

## 清酒酵母の一俵体の取得と実験室酵母との交配による醸造 特性の遺伝解析

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者	加藤, 拓 下飯, 仁
巻/号	105巻8号
掲載ページ	p. 500-506
発行年月	2010年8月

# 清酒酵母の一倍体の取得と実験室酵母との交配による醸造特性の遺伝解析

清酒酵母の特性に関する遺伝学的背景は実験室酵母のそれに比べ複雑である。例えば高濃度エタノールや香気成分生成能など株間で連続した違いのある量的形質にはそれぞれに多数の遺伝子が関与しているため、関連する遺伝子の特定は困難である。その方法の一つとしてゲノム配列からの該当する遺伝子の特定があるが、もう一つのアプローチとしては酵母本来の有性世代を利用した交配による量的形質に関する遺伝子座の解析がある。ここでは後者に焦点をあて、著者らの研究を中心に解説していただいた。

今後、このようなアプローチがゲノム解析の成果と融合することによって醸造形質の遺伝解析に寄与するとともに、さらに広く種々の酵母にも展開されることにより、進化の系列の中で醸造形質の遺伝解析を捉えることが可能となることで酵母に潜在する新規有用遺伝子の発見につながることも期待される。

加 藤 拓・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成するばかりでなく様々な香味成分を生成し、酒類の品質に大きな影響を与えている。清酒醸造には清酒酵母が用いられるが、清酒酵母は分類学的には実験室酵母や他の醸造用酵母と同様 *Saccharomyces cerevisiae* に属している。しかし、清酒酵母は実際の醸造においても生理学的な性質においても他の酵母とは異なる特徴を数多く備えている<sup>1)</sup>。例えば、清酒酵母は清酒もろみにおいて他の酵母では得られないほど高濃度のエタノールを生成する。高泡形成能、低温発酵性、ピオチン非要求性なども他の酵母とは異なる性質である。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。実際上は、清酒酵母を用いなければ商品としての清酒をつくることができないと言っても過言ではない。最近の遺伝子レベルの研究からも、清酒酵母は *S. cerevisiae* の中で他の菌株と分別可能な一つのグループを形成していると考えられている<sup>2)</sup>。私たちの研究グループは、優れた清酒酵母を育種するための基盤として、清酒酵母の醸造特性を決定している因子を明らかにすることを目的として研究に取り組んでいる。

## 2. ゲノム解析だけでは醸造特性はわからない

では、何が清酒酵母の醸造特性を決定しているのかといえば、清酒酵母も生物である以上、それは清酒酵母に含まれているゲノムの他にはない。そこで、酒類総合研究所は、産学官の研究者による清酒酵母ゲノム解析コンソーシアムを結成し、(独)製品評価技術基盤機構との共同研究により、代表的な清酒酵母であるきょうかい7号のゲノム配列を解析した。得られたゲノム情報は近日中にデータベースとして一般に公開する予定である。解析の結果得られた清酒酵母のゲノムと、すでにゲノム配列が既知である実験室酵母 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、両株は非常に似ていることがわかった<sup>3)</sup>。しかし、実験室酵母で清酒を醸造してもエタノール濃度が低く香味が不良な清酒しか得られない。したがって、残りの3.8%の相違の中に清酒酵母と実験室酵母の醸造特性の違いが隠されていることになる。では、どのようにしたら清酒酵母の醸造特性を決定している遺伝子を見つけ出すことができるのだろうか。

私たちは現在二つの方法論でこの問題に取り組んでいる。一つは、清酒酵母と実験室酵母のゲノム塩基配

列を注意深く比較し、両者で相違のある遺伝子に着目し、その相違が醸造特性に与える影響を検討する方法である。ゲノム解析の結果、清酒酵母には存在するが実験室酵母には存在しない遺伝子、逆に実験室酵母には存在するが清酒酵母には存在しない遺伝子が見つかっている。また、タンパク質の構造に影響を与える変異も多数見つかっている。我々は、これらの遺伝子について注意深く解析を進めているところである。もう一つは、遺伝学の理論を利用して醸造特性に影響を与えている染色体領域を見つけ出そうという方法である。二つの方法は研究の方向性が異なっているが、互いに独立しているわけではなく、両者を組み合わせて研究を進めることが必要である。今回は、主に二番目の方法を用いて清酒酵母の醸造特性を解析した結果を紹介したい。

### 3. 量的形質と質的形質

酵母の醸造特性は、各菌株ごとに定まっており、遺伝的な性質（形質）である。生物の遺伝的形質は、質的形質と量的形質に分けることができる。質的形質はプラス・マイナスで表すことのできるデジタル的な形質であり、単一又は少数の遺伝子によって支配されている。酵母の場合、このような遺伝子については変異株の機能相補によるクローニングも可能である。例えば、清酒酵母の高泡形成能は質的形質であり、「泡あり」か「泡なし」のどちらかである。高泡形成に関与する遺伝子は、泡なし変異株を泡ありに変化させる遺伝子をライブラリからスクリーニングすることでクローニングされ、清酒酵母に特有の遺伝子であることが判明した<sup>4)</sup>。

しかし、生物の産業上有用な形質の多くは、複数の遺伝子によって支配されており、形質が連続的な値を示すことが知られている。ヒトの身長、体重、栽培植物の収量などが典型的であり、このような形質は量的形質と呼ばれ、それを支配する遺伝子座は量的形質遺伝子座（Quantitative Trait Locus: QTL）と呼ばれている。清酒醸造においてもエタノールや香气成分の生成量のような重要な性質の多くは、多数の遺伝子が形質の発現に関与しており、形質が連続的な値を示すと考えられている。

ゲノム情報を利用してQTLを解析する方法として連鎖解析が用いられている。QTLの連鎖解析では、

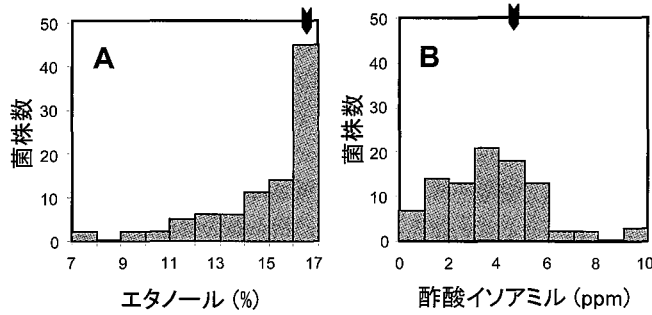
異なる形質を持った個体を交配し、その後の分離後代について、全ゲノム上に配置したDNAマーカーと表現型の連鎖を解析して、探索する遺伝子の位置を推定する。このQTL解析は植物や動物などの特性やヒトの病気の原因となる遺伝子の解析に用いられてきたが、酵母も減数分裂を伴う有性生殖を行うことから、QTL解析が可能である。

### 4. きょうかい7号の一倍体の取得と醸造特性の解析

QTL解析の第一段階として、我々はまずきょうかい7号酵母の一倍体の取得を試みた。きょうかい7号は二倍体であるので、相同染色体の同じ遺伝子座に塩基の相違（ヘテロザイゴシティー）がある可能性がある。実際にゲノム解析の結果を詳しく解析すると、きょうかい7号は多数のヘテロザイゴシティーを持つことが明らかになった。したがって、きょうかい7号から一倍体を分離すると、減数分裂に伴う組換えによって、個々の一倍体は、多数の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism: SNP）の組み合わせを持つことになり、様々な遺伝子型と表現型を示すことが期待される。そこで、我々は、きょうかい7号から多数の一倍体を取得し、それらを用いて清酒の小仕込試験を行い、醸造特性の比較検討を行った<sup>5)</sup>。

清酒酵母は孢子形成能がきわめて低いことが知られているが、我々は以下のような手法により、きょうかい7号の一倍体を取得した。まず、熱耐性を指標としたランダムスポア法により一倍体候補株1145株を取得し、一次スクリーニングとしてPCRによる接合型遺伝子の確認を行い、**a**型または**a**型の遺伝子型を示す候補株406株を選択した。二次スクリーニングとしてフローサイトメトリーによる核型解析を行い、一倍体のDNA量を示す候補株127株を取得した。三次スクリーニングとして標準一倍体との接合試験を行い、接合可能な100株を最終的な一倍体として取得した。核型解析のプロセスは必須であり、これを行わないと**a/a**型または**a/a**型の株を誤って一倍体として同定してしまう可能性がある。実際に、きょうかい7号の一倍体としてATCCに登録されている株にも**a/a**型の二倍体が存在する。

100株の一倍体それぞれについて3回の清酒小仕込試験を行い、醸造特性の比較検討を行った結果、得ら



第1図 きょうかい7号一倍体の醸造特性  
A: エタノール生成量、B: 酢酸イソアミル生成量  
矢印は親株の値

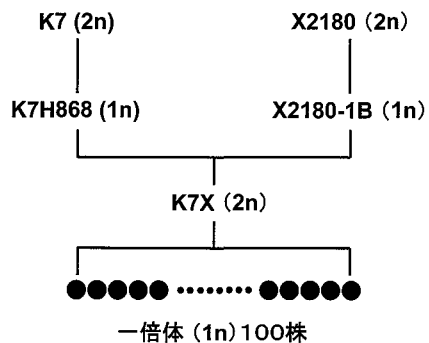
れた一倍体は、エタノール生産性や香り成分生成能などについて連続的な分布を示した(第1図)。これは、それぞれの醸造特性が複数の遺伝子の支配を受けており、それらの遺伝子に染色体間のヘテロザイゴシティーが存在しているため、減数分裂によって分離したSNPの組み合わせによって様々な醸造特性を持った株が得られたと考えられる。エタノール発酵力について親株より優れたものは得られなかったが、その他の分析項目については親株と異なる性質を持つ様々な株が得られた。また、エタノール生産性が高い株は、カブロン酸エチルを除く香り成分の生成能も高い傾向がみられた。酸度や酢酸イソアミルについても連続的な幅広い分布を示し、親株より有意に高濃度の酢酸イソアミルを生産する株も得られた。

注意すべき点は、得られた一倍体はいずれも増殖が親株よりよくないという点である。増殖に関連する遺伝子は多数あるが、それらに劣性変異が生じて、二倍体では正常遺伝子の存在によって隠されている。しかし、一倍体化することによって劣性変異の性質が表面に現れてきたと考えることもできる。きょうかい7号とその一倍体に存在するSNPを詳しく解析することは、きょうかい7号の進化の歴史を読むことに相当すると言えよう。将来的には、今回得られた多数の一倍体のSNPの遺伝子型と醸造特性との間の連鎖を解析することによって、醸造特性を支配しているQTLを同定することも可能である。また、得られた一倍体は多様な醸造特性を持っていることから、今後の清酒酵母の育種の材料としても利用可能であると考えられ

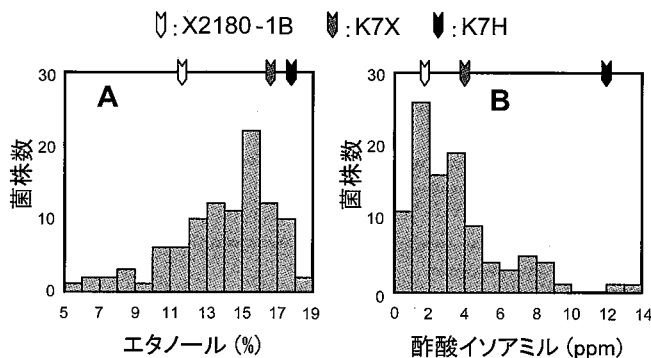
る。

## 5. 清酒酵母と実験室酵母の交配による醸造特性の解析

前述したように清酒酵母と実験室酵母の醸造特性は大きく異なっている。そこで次に、清酒酵母と実験室酵母の交配を行い(第2図)、子孫株の遺伝子型と醸造特性との関係を解析した<sup>6)</sup>。先の研究できょうかい7号から分離した一倍体の中で親株と同程度の醸造特性を有する株(K7H868)と実験室酵母一倍体株X2180-1Bとの交配株(K7X)を作製した。K7H868はX2180-1Bよりエタノールや香り成分の生成量が優れていたが、交配株K7Xは殆どの醸造特性に関してK7H868とX2180-1Bの中間的な特性を示した(第3図)。さらに、K7Xを孢子形成させて四分子分離を行



第2図 きょうかい7号と実験室酵母の交配と一倍体の取得



第3図 交配一倍体の醸造特性  
A: エタノール生成量、B: 酢酸イソアミル生成量  
矢印は親株の値

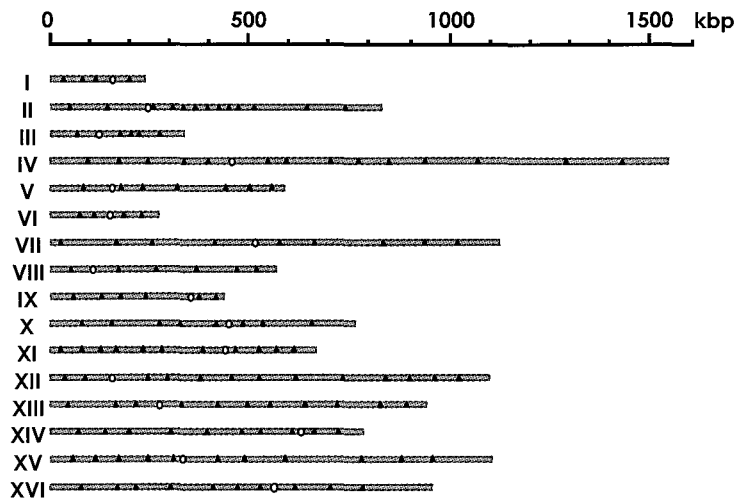
い、25個の四分子から100株の一倍体を分離した。興味深いことに、きょうかい7号の孢子形成率は著しく低い、K7Xは高い孢子形成率を示した。これは、きょうかい7号の低孢子形成能が遺伝学的に劣性であることを示している。これらの一倍体の接合型遺伝子座(MAT)の遺伝子型を決定した結果、MATa: MATαは2:2に分離し、少なくともMAT座に関しては染色体が正常に分配されていることが示された。100株の一倍体の醸造特性を清酒小仕込試験(総米200g、一段仕込)により解析すると、各一倍体は多様な醸造特性を示し、多くの醸造特性が複数の遺伝子によって支配される量的形質であることが明らかになった(第3図)。K7の一倍体の結果と同様にエタノール生成量は山型の連続的な分布を示したが、今回解析した100株の中からは親株であるK7H868より有意に発酵力の高い株は取得することはできなかった。一方、重要な香り成分である酢酸イソアミルについても山型の連続的な分布を示したが、K7H868より有意に生成量の多い株あるいはX2180-1Bよりも生成量の少ない株など様々な株を取得することができた。解析した醸造特性の遺伝率を計算すると0.8以上となり、醸造特性は主に遺伝的要因により支配されることが示唆された。また、MATaとMATαの菌株間で醸造特性に有意な差は観察されなかった。

### 6. 醸造特性のQTL解析

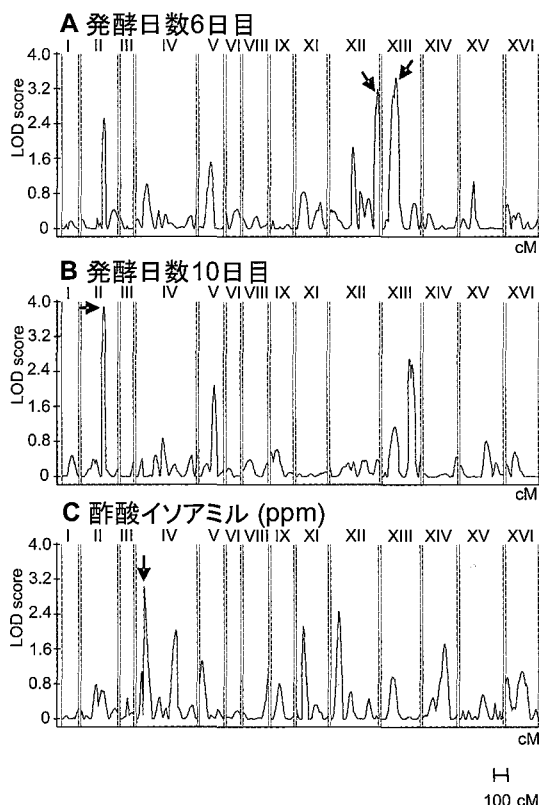
清酒酵母と実験室酵母の交配株の孢子形成とそれに

伴う減数分裂によって、各一倍体の染色体は清酒酵母に由来する部分と実験室酵母に由来する部分がモザイク状になっている。したがって、各一倍体の染色体の各部分について清酒酵母に由来するのか実験室酵母に由来するのかを決定できれば、それらのデータと醸造特性との連鎖解析が可能となる。著者らは、月桂冠株式会社との共同研究により、清酒酵母に由来する配列と実験室酵母に由来する配列を分別できるゲノムワイドなDNAマーカーを142個設計した(第4図)。これらのDNAマーカーは主にゲノム上の繰返し配列であり、ゲノムDNAのPCR反応によって、清酒酵母に由来するのか実験室酵母に由来するのかを決定できる。実際に、100株の一倍体について各々142個のDNAマーカーの遺伝子型が清酒酵母型かあるいは実験室酵母型であるかを決定したところ、殆どのDNAマーカーは2:2に分離したが、第7番染色体と第10番染色体では不規則な分離が観察されたので以後の解析ではこれらの染色体は除外した。

100株の一倍体のDNAマーカーの遺伝子型と清酒小仕込試験の結果からソフトウェア(Win QTL Cartographer Ver.2.5)を用いて連鎖解析を行った<sup>6)</sup>。その結果、エタノール発酵力や酢酸イソアミルの生産性に関与するものを含め統計的に有意なQTLを25個同定することができた(第5図)。発酵日数6日目のエタノール発酵力のQTLは第12番染色体と第13番染色体で、10日目の発酵力のQTLは第2番染色体で同定され、発酵が進むにつれ同定されるQTLが変化



第4図 使用したDNAマーカーの物理地図  
 三角印はDNAマーカーのS288Cゲノム上における位置を示す。  
 全部で142個、白丸はセントロメア。

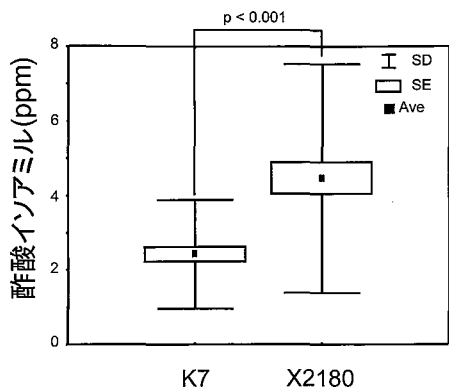


第5図 交配株の醸造特性のQTL解析  
 A, B: エタノール発酵力のQTL, C: 酢酸  
 イソアミル生成量のQTL  
 矢印は統計的に有意なQTLを示している。

することがわかった。これは、発酵に伴い清酒もろみ中のエタノール濃度が徐々に高くなることから、それに伴い関与する遺伝子も変化するためと予想された。また、酢酸イソアミル生成量のQTLは第4番染色体で同定された。興味深いことに、エタノール発酵力に関して発酵日数10日目の第2番染色体のQTLでは清酒酵母型のアレルで発酵力が高くなるが、6日目の第12番染色体と第13番染色体のQTLでは実験室酵母型のアレルで発酵力高くなるという結果になった。同様に、第4番染色体で同定された酢酸イソアミルのQTLについて、100株の一倍体をQTL近傍のDNAマーカーの遺伝子型で分類して酢酸イソアミルの生産性の分布を解析すると、清酒酵母型は  $2.42 \pm 1.45$  ppm、実験室酵母型は  $4.45 \pm 3.07$  ppm となり、実験室酵母型アレルの方が酢酸イソアミル生産性が2倍程度高くなった(第6図)。以上の結果は、本来醸造特性に優れている清酒酵母と言えども、清酒醸造にマイナスになる遺伝子を含んでおり、まだ遺伝的に改良の余地があることを示している。

## 7. 原因遺伝子の推定

清酒醸造の後期では、もろみ中のエタノール濃度が20%近くにもなることが知られている。今回の連鎖解



第6図 第4番染色体の酢酸イソアミル QTL 近傍 DNA マーカーの遺伝子型と表現型  
 K7: 清酒酵母型のアレルを持つ一倍体、  
 X2180: 実験室酵母型のアレルを持つ一倍体

析でエタノール発酵力に関する QTL が複数同定されたが、このうち発酵中期から後期に同定されたものは、酵母のエタノール耐性に関与することが予想される。そこで、発酵日数 6 日目と 10 日目に同定された QTL 領域に関して、エタノール耐性との関連性が報告されている遺伝子を探索した。その結果、6 日目の第 12 番染色体の QTL 領域には *TSR2* (a protein with a potential role in pre-rRNA processing) と *VPS36* (a component of the ESCRT-II complex) が、第 13 番染色体には *MSN2* (a transcription factor that regulates many genes induced by a number of stresses including ethanol stress) が候補遺伝子として含まれることがわかった。また、10 日目の第 2 番染色体の QTL 領域には *VPS15* (myristoylated serine/threonine protein kinase that is involved in vacuolar protein sorting) が含まれていた。今後はこれらの遺伝子がエタノール耐性だけでなく発酵力にも影響を与えているのかを検討する予定である。

## 8. おわりに

近年、栽培植物や家畜の量的形質について DNA マーカーを利用した連鎖解析が行われるようになり、産業上重要な QTL が数多く同定され、育種に利用されるようになってきた。酵母でも QTL 解析の報告が増えてきたが<sup>7)</sup>、産業用酵母での解析例はまだ少ない。

著者らは、清酒酵母と実験室酵母の清酒醸造での特性の違いを検討するためにゲノムワイドに設計した DNA マーカーを用いた連鎖解析を行い、醸造特性に関与する 25 個の QTL を同定した。今後は同定した QTL 領域から原因遺伝子及び変異点を特定することが課題となるが、その特定は困難なことが予想される。それは、一つには、QTL 解析の解像度はそれほど高くなく、QTL 領域に数十個にも及ぶ遺伝子が含まれており、そのどれが原因遺伝子であるかを決定しなければならないからである。また、今回の解析では一つの醸造特性 (例えば発酵力) を決定している個々の QTL の寄与率が低いため、原因遺伝子を変化させても醸造特性の変化が小さいと考えられることも、原因遺伝子の同定を困難にしている。しかしながら、今回の研究で、発酵力や香气成分生産能がたしかに複数の QTL によって支配されており、さらに清酒酵母も醸造特性に対してマイナスに作用する遺伝子を持っていることを明らかにしたことの意義は大きいと考えている。

もう一つ考慮しなければならないのは、QTL 解析は交配に用いた 2 株の特性の差異を説明することしかできず、解析に使用した株間で元々変異がない遺伝子については解析の対象とはならないことである。したがって、醸造特性に重要な影響を与える遺伝子がすべて同定できるということにはならない。この問題を乗り越える方法として、様々な系統に由来し特性も異なる個体の遺伝子型と表現型との相関解析が考えられる。これは、ヒトの遺伝病の解析でよく使用されている手法であり、最近では動植物にも応用が広がっている<sup>8)</sup>。相関解析では生物の進化も考慮に入れる必要があり、さらに複雑な解析が必要であるが、ゲノム解析技術が急速に進歩していることから、今後有力な解析手法となることが期待できる。

本報では清酒酵母と実験室酵母の醸造特性に着目して遺伝学的な解析を行ったが、得られた知見が今後の清酒酵母研究の発展に貢献できることを期待したい。

(独立行政法人酒類総合研究所)

## 参考文献

- 1) 下飯仁: 最新の清酒酵母研究—遺伝子から見た清酒酵母の特徴—, 食品工業, 50, 56~61 (2007)

- 2) 後藤奈美：実用酵母の'飼い慣らし'の歴史を遺伝的多様性から探る, 醸協, **103**, 418 ~ 425 (2008)
  - 3) 下飯仁ほか：清酒酵母ゲノム解析の現状と今後の応用, 化学と生物, **45**, 539 ~ 543 (2007)
  - 4) 下飯仁：清酒酵母の高泡形成に関与する遺伝子 *AWA1*, 醸協, **97**, 474 ~ 480 (2002)
  - 5) Katou, T. *et al.*: Brewing characteristics of haploid strains from the sake yeast *Kyokai no.7*, *Yeast*, **25**, 799 ~ 807 (2008)
  - 6) Katou, T. *et al.*: QTL mapping of sake brewing characteristics of yeast strains, *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 383-393 (2009)
  - 7) Steinmetz, L. M. *et al.*: Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast, *Nature*, **416**, 326 ~ 330 (2002)
  - 8) Zhu, C. *et al.*: Status and prospects of association mapping in plants, *The Plant Genome*, **1**, 5 ~ 20 (2008)
-