

酵母の代謝でお酒の酸味を変える

根来 宏明

清酒メーカーではお酒の味をコントロールする手法として、長年にわたり酵母の分離や育種を行ってきた。有機酸の代謝に特徴を持つ酵母もその一つである。清酒にはコハク酸、リンゴ酸、酢酸などの有機酸が含まれ、これらの含有量によって酸味のバランスが決まる。大部分は酵母が発酵中に生成するため、どのような有機酸生成能を持つ酵母を使用するかは、清酒の味を決めるうえで重要である。筆者はこれまでの研究において酵母の有機酸生成と遺伝子、代謝に関していくつかの知見を得たので、簡単に紹介したい。

清酒酵母と実験室酵母の有機酸生成

清酒醸造においては「清酒酵母」を使用することが一般的である。実験用によく使われる酵母（ここでは「実験室酵母」とする）と清酒酵母は同じ *Saccharomyces cerevisiae* でありながら、表現型は多くの点で異なっており、清酒酵母はアルコールや香り成分の生成能が高いことがよく知られている。近年、菌株間のゲノム比較が行えるようになり、これらの違いを生じる原因についてさまざまな研究が行われている。たとえば、清酒酵母がアルコールを高蓄積する原因として、プロテインフォスファターゼの経路に変異を持つことでアルコールストレスに「鈍感」になったためだと報告されている¹⁾。

エタノールや香りだけでなく、有機酸についても実験室酵母と清酒酵母では生成能が異なる。実験室酵母を使用して醸造を行うと、酸の生成が多く、特に酢酸の含有率が高い清酒となる。酢酸が高すぎると清酒の香りを悪くするため、この形質の違いは醸造に適した株を選抜してきた結果であると考えられるが、実は原因となる遺伝子や機構は知られていない。興味深いことに、*S. cerevisiae*

系統樹において、一般的な清酒酵母よりも実験室酵母にやや近いグループに位置する「きょうかい2号酵母」（1912年に月桂冠にて分離、100年酵母[®]と命名。）を用いて清酒醸造すると、清酒酵母よりもいくらか酸が多くなり、濃厚な酒質となる²⁾。これも詳細な要因は不明であるが、遺伝的バックグラウンドが影響していると考えられる。最近ではメタボローム解析やプロテオーム解析により、実験室酵母と清酒酵母では解糖系やTCA回路の代謝が異なることが明らかになりつつある³⁾。今後の研究によって有機酸生成に関する新たな知見が得られると期待される。

リンゴ酸高生産酵母の育種

酸生成に特徴を持つ清酒酵母の育種として、「リンゴ酸高生産酵母」の育種が多数行われている。有機酸は種類によって味が異なるが、リンゴ酸は爽やかな酸味を持つため、高生産させる対象となってきた。これまでに、コハク酸ジメチル (DMS) 感受性、シクロヘキシミド耐性、マルトース資化性、2,4-ジニトロフェノール耐性などを指標として、突然変異によりリンゴ酸高生産酵母を単離するさまざまな方法が報告されている (表1)。これらの得られた酵母について、高生産となる機構についても研究が行われており、たとえば、ミトコンドリア活性が低下することで有機酸をTCA回路で代謝しにくくなり、その結果、細胞質でリンゴ酸を蓄積したとの報告がある (図1a)^{8,9)}。

最近ではゲノムシーケンス技術の普及により、育種した株についてゲノム情報を得ることが比較的容易になっ

表1. 報告されているリンゴ酸高生産酵母の例

株名	分離方法	文献
きょうかい酵母No. 28	交配	4
きょうかい酵母No. 77	交配, シクロヘキシミド耐性	4
K-901H	DMS感受性	5
F-701H	DMS感受性	6
M20	マルトース低資化性	7
DRPN38	2,4-ジニトロフェノール耐性	8
15BY14-6	清酒もろみより分離	9

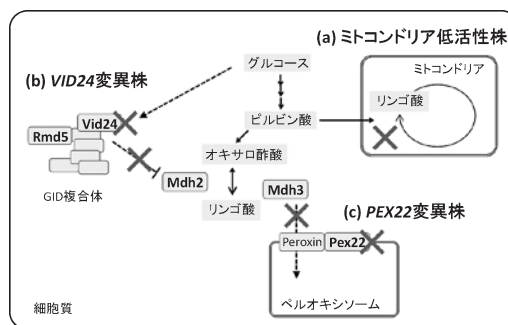


図1. リンゴ酸高生産の要因となる酵母細胞内の代謝変化

てきている。筆者らはいくつかのリンゴ酸高生産酵母についてゲノム情報を用いた解析を行ったので、その事例を以下にあげる。

リンゴ酸高生産酵母の遺伝子同定と代謝解析

例1. 糖新生制御因子 代表的な清酒酵母K-901を親株に、DMS感受性を指標としてリンゴ酸高生産酵母K-901Hを取得した。K-901Hをゲノムシーケンスに供し、K-901ゲノムと比較することで原因となる遺伝子の特定を試みた。解析の結果、K-901Hでは*VID24*遺伝子のミスセンス変異がリンゴ酸高生産をもたらす原因であった⁵⁾。Vid24pはGID (Glucose Induced Degradation deficient) 複合体の構成因子であり、GID複合体はグルコースの存在に応答して糖新生酵素を分解に導くE3ユビキチンリガーゼである。さらに解析を進め、K-901HはVid24pの機能を欠損することで、糖新生酵素の一つである細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (Mdh2p) を分解できなくなり、細胞質におけるオキサロ酢酸からリンゴ酸への反応が亢進されてリンゴ酸高生産になったと考えられた (図1b)。そこでLC-MSMSによる細胞内タンパク質の測定を行った結果、Mdh2pの蓄積を確認することができた。嫌気条件下の酵母細胞では、リンゴ酸はミトコンドリア内でクエン酸回路を介して生じるのではなく、細胞質側にてピルビン酸からMdh2pが触媒する経路により生じると報告されている¹⁰⁾。実際、好氣的に培養すると*VID24*変異株でのリンゴ酸蓄積はあまり見られなかったことから、Mdh2pの蓄積によるリンゴ酸高生産は、清酒醸造という嫌気条件において表現型が現れやすい形質だと推察される。

例2. 他のGID複合体 *VID24*欠損により、リンゴ酸高生産になったことから、他のGID複合体構成因子 (Vid30p, Rmd5p, Vid28p, Gid7p, Gid8p, Fyv10p) の欠損でも高生産になるのではないかと考えた。破壊株を用いて検証したところ、*VID30*, *RMD5*, *VID24*, *VID28*, *GID8*, *FYV10*を破壊した場合にそれぞれリンゴ酸高生産となった。*GID7*を破壊してもリンゴ酸生産能は変化しなかったことから、GID複合体の構成因子はそれぞれ糖新生酵素の分解における役割が異なっているのであろう。このときちょうど、日本醸造協会から頒布されているリンゴ酸高生産酵母No. 28およびNo. 77のゲノムを読んでいたので確認したところ、いくつかのGID遺伝子に変異を有していた。解析した結果、No. 28株は*VID24*のナンセンス変異、No. 77株は*RMD5*のナンセンス変異により、リンゴ酸高生産となったことが分かった¹¹⁾。*VID24*および*RMD5*の破壊株を用いたプ

ロテオーム解析の結果、リンゴ酸高生産となるGID遺伝子破壊株は互いに同様のタンパク質発現プロファイルを示したことから、No. 28株とNo. 77株でもMdh2pの蓄積により高生産になったと考えられた。K-901Hだけでなく、日本醸造協会の頒布酵母でもGID複合体の変異が関与していたことから、リンゴ酸高生産となる形質として生じやすい変異なのかもしれない。

例3. ペルオキシソーム制御因子 次に、DMS感受性を指標として得られたリンゴ酸高生産酵母F-701H (清酒酵母K-701の派生株であるF-701が親株) の例を紹介する。先述と同様にしてF-701Hをゲノムシーケンスに供し、F-701ゲノムと比較することで原因となる遺伝子の特定を行った。その結果、F-701Hは*PEX22*にナンセンス変異を有することで、リンゴ酸高生産になったことを見いだした⁶⁾。Pex22pはペルオキシソームの恒常性を維持するperoxinの一つであり、Pex4pなどと協調してペルオキシソーム内へのタンパク質輸送を制御している。ペルオキシソーム局在性のタンパク質が影響するのではないかと推察して機構の解析を行った結果、Pex22pの機能が欠損することでペルオキシソーム局在リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (Mdh3p) の局在が細胞質へ変化し、細胞質でのリンゴ酸生成が促進されていた (図1c)。糖新生制御因子 (*VID24*) とペルオキシソーム恒常性維持因子 (*PEX22*) という、まったく異なる役割を持つ遺伝子の変異であるのに、細胞質におけるリンゴ酸デヒドロゲナーゼの蓄積という現象が共通していたことは興味深い。

補足. 育種酵母の比較ゲノム解析 「微生物のゲノムを読んでも、遺伝子の特定までいかない」といった話をよく耳にするが、酵母の育種株におけるゲノム情報からの遺伝子特定は比較的取り扱いやすい部類に入るのはないかと思う。理由の一つとして、*S. cerevisiae*の多くの遺伝子は機能が特定されているため、どの変異が表現型に影響しそうか絞り込みやすいことがあげられる。また、醸造用の酵母を育種する場合、発酵力をなるべく落とさないように変異処理を強く掛け過ぎない (=ゲノム上での変異個所が少ない) 場合が多い。これらの理由により、ゲノムを親株と比較することで原因遺伝子を推定することが可能である。先にあげたK-901HやF-701Hの例では、親株に対してアミノ酸置換を伴う変異が数十~百個であったので、タンパク質の機能や変異個所から10個程度まで候補を絞り込み、運も味方してくれたことで原因遺伝子を特定することができた。一方で、上記以外の菌株でもゲノム解析を行ったところ、酵母が保有する6000超の遺伝子のうち1000個以上に変異を持つ株も

見受けられ、その後の解析が非常に大変であったために途中で諦めた株もある。いずれにせよ、ある程度の絞り込みを行った後も、実験にはそれなりの根気が必要であった。遺伝子破壊株コレクション (Thermo Scientific 社) を利用したハイスループットな系を組んだり、遺伝子機能をデータベースから自動抽出するプログラムを組んだりすることで、多検体でもやる気を失わずに済むだろう。閑話休題。

ゲノム解析結果の育種への活用

リンゴ酸高生産酵母の原因遺伝子をいくつか特定したので、清酒メーカーとしてはその情報を醸造に応用したいと考え、ゲノム情報を基にした酵母育種を試みた。K-901Hは二倍体であり、*VID24*変異をヘテロ接合型で有する。これより*VID24*変異によるリンゴ酸高生産は優性もしくは半優性の形質であると考えられたため、まず遺伝子組換えによりホモ接合型を作製して検証した。変異をヘテロ接合型よりもホモ接合型で持つほうが、リンゴ酸生産能が高くなったことから、半優性であった。そこで、清酒中のリンゴ酸をさらにコントロールすることを目的に、非遺伝子組換えによりK-901Hから*VID24*変異がホモ接合型となった株の選抜系を構築した。薬剤耐性の差やリンゴ酸生産性を指標として選抜を続けると(色々と試行錯誤したが、ここでは割愛)、ヘテロ接合性の消失により*VID24*変異がホモ接合型となったK-901H × 2株を取得した。K-901H × 2株で清酒醸造を行うとK-901Hの2倍のリンゴ酸を生産した。発酵する力も申し分なく、実用スケールでの醸造に耐えうる株であった¹²⁾。かなり多くのリンゴ酸を生成するため、K-901H × 2で醸造した清酒をそのまま味見すると、正直言って“一般的な日本酒”としては酸っぱ過ぎるのだが、ブレンド用や、酸味に特徴を持たせた清酒として活用価値があった。

以上より、ゲノム情報を基礎研究だけでなく、酵母育種に活用することができた。「育種酵母の原因遺伝子を調べて、どのように産業に役立ってるのか?」と聞かれたこともあるが、その質問に答える良い実例になったのではないかと思う。

おわりに

これまでに有機酸を高生産、あるいは低生産する酵母が数多く育種され、その機構も研究されてきたが、原因遺伝子が同定されていない株も数多く残っている。一方、カプロン酸エチル、フェルネソール、2-フェニルエチルアルコールなどの香りを高生産する酵母については、早期に原因遺伝子が同定されているものが多い(それぞれ*FAS2*¹³⁾、*ERG9*¹⁴⁾、*ARO4*¹⁵⁾)。これは、香り成分の生合成経路が比較的特定しやすいのに対して、有機酸代謝はさまざまな経路とリンクしているため遺伝子の特定が困難であったことが一因であろう。先に述べた通り、今日では育種した酵母を片端からゲノムシーケンスや発現解析に供することも可能であり(費用は掛かるが…)、その解析手法も日々進歩している。これまではメカニズムが未解明であったさまざまな酵母についても、徐々に明らかにされていくであろう。有機酸生成に関する新規な代謝制御を発見していくことで、より効率的・効果的な育種法の開発に役立てたい。

文 献

- 1) Watanabe, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e02083-18 (2018).
- 2) 堀田夏紀ら: 日本醸造学会大会講演要旨集, p. 8 (2019).
- 3) Uebayashi, K. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biot.*, **102**, 7071 (2018).
- 4) 吉田 清: 日本醸造協会誌, **90**, 751 (1995).
- 5) Negoro, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 665 (2016).
- 6) Negoro, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 211 (2018).
- 7) Asano, T. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 429 (2001).
- 8) Kosugi, S. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 39 (2014).
- 9) Oba, T. *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, **14**, 789 (2014).
- 10) Motomura, K. *et al.*: *J. Inst. Brew.*, **118**, 22 (2012).
- 11) 根来宏明ら: 日本醸造協会誌, **110**, 787 (2015).
- 12) Negoro, H. *et al.*: *J. Inst. Brew.*, **122**, 605 (2016).
- 13) Inokoshi, J. *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 90 (1994).
- 14) 特許第4236265号
- 15) Fukuda, K. *et al.*: *Curr. Genet.*, **20**, 453 (1991).