

新規ゲノム編集技術を用いたカプロン酸エチル高生産酵母の取得

SATテクノロジー・ショーケース2025

■ はじめに

日本酒は古来より日本人が嗜好してきたアルコール飲料であり、料理にも使われるなど日本人にとってなじみ深いアルコール飲料である。日本各地でも地元の水源や原料である米を使用して日本酒を製造し、地域特産のブランド日本酒として販売されている。日本酒の香りは、ビール、ワイン、ウイスキーなどの他のアルコール飲料とは明確に異なった特徴を有している。そのため、海外においても日本酒の魅力は和食ブームとともに広まっている。日本酒には多くの味と香りの成分が含まれており、特に香りは日本酒の印象を決める重要な要素である。様々な香りの中でも吟醸香はエステルを主体としたフルーティーな香りであり、この吟醸香はリンゴ様の香りのカプロン酸エチルとバナナ様の香りの酢酸イソアミルが主成分である。日本酒の主原料は米、水、米麹であるが、香りや味に大きな特徴のない米を原料とするため、清酒酵母が発酵醸造中に生成する香気に大きく依存している。日本酒の風味を向上させるために、数多くの酵母菌株が研究されてきた。カプロン酸エチル高生産酵母もその中のひとつである。

カプロン酸エチルはエタノールとカプロン酸(C6中鎖脂肪酸)から生成される。酵母の脂肪酸合成経路においてカプロン酸は、アセチルCoA、マロニルCoA、NADPHから合成される。脂肪酸合成反応により生成する脂肪酸は、通常パルミチン酸(C16)やステアリン酸(C18)が主体であり、他の脂肪酸の生成量は少ない。しかし、この反応で生成する脂肪酸の組成は種々の条件で変化するため、日本酒の醪の状態によって生成するカプロン酸の量が変化し、その結果としてカプロン酸エチルの生成量にも大きな影響を与えている。カプロン酸エチルを高生産化する因子としては脂肪酸生合成系のFAS2遺伝子の変異が挙げられ、代表的な変異点は1250番目のアミノ酸であるグリシン(G: glycine)のセリン(S: serine)への変異(G1250S)がある。この変異株は中鎖脂肪酸に類似の構造を持つセルレニンを、脂肪酸合成酵素の阻害剤として用いることで取得される。

実用レベルではEMSやUV照射で突然変異を起こす変異処理によりカプロン酸高生産酵母が育種されてきた。しかしながら、これらの変異導入法は多数の変異が入る、プリン、ピリミジン塩基間の置換しか起こらない。本研究では、核酸のみの導入で目的の変異を狙った個所のみ変異を起こすことができる新規ゲノム編集技術[1]によってG1250S変異を持つカプロン酸エチル高生産酵母の取得を試みた。

■ 活動内容

1. 新規ゲノム編集技術を用いたK7変異株の取得

●セルレニン耐性株の単離

今回使用した酵母はきょうかい7号(K7)株を使用した。2mLのYPD液体培地で前培養していたK7株をOD₆₀₀が0.3になるようにYPD液体培地に添加し、振とう培養した。培養後に集菌し、目的の配列を含んだオリゴDNAを酵母細胞に導入した。酵母液を7.5μMのセルレニンを含むYPD寒天培地に塗布し、30℃で5日間培養した。

単離された耐性株を再び同濃度のセルレニン入りYPD寒天培地に植菌し、生育の良い変異体の一つ選択した。この変異体をK7CG1株とした。

●シーケンス解析

K7CG1株のゲノムDNAに存在するFAS2遺伝子のシーケンス解析を行うことによって、この酵母株はヘテロ接合性の点変異を有しており、FAS2^{G1250S}変異が入っていることが確認された。

●セルレニン耐性評価試験

続いて、K7CG1株のセルレニン耐性評価試験を行った。YPD液体培地で前培養したK7株(親株)とK7CG1株を、セルレニンを含むYPD液体培地に添加した。30℃で一晩静置培養し、翌日生育状況を確認した。その結果、K7株のIC₅₀値は1.6μM、K7CG1株のIC₅₀値は18.9μMとK7CG1株はK7株に比べて高いセルレニン耐性を示した。

2. 醸造試験

K7CG1株の発酵特性を調べるため、K7株をコントロール株として醸造試験を行った。精米歩合70%のα化米120g、麹30g、水240ml、乳酸800μLを用いた。酵母はYPD液体培地で2日間振とう培養し、洗浄したものを添加した。醸造は15℃で行い、発酵の進行はCO₂の放出量を測定することによって確認した。発酵後、もろみを遠心分離し、上清を清酒として回収した清酒中の香り成分の測定をGC-MSを用いて行った。K7CG1株はK7株と比べてカプロン酸エチルが2倍生成されていることが確認された。

今後、再現性を確認するため、繰り返し醸造試験を進めていきたい。また、異なる箇所に変異を導入した酵母株の作製も試みる。

■ 関連情報(特許関連、施設)

[1]特許公開番号 2022-023037

代表発表者 井上 颯悟(いのうえ そうご)
所 属 近畿大学農学部応用生命化学科
応用微生物学研究室
問合せ先 〒631-0052
奈良県奈良市中町 3327-204
TEL: 0742-43-1894

■キーワード: (1)酵母
(2)ゲノム編集
(3)醸造