

東京大学大学院新領域創成科学研究科
先端生命科学専攻

令和1年度

修士論文

清酒酵母の育種におけるゲノム編集技術の
有用性と汎用性の検証

2020年1月提出

指導教員 大矢 禎一 教授

47-186315 鹿島 舞央

目次

要旨.....	4
序論.....	5
材料.....	8
使用菌株.....	8
培地.....	8
プラスミド.....	8
オリゴ DNA.....	9
方法.....	10
全ゲノムシーケンス.....	10
小仕込み試験.....	10
小仕込み試験による生成酒の成分分析.....	11
pCAS プラスミドによる清酒酵母のホモ遺伝子破壊株の取得.....	11
pCAS-Pro-CAR1 の作成.....	12
CAO 培地による <i>car1Δ/car1Δ</i> 株の表現型確認.....	12
結果.....	14
K7、K701、K7GE01 の全ゲノムシーケンス.....	14
K7、K701、K7GE01、K7S09 を用いた小仕込み試験による CO ₂ 発生量の比較.....	14
小仕込み試験によって得られた生成酒の成分比較.....	15
pCAS-Pro-AWA1 プラスミドを用いた K6、K9、K10 由来の <i>awalΔ/awalΔ</i> 株の取得.....	16
pCAS-Pro-CAR1 プラスミドの作成と pCAS-Pro-CAR1 プラスミドを用いた K6、K7、K9、K10 由来の <i>car1Δ/car1Δ</i> 株の取得.....	17
CAO 培地を用いた <i>car1Δ/car1Δ</i> 株の表現型の解析.....	18
考察.....	19
醸造用酵母における CRISPR-Cas9 システムの有用性.....	19

清酒酵母におけるゲノム編集による遺伝子破壊.....	20
今後の清酒酵母のゲノム編集による育種.....	20
小仕込み試験による生成酒の成分分析.....	21
全ゲノムシーケンス結果より期待された育種における形態解析の有用性.....	22
参考文献.....	23
表.....	27
Table.1 使用菌株.....	27
Table.2 プラスミド.....	28
Table.3 プライマー.....	28
Table.4 donor DNA.....	29
Table.5 sgRNA ターゲット配列.....	29
Table.6 CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊実験における遺伝子破壊確認 PCR 結果まとめ.....	30
図.....	31
Figure 1. 清酒酵母における <i>AWA1</i> 遺伝子の欠損による高泡形成能の喪失.....	31
Figure 2. 酵母における尿素生成および生成酒中のカルバミン酸エチル生成の仕組み.....	33
Figure 3. CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊の仕組みと pCAS プラスミドの構造.....	34
Figure 4. RF クローニングにおける PCR によるターゲット配列の置換の仕組み.....	36
Figure 5. 全ゲノムシーケンスによる K7GE01 と K701 の比較.....	37
Figure 6. K7、K7S09、K7GE01、K701 もろみ中の CO ₂ 発生量.....	38
Figure 7. K7、K701、K7GE01、K7S09 を用いた生成酒の成分分析.....	39
Figure 8. 作製した <i>awa1Δ/awa1Δ</i> 株の遺伝子欠損の確認.....	41
Figure 9. pCas-Pro-CAR1 作成の為の RF クローニング結果.....	43
Figure 10. 作製した <i>car1Δ/car1Δ</i> 株の遺伝子欠損確認.....	46
Figure 11. <i>car1Δ/car1Δ</i> 株取得の際のゲノム編集効率.....	47
Figure 12. CAO 培地による <i>car1Δ/car1Δ</i> 株の表現型確認.....	48
謝辞.....	49

図表目次

表

- Table.1 使用菌株
Table.2 プラスミド
Table.3 プライマー
Table.4 donor DNA
Table.5 sgRNA target sequence
Table.6 CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊実験における遺伝子破壊確認 PCR 結果まとめ

図

- Figure 1. 清酒酵母における *AWA1* 遺伝子の欠損による高泡形成能の喪失
Figure 2. 酵母における尿素生成および生成酒中のカルバミン酸エチル生成の仕組み
Figure 3. CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊の仕組みと pCAS プラスミドの構造
Figure 4. RF クローニングにおける PCR によるターゲット配列の置換の仕組み
Figure 5. 全ゲノムシーケンスによる K7GE01 と K701 の比較
Figure 6. K7、K7S09、K7GE01、K701 もろみ中の CO₂ 発生量
Figure 7. K7、K701、K7GE01、K7S09 を用いた生成酒の成分分析
Figure 8. 作製した *awa1Δ/awa1Δ* 株の遺伝子欠損の確認
Figure 9. pCas-Pro-CAR1 作成の為の RF クローニング結果
Figure 11. *car1Δ/car1Δ* 株取得の際のゲノム編集効率
Figure 12. CAO 培地による *car1Δ/car1Δ* 株の表現型確認

要旨

清酒酵母とは清酒の醸造に使用される *Saccharomyces cerevisiae* 系統の分離株であり、これまで様々な社会的な要請により育種されてきた。それには突然変異を導入する方法や異なる特性を持つ清酒酵母を交配する方法があるが、こうした育種法はいずれも表現型のみに着目した育種であり、その原因となる遺伝子型には着目されていない。表現型に着目した育種について、目的とする表現型の原因遺伝子が判明している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。自然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 *AWA1* が一部欠損した泡なし酵母 K701 などが作製されている。その後 K7 と K701 の SNP(Single Nucleotide Polymorphism: 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、先行研究により世界にさきがけて K7 から泡なし表現型を持つ *awa1Δ/awa1Δ* 株、K7GE01 が単離された。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の実験を行なった。まず K7GE01 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を行い、K7GE01 が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* 株である事を明らかにした。この事から、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る K7GE01 の醸造特性の調査を行い、*AWA1* が機能欠損した際の醸造への影響を明らかにした。また、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清酒酵母 K6、K9、K10 由来の *awa1Δ/awa1Δ* 株の取得、並びに、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に K7、K6、K9、K10 由来の尿素を生成できない *car1Δ/car1Δ* 株の取得を行い、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。

序論

清酒酵母とは清酒の醸造に使用される *Saccharomyces cerevisiae* 系統の分離株である(Peter *et al.* 2018)。清酒酵母の選択は日本酒の味や香り、時には醸造効率にも影響を与える。このため、これまで様々な社会的な要請により清酒酵母の育種が長年取り組まれてきた(Kitagaki, Kitamoto. 2013)。初期の清酒酵母の育種は育種と言うよりも新たな株の探査であり、醸造環境などから清酒醸造に有用であろうと考えられた新たな株を分離するというものであった。これにより全国各地から清酒醸造に有用な酵母株が発見された。代表的な例としては日本醸造協会が発布しているきょうかい酵母7号(K7)、6号(K6)、9号(K9)、10号(K10)の分離などがある(Ohya, Kashima. 2019)。醸造環境からの分離によって清酒酵母が確立されていった後に、既に実用化されている優良な清酒酵母を親株として新たに有用な株を作成する育種方法が開発された。その方法は大きく分けて二つある。一つ目は突然変異を導入する方法である。過去には培養環境を制限して自然突然変異を誘発することで、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株を分離した例がある(Figure 1A) (Ouchi, Akiyama. 1971)。また、親株を変異原処理により人工的な突然変異を導入することで、吟醸香の由来となるカプロン酸エチル高生成酵母株 K1701 などが分離された(Inabashi. 2001)。二つ目は異なる特性を持つ清酒酵母を交配する方法である。過去にはこの方法を用いてカプロン酸エチル高生成であるが発酵力の弱い K1601 と発酵力の安定している K9 を親株とした高発酵力高カプロン酸エチル生成能を持つ株 K1801 が作成された(Yoshida. 2006)。これらの株は現在でも広く使用されている。しかし、こうした育種法はいずれも表現型のみに着目した育種であり、その原因となる遺伝子型には着目されていない。

表現型に着目した育種について、目的とする表現型の原因遺伝子が判明している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。清酒酵母は通常醸造初期にもろみの表層に高泡と呼ばれる厚い泡の層を形成する。高泡の存在は発酵タンクの使用可能領域を狭めて醸造効率を下げる為、泡なしの酵母の開発が長年求められてきた(Figure 1A)。その結果、自然突然変異を利用した育種によって K7、K6、K9、K10 から泡なし酵母 K701、K601、K901、K1001 などが作製されてきた(Ouchi. 2010)。そして 2002 年に下飯らによって泡なしの表現型は *AWAI* 遺伝子の不活化によって起こることが明らかにされた(Shimoi *et al.* 2002)。*AWAI* とは 15 番染色体に位置する清酒酵母特有の遺伝子であり、細胞壁に局在して疎水性をもたらすタンパク質 *Awa1p* をコードする。*Awa1p* は合成後に *glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)* と結合する GPI アンカータンパク質であることが知られており、細胞壁への局在には C 末端に存在する GPI アンカーシグナルが必要である。高

泡を形成する株ではこの *Awa1p* の疎水性が原因となり、発酵中に発生する CO₂ ガスに細胞が付着して泡が発生すると考えられている。泡なし酵母では *AWA1* が不活化しているために細胞表層が親水性となり、泡が発生しない(Figure 1B)。代表的な泡なし酵母 K701 では 15 番染色体と 9 番染色体の間に非相互的な転座が起こり、*AWA1* 遺伝子配列の 3106 番目のグアニンがチミンに変化することでストップコドンが発生している(Miyashita *et al.* 2004)。その結果 *Awa1p* が細胞表層に局在する為に必要な GPI アンカーシグナル配列が欠失している事が確認されている(Shimoi *et al.* 2002)(Figure 1C)。しかし、泡なし酵母 K701 とその親株である K7 については過去に SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型)の分布が調べられており、*AWA1* 遺伝子が存在する 15 番染色体以外の領域にも SNP の分布の違いが確認されている(Akao. 2014)。この報告から、K701 では育種や保存期間中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。

また、目的とする表現型の原因遺伝子が判明している育種の例としては、尿素を生成できない清酒酵母の育種も知られている。清酒酵母は醸造環境において尿素を生成するが、この尿素とエタノールが生成酒中で反応することにより発癌性物質であるカルバミン酸エチルが発生する(Kitamoto *et al.* 1991)。発酵食品中のカルバミン酸エチルの含有量は各国で問題視されており、2007 年 3 月に国際がん研究機関によりグループ 2A (動物実験位において発がん性の根拠が十分に得られている)に分類され、カナダなどの一部の国ではアルコール飲料中の量に規制がある(<https://www.nta.go.jp/taxes/sake/anzen/joho/joho01.htm>)(http://www.doingbusinesswithlcb.com/tro/Packaging-Quality/Downloads/PPS_EN.pdf)。この為発酵食品中のカルバミン酸エチル含有量を抑える研究が各地で進められている。清酒酵母においては 1991 年の北本らの研究で尿素生成を行うアルギナーゼをコードする遺伝子 *CAR1* の欠損株が尿素非生成となる事が確認されている(Kitamoto *et al.* 1991)(Figure 2)。そして 1993 年に変異原処理を用いたアルギナーゼ欠損株の育種法が確立され、同様の方法にて K1801 を親株として分離された株 KArg1901 が広く知られている(Kitamoto *et al.* 1993)(Hasuda. 2014)。しかしこの株には変異原処理がなされている為、オフターゲットな変異の存在が懸念される。

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事が懸念される。このため、当研究室ではオフターゲットな変異を持たず目的の遺伝子型のみを忠実に再現した理想的な清酒酵母の作製を目的として、ゲノム編集による清酒酵母の遺伝子破壊株の作製を行ってきた。

この理想的な育種を実現するため、ゲノム編集を簡易的に行う事ができる CRISPR-Cas9 システムが採用された。CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集は、エンドヌクレアーゼである Cas9 と標的遺伝子領域内の PAM 配列に隣接したターゲット配列を認識する sgRNA による標的遺伝子領域の二本鎖切断、その後の donor DNA を鋳型と

した相同組み替え修復によって行われる。この時 donor DNA を標的遺伝子上流と下流を繋げた配列にした場合、その標的遺伝子の破壊株が得られる(Figure 3A)。また、donor DNA に任意の遺伝子配列を組み込む事で標的ゲノムへの遺伝子導入も行う事が出来る。CRISPR-Cas9 システムの産業酵母の育種への応用例は、ビール酵母では遺伝子導入、とワイン酵母では遺伝子破壊の報告があるが、清酒酵母では当研究室の研究が初の例となる(Denby *et al.* 2018、Vigentini *et al.* 2017)。そして本研究では、CRISPR-Cas9 システムの中でもシングルステップでの二倍体酵母の遺伝子破壊株の獲得が確認されている pCAS プラスミドが使用された(Ryan *et al.* 2014)(Figure 3B)。今回用いた pCAS プラスミドは①Cas9 と sgRNA を共発現する、②薬剤耐性マーカーを持つ、③二倍体酵母での高確率な遺伝子破壊が実証されている、などの特徴を持つ為、二倍体で栄養要求性を持たない清酒酵母のゲノム編集に適切であると考えられた。

そして、本研究室では pCAS プラスミドによる CRISPR-Cas9 システムを用いて、世界にさきがけて K7から泡なし表現型を持つ *awa1Δ/awa1Δ* 株、K7GE01 が単離された(山田駿一 修士論文 2018、Ohnuki *et al.* 2019)。しかし、K7GE01 に *awa1Δ/awa1Δ* 以外のオフターゲットな変異を持つかどうか、さらに K7GE01 が K7 と比較してどのような醸造特性を持つかについては未だに明らかにされていない。また、CRISPR-Cas9 システムを用いた清酒酵母のゲノム編集による育種が K7 を親株とした泡なし酵母の育種以外でも使用可能であるかについても未だ知見が無い。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、並びに、理想的な *awa1Δ/awa1Δ* 株の表現型を調べる事ではじめて判明する *AWA1* の機能欠損のみの醸造への影響を調査するため、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*AWA1* 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

材料

使用菌株

本研究において使用した菌株は Table 1 に記載されている。

培地

使用した酵母株は基本的に 30°Cにて 1×YPD 培地(1% Bacto™ yeast extract (BD Biosciences), 2% Bacto™ peptone (BD Biosciences) and 2% glucose)にて培養した。形質転換の前培養は、2×YPD 培地(2% Bacto™ yeast extract (BD Biosciences), 4% Bacto™ peptone (BD Biosciences) and 4% glucose)にて培養した。また、pCAS プラスミドを形質転換した株は YPD + G418 プレート(1% Bacto™ yeast extract (BD Biosciences), 2% Bacto™ peptone (BD Biosciences), 2% glucose, 2% agar (Shouei), 300 or 350 µg/ml G418(Takara))にて選択した。また、大腸菌は LB 培地(1% Bacto™ tryptone (BD Biosciences), 0.5% Bacto™ yeast extract (BD Biosciences), 1% NaCl)で増幅した。また、pCAS プラスミドを形質転換した株は LB + kanamycin プレート(1% Bacto™ tryptone (BD Biosciences), 0.5% Bacto™ yeast extract (BD Biosciences), 1% NaCl, 50µg/ml kanamycin)にて選択した。*car1* Δ/*car1* Δ株の表現型の確認は CAO プレート(0.17% Difco™ Yeast Nitrogen Base (BD Biosciences), 2% glucose, 10 µg/ml Canavanin (Nakarai Tesque), 5 mM Ornichine (Wako), 1mM Aruginine (Wako))を用いて行った。

プラスミド

本研究において使用されたプラスミドは Table 2 に記載されている。pCAS-Pro-URA3 プラスミドはバクテリアの pUC 複製起点、酵母の 2µ 複製起点、カナマイシンと G418 の選択マーカーである KanMX を持つ。そして、Cas9 と sgRNA を共発現する。Cas9 の発現調節には RNR2 プロモーターと CYC1 ターミネーターが使用され、Cas9 の核内への移行には SV40NLS が使用されている。また、sgRNA の発現調節には RNAIII 型の tRNA-Pro プロモーターと SNR52 ターミネーターが使用されており、ターゲット配列としては実験室酵母 S288C の *URA3* 配列が適用されている。pCAS-Pro-AWA1、pCAS-Pro-CAR1 は RF (Restriction free)クローニング(Van Den Ent *et al.*2006)を使用して pCAS-Pro-URA3 のターゲット配列をそれぞれ K7 の *AWA1* 遺伝子破壊用ターゲット配列と *CAR1* 遺伝子破壊用ターゲット配列に置き換えたものである(Table.5)。尚、pCAS-Pro-AWA1 の作成は先行研究において行われた。

オリゴ DNA

本研究において使用されたプライマーと donor DNA は Table 3、Table 4 に記載されている。PCR primer *AWAI*-F、PCR primer *AWAI*-R、PCR primer *CARI*-F、PCR primer *CAR1*-R は各遺伝子の破壊の確認を目的とした PCR に用いた。RF cloning primer *CAR1* target-F、RF cloning primer *CAR1* target-R に関しては pCAS-Pro-CAR1 作成の為の RF クローニング(Figure 4)で行う PCR に用いた。*AWAI*. donor. sense、*AWAI*. donor. anti、*CARI*. donor. sense、*CARI*. donor. anti は CRISPR-Cas9 システムにおける標的遺伝子領域切断後の相同組換え修復のドナーとして用いた。

方法

全ゲノムシーケンス

K7、K701、およびK7GE01からゲノムDNAを抽出して、全ゲノム配列を決定した。全ゲノムシーケンスはBGI(香港)に委託した。ゲノムDNAの抽出はGenomic-tip 500 / G (Qiagen、ジャーマンタウン、メリーランド州)を使用し、BGIの規定(ゲノム用量> 10 μ g、ゲノム濃度>30 ng/ μ l)に従い20~32 μ gを抽出した。実験手順は、QiagenのQIAGEN®Genomic DNA Handbookに記載されている方法に従った。DNAサンプルはBGIに送付し、PCRフリーのペアエンドシーケンスライブラリーの調製とイルミナHiSeq 4000による全ゲノムシーケンス解析(150 bp x 2)が行われた。K7リファレンスゲノム(NRIB_SYGD、txid721032)は、Sake Yeast Genome Database (SYGD : <https://nribf1.nrib.go.jp/SYGD/>、バージョン1.0)から取得し、シーケンスデータ分析で使した。アダプタの除去と低品質な配列のトリミングは、BGIによって行われた。リードのK7リファレンスゲノムへのマッピングにはBWA(Burrows-Wheeler Aligner (BWA、v. 0.7.12) (Li *et al.* 2019b))を使用した。SAMtools(Sequence Alignment / Mapツール(SAMtools、v. 0.1.19) (Li *et al.* 2019))を使用してsam形式のデータをbam形式のものに変換し、GATK(Genome Analysis TK (GATK、v. 3.8.0) (McKenna *et al.* 2010))をbam形式でのリアライメントに使用した。重複したリードを削除にはPicard-tools(Picard-tools (v. 2.10.9) (<http://broadinstitute.github.io/picard/>))を使用した。変異候補はGGM(GeneBay Genome Manager (GGM、v. 1.10.00) (GeneBay Inc.))を使用して抽出し、偽陽性と考えられるもの(シーケンス深度<10の変異、リピート配列内の変異)を排除して変異を特定した。

小仕込み試験

K7GE01、K7、K701、K7S09を用いて小仕込み試験を行った。72.8 gの α 化米、19.2 gの乾燥麴(*Aspergillus oryzae*含む)、136 μ Lの90%乳酸、および 1×10^9 cellsの前培養酵母細胞を含む170 mLの水を混合し、清酒もろみを調製した。もろみは15 $^{\circ}$ Cで20日間培養した。発酵活性は、清酒もろみの重量を測定して発生したCO₂の量を日毎に定量化して観察した。清酒の発酵が完了した後、もろみを50 mLの遠心管に回収し、15 $^{\circ}$ C、5,000 rpmで15分間遠心分離した。上清をマイクロファイバークロスでろ過して生成酒を取得し、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。小仕込み試験については広島酒類総合研究所と共同で行った。

小仕込み試験による生成酒の成分分析

小仕込み試験の結果得られた生成酒に関して広島酒類総合研究所と共同で成分分析を行った。日本酒度は、生成酒の比重の測定値から計算した。密度は、オートサンプラー (CHD-502; 京都電子株式会社) を備えた密度/比重計 (DA-500; 京都電子株式会社、京都、日本) で測定した。10 mL以上の解凍サンプルを20 mLバイアルに分取し測定した。日本酒度は、 $\text{日本酒度} = (\text{比重} - 1) \times 1,443$ として計算した。負の日本酒度は、比重と糖度が高いことを示す。エタノール濃度は、自動注入器 (7683B; アジレント) を備えたガスクロマトグラフィー (6890 N; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて測定した。内部標準として、1% イソプロパノール (940 μL) をサンプル (40 μL) と混合した。酢酸エチル、1-プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルなどの好気成分の測定にはヘッドスペースサンプラー (HSS 7694; アジレント) を備えたガスクロマトグラフィー (6890 N; アジレント) を使用した。サンプル (900 μL) は内部標準 (100 μL) と混合して使用した。酸度とアミノ酸含量は自動滴定装置 (COM-1700; 茨城県平沼市) を使用して測定した。サンプル (10 mL) は室温まで解凍した後に測定を行った。リンゴ酸、コハク酸、乳酸、クエン酸、酢酸、リン酸などの有機酸は液体クロマトグラフィー (SPR-Hカラムを備えたSCL-10 ASP; 京都府島津市) にて測定した。解凍したサンプルは1 mLを測定用に分取した。

pCAS プラスミドによる清酒酵母のホモ遺伝子破壊株の取得

awa1 Δ /*awa1* Δ 株および *car1* Δ /*car1* Δ 株は親株となるK6、K9、K10 (*CAR1*破壊株作成にはK7も使用) に pCAS プラスミド (pCAS-Pro-AWA1、pCAS-Pro-CAR1) と donor DNA (*AWA1* donor DNA、*CAR1* donor DNA) を共形質転換する事によって取得した (Table 2)(Table 4)。pCAS プラスミドは、ヌクレアーゼタンパク質 Cas9 と Cas9 タンパク質を誘導する sgRNA (標的遺伝子領域内のターゲット配列 (Table 5) を持つ) を共発現するプラスミドであり、選択マーカーとして G418 とカナマイシンの耐性遺伝子を持つ。pCAS-Pro-AWA1 は当研究室における先行研究 (山田駿一 修士論文 2018) において RF クローニング法 (Van Den Ent *et al.* 2006) によって pCAS-Pro-URA3 (Ryan *et al.* 2014) 配列内の *URA3* ターゲット配列を *AWA1* ターゲット配列に組み替える事で構築された。pCAS-Pro-CAR1 は同様の方法により本研究において作成された (Figure 4)。donor DNA はゲノム内の標的遺伝子領域と隣接する上流下流それぞれ 75 bp をつなぎ合わせた 150 bp の二本鎖オリゴヌクレオチドであり、等量の相補的な一本鎖オリゴヌクレオチド (*AWA1*. donor. sense と *AWA1*. donor. anti、*CAR1*. donor. sense と *CAR1*. donor. anti) とアニーリングバッファー (10mM Tris, pH 7.5~8.0、50mM NaCl、1mM EDTA) の混合物を 5 min 100°C で変性した後に 0.1°C/sec で 25°C まで冷却することでアニーリングして作成した (Table 4) (DiCarlo *et al.* 2013)。形質転換は Gietz *et al.* 2007 を参考としたリチウ

ム酢酸法を使用した(Gietz *et al.* 2007)。形質転換体の選択はYPD+G418(K6、K7、K10では350 ng/mL、K9では300 ng/mL)プレートにて行った。G418耐性を持つコロニーを選択した後、形質転換体の標的遺伝子領域付近をPCRにて増幅し、標的遺伝子の欠失を確認した。PCRによって標的遺伝子の破壊が確認された株についてはdonor DNA領域の配列をシーケンスし、標的遺伝子の破壊が正確に行われているか確認した。シーケンスによって正確な標的遺伝子の破壊が確認された株についてプラスミドドロップを行った。プラスミドドロップは以下の方法にて行った。まず遺伝子破壊成功株を2 mL YPD培地に接種して30°Cで一晩培養したものをYPDプレートにまいて30°Cで二日間培養した。これについて得られたコロニーをYPDプレートとYPD+G418(K6、K10では350 ng/mL、K9では300 ng/mL)プレートの両方にまき、再度30°Cで二日間培養し、YPDプレートで生存してYPD+G418プレートで生存しなかったものをプラスミドが除去された遺伝子破壊成功株であると判断した。

pCAS-Pro-CAR1 の作成

pCAS-Pro-CAR1 の作成は RF クローニングを用いて pCAS-Pro-URA3 (Ryan *et al.* 2014)配列内の URA3 ターゲット配列を CAR1 ターゲット配列に組み替える事で行われた。RF クローニングは Van Den Ent *et al.* 2006 を参考として行った(Van Den Ent *et al.* 2006)。まず、pCAS-Pro-URA3 をテンプレートとした RF cloning primer CAR1 target-F、RF cloning primer CAR1 target-R(CAR1 ターゲット配列を含む)によるPCRでpCAS-Pro-CAR1 の作成・増幅を行った(Figure 4)。この PCR 反応液 50 μ L に対して *Dpn1* を 1 μ L 加えて 2h 以上インキュベートする事で pCAS-Pro-URA3 の除去を行い、これを大腸菌 DH5 α へ形質転換することで pCAS-Pro-CAR1 のさらなる増幅を行った。得られた形質転換体については CAR1 ターゲット配列を持つ pCAS-Pro-CAR1 が正確に保持されているか確認する為、プラスミド抽出後にシーケンスを行った。また、CAR1 ターゲット配列の設計は CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp>)を用いて CAR1 領域内で PAM 配列に隣接する配列をリストアップした後、CAR1 配列の端に近く、ターゲット配列に TTTTs を含まず、GC 含量が 50 \pm 10%程度で K7 ゲノムに相同領域が少ないものを選択して共同研究者によって行われた。決定したターゲット配列については Table 5 に記載した。

CAO 培地による *car1 Δ /car1 Δ* 株の表現型確認

CAO 培地を用いて *car1 Δ /car1 Δ* 株の表現型の確認を行った。CAO 培地に CRISPR-Cas9システムを用いて得られた *car1 Δ /car1 Δ* 株(K6GEcar1-1、K7GEcar1-1、K9GEcar1-1、K10GEcar1-1)とその親株(K6、K7、K9、K10)をストリークし30°Cで3~4日

間培養し、各株の生育を確認した。

結果

K7、K701、K7GE01 の全ゲノムシーケンス

当研究室の先行研究において分離されたゲノム編集による泡なし酵母 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、親株の K7、自然突然変異の導入による泡なし酵母 K701 について全ゲノムシーケンスによる配列比較を行った。偽陽性と考えられるリピートの前後の配列、シーケンス深度 < 10、変異を起こしているアレル < 25% のものを除外してノンシノニムな変異を抽出した結果、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 (Figure 5)。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* は機能が明らかにされていない非必須遺伝子であり、*YLF2* の欠損は適応度や細胞の形態に影響を及ぼさない事が知られている (Suzuki *et al.* 2018)。Amino acid explorer (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/aa/aa_explorer.cgi) による検索により、ロイシンとフェニルアラニンで等電点がそれぞれ 6.0 と 5.5、両方とも無極性で疎水性である事、構成要素となる原子の種類に大きな違いは見られない事が確認された。また、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も大きな変化は無かった。これらのことから、今回確認された K7GE01 における *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 の比較では 73 箇所のヘテロな変異と 5 箇所のホモな変異が確認された (Figure 5)。このため、K701 と K7 の間には自然突然変異が蓄積していることが確認された。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。

K7、K701、K7GE01、K7S09 を用いた小仕込み試験による CO₂ 発生量の比較

K7GE01 がオフターゲットな変異の影響の無い *AWA1* 遺伝子の単一破壊株であることによりはじめて調べられる *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 2009 年に単離された K7S09)、K7GE01、K701 の発酵中の CO₂ 発生量の変化を調べた。尚、K7S09 は K7 から 2009 年に単離された株であり、基準となる K7 系統の株の発酵特性をより正確に捉える為の補助として今回の実験に加えた。CO₂ 発生量はもろみを仕込んだ瓶の前日との重量の差から算出した。CO₂ 発生量はもろみ中のアルコール濃度とほぼ類似した上昇傾向を示すことが知られている。このため、CO₂ 発生量を定量することでもろみの発酵

の勢いをモニタリングすることが可能である(Watanabe, 2011)。もろみの重量から推定される日毎の CO₂ 発生量は、K7、K701、K7GE01、K7S09 で 4 日目にピークを示した (Figure 6)。このピークの後に K7 と K7S09 では高泡が観察された(data not shown)ことから、CO₂ の活発な生成が続いて高泡の発生を誘発したことが示唆される。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 株よりも有意に少ないことが確認された (Tukey の多重比較検定、 $p < 0.05$)。この変化は *awalΔ/awalΔ* 株の真の表現型であると考えられ、*AWA1* の機能欠損により醸造 4 日目付近の CO₂ 発生量が減少することが明らかになった。また、発酵終了時の総 CO₂ 発生量またはエタノール生産量の差は検出されなかった (Figure 6、Tukey の多重比較検定、 $p < 0.05$)。ここから、ピーク時には泡なし酵母である K7GE01 と K701 の発酵がわずかに緩慢であったが最終的には泡あり酵母である K7 株に追いついている事が確認できる。このため、*AWA1* の機能欠損による最終的なアルコール発酵能力への影響はほとんど無いことが明らかになった。

小仕込み試験によって得られた生成酒の成分比較

より詳しい *awal Δ/awal Δ* 株の真の表現型、並びに *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、K7 株 (K7 と 2009 年に単離された K7S09)、K7GE01 と K701 について小仕込み試験によって得られた生成酒の成分の変化を調べた。先のセクションで醸造初期段階の CO₂ 発生量に有意な変化が確認されている事から、泡なし酵母 K7GE01 と K701 によるもろみの発酵特性は泡あり酵母である K7 株と異なると考えられる。よって生成酒の成分も泡なし酵母と泡あり酵母の間で異なると予想した。そこで、エタノール、香気成分、有機酸の定量をガスクロマトグラフィーにて行い、酸度、アミノ酸度の定量を自動酸度中和滴定装置にて行った。その結果、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、酢酸の含有量が低いという結果になった (Figure 7A)。この変化は *awalΔ/awalΔ* 株の真の表現型であると考えられ、*AWA1* の機能欠損により生成酒の酢酸エチル、リンゴ酸、乳酸の含有量が増加し、酢酸の含有が低下することが明らかになった。また、K701 による生成酒は K7GE01 と共通に確認された表現型に加えて、K7 と K7S09 による生成酒よりも酸度とカプロン酸エチル含有量が有意に高く、日本酒度とリン酸の含有量が低いことが確認された (Figure 7B)。こうした事から、生成酒の酸度、カプロン酸エチル、日本酒度、リン酸に影響を与える自然突然変異が K7 および K701 に蓄積されている事が示唆された。先のセクションのホールゲノムシーケンスで確認された通り K701 と K7 の間にはオフターゲットな変異の蓄積があるため、これまで K701 と K7 の醸造特性の違いが *AWA1* の機能欠損の影響によるものか、K7 と K701 の間に蓄積されたオフターゲットな変異の蓄積の影響によるものか判別不可能であったが、本研究

で行ったオフターゲットな変異の影響の無い *awal* Δ /*awal* Δ 株の分析によりはじめて *AWA1* の機能欠損による醸造への影響を明らかできたことがこれらの結果から確認できる。

pCAS-Pro-AWA1 プラスミドを用いた **K6、K9、K10** 由来の *awal* Δ /*awal* Δ 株の取得
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 *awal* Δ /*awal* Δ 株の取得を試みた。*awal* Δ /*awal* Δ 株の取得は pCAS-Pro-AWA1 と *AWA1* donor DNA を細胞に共形質転換する事で行った。pCAS-Pro-AWA1 はエンドヌクレアーゼである Cas9 と標的遺伝子 *AWA1* 領域内の *AWA1* ターゲット配列を認識する sgRNA を共発現するプラスミドであり、当研究室の先行研究において山田により pCAS-Pro-URA3 から RF クローニングによって作成された。*AWA1* donor DNA はゲノム内の *AWA1* 配列と隣接する上流下流それぞれ 75 bp をつなぎ合わせた 150 bp の二本鎖オリゴ DNA であり、標的遺伝子領域の Cas9 による切断後の相同組み替え修復のドナーとなる。形質転換体取得後、シングルステップの形質転換による *AWA1* 遺伝子の破壊が実際に行われているか確認する為、PCR による形質転換体ゲノムの *AWA1* 領域付近の増幅を行った。この時 *AWA1* の破壊が行われている株では 715 bp の PCR 産物が確認される(Figure 8A)。PCR の結果、K6 では 14 株中 1 株、K9 では 28 株中 2 株、K10 では 13 株中 1 株の *awal* Δ /*awal* Δ 株が確認された(Figure 8B)。各親株に対して *awal* Δ /*awal* Δ 株を 1 株ずつ分離し K6GE01p、K9GE01p、K10GE01p とした。*AWA1* donor DNA の挿入が正確に行われているか確認する為 *AWA1* donor DNA 挿入領域のシーケンスを確認したところ、全ての株において *AWA1* donor DNA の正確な挿入が確認された(Figure 8C)。その後、donor DNA の挿入が確認された株に対してプラスミドドロップを行った結果を Figure 8D に示した。プラスミドドロップ前の *awal* Δ /*awal* Δ 株をポジティブコントロールとして、親株(K6、K7、K9、K10)をネガティブコントロールとして使い、プラスミドドロップを行った株と共に Figure 8D に示した選択用のプレート(YPD+G418 プレート、YPD プレート)に巻いた。YPD プレートで生育し YPD+G418 プレートで生育しなかったコロニーをプラスミドドロップの成功株として確認したところ、全ての *awal* Δ /*awal* Δ 株から pCAS プラスミドが除去された株を作成する事が出来た(Figure 8D)。これらの事から、シングルステップの形質転換により K6、K9、K10 から *awal* Δ /*awal* Δ 株(それぞれ K6GE01、K9GE01、K10GE01)の取得が確認された。同時に、CRISPR-Cas9 システムを用いた泡なし酵母の育種が K7 以外の株でも実現できたことから、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。

pCAS-Pro-CAR1 プラスミドの作成と pCAS-Pro-CAR1 プラスミドを用いた K6、K7、K9、K10 由来の *car1Δ/car1Δ* 株の取得

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。このためにまず、CRISPR-Cas9 システムによる *car1Δ/car1Δ* 株の取得に必要な pCAS-Pro-CAR1 を作成した。pCAS-Pro-CAR1 の作成は RF クローニングを用いて pCAS-Pro-URA3 にコードされる *URA3* ターゲット配列を *CAR1* ターゲット配列に作り替えることで行った。pCAS-Pro-URA3 を鋳型として *CAR1* ターゲット配列を含むプライマーを用いた PCR を行った後、PCR 反応液を大腸菌 DH5 α 株に形質転換したところ、23 個のコロニーが確認された(Figure 9A)。このうち 8 個のコロニーについてプラスミドを抽出しシーケンスによる配列確認を行ったところ、3 個の候補プラスミドについて正確な *CAR1* ターゲット配列の保持が確認された(Figure 9B)。

作製された pCAS-Pro-CAR1 を用いた CRISPR-Cas9 システムにより、清酒酵母 K6、K7、K9、K10 から *car1 Δ/car1 Δ* 株を取得した。破壊株の取得は pCAS-Pro-CAR1 プラスミドと *CAR1* donor DNA を細胞に共形質転換する事で行った。形質転換体取得後、シングルステップの形質転換による *CAR1* 遺伝子の破壊が実際に行われているか確認する為、PCR による形質転換体ゲノムの *CAR1* 領域付近の増幅を行った。この時 *CAR1* の破壊が行われている株では 750 bp の PCR 産物が確認される(Figure 10A)。PCR の結果、確認を行った全ての形質転換体について 750 bp の PCR 産物の増幅が確認され、*car1 Δ/car1 Δ* 株の取得が確認された(Figure 10B)。PCR で確認された *car1 Δ/car1 Δ* 株のうち各親株由来の *car1 Δ/car1 Δ* 株 3 株ずつを K6GEcar1p-1-3、K7GEcar1p-1-3、K9GEcar1p-1-3、K10GEcar1p-1-3 として分離し、*CAR1* donor DNA の挿入が正確に行われているか確認する為 *CAR1* donor DNA 挿入領域のシーケンスを行ったところ、全ての株において *CAR1* donor DNA の正確な挿入が確認された(Figure 10C)。このうち K6GEcar1p-1、K7GEcar1p-1、K9GEcar1p-1、K10GEcar1p-1 に対してプラスミドドロップを行った結果を Figure 10D に示した。プラスミドドロップ前の *awal Δ/awal Δ* 株をポジティブコントロールとして、親株(K6、K7、K9、K10)をネガティブコントロールとして用い、プラスミドドロップを行った株と共に Figure 10D に示した選択用のプレート(YPD+G418 プレート、YPD プレート)に巻いた。YPD プレートで生育し YPD+G418 プレートで生育しなかったコロニーをプラスミドドロップの成功株として確認したところ、全ての *car1 Δ/car1 Δ* 株から pCAS プラスミドが除去された株を作成する事が出来た(Figure 10D)。これらの事から、シングルステップの形質転換により K6、K7、K9、K10 から *car1 Δ/car1 Δ* 株(K6GEcar1-1、K7GEcar1-1、K9GEcar1-1、K10GEcar1-1)の取得が確認された。同時に、CRISPR-Cas9 システムを用いた育種が泡なし酵母の育種以外でも実現できたことから、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。

また、pCAS-Pro-CAR1 プラスミド形質転換体のうち PCR にて破壊が確認された株の割合からゲノム編集効率を求めたところ、K6 では 98%、K7 では 96%、K9 では 100%、K10 では 99%となった(Figure 11)。株によってゲノム編集効率に大きな差がないことから、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。

CAO 培地を用いた *car1Δ/car1Δ* 株の表現型の解析

CRISPR-Cas9 システムを用いて得られた *car1 Δ /car1 Δ* 株 (K6GEcar1p-1-3、K7GEcar1p-1-3、K9GEcar1p-1-3、K10GEcar1p-1-3) についてアルギナーゼの欠損を確認する為、CAO 培地を用いて表現型を調べた。CAO 培地は Kitamoto らによって 1993 年に見出されたアルギナーゼ欠損株の選択培地であり、窒素源としてアルギニンとオルニチン、アルギニンのアナログで野生株の増殖を阻害するカナバニンを含む。野生株はカナバニンを細胞内に取り込む為 CAO 培地では生育できない。一方で、アルギナーゼ欠損株では細胞内でアルギナーゼによってアルギニンが分解されず蓄積する為、細胞内での相対的なカナバニンの濃度が下がることで CAO 培地での生育が可能となると考えられている (Kitamoto et al. 1993)。CAO 培地で K6GEcar1p-1-3、K7GEcar1p-1-3、K9GEcar1p-1-3、K10GEcar1p-1-3 とその親株 (K6、K7、K9、K10) を培養した結果、*car1 Δ /car1 Δ* 株では CAO 培地で十分な生育が確認され、親株である K6、K7、K9、K10 は生育が確認されなかった (Figure 12)。この結果から K6GEcar1p-1-3、K7GEcar1p-1-3、K9GEcar1p-1-3、K10GEcar1p-1-3 においてアルギナーゼ活性が欠損していることが表現型からも示された。

考察

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た研究が行われ、CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集により、世界にさきがけてK7から泡なし表現型を持つ *awa1Δ/awa1Δ* 株、K7GE01 が単離された。これを受けて本研究では、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、並びに、理想的な *awa1Δ/awa1Δ* 株の表現型を調べる事ではじめて判明する *AWA1* の機能欠損のみの醸造への影響を調査するための実験を行なった。

そして、K7GE01、K7、K701 株の全ゲノムシーケンスの結果から、K7GE01 が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、清酒酵母の育種における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り、*AWA1* の機能欠損の影響によって醸造 4 日目付近の CO₂ 発生量が減少し、生成酒の酢酸エチル、リンゴ酸、乳酸の含有量が増加し、酢酸の含有が低下することを明らかにした。また本研究では、CRISPR-Cas9システムによるシングルステップの形質転換により K7 とは異なる清酒酵母 K6、K9、K10 株からも *awa1Δ/awa1Δ* 株 K6GE01、K9GE01、K10GE01 を取得した。さらに同様の方法により K6、K7、K9、K10 株から、*car1Δ/car1Δ* 株 K6GEcar1-1、K7GEcar1-1、K9GEcar1-1、K10GEcar1-1 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。

醸造用酵母における CRISPR-Cas9 システムの有用性

今回の一連の研究により二つの遺伝子に対する計 8 株のホモの遺伝子破壊株が得られた。通常清酒酵母は二倍体である。両方の染色体において遺伝子が破壊された株を得るには 10 万~100 万のコロニーをレプリカして 1 株取れるほどの低効率である (Kitamoto. 1993)。このため、これまで *AWA1* の遺伝子破壊株の取得は一倍体のみで行われ (Shimoi et al. 2002)、*CAR1* の遺伝子破壊株の取得は二回の形質転換による標的遺伝子の連続的な破壊によって行われている (Kitamoto. 1991)。しかし今回の研究では CRISPR-Cas9 システムを使用した遺伝子破壊株の取得により、シングルステップの形質転換により簡便で効率的な清酒酵母の育種が実現した。別の研究では CRISPR-Cas9 システムを使用してリナロールとゲラニオール of 植物由来の生合成経路をビール酵母に導入し、ホップを使わずともホップ様の香りがついたビールが製造された事が報告されている (Vigentini et al. 2017)。こうした例および本研究は CRISPR-Cas9 システムがアルコール発酵に役立つ様々な *S. cerevisiae* 分離株の育種に有用であることを示している。

清酒酵母におけるゲノム編集による遺伝子破壊

先行研究における K7 由来の *awa1Δ/awa1Δ* 株の取得実験(山田駿一 修士論文 2018)並びに本研究での *awa1Δ/awa1Δ* 株と *car1Δ/car1Δ* 株の取得実験について、PCR による遺伝子破壊の確認が行われた形質転換体数、ホモでの標的遺伝子切断が行われたと考えられる(バンドが一本、または無い場合)形質転換体数、donor DNA による相同組み替え修復が正しく行われた(標的遺伝子の破壊が正しく行われた)形質転換体数、想定外の方法でゲノムの修復が行われた(想定外のバンドが確認された)形質転換体数を Table. 6 にまとめた。この表から、*awa1Δ/awa1Δ* 株の取得実験の際には、ほとんどの形質転換体で Cas9 による標的遺伝子の切断は起きているが donor DNA による相同組み替え修復は正しく行われなかったことが確認できる。対して *car1Δ/car1Δ* 株の取得実験では全ての親株から 96%以上の形質転換体で donor DNA による相同組み替え修復が正しく行われた(標的遺伝子の破壊が正しく行われた)ことが確認できる。*awa1Δ/awa1Δ* 株の取得実験の際に PCR による破壊確認に用いられた形質転換体は K7 で 40 個、K6 で 14 個、K9 で 28 個、K10 で 13 個のみであり、*car1Δ/car1Δ* 株の取得実験の際とは同質なデータではないため統計的な議論はできないが、Table. 6 から標的遺伝子が *AWA1* である場合に遺伝子破壊効率が著しく低いことが予想される。このため、donor DNA による相同組み替え修復が正しく行われない原因は *AWA1* 遺伝子とその付近のゲノム構造にあると考えられる。

今後の清酒酵母のゲノム編集による育種

これまでゲノム編集を使用した育種による生物は GMO (遺伝子組換え生物)として本国での食品への使用は安全審査の対象であった。しかし、本年度 10 月 1 日よりゲノム編集食品に対する制度が改定され、ゲノム編集の結果、外来の遺伝子が挿入されない場合のみ任意の届け出を行うだけで安全審査を伴わないゲノム編集食品の販売が可能となった(<https://www.mhlw.go.jp/content/000549423.pdf>)。この為、清酒醸造においてもゲノム編集によって生まれた清酒酵母の使用が次第に広まる事が予想される。こうした流れに備えるためにもエビデンスとなる遺伝子型に基づいた清酒酵母の育種の実用例を増やしていく事が重要であると考え。

本研究における例の他にもゲノム編集による遺伝子型に基づいた清酒酵母の育種として以下の例が期待される。一つ目は吟醸香の由来となるカプロン酸エチル高生成清酒酵母株の育種である。これまでに育種されたカプロン酸エチル高生成となる清酒酵母は *Fas2p* に 1250 番目の Gly が Ser に置き換わる変異(Gly 1250 Ser)を持っている (Ichikawa *et al.* 1991) (Aritomi *et al.* 2004) (Tamura *et al.* 2015)。この為、ゲノム編集を用いた清酒酵母株への *Fas2p* の Gly 1250 Ser 変異の効率的な導入が期待される。二つ目はヒネ香低生成酵母株の育種である。ヒネ香とは清酒醸造

後の保存期間中に生成されるオフフレーバーであり、ジメチルトリスルフィド (DMTS) が主成分である。清酒中の DMTS の生成は酵母内のメチオニンサルベージ経路内の遺伝子 *MDE1* または *MRI1* の破壊株の使用によって低減される事が知られている (Wakabayashi *et al.* 2013)。この為、ゲノム編集による清酒酵母株からの *mdel* Δ /*mdel* Δ および *mri1* Δ /*mri1* Δ 株の作製が期待される。またゲノム編集の利用により、こうした遺伝子の単一の変異株だけでなく複数の遺伝子の変異株の作製も期待される。このように、今後もゲノム編集による産業酵母への育種はさらに広がりを見せる事が推察される。

小仕込み試験による生成酒の成分分析

今回の小仕込み試験による生成酒の成分分析の結果から、K7GE01 と K701 で共通して K7 系統の株と異なる表現型が *AWA1* の機能欠損による変化であり、また K701 のみが K7 と異なる表現型を K7 と K701 の間に蓄積されたオフターゲットな変異の影響による変化として結論づけた。K7 と K701 の醸造試験による比較は 1972 年に実施されていたが、全国の 48 の試験場より得られた醸造試験の約 200 例の試験結果を集計したものであり各試験場で扱った醸造量や発酵日数もまちまちであった事から、高精度の統計的な分析は困難であった (Nunokawa *et al.* 1972)。今回の結果は醸造量や発酵日数、発酵環境を揃えた小仕込み試験によるものであるため、以前の研究では困難であった統計的な分析が可能となった。生成酒の成分分析では、泡なし酵母 K7GE01、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、酢酸の含有量が低いという結果が得られた。醸造の初期段階で泡なし酵母株 K7GE01、K701 が高泡を形成しないこと、醸造 4 日目付近の CO₂ 発生量が減少したことから、*AWA1* の機能欠失による泡なしのもろみは発酵条件に何らかの変化が生じている可能性が考えられる。本研究において泡なし酵母株 K7GE01、K701 による生成酒で酢酸の含有量の低下が確認されているが、酢酸は嫌気的な発酵条件下で清酒酵母による生成量が少なくなることが確認されている (Tadenuma 1966)。また、含有量の増加が確認されたリンゴ酸は、嫌気的な発酵条件下で清酒酵母による生成量が多くなることが確認されている (Matuda. 2014)。これらのことから、泡なし酵母株 K7GE01、K701 によるもろみではより嫌気的な条件下での発酵が行われたと考えられる。高泡を形成する泡ありのもろみでは酵母が泡に吸着しているため、一部の酵母が泡と共にもろみの上に持ち上げられる。対して泡なしのもろみでは同様の現象は起こらず一部の酵母がもろみの表層にたまることはない。このため、酵母のもろみ内の局在の変化がこうした発酵における好気条件の変化に寄与していることが考えられる。

今回 K7GE01、K701 による生成酒での含有量の増加が確認されたリンゴ酸は清酒

に清涼感を伴う酸味を、乳酸は収斂味を伴う酸味を付与する成分で、これらは清酒中の有機酸の主要成分であることが知られている(Tadenuma 1966)。対して低下が確認された酢酸は酸臭の原因となるオフフレーバーであり、旨味を伴う酸味を呈することが知られている(Tadenuma 1966)。このため、泡なし酵母による生成酒は K7 株による生成酒よりも比較的爽やかな酸味が強い事が推察される。また、K701 による生成酒ではさらに酸味や濃厚さに影響するとされている酸度が高く、酒の甘辛を示す日本酒度が低く(甘い事を示す)、清酒に華やかな吟醸香を付与するカプロン酸エチルの濃度が高い事から、K7、K7S09、K7GE01 による生成酒よりもさらに酸味があり、より濃厚で華やかな味わいである事が推察される(Negoro *et al.* 2017)(Tutumi. 2011)。本研究で明らかにされた *AWA1* 遺伝子の機能欠損の影響や K7 と K701 の間に蓄積されたオフターゲットな変異の蓄積の影響が実際に程味に変化を及ぼすかどうか知見を得るため、予備的な実験ではあるが、小仕込み試験で得られた生成酒に対して味覚センサー(インテリジェントセンサーテクノロジー味覚認識装置 SA402B)による塩味、酸味、旨味、苦味、渋味の強度測定を行なった。この結果、確かに酸味の強度については差が認められ、小仕込み試験の結果から推察された通り K701 が一番強く、次いで K7GE01、K7 株の順であることが確認されている(data not shown)。

全ゲノムシーケンス結果より期待された育種における形態解析の有用性

K7、K701、K7GE01 については当研究室にて形態表現型解析が行われている(Ohnuki *et al.* 2019)。K7GE01、K701 をそれぞれ K7 と比較した場合のユークリッド距離と有意差のある形態パラメーター数が求められ、K7GE01 は K701 よりも K7 に近い形態であること、K701 では有意な形態変化があるが K7GE01 では無いことが確認されている(Ohnuki *et al.* 2019)。本研究での全ゲノムシーケンスでは、K7 と K701 の間にオフターゲットな変異の蓄積があるが、K7GE01 にはオフターゲットな変異がほとんど無いことが確認されている。これらの結果から、CalMorph を使用した形態解析により育種株と親株とのユークリッド距離や有意差のある形態パラメーター数を求めることで、育種中や保存期間に発生したオフターゲットな変異の存在のチェックができることが示唆された。そして、CalMorph を使用した形態表現型解析がオフターゲットな変異を持つ育種株の排除に有用であることが期待される。清酒酵母の育種において、表現型に着目した育種によっていくつかの候補株が取得された場合、一度仕込み試験を行い親株と性質の近いものを選抜するケースがある。この選抜の代用として CarMorph による形態表現型解析が使用できれば選抜期間の短縮が可能となるだろう。

参考文献

Akao T. New perspectives of genetic variability of sake yeast strains in microevolution and breeding. *Science and Biology*. 2014;52(4):223–232.

Aritomi K *et al.* Self-cloning yeast strains containing novel *FAS2* mutations produce a higher amount of ethyl caproate in Japanese sake. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68(1):206-214

Denby CM *et al.* Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. *Nat Commun*. 2018;9(1):965.

DiCarlo JE *et al.* Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(7):4336–4343.

Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*. 2007;2(1):31–34.

Ichikawa E *et al.* Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric Biol Chem*. 1991;55(8):2153–2154.

Inabashi M. *Kyokai* sake yeast strain No.1701. *J Soc Brew Jpn*. 2001;96(10):679-687

Kitagaki H, Kitamoto K. Breeding research on sake yeasts in Japan: history, recent technological advances, and future perspectives. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013;4:215–235.

Kitamoto K *et al.* Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57(1):301–306.

Kitamoto K *et al.* Mutant Isolation of Non-Urea Producing Sake Yeast by Positive Selection. *J. Ferment. Bioeng*. 1993;75(5): 359-363.

Kitamoto K. Sake and ethyl carbamate. *Science and Biology*. 1993;31(8):524-530.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754–1760.

Li H *et al.* The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078–2079.

Matuda A *et al.* Influence of culturation method on enzymes concerned with the production of malic acid of yeasts. *J Soc Brew Jpn*. 2014;109(10):745-755

McKenna A *et al.* The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297–1303.

Miyashita K *et al.* Cloning and analysis of the *AWAI* gene of a nonfoaming mutant of a sake yeast. *J Biosci Bioeng*. 2004;97 (1):14–18.

Negoro H *et al.* Identification of mutant genes contributing to high malic acid production in sake yeast and application to breeding. *Science and Biology*. 2017;55(6):434-437

Nunokawa Y, Ouchi K. Fermentation test by nonfoam-forming mutant of Kyokai 7 yeast. *J Soc Brew Jpn*. 1972;67(3):242–245.

Ohnuki *et al.* 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.

Ouchi K, Akiyama H. Non-foaming mutants of sake yeasts selection by cell agglutination method and by froth flotation method. *Agric Biol Chem*. 1971;35 (7):1024–1032.

Ouchi K. History of non foaming yeasts. *J Soc Brew Jpn*. 2010;105(4):184–187.

Peter J *et al.* Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*. 2018;556(7701):339–344.

Ryan OW, Jamie H.D. Cate. Multiplex Engineering of Industrial Yeast Genomes Using

CRISPRm. *Methods in Enzymology*. 2014;546(c):473-489

Ryan OW *et al.* Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *Elife*. 2014;3:1-15

Shimoi H *et al.* The *AWAI* gene is required for the foam-forming phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(4):2018–2025.

Suzuki G *et al.* Global study of holistic morphological effectors in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 2018;19(1):149.

Tadenuma M. Organic acid of sake. *J Soc Brew Jpn*. 1966;61(12):1092-1097

Tamura H *et al.* Isolation of a spontaneous cerulenin-resistant sake yeast with both high ethyl caproate-producing ability and normal checkpoint integrity. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;19:1–9.

Tutumi H. Study on aroma production of sake yeast. *Biotechnology*. 2011;89(12):717-719

Van Den Ent F, Lowe J. RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J Biochem Biophys Methods*. 2006;67(1):67–74.

Vigentini I *et al.* CRISPR/Cas9 System as a Valuable Genome Editing Tool for Wine Yeasts with Application to Decrease Urea Production. *Front Microbiol*. 2017;8:2194.

Wakabayashi K *et al.* Involvement of methionine salvage pathway genes of *Saccharomyces cerevisiae* in the production of precursor compounds of dimethyl trisulfide (DMTS). *J Biosci Bioeng*. 2013;116(4):475–479.

Watanabe D. Quantitative analysis of sake fermentation profile using gas generation measurement system. *The new technology and functionality of fermented foods II* . 2011;140-149

Yamada S. master's thesis. Breeding of sake yeast using genome editing. 2018

Yoshida K. *Kyokai* sake yeast strain No.1801. J Soc Brew Jpn. 2006;101(12):910-922

表

Table.1 使用菌株

Name	Genotype	Source	Description
K6 (YOC5224)	Sake yeast MATa/ α	The Brewing Society of Japan.	Representative sake yeast currently used.
K6GE01	Sake yeast MATa/ α <i>awal/awal</i>	In this laboratory. (In this study)	Non form forming sake yeast made from K6 by genome editing
K6GEcar1-1	Sake yeast MATa/ α <i>car1/car1</i>	In this laboratory. (In this study)	Non produce urea yeast made from K6 by genome editing.
K7 (YOC5226)	Sake yeast MATa/ α	The Brewing Society of Japan.	Representative sake yeast currently used. (Separated in 2015)
K7S09 (YOC4451)	Sake yeast MATa/ α	National Research Institute of Brewing	Representative sake yeast currently used. (Separated in 2009)
K701 (YOC5227)	Nonfoaming mutant of K7	The Brewing Society of Japan.	Non form forming sake yeast prepared by natural mutation.
K7GE01 (YO5229)	Sake yeast MATa/ α <i>awal/awal</i>	In this laboratory. (Yamada S. master's thesis. 2018)	Non form forming sake yeast made from K7 by genome editing.
K7GEcar1-1	Sake yeast MATa/ α <i>car1/car1</i>	In this laboratory. (In this study)	Non produce urea yeast made from K7 by genome editing.
K9GE01	Sake yeast MATa/ α <i>awal/awal</i>	In this laboratory. (In this study)	Non form forming sake yeast made from K9 by genome editing
K9GEcar1-1	Sake yeast MATa/ α <i>car1/car1</i>	In this laboratory. (In this study)	Non produce urea yeast made from K9 by genome editing.
K10 (YOC5231)	Sake yeast MATa/ α	The Brewing Society of Japan.	Representative sake yeast currently used.
K10GE01	Sake yeast MATa/ α <i>awal/awal</i>	In this laboratory. (In this study)	Non form forming sake yeast made from K10 by genome editing
K10GEcar1-1	Sake yeast MATa/ α <i>car1/car1</i>	In this laboratory. (In this study)	Non produce urea yeast made from K10 by genome editing.

Table.2 プラスミド

Name	Description	Marker	Reference
pCAS-Pro- <i>URA3</i>	Co-express Cas9 and sgRNA targeting <i>URA3</i> locus	KanMX	Ryan <i>et al.</i> 2014
pCAS-Pro- <i>AWA1</i>	Co-express Cas9 and sgRNA targeting <i>AWA1</i> locus	KanMX	Yamada S. master's thesis. 2018
pCAS-Pro- <i>CARI</i>	Co-express Cas9 and sgRNA targeting <i>CARI</i> locus	KanMX	In this study

Table.3 プライマー

Name	Sequence (5'→3')	Direction
PCR primer <i>AWA1</i> -F	TGGTGCTAGGCCCTGTGTTGTG	Forward
PCR primer <i>AWA1</i> -R	TGGCCTGAACGATTTACTGTGGA	Reverse
RF cloning primer <i>CARI</i> target-F	CGGGTGGCGAATGGGACTTTTGGTCTGCAAACAAG CATAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	Forward
RF cloning primer <i>CARI</i> target-R	GCTATTTCTAGCTCTAAAACCTATGCTTGTGTTGCAG ACCAAAAAGTCCCATTCGCCACCCG	Reverse
PCR primer <i>CARI</i> -F	GGTGCAATCCCTGACTCATCAATG	Forward
PCR primer <i>CARI</i> -R	ATTTTAAAGGCCCCACGGTTGG	Reverse

Table.4 donor DNA

Name	Sequence (5'→3')	Direction
<i>AWAI</i> . donor. sense	TTTTGTGGTTCTCAAGTCAGTAACAACAAATACCCATCGTT GATTCTTTTTGGTAAGATCTTGCCTGTCAAAGAGTTTTTTT AACTGAGGAATTAAAAGTTTATTCCTCTGAAACGAGATAG GTTCTTAATATGCATTTTATATACGCTT	sense
<i>AWAI</i> . donor. anti	AAGCGTATATAAAATGCATATTAAGAACCTATCTCGTTTCA GAGGAATAAACTTTTAATTCCTCAGTTAAAAAACTCTTTTG ACAGGCAAGATCTTACCAAAAAGAATCAACGATGGGTATT TGTTGTTACTGACTTGAGAACCACAAAA	antisense
<i>CARI</i> . donor. sense	TGGTCTGTATATGTTTTCTCAAAGTTAGCAGAAACAACAA CAACA ACTATATCAATAACAATAACTACTATCAAGTTTATAT CATCATCCCTTTTATCAAATAAGCATTCTCTTTTTATTTTA GTTAAGCACATGCATACATAAATTTA	sense
<i>CARI</i> . donor. anti	TAAATTTATGTATGCATGTGCTTAACTAAAATAAAAAGAGA ATGCTTATTTTGATAAAAGGGATGATGATATAAACTTGATAG TAGTTATTGTTATTGATATAGTTGTTGTTGTTGTTTCTGCTA ACTTTGAGAAAACATATACAGACCA	antisense

Table.5 sgRNA ターゲット配列

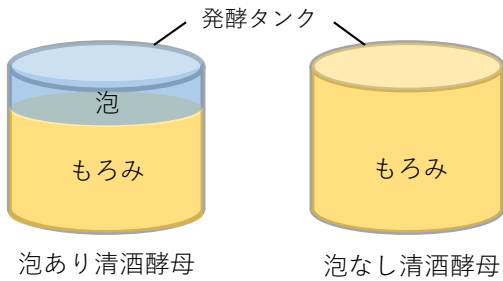
Locus	Sequence (5'→3')	Background
<i>AWAI</i>	CCTTACTCCCAAAGTGCAT	K7
<i>CARI</i>	TGGTCTGCAAACAAGCATAG	K7

**Table.6 CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊実験における遺伝子破壊確認 PCR 結果
まとめ**

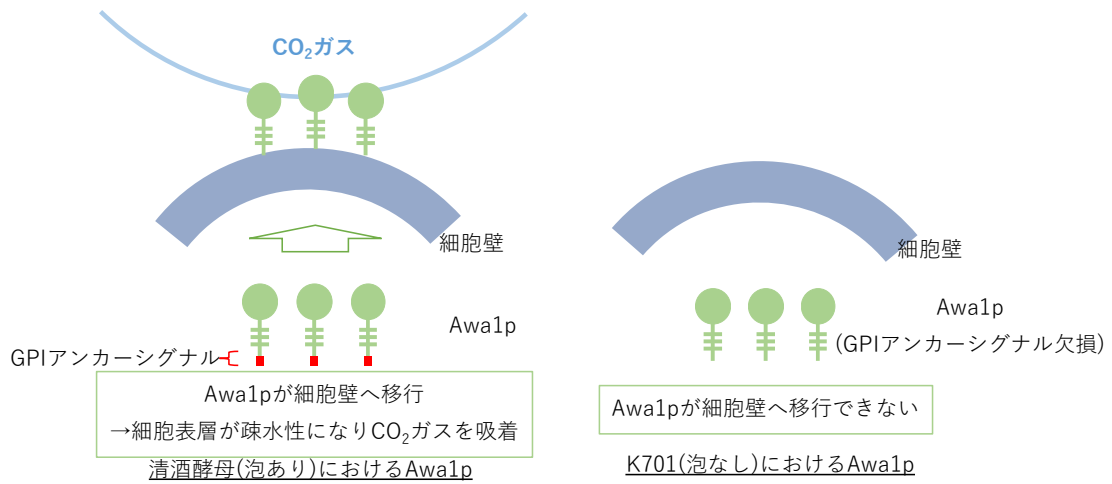
標的遺伝子	<i>AWI</i>				<i>CAR1</i>			
	K6	K7	K9	K10	K6	K7	K9	K10
親株	K6	K7	K9	K10	K6	K7	K9	K10
リファレンス	本研究	山田駿一 修士論文 2018	本研究	本研究	本研究	本研究	本研究	本研究
PCR による遺伝子破壊確認を行なった形質転換体数	14	40	28	13	100	100	100	100
ホモでの標的遺伝子切断が行われた形質転換体数	14	40	28	13	100	100	100	100
donor DNA による相同組み替え修復が正しく行われた形質転換体数	1	2	2	1	98	96	100	99
想定と異なるゲノムの修復が行われた形質転換体数 / 確認されたバンド長	0	4 / 4 kbp	13 / 3~4 kbp	1 / 3 kbp	0	0	0	0



A



B



C

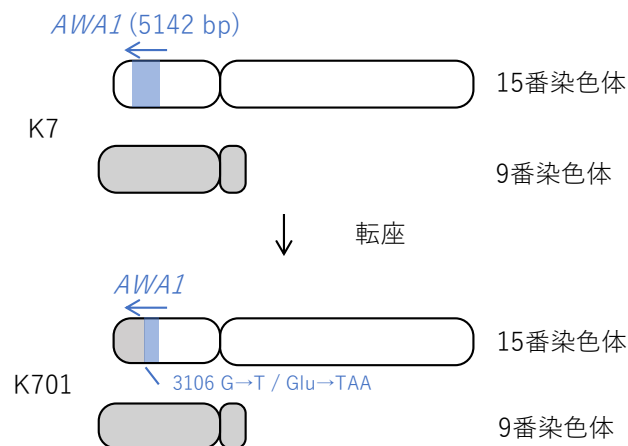


Figure 1. 清酒酵母における *AWA1* 遺伝子の欠損による高泡形成能の喪失
A) 泡あり酵母と泡なし酵母による清酒醸造における発酵タンクの様相。清酒酵母は

醸造初期にもろみの表層に高泡と呼ばれる厚い泡の層を形成する。高泡の存在は発酵タンクの使用可能領域を狭める。しかし、泡なし酵母によるもろみは高泡が形成されない。

B) 清酒酵母における *Awa1p* による高泡形成の仕組みと泡なし酵母 K701 における高泡形成能喪失の仕組み。通常の清酒酵母では *Awa1p* が GPI を介して細胞膜に結合し、その後細胞壁に移行する。*Awa1p* の C 末端側は細胞壁に固定されているため、細胞外に突出した *Awa1p* の N 末端側が疎水性をもたらす発酵中に発生する CO₂ ガスを吸着して泡が発生すると考えられている。泡なし酵母 K701 では C 末端付近に存在する GPI アンカーシグナル配列が欠損しているため、*Awa1p* が細胞膜へ結合できず、結果として *Awa1p* の細胞壁への移行も起こらない。そして細胞表層の疎水性が失われ、CO₂ ガスへの吸着が出来なくなる。このため、高泡の形成が起きなくなると考えられている(Shimoi, 2002)。

C) K701 における高泡形成能喪失原因となる変異の模式図。泡なし酵母 K701 では 15 番染色体と 9 番染色体の間に非相互的な転座が発生し *AWA1* 遺伝子領域の半分が欠損している。この転座の影響により 3106 番目の塩基が G から T に変化し、ストップコドンが発生している(Miyashita *et al.* 2002)。

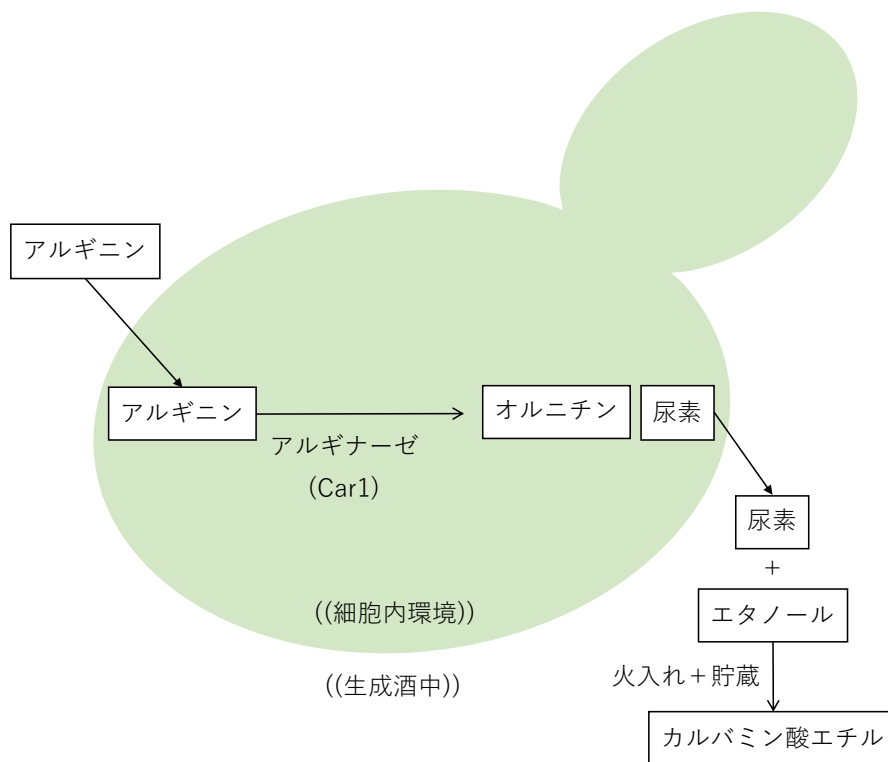
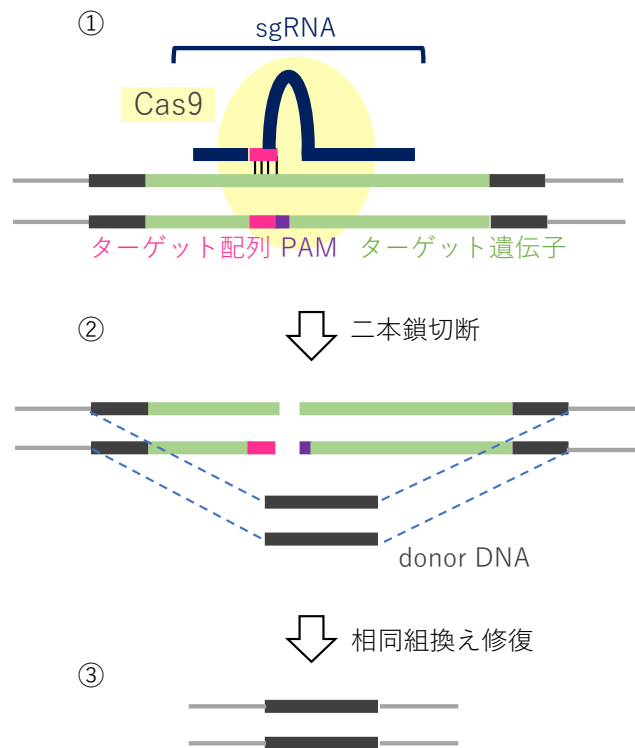


Figure 2. 酵母における尿素生成および生成酒中のカルバミン酸エチル生成の仕組み

生成酒中の尿素は主に酵母細胞に取り込まれたアルギニンがアルギナーゼ(Car1)によって分解される事でオルニチンと共に生成される。発癌性物質であるカルバミン酸エチルは生成酒の火入れや貯蔵段階の段階で尿素とエタノールが化学反応する事で生成される(Kitamoto *et al.* 1991)。

A



B

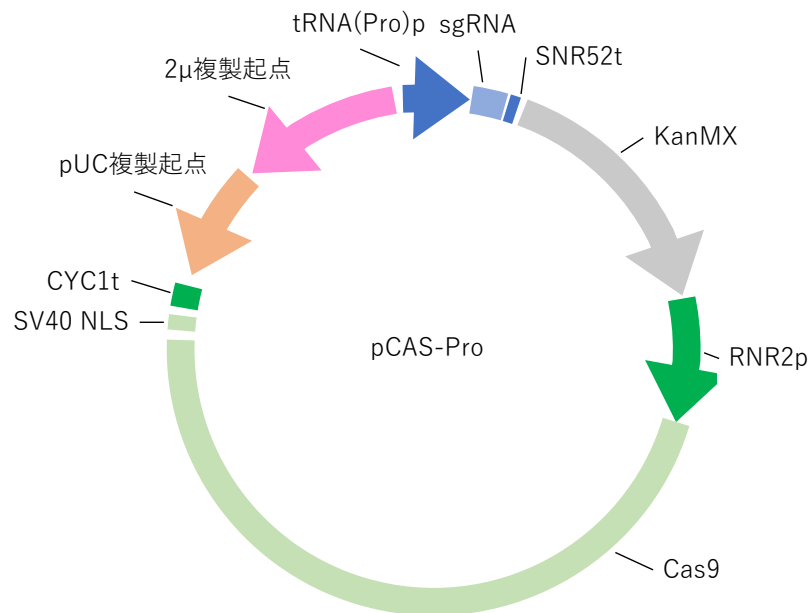


Figure 3. CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊の仕組みと pCAS プラスミドの構造

A) CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊の仕組み。CRISPR-Cas9 による遺伝子破壊は、①細胞内で発現させたエンドヌクレアーゼである Cas9 と標的遺伝子領域内の PAM 配列(NGG)に隣接したターゲット配列を認識する sgRNA による標的遺伝子領域の二本

鎖切断、②donor DNA を鋳型とした相同組み替え修復(HDR)、によって行われる。この時 donor DNA を標的遺伝子上流と下流を繋げた配列にした場合、③その標的遺伝子の破壊株が得られる。

B) pCAS プラスミドの構造。pCAS プラスミドは細胞内で Cas9 と sgRNA を共発現する。また、バクテリアに作用する pUC 複製起点、酵母で作用する 2 μ 複製起点、バクテリアに作用する抗生物質 kanamycin と酵母で作用する抗生物質 G418 の耐性遺伝子を含む KanMX カセットを持つ。Cas9 の発現調節には RNR2 プロモーターと CYC1 ターミネーターが使用され、Cas9 の核内への移行には SV40NLS が使用されている。また、sgRNA の発現調節には RNAIII 型の tRNA-Pro プロモーターと SNR52 ターミネーターが使用されている。sgRNA の 5'末端側には自己切断型肝炎デルタウイルス(HDV) 配列が結合しており、RNA 分解機構からのターゲット配列の保護や余分な RNA の除去を行い、細胞内の sgRNA レベルを高める(Ryan *et al.* 2014)。

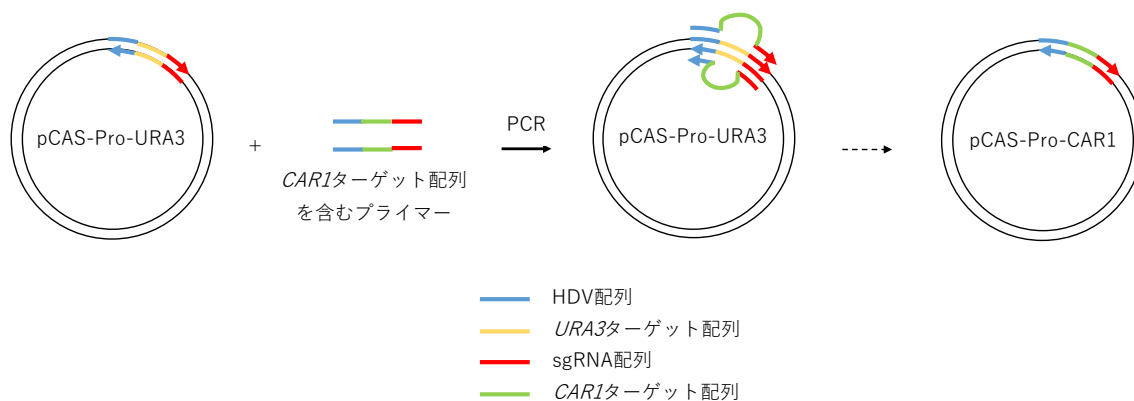


Figure 4. RF クローニングにおける PCR によるターゲット配列の置換の仕組み

RF クローニングによる pCAS プラスミドへのターゲット配列の導入には PCR が用いられる。pCAS プラスミドにおけるターゲット配列は HDV 配列と sgRNA 配列の間にコードされている。ターゲット配列を置換する為には HDV 配列と sgRNA 配列の間に新たなターゲット配列がコードされるプライマーを用いて PCR を行う。本研究では pCAS-Pro-URA3 を鋳型として pCAS-Pro-CAR1 を作成する為、HDV 配列と sgRNA 配列の間に *CAR1* ターゲット配列がコードされているプライマーを用いた。

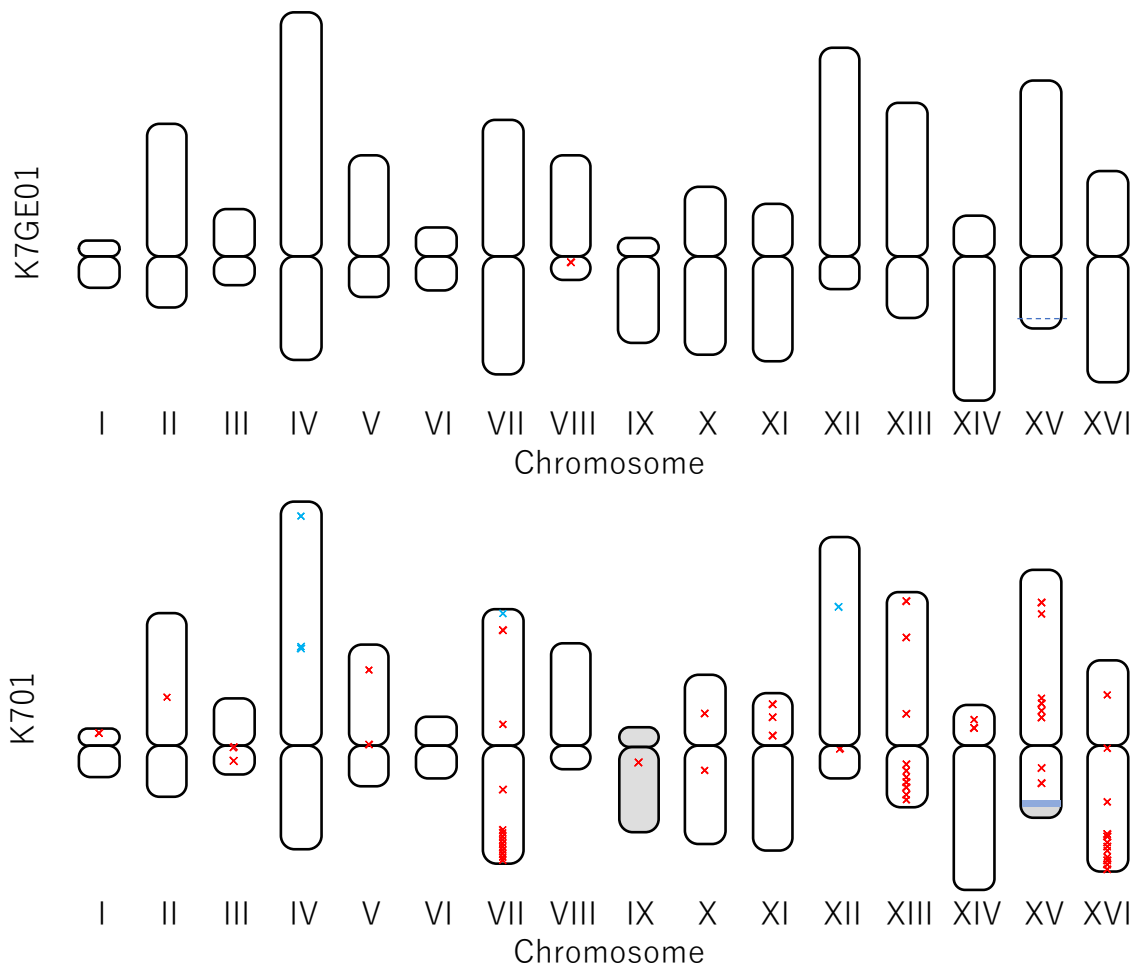
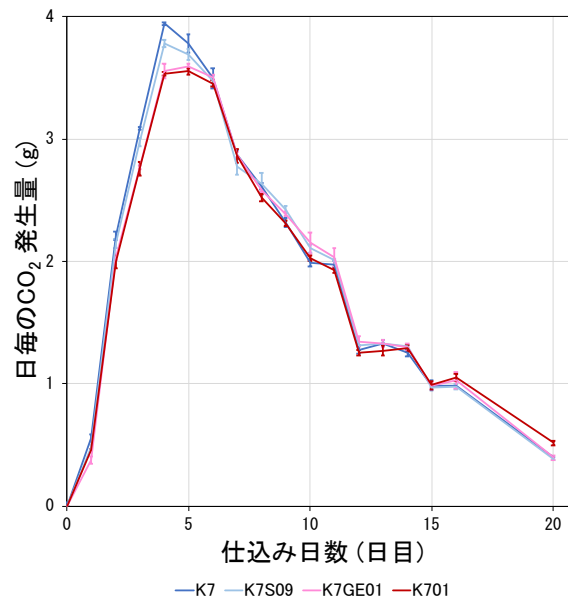


Figure 5. 全ゲノムシーケンスによる K7GE01 と K701 の比較

K7GE01、親株の K7、自然突然変異により育種された泡なし酵母 K701 について全ゲノムシーケンスによる配列比較を行った。GGM を用いて K7 と比較した際の K7GE01 と K701 における変異を抽出した後、さらに偽陽性と考えられるリピートの前後の配列、シーケンス深度 < 10、変異を起こしているアレル < 25% のものを除いたものを除外してノンシノニムな変異を抽出した。その結果判明した変異の位置が図に × で示されている。ホモな変異については青、ヘテロな変異については赤で示した。K7GE01 については 1 つ、K701 については 88 個のノンシノニムな変異が示されている。K7GE01 の 15 番染色体上の青い点線は *AWAI* 領域の欠失部位を表す。また K701 の 15 番染色体上の青い領域は 9 番染色体の転座後に残った *AWAI* 領域を示す。灰色の領域は 9 番染色体の配列が存在する領域を示す。

A



B

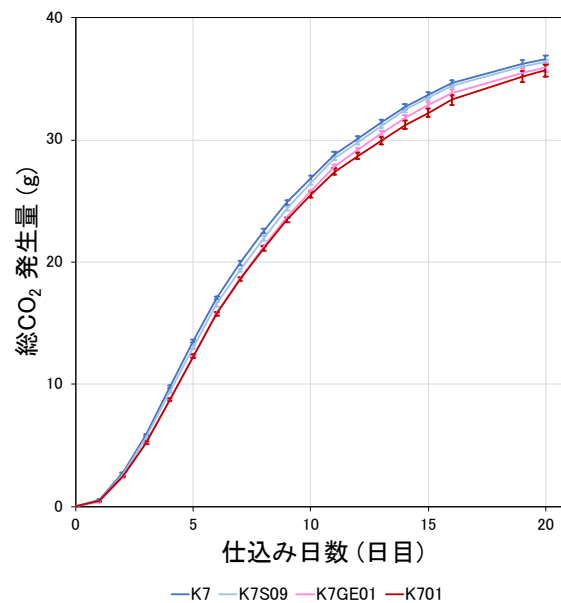
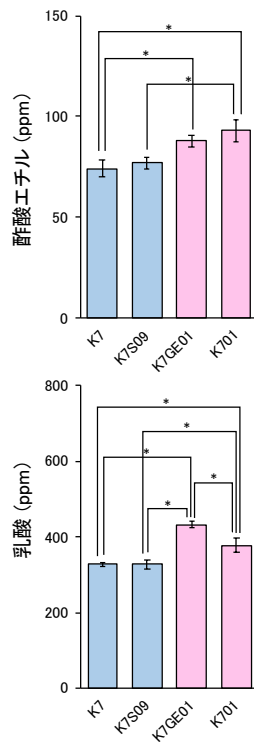


Figure 6. K7、K7S09、K7GE01、K701 もろみ中の CO₂ 発生量

A) もろみ中の日毎の CO₂ 発生量を仕込み瓶の前日との重量の差から算出し、K7、K701、K7GE01、K7S09 で比較した(n=3)。グラフの縦軸には CO₂ 発生量(g)を横軸には仕込み初日(0 日目)からの日数を示した。ピーク時の有意差は Tukey の多重比較検定(p < 0.05)によって求められ、エラーバーは標準偏差を示す。

B) 日毎の CO₂ 発生量を累計して総 CO₂ 発生量を日毎に算出した(n=3)。グラフの縦軸と横軸は A)と同様に示した。

A



B

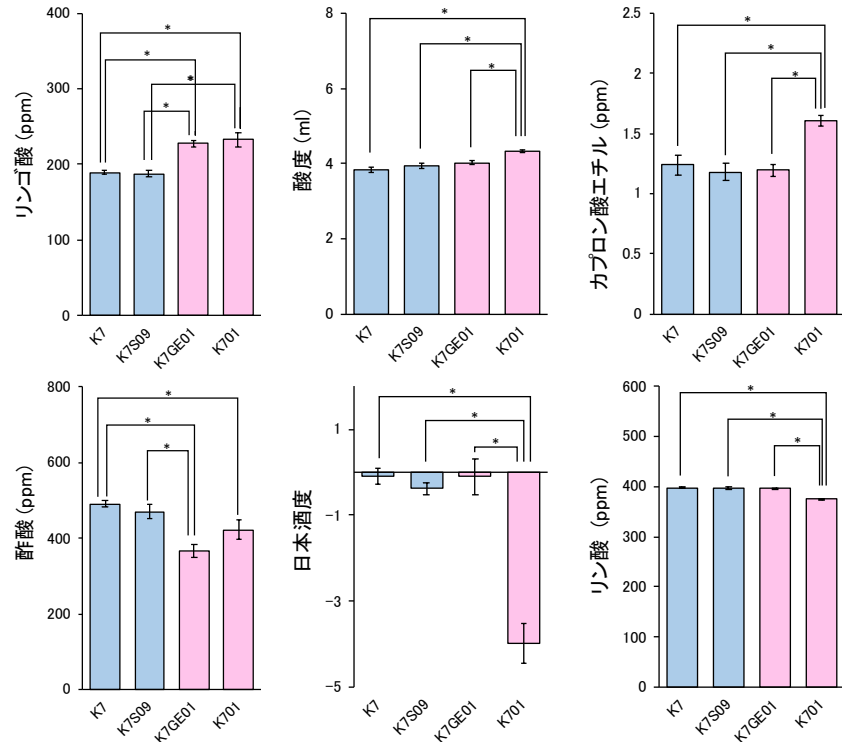


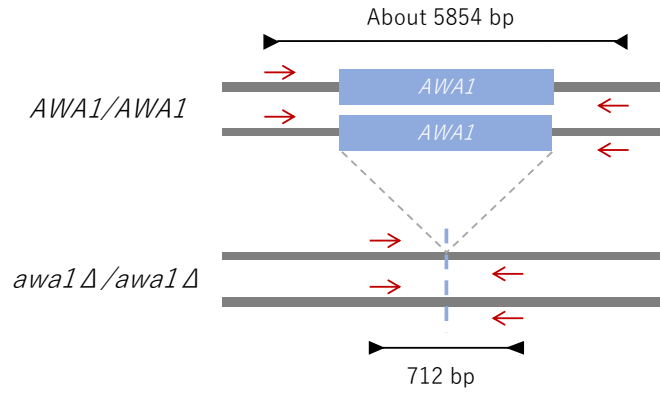
Figure 7. K7、K701、K7GE01、K7S09 を用いた生成酒の成分分析

A) K7、K7S09 と K7GE01、K701 間で有意に異なる成分。

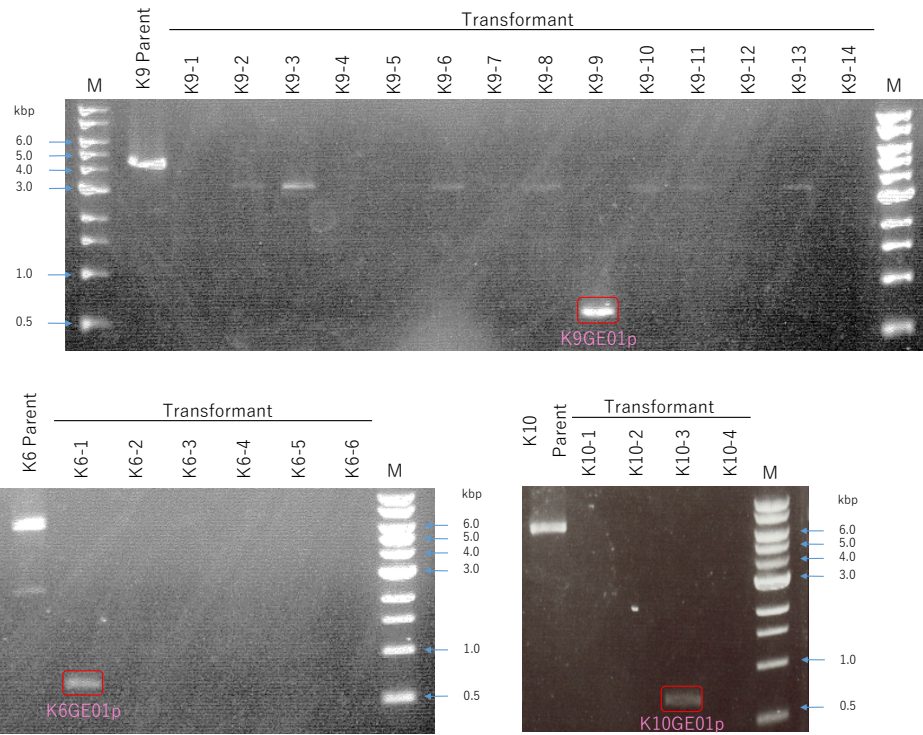
B) K7、K7S09、K7GE01 と K701 間で有意に異なる成分。

両グラフとも縦軸に測定した成分の濃度、横軸に株名を示した。青のバーは泡あり酵母を示し、ピンクのバーは泡なし酵母を示す。アスタリスクは Tukey の多重比較検定によって求められた有意差を示し ($p < 0.05$) ($n = 3$)、エラーバーは標準偏差を示す。

A



B



C



D

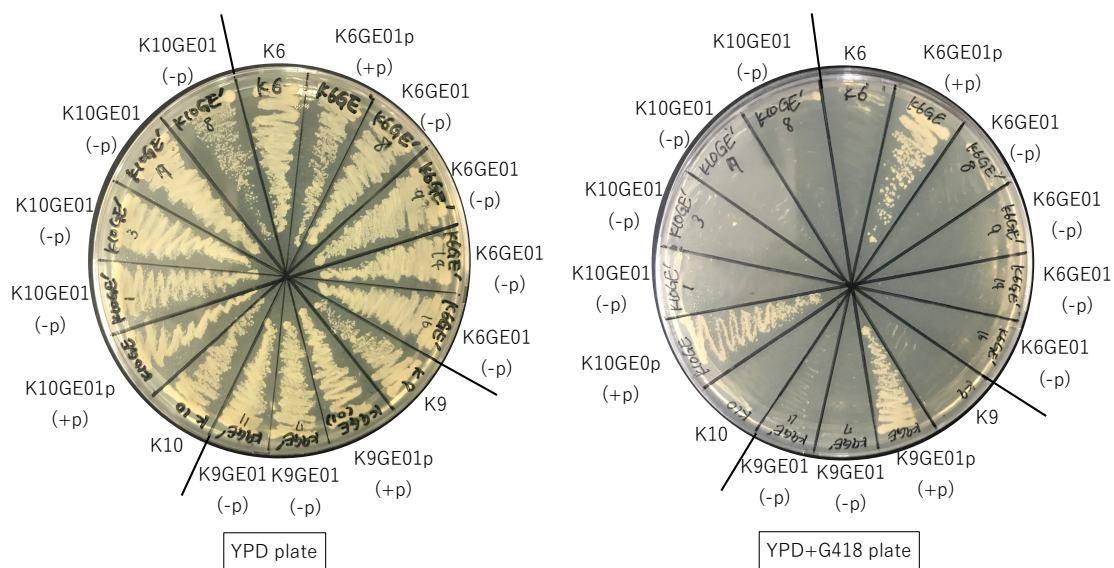


Figure 8. 作製した *awa1* Δ /*awa1* Δ 株の遺伝子欠損の確認

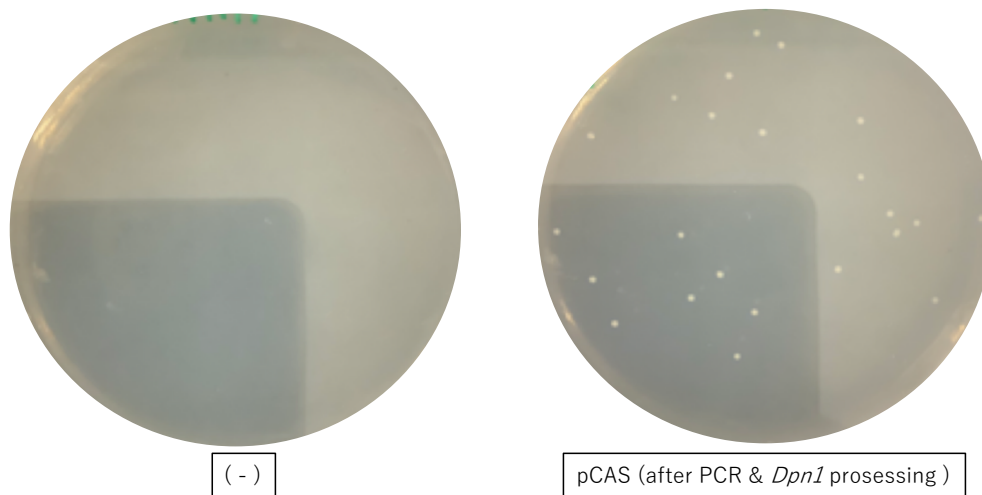
A) 親株(*AWA1*/*AWA1*)と *awa1* Δ /*awa1* Δ 株の *AWA1* 遺伝子領域付近の模式図。PCR での *AWA1* 遺伝子破壊確認に用いるプライマー(PCR primer *AWA1*-F, PCR primer *AWA1*-R)が赤矢印で示されており、増幅が予想されるフラグメントの長さが黒いバーと共に示されている。親株ではおよそ 5854 bp、*awa1* Δ /*awa1* Δ 株では 712 bp の増幅が期待される。

B) PCR での *AWA1* 遺伝子破壊確認。親株と pCAS プラスミドの形質転換体の *AWA1* 遺伝子領域付近をコロニーPCR で増幅し *AWA1* 遺伝子破壊確認を行った。確認は K6 では 14 株、K9 では 28 株、K10 では 13 株の形質転換体で行った。図には 712 bp の増幅が見られ *awa1* Δ /*awa1* Δ 株である事が確認された株(赤枠)(K6GE01p、K9GE01p、K10GE01p)の泳動写真を抜粋して記載した。親株である K6、K9、K10 は 5854 bp 付近のフラグメントを増幅する比較対象として用いた。M と記載したレーンにはマーカートを流した。

C) *awa1* Δ /*awa1* Δ 株の *AWA1* donor DNA 挿入領域付近のシーケンス結果。PCR で *AWA1* 遺伝子の破壊が確認された株(K6GE01p、K9GE01p、K10GE01p)の *AWA1* donor DNA 挿入領域付近を PCR primer *AWA1*-F、PCR primer *AWA1*-R を用いてシーケンスした。Expected sequence には *AWA1* donor DNA 領域とその付近のリファレンス(K7)の配列を用いた。シーケンス結果における Y について実際のリードの波形を確認したところ、expected sequence と一致する配列(C)が検出されていた(data not shown)。

D) K6GE01p、K9GE01p、K10GE01p のプラスミドドロップ結果。K6GE01p、K9GE01p、K10GE01p を YPD 液体培地で培養して YPD プレートにまいた。pCAS プラスミドは KanMX カセットを持つ為、得られたシングルコロニーのうち pCAS プラスミドが除去された株を YPD+G418 プレートと YPD プレートをを用いて選択した。YPD プレ

ートで生育しYPD+G418プレートで生育しなかったコロニーをプラスミドドロップの成功株として(-p)と記している。また、プラスミドドロップ前の K6GE01p、K9GE01p、K10GE01p をポジティブコントロールとして用い、親株(K6、K7、K9、K10)はネガティブコントロールとして用いた。

A**B**

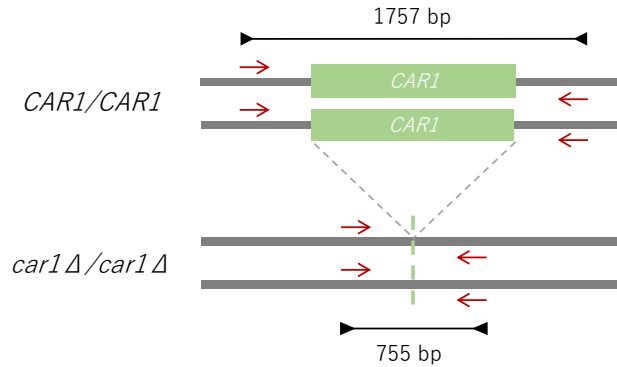
	<i>CAR1</i> target sequence
Expected sequence	<u>CTTTGGTCTGCAAACAAGCATAGGTTT</u>
prasmid sample 1	<u>ACGTTACAGAAAAGCAGGCTGTTT</u>
prasmid sample 2	CTTTGGTCTGCAAACAAGCATAGGTTT
prasmid sample 3	<u>CTTTACGTTACAGAAAAGCAGGCTGTTT</u>
prasmid sample 4	CTTTGGTCTGCAAACAAGCATAGGTTT
prasmid sample 5	CTTTGGTCTGCAAACAAGCATAGGTTT
prasmid sample 6	CTTTGGTCTGCAAACAAGCATAGGTTT
prasmid sample 7	<u>CTTTACGTTACAGAAAAGCAGGCTGTTT</u>
prasmid sample 8	<u>CTTTACGTTACAGAAAAGCAGGCTGTTT</u>
prasmid sample 9	<u>CTTTACGTTACAGAAAAGCAGGCTGTTT</u>

Figure 9. pCas-Pro-CAR1 作成の為の RF クローニング結果

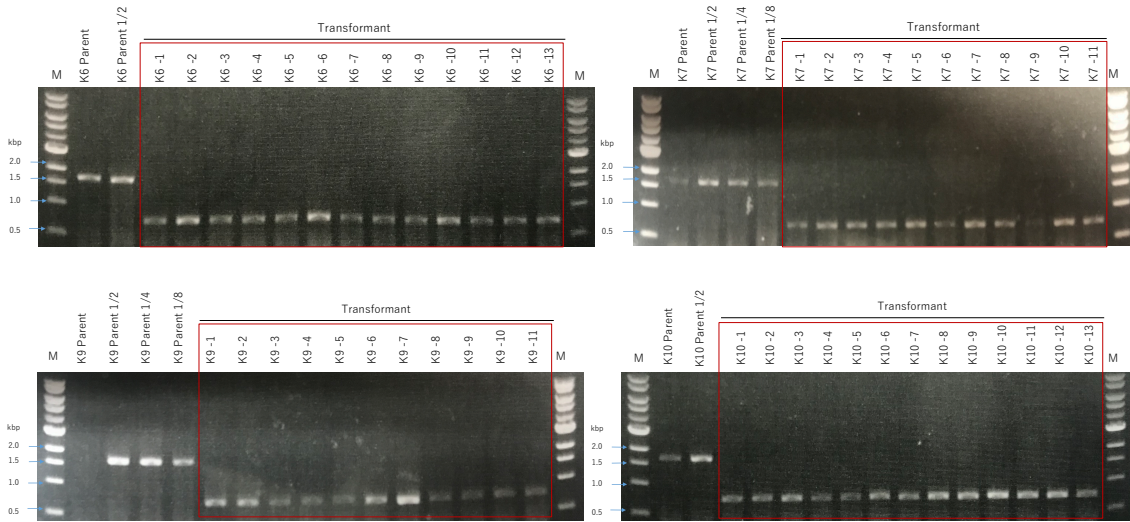
A) PCR 反応液の大腸菌への形質転換結果。pCAS-Pro-URA3 を鋳型として *CAR1* ターゲット配列を含む RF cloning primer *CAR1* target-F、RF cloning primer *CAR1* target-R を用いた PCR を行った後、*DpnI* 処理した PCR 反応液を大腸菌 DH5 α に形質転換した。LB+kanamycin プレートで選択を行ったところ、23 個のコロニーが確認された。右がその結果を表す写真であり、左の写真は鋳型の pCAS-Pro-URA3 を加えずに PCR した反応液を形質転換したプレートでネガティブコントロールとして用いた。

B) 大腸菌形質転換体が保持するプラスミドのシーケンス結果。A)にて確認された 23 のコロニーのうち 8 つについてプラスミドを抽出し、正確に *CAR1* ターゲット配列が挿入された pCAS プラスミドが保持されているかシーケンスによって確認した。Expected sequence には上流に HDV 配列、下流に sg RNA 配列が結合した *CAR1* ターゲット配列を用いた。Expected sequence と相同でないターゲット配列は黒い背景で示した。

A



B



C

CAR1 donor DNA sequence / sense

Expected sequence / sense
 K6GE *car1p-1* / sense
 K6GE *car1p-2* / sense
 K7GE *car1p-1* / sense
 K7GE *car1p-2* / sense
 K9GE *car1p-1* / sense
 K9GE *car1p-2* / sense
 K10GE *car1p-1* / sense
 K10GE *car1p-2* / sense
 K10GE *car1p-3* / sense

CAR1 donor DNA sequence / anti sense

Expected sequence / anti sense
 K6GE *car1p-1* / anti sense
 K6GE *car1p-2* / anti sense
 K7GE *car1p-1* / anti sense
 K7GE *car1p-2* / anti sense
 K9GE *car1p-1* / anti sense
 K9GE *car1p-2* / anti sense
 K10GE *car1p-1* / anti sense
 K10GE *car1p-2* / anti sense
 K10GE *car1p-3* / anti sense

D

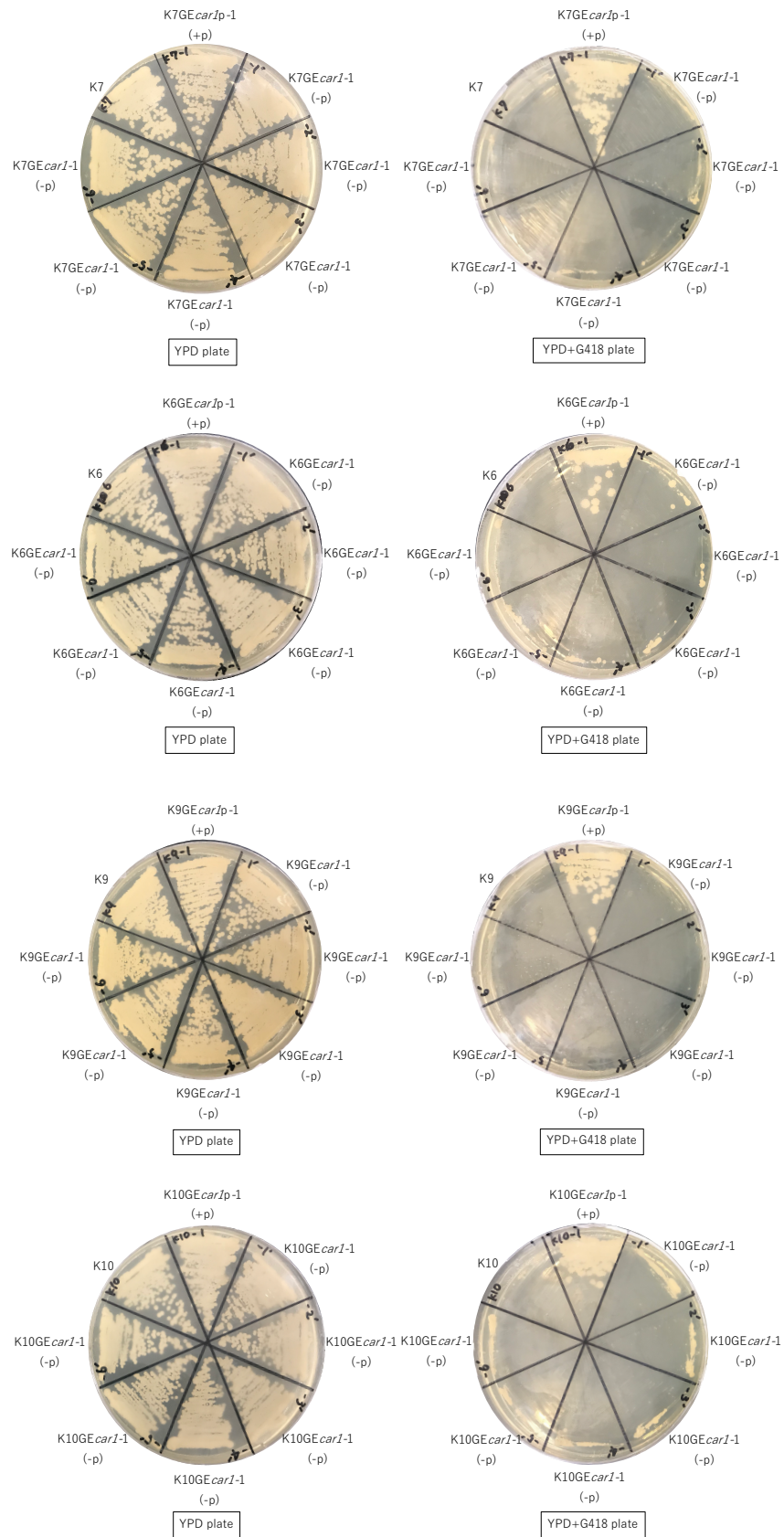


Figure 10. 作製した *car1* Δ/*car1* Δ株の遺伝子欠損確認

A) 親株(*CARI*/*CARI*)と *car1* Δ/*car1* Δ株の *CARI* 遺伝子領域付近の模式図。PCR での *CARI* 遺伝子破壊確認に用いるプライマー(PCR primer *CARI*-F、PCR primer *CARI*-R)が赤矢印で示されており、増幅が予想されるフラグメントの長さが黒いバーと共に示されている。親株ではおよそ 1757 bp、*car1* Δ/*car1* Δ株では 755 bp の増幅が期待される。

B) PCR での *CARI* 遺伝子破壊確認結果。親株と pCAS プラスミド形質転換体の *CARI* 遺伝子領域付近を PCR で増幅し *CARI* 遺伝子破壊確認を行った。確認はそれぞれ 100 株ずつ行った。755 bp の増幅が見られ *car1* Δ/*car1* Δ株である事が確認された株(赤枠)のうちサンプル番号 1~3 までを K6GE*car1*p-1~3、K7 GE*car1*p-1~3、K9 GE*car1*p-1~3、K10GE*car1*p-1~3 として分離し、図にそれらの泳動写真を抜粋して記載した。親株である K6、K9、K10 は 1757 bp のフラグメントを増幅する比較対象として用い、コロニー溶液を希釈したものも併せて用いた。M と記載したレーンにはマーカーを流した。

C) *car1* Δ/*car1* Δ株の *CARI* donor DNA 挿入領域付近のシーケンス結果。PCR で *CARI* 遺伝子の破壊が確認された株(K6GE*car1*p-1~3、K7 GE*car1*p-1~3、K9GE*car1*p-1~3、K10GE*car1*p-1~3)の *CARI* donor DNA 挿入領域付近を PCR primer *CARI*-F、PCR primer *CARI*-R を用いてシーケンスした。Expected sequence には *CARI* donor DNA 挿入領域とその付近のリファレンス(K7)の配列を用いた。

D) K6GE*car1*p-1、K7 GE*car1*p-1、K9GE*car1*p-1、K10GE*car1*p-1 のプラスミドドロップ結果。K6GE*car1*p-1、K7GE*car1*p-1、K9GE*car1*p-1、K10GE*car1*p-1 について *awa1* Δ/*awa1* Δ株と同様の方法にてプラスミドドロップと選択を行った。YPD プレートで生育し YPD+G418 プレートで生育しなかったコロニーをプラスミドドロップの成功株として(-p)と記した。また、プラスミドドロップ前の K6GE*car1*p-1、K9GE*car1*p-1、K10GE*car1*p-1 をポジティブコントロールとして用い、親株(K6、K7、K9、K10)はネガティブコントロールとして用いた。

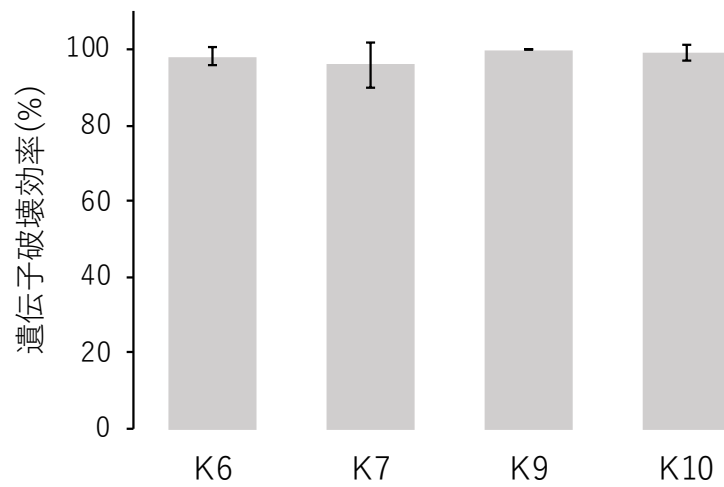


Figure 11. *car1* Δ /*car1* Δ 株取得の際のゲノム編集効率

K6、K7、K9、K10 由来の pCAS-Pro-CAR1 プラスミドの形質転換体からそれぞれランダムに 20 コロニーをサンプリングして PCR による *CAR1* 遺伝子の破壊確認を行った。そのうち *CAR1* 破壊が確認された株の割合からゲノム編集効率を求めた。(n=5)

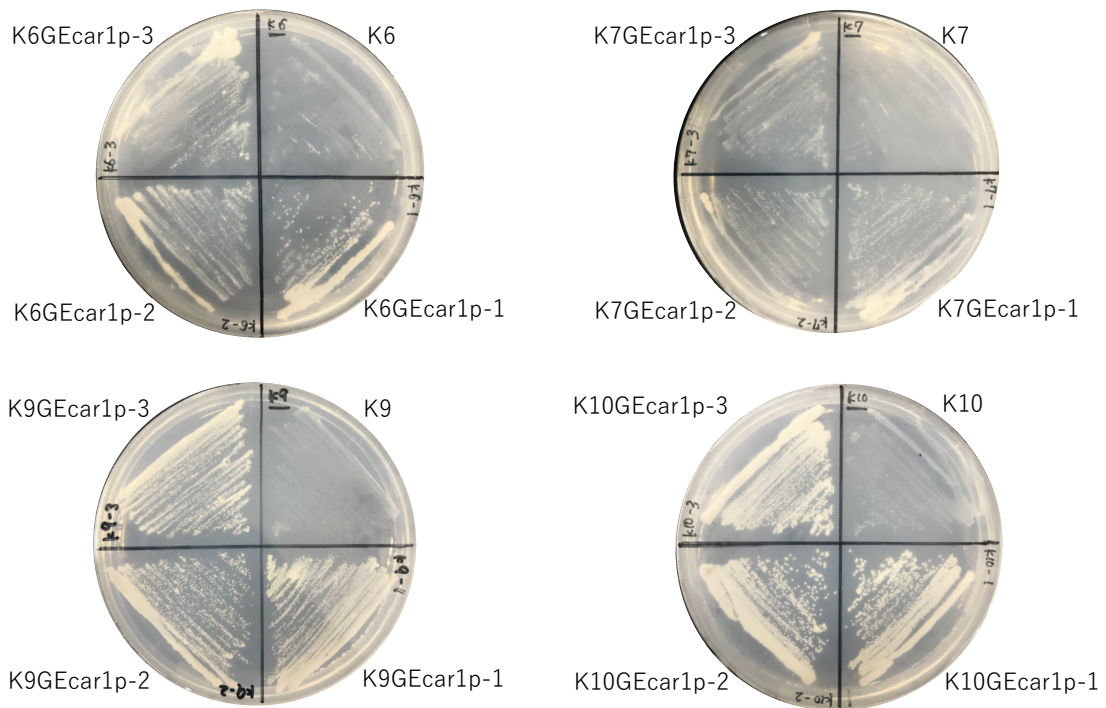


Figure 12. CAO 培地による *car1Δ/car1Δ* 株の表現型確認

CAO 培地で *car1Δ/car1Δ* 株 (K6GEcar1p-1~3、K7GEcar1p-1~3、K9GEcar1p-1~3、K10GEcar1p-1~3) と親株の表現型の比較を行った。CAO 培地に CRISPR-Cas9 システムを用いて得られた *car1 Δ /car1 Δ* 株 (K6GEcar1-1、K7GEcar1-1、K9GEcar1-1、K10GEcar1-1) とその親株 (K6、K7、K9、K10) をストリークし 30°C で 3~4 日間培養し、各株の生育を確認した。親株である K6、K7、K9、K10 はネガティブコントロールとして用いた。

謝辞

本研究の遂行及び本論文をまとめるにあたり、指導教員の東京大学大学院新領域創成科学研究科 大矢禎一教授には、大学院生活を通じて常に懇親なご指導を賜りました。厚く御礼を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、有益な助言や激励を下された同研究科 鈴木邦律准教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、小仕込み試験、その生成酒の成分分析および全ゲノムシーケンスにおける実験手法とデータ解析を共同で行い手厚いご指導を下された酒類総合研究所の赤尾健博士に深く感謝申し上げます。

また、小仕込み試験とその生成酒の成分分析実験を共同で行い助力を頂いた酒類総合研究所の周延氏をはじめの研究室のメンバーの皆様に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、統計解析、研究の進め方および修士論文の指導など、様々な助言をして下さった大貫慎輔特任助教授に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、実験方法や修士論文の指導など、様々な助言をして下さった平田恵理氏に深く感謝致します。

また、研究を通して議論にお付き合い頂き、研究生活を支えて頂いた生命応答システム分野の皆様に感謝致します。

最後に、研究活動を陰ながら支えて下さった家族の皆様に感謝致します。