

博士論文要約（Summary）

平成 26 年入学

連合農学研究科 応用生命科学専攻

氏 名 澤田 和敬

タイトル	新規清酒酵母育種のための代謝工学的研究
------	---------------------

キーワード（酵母）（育種）（メタボローム解析）

近年、消費者が手に入れることができる酒類は多様化し、アルコール飲料業界は多様化する消費者ニーズに応える商品開発や技術開発が行われている。

このうち清酒は蒸米と蒸米に麴菌を生育させた米麴、そして酵母の並行複発酵によって醸成される。清酒醸造では、酵母は原料米のデンプンが麴菌の生成する酵素によって変換されたグルコースを、エタノールに変換するだけでなく、吟醸香や有機酸など製成酒の香味に寄与する成分を産生する働きを担う。このことから、清酒酵母の選択は商品の品質に直結するとともに、新商品開発の大きなポイントである。

そこで、本研究では清酒の多様性・差別化に資するために清酒酵母の育種開発のために以下の検討を行い、まとめたものである。

第 2 章 醸造用酵母の 1 倍体取得方法の高効率化に関する検討

清酒酵母の交雑育種法は、清酒酵母の孢子形成率が極めて低く 1 倍体株の取得が難しいことからあまり用いられていない。しかし、酵母の交雑育種は遺伝子組み換え技術を使わずにゲノム全般にわたる遺伝子の改変が可能であり、様々なバリエーションの酵母を取得しやすいという利点が挙げられ、交雑育種法で取得した酵母は清酒の多様性に貢献できるという観点から見直されている。さらに近年清酒酵母の QTL が明らかになったことから今後、大きな発展の可能性がある。

そこで第 2 章では清酒酵母の交雑育種を行うために、清酒酵母の 1 倍体を高効率で取得することを目的とした。協会 7 号系及び協会 9 号系といった遺伝学的背景の異なる清酒酵母を用い、ランダムマスポア法における孢子形成法、細胞壁溶解酵素処理、栄養細胞の除去方法の組み合わせを中心に検討を行った。

まず、孢子形成法は孢子形成培地としてよく用いられている酢酸カリウム培地と飢餓に対する応答と同様の挙動を引き起こす免疫抑制剤ラパマイシンを用いた孢子形成培地の 2 種類で清酒酵母を孢子形成させ、その様子を孢子染色法の 1 種である wirtz 法を一部改変し、内生孢子を観察した。

その結果、酢酸カリウム培地で孢子形成させた試験区では、内生孢子と栄養細胞の対比染色が行われ問題なく観察することができたが、ラパマイシンを用いた孢子形成培地の試験区では、内生孢子的観察ができなかった。その原因として、ラパマイシンが酵母に何らかのストレスを与え、細胞壁或いは細胞膜が正常に形成されなかったためと考えた。

次いで、細胞壁溶解酵素処理は協会 7 号系清酒酵母と協会 9 号系清酒酵母では、細胞壁溶

解酵素の濃度及び反応時間を使い分けることで 1 倍体の取得率が向上することがわかった。さらに、栄養細胞の除去法は熱処理法，界面活性剤法，流動パラフィン法の 3 種類の方法で比較した。その結果、界面活性剤法及び流動パラフィン法の方が熱処理よりも高い 1 倍体取得率を示し、界面活性剤を用いた方法の方が流動パラフィンよりも実験の操作性が良かった。

以上の結果から、孢子形成には酢酸カリウム培地を用い、協会 7 号系酵母と協会 9 号系酵母で細胞壁溶解酵素処理を使い分け、残存栄養細胞の除去には界面活性剤を用いた方法を組み合わせることで、清酒酵母の 1 倍体取得が高効率化することを示した。

第 3 章 醸造用酵母のメタボローム解析

一般的に育種開発された或いは自然界から分離された醸造用酵母は、小スケールの仕込試験を複数回行い、対照区である親株と比較し、香味の評価が試験者の主観的な判断において酵母の選抜が行われた後、実地醸造試験を経て実用化されており、試験者の経験が必要とされ、膨大な時間を必要とする。

近年、食品の含有成分の個別分析、官能評価などの従来の成分分析手法と異なるメタボローム解析と呼ばれる食品中に含まれる代謝物の網羅的な分析を行い、主成分分析や PLS 判別分析を行うことで、産地間や品種間などの差異を明らかにすることができるパラダイムが勃興しつつある。

メタボローム解析技術は清酒中に含まれる代謝物成分の差異を表現することができることから、有用酵母の育種から清酒の官能評価までリプレースするだけでなく、新たな考えをも創造しうるポテンシャルを秘めている。

そこで、第 3 章ではガスクロマトグラフィー質量分析計を用いた醸造用酵母のメタボローム解析を行った。さらに、低ピルビン酸酵母 K7-TCR7-13 株及び第 2 章の方法で取得した低ピルビン酸酵母 K7-TCR7-13 株の 1 倍体をメタボローム解析に供することで、1 倍体がどのような代謝特性を示すかについて検討を行った。

本章の検討に用いた酵母は、4 種類の清酒酵母、3 種類の焼酎酵母、4 種類のワイン酵母、3 種類のビール酵母、泡盛酵母、パン酵母、実験室酵母 BY4743、4 種類の野生酵母 AHU 株、第 2 章の方法を低ピルビン酸酵母の泡なし株である K7-TCR7-13 株の 1 倍体株を加えた計 38 株を用いた。

代謝物の抽出及び分析は川瀬らの方法に準じ行った¹⁾。GC-FID を用いたメタボローム解析では、酵母の代謝物 30 種類を説明変数として主成分分析を行ったところ、醸造用途に応じ分類可能だった。更にピルビン酸低減能をもつ K7-TCR7-13 株から取得した 1 倍体は PCA スコアプロット上に菌株ごとに幅広く分布しており、1 倍体酵母は様々な醸造特性を示すことが示唆された。また、GC/MS を用いたメタボローム解析では、K7-TCR7-13 株とその 1 倍体酵母の代謝物 50 種類を説明変数とし、OPLS 判別分析を行い、1 倍体の分類に係る化合物の探索を行ったところ、マンニトール、グリセロール、イノシトールが 1 倍体の分類に寄与していることが明らかになった。また、GC-FID 及び GC/MS を用いたメタボローム解析で分類可能とされた 1 倍体株を用いて小仕込試験を行った。小仕込試験で得られた製成酒の 1:2 点試験法を行った。その結果、P 値は 0.0032 以下であり、有意水準 5% 以下で判別可能であった。これらの結果からメタボローム解析は酵母の発酵特性を評価することが可能であるとともに、官能評価をリプレースすることができる可能性を有する技術で

あることを示した。

第4章 ピルビン酸低減性酵母 K7-TCR7-13 株から取得した 1 倍体株を用いたピルビン酸低減メカニズムの解明に関する検討

健康志向の高まりによって、缶チューハイなどの低アルコール市場は急成長しており、清酒業界では低アルコール清酒やスパークリング清酒といった商品がこれらの市場をターゲットに上市されている。

低アルコール清酒は、通常の製法で造られた 16~18 % のアルコール度数の製品を目的の 6~8 % 程度のアルコール度数まで加水するか、酵母の発酵が最も旺盛な 8% 程度のアルコール度数で発酵停止させる製法が用いられているが低アルコール清酒の一番の課題はその製法にある。加水する製法では、加水することで香味が乏しくなり、“水っぽい”という評価を受け、発酵旺盛な時期に発酵を停止させる製法では、清酒中に酵母が生成したピルビン酸が残存してしまいオフフレーバーが発生しやすいという課題がある。

この技術的課題を解決するために、堀江らはきょうかい 7 号酵母を親株とし、ピルビン酸のミトコンドリア輸送阻害剤である α -シアノ桂皮酸エチルの耐性株 (TCR7 株) を取得した²⁾。TCR7 株は発酵能の低下がみられず、明らかにピルビン酸を低減することが可能であり、2014 年より日本醸造協会から『きょうかい酵母®低ピルビン酸低生産性酵母 7 号』として全国の酒類メーカー向けに頒布されている。

ピルビン酸低減清酒酵母がピルビン酸を低減する詳細なメカニズムを明らかにすることで、様々な醸造酵母のピルビン酸を低減させる酵母への育種技術が可能になる。

近年、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer ; NGS) の開発によりゲノム解析のコストが格段に下がり、モデル生物だけではなく変異株ごとにゲノム解析をできるようになった。NGS を用いた変異株ごとのゲノム解析は順遺伝学の手法のハイスループット化・ブレイクスルーが期待され、今後様々な生物の育種開発に用いられる可能性をもつ。さらにその技術は交配育種のような多数の遺伝子が関与する形質を改良する新しい育種技術の開発に欠かせないツールとなりうることが予想される。

そこで、第 4 章では、ピルビン酸低減清酒酵母の次世代シーケンサーを用いたピルビン酸の低減に寄与する責任遺伝子の特定及びリアルタイム PCR を用いたそれらの遺伝子発現量を解析することで、ピルビン酸低減のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

ピルビン酸の低減メカニズムを明らかにするため、系統が異なるコンソーシアム K7 号 2 菌株とピルビン酸低減能を有する K7-TCR7 の NGS 解析を行い、ピルビン酸低減に寄与していると考えられる 13 個の SNP を抽出した。それらの SNP の抽出した SNP の遺伝子破壊株を作成し、それらの小仕込み試験を行ったところ、SNP の遺伝子破壊株でピルビン酸生成の低下は見られず、1 遺伝子変異の可能性は 69 % であり、複数の遺伝子変異している或いはノンコーディング領域が変異している可能性が示された。

一方、ピルビン酸低減能を有する TCR7 株は NGS のリーディング位置が親株である K7-4 の 1.5 倍に位置しており、一部の染色体が異数倍数性を示した。また、TCR7 を親株として取得した 1 倍体も同様に一部の染色体が異数倍数性を示した。異数倍数性を示した菌株の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で解析したところ、その発現量は有意に増加していた。また、染色体が異数倍数性を示した株を用いて小仕込み試験を行ったところ、試験対照区に比べ、有意なピルビン酸の低減が認められた。

以上の結果より、一部の染色体の倍加がピルビン酸の低減性に寄与していることが示された。

第5章 醸造用酵母のミトコンドリア残活性が醸造酒の代謝産物に与える影響に関する諸検討

好気呼吸の場と考えられるミトコンドリアは嫌氣的に進行する清酒醸造では機能を有さないと考えられていた。しかし、ミトコンドリア活性が高い場合、ミトコンドリアは増殖段階で高度に枝分かれした形態を示し、コハク酸が多く、リンゴ酸が少ない呼吸的プロファイルを示す一方、ミトコンドリア活性が低い場合、細長いフィラメント上の形態を示し、コハク酸が少なく、リンゴ酸が高い発酵的プロファイルを示した。また、清酒酵母のミトコンドリアの分解を阻害することで発酵力が改善されることを示されており、これらの報告のようにミトコンドリア活性と清酒酵母の発酵代謝プロファイルは深くリンクしていることが明らかになりつつある。

更に、清酒酵母のミトコンドリアの活性、形態、分解がリンゴ酸、ピルビン酸の生産性と炭素フラックスなどの発酵特性に影響を与えることが報告されており、醸造酵母のミトコンドリアの電子伝達系の残活性が不飽和脂肪酸の生成効率に影響を与えるという可能性が考えられる。

そこで第5章では、発酵醪での酵母のミトコンドリア残活性と不飽和脂肪酸組成及びエステル生成の関係を解明する検討を行った。

まず、米麴と原料米のみの試験区、米麴と原料米に清酒酵母を添加した試験区を設定し、発酵醪中のパルミチン酸やオレイン酸のような不飽和脂肪酸の供給源は麴と原料米に含まれるリノレン酸や α -リノレン酸が供給源ではなく、清酒酵母が不飽和脂肪酸の供給源であることを明らかにした。次いで、培養液に流動パラフィンを重ねることで、空気中の酸素を遮断し、実製造に近い酵母の生育モデルを構築した。この生育モデルを用いアルコール醸造中の醸造酵母のミトコンドリア残活性の機能について検討したところ、清酒酵母の大部分のミトコンドリアが酸素を遮断後、徐々に断片化された。しかし、ミトコンドリアのある一定の部分は発酵開始から24時間経過しても管状のままであり、ミトコンドリアの膜電位差は嫌氣的に進行するアルコール発酵の間においても維持されることが明らかになった。さらに、ミトコンドリア膜電位の脱共役剤であるカルボニルシアニド-*m*-クロロフェニルヒドラゾンを用い、断片化されたミトコンドリアの残活性と脂肪酸合成について検討を行った。その結果、嫌氣的条件下では、清酒酵母の脂肪酸合成と脂肪酸の不飽和化は拮抗的な関係にあり、ミトコンドリアの残活性を抑制することで、脂肪酸の不飽和化が低下することが明らかになった。

第6章 麴菌由来のグルコシルセラミドに着目した醸造中の清酒酵母と麴菌の共生関係における検討

穀物を原料とするアルコール飲料では、麴菌が糖化酵素の供給源として用いられ、穀物のデンプンは糖化酵素の作用を受けてグルコースへと加水分解され、そのグルコースを用いて酵母はアルコール発酵を行う。

麴は、蒸煮した穀物に日本の国菌である *Aspergillus oryzae* や *A. kawachii* といった非病原性の真菌を生育させたものであり、麴はその製造過程において、様々な酵素を産生し、その酵素は穀物に含まれるデンプンやタンパク質、脂質といった高分子化合物の分解に利用さ

れる。

麴は多糖を単糖へと変換する酵素を分泌することが主な役割とされているが、微生物間で生じる可能性がある麴と酵母の相互作用など未だ明らかになっておらず、その相互作用にスフィンゴ脂質が関与していると推測した。

スフィンゴ脂質は、真核生物の中で偏在し、スフィンゴシン塩基に脂肪酸がアミド結合した脂質群の総称であり、この中にはセラミドやグルコシルセラミド(GlcCer)が含まれ、その構造は複雑でかつ多様な結合をもつことが報告されている。

このうち、グルコシルセラミドは様々な生理的機能を有するが、*S. cerevisiae* はグルコシルセラミドを保有していないことが報告されている。そこで第 6 章では、グルコシルセラミド生成微生物である麴菌とグルコシルセラミド非生成微生物の酵母の二つの微生物が共存する発酵醪で、麴菌 *A. kawachii* が作り出すグルコシルセラミドが酵母の生理的特性及び物理化学的特性に与える影響について検討を行った。

まず、麴から抽出した脂質を pH 調製した合成培地に添加し、培養試験を行った。中性域 (pH6.5) では脂質の有無に関わらず、生育に差が認められなかったが、アルカリ域 (pH8.0) では脂質を添加した試験区の方が無添加の試験区よりも有意に生育が認められた。次に、麴から抽出した脂質を HPLC により精製し、分画した脂質をそれぞれ添加し、pH8.0 における培養試験を行った。酵母にアルカリ耐性を付与した精製画分の構造推定のため、ESI-MS/MS に供したところ、*Aspergillus* 属が保有するグルコシルセラミドであることが示唆された。更に、酵母にアルカリ耐性付与に関わる構造を明らかにするため、大豆、小麦、マイタケ由来のグルコシルセラミドを添加し、pH8.0 で培養試験を行った。その結果、グルコシルセラミドを添加した試験区の全てで酵母にアルカリ耐性が付与されており、酵母のアルカリ耐性付与は幅広い構造選択性を持つことが示された。また、グルコシルセラミドの分解物がアルカリ耐性に寄与するか検討したところ、セラミドはわずかにアルカリ耐性を付与することが示唆された。

発酵醪における酵母へのグルコシルセラミドの主な供給源は麴であり、分泌したグルコシルセラミドは酵母の栄養源とならないため、発酵期間中醪中に大量に存在することが示された。また、グルコシルセラミドは酵母へアルカリ耐性を付与するだけでなく、エタノール耐性の付与、酵母の生成する香気成分プロファイルの改変に関与することが示された。その機構は、グルコシルセラミドは酵母の細胞膜を乱雑にし、アシル鎖の回転運動を促進することで、アルカリ耐性、エタノール耐性及び香気成分プロファイルの改変に寄与していることが示された。

以上の結果は新規酵母の育種開発やその選抜方法、清酒の香味の制御に応用することができ、これらの知見を活用することで清酒の多様性・差別化に貢献できることが期待される。

- 1) Kawase, Naoki, et al. "Different-batch metabolome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* based on gas chromatography/mass spectrometry." *Journal of bioscience and bioengineering* 117.2 (2014): 248-255.
- 2) Horie, Kenta, et al. "Breeding of a low pyruvate-producing sake yeast by isolation of a mutant resistant to ethyl α -transcyanocinnamate, an inhibitor of mitochondrial pyruvate transport." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74.4 (2010): 843-847.

※注1 博士論文要約はインターネットの利用により公表されるので、記載内容については十分注意してください。

※注2 特許、知的財産等に係る部分は記載しないでください。

※注3 全体で4頁～5頁を目処にしてください。

※注4 10.5ポイントで作成。（本様式を使用する。文字数、行数は変更しない。）