ酸、乳酸の含有量が有意に高く、酢酸の含有量が低かった(図 4)。これらの結果より、*AWA1* の機能欠損により、醸造 4 日目付近の CO₂ 発生量の減少し、生成酒の酢酸エチル、リンゴ酸、乳酸の含有量が増加し、酢酸の含有量が低下することがわかった。

3. 清酒酵母における CRISPR-Cas9 による育種の汎用性の確認

ゲノム編集による泡なし酵母の育種が K7 以外の株でも可能であることを示すために、K7 と異なる清酒酵母 K6、K9、K10 について *awa1Δ/awa1Δ* 株の取得を試みた。この結果、全てシングルステップの形質転換で単離できたことを PCR によって確認した。また、泡なし酵母の育種以外でもゲノム編集が応用可能かどうかを調べるために、K7、K6、K9、K10 から尿素を生成できない *car1Δ/car1Δ* 株の取得を試みた。尿素からは発癌性物質であるカルバミン酸エチルが生じるので、尿素の非産性は清酒酵母にとって有利な特徴である。この結果、シングルステップの形質転換により K7、K6、K9、K10 から *car1Δ/car1Δ* 株の取得が確認され、清酒酵母における CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集の汎用性が示された。

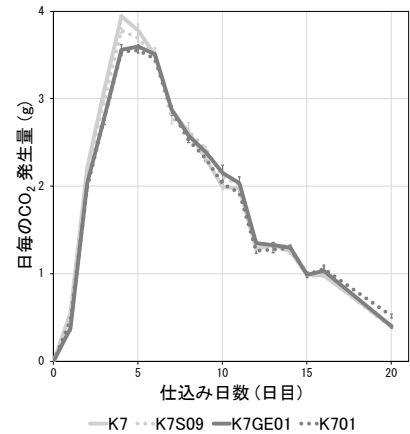


図 3 もろみ中の CO₂ 発生量

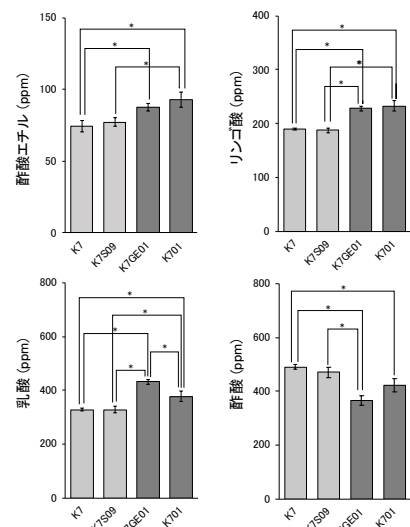


図 4 K7 と K7GE01、K701 間で異なる生成酒の成分

【考察】

K7 から作製したゲノム編集泡なし酵母 K7GE01 は、全ゲノムシーケンスの結果からオフターゲットな変異をほとんど持たない理想的な *awa1Δ/awa1Δ* 株であることが明らかになり、ゲノム編集技術の有用性が確認された。同時に小仕込み試験によって *AWA1* の機能が欠損した際の影響がはじめて明らかになった。本研究では、他の K6、K9、K10 株からも *awa1Δ/awa1Δ* 株を取得した。さらに K6、K7、K9、K10 株から、*car1Δ/car1Δ* 株を取得し、清酒酵母の育種における CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集の汎用性を示すことが出来た。

【参考文献】

Ohnuki S, Kashima M, Yamada T, Farzan G, Yan Z, Goshima T, Maruyama J, Kitamoto K, Hirata D, Akao T & Ohya Y. Genome editing to generate nonfoam-forming sake yeast strains. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;83(8):1-11

Ohya Y, Kashima M. History, lineage and phenotypic differentiation of sake yeast. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;9:1-7. 他