

# 新規ゲノム編集技術を用いた 酢酸イソアミル高生産清酒酵母の取得

SATテクノロジー・ショーケース2025

## ■ はじめに

日本酒は 1300 年以上の歴史をもつ日本の伝統的なアルコール飲料であり世界中でも愛飲者が増えている。日本酒は米、水、麹菌 *Aspergillus oryzae*、清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発酵して生産される。日本酒には吟醸香という酵母が生成する成分由来の特有の香りがある。吟醸香の一例としてバナナのような香りの酢酸イソアミルがあげられる。このような香りの変化は発酵に使用される酵母由来のため、香气成分を高生産できる酵母の育種研究が進められている。酢酸イソアミルはイソアミルアルコールから酵母が持つアルコールアセチルトランスフェラーゼ(AATase)を介して生成される。しかし野生型の酵母では *LEU4* 遺伝子がコードする IPMS ( $\alpha$ -イソプロピルリンゴ酸合成酵素)が最終生成物のロイシンによってフィードバック阻害を受け、生合成系のバランスがとられている。しかしIPMSのフィードバック阻害が解除されると、代謝産物のバランスが崩れ、副反応経路から酢酸イソアミルが多量に合成される。酢酸イソアミル高生産株の取得にはロイシンの毒性アナログである TFL (5,5,5-トリフルオロロイシン)が用いられている [1]。TFL 耐性酵母はIPMSのロイシン結合部位に変異を有し、ロイシンが結合できず、フィードバック阻害が解除されている。

従来の育種では UV 照射や EMS 処理などのランダム変異が用いられているため、目的の性質を有する変異株の取得には多大な労力が必要である。本研究では標的箇所のみに変異導入が可能かつ off-target が少ない新規のゲノム編集技術である Sense strand Technology 法(ST 法) [2]を用いて酵母の育種を行った。

## ■ 実験内容

### 1. ST 法による酢酸イソアミル高生産株の創製

きょうかい 7 号酵母(K7 酵母)株へ、IPMS の 551 番アミノ酸であるアデニン (A) をバリン (V) に置換する変異 (A551V) を含むオリゴ DNA で形質転換を行い、TFL 濃度が  $200 \mu\text{M}$  になるように調節した SD 寒天培地に塗布したのち、 $30^\circ\text{C}$  で 5 日間静置培養した。

### 2. 単離株の評価試験

単離した株からゲノム DNA を抽出し、変異点確認を行った。また TFL 耐性を定量的に評価するため、 $100 \mu\text{M}$  ~  $5000 \mu\text{M}$  の TFL を含む SD 液体培地を用いて耐性評価を行った。

### 3. 醸造試験と香气成分分析

単離株と親株である K7 株を用いて醸造試験を行った。 $\alpha$  化米 120g、米麴 30g に、洗浄した酵母液と水を合わせて 240ml になるように加えた。この際、液体の  $\text{OD}_{600}$  が 1.0 となるように酵母液量を調節し、さらに雑菌抑制のために乳酸を  $800 \mu\text{L}$  加えた。2, 3 日ごとに重さを測り、二酸化炭素減少量を確認する。21 日後に遠心分離して上清を回収した。フィルター滅菌を行った後、GC-MS で香气成分を測定した。

## ■ 結果

K7 株に ST 法を用いて A551V の変異を導入し、3 コロニーを獲得した。塩基配列を確認した所、2 つに A551V 変異が確認でき、それぞれ K7TG-2 株、K7TG-3 株とした。この 2 株の薬剤耐性試験を行ったところ、TFL 濃度  $5000 \mu\text{M}$  の培地においても細胞増殖が確認でき、親株 (K7株) と比べ高いアナログ耐性を有することを確認した。醸造試験を行ったところ、二酸化炭素減少量は親株と K7TG-3 株で同等であった。香气成分に関しては、K7TG-3 株は酢酸イソアミルとイソアミルアルコールがともに親株と比べ 2 倍程度増加していた。先行論文では親株と比べイソアミルアルコールが 2.0 ~ 2.6 倍増加し、酢酸イソアミルが 1.9 ~ 3.7 倍増加していた [3]。今後は醸造特性の再現性を確かめるため、繰り返し醸造試験を行うことを予定している。

## ■ 関連情報等 (特許関係、施設)

[1] VR Baichwal *et al* Current genetics, Volume 7, pages 369-377, (1983)

[2]特許公開番号 2022-023037

[3]H Takagi *et al* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Volume 86, Issue 6, June 2022, Pages 755-762

代表発表者 表 宏樹 (おもて ひろき)  
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