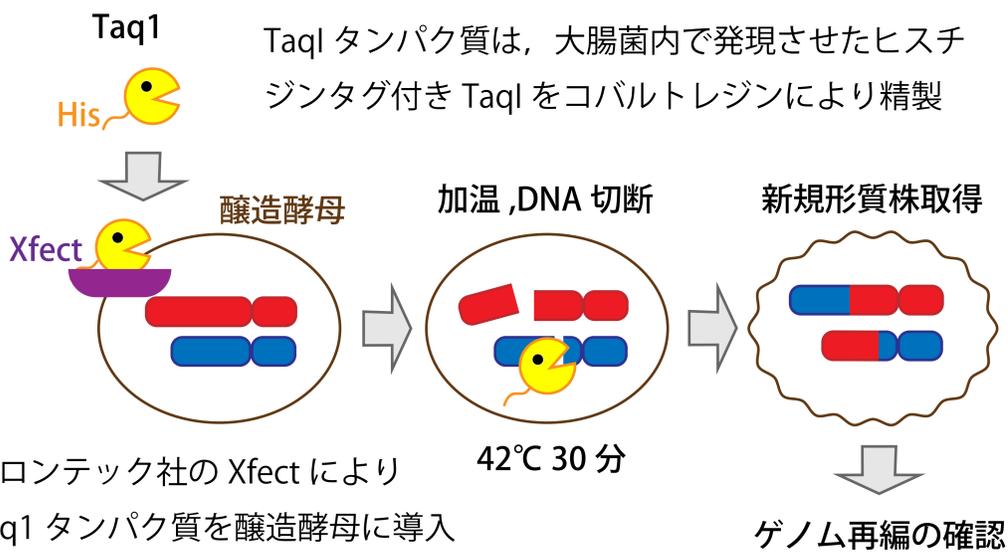


酵母の発酵性能の改良では、変異源処理や自然変異、孢子形成をともなう遺伝的な交配によってゲノムを改変し、醸造に好適な形質を持つ酵母を選択する方法が主流である。しかし、従来手法では新規の形質が飽和状態を迎えつつあること、また醸造酵母の多くが孢子形成能を失っていることから、新しい方法の開発が必要である。

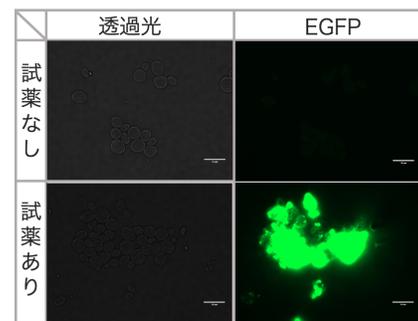
我々は、新規ゲノム再編成システム TAQing システムを確立した (Muramoto ら 2012 Nature Commun.)。TAQing システムでは、高熱菌由来の制限酵素 TaqI を細胞内に導入して一過的に加温することで、ゲノム中に多数の DNA 切断を誘発し、転座や変異、ヘテロ接合性喪失などのゲノム再編成を誘発できる。この方法により新規表現型を持つ実験室出芽酵母や植物の作出に成功した。

そこで本研究では、TAQing システムにより、醸造用酵母で交配時のようなゲノム再編成を活性化し、醸造や物質生産に適した株を構築する方法を確立した。特に酵母細胞内に TaqI タンパク質を直接送致して TAQing システムを実現するため、用いる醸造酵母に好適な条件の探索を実施した。今後、有用株の取得、さらに責任遺伝子を同定することで、新しい有用発酵形質を持つ酵母の獲得が期待できる。

方法: Taq1 タンパク調節による醸造株変異誘導



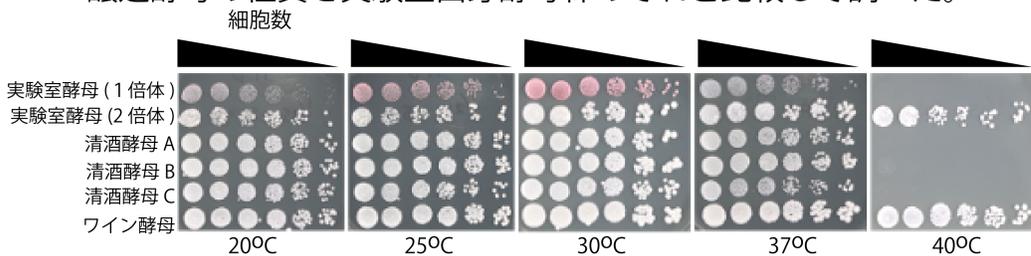
3. Taq1 タンパク質の細胞内への直接導入



TaqI タンパク質を Xfect トランスフェクション試薬により酵母細胞内へ導入する条件を検討した。この実験には定量的分析のため、GFP タンパク質を用いた。試薬の標準プロトコルを改変することにより、トルラ酵母と清酒酵母で9割ほどの細胞に導入する条件を見出した。改変することにより図は清酒酵母についての結果を示している (エラーバーは 10μm)

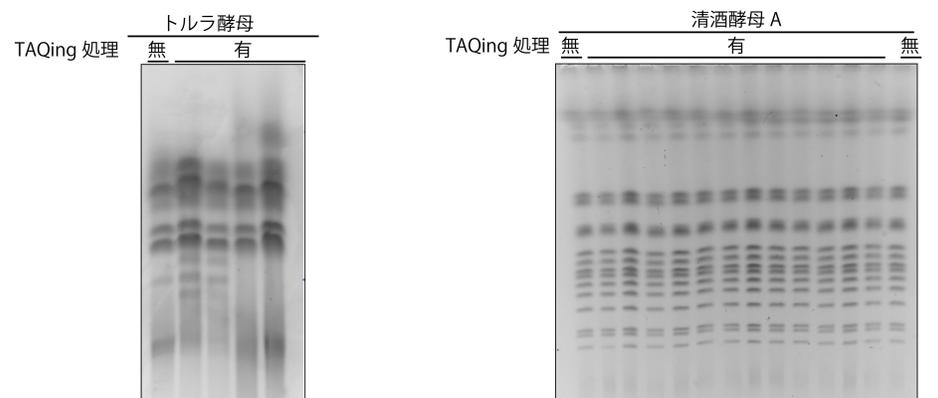
1. 醸造酵母株での TAQing 条件検討

醸造酵母に TAQing システムを適用するための条件を見出すため、醸造酵母の性質を実験室出芽酵母株のそれと比較して調べた。



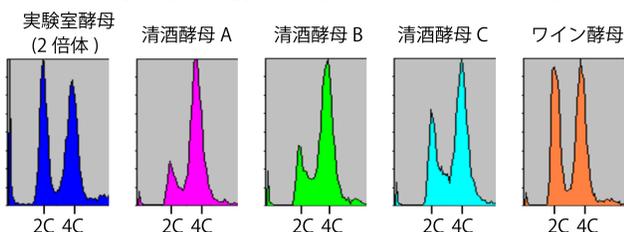
この図では各種酵母の温度感受性を示した。実験室酵母やワイン酵母に比べ、清酒酵母の温度感受性が強いことがわかった。しかし、TAQing システム適用時の加温処理は 30 分間と限定的であることと TaqI の活性化が重要なことを考え、清酒酵母にこのシステムを適用する際の加温処理も 42°C、30 分間とした。

4. TAQing 変異株の染色体再編成の確認

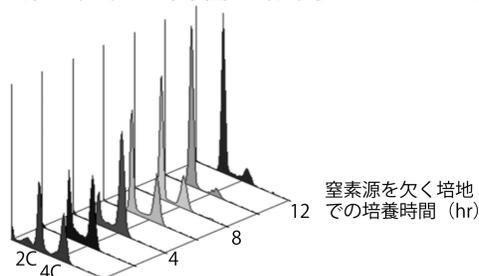


ゲノム再編成を検出するためのパルスフィールド電気泳動条件を決定した。これにより TAQing トルラ酵母変異株については、再編成の発生を確認した。清酒酵母ゲノムの変化は現時点では確認できていない (ここでは 12 株を示した) が、今後より多くの株を解析する。

2. 醸造酵母株の倍数性と細胞周期の検討



醸造酵母の細胞内 DNA 含量を FACS で調べたところ 2 倍体であることと実験室酵母に比べ G2 期の細胞の割合が傾向があることがわかった。



醸造酵母を窒素源非含有培地で 6 時間以上培養すると G1 期で同調することがわかった。この状態で TAQing 処理を行うこととした。

まとめと考察

今回の研究で、清酒酵母とトルラ酵母に対して TaqI タンパク質を細胞に直接導入し、TAQing 加温処理することで、30 クローン以上の変異株が得られ形質が変化するものも得られた。これらからゲノム DNA をパルスフィールド電気泳動で調べたところトルラ酵母において明確な染色体再編成を確認できた。したがって、醸造酵母に対して TaqI タンパク質導入による TAQing システムの構築は完了したと考えられる。

今後は清酒酵母、ワイン酵母の両者に対して多くの細胞を処理し、香味成分を多く生産するなど有用形質を持つ新規醸造酵母を取得する予定である。