The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

セルフクローニング酵母のお酒の酔いに醒めてから

赤田　倫治*・中村美紀子・星田　尚司

2003年，日本で最初の，私たちの知るところ世界で最初の，組換え操作を行った酵母の日本酒が商品化された．ただし，この酵母はセルフクローニング酵母と認定されているので組換え体と呼ぶ必要はなく，表示の義務もない．その商品は学術資産の価値があると勝手に思っているが，企業側の要望で発表することができないので，これこそ誰も知らない幻の酒となった．その酒に酔った頃の話から．

セルフクローニング酵母開発の流れ

セルフクローニングの定義は，「組換えDNA技術によって最終的に宿主に導入されたDNAが，当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物のDNAのみである微生物と判断されたものをいう」とある．判断は，国の審査委員会が行うが，2001年4月27日に山口大学と山口県産業技術センターで開発した*Saccharomyces cerevisiae* RAK649株がセルフクローニング醸造酵母として初めて認められた．

第一世代のセルフクローニング　我々の開発した酵母のセルフクローニング技術には二つの世代があり，RAK649株は第一世代のものである．第一世代は栄養要求性変異がない醸造酵母を対象にし，遺伝子導入を薬剤耐性マーカー遺伝子で行い，導入に使ったマーカー遺伝子や大腸菌由来のプラスミドDNAを完全に除去するというものである．開発したのは遺伝子を除去する技術であるが，詳しくはいくつかの解説を参考にしてもらいたい[1,2]．この導入と除去の二段階の第一世代セルフクローニング技術により，まず作製したのがRAK649株である．

この株で操作した変異*FAS2*遺伝子は，カプロン酸エチルを高生産することで香り高いお酒が醸造できることが知られているものであり，吟醸酒用酵母変異としてすでに醸造に利用されていた．*FAS2*遺伝子の1250番目のグリシンがセリンに変わるので*FAS2-1250S*変異と呼ぶ．市販の人気のお酒の酵母とまったく同じ酵母株を組換え技術で作製したということであり，科学的にはまったく同じ酵母である（図1）[3]．醸造的には二番煎じなので価値はないが，組換え技術を使った酵母として認定される必然性があると考え，セルフクローニング株として日本初の認定を得て，そのお酒は市販された．

この第一世代では，*FAS2*の1250番目をセリンではなくアラニンにした株*FAS2-1250A*やシステインにした株*FAS2-1250C*も作製した．これらは，*FAS2*遺伝子のほんの一つのアミノ酸を変換しただけのセルフクローニング株であるが，今までの薬剤耐性変異スクリーニング法などでは育種することはできないので，組換え技術が必須の株である．うれしいことに，*FAS2-1250C*変異株は*FAS2-1250S*よりもカプロン酸エチルを多く生産する香り高い酵母株となった（図1）[4]．

同様な二段階法で，遺伝子発現プロモーターを香りの遺伝子（*ATF1*遺伝子）の前に挿入し，不要な配列を除いた株も作製した[5]．この株もセルフクローニングで，香り遺伝子の発現量が過剰となるので，香りの強いお酒が醸造できる．

第二世代のセルフクローニング　次に，このような二段階選抜法のセルフクローニング育種から脱却し，一回の遺伝子操作で自由自在にセルフクローニングを達成する第二世代の技術を開発した[6]．第二世代のセルフクローニング技術は，少し常識外れの発見から始まる．当時，2倍体の酵母では遺伝子が2セットあるはず

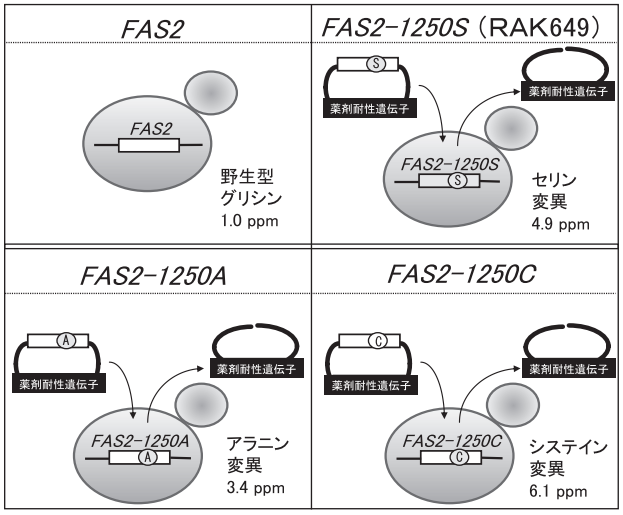

図1．第一世代のセルフクローニング育種酵母．薬剤耐性遺伝子を利用して操作したい遺伝子，ここでは変異*FAS2*（脂肪酸合成酵素）を導入し，遺伝子除去技術で不要な配列を除去してセルフクローニング酵母を育種する．数値は香気成分であるカプロン酸エチルの濃度で，高いと香りがよい．

*著者紹介　山口大学大学院医学系研究科応用分子生命科学系専攻（教授）　E-mail: rinji@yamaguchi-u.ac.jp

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

だから，ウラシルやヒスチジンなどの栄養要求性変異株はまず取得できないと考えられていた．今でもそう思っている方も多いかもしれない．しかし，実際に2倍体の醸造酵母で，1倍体で用いるレプリカ法による栄養要求性変異株の取得を試みてみると次々に取得できたのである[7]．4年生が卒論を始めて1か月で出した結果なので，絶対にコンタミネーションだと思ったが，いくつもの確認をして正しい変異であることがわかった．これが2倍体で直接劣性変異が簡単に取得できることを示した最初だと思う．この現象に対して，2倍体でのLOH（Loss Of Heterozygosity：ヘテロ接合性の消失）の概念を我々が導入して説明することになる[6]．LOHの概念自体はもともとガン細胞などの性質として知られていたが，このLOHを実用酵母2倍体の育種に導入することで，第二世代の実用酵母セルフクローニングができるようになった（図2）．

第二世代で醸造酵母での栄養要求性変異が取得できたので，後はその要求性遺伝子をマーカー遺伝子として遺伝子導入操作を行うだけでよい．元の変異株にはもちろん組換えDNA技術を利用していないので，その酵母に*S. cerevisiae*由来の栄養要求性マーカー遺伝子を利用して目的遺伝子を破壊しても，*S. cerevisiae*由来の高発現プロモーターを目的遺伝子の上流に導入してもセルフクローニングである．酵母由来のDNA配列を利用するなら，ありとあらゆる操作が他の生物のDNAを含むことなく可能となる．もともと大腸菌でのプラスミド作成がわずらわしいと感じていたので，酵母だけで遺伝子を操作することは快適であり，この快適さをシステム化した方法も最近報告した[8]．

この第二世代では，肝硬変に効く成分である*S*-アデノシルメチオニンの生産を増強できる醸造酵母のセルフクローニング育種も行い，健康増進につながる酒への可能性も広げた[9]．しかしながら，最初のセルフクローニング酵母の認定から商品化を経て約10年，どうなっただろうか．

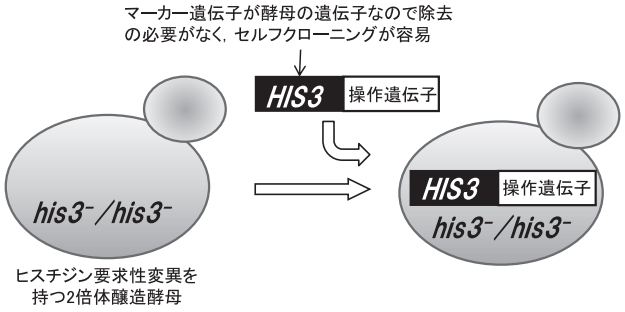

図2．第二世代のセルフクローニング育種酵母．醸造酵母の栄養要求性変異株が取得できたので遺伝子破壊や過剰発現プロモーター挿入などの遺伝子操作が即セルフクローニングとなる．

現在の「組換え食品審査事情」

2003年に「食品微生物の組換え審査事情」と題した解説を，バイオサイエンスとインダストリー誌に載せた[10]．醸造酵母のセルフクローニング株は2001年に審議会決定されたが，10年以上を経てもセルフクローニング認定を受けた醸造酵母など，食品に直接利用できる微生物は我々の開発した酵母以外に一つもない（表1）．食品添加物における遺伝子組換え安全性審査では，現在までにアミラーゼやリボフラビンなどの16品目が審査され，2012年には日本で開発された2件が加わった．一方で，食品添加物に対するセルフクローニング，ナチュラルオカレンス，高度精製品に該当するかどうか（以後，セルフクローニング等と呼ぶ）の審査は，日本で開発されたのがダントツの42件であり，我が国においてはセルフクローニングなどの食品添加物開発が主流であるといえよう．この中には，アミノ酸類などが高度精製品として，プロテアーゼやホスホリパーゼなどの酵素類がセルフクローニングまたはナチュラルオカレンスとして組換え添加物に該当しないと判断されている．

表1．日本における組換え食品添加物とセルフクローニング等食品添加物の審査状況

組換え食品及び添加物	開発国						
	デンマーク	米国	スイス	オランダ	ドイツ	韓国	日本
組換え食品添加物	10	2	1	1	0	0	2
セルフクローニング等の食品添加物	0	6	0	2	1	2	42
セルフクローニング食品微生物	0	0	0	0	0	0	1

2013年7月現在

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

表2. 日本における組換え食品審査状況

食品（254品種）	開発国					
	米国	ドイツ	スイス	米国―ドイツ	米国―スイス	日本
とうもろこし	94	2	85	0	0	0
わた	20	7	0	1	0	0
なたね	2	16	0	0	0	0
大豆	9	3	0	0	0	0
じゃがいも	8	0	0	0	0	0
てんさい	0	1	0	1	1	0
アルファルファ	3	0	0	0	0	0
パパイヤ	1	0	0	0	0	0
合計	137	29	85	2	1	0

2013年7月現在

誰がやるのか，いつやるのか

いままで，多くの遺伝子組換え食品の研究が成されたと思うのだが，表2のデータを見ると日本の現状が理解できる．2013年7月現在で安全性審査の手続きを経た食品は計254品種あるが，残念なことに日本の開発は1件もない．日本で開発された組換え食品が外国において申請され認可されているものが存在するのかもしれない．しかしながら，少なくとも日本においての組換え食品は日本からは実用化されようとしていないのである．一方で，すでに海外で開発された組換え食品が日本では実用化可能であり，商品として流通もしている．

グローバル化する世界において，世界で開発された有用な穀物，飼料，食品などが自由に行き来することが当然となるはずであり，それを止めることはできないのではないだろうか．日本に押し寄せる組換え食品を目の前にして，日本で開発されたものが日本には一つもない現状と，セルフクローニング等の認定に頼る食品添加物だけが突出しているのが日本の状況である．よい組換え食品の研究が育っていてもそれを実用化し，日本でも世界でも役に立つものにできないようなら，それが価値ある研究なのかどうかを我々自身に問わなければならない．

何で組換え生物でなければならない？

今までのセルフクローニング酵母の開発の流れを辿ると，遺伝子組換え技術によって作らなければならなかった酵母とは，実は外来遺伝子を導入しなければ決してできない突出した価値を持つ酵母であったのではないだろうか．セルフクローニングやナチュラルオカレンスのように，既存の生物に担えるものを組換え技術で時間をかけて作る必要はないのではないかと感じ始めている．異種生物の特徴的な遺伝子を導入する必要がない程度の変化は，驚くほどの価値を持っていないのかもしれない．ただし，これはセルフクローニング審査を否定したい議論ではない．現状で，セルフクローニングやナチュラルオカレンスと認定されるかどうかは，その後の商品開発には多大な影響を与える．一方で，我々研究者は，セルフクローニングやナチュラルオカレンスで満足してはいけないのではないかと考えている．

一つ，留意しなければならないことは，組換え生物の安全性審査が行われない，つまり，組換え生物の実用化ができないわけではない．ただ，我が国からは実用化のための開発をやろうとしていないということである．

遺伝子組換え発酵技術

2013年7月23日から日本がTPP（環太平洋戦略的経済連携協定）交渉に参加するとのニュースが伝えられた．同じ時期に，宮崎駿のアニメ「風立ちぬ」が公開された．零戦を設計した技術者を主人公とする話だが，その時代に生きる技術者が何を考え，何を成すべきか，どう生きるかがテーマらしい．つい，同じようにグローバル化の波打ち際で，組換え食品を作る技術者が何を成すべきなのかを考えてしまった．

戦時での技術者の兵器開発と我々の作り出す遺伝子組換え生物とを比べるべきではないのであろうが，現時点での日本における組換え審査リストを見る限り，日本で開発された組換え体で安全性審査に申請されていないものが世界市場で貢献する可能性は低いであろう．我々発

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

図3．パン酵母を利用した組換えDNA実験キット．アミラーゼ遺伝子をパン酵母に導入するキットを高校などへ配布中．生物工学会西日本支部の援助の範囲内は無償．

酵研究者は，伝統ある我が国の発酵を担い，次世代に残せる技術を突き詰めて開発しているのだろうか．その問題提起や表立った議論を今こそすべきというのが今回の企画だと思う．

今，おいしいお酒を造る組換え酵母の開発は主体的には進めていないが，組換え技術や組換え酵母の開発は力の限り進めている．ワクチン生産する酵母，酵素の分泌能力に長ける酵母，新しいタンパク質設計，バイオエタノール発酵に有用な酵母，耐熱性酵母，医薬品製造用酵母など，毎日の食や医療に貢献し，エネルギーをも作り出せる酵母を誰が何と言おうとありとあらゆる遺伝子をとことん操作して開発するつもりである．我々が遺伝子組換えの実用化に取り組んで20年，時代を超えて残せる技術を示すことこそが今後の道筋だとやっと思えるようになった．一緒に実用化に取り組んでくれる企業をいつも探している．

もう一つの小さな試み

このような思いとともに，生物工学会西日本支部の支援で続けてきた教育用組換えキットのことも紹介しておく（図3）[11]．今年度からは東京書籍の高校生物の教科書にも取りあげられており，全国の高校から広く注文がきている．高峰譲吉のこうじ菌アミラーゼを題材に，その遺伝子を酵母に導入し，ヨウ素デンプン反応を利用して遺伝子導入によるデンプン分解を検出するキットで，日本酒の発酵研究の歴史と医療への貢献も学べるキットである．次世代を担う若者が開発する発酵は組換え技術を駆使したものであって欲しい．

謝　辞

パン酵母の組換えキット事業は美澄幸恵さんや鈴木絢子さんを始めとする研究室の皆さんの努力と日本生物工学会西日本支部の援助で成り立っています．ここに，お礼申し上げます．

文　献

1) 赤田倫治：醸造協会誌，**93**, 113 (1998).
2) 赤田倫治ら：化学と生物，**38**, 30 (2000).
3) Akada R. *et al*.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 43 (1999).
4) Aritomi, K. *et al*.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 206 (2004).
5) Hirosawa, I. *et al*.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**, 68 (2004).
6) 赤田倫治ら：バイオサイエンスとインダストリー，**63**, 27 (2005).
7) Hashimoto, S. *et al*.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 312 (2005).
8) Fukunaga, T. *et al*.: *Yeast*, **30**, 243 (2013).
9) Ano, A. *et al*.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 633 (2009).
10) 赤田倫治：バイオサイエンスとインダストリー，**61**, 52 (2003).
11) 星田尚司，赤田倫治：化学と生物，**46**, 501 (2008).

NII-Electronic Library Service