

研究課題：静岡河津桜由来清酒酵母のゲノム解析にもとづく分子育種

(研究代表者)

静岡県立大学 食品栄養科学部

准教授 河原崎 泰昌

【背景と目的】

静岡県酒造組合は 27 の酒蔵で構成され、毎年複数の酒蔵が全国新酒鑑評会で金賞・入賞を受賞するなど高い技術水準にある。静岡県工業技術研究所沼津工業技術支援センター（以下、県沼津工技セ）は、故河村伝兵衛氏による静岡酵母開発より連綿と続く卓越した酒造酵母の開発研究拠点であり、優れた酵母株を酒蔵に提供してきた。県沼津工技セの勝山主任研究員らは、早咲きで有名な河津桜の花から清酒製造に適した酵母株を単離し、育種を重ねてきた。試験醸造は全国紙にも大きく取り上げられた（図 1）。さらに、同酵母を用いた清酒は高嶋酒造により“かわづの春”として製品化され（図 2）たほか、富士錦酒造の新銘柄「サクラノカガヤキ」に使われて大きく報道され（静岡新聞 H30. 5. 20）るなど、話題性に富んだ製品となっている。

一方、河津桜酵母はアルコール発酵能が弱く、低いアルコール度数（12%）で発酵が終了し、酵母に利用されない糖が残る。すなわち、発酵後に加水して味を調べ、淡麗な飲み口にしたりと、バリエーションを持たせるのが比較的困難である。

そこで本研究は、さらなる話題性のある商品の開発のため、より発酵能の強い株や視覚的特徴を有する株の開発に向け、ゲノム情報に基づく分子育種のための基盤を形成することを目的とした。



図 1 試験醸造の際の報道（毎日新聞社）



図 2 高嶋酒造「かわづの春」（同社 HP）

【方法等】河津桜酵母は、沼津工技セより分譲された NMZ004 株を用いた。培養には、実験室酵母で標準的に使用される栄養培地および胞子形成培地を用いた。酵母の形質転換はエレクトロポレーション(ギャップ幅 2 mm、印加電圧 1.5 kV) または Zymoresearch 社製 Frozen EZ Yeast Transformation kit II を用いて行った。マーカーとして Aureobasidin A 耐性遺伝子である Aur1 遺伝子 (takara 社 pAUR112 由来) を用い、形質転換体は Aureobasidin 含有培地での生育により選択を行った。その他、断りの無いかぎり、分子生物学的、遺伝子工学的手法は多くの実験室で一般的に使用される方法を用いて実験を行った。

【結果等】

1. 河津桜酵母 NMZ004 株の全ゲノム塩基配列決定

共同申請者の小谷 (静岡大) は、同大道羅らの協力を得て、河津桜酵母の全ゲノム配列を決定し、蛋白質コード領域のマッピングを行った。概要を図 3 に示す。この結果、河津桜酵母 NMZ004 株は、広く用いられている標準的な実験室酵母 (パン酵母由来) S288c 株とほぼ同一の染色体構造をもっており、全ゲノムの配列比較では 99% の配列一致度を示した。顕著な染色体転座や遺伝子重複は見つからなかった。

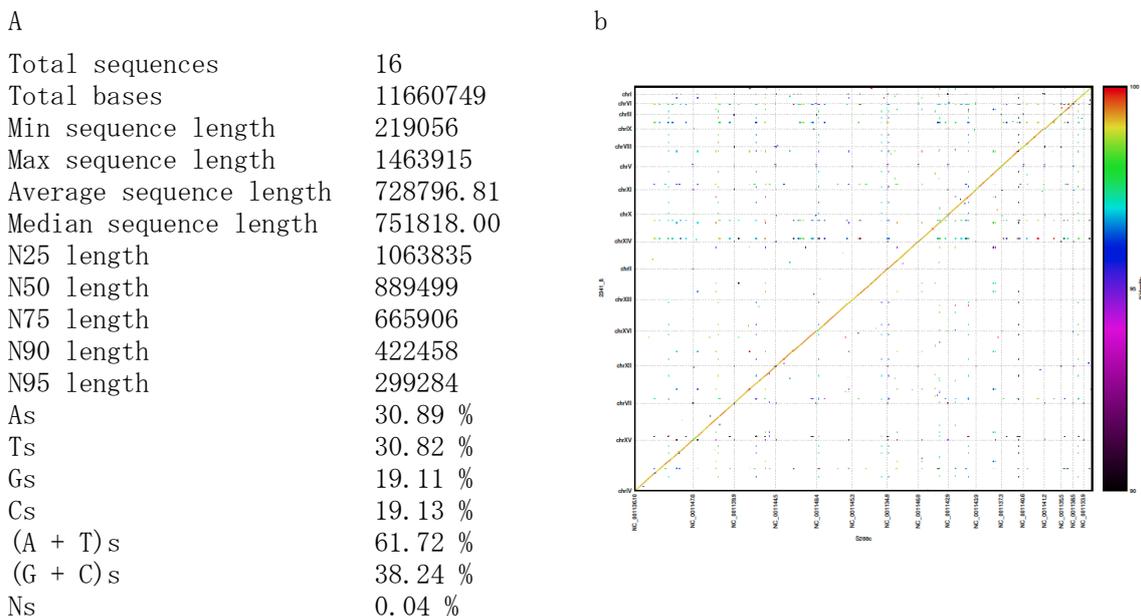


図 3 NMZ004 株の全ゲノム解析 a) 全ゲノム塩基配列決定の概要 b) S288C 株との比較

以上の結果より、多くの実験室で従来より用いられている培養法ならびに菌体取扱法の多くを、そのまま NMZ004 株に流用できることが示された。また、全ゲノム配列の結果より、個々の遺伝子の発現を調べるための分子基盤 (プライマーやプローブの塩基配列を一義的に決定できる) が整った。

2. 河津桜酵母 NMZ004 株の培養工学的諸性質

沼津工技セより分譲をされた NMZ004 株を用い、炭素源濃度 (図 4) と乳酸濃度 (図 5) が生育に与える影響を調べた。コントロール株として、組換え蛋白質生産株として標準的に使用される 2 倍体出芽酵母株 INVSc1 (インビトロジェン) を用いた。

その結果、NMZ004 株はもろみを想定した微酸素環境下 (静置培養) で良好な生育を示し、5% までのグルコース濃度であれば通気培養 (振盪培養) よりも非常に高い増殖を示した。濁度 (660 nm) 0.1 付近で計測した比増殖速度 (h^{-1}) は、静置培養で約 0.3、振盪培養で 0.1 であった。世代時間に直すと、静置培養で 1 時間、振盪培養で 2.5 時間であった。しかし、より高糖濃度 (10%) では生育速度は極端に減少し、通期方法による違いは見られなくなった (図 4)。この酸素への応答に関しては、通常用いられている実験室酵母株とは傾向が異なる。このため、高糖濃度、無通気条件下における NMZ004 株の遺伝子発現を通気条件下のものと比較することとした。

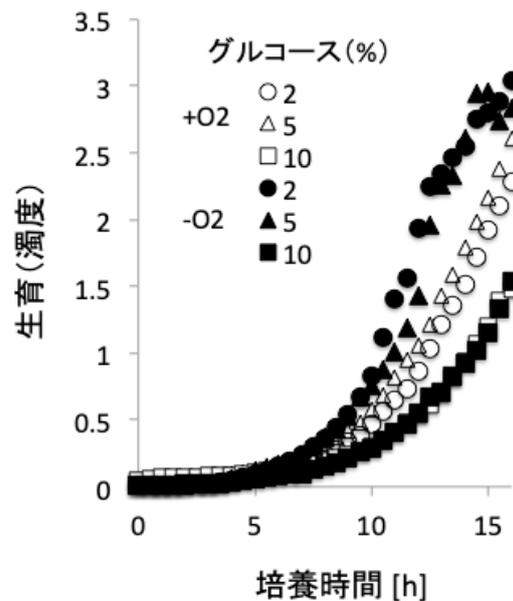


図 4 NMZ004 株の生育に与えるグルコース濃度・通気の影響

次に、NMZ004 株の乳酸感受性を INVSc1 株と比較した。一般に清酒醸造においては酵母は乳酸菌とともに前培養されて酒母を形成し、またもろみ中でも麹菌の糖化と乳酸菌の乳酸とともに発酵をつづけるため、乳酸への抵抗性は重要である。

培養試験の結果、コントロール株と比較して NMZ004 株は乳酸感受性が高く、乳酸 (pH5 に調整済) 添加とともに比増殖速度が漸減し、4% で無添加の 1/3 となった。

このため、乳酸存在下での遺伝子発現を調べる必要があり、全 RNA を当該試料より調製した。

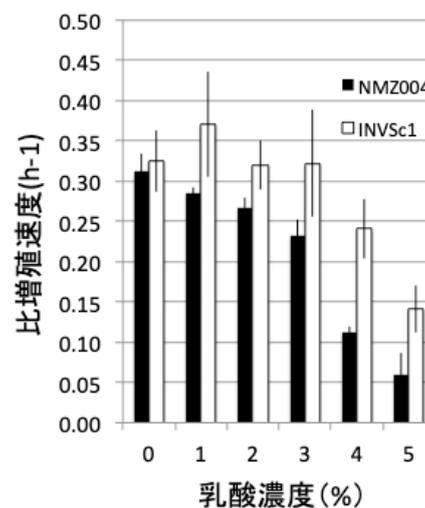


図 5 NMZ004 株の乳酸感受性

上記実験で調製した RNA サンプルは、読み取りが終わり、現在発現変動解析中である。

3. 視覚的特徴を有する変異体の作出

多くの実験室出芽酵母は、核酸を構成する塩基の一つであるアデニンの生合成経路 (図 6) の不具合により、前駆体化合物を赤色色素として蓄積することが知られる。赤色色素蓄積を伴うのは、*Ade2* または *Ade1* 遺伝子の欠損であることも既に知られている。

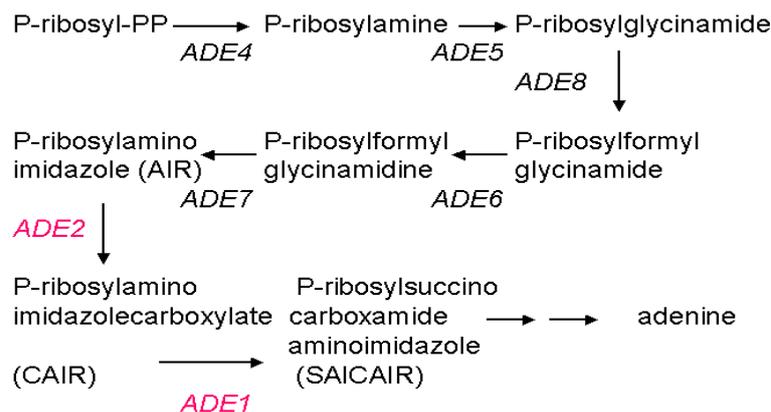


図 6 出芽酵母のアデニン生合成経路：*ADE1* から *ADE8* は当該反応を触媒する酵素をコードする遺伝子である。(出典：<https://www.phys.ksu.edu/gene/>)

そこで、従来型の変異導入 (菌株の変異源処理) による赤色色素を蓄積する NMZ004 株の作出を試みた。まず、紫外線による変異導入を試み、処理時間の最適化を行った (図 7)。

NMZ004 株を YPD 培地中で一晚振盪培養 (前培養) し、得られた菌体 (10^7 細胞) を滅菌蒸留水に懸濁し、254 nm の紫外線 (15 W) を照射した。この菌液中に生存する菌体を計測し、図 7 を得た。この結果、同実験条件では 2 分照射により生細胞が約 1/10 になることがわかった。生細胞が 1/100 となる 4 分を適正紫外線照射時間とした。

変異処理を行った菌体は、その後 YPD 培地で 1 時間養生させ、再び滅菌水に懸濁した後、アデニン含有孢子形成培地に塗布して孢子形成を行わせた。

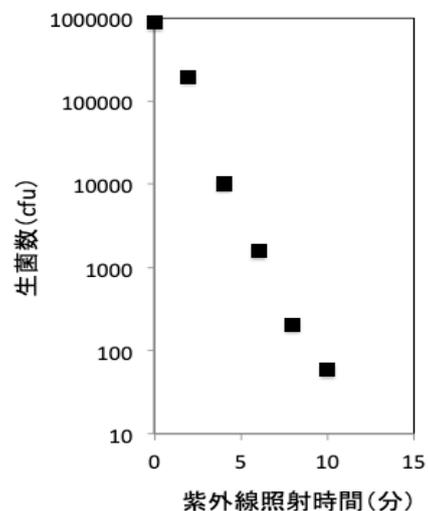


図 7 UV による変異導入 (NMZ004 株細胞生存曲線)

最終的に、変異体群 (孢子懸濁液) を寒天培地 1 枚あたり 200~400 コロニーとなるように YPD 培地に塗布し、色素沈着が見られる酵母コロニーを探索した。

3万~4万コロニーをスクリーニングしたところ、コロニー毎に菌体の生育速度にばらつきがみられた。数個のコロニーに赤色~褐色の色素沈着が見られたものの、生育速度が極端に遅く、適度な大きさのコロニーになるころには黒ずんだ褐色となった(図8)。これら変異体は、通常の遺伝子組換えにより *Ade2* の選択的破壊を行った組換え酵母の色調と比較し、YPD 寒天培地上での生育が悪かった。これは、変異体群は目的遺伝子 (*Ade2* や *Ade1*) 以外の遺伝子にも紫外線照射による突然変異が導入されているためである。基本的には *Ade2* の機能欠損により赤色色素沈着型変異体が得られることがわかったので、今後は、1) 変異導入頻度を小さくし、より大量の変異体をスクリーニングする；あるいは2) 現行の変異体と親株を交雑させる戻し交配の繰り返しにより、健全な色素蓄積株を取得する、のいずれかの手段で赤色酵母を育種できると期待できる。

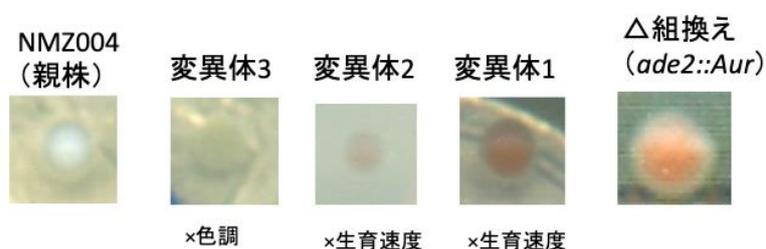


図8 色調変化が見られた変異体コロニー (*ade2::Aur1* 株との比較)

4. NMZ004株の発現情報解析

5%または10%のグルコースを含むYPD培地を用い、NMZ004株を振盪培養または静置培養により生育させた。濁度1.0を越えた段階で集菌し、滅菌蒸留水で洗浄、 -80°C 凍結処理を行った後、研究室で用いている標準的な方法(海砂・酸フェノール摩砕抽出)により全RNAを調製した。同様に、2%ラクトースを加えて培養を行った菌体からも全RNAを調製した。培養液1mLから数mgのRNAを調製した。調製したRNAの純度検定結果の例を以下に示す(図9)。RNA-seqによるmRNAの読み取りは終了したが、個々の遺伝子の発現量の変動は現在解析中であり、その結果は不掲載とする。

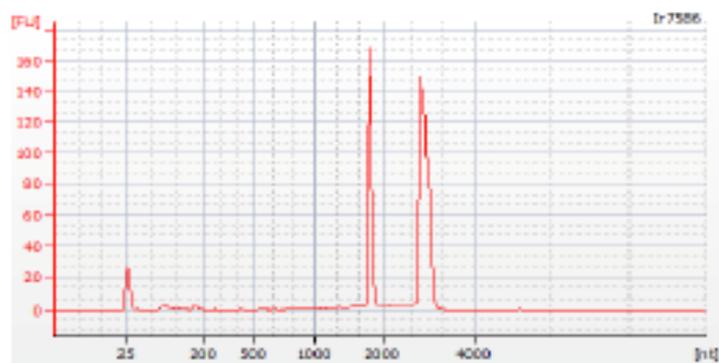


図9調製された全RNAの純度検定(キャピラリー電気泳動):ピークは小分子画分からtRNA, 18S rRNA, 26S rRNAであり、明確なピーク群は高純度RNAが調製できたことを示している。

【まとめと今後の課題】

本研究は沼津工技研支援セが河津桜より単離・育種した醸造用酵母株NMZ004株のゲノム情報を基盤とした分子育種を試みた研究である。視覚的特徴（赤～ピンク）を備えた酵母株の育種が可能であることを示した。しかしながら、醸造好適株とするには依然として継続的改良が必要であることが課題である。また、発現情報解析が進んでおらず、高糖濃度や乳酸存在下における発現変動を解析すること、さらにこれを基盤情報として活用した高発酵度酵母株（高エタノール耐性株）の育種が引き続き必要である。