ゲノムから見た清酒酵母の特徴

清酒酵母は、実験室酵母や多くの醸造用酵母と同じく *Saccharomyces cerevisiae* に属しているが、高泡形成能、高いアルコール耐性、ピオチン非要求性などの点で他の *S. cerevisiae* とは異なる性質を持っている。著者らは、清酒酵母の持つ様々な特徴の一端を実験室酵母と清酒酵母のゲノムや遺伝子の解析と比較によって明らかにした。これら一連の分子生物学的手法を用いた研究の知見に基づいて、染色体末端領域の重要性、清酒酵母の進化、協会 6, 7, 9, 10 号の起源等に対する興味深い考察が展開されている。

下 飯 仁

1. はじめに

酵母は酒類の主成分であるエタノールを生産するだけでなく、様々な香味成分を生成することで製品の品質に決定的な影響を与えている。そのため、それぞれの酒類の製造には求められる品質に適した酵母が選択されて使用されている。清酒酵母は、他の醸造用酵母と同じ *Saccharomyces cerevisiae* に属しているが、高泡形成能、高いアルコール耐性、ビタミン要求性などの点で他の醸造用酵母とは異なる性質を持っている。これらの特徴はすべて清酒酵母のゲノムに書き込まれているはずである。したがって、1996 年に実験室酵母の全ゲノムの配列が発表されたことは、清酒酵母のような実用酵母の研究にも大きなインパクトを与えることとなった。実験室酵母の DNA 配列に基づいて清酒酵母の遺伝子をクローニングし、実験室酵母の配列と比較して、相違点を解析することも容易にできるようになった。また、DNA マイクロアレイのようなポストゲノムの解析手法を応用することも可能である。我々の研究室では、様々な手法を用いて清酒酵母の特性を遺伝子レベルで解析し、その結果を清酒酵母の育種に応用することを目標に研究を進めている。今回は、それらの研究の経過で得られた清酒酵母の特徴について解説したい。

2. 清酒酵母のゲノム解析

清酒酵母ゲノムの全体像を探るために、代表的な清酒酵母である協会 7 号酵母のゲノムを部分的に解析した。協会 7 号酵母からゲノム DNA を調製し、部分分解によって生じた断片をプラスミドベクターに連結し、得られたショットガンライブラリから約 20,000 個のクローンをランダムに抽出し、挿入断片の塩基配列を解析した¹⁾。得られた塩基配列からベクター配列を取り除き、実験室酵母のゲノムデータベース (*Saccharomyces* Genome Database) と比較した。解析した配列の合計塩基数は 8,600,000 塩基で、これは重複を考慮しなければ清酒酵母ハプロイドゲノムの約 0.6 倍に相当すると考えられる。解析の結果、協会 7 号酵母と実験室酵母 S 288 C のゲノムの相同性は約 99% であり、協会 7 号酵母と実験室酵母のゲノム配列はきわめて類似していることがわかった。*S. cerevisiae* 近縁種のゲノム解析の結果がすでに報告されているが、*S. cerevisiae* のゲノムとそれらのゲノムとの相同性は 80~90% である²⁾。清酒酵母の特性が他の *S. cerevisiae* と異なることから、清酒酵母を別の種と考える意見もあるが、以上の結果は清酒酵母が *S. cerevisiae* であることを再確認することとなった。しかしながら、協会 7 号酵母のゲノムには実験室酵母との

同一性が90%以下の配列も約2%含まれている。清酒酵母の特徴はゲノム全体に分布している一塩基変異や一部の低相同性遺伝子の中にあることが推定される。

3. 清酒酵母ゲノムのDNAマイクロアレイによる解析

DNA マイクロアレイとはゲノム上の全ての遺伝子に由来するDNA断片を担体上に付着させたもので、一般的には、ある生物の遺伝子発現の全体像である発現プロファイルの解析に使用される。DNA マイクロアレイをゲノムの解析に使用すると、染色体の一部や全体の欠失及び重複を検出することができる。すでに述べたように協会7号酵母と実験室酵母S 288 Cのゲノムの相同性が高いことから、実験室酵母用に作製された市販のDNA マイクロアレイをそのまま使用することが可能である。

DNA マイクロアレイを用いて協会7号酵母と実験室酵母X 2180（ゲノム解析株であるS 288 Cの二倍体株）のゲノムDNAにおける各遺伝子のコピー数を解析した結果、ほとんどの遺伝子についてはコピー数の比が約1であったが、いくつかの遺伝子についてコピー数に差が認められた³⁾。協会7号酵母の方がコピー数が少ない遺伝子として*CUP1*、*ENA1*及び*ASP3*が検出された。*CUP1*はメタロチオネインをコードしており、銅イオン耐性に関与していることが知られている。*ASP3*はアスパラギナーゼをコードしている。*ENA1*はP-type ATPaseをコードしており、ナトリウムイオン耐性に関与している。サザン解析によってこれらの遺伝子のコピー数を解析した結果、X 2180ではこれらの遺伝子が複数コピー存在するのに対して、協会7号酵母では1コピーしか存在しないことがわかった。これらの遺伝子のコピー数の差は表現型の変化をもたらすと考えられるが、実際に協会7号酵母はX 2180にくらべて銅イオン耐性及び食塩耐性が低いことが確認された。

逆に協会7号酵母の方がX 2180に比べてコピー数が多い遺伝子が第16番染色体右腕の末端にあるYPR 192 WからYPR 210 Wの領域に連続して存在していた。詳しい解析の結果、第16番染色体右腕の末端領域が第4番染色体右腕及び第13番染色体左腕の末端に転座していることがわかった。そのため、協会7号酵母ではこの領域のコピー数が3倍に増加して

いたのである。それではこのようなコピー数の増加は他の清酒酵母でも同様なのであろうか。他の清酒酵母について調べてみると、6号、9号、10号など現在清酒醸造で用いられている優良酵母は全てこの領域のコピー数が増加していることがわかった（第1図）。もちろん、これらの酵母の泡なし株等の変異株についても同様である。優良清酒酵母でこのような遺伝子のコピー数の増加が観察されることについては、以下のように2通りに考えることができる。第1には、この領域のコピー数の増加が清酒醸造に関して重要な役割を持っているために、コピー数が増加した株が選択されてきたという考えである。第2には、これらの優良清酒酵母が共通の祖先に由来しているため、その子孫であるこれらの株が共通の遺伝学的特徴をそなえているという考えである。現在のところ協会清酒酵母でコピー数が増加している領域に含まれている遺伝子が醸造にとってどのような機能を果たしているのかについては不明であるので、どちらの考え方がより妥当であるのかを決定することは困難である。

4. 清酒酵母の遺伝子発現のDNAマイクロアレイによる解析

それでは清酒酵母の遺伝子発現は実験室酵母の遺伝子発現とどのように異なっているのであろうか。遺伝子発現についても市販の酵母用DNA マイクロアレイを用いて、網羅的に解析することが可能である。もち

第1図 各種協会清酒酵母のYPR 192 W遺伝子（第16番染色体右腕）のゲノミックサザン解析
番号は協会清酒酵母の番号を示す。協会6, 7, 9, 10号酵母はYPR 192 W遺伝子を3コピー持っている。

ろん、実験室酵母に存在しない清酒酵母に特異的な遺伝子（以下に述べる *AWA1* や *BIO6*）については解析できない。清酒酵母協会7号と実験室酵母 X 2180 の遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて解析した結果、清酒酵母ではエルゴステロールの合成に関与している多くの遺伝子が高発現していることがわかった⁴⁾。実際、X 2180 は協会7号酵母に比べてエルゴステロール含量が低いこともわかった。エルゴステロールは細胞膜の主要な成分のひとつであり、エタノール耐性にも影響を与えることが知られている⁵⁾。実験室酵母と比較して清酒酵母でエルゴステロール合成系遺伝子が高発現している理由を検討した結果、X 2180 では転写因子 Hap 1 をコードする遺伝子に変異が生じているという報告があることがわかった⁶⁾。Hap 1 はエルゴステロール合成系遺伝子を含めた多くの遺伝子の転写制御に関わっていることから、この変異によって X 2180 のエルゴステロール合成系遺伝子の発現が低下していることが考えられた。一方、協会7号酵母の *HAP1* 遺伝子は正常であることがわかったので、正常な協会7号酵母の *HAP1* 遺伝子を X 2180 に導入したところ、形質転換体ではエルゴステロール合成系遺伝子の発現及びエルゴステロール含量が協会7号酵母とほぼ同等となった。このケースでは、清酒酵母の方が正常であり、標準と考えられていた実験室酵母の方に異常があったわけであり、菌株間の比較を行う場合には注意が必要である。

5. 清酒酵母のビオチン非要求性に関与する遺伝子

ゲノム解析の過程で我々は協会7号酵母が実験室酵母には存在しない遺伝子を複数コピー持っていることに気がついた（第2図）。この遺伝子は、ビオチン合成経路の遺伝子である大腸菌の *bioA* 及び *S. cerevisiae* の *BIO3* とホモロジーがあることから、*BIO6* と名づけられた。ビオチンはビタミンの一種であり、カルボキシ化酵素の補酵素として作用する。一般に *S. cerevisiae* はビオチンを合成できず、培地中に添加することが必要である。ワイン酵母やビール酵母などの清酒酵母以外の多くの醸造用酵母や実験室酵母がビオチンを生育に必要とする。ところが、協会7号酵母を含めた多くの清酒酵母はこれらの酵母とは異なりビオチンを生育に必要としないことが知られている⁷⁾。

1 2

第2図 *BIO6* 遺伝子の染色体サザン解析
協会7号酵母は *BIO6* 遺伝子を複数コピー持っている。
レーン1：X 2180（実験室酵母），レーン2：協会7号酵母

協会7号酵母に存在し、実験室酵母に存在しない *BIO6* は新規なビオチン合成経路の遺伝子である可能性がある。そこで、いろいろな醸造用酵母や実験室酵母について *BIO6* の存在とビオチン要求性を調べてみると、*BIO6* を持つ株はすべてビオチンを要求しないことがわかった。ワイン酵母やビール酵母などと代表的な実験室酵母には *BIO6* は存在しないが、清酒酵母や焼酎酵母は *BIO6* を複数コピー持っていた。*BIO6* の機能を調べるためには遺伝子破壊を行い破壊株の表現型を解析することが有効である。しかし、清酒酵母は *BIO6* を複数コピー持っているもので、それらを全て破壊することは困難である。そこで、*BIO6* を1コピーしか持っていない実験室酵母 A 364 A に着目した。A 364 A は清酒酵母と同様ビオチン非要求性である。A 364 A の *BIO6* を破壊した結果、破壊株はビオチン要求性となったので、*BIO6* が確かにビオチン合成に関与していることが確認された。清酒酵母がなぜ *BIO6* を複数コピー含んでいるのかは不明であるが、清酒醸造環境において何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。*S. cerevisiae* の近縁種には *BIO6* ホモログが存在していることを考えると、本来の *S. cerevisiae* は *BIO6* を保持しておりビオチン非要求性であったのだが、実験室酵母や清酒酵母以外の醸造用酵母では *BIO6* が脱落してしまったもの

第3図 Awa1タンパク質とYOL155Cの構造

Awa1タンパク質はYOL155CとYJR151Cとのキメラである。SP：シグナルペプチド，SRR：セリンリッチリピート，CTR：C末端リピート，GPI：GPIアンカーシグナル

と考えられる。

6. 高泡形成遺伝子

清酒酵母はもろみで高泡を形成するが、これは他の酵母では見られない清酒酵母だけの特徴である。現在ではもろみで高泡形成をしない変異株が各種の清酒酵母から育種され泡なし酵母として実用化されている。我々は高泡形成のメカニズムを解明する目的で泡なし酵母に高泡形成能を付与する泡あり酵母の遺伝子をクローニングし、*AWA1*と名づけた⁹⁾。*AWA1*遺伝子がコードするタンパク質は膜タンパク質の一種であるGPIアンカータンパク質の特徴を持っており、細胞壁グルカンに結合している。Awa1タンパク質は実験室酵母のYOL155Cタンパク質と類似した構造を持っているが、繰り返し配列の長さが異なること、N末端付近にYJR151Cタンパク質と類似した部分が存在するという点で実験室酵母には存在しない、清酒酵母独自の遺伝子に由来することがわかっている（第3図）。清酒酵母の*AWA1*遺伝子破壊株は泡なしとなることから、*AWA1*遺伝子は高泡形成に直接関与していることが明らかとなった。

Awa1タンパク質の構造と機能との関係を解析するためにいろいろな部分を欠失させた変異株を作製したところ、YJR151C部分とC末端のGPIアンカーシグナルを欠失させると高泡形成能がなくなることがわかった⁹⁾。また、これらの株では同時に酵母細胞表層の疎水性が低下していた。Awa1タンパク質を免疫染色して顕微鏡観察すると、高泡形成株及びYJR151C部分欠失株ではAwa1タンパク質が細胞表層に局在していたが、GPIアンカーシグナル欠失株では酵母細胞は染色されなかった。これらの結果か

第4図 協会701号酵母の*AWA1*遺伝子の構造

協会701号酵母の*AWA1*遺伝子は、協会7号の第IX番染色体のテロメア付近の配列が第XV番染色体の*AWA1*遺伝子の後半部分に転座した結果生じた。

ら、Awa1タンパク質は、YJR151C部分を含むN末端部分で泡と疎水結合によって結合し、C末端部分で酵母細胞に結合するものと考えられた。

以上の結果から、泡なし酵母では*AWA1*遺伝子に変異が生じていることが予想される。実際に泡なし酵母である協会701号酵母の*AWA1*遺伝子を調べてみると、染色体間の組換えによってAwa1タンパク質のC末端側が失われていることがわかった（第4図）¹⁰⁾。この結果、GPIアンカーシグナルが失われてAwa1タンパク質が酵母細胞の表層に固定されないために、酵母細胞が泡と結合ができずに泡なしとなったものと考えられる。

*AWA1*遺伝子について興味深いことの1つにその多様性があげられる。各種の清酒酵母の*AWA1*遺伝

子を PCR によって増幅してみると、PCR 産物の大きさは菌株によって異なっていることがわかった⁹⁾。清酒酵母は一般に極めて近縁であるために菌株の同定が困難であるが、*AWA1* 遺伝子の PCR によって菌株を同定することが可能である。*AWA1* 遺伝子の多様性はおそらく繰り返し配列の長さが菌株によって異なるためであると考えられる。

7. 清酒酵母の進化

清酒酵母の中で特に現在よく使用されている優良清酒酵母である協会 6, 7, 9, 10 号酵母には以下のような遺伝子レベルでの共通点があることがわかった。(1) *AWA1* 遺伝子の存在と高泡形成能, (2) *BIO6* の存在とビオチン非要求性, (3) 第 16 番染色体右腕末端領域のコピー数の増加。これらの性質に基づいて現在の清酒酵母がどのようにして進化してきたのかを考察することができる。最も古い変化は、清酒酵母以外の酵母において *AWA1* 遺伝子及び *BIO6* 遺伝子が脱落したことであろう。ほとんどの清酒酵母は両者共に保持しているが、大部分の実験室酵母と清酒酵母以外の醸造用酵母はこれらの遺伝子を持っていない。次に考えられるのは、清酒酵母の中に第 16 番染色体右腕末端領域のコピー数が増加した株が出現したことである。この点で、協会 6, 7, 9, 10 号酵母は共通しており、他の清酒酵母とは異なっている。最後に考えられるべきことは、*AWA1* 遺伝子の多様性である。協会 6, 7, 9, 10 号酵母の間でも *AWA1* 遺伝子の大きさは異なっている。これらの変化が生じた一方で、清酒酵母のゲノム上に生成酒の品質面に影響を与えるような変化が生じていることは十分に考えられることで

ある。興味深いことにこれらの遺伝子は全て染色体の末端付近に存在している。染色体の末端付近は染色体の転座などの変化が生じやすいことが知られている。清酒酵母間のゲノムの変化を概観するには染色体末端付近を解析することが有効な手段と考えられる。さらに、清酒酵母の進化が清酒醸造という酵母にとっての特殊な環境によるのかも興味をもたれるところである。今後は、清酒酵母の醸造特性をゲノムレベルで解析して、醸造特性とゲノムとの関係を明らかにすることによって、あらたな清酒酵母の育種の道が開けるのではないかと考えている。 <(独)酒類総合研究所>

参考文献

- 1) 呉洪ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 16 (2003).
- 2) Kellis, M. *et al.* : *Nature*, **423**, 241 (2003).
- 3) 荻原深ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 16 (2003).
- 4) Tamura, K. *et al.* : *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 159 (2004).
- 5) Inoue, T. *et al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 229 (2000).
- 6) Gaisne, M. *et al.* : *Curr. Genet.*, **36**, 195 (1999).
- 7) 高橋雅弘：農化, **28**, 398 (1954).
- 8) Shimoi, H. *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2018 (2002).
- 9) 清水正史ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 2 (2004).
- 10) Miyashita, K. *et al.* : *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, (2004).