

平成 27 年度
清酒酵母・麴研究会
講演要旨集

日時 平成 27 年 10 月 5 日 (月)

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 「宮城県における酵母の開発について」
宮城県産業技術総合センター 橋本 建哉
- 13:50～14:20 「麴菌のエピジェネティックな二次代謝と分化の制御機構」
東京大学大学院農学生命科学研究科 河内 護之
- 14:20～14:50 「醸造用酵母によるフェノール臭の生成」
独立行政法人酒類総合研究所 向井 伸彦
- 14:50～15:10 休憩
- 15:10～15:40 「焼酎麴菌らしさを探るオミックス研究」
九州大学大学院農学研究院 後藤 正利
- 15:40～16:45 特別講演 「醸造酵母の形態情報の活用」
東京大学大学院新領域創成科学研究科 大矢 禎一
- 17:00～ 懇親会 （北とぴあ9階901会議室）

宮城県における酵母開発について

宮城県産業技術センター
橋本 建哉

1. 開発等の概況

平成2年当センターに醸造部門が設けられる以前は、宮城県酒造組合醸造試験所により酵母の分離・保存が行われてきたが、純米酒の品質向上に努めていく中で酵母の共同開発の気運が高まり、平成7年より県と県酒造組合が協力して清酒酵母開発を行ってきた。はじめに宮城県の純米酒製造に適した酵母の開発、次いで小規模の製造場でも低アルコール濃度の純米酒製造を容易にする酵母の開発を行い、それぞれ平成12酒造年度、平成13酒造年度より培養頒布を開始した。

2. 県と県酒造組合の共同開発菌株

①純米酒用酵母「宮城マイ酵母」

昭和61年の「みやぎ純米酒の県」宣言以来、純米酒造りに力を注いできた県酒造業界からの、宮城県における純米酒造りに適した酵母開発の強い要望に応えるため、宮城県と宮城県酒造組合が共同で開発した。親株として用いた初代宮城酵母は、昭和40年に宮城県酒造組合醸造試験所の佐藤により(株)佐浦のもろみから分離された吟醸用酵母で昭和60年から協会12号酵母として(財)日本醸造協会より頒布された酵母の原株である。穏やかな酢酸エステル系の吟醸香を特徴として広く使われた酵母であったが、純米酒製造に用いるには高アルコール濃度耐性や発酵性においてやや物足りない面があった。そこで初代宮城酵母のアルコール耐性強化株の取得を試み、平成12年度までに純米酒用酵母1株を選抜した。さらに、県酒造業界からの同酵母の泡なし変異株取得への要望に応じて、平成16年度までに泡なし株1株を取得した。

特性：宮城県における純米酒造りの特性を踏まえ、低温でよく発酵し、純米もろみの後半まで良好な発酵を維持するとともに、製成酒の酸味がやわらかくなる酵母。香りはおだやかな酢酸エステルが主体。

用途：純米酒、純米吟醸酒を主な用途とする。

親株：初代宮城酵母（協会12号の原株）

変異処理：初代宮城酵母の中から高アルコール濃度下での生存性を指標に自然変異株を選抜した。また froth flotation 法により泡なし株を取得した。

開発時期：平成9年度～平成12年度、平成14年度～平成16年度（泡なし株）

分譲時期・機関：高泡形成株については平成13酒造年度より、泡なし株については平成17酒造年度より現在まで当センター事業として有償配布を行っている。

②低アルコール濃度清酒製造用酵母「みやぎ酵母・愛実」

低アルコール濃度清酒製造には、割水あるいは追水を増やすことで製品のアルコール度を低く抑える方法（加水希釈型）とアルコール濃度が低い段階でもろみを上槽し製品のアルコール度を低く抑える方法（発酵停止型）に大別される。淡麗な品質になりやすい加水希釈型に比べ、発酵停止型は多様な商品を作りやすいメリットがある一方でダイアセチル臭などのオフフレーバー発生の危険が伴うため、高度なもろみ管理の技術や特殊な設備を必要とする。

特殊な設備を要せずに発酵停止型の低アルコール濃度純米酒を小規模の製造場でも安定的に製造したいという県酒造業界の要望に応えるため、ビシナルジケトン類（ダイアセチルを含む）の前駆物質 α ヒドロキシ酸類の低蓄積性酵母を宮城県と宮城県酒造組合が共同で開発した。

特性：もろみ全期間を通じて発酵中のトータルダイアセチル濃度（試料を強制酸化処理後にビシナルジケトン類の総量として測定）が検知閾値以下に保たれる^{1) 2)}。

用途：発酵停止型の低アルコール濃度純米酒製造を主な用途とする。

親株：日本醸造協会清酒用7号酵母

変異処理：EMSによる化学変異株より分岐鎖アミノ酸アナログに対する感受性を指標として選抜した。

開発時期：平成9年度～平成13年度

分譲時期・機関：平成13酒造年度は、実地試験醸造を実施し、平成14酒造年度より現在まで当センター事業として有償配布を行っている。

3. 過去の開発菌株

①吟醸用宮城酵母

平成6年までに宮城県酒造組合醸造試験所が分離・収集した酵母の中から選抜。平成11酒造年度以降は当センターより有償配布を行っている。

参考文献

- 1) 特許3972123号
- 2) 橋本建哉：食品と技術, 423, 12(2006)

麴菌のエピジェネティックな二次代謝と分化の制御機構

東京大学農学生命科学研究科醱酵学研究室 河内護之

【はじめに】

エピジェネティックな制御とは、遺伝情報への「後天的な修飾」により遺伝子発現の多様性を生み出す動的な機構である。代表的なものとして、DNA のメチル化、ヒストン修飾、小分子 RNA 等が挙げられる。我々は、この中でも特にヒストンのアセチル化修飾に着目し研究を行ってきた。

ヒストンアセチル化修飾の状態は、クロマチン弛緩あるいは凝集と密接に関わっている。そのため、その状態の変化は染色体レベルで遺伝子発現のダイナミックな変化を誘発する。ヒストンのアセチル化は、histone acetyltransferase (HAT) と histone deacetylase (HDAC) により制御される。このうち特に HDAC は、高等真核生物を始め幅広い生物で保存され、糸状菌にも保存されている。またここ十年で、糸状菌 HDAC の機能解析は大きく進展し、生育、ストレス耐性、二次代謝物生産へ関与など、多様な機能が示され、その重要性が認知されつつある。本研究会では、これまでの研究で明らかとなった麴菌 HDAC の多様な機能について紹介したい。

【麴菌 HDAC の系統解析と網羅的表現型解析】

麴菌染色体にコードされる HDAC ホモログ(AoHDAC)に関し全く未知であった為、始めにその検索と系統解析を行った。麴菌 RIB40 株のゲノム情報に対し、出芽酵母及びヒトの既知 HDAC 配列をクエリーとした BLAST 検索を行った結果、11 個の AoHDAC 遺伝子が抽出された。系統解析の結果、麴菌の AoHDAC 遺伝子は、酵母や他の糸状菌と同様に class1~class3 に分類され、高等真核生物に特有な class4 HDAC を含んでいなかった。その一方で、菌類で特異的な sirtuin に分類される遺伝子 *hstD* を有していた。以上のことから麴菌 AoHDAC 遺伝子も他の菌類と類似した進化をしていることが示唆された。

続いて全 11 遺伝子の AoHDAC の機能解析を目的に、遺伝子破壊を試みた。その結果、10 遺伝子の破壊株が得られたが、*hdaB* についてはヘテロカリオン破壊株(以下 *hdaB ht* 株)しか単離されず、必須遺伝子である事が示唆された。続いて、AoHDAC 破壊株及び *hdaB ht* 株を用い、最小培地におけるプレート・液体培養での表現型を解析した。その結果、*hdaB ht* 株、 $\Delta hdaD$ 株、 $\Delta hstD$ 株で、プレート培養で生育遅延、形態形成異常や分生子形成率の低下が見られた。また $\Delta hdaD$ 株は、液体培養での菌体量低下も見られた。

次に、AoHDAC の破壊株のストレス耐性試験を行った。ストレス耐性試験の結果、*hdaB ht* 株は、幅広いストレスに対し感受性を示した。したがって、*hdaB* の致死性の一因としてストレス全般への耐性低下が示唆された。また興味深いことに、 $\Delta hdaA$ 株は液体培養時の浸透圧に対してのみ感受性を示した一方、 $\Delta hstD$ 株はプレート培養時の浸透圧のみ感受性を示した。したがって、*hdaA*、*hstD* は、培養形態に依存したストレス応答に関係すること

が示唆された。

麴菌は、伝統醸造産業において「麴」として用いられることから、米麴上での生育や酵素生産についても解析を行った。その結果、*hdaB ht*株、 $\Delta hdaD$ 株では、プレート培養と同様に米麴上で菌体量が低下し、酵素生産にも影響する事が明らかとなった。また、プレート及び液体培養では生育への影響がみられなかった $\Delta hdaA$ 株で、米麴上での菌体量の低下が見られた。さらに $\Delta hstD$ 株では、菌体量の有意な減少は見られない一方、米麴上での酵素生産に影響することが明らかとなった。以上の解析により AoHDAC は、麴菌の幅広い表現型に影響することが明らかとなった。

【麴菌 *hstD*による二次代謝と形態分化制御の分子生物学的解析】

糸状菌は、医薬品や化粧品等の有用物質や人や植物に対する毒素など多種多様な二次代謝物を生産する。近年の研究で、糸状菌の二次代謝は、形態分化制御と、密接に関わっている事が明らかとなっている。先の解析で AoHDAC は、麴菌の形態分化にも多分に影響が見られた為、二次代謝物生産にも影響することが予想された。

そこで、AoHDAC 遺伝子破壊株の二次代謝物生産について、コウジ酸生産性を指標とし解析を行った。その結果 $\Delta hstD$ 株で、コウジ酸生産量が 200 倍上昇し、且つコウジ酸生産遺伝子も活性化していた。また、ペニシリン生産でもコウジ酸と同様の結果が得られた。さらに LC/MS による分析により、未同定の二次代謝物の生産が活性化されていることが示された明らかとなった。したがって *hstD*は、麴菌の二次代謝に強く影響していることが示唆された。菌類特異的 sirtuin *hstD*の生化学的機能については、出芽酵母で明らかにされているが、生理学上の機能はほとんど明らかではなかった。本解析により、*hstD*は菌類に特徴的な分子形成と二次代謝物生産に関係することが初めて明らかとなった。

糸状菌において *laeA* 遺伝子は、二次代謝と形態分化制御の中心的な因子としてよく知られている。そこで、*laeA* の遺伝子発現について検討した結果、 $\Delta hstD$ 株で高発現していることが明らかとなった。そこで、 $\Delta laeA \Delta hstD$ 二重破壊株、 $\Delta laeA hstD$ 高発現株、 $\Delta hstD laeA$ 高発現株を用いた遺伝学的な解析を行った結果、*hstD*は、*laeA*の上流で機能していることが示された。以上の解析結果により、菌類特異的 sirtuin *hstD*は、*laeA*の遺伝子発現制御を介し糸状菌の二次代謝と形態分化を制御していることが明らかとなった。

【参考文献】

- ・ Kawauchi M. *et al.*, *Eukaryot. Cell*, **12** (8), 1087-1096 (2013)
- ・ Kawauchi M. *et al.*, *J Biosci. Bioeng.*, **118**(2), 172-176 (2014)

※本研究は、平成 21 年~26 年にかけて独立行政法人酒類総合研究所で実施されました。

酵母による 4VG の生成について

独立行政法人酒類総合研究所

向井 伸彦

大麦、小麦、米といった酒類原料植物細胞壁中には、フェルラ酸、*p*-クマル酸、桂皮酸といったフェニルアクリル酸（フェノール酸）化合物が含まれている。フェルラ酸は、抗酸化活性、抗菌性、抗腫瘍活性等の機能が知られており最近注目されている。

ところで、酒類製造においては、香気成分の前駆物質としての役割を果たしているフェルラ酸はある種の醸造用酵母により発酵中に、あるいは蒸留や煮沸といった加熱工程において化学変換されて、煙様、燻製様のフレーバーを有する 4-ビニルグアヤコール(4VG)へと変換される。

酒類中の 4VG の存在は、南ドイツのバイツェンビールでは特徴香として不可欠なフレーバーである一方、清酒、焼酎、ワイン、通常のビールでは多量に存在するとオフフレーバーとして好まれない。また、泡盛醸造において 4VG は貯蔵中にバニラ様のフレーバーを有するバニリンへ変換され、泡盛古酒（ケース）の特徴香の 1 つとして働く場合もある。そのため、酵母のフェニルアクリル酸脱炭酸反応は、酒類のフレーバーの形成にとって重要である。

従来、酵母のフェニルアクリル酸脱炭酸反応に関与する遺伝子として 2 種類の遺伝子が知られていた。フェニルアクリル酸脱炭酸酵素遺伝子(phenylacrylic acid decarboxylase gene)(*PADI*, *YDR538W*) については、*PAD* 活性が欠損し、桂皮酸感受性を示す変異株を *PADI* で形質転換したところ、桂皮酸耐性と *PAD* 活性が回復したと報告されている。フェルラ酸脱炭酸酵素遺伝子(ferulic acid decarboxylase gene)(*FDC1*, *YDR539W*)に関しては、フェルラ酸脱炭酸酵素活性を持たない清酒酵母を、ワイン酵母の *FDC1* で形質転換したところ、フェルラ酸脱炭酸活性を有するようになったと報告されている。しかしながら、これらの遺伝子の遺伝子破壊株の表現型や、遺伝子産物には脱炭酸酵素活性があるかなどは確かめられていなかった。

そこで、酵母のフェニルアクリル酸脱炭酸反応に関与する遺伝子の解析や、様々な醸造用酵母においてフェルラ酸脱炭酸能を有しているかを調べ、醸造用酵母間での脱炭酸能の差異について解析した。また、4-VG 含有量を高めた焼酎製造を試みた。

1 酵母のフェニルアクリル酸脱炭酸反応に関与する遺伝子の解析

実験室酵母 YPH499 株を親株として、*PADI* 及び *FDC1* に関する遺伝子破壊株（単独破壊株、二重破壊株）を作成した。また、遺伝子破壊株に破壊した遺伝子を回復させた形質転換体を作成した。これら得られた株のフェニルアクリル酸脱炭酸能を調べたところ、脱炭酸反応には両遺伝子の発現が必須であることがわかった¹⁾。また、フェルラ酸の脱炭酸による 4VG の生成量は、*PADI* の高発現では親株と同じ程度にとどまったが、*FDC1* の高発現により増加した。

2 醸造用酵母におけるフェルラ酸脱炭酸能の差異

醸造用酵母のフェルラ酸脱炭酸能については、従来一部の酵母しか知られていなかった。そこで、清酒酵母、焼酎酵母を含め様々な醸造用酵母について調べたところ、実験室酵母、ワイン酵母の多く及びバイツェンビール酵母は脱炭酸を持つものに対して、清酒酵母、焼酎酵母、ワイン酵母の一部、バイツェンビール酵母を除くビール上面発酵酵母及びビール下面発酵酵母ではフェルラ酸脱炭酸能を有していないことがわかった^{2,4)}。また、醸造用酵母の *PADI*、*FDCI* 遺伝子配列を調べたところ⁴⁾、これらの脱炭酸能を有していない酵母では、*FDCI* の途中で終止コドンを生じる変異が生じていた。清酒酵母及び焼酎酵母に *FDCI* を発現させると脱炭酸能を持つようになった。清酒酵母及び焼酎酵母では *FDCI* が正常に機能していないことがわかった。

さらに、現在では産業的に利用されていない酵母を含めて様々な清酒酵母及び焼酎酵母のフェルラ酸脱炭酸能及び *PADI*、*FDCI* 遺伝子配列を調べたところ、清酒酵母及び焼酎酵母は選抜の初期の段階からフェルラ酸脱炭酸能を有していないことがわかった。*PADI*、*FDCI* 配列は清酒酵母きょうかい 2 号 (K-2) を除いて非常に類似していたが、いくつかの型に分けることができた。なお、根来の報告⁵⁾と同様 K-2 については清酒酵母型と非清酒酵母型の配列を併せて有しており、ハイブリッドであることがわかった。なお、K-2 の非清酒酵母型配列については、上面発酵ビール酵母、ワイン酵母 (バイツェンビール酵母) などに特有の一塩基置換がみられ、非常に複雑な配列であった。

3 4-ビニルグアヤコールを高めた焼酎の製造

4VG 自体は焼酎のオフフレーバーとされているが、泡盛古酒 (クース) の特徴香の 1 つであるバニリンの前駆物質でもある。米焼酎及び泡盛の製造において、フェルラ酸脱炭酸能を有するワイン酵母の使用、及び醸造用酵素剤 (細胞壁分解酵素、ヘミセルラーゼ剤) を用いることで、通常の仕込みを行うよりももろみ中に 4VG が増加するとともに、蒸留後の留出液に顕著に 4-VG を増加させることができることがわかった⁶⁾。

【参考文献】

- 1) N. Mukai, K. Masaki, T. Fujii, M. Kawamukai and H. Iefuji: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109 (6), 564-569 (2010)
- 2) 向井伸彦、岡田明彦、鈴木昭紀、高橋利郎: *醸協*、93 (12)、967-975 (1998)
- 3) T. Shinohara, S. Kubodera and F. Yanagida: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (1), 90-97 (2000)
- 4) N. Mukai, K. Masaki, T. Fujii and H. Iefuji: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118 (1), 50-55 (2014)
- 5) 根来宏明: 第 3 回日本醸造学会若手シンポジウム要旨集 (2011)
- 6) 向井伸彦、木曾邦明、家藤治幸: *醸協*、100 (11)、832-835 (2005)

焼酎麹菌らしさを探るオミックス研究

九州大学大学院農学研究院
未来創成微生物学寄附講座
後藤 正利

麹菌はその安全性と優れた酵素生産能をもつことから、酒類、醤油、味噌など我が国の伝統的発酵食品製造に使用されている。温暖な九州地域でおもに製造される本格焼酎には、原料のでんぷんを加水分解するのに必要な α -アミラーゼやグルコアミラーゼを高生産することに加え、製造時のもろみの pH を低く保ち雑菌の増殖を防ぐためにクエン酸を高生産する焼酎麹菌（黒麹菌、白麹菌）*Aspergillus luchuensis* が用いられる。白麹菌を特徴つけている性質は、（１）分生子が非黒色である（２）カビ毒を生産しない（３）クエン酸の高生産性（４）多様な糖質加水分解酵素をもつ、という点があげられる。本講では、これらの白麹菌を特徴づけている性質の要因について紹介する。

これまで、白麹菌においては研究対象とするための分子基盤・ツールが整備されていなかったため、まず *A. luchuensis* mut. *kawachii* IFO 4308 のゲノム解析と研究用宿主菌（栄養要求性株、高効率相同組換え株）の開発を行った。白麹菌のゲノムサイズは 37 Mb で、11,488 ORF をコードしていると推定された。

焼酎製造に用いられる麹菌は、最初は黄麹菌 *A. oryzae* であったが、より生酸能力の高い黒麹菌が導入された。その後、黒麹菌のアルビノ変異株で分生子の色素合成能が失われた白麹菌がよく利用されている。淡いベージュ色の分生子をつくる白麹菌と黒い分生子をつくる黒麹菌、黒カビ (*A. niger*) とのゲノムを比較した。分生子の色素合成に関与する *pksP* (ポリケチド合成酵素) 遺伝子に白麹菌にだけ点変異があり、白麹菌では *PksP* のサイズが小さくなり活性発現に重要な機能性ドメインの一つを欠失して、色素合成の機能が低下していることが推察された。

焼酎麹菌に近縁な *A. niger* には、オクラトキシンやフモニシンといったマイコトキシンを生産することが知られている。白麹菌では、オクラトキシン合成に関与する重要な遺伝子を含む遺伝子クラスターの一部が欠失していること、フモニシンについても合成遺伝子群のほとんどを保有していないことがわかった。すなわち、白麹菌では両マイコトキシンが遺伝子レベルで合成できない状態である。

焼酎製造現場では、製麹時の前半の 30 時間程度は 40°C 程度の高温経過をとりアミラーゼを生成させ、後半に 35°C 程度の低温を維持してクエン酸を生成させる品温管理が実践されている。白麹菌と黄麹菌で同様の条件で作成した大麦麹の有機酸生産量を比較した。白麹菌では麹中にクエン酸を著量蓄積させたが、黄麹菌では白麹菌の 6% 程度のクエン酸量しか蓄積しなかった。クエン酸を高生産する白麹菌、*A. niger* と高生産しない黄麹菌の 3 菌株間で同源性 70% 以上を示す遺伝子数を調べた。3 菌株間で共通に保存された遺伝子数は 3,797 存在するが、クエン酸高生産株間で保存され、かつ黄麹菌では保存されていない遺伝子数が 4,852 存在した。これらの 4,852 遺伝子のうち、TCA 回路での代謝に関与すると推定される遺伝子は 4 つ存在し、クエン酸生産の場であるミトコンドリアに局在する輸送体をコードする遺伝子は 6

つ存在した。

白麹菌の麹中での遺伝子発現変動を調べるために、2つの条件で麹を作成した。白麹菌を接種後、アミラーゼ活性を誘導するために25時間までは36から40°Cで培養し、クエン酸を高生産させるために26.5時間後には30°Cで44時間まで培養した（通常製麹）。一方、上記製麹において接種後26.5時間、44時間も40°Cのまま培養温度を維持した（高温製麹）。麦麹中の白麹菌全遺伝子の転写量をマイクロアレイで推定して、正常製麹サンプルと異常製麹サンプル間の同培養時間における発現変動遺伝子を抽出した。培養温度低下によるクエン酸生産誘導条件下において発現量が上昇した566遺伝子および低下した548遺伝子を同定した。クエン酸生産誘導条件下において発現量の低下した遺伝子は、ペントースリン酸経路、グリセロール経路、トレハロース経路などで働く遺伝子が多く見られた。また、アミノ酸輸送に関わる遺伝子群は発現上昇していた。一方、タンパク質の折りたたみプロセスに関与する各種遺伝子が発現低下した遺伝子群に多く見られた。これらの発現変動遺伝子全体の挙動から、糖化酵素の分泌生産を促すための高温培養は白麹菌にとってストレスであり、細胞を熱ダメージから保護するため、タンパク質の折りたたみに関する機能、ストレス保護剤として働くトレハロースやグリセロール生産の活性化すなわち熱ストレス対応を行っていることがわかった。低温培養への移行により、それら活性化した代謝系の抑制に伴う代謝系の変換（EMP経路、TCA回路への変換）がクエン酸の高生産に関係しているものと推察された。

白麹菌（麹菌）のもうひとつの特徴的な性質は、多様な糖質加水分解酵素（GH）をもつことである。現在までに、およそ25万種のGHが、アミノ酸配列の相同性にもとづいて133のファミリーとNon-classifiedに分類されたCAZY (<http://www.cazy.org/>) データベースに登録されている。白麹菌ゲノム中には、少なくとも253のGHをコードする遺伝子が存在し、それらは55のGHファミリーとNon-classifiedにわたる。白麹菌わずか一つの生物種で全体の約4割のGHファミリーをカバーしていることになる。白麹菌の253のGHの中には、白麹菌が麹菌としての役割を果たすために重要な耐酸性 α -アミラーゼ（GH13）、グルコアミラーゼ（GH15）などの原料の糖化に必須なGHも当然含まれている。我々は、白麹菌の253のGHのうち、白麹菌や類縁菌において、未だ基質特異性が未同定な分泌型GHと推定される基質特異性未知のおよそ100種のGHの基質特異性を明らかにしようとしている。例えば、白麹菌が保有する2つのGH128ファミリー酵素は、新規なグルコースを生成しないオリゴ糖生産型 β -1,3-endoglucanaseであることがわかった。

白麹菌の特徴的な性質や機能を明らかにする事で、焼酎醸造特性の異なった多様な白麹菌の育種とその利用、クエン酸高生産を利用した有機酸高生産株の育種、新規な加水分解酵素の産業利用が可能となることを願って、白麹菌の活躍の場を提供できるよう研究を行っている。

醸造酵母の形態情報の活用

東京大学 大学院新領域創成科学研究科

大矢 禎一

我々の研究室では CalMorph というハイスループット画像解析システム¹を使い、出芽酵母の高次元フェノタイピングに関する基礎研究を長年行ってきた。表現型解析が表面的な解析に終わることがないように、我々が掲げてきた基本的な方針は以下の5つである。

- 1) 高次元 (501 次元) の形態情報の中でどの形態に注目するかを予め定めない
- 2) 従来の生物学的知識を解析前には利用せず、解析方法にバイアスをかけない
- 3) 一般化線形モデルや多変量解析などを駆使して、意味のある生物情報を抽出する
- 4) 細胞システム全体を理解することを大きな目的のひとつにする
- 5) 取得したデータはデータベースとして公開する

その結果、類似した遺伝子機能の欠損は同じような表現型を示すことを示し、「遺伝子の機能」と「変異株の表現型」の間に見られる一般原理を明らかにした²。さらに機能未知遺伝子の機能が予想できること、薬剤の細胞内標的が予想できることを示した²。生物が持つ表現型のシステムレベルの理解を進め、New York 大学の Mark Siegal らと並行して、細胞システムの頑強性 (ロバストネス) の研究を進め、システムが持つ頑強性を細胞の形態表現型の均一性から研究してきた^{2,3}。

CalMorph の研究は基礎研究だけに留まらず、バイオテクノロジーの分野で清酒酵母やビール酵母などのいわゆる醸造酵母の研究にも利用されるようになってきた。そこで本講演では最近行った3つの研究機関との共同研究を紹介する。

I. 遺伝的に安定な清酒酵母の簡便な検査法

ごく最近朝日酒造 (株) の田村博康、平田大らは、カプロン酸エチルを高生産し、紡錘体形成チェックポイントが正常である清酒酵母 (G9CR) の育種に成功した⁴。芳香が高い大吟醸酒を造るのに適した株であるとともに、染色体の安定性が保証されている優良株として期待が高まっている。我々は染色体の安定性と細胞システムの頑強性が関係していること、およびシステムの頑強性は細胞形態の均一性から判断できることから、ひとつの仮説を考えた。それは、チェックポイントが異常になった清酒酵母よりもチェックポイントが正常である清酒酵母の方が、細胞システムが頑強、つまり形態的に均一ではないかという仮説である。実際に CalMorph を使って調べてみたところ、予想通りシステムの頑強性の指標である Phenotypic potential (ここでは形態ノイズ指標と呼ぶ) に差が見られ、チェックポイントが正常である清酒酵母の方が形態的に均一になっていた。このことから、染色体の安定性は形態ノイズ指標を用いて簡単に調べられることを提案した。

II. 清酒酵母の網羅的な形態解析からわかること

酒類総合研究所の赤尾健らの研究チームは、協会酵母を含む清酒酵母の網羅的なゲノム配列を明らかにしている。そこで、我々はそれら清酒酵母 27 株の高次元形態情報を CalMorph を使って取得し、確率分布に基づく一般化線形モデルを導入して清酒酵母間の形態的違いを検出し、主成分分析などの多変量解析を行って清酒酵母間の形態的多様性を解析した。驚いたことに、遺伝的多様性は小さいにも関わらず、清酒酵母の形態的多様性は自然界に存在する全出芽酵母 *S. cerevisiae* 野生型株に匹敵するほどであり、形態的な変化が頻繁に清酒酵母内で起きていることが明らかになった。さらに形態情報を指標にして清酒酵母の育種過程を精査し、突然変異株を取得する時や交配の時にどのような形態変化が見られるか、その規則性を明らかにした。さらに上述した形態ノイズ指標の算出することにより、形態的に不均一になり、システムの頑強性が弱まっている清酒酵母を特定することができた。既に発表している清酒酵母の形態情報⁵に加えて今回の網羅的な形態表現型のデータは清酒酵母を育種する上で重要な意味を持つと考えている。

III. 醸造中の酵母のモニタリング

キリンビール（株）の善本裕之らから、ビール醸造中の細胞形態変化を CalMorph を使ってモニターできれば、従来から生理状態を表す指標として使われている「酵母の活性」に置き換えることができるのではないかと相談を受けたのがこの研究のきっかけである。期待通り、CalMorph で取得した高次元の酵母形態データを二段階の主成分分析により解析することによって、発酵過程における下面発酵酵母（ラガー酵母）のダイナミックな活性変化を追跡することに成功した^{6,7}。

参考文献

1. Okada H, Ohnuki S, Ohya Y. (2015) Quantification of cell, actin, and nuclear DNA morphology with high-throughput microscopy and CalMorph. **Cold Spring Harb Protoc.** 2015:408-12.
2. Ohya Y, Kimori Y, Ohnuki S, Okada H. (2015) Single cell phenomics in budding yeast. Perspectives **Mol Biol of Cell.** 26: in press.
3. Yvert G, Ohnuki S, Nogami S, Imanaga Y, Fehrmann S, Schacherer J, Ohya Y. (2013) Single-cell phenomics reveals intra-species variation of phenotypic noise in yeast. **BMC Syst Biol.** 7:54.
4. Tamura H, Okada H, Kume K, Koyano T, Goshima T, Nakamura R, Akao T, Shimoi H, Mizunuma M, Ohya Y, Hirata D. (2015) Isolation of a spontaneous cerulenin-resistant sake yeast with both high ethyl caproate-producing ability and normal checkpoint integrity. **Biosci Biotechnol Biochem.** 79:1191-1199.
5. Watanabe D, Nogami S, Ohya Y, Kanno Y, Zhou Y, Akao T, Shimoi H. (2011) Ethanol fermentation driven by elevated expression of the G1 cyclin gene *CLN3* in sake yeast. **J Biosci Bioeng.** 112:577-582.
6. Ohnuki S, Enomoto K, Yoshimoto H, Ohya Y. (2014) Dynamic changes in brewing yeast cells in culture revealed by statistical analyses of yeast morphological data. **J Biosci Bioeng.** 117:278-284.
7. 大矢禎一 (2014) ビール醸造の発酵過程におけるビッグデータの活用 **バイオサイエンスとインダストリー** 72:380-384.