

遺伝子破壊法を用いた尿素を生成しない酵母の育種

月桂冠株式会社 大倉酒造研究所 水津哲義

(1) ECA問題の契機とこれまでの経過

①カナダ、合衆国による規制

ECA(カルバミン酸エチル)については、食品衛生上有害の恐れのある物質と考えられており、FDAにおいて動物実験が続けられている。

酒類中に見いだされたECAの規制を、最初に行ったのはカナダで、1985年には全酒類に対して規制値が設けられた。この時点での規制値にもとずき、市販の全酒類についての測定が成された結果、他の酒類と同様日本酒でも規制値を超える製品があり(1986年)問題となっている。また、1988年に合衆国においても、ワイン、ウィスキー業界において自主規準の目標値が設定されている。

②清酒製造とECA前駆体

清酒の製造原料は、米、米麴、水であるが、これらを用いた醗酵中あるいは製品の状態でのECA生成要因を明らかにすることから研究が開始された。

まず、ECAの簡易測定法を開発し清酒におけるECAの前駆体を検索した結果、清酒に数十ppm含まれる尿素が前駆体であることが明らかになり、尿素とエチルアルコールによって化学的にECAが生成することが示された。

③酵素剤を用いた酒の処理

清酒中の尿素を低減させる方法のうちで、現在のところ最も優れているのは、微生物の生産する酸性ウレアーゼで処理する方法で、乳酸菌*Lactobacillus fermentum*由来の酵素が著名である。この酵素を用いることにより清酒中の尿素は完全に除去され、処理後の清酒はECAを生成しない。この様な微生物起源の酸性ウレアーゼ標品は1987年に指定物品として国税庁長官の許可を受けている。

(2) 遺伝子破壊法を用いた尿素を生成しない酵母の育種

①酵母における尿素の生成

酵母のアミノ酸代謝研究の中で、尿素は、L-アルギニンが酵素アルギナーゼによって代謝された場合に生成され、この酵素を欠く酵母は尿素を全く生成しないと考えられた。そこで、アルギナーゼ遺伝子(CAR1)の破壊を試みた。

②CAR1遺伝子破壊株の作成

清酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*, 協会7号のDNAを用いて遺伝子ライブラリーを作製した。これより合成DNAプローブを用いて、CAR1遺伝子をクローニングした。次に、このCAR1遺伝子の5'および3'末端を欠く断片(Internal region)と、選択マーカーとしてTRP1を含むハイブリッドプラスミドpEPH-2を作製。これを用いて酵母YNN27の形質転換を行いCAR1遺伝子の破壊された株U-3を得た。

③遺伝子破壊株の特徴

遺伝子破壊株は、親株と比較して細胞内のアルギナーゼ活性が極めて低いにもかかわらず、親株と同等の増殖能および醗酵能を示し、また醗中には尿素は全く検出されなかった。

④実用株への応用

同様の操作によって、実用酵母協会9号酵母のCAR1遺伝子の破壊がなされ、尿素を生成しない実用株が育種されている。一般的に、この様な酵母の代謝系を変化させた場合、その影響が他の代謝系へと及び、必ずしも有用な酵母を育種することは出来ないと考えられるが、CAR1遺伝子の破壊は、希少な成功例の一つであると考えられ、将来的に実用が期待される。