

令和6年度
清酒酵母・麴研究会
講演要旨集

日時 令和6年10月7日（月）
会場 北とぴあ 第1研修室
東京都北区王子1丁目11番1号

清酒酵母・麴研究会

プログラム

- 13:10～13:40 三重県清酒酵母の開発及び県開発酵母を活用したブランディング戦略
三重県工業研究所 丸山 裕慎
- 13:40～14:10 清酒酵母の醸造特性に寄与する遺伝子の効率的同定法に関する研究
(独) 酒類総合研究所 金井 宗良
- 14:10～14:40 自然界から分離した麹菌を用いた「完全自県産清酒」の取り組み
(地独) 岩手県工業技術センター 佐藤 稔英
- 14:40～15:00 ～休憩～
- 15:00～15:30 麹菌の未来を創るために～麹菌のゲノム編集技術の開発と応用展開～
(独) 酒類総合研究所 織田 健
- 15:30～16:35 特別講演：焼酎酵母育種法の検討
鹿児島大学農学部焼酎・発酵学教育研究センター 玉置 尚徳

三重県清酒酵母の開発および県開発酵母を活用したブランディング戦略

三重県工業研究所 食と医薬品研究課
主任研究員 丸山裕慎

1. はじめに

天照大御神が祀られている「神宮（伊勢神宮）」が鎮座する三重県では、古くから神宮参拝による人の往来があり、一説によると平安時代から清酒醸造が行われていたとされている。江戸時代には全国各地より参拝客が伊勢を訪れるようになり、「一生に一度はお伊勢さん」という言葉が生まれるほど、神宮への参拝旅行は当時の庶民の憧れであった。伊勢に到着した参拝客は、伊勢志摩産のアワビやタイを使った和食のフルコースと、伊勢地域で醸造された酒による歓待を受けていたとされ、三重の酒が食中酒として発展してきたことが伺える。神宮を取り巻く神宮林がまさにそうなのだが、三重県の県土の65%を山林が占め、国立公園（国定公園）の指定を受けた自然林等が広がっている。この自然の恩恵を受け、三重県には海の幸から山の幸まで、豊富な農水産物を特産品として有している。また、豊かな水源林により涵養された三重県の水は良質な軟水で、酒造用の仕込み水として非常に適性が高く、きめ細やかでまろやかな味わいの酒に醸し上がるといわれている。

2. 三重県清酒酵母の開発経緯

三重県では、清酒醸造用として、県独開発の清酒酵母を5株分譲している。1990年代はじめに、酢酸イソアミルが華やかで低酸性を特徴とした吟醸酒向きの酵母として開発されたMK1を皮切りに、1990年代後半のリンゴ酸高生産酵母の開発ブームの際に、リンゴ酸高生成の特徴を有したMLA12が、全国で香り系酵母が開発されるタイミングで、カプロン酸エチルの高生成を特徴としたMK3が開発された。その後、食中酒を意識して、コハク酸を特徴とした純米酒用の酵母であるMK5を2012年に開発し、2016年にはMK5を親株としてセルレニン耐性株を選抜し、吟醸香とコハク酸を特徴としたMK7を開発している。それぞれの酵母の開発時期を鑑みるに、酒造業界の流行を敏感に察知し、追随して清酒酵母の開発をしていることから、三重県酒造組合との連携がしっかりとれていたことが伺える。また、MK5やMK7などは、三重県が誇る豊富な農水産物とのペアリングを意識し、「食中酒の開発」や「飲料シーンの提案」を狙ったシーズ型の育種開発であり、積極的に業界支援が行われていたと推察できる。

3. GI三重で「三重県清酒酵母」を軸に据えるために

近年、国税庁の支援の下、地理的表示（GI）保護制度を活用した、地域ごとの清酒のブランディングが促進されている。三重県では2020年にGI三重の指定を受けたが（県単位の指定では山形県に次ぐ2例目）、2024年9月時点で、清酒のGIは全体とし

て 17 例あり、県単位で指定を受けているものが 9 例ある。これらは今後も増加していくことが予想されることから、GI の指定を得るだけでなく、その他の GI と差別化することが重要となる。清酒の香味は酵母の代謝物に由来するところが大きいことから、地域独自開発の清酒酵母の独自性を明確にできれば、GI の差別化につながり、ひいては地域ブランドとしての価値向上につながる。しかしながら、三重県清酒酵母 5 株のうち、3 株がもろみ取りにより開発されており、そもそもの遺伝的背景すら不明であった。その為、GI 三重のストーリー強化のために、三重県清酒酵母 5 株について全ゲノム解析による遺伝的背景の確認、ならびに全国で手に入る優良清酒酵母「きょうかい酵母」との醸造特性の差別化を行い、GI 三重を支える三重県清酒酵母の醸造特性を明確にした。

4. ビール醸造用に最適化したビール醸造用三重県清酒酵母 BMK3 の開発

近年、日本国内でもクラフトビールが伸びており、ブルワリー数は約 800 件に到達した。しかしながら、日本国内のクラフトビール消費量は少なく、海外市場の大きさを見ると、国産クラフトビールの海外輸出に期待が寄せられる。現状、日本オリジナルのビアスタイルが確立されていないことから、「日本独自」と強く主張できるビールを創出することが輸出への課題である。その為、三重県清酒酵母 MK3 からビール醸造に最適化したビール醸造用の三重県清酒酵母 BMK3 を開発し、カプロン酸エチルを特徴とした新規日本オリジナルビアスタイルの創出に着手した。カプロン酸エチルを特徴としたビールは既存のビアスタイルに無いため、非常にオリジナリティが高い。また、清酒酵母は日本で独自の選抜を経てきており、世界で流通しているビール酵母とは酒質もストーリー性も大きく異なることから、日本の独自性を強く主張できるメリットがある。BMK3 で醸造したビールは、「華やかな吟醸香を特徴とし、甘みがありながらすっきりキレがある」という酒質を示し、既存のビアスタイルとは異なる独自性を有した新規日本オリジナルビールであることが示された。

5. おわりに

醸造技術や醸造関連機器が成熟してきた現代において、清酒は非常に高品質化されたといわれている。また、SNS の発達や蔵人同士の交流も活性化したことにより、情報の地域差が小さくなったことから、酒質の均質化も生じてきている。販売促進を考えると、品質のみを追求する時代ではなく、消費者に選ばれるための理論構築やブランド価値の創出がより一層重要になったと感じる次第である。このような時代において、公設試の研究はどうあるのが最適なのか？そもそも新規の県酵母の開発は必要なのだろうか？時代に即し、かつ、時代を先取るためにも、広い視野と深い洞察を磨いていきたい。

清酒酵母の醸造特性に寄与する遺伝子の効率的同定法に関する研究

独立行政法人酒類総合研究所

醸造微生物研究部門

主任研究員 金井 宗良

酵母は単細胞・真核微生物だが非常に多様性をもつ微生物である。例えば酒類製造に良く用いられる醸造用酵母（清酒酵母、焼酎・泡盛酵母、ビール酵母、ワイン酵母など）は各々が特徴的な遺伝子・変異を有するため、様々な酒類の製造を可能としている。近年の酒類産業の潜在的ニーズとして「酒質の多様性」が挙げられ、特に清酒品質の多様性を生むためには清酒酵母の特性がより多様化することが重要である。従って「清酒酵母の多様性」を実現させるためには、清酒製造により適した又はさらに優れた醸造特性を付与させたり、特定の清酒成分のみを増減させることが可能となる標的遺伝子・変異を効率的に選択することが非常に重要である。

そこで、本研究では、清酒醸造に適した酵母である清酒酵母に着目し、清酒酵母の醸造特性に最も寄与する遺伝子・変異の同定をより効率化させる解析手法の構築を目指した。

1. 既存 QTL 解析系の改良（遺伝子型値）及び表現型値の収集

QTL（量的形質遺伝子座）解析とは、ある表現型に寄与するゲノム上の QTL の位置を特定する為に、解析に用いる分離株の表現型値と染色体上の DNA 多型（DNA マーカー）との連鎖を利用する遺伝統計学的手法のことである。これまでに当研究室では、きょうかい清酒酵母 7 号酵母の一倍体株（K7H868a）と実験室酵母一倍体株（X2180-1B）との交配によって得られた F1 株由来の孢子分離一倍体株（F1 分離一倍体株）100 株及びその反復配列を利用した DNA サテライトマーカー（125 個）を用いて、遺伝型情報と表現型情報を連鎖させる QTL 解析系を既に構築している¹⁾。実際に、清酒酵母の特徴の一つである機能成分 *S*-アデノシルメチオニン及び葉酸高蓄積に寄与する遺伝子として *ERC1* を同定している^{2,3)}。しかし、これら既存の系には、非常に重要な問題点がある。QTL 解析に用いる F1 分離一倍体株及び DNA マーカーの数が非常に少なく、QTL 解析によるマッピング結果の検出力及び分解能が明らかに不足しているため、目的の形質（表現型）に寄与する QTL が同定できたとしても、その QTL の位置に含まれる遺伝子は数百個存在することがあり、目的の表現型に最も寄与する真の遺伝子・変異の同定が非常に困難であった。

そこで、本研究では、まず QTL 解析に用いる F1 分離一倍体株を 100 株から 400 株に増やし、F1 株の親株である K7H868a 株と X2180-1B 株について全ゲノムシーケンス（NGS）による比較ゲノム解析を行い、50,962 個の一塩基多型（SNP; Single

Nucleotide Polymorphism) を検出した。次に DNA マーカー数の増加を目的に、F1 分離一倍体株 400 株全てについても NGS を行い、各 398 株 (未解析の 2 株を除く) のゲノム SNP 情報及び組換えパターンを考慮し、全 50,962 個の SNPs の中からゲノム全域 (約 12 Mbp) に均一かつ密に約 3 kb ごとに 5,267 か所 SNP マーカーを設定することで、新たな改良型 QTL 解析系を構築した。また、解析に必要な表現型情報収集のため、F1 株一倍体 400 株での清酒小仕込み試験 (総米 100 g) を実施し、表現型情報となる製成酒の各種成分を分析した。

2. 改良型 QTL 解析系を用いた清酒酵母の醸造特性に寄与する遺伝子の効率的同定

改良した QTL 解析系を用いて、清酒製成酒のエタノール濃度に寄与する遺伝子の同定を試みた (図)。QTL 解析によって同定された QTL 領域に存在する 12 個の候補遺伝子について、実験室酵母一倍体の該

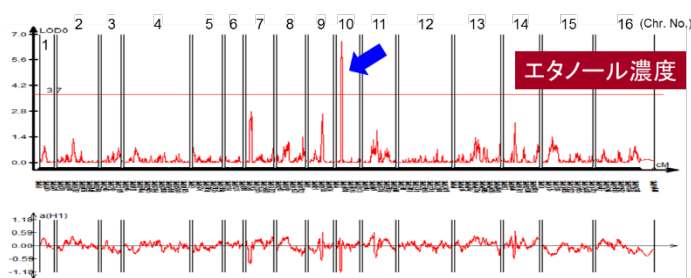


図 改良QTL解析系を用いたエタノール発酵濃度のマッピング

当遺伝子を清酒酵母型に置換した遺伝子置換株を造成し、清酒小仕込み試験にて製成酒のエタノール濃度を分析した。結果、浸透圧ストレス (高等濃度、高塩濃度) 下で活性化するキナーゼ経路の主要因子である遺伝子の置換株のみ、親株と比較してエタノール濃度が顕著に減少した。以上より、改良した QTL 解析系を用いて、清酒製成酒のエタノール濃度に寄与する原因遺伝子を効率的に同定できたことから、本研究における改良型 QTL 解析系の遺伝子マッピング系としての有用性及び実用性の向上が示唆された。

【参考文献】

- 1) Katou T, Namise M, Kitagaki H, Akao T, Shimoi H (2009) QTL mapping of sake brewing characteristics of yeast. *J Biosci Bioeng* 107:383-93.
- 2) Kanai M, Kawata T, Yoshida Y, Kita Y, Ogawa T, Mizunuma M, Watanabe D, Shimoi H, Mizuno A, Yamada O, Fujii T, Iefuji H (2017) Sake yeast YHR032W/ERC1 haplotype contributes to high S-adenosylmethionine accumulation in sake yeast strains. *J Biosci Bioeng* 123:8-14.
- 3) Kanai M, Kawata T, Morimoto T, Mizunuma M, Watanabe D, Akao T, Fujii T, Iefuji H (2020) The sake yeast YHR032W/ERC1 allele contributes to the regulation of the tetrahydrofolate content in the folate synthetic pathway in sake yeast strains. *Biosci Biotechnol Biochem*. 84:1073-1076

自然界から分離した麹菌を用いた「完全自県産清酒」の取り組み

地方独立行政法人岩手県工業技術センター 佐藤稔英

【緒言】

「一麹二酛三造り」の言葉通り、麹は米を溶解して酵母が健全に発酵するための栄養源を供給する重要な役割を持つ。製成酒の品質には表れにくいものの芯となる骨格を形成し、味に深みを与えている。この麹の元になるのが麹菌 (*Aspergillus oryzae*) であり、一般的には日本全国にある種麹メーカーがその豊富な菌株ストックの中から、酒造メーカーが望む麹菌を供給している。各県において独自の乳酸菌や酵母の開発などが行われ商品の差別化・高品質化が図られているが、麹菌の開発事例は非常に少なく、これは優秀な種麹メーカーが複数存在するため特に新規な麹菌を開発する必要が無かったためである。また、安全性の担保や品質管理・流通管理など、開発以降の普及段階での問題点を考慮すると、県単独での開発は非常に困難である。

岩手県でも長らく県独自の麹菌は存在しなかったが、2011年の東日本大震災を契機として被災者追悼および津波により被災した沿岸3社の早期復旧・復興を祈念した「材料全てが岩手県産の清酒造り」の機運が高まり、独立行政法人酒類総合研究所と株式会社秋田今野商店の協力の元、麹菌「黎明平泉」を市販化した。しかし、黎明平泉の選抜は非常にタイトな期間で試験・実用化する必要があったため、菌株は分譲を受けていた。結果的に目標はクリアできたものの、開発担当者としては「いつかは分離元も岩手県産の麹菌を」との思いを抱いていた。2017年、岩手県は6月上旬および8月下旬に低温寡照に見舞われ、稲の生育に影響を及ぼす懸念があり酒造好適米の栽培調査を行っていたところ、12枚の圃場で稲麹病を発症している稲体を発見した。稲麹の発生は一般に低温、日照不足、多雨条件下で発生しやすいことが知られているが、過去の報告では稲麹から麹菌を分離した例がある。そこで、1885年に上梓された「通俗製麹方要訣」に基づいて稲麹病粒から麹菌の分離を試みた。

【開発】

通俗製麹方要訣によれば、①檜葉、椿葉、綿殻、菊等から灰を作る②蒸米の上一面に篩をかけて灰をまぶす③冷ましてすり潰した迎種をよく混ぜて包み上げる④品温・湿度を保って二昼夜を過ぎて米粒が深緑色になったら粒を分ける⑤さらに三昼夜をかけて緑黄色の種麹となる、とある。そこで、岩手県内で椿が自生する気仙地域で椿葉柴を集めて蒸し焼きにし、100メッシュの篩に掛けて乾熱殺菌した灰を準備した。蒸米は精米歩合97%に調整した結の香を洗米せずに1晩吸水させ、そのまま蒸きょうしたものをを用いた。白米重量に対して1wt%の灰をまぶして良く混和し、放冷した。0.5wt% Tween80 溶液 1 mLに対して稲麹病粒 1 粒を入れて良く分散させた液体をアトマイザーで白米に吹きかけ、滅菌処理したジップロックコンテナに50 gずつ取り分けて38℃に培養庫に静置した。培養後24時間で黄麹菌様の菌糸が見え始めた米粒を40mmシャーレに取り分け、湿度を与えながらさらに120時間培養を進めて、米粒92粒で分生子を形成させた。12枚の圃場から集めた稲麹にそれぞれ同様の処理を行ったが、黄麹菌様の菌糸が形成されたのは内4枚の圃場から得られた稲麹だった。黄麹菌様の菌糸が形成されなかった場合、もしくは増殖が極端に遅い菌だけがいる場合には他のカビ類が優占種となったと考えられた。

得られた92粒の米粒に形成された分生子の単菌分離及び純化を進める目的で、単コロニーをPDA培地に出現させた。またこれを1株当たり20回繰り返して、分生子色調、コロニー径、アスペルジラ、分生子形成構造、分生子柄、明培養・暗培養のコロニーの色調等を都度確認して、途中で株の特徴が変化した株を棄却し34株を選抜した。この34株はアンモニアガス接触による色調変化により簡易的には全ての株でアフラトキシン不検出であった。その後、ジャイアントコロニーから分生子を得てシャーレ製麹を行って酵素生産性を検討した結果、グルコアミラーゼ活性が高く、酸性カルボキシペプチダーゼ活性が低い「No. 36株」と、 α -アミラーゼ活性が高い「吟1061株」の2種が市販株と比較して特徴的な酵素生産性を示した。また、この2株はチロシナーゼ活性が中程度で、灰を使用しない状態での分生子形成量も実用株として十分だったため、この2株を選抜した。この2株は外部機関に依頼し、菌種同定を行った結果、いずれも *A. oryzae* と同定された。また、簡易製麹した米麹のアフラトキシン含量を外部機関で定量した

結果、両菌で製麹された米麹からアフラトキシンは検出されなかった。

【試験醸造】

選抜した2株を㈱秋田今野商店で粒状種麹化していただき、岩手県内の使用希望のあった酒造メーカーで試験製麹（No. 36は56回、吟1061は25回）および試験醸造を行った。その結果、酵素力価は選抜時の特性を維持し、いずれも清酒醸造に問題のないレベルの力価が得られた。

試験製麹終了後、新規麹菌を使用した酒造メーカーの麹担当者へアンケート調査を行ったところ、2株ともに分生子量の少なさに不安を感じるケースやこれまでの市販株と違い特徴的な香りがする、との報告が多く寄せられた。一方で、比較的短時間での製麹となることについては評価が高く、品温経過に関しても仲仕事以降の温度張りが強く作りやすい、酵素力価も良好と考えている、との結果が得られた。

試験麹菌を使用した製成酒は、令和2年度の岩手県新酒鑑評会、全国新酒鑑評会、南部杜氏自醸清酒鑑評会にそれぞれ出品された。その結果、いずれの鑑評会においても金賞・入賞を獲得し、特に南部杜氏自醸清酒鑑評会では3社が上位入賞を果たすなど、使用に不慣れな状況の中で非常に良好な結果が得られた。

以上の様に選抜した2株は市販菌株とは明らかに異なる特徴的な性質を有しているだけでなく、良質な清酒製造が可能であることが判明した。そこで令和3年度より㈱秋田今野商店からNo. 36は「Roots36」、吟1061株は「Oriza1061」の名称で全国の酒蔵向けに販売が開始された。現在、岩手県内のほぼ全てのメーカーが、吟醸酒系、純米酒系で使用しており、分離元も含めた岩手県オリジナル麹菌の普及が進んでいる。これに岩手県オリジナルの酒造好適米「吟ぎんが」「ぎんおとめ」「結の香」及び清酒酵母「ジョバンニの調べ」「ゆうこの想い」等を組み合わせることで念願であった「完全自県産清酒」が完成した。今後、地理的表示（GI）岩手清酒に設定されたオールいわて清酒などとして広く普及することを期待したい。

表1 シャーレ製麹による酵素力価

| 菌株名 | α -アミラーゼ (U/g・麹) | グルコアミラーゼ (U/g・麹) | 酸性カルボキシペプチダーゼ (U/g・麹) | 和シラーゼ (U/mL) |
|--------|----------------------------|---------------------|--------------------------|-----------------|
| 市販品A | 1558 | 622 | 5605 | 0.082 |
| 市販品B | 1251 | 244 | 4542 | 0.017 |
| 市販品C | 1514 | 617 | 4550 | 0.085 |
| 市販品E | 1770 | 233 | 3931 | 0.011 |
| 黎明平泉 | 1400 | 161 | 4927 | 0.007 |
| No.36 | 1349 | 719 | 2568 | 0.039 |
| 吟_1061 | 2456 | 406 | 4132 | 0.021 |

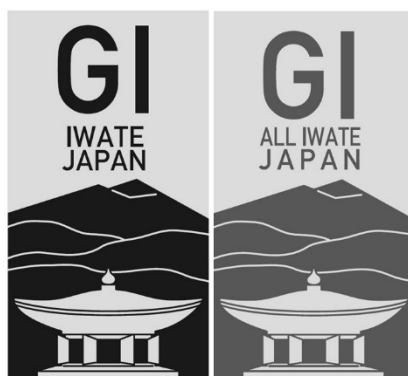


図1 GI岩手とGIオールいわてのロゴマーク

麴菌の未来を創るために～麴菌のゲノム編集技術の開発と応用展開～

独立行政法人 酒類総合研究所
主任研究員 織田 健

Cas9 直接導入による麴菌のゲノム編集技術の開発

麴菌は、日本の醸造・発酵産業に深く関わり有用菌株が求められているが、多核、交雑が出来ない等の理由により育種が非常に難しい状況にあった。そのような困難を打ち破ったのが、Cas9 によるゲノム編集である。本講演では、当所で開発しているゲノム編集育種技術とその応用例について概説する。

黄麴菌では、東京大学の片山らによりプラスミドで導入された Cas9 および sgRNA を発現する系でゲノム編集が出来ることが初めて報告されたのを皮切りに、以降、プラスミドで発現した TALEN、Cas12 (Cpf1) でのゲノム編集の成功も報告された²⁾。一方で我々は、産業利用の観点から、Cas9 酵素及び sgRNA の複合体 (RNP) のみを直接導入しゲノム編集する系を検討した。pyrG を破壊するゲノム編集を実施したところ、1 残基の欠失や 1kb ほどの欠失など多様な変異を持つ株が得られ、RNP 直接導入によりゲノム編集が実施出来ることが示された。さらに産業上使用されてきた多様な麴菌について同手法を適用したところ、効率は違えどもゲノム編集が実施出来ることが示され、プロトプラスト-PEG 法が適用できる糸状菌で汎用できることが考えられた。また、Cas9 以外にも、dCas9、Cas9::RFP、Cas12(Cpf1) などでも同様に直接導入でゲノム編集に成功し、酵素を変えることで多様なゲノム編集を起こせることが示された。Cas9 により遺伝子ターゲティングが出来ることから、アームなしのマーカのノックインによる遺伝子破壊を検討したところ、高い確率で実施出来ることが示された。通常のノックインでは遺伝子マーカが使用され、育種を希望する株それぞれのマーカ破壊株 (宿主) をあらかじめ準備する必要がある。そこで、複数の sgRNA の導入で多重破壊が出来るメリットを活かし、マーカ及び目的遺伝子に対する sgRNA を導入し、マーカによる選抜を行うことで目的遺伝子の破壊を達成する共ゲノム編集を wA と pyrG の同時破壊により実証した³⁾。この技術開発により市販の Cas9 と目的とするターゲットの sgRNA を購入することで自前の産業株に対して、直ちにゲノム編集が実施出来ることとなった。さらに、共ゲノム編集の技術を応用し、コウジ酸などの麴菌の 2 次代謝物生産性の制御を主眼として、遺伝子組換えで汎用される一般的な手法である遺伝子破壊、ノックイン、相同組換え、小規模欠失、大規模欠失を実施し確認したところ、いずれも効率よく実施出来ることが示された⁴⁾。

共ゲノム編集による細胞内ノックイン

共ゲノム編集技術を開発している過程において、遺伝子破壊を行うために切

除した断片がマーカーとしている遺伝子領域内に挿入、あるいは切断部位で逆に挿入されている現象を見出していた。これまで麴菌の遺伝子組換え系では非相同末端結合による修復能が高いことから破壊コンストラクトが目的外に挿入されターゲティングを妨げていたが、コペルニクスの発想の展開にて逆にその性質を意図的に利用することを考えた。つまり、共ゲノム編集により細胞内の特定の配列を切り出し、他の部位に挿入する細胞内ノックインが可能なのではないかと考えた。そこで、まずは遺伝子組換え系にて *pyrG* のプロモーター領域を切除した株を構築し疑似的な *pyrG* 破壊株とした。次に共ゲノム編集により *amyB* プロモーターを切り出し、*pyrG* プロモーター領域に挿入を図った。数少ないものの挿入株が取得され、C 源に依存した生育を示し、細胞内ノックインが実施出来ることが示された。さらに、実用株に対して、固体培養特異的なアミラーゼ *glaB* のプロモーター領域に *amyB* プロモーターを細胞内ノックインしたところ、液体培養条件で 26 倍、米麴の固体培養条件下で約 2 倍のグルコアミラーゼ活性上昇を示し、実用面でも応用が可能であることが示された。

現在、麴菌のゲノム編集のための技術開発を継続しており、連続した共ゲノム編集を可能とする育種用マーカーの拡充や全ゲノムシーケンスによるオフターゲット解析の実施などを行い、ゲノム編集育種のための基盤を整えている状況である。

次世代の麴菌

約 150 年前に麴菌が純粋分離され研究が萌芽し、約 30 年前に形質転換系が開発されることで研究が加速し、麴菌の分子生物学的な知見が蓄積されてきた。開発したゲノム編集技術を利用することにより、過去の研究成果が実用されることに繋がって行く。今後は、ゲノム編集育種により麴菌の潜在的な能力が花開き、パブリックアクセプタンスの状況に対応しながら麴菌のさらなる利活用が拡がることが期待される。

本研究の一部は、JST 産学共創プラットフォーム共同利用推進プログラム (OPERA) および共創の場形成支援プログラム (COI-NEXT) コンソーシアムでの研究成果である。

引用文献

- 1: T. Katayama *et al.*, *Biotechnology Letters*, 38(4), 637-642(2016)
- 2: O. Mizutani *et al.*, *J. Biosci. Biotechnol.*, 123(3), 287-293(2017)
- 3: 特許6994730、特許7141648
- 4: 織田健、温古知新, 60, 29-35(2023)

焼酎酵母育種法の検討

玉置 尚徳（鹿児島大学 農学部 焼酎・発酵学教育研究センター）

焼酎は、サツマイモ、大麦、米、そば、黒糖などを原料とする蒸留酒である。焼酎製造の発酵は、清酒醸造と同じく麹菌による糖化と酵母による発酵が同時に並行して行われる並行複発酵である。しかしながら多くの芋焼酎の製造はサツマイモの収穫時期（8～12月）に限定されるため、清酒醸造と比べて高い温度で発酵が行われる。そのため焼酎製造では、雑菌混入による腐造を防ぐ目的で多量のクエン酸を分泌生産する麹菌（黒麹菌、白麹菌）が用いられ、酵母は酸耐性で高温での発酵性に優れたものが用いられている。焼酎酵母に関しては、これまでにその分類や性質に関する報告は少なく、育種法に関してもほとんど報告されていない。本講演では、一般的な焼酎酵母の性質と共に、我々が検討した焼酎酵母の育種法について紹介する。

焼酎酵母は2倍体である。そのため相同染色体の対立遺伝子の一方に変異が生じても形質として表れにくく変異株の取得は困難であるとされてきた。我々は、LOH (Loss of Heterozygosity: ヘテロ接合性消失) を利用した焼酎酵母遺伝子破壊システムを構築した。LOHとは、2倍体株の相同染色体間での組み換えにより、ヘテロな遺伝子座位がホモに置き換わる現象のことである。

本システムで用いる破壊カセットは *LYS5* の両側にオーバーラップする領域を持たせて二分割した *ura3-5'* と *ura3-3'* 断片を付加し、さらに分割した *ura3* の両方の外側に相同な配列をもたせるよう設計した。本破壊カセットをターゲット遺伝子 (*LEU2*) の配列を付加したプライマーでPCR増幅し、焼酎酵母 (*ura3Δ/ura3Δ lys5Δ/lys5Δ* 株) を形質転換し、-Lys 最小培地にて一方の目的遺伝子が破壊された株を取得し、その株を YPD 培地で培養を行うことで対立遺伝子における LOH を誘導し、さらに両端の *Ura3* 遺伝子のオーバーラップする領域間でループアウトが起こることによって一方の *LYS5* 遺伝子が除去され *URA3* 遺伝子が復活する株を、-Lys-Ura 最小培地により選択することで *LEU2* の2重破壊株を取得した。また、破壊カセット内に2カ所ずつ配置した相同な配列間でのループアウトを利用することで、遺伝子破壊に用いた破壊カセットを除去し、さらに *ADE2* の2重破壊株を取得することにも成功し、同じ破壊カセットを用いた繰り返し利用可能な遺伝子破壊システムの構築を行った。(J. Biosci. Bioeng., 137, 31-37 (2024))

また、焼酎酵母は高い孢子形成能を有するものの、ホモタリックであることから交配させるのが困難と考えられたが、マイクロマニピュレーターを用いて孢子を隣接する顕微接合法による育種についても紹介する。

