

地方清酒製造に貢献できる清酒酵母の育種†

尾形智夫*, 鮎澤涼**, 近藤彬文**, 竹内 駿**, 増淵 隆***

Breeding of sake yeast strains which contribute regional *sake* production†

Tomoo Ogata*, Ryo Ayuzawa**, Akifumi Kondo**, Shun Takeuchi**
and Takashi Masubuchi***

In order to contribute regional *sake* production, we have been trying to isolate yeast strains from nature. Yeast strain MITOY20 had a good *sake* fermentation performance compared to *sake* yeast strain K701. The meiotic segregant MITOY66 which exhibited mating type a was isolated from *sake* yeast K701 which was treated with rapamycin.

Key words: Yeast strain, *Sake* production, Mating type

1 はじめに

地域産業として重要な清酒製造に貢献する手段として、地域独自の清酒用酵母を育種することが考えられる。既に、全国で用いられている清酒酵母である協会清酒酵母（日本醸造協会から頒布されている酵母）から、群馬県独自の吟醸酒用の酵母が育種され、活用されている¹⁾。これら酵母育種は、多くは突然変異法が用いられている。突然変異法は、有力な酵母育種法であるが、変異は、育種の目的とする遺伝子以外にゲノム全体に変異が導入され、その結果、育種した酵母の生育や発酵能に悪影響を及ぼすことがある。

酵母は、接合遺伝子座 *MAT* に *MAT*a が挿入されていて、接合性 a を示す 1 倍体細胞と、接合遺伝子座 *MAT* に *MAT* alpha が挿入されていて、接合性 alpha を示す 1 倍体細胞が接合し、接合遺伝子座 *MAT* に *MAT*a/*MAT* alpha が挿入されていて、接合性を示さない 2 倍体細胞を形成する。この接合を利用した育種法である接合育種は、突然変異法と組み合わせる、すなわち、育種の目的とする遺伝子以外に挿入された変異を野生型遺伝子に相補させる戻し交配と組み合わせると、さらに有効な酵母育種法になる。

しかし、協会清酒酵母は孢子形成能が弱く、接合育種を簡単にすることはできない。そこで、本研究では、最初に自然界から、清酒製造に適した酵母菌株を分離し、地域の清酒製造に貢献できる酵母株の分離をめざした。酵母は、自然界では、糖濃度が高い花や果実に存在すると考えられることより、これらから分離し、十分にアルコール発酵し、清酒製造をおこなうに適している酵母の分離を試みた。地方独自の分離源から、酵母を分離し、その酵母を活用することができると、地方清酒製造に貢

献できると期待された。

また、協会清酒酵母は、通常では、孢子成能が弱く、接合性を有する孢子分離体を分離することができず、簡単には接合育種することができない。本研究では、その協会清酒酵母から、接合性を有する孢子分離体を分離し、接合育種への道筋をつけることも試みた。

培地が窒素飢餓状態であると、酵母細胞内に栄養源シグナルが遮断され、孢子形成に関係する遺伝子群の発現が誘導され、酵母の孢子形成が開始すると考えられている。協会清酒酵母は、この栄養源シグナルの遮断が十分ではなく、孢子形成に関係する遺伝子群の発現誘導が生じないと報告されている²⁾。一方、細胞内の栄養源シグナルの遮断を生じさせる薬剤ラパマイシンを用いることで、通常ではほとんど孢子を形成しない協会清酒酵母が、孢子を形成することが報告されている³⁾。そこで、本研究では、協会清酒酵母に、ラパマイシンを作用させ、孢子を形成させ、接合育種に使用する接合性を有する孢子分離体を分離することができるかを試みることにした。ラパマイシンは、免疫抑制薬として開発されたが、その後、栄養源シグナルを遮断することで、細胞増殖を抑制する機序を有することが知られている薬剤である。

2 実験材料と実験方法

2・1 実験材料

試薬は、通常、和光純薬の特級あるいは 1 級のものを使用した。但し、酵母培養用の酵母エキス、ペプトン等は、Difco 社製のものを使用した。使用した協会清酒酵母 701 号は、群馬産業技術センター保存株を用いた。清酒小仕込試験で用いた MITOY20 酵母は、栃木県立栃木農業高校教諭 岩本敏央氏から分与された。

† 原稿受理 平成 27 年 2 月 27 日 Received February 27, 2015

* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

** 生物工学科学生 (Department of Biotechnology)

*** 群馬産業技術センター (Gunma Industrial Technology Center)

2・2 培地

自然界からの酵母の分離は、CE 培地(3% グルコース, 0.3% ペプトン, 0.3% 酵母エキス, 3% エタノール, 15 µg/ml クロラムフェニコール, pH 4.5)でおこなった. 実験室での通常の酵母培養は、YPD 培地(1% 酵母エキス, 2% ペプトン, 2% グルコース)でおこなった. 寒天培地は、通常は 2% で使用した. 発酵試験は、グルコースを 20% とした YPD 液体培地(1% 酵母エキス, 2% ペプトン)でおこない、CO₂ の発生に伴う発酵液の重量減少で発酵力を測定した.

2・3 清酒小仕込試験

清酒小仕込試験は、総米 200g の二段仕込みでおこなった. Table 1 に、小仕込み試験の配合を示した. CO₂ の発生に伴う発酵液重量の減少で発酵力を測定した.

2・4 酵母の孢子形成、孢子分離体の分離

酵母の孢子形成は、以下のように行った. 酵母を YPD 液体培地で培養し、前孢子培地(1% Yeast extract, 3% Nutrient broth, 5% Glucose)で 1 昼夜培養し、孢子培地(0.5% 酢酸カリウム)に移し、3 日から 5 日培養し、孢子の形成を顕微鏡で確認した.

孢子分離体の分離は、以下のように行った. 孢子形成培地で孢子を形成した酵母細胞懸濁液を、65°C 10 分間処理し、栄養細胞を死滅させた後に、YPD 寒天培地に塗布し、コロニーを形成させた. 形成されたコロニーが、接合性のある孢子分離体由来であるかは、接合性遺伝子座である *MAT* を PCR することによって確認した. PCR で用いたプライマーは、以下のとおりである. *MAT* 特異的プライマーとして (5'-ATACTTTGCTTCCATGAGGATTCTTATATTAGGGA-3'), *MAT*_a 特異的プライマーとして (5'-TGGCATTACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG-3'), *MAT*_{alpha} 特異的プライマーとして (5'-AAATGCAGCACGGAATATGGGACTACTTCG-3') を用いた. *MAT* 特異的プライマーと *MAT*_a 特異的プライマーによる PCR で、1.2kbp の増幅産物が得られた場合は、その酵母株の *MAT* 座は、*MAT*_a が挿入されていて、*MAT* 特異的プライマーと *MAT*_{alpha} 特異的プライマーによる PCR で、1.1kbp の増幅産物が得られた場合は、その酵母株の *MAT* 座は、*MAT*_{alpha} が挿入されていることがわかる.

3 実験結果

3・1 自然界からの酵母の分離

群馬県内のワイナリーのブドウあるいは、桜等の花を、CE 液体培地に接種し、25°C で 1 週間ほど培養した. その結果、液体培地の底面に微生物の生育を認めた(Fig.1). 顕微鏡観察により、その微生物が酵母であると認めた場合、YPD 寒天培地に植菌し、グルコースを 20% とした、YPD 液体培地で、協会清酒酵母 701 号を対照とした発酵試験をおこなった. 2014 年 10 月から 2014 年 12 月ま

での自然界から分離した酵母では、協会清酒酵母 701 号に匹敵する発酵力を有する酵母は分離することはできなかった. 一方、培地表面に強力な産膜を形成する酵母を、ブドウの 1 種であるジーンファンデルから分離することができた(Fig. 2). これらの酵母は、ワインの 1 種であるシェリー酒を造ることに適している可能性がある. MITOY65 酵母として、当研究室で保存することとした.

Table 1 Small-scale sake brewing

	Starter	1 st	2nd	Added water	Total
Total rice(g)		40	160		200
Steamed rice(g)			160		160
Koji rice(g)		40			40
Lactate(ml)		0.168			
Water(ml)	25*	160	100	15	300

* Yeast was cultured in 25ml of koji-extracted.



Fig. 1 Isolation of wild yeast strains from nature

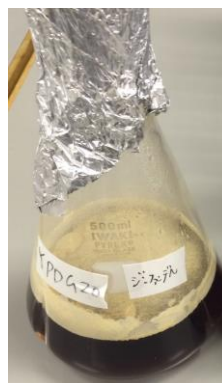


Fig. 2 Isolation of wild yeast strain which forms pellicle

3・2 自然界から分離した酵母の清酒小仕込み試験

当研究室で保存していた自然界から分離した酵母について、清酒小仕込み試験をおこなった. 清酒小仕込み試験の配合は、Table 1 に示した. 結果は、Fig. 3 に示した. ムラサキ科ヒレハリソウ属の多年生草木コンフリー(Comfrey)の花から分離された酵母 MITOY20 は、協会清酒酵母 701 号に匹敵する良好な清酒発酵性を示した

(Fig. 3). MITOY20 酵母は、協会清酒酵母 701 号に比べて、発酵初期段階では、発酵速度が遅いものの、発酵後期では、むしろ発酵速度が上昇してきて、生成酒のアルコール度、日本酒度には、大きな差はなかった (清酒酵母協会 701 号 アルコール 16.3 ± 0.153 日本酒度 $+5.3 \pm 1.44$, 自然界から分離された酵母 MITOY20 アルコール 16.1 ± 0.115 日本酒度 $+5.3 \pm 0.850$).

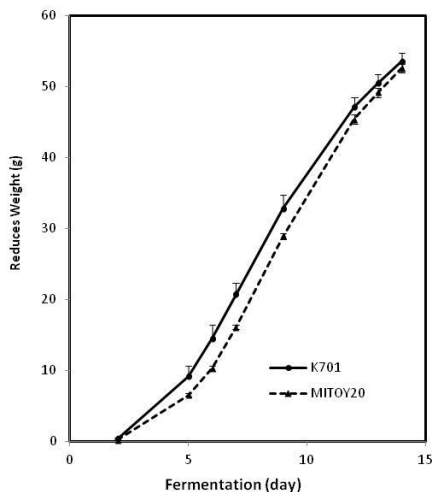


Fig.3 Small-scale sake brewing using yeast strain isolated from nature. Values are expressed as average of reduced weight \pm standard deviation.

3・3 協会清酒酵母からの接合性のある孢子分離体の分離

清酒醸造で最もよく使用されている酵母株は、日本醸造協会から頒布されている協会酵母 7 号, 9 号, 701 号, 901 号である。これらの協会清酒酵母は、孢子形成能が弱く、簡単には接合性を有する孢子分離体を分離することができず、通常では接合育種することができない。これは、協会清酒酵母は、窒素源飢餓シグナルの伝達が弱いことによると考えられる。そこで、栄養源シグナルを遮断する薬剤であるラパマイシンを孢子形成培地に添加し、協会清酒酵母の孢子形成を調べた。その結果、協会酵母 7 号と 701 号では、ラパマイシン 200 ng/ml 添加時において、極めて孢子形成頻度は低いものの、孢子形成が見られた。孢子を形成がみられた酵母細胞懸濁液を、65°C 10 分間処理し、栄養細胞を死滅させた後に、YPD 寒天培地に塗布し、コロニーを形成させた。接合性を有している孢子分離体であることを確認するために、得られたコロニーから、ゲノム DNA を抽出し、接合性を決定する遺伝子座 *MAT* を PCR で調べ、*MAT* 座が *a* あるいは、*alpha* である酵母株であるかを調べた。その結果、調べた酵母株のほとんどは、*MAT* 座は、*a* と *alpha* を有していたが、現在までに、協会 701 号由来で 1 株は、*MAT* 座が、*a* のみを示す株が分離され (Fig. 4 lane 3, 4), MITOY66 酵母として、当研究室で保存することとした。



Fig. 4 Isolation of meiotic segregant MITOY66 which exhibited mating type *a*. PCR amplified products are as follows; M: molecular weight marker λ DNA *Hind* III digested, lane 1: from K701 using *MAT*^a-specific primer and *MAT* *a*-specific primer, lane 2: from K701 using *MAT*^a-specific primer and *MAT* *alpha*-specific primer, lane 3: from MITOY66 using *MAT*^a-specific primer and *MAT* *a*-specific primer, lane 4: from MITOY66 using *MAT*^a-specific primer and *MAT* *alpha*-specific primer.

4 考察

地域清酒製造に貢献する地域独自の清酒酵母が、各地方で育種されている。その多くは、現在まで、清酒製造で最もよく使用されている酵母である、協会清酒酵母を突然変異処理して得られた酵母株である。突然変異処理をおこなうと、育種の目的とする遺伝子以外にゲノム全体に変異が導入され、その結果、育種した酵母の生育や発酵能に悪影響を及ぼすことがある。そこで、接合育種を組み合わせた戻し交配をおこなうことが考えられるが、協会清酒酵母は、孢子形成能が弱く、通常の実験方法では、接合性を有する孢子分離体を分離することは難しい。そこで、本研究では、地域独自の清酒酵母を分離するために、自然界から、酵母を分離し、十分に清酒発酵することができる酵母株の分離を試みた。2014 年 10 月から 12 月までのサンプリングで、自然界から分離した酵母には、協会清酒酵母 701 号に匹敵するアルコール発酵力を有する酵母株は分離できなかった。一方、強い産膜形成をおこなう酵母株 MITOY65 を分離することができた。産膜形成酵母は、ワインの 1 種であるシェリー酒を作る際に必要である。今後の活用や解析が望まれる。

当研究室で保存していた自然界から分離した酵母株のうち、コンフリーから分離した酵母 MITOY20 は、協

会清酒酵母 701 号に匹敵する清酒発酵能を示した(Fig. 2). この時, 特徴的なこととして, 発酵前半は, 協会清酒酵母 701 号が, 比較的早い発酵速度であったが, 発酵後半になると, 自然界分離酵母 MITOY20 の方が, 発酵速度が, 比較すると早くなっていった. 協会清酒酵母 701 号には, 静止期に移行するプロテインキナーゼをコードする *RIM15* 遺伝子に, 機能欠損変異があり, 静止期移行に欠損があることが, 発酵速度を早いものになっているという見解がある. 協会清酒酵母 701 号が, 自然界分離酵母 MITOY20 と比べて, 発酵前半に早い発酵速度を示すのは, この *RIM15* 変異等が影響している可能性がある. 一方, 自然界分離酵母 MITOY20 は, 発酵後半に, 比較すると早い発酵速度を示し, 最終的には, 清酒醸造の標準的な協会清酒酵母 701 号と, ほぼ同じ発酵性を示した. MITOY20 株の *RIM15* 遺伝子の状態は, 今後興味もたれる.

現在, 最も清酒醸造に用いられている酵母である協会清酒酵母 701 号から, 接合性を示す孢子分離体の分離を試みた. 酵母の育種法として, 戻し交配等で接合を利用しようと思っているからである. 協会清酒酵母 701 号やその他の協会清酒酵母は, 孢子形成能が低いことが報告されている. その原因の一つとして, 協会清酒酵母では, 孢子形成要因の一つである, 栄養源シグナルの遮断が十分ではないことが挙げられている. そこで, 栄養源シグナルを遮断する薬剤である, ラパマイシンを協会清酒酵母に作用させ, 孢子分離, 接合性を有する孢子分離体の分離を試みた. その結果, ラパマイシン処理により協会清酒酵母 701 号で, 低頻度ながら孢子形成がみられ, *MAT* 遺伝子座が a である孢子分離体を得られた. 今後, その孢子分離体の接合能を調べ, 地域の清酒製造に寄与させたいと考えている.

5 要約

1. 地域の清酒製造に寄与する酵母株を分離するため, 自然界から酵母株の分離を試みている.
2. 自然界分離酵母のうち, 研究室に保存されていた酵母株 MITOY20 は, 協会清酒酵母 701 号に匹敵する清酒発酵能を有していた.
3. 協会清酒酵母 701 号から, 薬剤ラパマイシンで処理したところ, 孢子形成を観察し, *MAT* 遺伝子座が a である孢子分離体 MITOY66 を得ることができた.

参考文献

- 1) 増淵隆, 上山修, 佐藤勝也, 長谷純宏, 鳴海一成, 群馬県立群馬産業技術センター研究報告 (2010).
- 2) N. Nakazawa, K. Abe, Y. Koshika, and K. Iwano, J. Biosci. Bioeng. 110, 1 (2010).
- 3) N. Nakazawa, S. Nijima, Y. Tanaka, and T. Ito, J. Biosci. Bioeng. 113, 491 (2012).
- 4) D. Watanabe, Y. Arai, Y. Zhou, N. Maeya, T. Akao, and H. Shimoi, Appl. Environ. Microbiol. 78, 4008

(2012).