【解説】

清酒酵母ゲノム解析の現状と 今後の応用

下飯 仁*1, 藤田信之*2

我々日本人にとって最も馴染みの深い微生物の一つである清酒酵母。そのゲノム解析が進展している。関連する研究所、企業、大学を総動員して進められているこのプロジェクトの成果が今後の醸造・発酵、さらには広くバイオテクノロジーに及ぼすインパクトに対する期待は高い。現時点で明らかになったその成果の一端を紹介する。

清酒（日本酒）は、米のデンプンを麹菌の酵素で糖化し、生じたグルコースを清酒酵母がエタノール発酵することで醸造される日本独自の酒類である。清酒の特徴はその芳醇な香りと味にあり、近年では日本食の普及ともあいまって諸外国でも多くの人々に楽しまれるようになってきた。清酒は他の酒類とは異なる優れた香味を有するが、製造技術の面でも様々な特徴をもっている。その一つは、米デンプンの麹菌酵素による糖化と清酒酵母によるエタノール発酵が同時進行することである。この発酵方法は、並行複発酵または Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) と呼ばれ、糖化によって生じたグルコースが速やかに酵母によって資化されるので、濃厚仕込が可能となり、高濃度のエタノール

ルを生成することができる。酒類は、エタノール発酵物をそのまま飲用に供する醸造酒と蒸留を行なう蒸留酒に分類されるが、清酒は世界の中でも最も高いエタノール濃度をもつ醸造酒の一つである。

なぜ清酒酵母ゲノムか

清酒酵母は、エタノールを生産するだけでなく、様々な香りや味の成分を生成することで清酒の品質に決定的な影響を与えている。したがって、清酒の醸造においては商品設計に基づいて適切な清酒酵母を選択することがきわめて重要である。清酒酵母は、他の醸造用酵母と同様 *Saccharomyces cerevisiae* に属しているが、他の酵母とは異なる特徴を数多く備えている。たとえば、清酒醪^{もちろみ}で発酵が旺盛なときには、発酵で生じた二酸化炭素の泡が容易には消えないので、時にはあふれ出してしまう。これを高泡というが、高泡形成は、清酒酵母を用いて清酒を製造したときのみ見られる現象であり、ビール酵母やワイン酵母など清酒酵母以外の酵母を使用して清酒を製造しても高泡は形成しない⁽¹⁾。この他にも、低温発酵性、高いエタノール耐性、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示す。もちろん、清酒らしい香味の生成も清酒酵母の特徴の一つである。した

Hitoshi SHIMOI, Nobuyuki FUJITA *¹独立行政法人酒類総合研究所, *²独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部

がって、清酒酵母は *S. cerevisiae* の中で他の菌株と分別可能なグループを形成していると考えられている⁽²⁾。

これらの清酒酵母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ので、清酒酵母のゲノムの塩基配列を知ることは、今後、清酒酵母の特徴を明らかにし、優れた清酒酵母を育種していくための重要なプラットフォームである。また、近年の DNA 塩基配列解析能力の進歩に伴い、数十種以上の各種 *S. cerevisiae* 菌株のゲノムを網羅的に解析して比較するというプロジェクトも国外で開始されている。筆者らは、日本の貴重な遺伝子資源の一つである清酒酵母のゲノムについては、ぜひ世界に先駆けて日本で解析し、世界に情報を発信したいと考えた。

清酒酵母ゲノム解析コンソーシアム

ゲノム解析には大きな研究資金と人員が必要とされるので、独立行政法人酒類総合研究所 (NRIB) から、清酒酵母に興味をもつ多くの研究者に対して共同研究を呼びかけ、多数の研究者のご賛同をいただいた。その結果、2005 年に NRIB を代表とする清酒酵母ゲノム解析コンソーシアムが設立された。このコンソーシアムには、表 1 に示すように、日本醸造協会、大学 10 グループ、公的試験研究機関 6 グループ、酒類製造メーカー 9 社の計 26 グループが参加し、日本で有数のゲノム解析能力をもつ独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) との共同研究で、清酒酵母のゲノム解析を開始した。ゲノム DNA の調製は NRIB が行ない、NITE がショットガンライブラリーの作製、シーケンシングおよびアセンブルを行なった。アセンブルの検証のための物理地図の作製、遺伝子アノテーションシステムとデータベースシステムの作製と運用は NRIB が担当し、遺伝子のアノテーションとその後の解析をコンソーシアムメンバー全員で分担した。

清酒酵母ゲノムのドラフト解析

清酒酵母のゲノムはすでにゲノム解析がなされている実験室酵母のゲノムと類似点が多いと予想され、またゲノムの完全解析には多大な資金と時間がかかることから、今回の解析はドラフトレベルとし、清酒酵母ゲノムの 95% 以上を解析することを目標とした。ゲノム解析を行なった清酒酵母は「きょうかい 7 号酵母」であり、昭和 21 年に醸造試験所 (現 NRIB) の山田、塚原らにより長野県の宮坂醸造株式会社から分離された優良清酒酵

表 1 ■ 清酒酵母ゲノム解析コンソーシアム参加グループ

グループ名	代表者
独立行政法人酒類総合研究所	下飯 仁
財団法人日本醸造協会	石川雄章
九州大学大学院農学研究科	久原 哲
山口大学工学部応用化学工学科	赤田倫治
東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻	北本勝ひこ
神戸市立工業高等専門学校応用化学科	芝崎誠司
東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻	太田明徳
東京工業大学大学院生命理工学研究科	梶原 将
菊正宗酒造(株)総合研究所	溝口晴彦
東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻	依田幸司
日本盛(株)	佐藤 要
東京農業大学醸造科学科	中里厚実
愛知県産業技術研究所食品工業技術センター	北本則行
白鶴酒造(株)研究開発室	山下伸雄
大関(株)総合研究所	広常正人
鹿児島県工業技術センター食品工業部	安藤義則
京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻	井上善晴
福岡県工業技術センター生物食品研究所	大場孝宏
月桂冠(株)総合研究所	浪瀬政宏
大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻	原島 俊
広島県立食品工業技術センター	谷本昌太
群馬県立群馬産業技術センター食品バイオグループ	増渕 隆
アサヒビール(株)酒類研究所	尾形智夫
サッポロビール(株)価値創造フロンティア研究所	佐藤雅英
キリンビール株式会社フロンティア技術研究所	小林 統
サントリー株式会社先進技術応用研究所	古久保進

(順不同)

母である。低温でも強い発酵力を示し、豊かな香味の清酒をつくることから、現在でも多くの清酒製造場で使用されている代表的な清酒酵母である。

DNA 塩基配列の解析は、ゲノムの多数の断片をランダムに読み取るホールゲノムショットガン法により行なわれた。財団法人日本醸造協会より提供されたきょうかい 7 号のゲノム DNA を用いて、インサート長の異なる 2 種類のプラスミドライブラリーおよび 1 種類のフォスミドライブラリーを作製し、インサート両端の塩基配列決定を行なった。ベースコールには Phred を用いて、合計 17 万リードの塩基配列を得た。Phrap を用いたアセンブルの結果、合計 979 個のコンティグが得られ、ゲノムの約 97% が解析されたものと推定された (表 2)。リンキングクローン情報からコンティグを整列化することで、17 個のスーパーコンティグが得られ、ちょうど *S. cerevisiae* の 16 本の染色体とミトコンドリアに対応し

表2 ■ 清酒酵母ゲノムのドラフト解析結果

リード数	170,784
平均リード塩基長 (Phred $\geq$ 20) (bp)	778
冗長度	9.1
コンティグ数	979
合計コンティグ長 (Mbp)	12.55
スーパーコンティグ数	17
スーパーコンティグに含まれるコンティグ数	222
スーパーコンティグ総塩基長 (Mbp)	11.83
ギャップを含むゲノム総塩基長 (Mbp)	12.17

ていた。しかし、染色体への対応がとれないコンティグもまだ多数残っている。これらの中には、繰り返し配列を含むものや二倍体であるきょうかい7号の相同染色体間のヘテロジェニティによってアセンブルされなかったものも含まれているものと考えられる。現在は、アセンブル結果の物理地図との照合による確認、コンソーシアムメンバーによるゲノム配列のアノテーションおよび機能解析が進められている。以下に、今回得られたきょうかい7号のゲノム解析結果の概要を示すが、現在、解析途中のものを含んでおり、今後、変更される可能性もあることをお断りしておきたい。

清酒酵母ゲノムの概要

今回のドラフト解析で得られたきょうかい7号のゲノムと実験室酵母 S288C のゲノムとの一致度を塩基配列レベルで計算すると 96.2% となり、両者はよく似ていることがわかった。染色体ごとに清酒酵母と実験室酵母のゲノムを比較すると、ほとんどの染色体で全領域にわたって対応がとれていた。しかし、第 V 染色体では一部に逆位が見られた。また、清酒酵母と実験室酵母の間で対応がとれない領域は、染色体の末端付近に多いことがわかった。清酒酵母は、他の醸造用酵母と異なる表現型

を多くもつことから、*S. cerevisiae* とは異なる種であるという議論もあるが、今回の結果は清酒酵母が *S. cerevisiae* であることを再確認したことになる。清酒酵母ゲノムから *in silico* でアミノ酸 100 個以上をコードする ORF を抽出したところ、5,697 個の ORF が抽出された。実験室酵母の 100 個以上のアミノ酸のタンパク質をコードする遺伝子の数 5,540 より多いが、機械的に抽出した結果なので、今後のアノテーション作業の進展によって減少する可能性がある。清酒酵母と実験室酵母で遺伝子の相同性をアミノ酸レベルで比較すると、図1に示すようにほとんどの遺伝子について 98% 以上一致していることがわかった。しかし、ホモロジーの低い遺伝子については、清酒酵母の特性に関連している遺伝子である可能性もあるので、今後、慎重な検討が必要である。

清酒酵母特異的遺伝子

今までの清酒酵母の遺伝子研究から、実験室酵母には存在しないが清酒酵母に存在する遺伝子がいくつか知られている。*AWA1* は清酒酵母の高泡形成に関与する遺伝子であり、ほとんどの清酒酵母に存在するが、実験室酵母や清酒酵母以外の醸造用酵母には存在しない⁽¹⁾。*BIO6* はビオチン生合成に関与する遺伝子であり、ほとんどの清酒酵母に存在するが、清酒酵母以外の酵母菌株は *BIO6* をもっておらず、ビオチン生合成ができないため培地中にビオチンを添加する必要がある⁽³⁾。また、今回のゲノム解析の結果、きょうかい7号にはエポキシド加水分解酵素とホモロジーをもつ新規遺伝子が存在することがわかった。この遺伝子を *EHL1* と名づけ、様々な酵母菌株における分布をサザン解析により調べた結果、図2に示すように、代表的な清酒酵母であるきょうかい6号、7号、9号、10号はいずれも2コピーの *EHL1* をもっていたが、実験室酵母や清酒酵母以外の醸造用酵母はほとんど *EHL1* をもっていないことがわかった。この遺伝子が清酒酵母においてどのような機能をもっている

図1 ■ 清酒酵母と実験室酵母の遺伝子がコードするタンパク質の相同性

図2 ■ *EHL1* のゲノミックサザン解析

きょうかい7号 (K7) などの清酒酵母は2コピーの *EHL1* をもっている。

図3 ■ 清酒酵母特異的遺伝子の染色体上の位置

○は *BIO6*, ■は *AWAI*, ●は *EHL1* を示す。

のかは現在のところ不明である。これら清酒酵母特異的遺伝子の位置をきょうかい7号の染色体上にプロットしてみると、図3に示すように、いずれも染色体の末端付近に位置していることがわかった。*S. cerevisiae* の近縁種のゲノム解析の結果からも、染色体末端付近の配列には変化が多いことが知られている⁽⁴⁾。染色体の末端付近では組換えや欠失などが生じやすいことも知られており、染色体末端は酵母菌株間の多様性の源泉になっていると考えられる。

清酒酵母の接合型関連遺伝子

清酒酵母は一般に二倍体といわれているが、ゲノム解析の結果からはどのようなことがわかったであろうか。今回のドラフト解析で行なったアセンブルは二倍体であることを考慮したものではないので、1種類のコンセンサス配列しか得られていない。二倍体の相同染色体間でヘテロザイガスな部分があってもそれは無視されるか、うまくアセンブルされなかった可能性がある。一例として、接合型遺伝子 *MAT*⁽⁵⁾ を調べてみると、コンセンサス配列としては *MATα* が得られていたが、スーパーコンティグにアセンブルされていない配列を慎重に解析した結果、完全な *MATα* も存在することがわかった。これは従来の知見とも一致するものであり、きょうかい7号は *MATα*/*MATα* の二倍体であることが確認された。

また、*S. cerevisiae* には、一倍体が細胞分裂のときに、*MATα* をもつ細胞から *MATα*, また *MATα* をもつ細胞から *MATα* の細胞が生じるという接合型転換のメカニズムをもっている株がある。接合型転換を行なう株を

図4 ■ きょうかい7号 (K7) の第IV染色体の *HO* 遺伝子

K7は36アミノ酸(522~557)に対応する108塩基の欠失がある。AB320はホモタリック株、S288Cはヘテロタリック株である。矢印はアミノ酸置換を示す。

ホモタリック、行なわない株をヘテロタリックという⁽⁶⁾。ホモタリックの株では孢子形成によって一倍体を分離しても、接合型変換とその後の細胞融合によって二倍体が生じることになる。きょうかい7号は、減数分裂によって形成率は低いものの孢子を形成し、孢子から安定な一倍体を取得することができるので、ヘテロタリックな酵母である。ホモタリック株は染色体の切断に関与するエンドヌクレアーゼをコードする *HO* 遺伝子を保持しており、ヘテロタリック株では *HO* 遺伝子が機能していないことが知られている。きょうかい7号の *HO* 遺伝子をゲノム配列から抽出して解析すると、図4に示すように欠失や塩基置換がみられ、機能を失っているものと考えられた。

相同染色体間のヘテロザイゴシティ

きょうかい7号は二倍体であるので、二本の相同染色体間には塩基の違いがあることが考えられるが、アセンブルに用いられた生データを見るとほとんど同一で、相同染色体間の相違(ヘテロザイゴシティ)はそれほど大きくないようである。しかし、もし二倍体の相同染色体間に広範なヘテロザイゴシティが存在するとすれば、減数分裂を伴う孢子形成によって得られた一倍体は、ヘテロザイガスな対立遺伝子の分離によって、様々な遺伝子型をもち、その結果として多様な形質を示すことが予想される。そこで、NRIBでは、きょうかい7号から孢子形成によって多数の一倍体を取得してその性質を解析した。その結果、得られた一倍体株は、発酵能や香気成分生成能などについて連続的な分布を示すことがわかった⁽⁷⁾。このことは、きょうかい7号の相同染色体間にはかなりの数のヘテロザイゴシティが存在し、減数分裂によってそれらが分離したものと考えられる。また、これらの性質は単一の遺伝子ではなく、複数の遺伝子による支配を受けていることが予想される。

他の清酒酵母のゲノム解析

今回のゲノム解析はきょうかい7号を用いて行なわれたが、清酒酵母には他にも、きょうかい6号、9号、10号などの多くの種類がある。また、最近では清酒の品質の多様化をめざして、花などの自然界から清酒酵母が分離され、使用された例もある。これらの酵母はそれぞれに特徴的な香りや味の清酒をつくるが、これらの特徴を遺伝子レベルで解析するためには、調べたい菌株のゲノム解析が必要になるのであろうか。清酒酵母は、他の *S. cerevisiae* 酵母と分別可能な一つのグループを形成しており、清酒酵母のゲノムは互いに類似していることが予想される。今回ゲノム解析を行なったきょうかい7号のゲノムを標準として、他の清酒酵母については相違する部分のみを抽出して解析すれば時間とコストの節約が可能である。最近では、*S. cerevisiae* 実験室株のゲノムを5 bpの間隔で網羅的にカバーしたタイリングアレイも市販されている。このアレイは1塩基の変異も検出可能であり⁽⁸⁾、清酒酵母と実験室酵母の相同性が高いことを考えると、清酒酵母の異なる菌株間でも塩基レベルでの変異が検出できることが期待できる。

清酒酵母のポストゲノム解析

ゲノム解析は清酒酵母の特性を理解するための大きな前進であるが、ゲノムの塩基配列を解析するだけで清酒酵母の醸造特性が理解できるようになるのであろうか。たとえば、酒類醸造にとって重要な性質であるエタノール耐性を考えてみると、この性質には200個以上の遺伝子が関与していることが報告されており⁽⁹⁾、しかもプラス、マイナスでは表わすことのできない連続量としての形質(量的形質)を示すことが知られている。きょうかい7号の一倍体の例が示すように、香りや味の生成などの醸造特性も多くの場合は量的形質であり、それらの形質は複数の量的形質遺伝子座(QTL)によって決定されていると考えられる。このような形質については、塩基配列の解析のみで原因遺伝子を解析することは困難であり、減数分裂に伴う染色体の連鎖を利用した解析が有効である。ヒトの病気の原因遺伝子および栽培植物や家畜の収量や品質を左右している遺伝子についてのQTL解析が行なわれ、大きな成果があがっている。酵母も減数分裂を行なう真核生物であるので、原理的にQTL解析が可能であり、エタノール耐性、薬剤耐性、細胞形態などに関するQTL解析が行なわれている⁽¹⁰⁾。筆者らも、すでに清酒酵母のゲノム配列を利用してDNAマーカー

を設定し、これを利用することで清酒酵母の香気成分の生成を向上させるQTLを見いだした⁽¹¹⁾。今回のゲノム解析の結果から、さらに詳細なQTL解析が可能になると考えられる。ポストゲノム時代を迎えた今後の清酒酵母研究では、個別の遺伝子に関する詳しい解析、各種清酒酵母菌株間のゲノム配列の相違の解析、トランスクリプトームやプロテオームなどの網羅的な解析、QTL解析を含む遺伝学的解析などの様々なアプローチが可能となる。今後、ゲノム解析の成果を活用することで、清酒酵母の醸造特性を左右する遺伝子が多数解明されることを期待したい。

文献

- 1) 下飯 仁：醸造協会誌, 97, 474 (2002).
- 2) 下飯 仁：食品工業, 50, 56 (2007).
- 3) H. Wu, K. Ito & H. Shimoi: *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 6845 (2005).
- 4) M. Kellis, N. Patterson, M. Endrizzi, B. Birren & E. Lander: *Nature*, 423, 241 (2003).
- 5) 中沢伸重：“清酒酵母の研究—90年代の研究”，清酒酵母麴研究会編，日本醸造協会，2003, p. 95.
- 6) 大嶋泰治：“酵母の解剖”，講談社サイエンティフィク，1981, p. 151.
- 7) 加藤 拓ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 187 (2007).
- 8) D. Gresham, D. Ruderfer, S. Pratt, J. Schacherer, M. Dunham, D. Botstein & L. Kruglyak: *Science*, 311, 1932 (2006).
- 9) S. Kubota, I. Takeo, K. Kume, M. Kanai, A. Shitamukai, M. Mizunuma, T. Miyakawa, H. Shimoi, H. Iefuji & D. Hirata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 968 (2004).
- 10) X. Hu, M. Wang, T. Tan, J. Li, H. Yang, L. Leach, R. Zhang & Z. Luo: *Genetics*, 175, 1479 (2007).
- 11) 浪瀬政宏ら：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 247 (2005).

くらしの中の化学と生物 3

ヒット食品開発の発想と技術

日本農芸化学会／五十嵐 脩・上野川修一 編

四六判／250頁／本体価格 1553円

ヒット商品のできるまで—その着想から食品素材の加工技術と製品開発までを解説！

【主要目次】 まえがき／＜食品の開発＞インスタント食品
一、インスタントラーメン／二、インスタントコーヒー／飲料 一、
ファイブミニの開発／二、烏龍茶と日本茶／レトルト食品／油脂
類 一、ファットスプレッド／二、はねない油／乳製品 一、チーズ／
二、ヨーグルト／調味料／＜食品素材、加工貯蔵技術の開発＞
甘味料 一、オリゴ糖／二、アスパルテーム／食物繊維／脱酸
素剤／高圧食品／エクストルダ―を利用した食品加工法

学会出版センター