

平成 28 年度
清酒酵母・麴研究会
講演要旨集

日時 平成 28 年 10 月 18 日 (火)

場所 北とぴあ 第 2 研修室

東京都北区王子 1 丁目 11 番 1 号

清酒酵母・麴研究会

プログラム

- 13:00～13:20 清酒酵母・麴研究会総会
- 13:20～13:50 「遺伝的安定性の高いカプロン酸エチル高生産性酵母の育種」
朝日酒造株式会社 田村 博康
- 13:50～14:20 「麴グリコシルセラミドが酵母の発酵プロファイルに与える影響について」
佐賀大学農学部 北垣 浩志
- 14:20～14:50 「香気生成能の高い酵母の育種と清酒醸造への利用」
菊正宗酒造株式会社 高橋 俊成
- 14:50～15:10 休憩
- 15:10～15:40 「清酒中の 4-VG 生成要因」
新潟県醸造試験場 金桶 光起
- 15:40～16:45 特別講演「細胞・分子から紐解く麴菌の未知なる世界」
東京大学大学院農学生命科学研究科 丸山 潤一
- 17:00～ 懇親会 （北とぴあ9階901会議室）

遺伝的安定性の高いカプロン酸エチル高生産性酵母の育種

朝日酒造株式会社 研究開発部 田村博康

【背景】

近年、大吟醸に代表される高品質清酒醸造においては、吟醸香・香気成分を多く生産するカプロン酸エチル（以下 EtOCap）高生産性酵母が広く使用されている。EtOCap 高生産性酵母の育種は、変異剤により突然変異を誘発させ、セルレニン耐性を指標に選抜されてきた⁽¹⁾。セルレニンは、中鎖脂肪酸に類似構造を持つ脂肪酸合成阻害剤である⁽²⁾。脂肪酸合成酵素は、2種類のサブユニット（ α サブユニット・*FAS2* 遺伝子、 β サブユニット・*FAS1* 遺伝子）からなる $\alpha_6\beta_6$ の多量体構造を取っている。EtOCap 高生産性酵母は、脂肪酸合成酵素の α サブユニットの1250番目のグリシンがセリンに変異している⁽³⁾。一般的に使用されている EtOCap 高生産性酵母のほとんどが、*FAS2*-G1250S のヘテロ変異型である。

現在、使用されている EtOCap 高生産性酵母は、EtOCap を高生産するというメリットを持つ反面、以下の2つの理由から、遺伝的に不安定な可能性が示唆された。

- 1) 脂肪酸は、細胞形成に重要な細胞膜（核膜を含む）の主要構成成分である。齊藤らは、分裂酵母の培養液にセルレニンを添加すると核分配が不均一になることを報告している⁽⁴⁾。これは、脂肪酸合成阻害が核の分配異常を誘導すること示唆し、出芽酵母においても脂肪酸合成の異常が遺伝的に不安定になる可能性が示唆された。
- 2) 多くの変異株と同様、従来の EtOCap 高生産性酵母も、突然変異を誘発させることで育種されてきた。UV および EMS などを用いた突然変異誘発は、効率的に目的の変異株を取得することが可能であるが、一方、目的以外の遺伝子にもランダムに変異が入ることは避けられない。その結果、染色体分配の完全性を保障する機構にも変異が導入され、遺伝的に不安定になる可能性が考えられた。

遺伝的安定性は、チェックポイント機構により保障されるが、出芽酵母である清酒酵母において、本機構の完全性については未解析であった。以上より、我々は、セルレニン耐性の EtOCap 高生産性酵母の遺伝的安定性を調査し、一部の株においてチェックポイント機構が部分的に不完全であることを発見した。さらに、遺伝的に安定な EtOCap 高生産性酵母を育種する目的で、自然発生的セルレニン耐性酵母の単離を試み、これに成功した⁽⁵⁾。

【研究内容】

1. 清酒酵母の遺伝的安定性の調査

清酒酵母（EtOCap 高生産性酵母を含む）について、チェックポイントを活性化する微小管重合阻害剤（Benomyl）および DNA 合成阻害剤（HU）に対する感受性および生存率を調査した。その結果、K1801 株（EtOCap 高生産性酵母）の紡錘体チェックポイントの機能が不完全であることが示唆された。

2. EtOCap 高生産性酵母の自然発生的な単離

新潟清酒酵母 G9 株から、以下の3段階で、EtOCap を高生産する自然発生的 *FAS2*-G1250S

変異を試みた。一次スクリーニングでは、セルレニン耐性酵母として 3056 株、分離した。二次スクリーニングでは、それらの中から、遊離脂肪酸を高生産する株を選抜した。遊離脂肪酸の測定は栗林らの方法⁽⁶⁾に従った。EtOCap 高生産性酵母では EtOCap の前駆体であるカプロン酸 (C6) が全遊離脂肪酸量の 83%を占めることから⁽⁶⁾、選抜指標とした。その結果、14 株の遊離脂肪酸高生産性株を選抜した。三次スクリーニングでは、PCR - RFLP assay により *FAS2*-G1250S 変異株を選抜後、DNA シーケンスにより *FAS2* 遺伝子の 3748 番目の塩基の G から A への置換を確認し、最終的に EtOCap 高生産性酵母を 1 株分離、G9CR と命名した。

3. G9CR の遺伝的安定性の確認

分離した G9CR の遺伝的安定性を 1 と同様の方法で調査した結果、チェックポイント機構の機能が正常であることを確認した。さらに、CalMorph⁽⁷⁾による細胞形態の均一性の調査結果からも、G9CR の遺伝的安定性が高いことが指示された。

4. G9CR の発酵力の検証

最後に、G9CR の発酵力を検証するため、工業規模の試験醸造 (総米 600 kg) を行った。対象株として、K1801 株と親株 G9 株を使用した。その結果、G9CR の発酵力は G9 と同等であり、EtOCap の生成量は G9 の 2.5 倍、K1801 の約 50%であった。官能試験の結果、G9CR により醸造された清酒は、親株と遜色なく高い評価を得た。以上より、G9CR は、G9 とほぼ同等の発酵特性を持ち、G9 よりも高い EtOCap 生産性を持つことが確認された。

【総括】

本研究では、自然発生的な EtOCap 高生産性酵母の分離に成功し、遺伝的安定性が高いことを確認した。現在、使用されている清酒酵母の発酵特性は管理されており、顕著な不安定性は認められない。しかし、突然変異誘発法により育種された株では、目的以外の遺伝子に変異が導入されるリスクを伴っている。このリスクを軽減するためには、自然発生的変異株の分離と遺伝的安定性の確認が重要である。本法が、今後の標準的な酵母育種法となることを期待する。

【謝辞】

本研究を行うにあたり多大なるご協力を頂きました、新潟県醸造試験場、広島大学、(独)酒類総合研究所、日本醸造協会、東京大学、岩手大学など、共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) Ichikawa *et al.* Agric. Biol. Chem. 1991; 55: 2153-2154.
- 2) Omura S. Bacteriolo. Rev. 1976; 40: 681-697.
- 3) Aritomo *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004; 68: 206-214.
- 4) Saitoh *et al.* J. Cell Biol. 1996; 134: 949-961.
- 5) Tamura *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 2015; 79: 1191-1199.
- 6) Kuribayashi *et al.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 2012; 76: 391-394.
- 7) Ohtani *et al.* J. Bioinform. Comput. Biol. 2004; 1: 695-709.

麴グリコシルセラミドが酵母の発酵プロファイルに与える影響

佐賀大学 北垣 浩志

1 麴の酵素以外の役割

清酒醸造における麴の主要な役割はでんぷんの糖化酵素の供給である。しかし酵素だけで作った清酒の品質は必ずしも同一ではなく、それ以外にも品質に寄与する成分があることが考えられてきた。そのひとつは、エステル結合型脂質を構成する不飽和脂肪酸である。実際に、不飽和脂肪酸を添加すると発酵能が向上したり、香気成分が減少することが報告されてきた。この不飽和脂肪酸は、米粒の外側や麴に含まれていることが知られていた。

2 麴のスフィンゴ脂質成分

一方、アミド結合型脂質であるスフィンゴ脂質の酵母の発酵プロファイルに与える影響は、その分析手法の難しさもあり、これまでまったく報告されてこなかった。

そこで麴のスフィンゴ脂質含量を調べたところ、グリコシルセラミドの化学形が圧倒的に多く、またその含量も他の食品と比べても多いことがわかった。

そして麴を加えたもろみの段階でも、麴に由来する多量のグリコシルセラミドが含まれていることがわかった。従って清酒酵母は発酵もろみにおいて、多量の麴由来のグリコシルセラミドにさらされていることになる。

3 麴グリコシルセラミドはストレス耐性、香気成分改変を引き起こす

そこで、麴グリコシルセラミドが酵母に与える影響を調べた。まず、pH8.0のアルカリ条件やエタノール 8%などの高エタノール条件での増殖がグリコシルセラミドを添加すると増加したことから、グリコシルセラミドは酵母のストレス耐性を向上させることが示された。

グリコシルセラミドは糖部分、スフィンゴイド塩基部分、脂肪酸部分に生物種ごとに多様性がある。そこで、これらの構造の違いがこうしたストレス耐性に影響を与えるかを調べたが、いくつかの違いがあっても同様にストレス耐性を引き起こしたことから、グリコシルセラミドであれば細かな化学構造の違いは影響がないと考えられた。

加えられたグリコシルセラミドがそのままの化学形で酵母に作用しているのか、あるいはセラミドやスフィンゴイド塩基に分解されて作用しているのかを調べるために、これらの分子種が酵母に与える影響を調べた。その結果、セラミドは同様にストレス耐性を与えたが、スフィンゴイド塩基はストレス感受性を与えたため、グリコシルセラミドかセラミドの形で酵母に作用が及んでいると考えられた。酵母に与えたグリコシルセラミドの脂質を調べると、セラミドはほとんど検出されなかったことから、グリコシルセラミドはそのままの化学

形で酵母に作用していると考えられた。

次にグリコシルセラミドが酵母の香気成分生産プロファイルに与える影響を調べた。グリコシルセラミドを与えた酵母の発酵液ではカプリル酸エチルなどエステル香気成分が減少しており、酵母の香気成分生産プロファイルに影響を与えることが明らかになった。

4 麴グリコシルセラミドが酵母の脂質二重膜に与える影響の解析

最後にグリコシルセラミドが酵母に影響を与えるメカニズムを調べた。酵母の脂質二重膜に入り込んで蛍光を発する TMA-DPH (1-[4-trimethylamino]-phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene) の蛍光寿命を調べた。その結果、グリコシルセラミドを与えた酵母では TMA-DPH の蛍光寿命が無添加のものに比べて統計的に有意に減少しており、脂質二重膜のパッキングが緩んでいると推察された。酵母の複合スフィンゴ脂質はリン酸ジエステル型であるが、その脂肪酸は C26 と全生物中で最も長い。一方、麴のグリコシルセラミドの脂肪酸は C18 であるため、これが酵母の脂質二重膜の C26 の領域に入り込むとパッキングが緩んでストレス耐性や香気成分の改変を引き起こすと考えられた。

以上の結果から、麴のグリコシルセラミドは発酵もろみに持ち込まれ、酵母の脂質二重膜に入り込んでその構造を緩ませることでストレス耐性や香気成分の改変を引き起こすことが明らかになった。麴のグリコシルセラミドはこれまで注目されていなかった成分であるが、酵母の発酵プロファイルに影響を与える重要な成分として今後品質管理の重要なターゲットになると考えられる。

参考文献

1. Glucosylceramide Contained in Koji Mold-Cultured Cereal Confers Membrane and Flavor Modification and Stress Tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* during Coculture Fermentation. Sawada K, Sato T, Hamajima H, Jayakody LN, Hirata M, Yamashiro M, Tajima M, Mitsutake S, Nagao K, Tsuge K, Abe F, Hanada K, Kitagaki H. *Appl Environ Microbiol.* 81(11):3688-98 (2015)
2. Role of Tween 80 and monoolein in a lipidsterol-protein complex which enhances ethanol tolerance of sake yeasts. Ohta K, Hayashida S. *Appl Environ Microbiol* 46:821-825 (1983).
3. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. Fujii T, Kobayashi O, Yoshimoto H, Furukawa S, Tamai Y. *Appl Environ Microbiol.* 63(3):910-5 (1997).

香気生成能の高い酵母の育種と清酒醸造への利用

菊正宗酒造株式会社
高橋 俊成

吟醸酒の特徴香である吟醸香は主にカプロン酸エチルと酢酸イソアミルにより構成される。これらの香気成分は酵母菌体内で生合成されるが、その生合成経路は原料米の外層部に由来する不飽和脂肪酸により抑制を受けることが知られている¹⁻³⁾。そのため、吟醸酒造りには高精白米が欠かせない。さらに醪での発酵も低温かつ長期間を要するため、手間とコストがかかることになる。本講演では、清酒の酒質の多様化を目指し、低精白米を用いた清酒醸造において吟醸香成分を高生産する酵母変異株の育種と実醸造への応用例を紹介する。

1. 酢酸イソアミル高生産酵母変異株の育種とその醸造特性⁴⁾

清酒醸造において、酢酸イソアミルはイソアミルアルコールとアセチル-CoA を基質とし、主に *ATF1* にコードされるアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATase) によって生合成される。*ATF1* および Δ -9 脂肪酸不飽和化酵素をコードする *OLE1* の発現はともに *Mga2p* を介して不飽和脂肪酸による抑制を受ける (FIG. 1)。

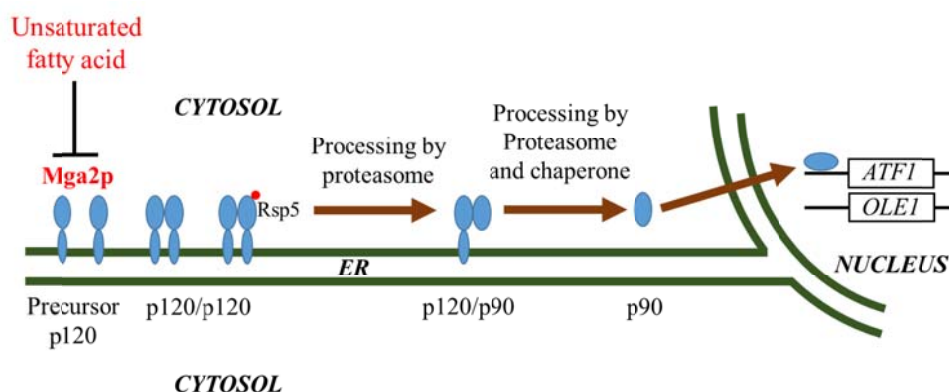


FIG. 1 不飽和脂肪酸による *ATF1* 発現抑制のメカニズム

スフィンゴ脂質生合成経路の最初のセリンとパルミトイル-CoA の縮合反応を触媒するセリンパルミトイルトランスフェラーゼは、抗生物質ミリオシン (ISP-1) によって阻害されるが、N-アセチルトランスフェラーゼをコードする *SLI1* を高発現させた酵母では ISP-1 に耐性を示すようになり、ISP-1 によるスフィンゴ脂質合成経路の阻害が解除される。Sli1p は Atf1p および Atf2p とホモロジーがあることから、AATase はエステル化反応だけでなく、スフィンゴ脂質生合成経路においても重要な役割を果たす可能性がある。そこでスフィンゴ脂質合成経路の阻害剤の一つであるオーレオシジン A (AbA) に耐性を示す酵母の中から低精白米仕込みにおいて酢酸イソアミルを高生産する酵母変異株を育種することにした。

清酒酵母 Km97 株 (K901 株のアルギナーゼ欠損株) を EMS 処理して得られた AbA 耐性株 428 株について発酵試験および精米歩合 70% の清酒小仕込み試験を行い、製成酒の酢酸イソアミル濃度が 2.6 倍以上、E/A 比が 24 以上となる酵母変異株を 4 株 (*hia1*, 2, 4, 6 株) 取得した。製成酒の官能評価が最も高かった *hia1* 株について詳細な特性解析を行ったところ、Km97 株に比べ *hia1* 株では AATase 活性および *ATF1* 発現量が増加しており、それらは不飽和脂肪酸による抑制を受けることはなかった。この *hia1* 株について全ゲノム解析を行ったところ、*ATF1* の転写因子である *MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser 706 *) が生じていることが明らかとなった。*hia1*, 2, 4, 6 株は独立したスクリーニングにより得られた変異株であるため、同一クローンでない。そこ

で、4 菌株をそれぞれ培養後、菌体より抽出した DNA を等量混合し、全ゲノム解析を再度行ったところ、4 菌株共通の変異箇所は *MGA2* のホモ接合型ナンセンス変異 (Ser 706 *) のみであった。FIG. 2 に示す K901 由来 *MGA2* (w*MGA2*) および *hia1* 株由来 *MGA2* (m*MGA2*) を YCp ベクターを用いて BY4743 Δ *mga2* 株に導入し、*ATF1* の発現解析を行ったところ、m*MGA2* の導入により発現量の増加が認められたが、その発現は不飽和脂肪酸によって部分的に抑制されたことから、*hia1* 株では Mga2p のナンセンス変異に加え、Mga2p とは別の要因も不飽和脂肪酸による *ATF1* 発現抑制解除に関与している可能性がある。

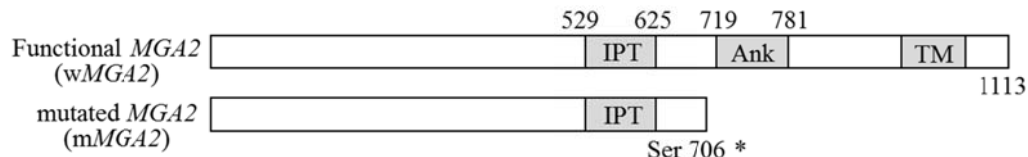


FIG. 2 *MGA2* 遺伝子の構造

2. カプロン酸エチル高生産酵母変異株の育種とその醸造特性

低精白米仕込みにおいてカプロン酸エチルを高生産する酵母変異株の育種を目指し、*MGA2* にホモ接合型ナンセンス変異 (Ser 706 *) を有し、*ATF1* の恒常的発現上昇が認められる *hia1* 株にセルレニン耐性を付与することにした。

はじめに *hia1* 株における *FAS1* および *FAS2* の発現解析および菌体内カプロン酸含量の測定を行ったところ、両遺伝子の発現量および菌体内カプロン酸含量が増加していることが明らかとなった。さらに、FIG.2 に示す m*MGA2* を導入した BY4743 Δ *mga2* 株では、*FAS1* および *FAS2* の発現量の増加が認められたことから、Mga2p が両遺伝子の活性化に関与することが明らかとなった。そこで、カプロン酸エチルの前駆体であるカプロン酸を高生産する *hia1* 株を EMS 処理し、得られたセルレニン耐性株 44 株について発酵試験および精米歩合 70% の清酒小仕込み試験を行ったところ、酵母変異株 3 株 (*hec2*, 3, 6 株) の製成酒において、カプロン酸エチル濃度が親株の 9 倍以上と高い値を示した。一方、酢酸イソアミル濃度は親株に比べ低下したが、市販の清酒に比べ明らかに高い値を示したことから、これら *hec* 株を用いることにより、低精白米を用いても、カプロン酸エチルおよび酢酸イソアミルの両成分が豊富に含まれる清酒醸造が可能となった。

hec 株のカプロン酸エチル生産能が K1801 と比べ著しく高いことから、カプロン酸エチル高生産能を付与する *FAS2* 変異以外の因子も関与すると考えられる。*hia1* 株に人為的にホモ接合型の *FAS2* 変異を導入した形質転換体を用いて清酒小仕込み試験を行ったところ、製成酒のカプロン酸エチル含量は *hec2* 株のそれには遠く及ばなかった。したがって、*hec2* 株で見られるカプロン酸エチル高生産能には *FAS2* 以外の因子が関与すると考えられた。そこで、カプロン酸エチル生合成経路に関与する遺伝子の発現解析を行ったところ、*hec2* 株ではカプロイル CoA とエタノールからカプロン酸エチルを生合成するアルコールアシルトランスフェラーゼをコードする *EEB1* が高発現していることが明らかとなった。また *hec2* 株の全ゲノム解析の結果、*FAS1* にホモ接合型ミスセンス変異 (Gly 909 Arg) が検出された。*hec2* 株のカプロン酸エチル高生産能には、*MGA2*、*FAS1*、*FAS2* の変異および *FAS1*、*FAS2*、*EEB1* の発現量の増加など多くの因子が複雑に関与していると考えられる。

- 1) Yoshioka, K. and Hashimoto, N.: *Agri. Biol. Chem.*, **47**, 2287-2294 (1983).
- 2) Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., and Tamai, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 910-915 (1997).
- 3) Furukawa, K., Yamada, T., Mizoguchi, H., and Hara, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 448-454 (2003).
- 4) Takahashi, T., Ohara, Y., Sawatari, M., and Sueno, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.07.002> (available online 16 July 2016).

清酒中の 4-VG 生成要因

新潟県醸造試験場 金桶 光起

酒類の香は品質を決める重要な要素であり異臭があると品質を下げる。ビール、ワイン等で問題となる 4-ビニルグアイアコール(4-VG)、4-エチルグアイアコール(4-EG)、4-ビニルフェノール(4-VP)、4-エチルフェノール(4-EG)等の揮発性フェノール類に由来する異臭が清酒においても発生するが発生原因について、これまで詳細な研究はなかった。

これらの香は何れも、原料米細胞壁構成成分であるフェルラ酸(FA)、p-クマル酸(p-CA)の脱炭酸によって生成する。

ワイン¹⁾、ウイスキー²⁾ およびビール³⁾ に関しては、酵母、乳酸菌等により FA および p-CA が脱炭酸され、4-VG、4-VP 等が生成することが報告されている。

しかしながら清酒の場合、使用する酵母には FA を脱炭酸し 4-VG に変換する活性がない³⁾ ことから生成要因は不明であった。

清酒中の 4-VG 生成を検討したところ、清酒中では麹から持ち込まれるバチルス属、スタフィロコッカス属の細菌およびカンジダ属、ピキア属の酵母が関与していることを明らかにした⁴⁾。分離した細菌は、アルコールが 20%存在下でも FA を 4-VG に、p-CA を 4-VP に変換する活性があり通常の清酒のアルコール度数で十分な 4-VG 生成活性を持つことが明らかとなった。

菌濃度と 4-VG 生成との関係では、細菌では 10^6 CFU/ml、酵母では 10^5 CFU/ml の菌体が存在することにより、閾値を超える 4-VG が生成することが明らかとなった。さらに、酵母においては、4-VG および 4-VP を還元し 4-EG、4-EP に変換することも明らかとなった。

4-VG 生成活性がある微生物が清酒酵母のアルコール発酵に及ぼす影響を検討したところ、 10^7 CFU/ml の濃度で清酒酵母と共に存在していても清酒酵母のアルコール生産になんら影響を及ぼさないことが明らかとなった。

この結果は、清酒中での揮発性フェノール化合物の生産に麹から持ち込まれる微生物が関与しており、これらの菌は清酒中での生育は出来ないが酵素活性が保持されており、これにより揮発性フェノール化合物の生産が起こることを示している。

またさらに、清酒中の FA 濃度と 4-VG 濃度には相関が認められることより、

微生物によらない可能性を検討したところ、清酒中の FA が非酵素的に脱炭酸され 4-VG が生成する事を見いだした。

県内で製造された火入れ済み出品大吟醸酒 (FA 4.12 ppm) に FA を 5, 10, 20 ppm 添加後、0.45 μ のフィルターで濾過し 4, 15, 30°C で貯蔵した。

その結果、15, 30°C で貯蔵した清酒中の 4-VG 濃度は、何れの温度においても保温時間の経過と共に増加した。この増加量は添加した FA 量が多いほど貯蔵温度が高いほど顕著であり、15°C 41 日貯蔵後の 4-VG 量は添加 FA 量 0, 5, 10, 20 ppm に対して、それぞれ 0, 1.82, 13.0, 29.3 ppb、30°C では 29.9, 78.7, 118.7, 225.6 ppb であった。

この結果により清酒中の FA から 4-VG の生成には微生物関与と非酵素的な生成が有ることが明らかとなった。

麴から持ち込まれる微生物による 4-VG 生成を防ぐためには麴の細菌汚染を防ぎ細菌数を 10^6 CFU/g・麴以下にすることが重要である。

また、非酵素的な 4-VG 生成を防ぐためには原料米からの FA の遊離を押さえ、清酒の貯蔵温度を低く保つ事が重要である。

清酒の揮発性フェノール化合物による異臭について、本研究によりその一端があきらかとなった。今後も清酒の異臭発生原因の究明につながる研究が必要であり、研究を通じて異臭のない高品質な清酒醸造に貢献するものと考えている。

参考文献

- 1) T. Shinohara, S. Kubodera, and F. Yanagida : Distribution of Phenolic Yeasts and Production of Phenolic Off-Flavors in Wine Fermentation, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**(1), 90-97(2000)
- 2) S. van Beek and F. G. Priest : Decarboxylation of Substituted Cinnamic Acids by Lactic Acid Bacteria Isolated during Malt Whisky Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(12), 5322-5328(2000)
- 3) 向井伸彦, 岡田明彦, 鈴木昭紀, 高橋利郎 : ビール酵母とその他の醸造用酵母のビール醸造特性, *醸協*, **93**(12), 967-975(1998)
- 4) 金桶光起 : 清酒中の 4-ビニルグアイアコール生成要因, *醸協*, **109**, 320-326(2014)

細胞・分子から紐解く麹菌の未知なる世界

東京大学大学院農学生命科学研究科 丸山 潤一

はじめに

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、日本で古くから日本酒・醤油・味噌などの製造に用いられてきたとともに、異種タンパク質生産の宿主として世界的に利用されている。

麹菌は糸状菌である。演者が麹菌を研究対象とし始めた頃は、極性をもって菌糸を伸長させる形態的特徴に着目した研究はほとんど行われていなかった。演者は麹菌で初めて、緑色蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) を用いた細胞内可視化技術を導入し、糸状菌に特有の様々な細胞内構造の動態を明らかにしてきた。本講演では、麹菌で見出だした様々な現象と、細胞・分子レベルで解明したメカニズムについて最近の知見を紹介したい。

1) 糸状菌特異的なオルガネラ Woronin body の多細胞制御における機能解明

麹菌は細長い細胞が連なって菌糸を構成する“多細胞”である。隣接する細胞は、隔壁にあいた小さな穴である隔壁孔を介して、細胞間連絡を行っている。糸状菌特異的に存在するオルガネラ Woronin body は溶菌時に隔壁孔をふさぎ、隣接する細胞に溶菌が伝播するのを防ぐ機能を有する。

演者は、寒天培地上の麹菌のコロニーに水をかけると、菌糸先端から溶菌する現象を偶然発見した。この現象を利用することで、Woronin body が隔壁孔をふさいで溶菌の伝播を防ぐ機能を定量的に解析できるようにした。さらに、オランダのグループとの共同研究により、Woronin body が通常の生育条件においても隔壁孔をふさぐことを発見した。これは、溶菌時にのみ Woronin body が隔壁孔をふさぐとされてきた定説を覆す発見であった。

2) ペルオキシソームの新規機能の発見

Woronin body は、ペルオキシソームという真核生物に普遍的に存在するオルガネラから分化して形成する。この解析のなかで演者らは、麹菌のペルオキシソーム機能欠損株が、最少培地で生育できないことに気付いた。そして偶然、ビタミンの一種であるビオチンの添加により、生育が回復することを突き止めた。次いで、ビオチン生合成経路の酵素の 1 つが実際にペルオキシソームに局

在して機能することを明らかにした。以上により、ペルオキシソームがビオチンの生合成に関与することを、世界で初めて発見した。さらに、植物でも本発見を支持するデータを得て、ビオチンを生合成する真核生物に普遍的な現象を明らかにした。

3) 麴菌の特異な光応答とそのメカニズムの解明

光は自然界に存在する環境因子の 1 つであり、糸状菌において分生子形成は光照射により促進されるのが一般的である。一方で麴菌は、分生子形成が光照射によって抑制されることから、特異な光応答を示す。

最近我々は、照射する光の波長を選択できる LED 光源を使用することで、光による分生子形成の抑制は青色光に依存することを明らかにした。そして、光依存的な分生子形成抑制には青色光受容体が必要であり、このタンパク質が麴菌の特異な光応答に関与していることが示された。

4) 有性世代が未発見である麴菌における有性生殖誘導の試み

麴菌ではこれまで有性世代が見つかっておらず、交配育種が適用できないのが長年の課題である。演者らは、様々な用途の麴菌株を調べて 2 つの接合型が存在することを明らかにした。また、近縁の糸状菌において、菌核と呼ばれる気中菌糸が集合凝集した構造が内部に有性生殖器官を形成することが報告されている。麴菌では、菌核形成能が低下もしくは欠失しており、これが有性世代発見の障害となっていた。演者らは、菌核および有性生殖器官の形成に関連する遺伝子を操作することにより、有性孢子様の構造を初めて観察した。

5) 麴菌の細胞融合能と不和合性の発見

有性生殖の過程の 1 つとして細胞融合がある。麴菌の細胞融合に関する研究は、1950 年代に坂口謹一郎東京大学名誉教授らの報告があったが、以降は途絶えていた。演者らは栄養要求性の相補や BiFC 法という解析手法を利用することにより、約 60 年ぶりに麴菌の細胞融合能を再発見し、細胞融合に関与する新規因子を見いだした。さらには、異なる菌株の間で融合体が生育することのできない「不和合性」という現象を発見した。すなわち、同じ麴菌でありながらも、株間で自己・非自己を見分ける仕組みが存在することを明らかにした。