

エヌリブ

酒類総合研究所広報誌

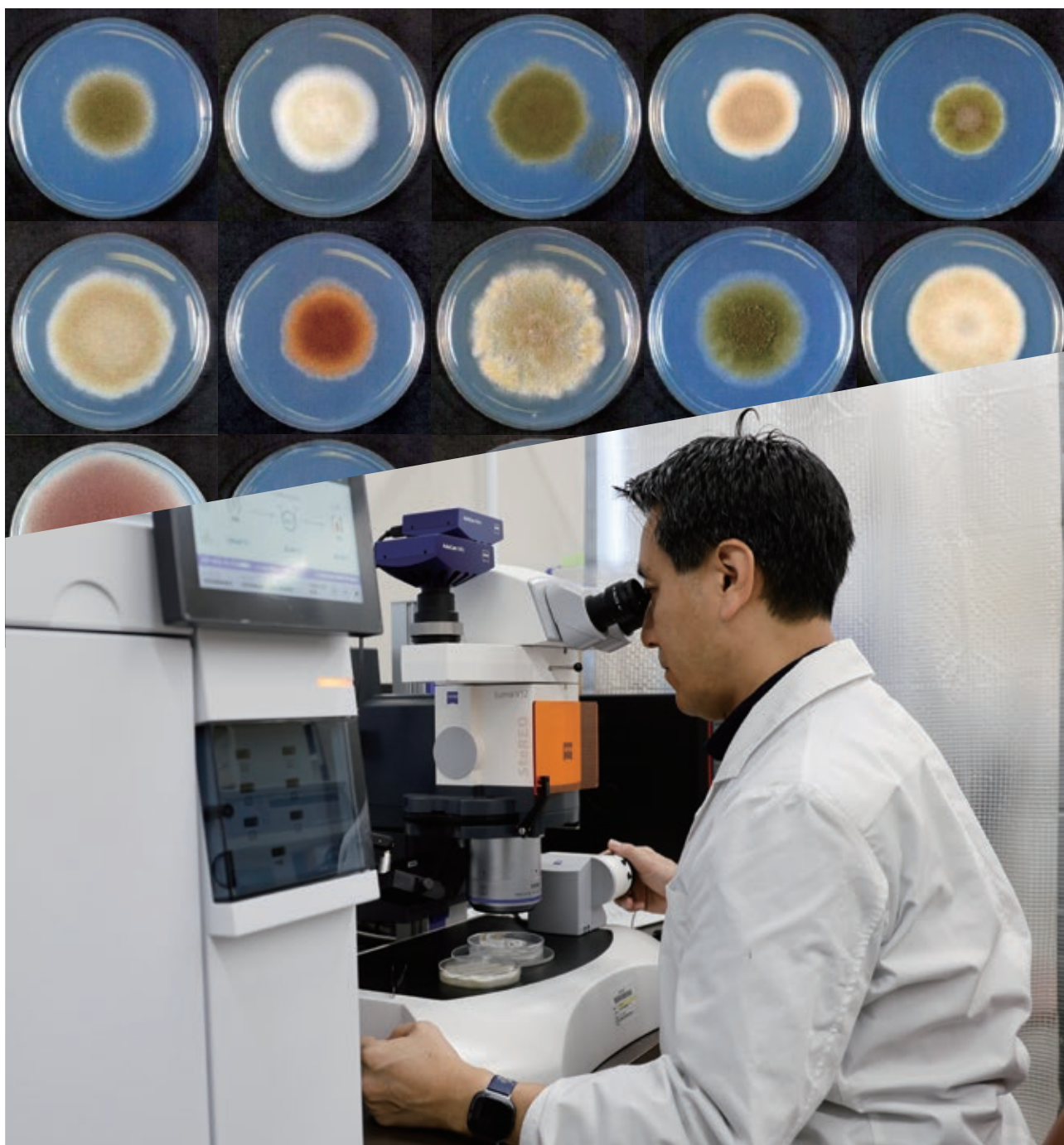
令和6年3月31日 第45号
2024.3.31 No.45

NRIB

45

National Research Institute of Brewing

特集 麹菌育種の最先端2023



麹菌育種の最先端2023

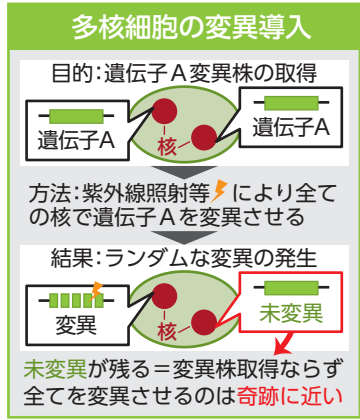
麹菌は古くから日本の伝統的な醸造産業において使用され、自然突然変異などを利用し有用な菌株も開発されています。しかし、麹菌は育種を困難にする特性が複数あり必要な性質のみ付与された株の育種は難しいのが現状です。今号では、麹菌育種の困難に打ち勝つ3つのステップと、当研究所で行う麹菌育種の最先端についてご紹介します。



醸造微生物研究部門
主任研究員
織田 健
Oda Ken

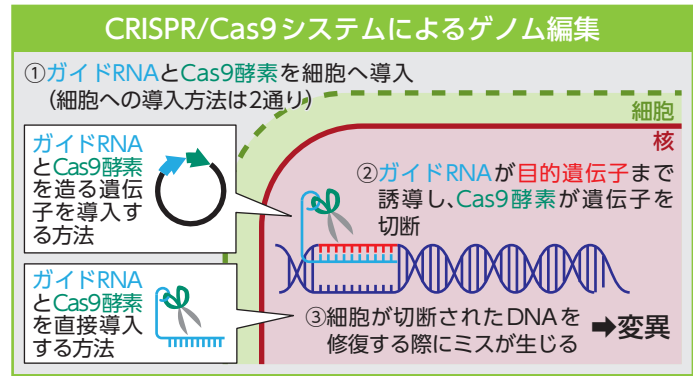
麹菌の育種は難しい

麹菌は、様々な産業分野で活躍する微生物であり、より有用な性質の株を求め、育種の研究もされています。育種では紫外線照射等がよく利用されます。これはランダムな変異を起こす手法であり、目的外の変異体も多く得られます。さらに麹菌は一つの細胞に複数の核を持つ多核体構造があり、紫外線照射等で目的の遺伝子全てを変異させるのは奇跡に近いものがあります。また、優れた性質の株同士を掛け合わせる育種法もありますが、麹菌は掛け合わせに必要な性別のようなものが未発見であるため適用できません。このように、麹菌では従来の育種法の利用が困難なのです。



STEP.1 ゲノム編集技術の登場

育種が難しい麹菌ですが、ゲノム編集技術の登場により光明が差してきます。中でも、2012年に開発されたCRISPR/Cas9(クリスパーキャスナイン)システムは、Cas9という遺伝子切断酵素と、この酵素を目的遺伝子まで誘導するガイドRNAから成るもので、目的の遺伝子を狙って変異させることができます。



麹菌では2016年に初めて、CRISPR/Cas9システムを使用したゲノム編集の結果が報告されました。ターゲットは分生子を黄緑色にするwA遺伝子です。ゲノム編集の結果、wA遺伝子の破壊により分生子が白色になった株が

取得され、麹菌に対するCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集の有効性が示されました。

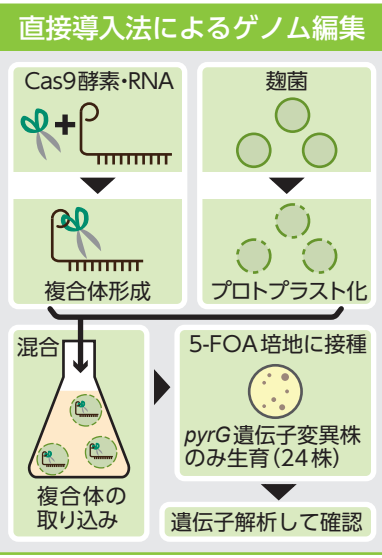
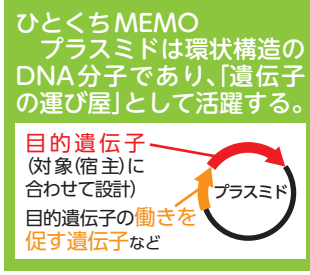
STEP.2 麹菌の性質を活かして

先の報告では、Cas9酵素とガイドRNAを造る遺伝子とを載せたプラスミドを麹菌へ導入する手法がとられました。このプラスミド構築は、麹菌体内で効率的に機能するように遺伝子を設計するなど、やや煩雑な作業でもあります。

ところで、実は麹菌にはタンパク質を直接取り込む能力があります。Cas9酵素もタンパク質ですから、麹菌に取り込ませることで、プラスミド構築なしのゲノム編集が可能になるかも知れません。これを検証するため、私たちはpyrG遺伝子をターゲットに、Cas9酵素の直接導入によるゲノム編集を試みました。なお、pyrG遺伝子を破壊された株は5-FOA(5-フルオロオロチン酸)耐性を獲得します。

まずはCas9酵素とガイドRNAを合成し、混合して複合体を形成させました。次に、麹菌をプロトプラスト化(細胞の外側を覆う殻のようなものを脆くし、体外の物質を取り込みやすくした状態)しました。これらを混合し麹菌にCas9複合体を取り込ませたのち、5-FOA含有培地に接種したところ、24株が生育しました。5-FOA含有培地に生育するということは、5-FOA耐性がある、すなわちpyrG遺伝子に変異しているということです。実際に24株を解析してみるとpyrG遺伝子の変異が確認できました。

直接導入法による麹菌のゲノム編集^{*1}は可能であることが示されました。これによりプラスミド構築が不要となり、麹菌のゲノム編集は非常に迅速化しました。



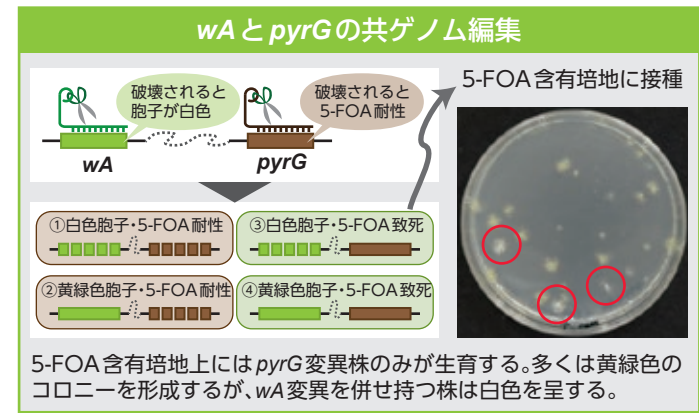
STEP.3 より効率化を目指して

さて、遺伝子への変異導入処理というのは、必ず遺伝子を変異させるものではありません。麹菌のゲノム編集において目的の変異株が得られる確率は、使用する菌株などで多少の変化はありますが、平均しておおよそ100万分の1と言ったところでしょうか。ゲノム編集処理した菌液(以下、処理菌液)は約100万株を含むよう調整しており、その中に変異株は数個しか存在しないのです。変異により薬剤耐性獲得など見た目で見える形質(姿形や性質)変化が起これば変異株を探しやすいのですが、それがなければ100万株を総当たりで遺伝子解析して変異株を探すことになります。遺伝子解析は株を1つずつ分離し遺伝子を抽出して行うもので、時間と手間がかかります。

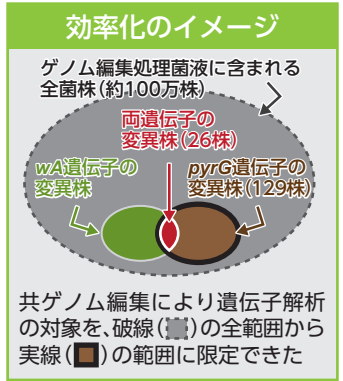
そこで私たちが考えた解決法が、ターゲット遺伝子と同時に薬剤耐性など形質が変化する遺伝子も編集する「共ゲノム編集法^{*2}」です。獲得した薬剤耐性などをマーカーとして活用し、遺伝子解析の対象を減らすことが目的です。



実際にターゲットを(形質は変化しますが)wA遺伝子、マーカーをpyrG遺伝子として共ゲノム編集を実施してみました。wA遺伝子とpyrG遺伝子のガイドRNAをそれぞれCas9酵素と複合体形成させ、直接導入法により同時に麹菌に取り込ませました。この処理菌液を5-FOA含有培地に接種し、pyrG遺伝子に変異した129株を獲得しました。このうち、26株は白色を呈しており、その遺伝子を解析すると、pyrGとwA両遺伝子の変異が確認できました。



顕著な形質変化のない遺伝子だけをゲノム編集した場合、遺伝子解析の対象は約100万株です。この中に変異株は平均して数個しか無く、それを探し出すということは、いわば広大な砂漠の中で一握りのダイヤを探すような作業です。ここに、薬剤耐性を獲得する遺伝子のゲノム編集を合わせることで、先の例では実際に129株まで遺伝子解析の対象を減らすことができました。共ゲノム編集の有効性がよく分かります。

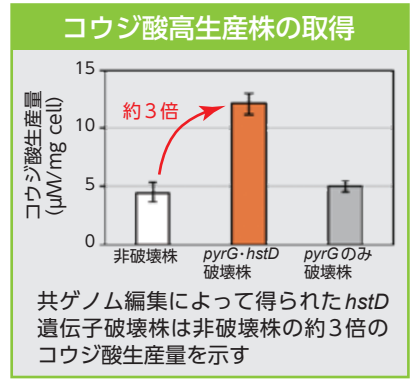


最先端の麹菌育種

共ゲノム編集の有効性が実感できたところで、実際に顕著な形質変化のない遺伝子をターゲットとした共ゲノム編集の結果をお示しします。

今回のターゲットは美白成分としても有名なコウジ酸の生合成を抑える働きをもつhstD遺伝子です。この遺伝子のみを破壊しても顕著な形質変化はないため、pyrG遺伝子をマーカーとして共ゲノム編集を実施しました。処理菌液を5-FOA培地に接種し、生育した株の遺伝子解析を行った結果、3個のhstD破壊株が得られました。

得られたhstD破壊株と非破壊株を液体培地で培養し、培養液中のコウジ酸量を定量したところ、hstD破壊株は非破壊株の約3倍のコウジ酸生産量を示しました。これはhstD遺伝子の破壊によりコウジ酸生産の抑制が解除されたということであり、pyrG遺伝子とhstD遺伝子の共ゲノム編集が問題なく実施されたことを示します。



麹菌育種のこれから

本誌では実験室株という実験に汎用される株を対象とした研究を紹介しましたが、共ゲノム編集技術は実際にお酒造りの現場で使用されている株にも直ちに適用できるものです。現在は、ターゲット以外の遺伝子に変異が入ったりしないか、ゲノム編集した株で造った米麹やお酒に予期せぬ変化はないかなど、ゲノム編集技術の安全性などについてもさらに検証を行なっているところです。

麹菌はその有用性から1890年代より研究が開始され、1980年代からは分子生物学的な研究も加わりました。その100年以上の歴史の中で、どの遺伝子をどのように改変すれば、どのような性質になるのか、といった知見がたくさん蓄積されています。それらの知見と共ゲノム編集技術を活かして、今よりもっと役に立つ麹菌が開発され、広く世の中に受け入れられることを期待しています。

*1 ...特許6994730
*2 ...特許7141648

これが私の仕事です

このコーナーでは、特集ページでは紹介できていない
研究所の業務をお伝えします。第4回目は、
業務統括部門の西本技官にお話を聞きました。

スギダマン

酒類総合研究所の杉玉の
中に住んでいる神様。スギ
ダマンに見守られて造ら
れたお酒はおいしくなる。



研究所のお酒造り
を見守っているのは、ボク
だけじゃないみたい。

▶どんな仕事をしているの？

研究所の酒造場でもある酒類製造実験棟(以下、製造棟)の管理
をしています。研究所は全ての酒類の製造免許を取得しており、
製造棟には様々な設備があります。これらの設備を使用する人が
「普通に使える」よう、機器類の整備や準備・片付け、作業場の清掃
をするのが仕事です。

製造棟では、研究成果を検証する試験
醸造や酒類醸造講習の製造実習などが
実施されます。それらは年間スケジュール
が決まっているので、時期が近づくと早め
に機器を試運転し、動作確認します。特に
酒類醸造講習は日程が細かく組まれて
いるため、機器の不調で進行に支障が
出ないように準備しています。



▶気を付けていることは？

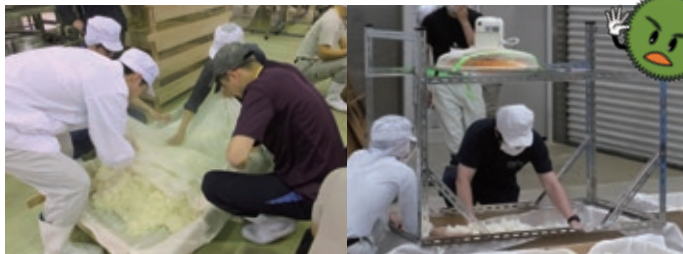
衛生的でありつつ、酒造りにも配慮した器具等の洗浄を心がけて
います。

例えば、木製器具に塩素系殺菌剤を使用するとお酒のカビ臭の
原因になることがあるため、熱湯で殺菌しています。また、布類は
洗剤の匂いが残りやすいため、汚れが
あるときも極力洗剤を避け、まずは手で
もみ洗いをしています。もちろん、酒造
への影響が心配ないものは洗剤等
を使用します。このように、器具に合わせ
て適切な洗浄方法をとることで、衛生的かつ
酒造に最適な環境を維持しています。



▶仕事のやりがいはどこなところ？

必要に応じて道具を自作しています。例えば、清酒もろみは低温
で仕込むため、米は蒸した後に冷まして使用しますが、初夏(6月)
に行なわれる酒類醸造講習では蒸米が冷めにくいという難点が
ありました。これを解消すべく、台座付きの扇風機を作りました。
蒸米に風を当てて冷ますことができるので、この作業に必要な
時間と人手が減り、次の作業に取り掛かりやすくなりました。



複数人で行っていた作業(左)が、一人でできる(右)ようになった

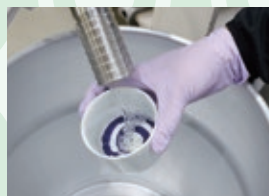
▶設備だけでなく作業者のこともよく見ているんだね!

製造棟の管理が仕事ですが、機器の使用や人手の必要な作業
のサポートもします。どんな作業に人が集まり、時間がかかるかを
観察し、どんな道具や設備の工夫でその不便を解消できるかを
考えています。

▶今後の抱負を教えてください。

怪我をしない、させないことです。酒造場で起こる事故は転落・
機械への巻き込まれ・転倒等が多いそうです。そういったリスクを
少しでも減らせるよう、清掃やメンテナンスを実施していきたいと
思います。

私とお酒のちょこっとエピソード



稀に、講習や研修で造ったお酒をきき
酒する機会があります。機器や道具が
影響することなく無事に「お酒」として
完成したことに、いつもホッとして
います。

NRIB News

酒類醸造講習を開催しました

第117回酒類醸造講習(ビール短期
コース、ワインコース)をそれぞれ全国地
ビール醸造者協議会、日本ワイナリー協会と
共催で開催しました。当講習を修了された
皆様の今後益々のご活躍を期待しています。



麦芽を投入
(ビール短期)

官能検査
(ワイン)

オリジナルプラスチック用品を頒布しています

酒類の官能評価に使用するオリジナルのカップ
と付属の蓋、およびスポイトを作成し、有料頒布
を開始しました。ご利用希望の方はホームペー
ジをご確認ください。

<https://www.nrib.go.jp/data/seikafukyuiinfo.html>



発行 独立行政法人酒類総合研究所

National Research Institute of Brewing (NRIB)

〒739-0046 広島県東広島市鏡山3-7-1

TEL: 082-420-0800 (代表)

本誌に関する問合せは広報・産業技術支援部門までお願いします
(E-mail: kouhou_info@nrib.go.jp)



◆当研究所の冊子等はホームページからご覧いただけます。

<https://www.nrib.go.jp/sake/sakeinfo.html>

◆今後の誌面作成の参考とするため、アンケートを実施してい
ます。皆様のご意見、ご感想をお寄せください。

<https://www.nrib.go.jp/sake/nrib>

