

2011年度生物工学奨励賞（江田賞）受賞



二倍体清酒酵母の新しい育種法の開発とその応用

小高 敦史



A novel breeding method useful for diploid sake yeast and its applications

Atsushi Kotaka (Research Institute, Gekkeikan Sake Co. Ltd., 101 Shimotoba-koyanagi-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8385) *Seibutsu-kogaku* **90**: 66-71, 2012.

はじめに

清酒は、米のデンプンを麹菌が酵素（アミラーゼ）で少しずつ糖化し、生成したグルコースを清酒酵母がエタノール発酵することによってつくられる。清酒のエタノールが20%(v/v)にも達するのは、こうした糖化と発酵が同時にバランスよく進む「並行複発酵」がその一因であるが、清酒酵母自体にもエタノール高生産の要因があると考えられている¹⁻⁵⁾。清酒酵母は分類学的に、真核生物のモデルとされる出芽酵母と同様に *Saccharomyces cerevisiae* に属している。しかし、長年の清酒醸造における選抜育種の結果、エタノール発酵に関する形質などは他の出芽酵母と大きく異なることが分かっている。清酒酵母は高濃度のエタノールを生産するなどの有用な形質を有しているため、酒類醸造はもちろんのこと、有用物質生産やバイオ燃料生産宿主としても注目されている。しかし、このような望ましい形質をもつ一方で、交配による育種や劣性変異株の取得が難しいといった難点もある。これは二倍体 (2n) である清酒酵母では、育種や機能解析がしやすい一倍体 (n) 取得に必要な、胞子形成能が非常に低いことが原因である。胞子形成能の低さは、酒造りにおいては安定な醸造を可能にするため好ましい形質であるといえるが、清酒酵母の機能解析や新しい清酒酵母の開発には大きな障害となっている。これまでにも清酒酵母の胞子形成能に関するさまざまな研究がなされているが^{6,7)}、二倍体清酒酵

母を一倍体実験室酵母と同じように扱いやすい酵母へ育種するまでには至っていない。そこで、胞子形成に頼らない二倍体清酒酵母の新しい育種方法の開発とその応用について検討した。

High-efficiency loss of heterozygosity (HELOH) 法の開発と多重劣性変異株の作製

研究で広く使用される酵母は多くの場合一倍体である。なぜなら各遺伝子が1セットずつで育種や機能解析がしやすいからである。それに対し、各遺伝子を2セットずつ持つ清酒酵母などの二倍体酵母は使用しづらい。二倍体酵母に変異を導入すると、通常ヘテロ変異株が取得されホモ変異株はほとんど取得されない。この変異が優性の変異であれば形質として現れるが、劣性の変異であれば形質として現れない。そのため、二倍体清酒酵母から劣性変異株を取得することは一般的に困難であり、遺伝子工学用宿主として有効な多重栄養要求性やプロテアーゼ欠損⁸⁾などの付与による清酒酵母の改良も当然進んでいない。

一方で、酵母を物質生産宿主として利用する場合、その生産性の向上などを目的とした、外来遺伝子の多コピー化を容易にできる技術の開発が望まれている。その点においては、二倍体酵母は一つの遺伝子座に二つの外来遺伝子が組込めるため、優位である。実際、外来遺伝子を組込んだ一倍体酵母どうしを掛け合わせて、外来遺伝子が複数組込まれた二倍体酵母が作製されている^{9,10)}。

著者紹介 月桂冠株式会社総合研究所（研究員） E-mail: a_kotaka@gekkeikan.co.jp

しかし、清酒酵母から一倍体を取得することは困難であるため、このような手法は用い難い。

以上のことから、二倍体清酒酵母に変異や外来遺伝子を効率的にホモ型に導入する技術が必要であると考え、ヘテロに導入された変異領域を高頻度でホモ化する方法について検討した。

まず、Brachmannらの方法¹¹⁾に倣ってヘテロ破壊株を作製した。URA3を選択マーカーとして、削除したい領域と選択マーカーとを置換後、5-フルオロオロチン酸(5-FOA)添加培地での生育¹²⁾を指標に、URA3がループアウトにより脱落した株を選抜し、ヘテロ破壊株を得た。次に、破壊領域の対立アレルにURA3マーカーを挿入後、5-FOA培地での生育を指標にヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity, LOH)が生じた株、すなわち破壊領域がホモ化された株を選抜することにより、目的とするホモ型遺伝子破壊株を取得することができた(図1)。なお、このときのLOHの頻度と、5-FOA培地にホモ破壊株が出現した頻度を表1に示す。LOHの頻度は $10^{-4} \sim 10^{-5}$ と非常に低く、ヘテロ破壊株からの網羅的スクリーニングが非常に難しいことを示している。それに対し、本法を用いて5-FOAプレートからスクリーニングした場合、その取得頻度は 10^{-1} オーダーとなり、目的とするホモ破壊株の取得効率は $10^4 \sim 10^5$ 倍に上昇した。このことは本法がヘテロ破壊株からホモ破壊株の取得に非常に有効であることを示している。このように、ヘテロな領域がホモ化した株を効率よく選抜する本法をhigh-efficiency loss of heterozygosity (HELOH)法と命名した。一方、得られた株の形質は破壊した遺伝子の表現型以外は親株とほぼ同等であったことから、清酒酵母の特性を損なわない劣性変異株が取得できたとと言える。また、HELOH法を繰り返し利用することにより、多重栄養要求性(ウラシル, リジン, ロイシン要求性; 図2)、プロテイナーゼA欠損清酒酵母を作製することができた¹³⁾。作製されたこれらの二倍体清酒酵母は遺伝子工学用宿主としての利用が期待される。

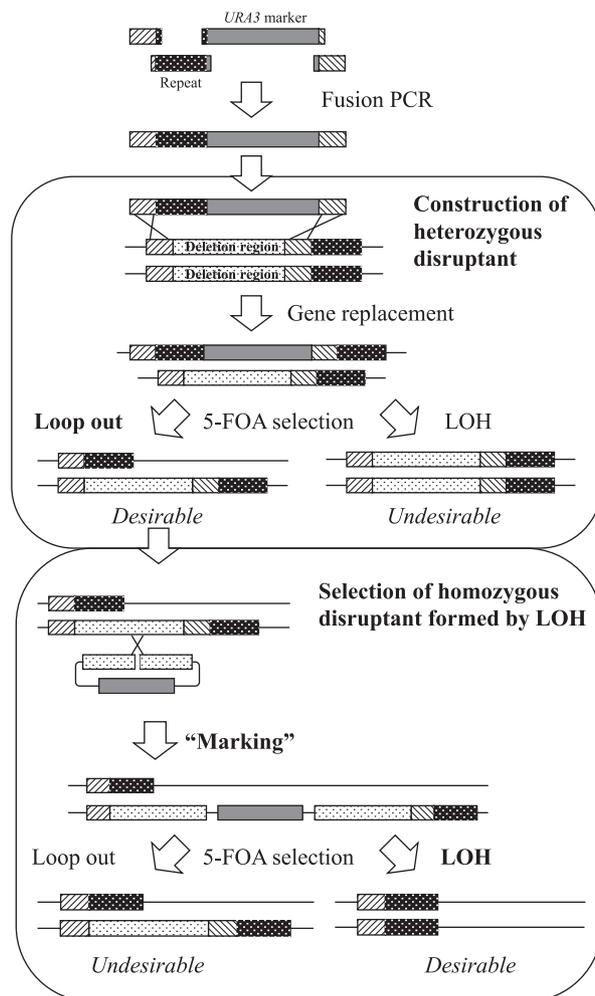


図1. HELOH法による二倍体清酒酵母の遺伝子破壊

表1. LOHの頻度と、5-FOA培地にホモ破壊株が出現した頻度

ヘテロ破壊株 →ホモ破壊株	LOHが生じた 頻度	5-FOA培地に ホモ破壊株が 出現した頻度
<i>LEU2/leu2</i> → <i>leu2/leu2</i>	2.4×10^{-5}	3.7×10^{-1}
<i>PEP4/pep4</i> → <i>pep4/pep4</i>	2.0×10^{-5}	3.6×10^{-1}

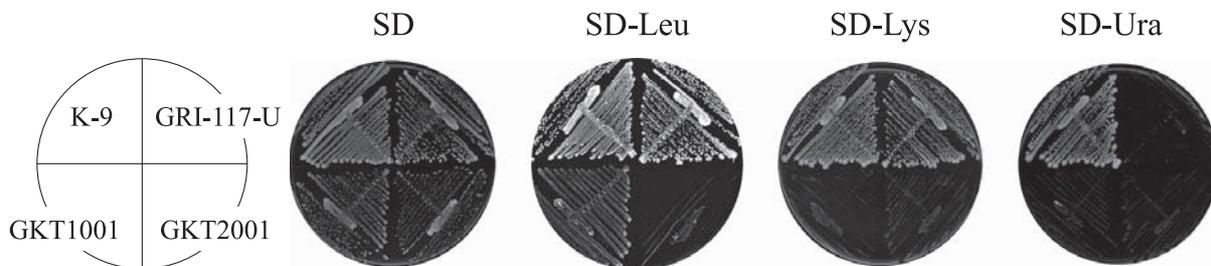


図2. 二倍体清酒酵母への栄養要求性の付与. K-9, 親株; GRI-117-U, ウラシル要求性; GKT1001, ウラシル, リジン要求性株; GKT2001, ウラシル, リジン, ロイシン要求性株。

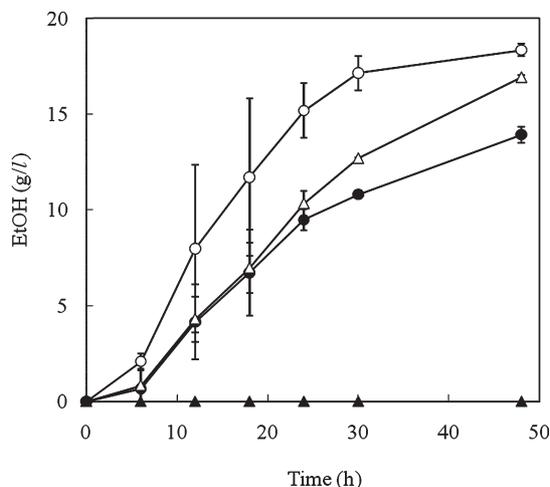


図3. グルコアミラーゼ提示清酒酵母を用いたデンプンからの直接バイオエタノール生産. ○, 麹菌GlaA提示株; ●, 麹菌GlaB提示株; △, *Rhizopus oryzae*グルコアミラーゼ提示株; ▲, 提示なし.

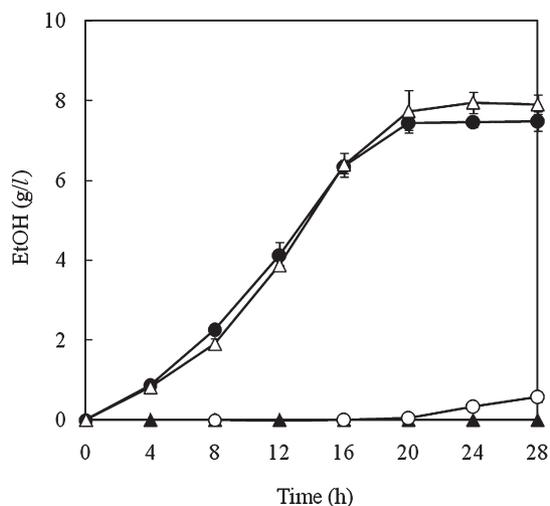


図4. β -グルコシダーゼ, エンドグルカナーゼ提示清酒酵母を用いた β -グルカンからの直接バイオエタノール生産. ○, エンドグルカナーゼ提示株; ●, エンドグルカナーゼ提示株および β -グルコシダーゼ提示株の混合; △, エンドグルカナーゼ, β -グルコシダーゼ共提示株; ▲, 提示なし.

清酒酵母によるバイオエタノール生産技術の開発への展開

清酒酵母が高濃度のエタノールを生産することに着目し, 清酒酵母を利用したバイオエタノール生産技術の開発を行った. このとき, バイオマスの糖化と発酵を同時に行えるようにするため, α -アグルチニンをアンカーとした細胞表層工学¹⁴⁾を利用して糖質加水分解酵素を清酒酵母の細胞表層に提示したさまざまな「アミン清酒酵母」を作製した.

まず, グルコアミラーゼを表層提示した清酒酵母を作製した. 麹菌グルコアミラーゼ (GlaA)¹⁵⁾を提示した清酒酵母を使用して50 g/lのデンプンから30°Cで直接エタノール発酵を行ったところ, 発酵開始から48時間後に18.5 g/lのエタノールが得られた(図3). 糖化と発酵を同時に行うことで効率的なエタノール発酵が実現できた¹⁶⁾.

世界的な食糧事情から, 食用ではないバイオマスからエタノールを生産する技術の開発が切望されている. そこで, 麹菌由来の β -グルコシダーゼおよびエンドグルカナーゼ (CelB)¹⁷⁾を清酒酵母の細胞表層に提示し, デンプン以外からのエタノール生産を試みた. β -グルコシダーゼを提示した酵母はその表層で高い β -グルコシダーゼ活性を示し, セロビオースから直接エタノールを生産することができた. 一方で, エンドグルカナーゼを提示した酵母は β -グルカンを効率よく分解することができた. さらに, それぞれの酵素を清酒酵母の細胞表層に同

時に提示 (共提示) させた株を作製し, 直接エタノール発酵を行ったところ, 20 g/l β -グルカンから24時間で7.9 g/lのエタノールを生産することができた(図4). 共提示により糖化と発酵を同時に行うことができ, 効率的なエタノール生産を行うことができた¹⁸⁾.

次に, アミン清酒酵母を利用したバイオエタノール生産をさらに効率よく行うために, 清酒酵母宿主の改良に取り組んだ. 表層提示のアンカーとしてGPIアンカー型タンパク質である α -アグルチニンを使用していることから, 他のGPIアンカー型タンパク質と細胞表層で競合することが考えられたため, GPIアンカータンパク質をコードする遺伝子が破壊された株をまずターゲットとした. 遺伝子破壊株セットより該当する株を25株抽出し, これらに麹菌 β -グルコシダーゼを表層提示させた. 細胞表層での活性を測定した結果, $\Delta sed1$, $\Delta tos6$ 株は有意に β -グルコシダーゼ活性が上昇することを見いだした(図5). 発現カセットのプロモーターに*SED1*のプロモーター領域を使用していたことから, 次に, 清酒酵母の*SED1*のORFおよびプロモーター領域を削除した株を, HELOH法を利用することにより作製した(図6). 作製した株に β -グルコシダーゼを表層提示させ, 細胞表層での β -グルコシダーゼ活性を評価したところ, ORFを削除することにより細胞表層での β -グルコシダーゼ活性が上昇した. 前述の結果と同様, 細胞表層で他のGPIアンカー型タンパク質との競合が回避されたためと考えられる. さらにプロモーター領域を削除することにより,

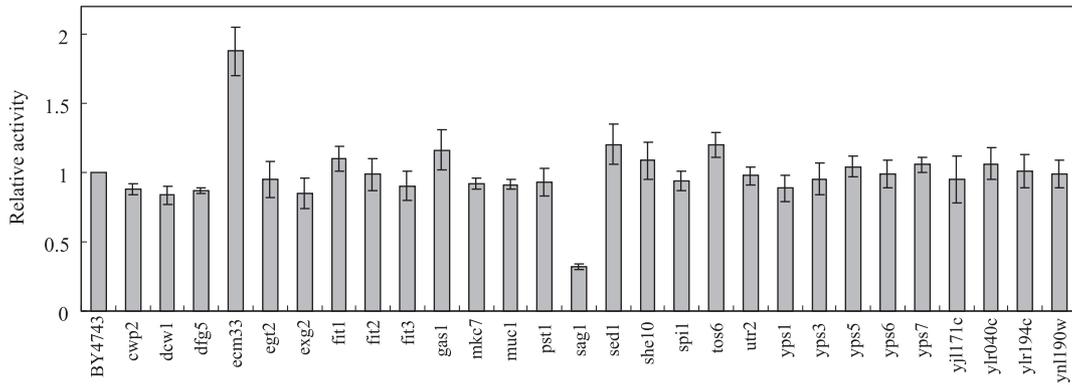


図5. 表層提示に有効な GPI アンカータンパク質遺伝子破壊株のスクリーニング. BY4743 (親株) を宿主としたときの活性を1とした。

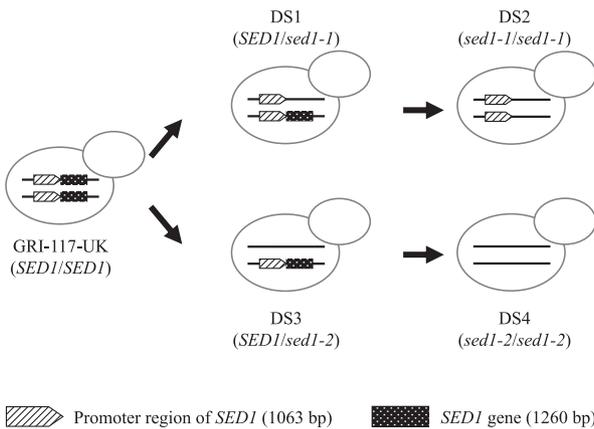


図6. HELOH法を利用した二倍体清酒酵母の *SEDI* 破壊株の作製

さらなる活性上昇がみられた。 *SEDI* のプロモーター領域には多くの転写因子結合部位が存在するため、プロモーター領域の削除により、転写因子の競合が回避されたと考えられる。また、ヘテロ型とホモ型を比較すると、ホモ型遺伝子破壊株の方が高い活性を示した。 *SEDI* の ORF とプロモーターの両方をホモに削除した株は、親株の1.6倍のβ-グルコシダーゼ活性を示した(図7)¹⁹。

清酒酵母の機能強化への展開 —カブロン酸エチル超生産酵母の育種—

カブロン酸エチルは吟醸酒における重要な香り成分の一つであり、脂肪酸合成酵素阻害剤であるセルレニンに対して耐性を示す酵母の中には、カブロン酸エチルを高生産するものがある²⁰。このような株は現在多くの蔵で使用されており、吟醸酒造りに大きく貢献している。

カブロン酸エチルを高生産するセルレニン耐性株では

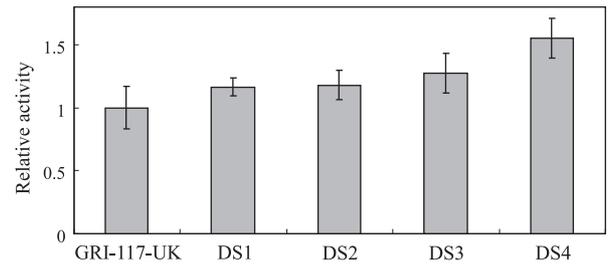


図7. 二倍体清酒酵母各種 *SEDI* 破壊株にβ-グルコシダーゼを提示させたときの細胞表層のβ-グルコシダーゼ活性. GRI-117-UKを宿主としたときの活性を1とした。

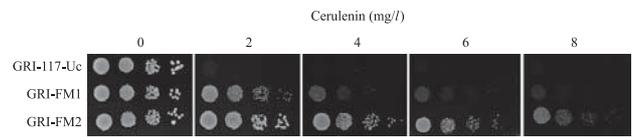


図8. 各変異株のセルレニン耐性の比較

脂肪酸合成酵素のα-サブユニットをコードする *FAS2* に一塩基置換が生じている^{21,22}。この変異は優性の変異で、二倍体清酒酵母では、まれにホモに導入されることもあるが、変異は通常ヘテロで導入されている^{23,24}。優性形質のホモ化についての議論はあまりなされていないため、HELOH法で変異型 *FAS2* をホモ化することにした。なお、親株には清酒酵母のウラシル要求性株 GRI-117-U を用いた。ホモ化の結果、野生型やヘテロ変異株は4 mg/lセルレニンに対して感受性を示したが、ホモ変異株は4 mg/l以上のセルレニンに対して耐性を示した(図8)。また、清酒小仕込み試験においてホモ変異株 (GRI-FM2) は、野生型 (GRI-117-Uc) やヘテロ変異

表2. 清酒小仕込み試験での各菌株のカプロン酸エチル生産量

菌株	エタノール % (v/v)	カプロン酸エチル mg/l
GRI-117-Uc	19.3 ± 0.2	0.66 ± 0.03
GRI-FM1	19.0 ± 0.1	3.3 ± 0.3
GRI-FM2	18.0 ± 0.2	4.3 ± 0.1

表3. 清酒小仕込み試験での各菌株のカプロン酸エチル生産量

菌株	エタノール % (v/v)	カプロン酸エチル mg/l
K-1801	19.2	5.41
K-1801-FM2	18.1	12.2



図9. 各濃度のセルレニン含有培地での酵母の生育

株 (GRI-FM1) より多くのカプロン酸エチルを生成した(表2). このように, 優性変異をホモ化することで, その形質を強化することができた.

現在, 遺伝子組換え体やセルフクローニング株は食品分野への応用が難しい²⁵⁾. そこで, *FAS2*ホモ変異株を遺伝子組換えせずに取得する方法を検討した. その際にもLOHを利用することとした. なぜならば, ヘテロ変異株を培養しているうちにLOHが生じて, 変異型*FAS2*がホモ化する株も存在するであろうと考えたためである. そこで, *FAS2*ヘテロ変異株であるきょうかい1801号 (K-1801)²⁶⁾を培養後, 各濃度のセルレニン培地に酵母を 10^6 塗布した. その結果, 2 mg/l以下のセルレニン培地ではプレート一面に酵母が生育したのに対し, 4 mg/l以上のセルレニンを含む培地では大きなコロニーが数十個ずつ出現した(図9). このようなコロニーを81個ピックアップし, *FAS2*の配列をシーケンスしたところ18株の変異型*FAS2*がホモ化していた. 出現頻度がおよそ 10^{-4} であったため, LOHが生じた結果, 変異型*FAS2*がホモ化したものと考えられる. このように, 高濃度セルレニン培地での選抜も有効であることが示された. また, 清酒小仕込み試験において*FAS2*ホモ変異非組換え酵母 (K-1801-FM2) もヘテロ変異株よりも多くカプロン酸エチルを生成し, その値はヘテロ変異株の2.2倍の12.2 mg/lに達した(表3). *FAS2*ホモ変異株を用いることにより, カプロン酸エチルの非常に華やかな香りを有する清酒を醸造することができた²⁷⁾.

おわりに

孢子形成に頼らない二倍体清酒酵母の新しい育種方法であるHELOH法を開発することにより, ヘテロな領域がホモ化した株を効率よく取得することが可能となった. その応用として, 遺伝子工学用宿主に有効な栄養要求性株やプロテアーゼ欠損株, 細胞表層提示に有効な遺伝子破壊株などの各種遺伝子破壊株を作製した. さらに優性形質の強化として変異型*FAS2*のホモ化にも成功した. また, ここで述べた以外に, ホモ型にプロモーターを置換することによる, 香気成分が強化されたセルフクローニング株の作製²⁸⁾や, ホモ型に外来遺伝子を導入することによる, 高活性で遺伝的安定性の高い組換え酵母の作製^{29,30)}にも成功している. このように, HELOH法は今後二倍体清酒酵母の様々な能力向上に貢献できる技術であると考えている.

アーミング清酒酵母によるバイオエタノール生産の研究は, 京都大学大学院農学研究科 植田充美教授, 黒田浩一准教授, 神戸大学大学院工学研究科 近藤昭彦教授との共同研究であります. 研究を行うにあたって, 先生方から多くのご指導いただきました. 心より御礼申し上げます. また, 本研究の機会やご指導を賜りました月桂冠株式会社 安部康久特別顧問, 川戸章嗣専務取締役製造本部長, 秦洋二取締役総合研究所長, 佐原弘師主任研究員をはじめとする関係各位の皆様, この場を借りて深く感謝申し上げます.

文 献

- 1) 下飯 仁, 藤田信之: 化学と生物, **45**, 539–543 (2007).
- 2) Katou, T., Kitagaki, H., Akao, T., and Shimoi, H.: *Yeast*, **25**, 799–807 (2008).
- 3) Katou, T., Namise, M., Kitagaki, H., Akao, T., and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 383–399 (2009).
- 4) Watanabe, D., Wu, H., Noguchi, C., Zhou, Y., Akao, T., and Shimoi H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 934–941 (2011).
- 5) Urbanczyk, H., Noguchi, C., Wu, H., Watanabe, D., Akao, T., Takagi, H., and Shimoi H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 44–48 (2011).
- 6) Nakazawa, N., Tsuchihara, K., Hattori, T., Akita, K., Harashima, S., and Oshima, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 6–11 (1994).
- 7) Suizu, T., Tsutsumi, H., Kawado, A., Murata, K., Suginami, K., and Imayasu, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 93–97 (1996).
- 8) Gleeson, M. A., White, C. E., Meininger, D. P., and Komives, E. A.: *Methods Mol. Biol.*, **103**, 81–94 (1998).
- 9) Saitoh, S., Tanaka, T., and Kondo, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 594–597 (2008).
- 10) Yamada, R., Bito, Y., Adachi, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.: *Enzyme Microb. Technol.*, **44**, 344–349 (2009).
- 11) Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D.: *Yeast*, **14**, 115–132 (1998).
- 12) Boeke, J. D., LaCrute, F., and Fink, G. R.: *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345–346 (1984).
- 13) Kotaka, A., Sahara, H., Kondo, A., Ueda, M., and Hata, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 387–395 (2009).
- 14) Kondo, A. and Ueda, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 28–40 (2004).
- 15) Hata, Y., Tsuchiya, K., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., and Hara, S.: *Gene*, **108**, 145–150 (1991).
- 16) Kotaka, A., Sahara, H., Hata, Y., Abe, Y., Kondo, A., Kato-Murai, M., Kuroda, K., and Ueda, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 1376–1379 (2008).
- 17) Kitamoto, N., Go, M., Shibayama, T., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 538–544 (1996).
- 18) Kotaka, A., Bando, H., Kaya, M., Kato-Murai, M., Kuroda, K., Sahara, H., Hata, Y., Kondo, A., and Ueda, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 622–627 (2008).
- 19) Kotaka, A., Sahara, H., Kuroda, K., Kondo, A., Ueda, M., and Hata, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 442–446 (2010).
- 20) Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K., and Imayasu, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153–2154 (1991).
- 21) 市川英治: 醸協, **88**, 101–105 (1993).
- 22) Inokoshi, J., Tomoda, H., Hashimoto, H., Watanabe, A., Takeshima, H., and Omura, S.: *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 90–96 (1994).
- 23) Akada, R., Matsuo, K., Aritomi, K., and Nishizawa, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 43–48 (1999).
- 24) Akada, R., Hirose, I., Hoshida, H., and Nishizawa, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 189–192 (2001).
- 25) Hino, A.: *Toxicol. Pathol.*, **30**, 126–128 (2002).
- 26) 吉田 清: 醸協, **101**, 910–922 (2006).
- 27) Kotaka, A., Sahara, H., and Hata, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 675–678 (2010).
- 28) Sahara, H., Kotaka, A., Kondo, A., Ueda, M., and Hata, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 359–364 (2009).
- 29) Horii, K., Adachi, T., Tanino, T., Tanaka, T., Kotaka, A., Sahara, H., Hashimoto, T., Kuratani, N., Shibasaki, S., Ogino, C., Noda, H., Hata, Y., Ueda, M., and Kondo, A.: *Enzyme Microb. Technol.*, **46**, 194–199 (2010).
- 30) 佐原弘師: バイオサイエンスとインダストリー, **68**, 350–352 (2010).