

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05800

研究課題名（和文）清酒酵母特異的遺伝子が酒質に与える影響

研究課題名（英文）The effect of sake yeast specific genes on properties of sake

研究代表者

中山 俊一（Nakayama, Shunichi）

東京農業大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：90508243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：清酒醸造に用いられる酵母を清酒酵母と称するが、清酒の酒質に影響を及ぼす遺伝子は清酒酵母では明らかになっていない。本研究では、清酒酵母に特徴的な遺伝子の破壊株を作製し得られた破壊株により清酒を醸造し酒質にどのような影響を及ぼすかを調べ、清酒酵母のみが有する遺伝子やビオチン生合成能が酒質に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

清酒酵母はワイン酵母と同様に *Saccharomyces cerevisiae* に属しゲノムレベルで極めて類似するものの、清酒酵母によって清酒を醸造するとワイン酵母など他の醸造酵母と異なり優れた呈味や香気を与える原因遺伝子については不明であった。本研究で得られた知見は、清酒醸造に適した酵母への育種やスクリーニングに応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The yeast used for sake brewing is called sake yeast. Sake yeasts are clearly distinguishable from other brewing yeast such as wine yeast based on the genomic and metabolites levels but the causative genes that make the difference in brewing characteristics is unclear. In this study, we disrupted genes characteristics for sake yeast and sake was brewed by using the disruptants. We demonstrated that the gene uniquely possessed in sake yeast and biotin biosynthetic ability of sake yeast plays an important role in sake quality.

研究分野：応用微生物学

キーワード：清酒酵母 清酒醸造 醸造特性 遺伝子破壊株

1. 研究開始当初の背景

清酒は麹菌により米のでんぷんが糖化されグルコースが生成された後、生成されたグルコースを清酒酵母が発酵することで醸造される。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の一種である清酒酵母はエタノールを生成するだけでなく、清酒中の有機酸・香気成分生成やアミノ酸組成など味や香りの成分の生成に関与する清酒の酒質を作用する最大の要因の一つであるため盛んに研究されてきた。*S. cerevisiae* は世界的に産業利用されワインやパンはもちろん国内では清酒・焼酎醸造に用いられており、それぞれの産業に利用される酵母やそれらを分離源とする酵母をそれぞれワイン酵母・パン酵母・清酒酵母・焼酎酵母と称しているが、これらの酵母により清酒を醸造した場合、各酵母毎に発酵能・香気・呈味成分生成能などに違いがあり酒質が変化する。特に、清酒酵母は吟醸香と呼ばれる清酒独特の香りを付与するカブロン酸エチル等の香気成分の生成に優れる。1,011 株の出芽酵母のゲノム情報を元に系統樹を作成すると、これらの酵母は産業別の酵母ごとに明確に分けられることが報告されているが、具体的にどの遺伝子が機能することで優れた醸造特性を生み出しているのかは不明であった。

これまでに清酒酵母は他の出芽酵母と比較して、細胞周期を制御する転写因子である *RIM15* に変異があると発酵能が高まることや細胞膜の脂肪酸を不飽和化する *OLE1* 遺伝子が高発現すること、細胞膜のステロールであるエルゴステロール量が多いこと、ビタミンの一種であるピオチン生合成能があること、清酒酵母だけが保有する epoxide hydrolase として機能することが推定されるが真の機能が不明な *EHL* 遺伝子が存在することなどの特徴が知られていたが、これらの遺伝子が香気や呈味といった酒質に影響を及ぼしているかは不明であった。

2. 研究の目的

前述の様に、出芽酵母 *S. cerevisiae* の中でも清酒酵母に特徴的な性質が知られているものの、これらの諸性質を担う遺伝子を破壊して清酒醸造する研究例は極めて少なくこれらの特徴が酒質にどのような影響を及ぼしているのかは調べられていなかった。そこで本研究では、(1)清酒酵母だけが保有する清酒酵母特異的遺伝子 *EHL* 遺伝子、(2)ピオチン生合成に関わる *BIO3* 遺伝子、(3)エルゴステロール生合成遺伝子の一つである *ERG24* 遺伝子、(4)細胞膜の脂肪酸を不飽和化する *OLE1* 遺伝子の破壊株を取得し清酒醸造することでこれらの遺伝子がどのように酒質に影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では清酒酵母を親株として遺伝子破壊株を取得した後に清酒醸造することで各遺伝子が酒質に及ぼす影響を調べた。清酒酵母は一倍体と二倍体で存在することが可能であり、遺伝子破壊し機能を調べるには一倍体株を親株として使用することが望ましいが、生育に必須な遺伝子である場合一倍体株では遺伝子破壊株を取得することが困難である。そのため、生育に必須でない *EHL* 遺伝子と *BIO3* 遺伝子の破壊株は清酒酵母 K701 を親株として取得した一倍体株を、生育に必須な *OLE1* 遺伝子と *ERG24* 遺伝子の破壊株の取得には二倍体株である K901 を親株として用いた。遺伝子破壊の方法は *EHL* 遺伝子と *BIO3* 遺伝子ではマーカール除去型ベクター pAUR135 を用いた。*OLE1* 遺伝子と *ERG24* 遺伝子破壊株では、オーレオバシジン耐性遺伝子を用いた相同組換え法により取得した。

清酒醸造には精米歩合 55% の山田錦を用いて総米 1kg にて 15 一定で酵母仕込み (三段) で行った。清酒中の一般成分分析は国税庁の所定分析法に従った。有機酸は HPLC (Hitachi 社)、香気成分は GC-MS (Agilent 社) を用いて分析した。細胞内の代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析時にはグルコース 10% を含む YM 培地で培養し、菌体から代謝物を抽出した後ヒューマンメタボロームテクノロジーズ社に依頼し解析した。

4. 研究成果

(1) 清酒酵母特異的遺伝子 *EHL* 遺伝子が酒質に及ぼす影響と *EHL* 遺伝子の機能解析

清酒酵母特異的遺伝子 *EHL* 遺伝子が酒質に及ぼす影響

清酒酵母中には *EHL* 遺伝子は 1 番染色体に 2 コピーと 11 番染色体に 1 コピーの合計 3 コピー存在していた。これらの 3 コピーの *EHL* 遺伝子を破壊するためマーカール除去型ベクター pAUR135 を用いて 3 回遺伝子破壊操作を繰り返すことで 3 コピー全ての遺伝子が破壊された株を取得した。この破壊株と親株として用いた一倍体株を清酒醸造した。その結果、日本酒度とアミノ酸度は親株と *EHL* 破壊株でほぼ同等であり、図 1 に示すようにエタノール生成能にも変化は見られなかった。総酸度は *EHL* 破壊株がやや低下し、各有機酸組成を調べたところリンゴ酸、乳酸、酢酸は有意差がなかったものの *EHL* 破壊株ではコハク酸生成量が約半分に低下していた。一方、香気成分に関してイソアミルアルコール量はほぼ同等であったものの、*EHL* 破壊株では酢酸イソアミル量が 35% 低下した。さらにはカブロン酸エチルも *EHL* 破壊株では親株と比較して 26% 低下した (図 1)。この様に、*EHL* 遺伝子はエタノール生成能には影響を及ぼさないもの

の、有機酸や香り成分等の酒質に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

EHL 遺伝子の機能解析

酒質に影響を及ぼすことが明らかとなった清酒酵母特異的な EHL 遺伝子は epoxide hydrolase をコードする遺伝子として推定されているが生体内での機能は不明であった。そこで、グルコース 10% を含む YM 培地で培養後、メタボローム解析によって網羅的に代謝物を比較しどの代謝経路が関係しているか推定した。その結果、EHL 遺伝子破壊株ではパントテン酸やピリドキシンといったビタミンが減少していることが見出された。そこでビタミンフリー培地にて培養したところ、EHL 破壊株は親株と比較して生育能が低下していた。ビタミンフリー培地にパントテン酸あるいはピリドキシンを添加して培養させたところ、ピリドキシンでは生育能は回復しなかったのに対してパントテン酸では生育能が回復した。Epoxide hydrolase としてどの触媒機能を有するかまでは明らかではないが、EHL 遺伝子はパントテン酸生成には関与する可能性が示唆された。

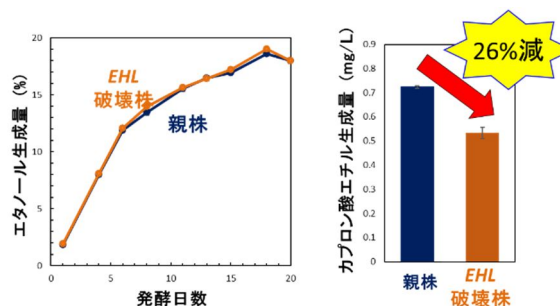


図1 EHL 遺伝子破壊株の醸造特性

(2) ビオチン生合成に関わる BIO3 遺伝子が酒質に及ぼす影響

出芽酵母 *S. cerevisiae* の多くはビオチン要求性であるのに対して、清酒酵母はビオチン非要求性であることが知られている。このことはビオチン生合成能が清酒醸造に重要であることが示唆される。そこで、ビオチン生合成遺伝子の内 1 コピーだけ存在する BIO3 遺伝子破壊株を取得し、清酒醸造しビオチン生合成能が酒質に及ぼす影響を調べた。

その結果、BIO3 破壊株は親株とほぼ同等のエタノール生成能を示した (図2)。一方、吟醸香の一つであるカプロン酸エチル生成量については BIO3 破壊株では親株のおよそ 40% に減少した (図2)。カプロン酸エチルは脂肪酸生合成の中間代謝物であるカプロイル-CoA とエタノールがエステル結合することで合成される。さらに、ビオチンは脂肪酸生合成に関わる初発の反応である acetyl-Co-A carboxylase の補酵素として機能することが知られており、ビオチン生合成能の低下によって脂肪酸生合成能が低下し、その結果カプロン酸エチル生成量が低下することが予想された。メタボローム解析により脂肪酸量を比較したところ、予想通り BIO3 破壊株ではカプロン酸 (C6)、カプリル酸 (C8)、カプリン酸 (C10)、ラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14) 等の脂肪酸量が減少していた。

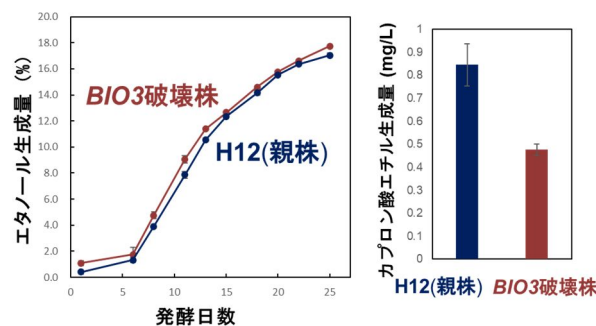


図2 BIO3 遺伝子破壊株の醸造特性

以上のことから、清酒酵母のビオチン生合成能は脂肪酸生合成能を高めることで吟醸香の成分であるカプロン酸エチル生成に寄与する可能性が示唆された。

(3) エルゴステロール生合成に関わる ERG24 遺伝子が酒質に及ぼす影響

出芽酵母 *S. cerevisiae* の細胞膜にはステロールの一種であるエルゴステロールが存在し、細胞膜の流動性等に関与する。清酒酵母では実験室酵母等他の酵母と比較してエルゴステロール含有量が多いことが知られているがこのことが酒質にどのような影響を及ぼしているかは明らかとされていない。そこで、エルゴステロール生合成に関わる ERG24 遺伝子の破壊株を取得し清酒醸造することでエルゴステロールが酒質に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。

当初、一倍体株を親株として遺伝子破壊株の取得を試みたもののエルゴステロールは生育に必須の遺伝子あり破壊株は取得できなかった。そのため二倍体株の清酒酵母 K901 を親株として、2 つの遺伝子の内一つだけを破壊し機能を低下させた遺伝子破壊株を取得し清酒醸造を行った。その結果、ERG24 破壊株では親株とほぼ同等のエタノール生成能を示した。一方、香り成分を比較したところ、ERG24 破壊株では酢酸イソアミルが 2.3 倍に増加することが見出された。このようにエルゴステロール生合成能は発酵能には影響を及ぼさないものの香り成分の一種である酢酸イソアミル生成量を抑える役割が示唆された。

(4) 脂肪酸不飽和化酵素をコードする OLE1 が酒質に及ぼす影響

細胞膜のリン脂質を構成する脂肪酸には飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の 2 種が存在する。清酒酵母においてはこの脂肪酸の不飽和化には OLE1 遺伝子が関与し、他の酵母と比較して OLE1 遺伝子が高発現することが知られている。このことは OLE1 遺伝子は清酒醸造に何らかの影響を及ぼすことが示唆される。OLE1 遺伝子破壊株も当初一倍体株を親株にして取得を試みたものの、生育に必須なため破壊株の取得には至らなかった。そこで、二倍体株の清酒酵母 K901 を親株として、ひとつの遺伝子だけを破壊し機能を低下させた株を作製し、清酒醸造した。

その結果、エタノール生成能だけでなく他の破壊株では生成量が変化した香気成分であるカプロン酸エチルや酢酸イソアミル生成量も親株とほぼ同程度であり変化がみられなかった。このことから、清酒酵母においては *OLE1* 遺伝子は高発現しているものの、これ自身が直接的に酒質に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 純平、清 啓自、門倉 利守、鈴木 健一朗、中山 俊一
2. 発表標題 酵母においてウラシル生合成能が TTC染色性に關与する原理の解明
3. 学会等名 第12回日本醸造学会若手シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大木 堯之, 桑山 翔一, 田中 純平, 門倉 利守, 鈴木 健一朗, 中山 俊一
2. 発表標題 転写因子 RDS2が清酒酵母と実験室酵母の発酵能に及ぼす影響
3. 学会等名 第12回日本醸造学会若手シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大木 堯之, 桑山 翔一, 田中 純平, 門倉 利守, 鈴木 健一朗, 中山 俊一
2. 発表標題 転写因子RDS2 が清酒酵母と実験室酵母の発酵能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山俊一、友永佳津子、森谷千星、田中純平、高瀬史織、鈴木健一朗、門倉利守
2. 発表標題 清酒酵母におけるピオチン生合成遺伝子BI03破壊株の代謝物
3. 学会等名 令和3年度日本醸造学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------