

# セルフクロニング法による赤色酵母開発に向けた遺伝子導入効率の改善

SATテクノロジー・ショーケース2026

## ■ はじめに

日本酒は、米、麹菌 *Aspergillus oryzae*、水を原料とし、清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアルコール発酵により生産される日本独自の伝統的な醸造酒である。酵母のアルコール耐性や香気成分の生産能などの発酵特性は、日本酒の品質に大きな影響を与える。そのため、酵母の育種や改良は、清酒の品質向上や特徴のある日本酒の創出において重要な研究対象となっている。近年、健康志向の高まりや飲酒嗜好の変化により、アルコール飲料全体の消費量が減少傾向にある中、清酒業界では伝統を尊重しつつ、多様なニーズへの対応が求められている。

このような背景から、酵母の遺伝子変異を活用した視覚的に特徴のある赤色清酒の開発に着目した。アデニン合成経路を構成する *ADE1* や *ADE2* 遺伝子が欠損すると、酵母はアデニン前駆体である5-aminimidazole ribotide(AIR)を赤色色素として蓄積し、その結果として酵母細胞塊(コロニー)が赤色を呈することが知られている。

従来の酵母育種法では、UV照射やEMS処理等により突然変異を誘発するため、DNA上の変異が無作為に生じて、目的とする形質を持つ個体の獲得に多大な労力が必要である。一方で、ゲノム編集では、DNA上の特定領域を切断・修復することで、狙った標的遺伝子を改変することが可能である。しかし、多くの場合で外来遺伝子の導入を伴うため、外来遺伝子が残存するとGMO規制の対象となる。そこで本研究では、外来遺伝子を導入しないセルフクロニング手法による酢酸リチウム法を用いた相同組み換えの遺伝子導入効率の向上を目的とした。

## ■ 活動内容

### 1. 赤色清酒に向けた *ade2* 変異株の取得

実験室酵母YPH500株のゲノムDNAを鋳型として、*ade2-101* 変異遺伝子を含むDNA断片をPCRにより増幅し、酢酸リチウム法により一倍体の実験室酵母BY4742株への導入を試みた。

前日より一晩培養した酵母を、 $OD_{600}=0.3$ に調整して5 mlのYPD液体培地に添加した。振とう培養を行った後に集菌し、DNA断片10  $\mu$ gを用いて形質転換を行った。細胞懸濁液をSD寒天培地に塗布し、30℃で5日間培養したが、目的とする赤色コロニーは確認されなかった。この結果は、*ade2* 欠損株がアデニン要求性を示すため、増殖速度が低下し、周囲の野生型細胞に生育速度が劣るためコロニーとして出現しにくいことが原因と考えられる。そのため、

導入効率の向上が必要である可能性が示唆された。

### 2. 遺伝子導入効率の向上

#### ● 遺伝子導入効率の評価

酢酸リチウム法を用いた相同組み換えの遺伝子導入効率を定量的に評価するため、選抜マーカー遺伝子 *URA3* を利用した。

*URA3* マーカー遺伝子を含むDNA断片を5  $\mu$ g添加して形質転換を行い、SD-Ura寒天培地およびYPD寒天培地に塗布して、30℃で5日間培養した。遺伝子導入効率は、SD-Ura培地上で生育したコロニー数を、YPD培地(Uraを含む)上の総コロニー数で割った百分率(%)として算出した。

#### ● 形質転換条件の改良

導入効率を改善するため、酢酸リチウム法における酵母細胞の処理条件を最適化した。

酢酸リチウム法におけるDNA導入時に使用するポリエチレングリコールおよび酢酸リチウム処理後のヒートショック時間を調整し、DNAを取り込ませた後の酵母液をSD-Ura寒天培地、YPD寒天培地に塗布し、30℃で5日間培養した。

これらの実験の結果、ヒートショック時間を延長することで導入効率が改善され、従来法と比較して約7倍の効率改善を達成した。これは、細胞膜の透過性が高まり、DNAの取り込みが促進されたことによると考えられる。

## ■ 展望

今後はさらに最適な条件を模索し、より効率的な遺伝子導入方法の確立を目指す。最終的には、確立したプロトコルを活用して *ade2* 変異株(赤色酵母)の安定的な作製を行い、清酒酵母への応用に展開する。

代表発表者 岡崎 龍一(おかざき りゅういち)  
所 属 近畿大学農学部応用生命化学科  
応用微生物研究室

問合せ先 〒631-0052

Z 奈良町中町 3327-204  
TEL:0742-43-1894

■キーワード: (1) 酵母  
(2) ゲノム編集  
(3) 酢酸リチウム法