

# ゲノムから見た清酒酵母の進化と醸造特性の解析

下飯 仁\*・赤尾 健・渡辺 大輔

酒類の製造にはさまざまな酵母菌株が使用されているが、それらの多くは分類学上 *Saccharomyces cerevisiae* に属している。しかし、同種の酵母ではあっても菌株ごとに醸造特性は異なっており、それぞれの酒類に適した菌株が使用されている。たとえば清酒酵母は、清酒もろみにおいて清酒固有の風味をつくりだすばかりでなく、他の酵母では得られないような高濃度のエタノールを生産する。現在使用されている清酒酵母は清酒醸造場から分離された菌株が基本となっているが、今後さらに高度な育種を行っていくためには、現在の清酒酵母がどのようにして生まれてきたのかという進化の過程と、清酒酵母の醸造特性を支配する遺伝子を知ることが重要である。ここでは、筆者らの研究室で行っているゲノム情報を用いた清酒酵母の進化過程および醸造特性の解析について紹介したい。

## きょうかい清酒酵母のゲノム解析

清酒酵母のゲノム解析のために酒類総合研究所は産官学26グループから構成される清酒酵母ゲノム解析コンソーシアムを結成し、さらにコンソーシアムと製品評価技術基盤機構との共同研究により清酒酵母きょうかい7号（以下K7）のゲノム解析を行った<sup>1)</sup>。K7は日本醸造協会から頒布されている代表的な清酒酵母であり、多くの育種株の親株ともなっている。ゲノム解析の結果、K7のゲノムと実験室酵母S288Cの染色体は、第5染色体と第14染色体の一部に存在する逆位構造を除いてきわめてよく対応しており、多くの遺伝子は塩基レベルで99%以上一致していた。しかし、逆に言えば、残りのわずかな違いの中に清酒酵母の特徴が潜んでいると考えられる。

今回のゲノム解析の結果から、清酒酵母のゲノムには存在するが実験室酵母S288Cのゲノムには存在しない遺伝子や、逆に実験室酵母のゲノムには存在するが清酒酵母のゲノムには存在しない遺伝子が見いだされた。たとえば清酒酵母の高泡形成にかかわる *AWAI*<sup>2)</sup> やピオチ

ン合成にかかわる *BIO6*<sup>3)</sup> は清酒酵母にのみ存在し、実験室酵母にはない遺伝子である。また、酵母のレトロトランスポソンである Ty 因子の染色体上での分布も清酒酵母と実験室酵母では大きく異なっていることがわかった<sup>4)</sup>。現在これらの変化が清酒酵母の特性にどのような影響を与えているのかを解析中である。

## きょうかい清酒酵母の系統と進化

*S. cerevisiae* にはさまざまな実用酵母や実験室酵母があり、それぞれ独自の進化を遂げてきたと考えられる。それでは、*S. cerevisiae* の各菌株の系統関係はどのようになっているのであろうか。近年、さまざまなゲノムワイドな解析手法を用いて各種酵母菌株の系統解析が行われるようになった。Azumi ら<sup>5)</sup> は AFLP 解析によって、清酒酵母、ワイン酵母、実験室酵母のグループがそれぞれ別のクラスターに分類され、独立に進化した系統であることを示唆した。しかし、清酒酵母群の中で現在よく使用されている K6, K7, K9, K10 の各酵母を分別することはできなかった。筆者らも、K7 と実験室酵母で醸造に相違のある多数の遺伝子を用いて清酒酵母の分別を試みたが、調べたすべての遺伝子について K6, K7, K9, K10 は同一の遺伝子型を示した<sup>6)</sup>。これらのことは、K6, K7, K9, K10 が系統的にきわめて近いことを示唆している。

現在、筆者らは清酒酵母の系統をさらによく解析する目的で、次世代シーケンサー（イルミナGAII）を用いた清酒酵母を主とする醸造用酵母の網羅的なゲノム解析を行っている。この解析で筆者らは、染色体の構造全体ではなく、塩基置換（SNP）に注目した解析を行っている。次世代シーケンサーを用いて得られた膨大な配列データをすでに全ゲノムが解析されている S288C または K7 と比較し、異なっている塩基を抽出してくるわけである。SNP データを2株の菌株で比較すると、2株間の塩基置換率を計算することができ、各菌株間の塩基置換率行列をもとに系統樹を作成することができる。すで

\* 著者紹介 独立行政法人酒類総合研究所醸造技術基盤研究部門（部門長） E-mail: simoi@nrib.go.jp

にLitiらは、部分ゲノム解析を行った多くの*S. cerevisiae* 菌株についてSNPに基づく系統樹を作成し、清酒酵母がワイン酵母や実験室酵母とは異なるクラスターを形成することを示した<sup>7)</sup>。しかし、Litiらによって示された清酒酵母クラスターは実際には主要な清酒酵母を含んでいなかった。筆者らは公開されているLitiらのデータと筆者らのデータを融合することで、Litiらの系統樹に筆者らが解析した酵母菌株を付け加えることを試みた。その結果、用いた清酒酵母と焼酎酵母のすべてが清酒酵母クラスターに含まれることが確認できた。また、その中でもK6, K7, K9, K10間の塩基置換率は非常に小さく、これらの菌株はきわめて小さなサブクラスターを形成していることがわかった。これらの菌株は分離された年代も地方も異なるが、非常に近い親戚関係にあることになる。したがって、現在使用されているほとんどの清酒酵母は系統的にきわめて狭い範囲の菌株に限られており、清酒の多様化を図る観点からは、もっと広い範囲の酵母菌株の中から清酒醸造に適した菌株をスクリーニングする努力が必要であると考えられる。

清酒酵母はヘテロタリックな二倍体であることから、相同染色体間で塩基配列に相違のある部分（ヘテロザイゴシティー）が存在することが予想される。K7のゲノム解析では一倍体としてのコンセンサス配列を求めたが、得られた配列情報を精査することでヘテロザイゴシティーを検出することができた<sup>8)</sup>。ヘテロザイゴシティーの染色体上での分布をグラフにしてみると、図1に示すように染色体上に均一に分布しているのではなく、ヘテロザイゴシティーの多い領域とほとんどない領域にわかれることがわかった。その他の清酒酵母についても、次世代シーケンサーによるゲノム解析データを用いてヘテロザイゴシティーの分布を調べてみると、K7と同様にヘテロザイゴシティーを持つ領域が染色体上に

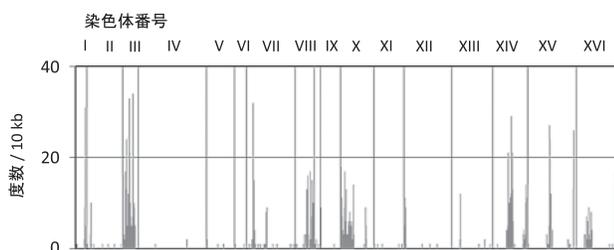


図1. ヘテロザイゴシティーの染色体上での分布。清酒酵母K7のヘテロザイゴシティーは染色体上に不均一に分布している。

不均一に存在していた。K6, K7, K9, K10では全体としてヘテロザイゴシティーのパターンは類似しているが、それぞれの菌株で異なる部分もあり、ヘテロザイゴシティーのパターンを解析することで、これらの菌株の同定ができることが示唆された。K6, K7, K9, K10のヘテロザイゴシティーのパターンについては、ゲノム配列の異なる2株が接合してヘテロ二倍体が生じ、その後のヘテロ性の喪失 (loss of heterozygosity, LOH) によって各菌株が生じたと仮定するとよく説明できる。

### 清酒酵母の醸造特性の原因遺伝子の解析

さまざまな酵母のゲノム配列がわかったとしても、それだけでは優れた清酒酵母の育種に利用することはできず、ゲノム配列の変化と醸造特性の変化との関連性を解明する必要がある。筆者らはこのために二つのアプローチで検討を行っている。一つは、清酒酵母に特徴的なゲノムの変化を検出し、それが醸造特性に与える影響を解析することである。このアプローチでは個々の遺伝子の解析が中心となる。もう一つは、遺伝統計学的手法によって表現型とゲノムの変化を結び付ける方法である。

**清酒酵母の変異の解析** Msn2p/Msn4pは熱、エタノール、浸透圧、活性酸素などのさまざまなストレスに対応して活性化する転写因子であり、多種類のストレス応答遺伝子の発現を誘導することが知られている。清酒酵母のゲノム解析から、K6, K7, K9, K10などの清酒酵母グループではMsn4pのC末端DNA結合モチーフが変異のため欠失していることがわかった。清酒もろみでは高濃度のエタノールストレスの存在が予想されるので、Msn4pおよびそのホモログであるMsn2pの制御下にある遺伝子の発現に興味を持たれた。そこで、Msn2p/Msn4pの結合配列を持つSTRE-*lacZ*レポーターを用いて、清酒もろみ中の酵母のSTRE依存的な遺伝子発現を比較すると、実験室酵母ではエタノール発酵の進行に伴い活性が顕著に増加したが、清酒酵母では活性上昇がほとんど認められなかった(図2)。さらに、清酒酵母または実験室酵母を用いて醸造した清酒もろみ中の酵母の遺伝子発現プロファイルの比較からも、清酒酵母と実験室酵母ではMsn2p/Msn4pが関与するストレス応答遺伝子の発現が大きく異なることがわかった。以上の結果から、清酒酵母はMsn2p/Msn4pを介した環境ストレス応答機能に著しい欠損を示すことがわかった。高いエ

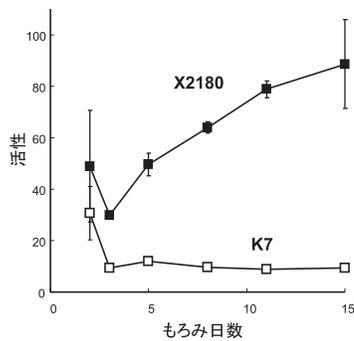


図2. 清酒もろみ中の酵母でのMsn2p/Msn4p 支配下にある遺伝子の発現. STRE-*lacZ*を用いて測定した.

タノール発酵力を示す清酒酵母でストレス応答が異常であることは意外であったが、実験室酵母の*msn2/msn4* 遺伝子破壊株は、高いエタノール感受性を示すにも関わらず、清酒もろみにおける発酵速度が大きいことから、清酒酵母における*msn4*機能欠失変異は清酒酵母の高発酵性の一因となっていると考えられる<sup>8)</sup>。

**清酒酵母はストレス感受性** 清酒酵母はMsn4pが機能せずSTRE支配下の遺伝子発現も低いとすると、清酒酵母は必ずしもストレス耐性が高くないことが考えられる。酵母細胞は、一般に増殖が旺盛な対数増殖期ではストレス感受性が高く細胞壁も薄い。そして、増殖が終了して定常期に入ると、酵母細胞はストレス耐性を獲得し、厚い細胞壁を持ったG0期(休止期)の細胞となる。最近の研究では、G0期の細胞は密度勾配遠心による浮遊密度が高くなっており、これがG0期のマーカーとなることが示された<sup>9)</sup>。一方、酵母細胞によるエタノール発酵は細胞増殖が終了した後でも継続するのが特徴である。清酒もろみにおいても細胞増殖が認められるのは発酵初期のみであり、発酵が盛んな中期以降の細胞は増殖を停止していると考えられる。清酒もろみにおけるエタノール発酵の主要部分が定常期の細胞で行われることから、筆者らは清酒酵母の定常期細胞の性質に興味を持った(図3)。

定常期細胞の状態を実験室酵母と清酒酵母で比較するために、YPD培地で振とう培養を行った細胞を用いて、浮遊密度とストレス感受性を調べた。その結果、実験室酵母は定常期に入ると報告どおりに浮遊密度が増加してストレス耐性も向上し、G0期に入ることが確認できた。しかし、清酒酵母は定常期になっても浮遊密度が増加せ

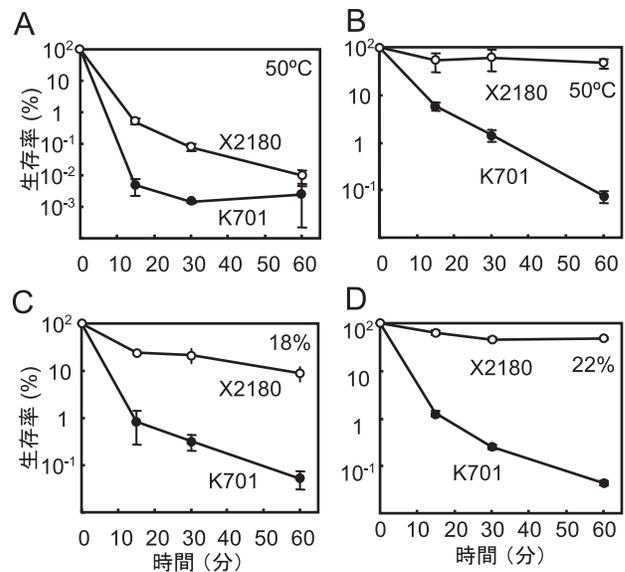


図3. 酵母のストレス感受性. 清酒酵母は定常期になってもストレス感受性が高い. K701: 清酒酵母, X2180: 実験室酵母. (A) もろみ2日目, 熱ショック, (B) もろみ10日目, 熱ショック, (C) もろみ2日目, エタノール, (D) もろみ10日目, エタノール.

ず、ストレス耐性も実験室酵母に比べて低いことがわかった。次に、実際の清酒もろみ中の酵母細胞について検討すると、上述の結果と同様に、実験室酵母は定常期には細胞の浮遊密度が増加し、ストレス耐性も上昇するが、清酒酵母では細胞の浮遊密度が増加せず、ストレス耐性も低いままであった。以上の結果から、清酒酵母は増殖が停止してもストレス耐性の高いG0期細胞になりにくいことがわかった<sup>10)</sup>。

清酒もろみでエタノール高発酵性を示す清酒酵母がストレスに弱いことは意外であるが、これについて筆者らは以下のような仮説を考えている。実験室酵母は、発酵によってある程度のエタノールを生産し増殖が停止すると、発酵力が低下すると同時にストレス耐性を高め、G0期細胞として長期間の生存が可能な状態となる。酵母自身の生き残りのためには過剰のエタノールの生産はむしろ不都合である。一方、清酒酵母はストレス応答の異常のために細胞増殖が停止してもG0期細胞になりやすく、エタノール発酵を続け、最後には自身も死滅してしまう。このような清酒酵母の性質は酵母自身にとっては好ましくないが、清酒醸造にとっては都合の良い性質である。清酒醸造の歴史の中で高発酵性を追求した結果、このような菌株が選択されてきたのではないかと考えられる。

**QTL解析** エタノールや香気成分の生産性などの

ような醸造特性は、連続した数値で示される遺伝形質であり、それらを支配する遺伝子座は量的形質遺伝子座 (quantitative trait locus, QTL) と呼ばれる。QTL解析はゲノム中のどの領域が量的形質に影響を与えているのかを決定する方法であり、表現型の異なる系統を交配し、多くの分離後代の遺伝子型と表現型の連鎖解析を行う。清酒酵母と実験室酵母は、*S. cerevisiae*の中で異なる系統に属しており、エタノールや香り成分の生成のような清酒醸造特性も大きく異なっている。筆者らは、清酒酵母と実験室酵母の醸造特性の違いを支配する遺伝子を解明する目的で、清酒酵母の一倍体と実験室酵母の一倍体との交配によるQTL解析を行った。まず、二倍体である清酒酵母K7から多数の一倍体を取得した<sup>11)</sup>。醸造特性に優れた清酒酵母一倍体と実験室酵母の一倍体を交配した後、胞子分離を行い、多数の一倍体を得た。得られた一倍体間ではエタノールや香り成分の生成量はさまざまであり、多数の遺伝子が関与していることをうかがわせた。得られた一倍体の醸造特性とDNAマーカーとの遺伝子型の連鎖解析を行い、醸造特性を支配する量的形質遺伝子座 (QTL) の解析を行った<sup>12)</sup>。その結果、発酵力や香り成分生成には複数のQTLが関与していること、そして、清酒酵母といえども醸造特性にマイナスに作用する遺伝子を保持していることが明らかになった。しかし、QTL解析では原理的に交配に用いた菌株に存在している遺伝子多型の影響しか検討することができない。この欠点を補うためには、さまざまな系統に由来する多様な菌株をもちいて表現型と遺伝子型の解析を行う

ゲノムワイド相関解析 (GWAS) が有効なのではないかと考えている。

### おわりに

次世代シーケンサーの登場によってゲノム解析の費用が劇的に低下し、多数の酵母菌株のゲノムを相互に比較することが現実に行えるようになってきた。このことは実用微生物の研究に大きなインパクトを与えられられる。菌株間の系統関係や有用変異株の変異をゲノムレベルで解析することが可能になってきたのである。今までは確認が困難であった菌株の同一性についても、ゲノム解析結果は明快な答えを出すことができる。ゲノムと表現型の関係の解析にはまだ多くの困難があるが、今後の解析技術の発展に期待したい。

### 文 献

- 1) 下飯 仁, 藤田信之: 化学と生物, **45**, 539 (2007).
- 2) Shimoi, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2018 (2002).
- 3) Wu, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7353 (2006).
- 4) Akao, T. *et al.*: *DNA Res.* (in press)
- 5) Azumi, M. *et al.*: *Yeast*, **18**, 1145 (2001).
- 6) 川上尚繁ら: 日本農芸化学会講演要旨集, 3P0874B (2009).
- 7) Liti, G. *et al.*: *Nature*, **458**, 337 (2009).
- 8) Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 934 (2011).
- 9) Allen, C. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **174**, 89 (2006).
- 10) Urbanczyk, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **112** (in press)
- 11) Katou, T. *et al.*: *Yeast*, **25**, 799 (2008).
- 12) Katou, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 383 (2009).