

焼酎製造用酵母の細胞・遺伝子工学的育種研究と

ポストゲノム（遺伝子機能）研究への展開



小川喜八郎（農学部）

はじめに

近年、本格焼酎は1) 低カロリー、低糖分、2) 血栓溶解酵素、ウロキナーゼの生成による脳梗塞等の予防、3) 善玉コレステロール増やし、心筋梗塞や動脈効果の予防、4) 気分転換、ストレス解消、肥満解消、糖尿病やガン予防効果、5) 感情をコントロールする伝達物質の生産等ヘルシー志向ということが医学的にも証明されて来た。特に、血栓予防病により、心筋梗塞、脳梗塞、強心症に効果的なことが判明した。

このような焼酎の新しい機能の他に、焼酎の嗜好品としての基本的な魅力にするために、当研究室では、バイテクノロジーの先端技術を用いて焼酎の香りや風味の改良に関わる麹菌や酵母の細胞融合や遺伝子工学による雑種形成や遺伝育種を行ってきた。

本格焼酎はアルコールという媒体を通して人間の感覚機能を豊かにしてくれる食の基本に関わる嗜好品である。愛飲される焼酎のイメージは、いうまでも無く、地域により異なるが、消費者の健康面に関する評価が高まっており、それが最近の焼酎の消費量の拡大の要因の一つとなっている。焼酎志向の高まりは、健康酒問いうイメージが一般大衆にも認められてきたことである。焼酎のようにお湯割りのできるアルコール濃度の低い酒が好まれる時代になると、香りや風味の優れた焼酎原酒の製造が求められている。理想的な品質設計をするには、

1) 良質な原料使用、2) 理想的な微生物の育種（香り、風味、甘味の醸成）、3) 新しい蒸留技術の開発、4) 新しい貯蔵・熟成技術の開発、5) 香り、風味および甘味等の協奏されたブレンド技術の開発等の総合体系化とシステム緊要の課題である。

そこで、焼酎製造上、最も重要な微生物の機能開発に対する当研究室の研究成果の一部について報告する。これらの研究は21世紀のポストゲノム研究の端緒であり、遺伝子源の確保や遺伝資源開発の原動力となる。

1. 高温性酵母の分離・検索と育種

東南アジアには、ラクパン（タイ国の種麹）や曲（中国の麹）等から300株の酵母を分離し、その中から、現在、使用されている焼酎酵母（宮崎酵母 KM921）よりも高温で発酵する高温性酵母の7株を選抜した。これらの酵母は、サッカロマイセス セレビスィエーの標準記載と比較していくつかの差異が認められたが、サッカロマイセス セレビスィエーの種としての枠を超えるものではなく、サッカロマイセス セレビスィエーと同定された。すべての温度条件下で、宮崎酵母 MK021 に比べて生育も早く、優良酵母の特性を示した。

小仕込み醸造試験の結果、低 pH、高温で宮崎酵母 MK021 より高濃度のアルコールを生産することが認められた。

パルスフィールド電気泳動によってこれらの高温性酵母と標準菌および DNA サイズ標準の染色体 DNA 泳動パターンを調べた結果、サッカロミセス・セレビジエーと DNA サイズ標準および標準株の染色体 DNA 数と DNA サイズにおいて概ね類似のパターンを示した。しかし、染色体数および染色体サイズには若干の差異が認められた。大部分の菌株で DNA サイズの比較的小さいバンド域で染色体 DNA が前後に分離している違いが見られた。これは菌株のタリズムに関係しているものと推測された (第 1 図)。

2. プロトプラスト電気融合による焼酎酵母の改良

プロトプラスト電気融合法による焼酎酵母の改良を目標に清酒酵母協会 9 号の栄養要求変異株 (*ade*) と宮崎焼酎酵母 MK021 の同変異株 (*lys*) を用いて電気融合処理を行った。融合の最適パラメーターは周波数式 MHz、交流電圧 400 V/cm、直流パルス電圧 6 kV/cm、パルス幅 60 μ sec、パルス回数 2 回であった。融合株のあるものは良好な生育発酵力を示し、親株に比較して多量の香気性成分を生産した。最も孢子形成能の高い融合株 F-1 から単孢子分離株を分離し、米麴あるいは大麦麴を用いて発酵能および香気性成分の生成能を検討した。特に、孢子分離株 F-1-2 は良好な生育と発酵性を示し、*n*-プロパノール、イソブチルアルコール、イソアミルアルコールおよび酢酸イソアミル等の香気性成分を多量に生産することが認められた (第 2 図)。

3. プロトプラスト融合による焼酎麹菌の育種

当研究室では焼酎麹菌アスペルギルス・アワモリ・パール、カワチとアスペルギルス・ウサミ・ミュータント・シロウサミの種間プロトプラスト融合による雑種形成等の研究を行った。これらの研究を通して、醸造における麹菌の複合形質の導入、特に、セルラーゼやアミラーゼ等の酵素生産性や有機酸生成能の増大、あるいは香気性に関する形質の付与を目的とした有用菌株の育種を行ってきた (第 3 図)。

4. アナログ耐性およびセルレニン耐性変異株による焼酎酵母の香気性成分生成能の改良

近年、酒類業界では微生物特性を生かした酒類の向上が望まれており、取り分け、宮崎県の地場産業の一つである本格焼酎については、香りに関する焼酎酵母の開発、つまり、きめ細かい、滑らかな味とフルーティーで軽快な芳香性焼酎の開発が行われてきた。現在、酢酸イソアミルアルコール、カプロン酸エチル、 β -フェネチルアルコール等の香気成分の付与された新規焼酎酵母の研究が研究されてきた。

現在、酵母への香気性成分の付与は、突然変異や変異遺伝子の導入等によって行われたきたが、LEU4 遺伝子 (酢酸アミルアルコール生成に関係する α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼをコード)、ARO4 (β -フェネチルアルコール生成に関係する DAHP シンターゼ

をコード) およびファ S2 遺伝子 (変異遺伝子導入によるカプロン酸エチルの増加) などの導入は、現在、実用的ではないので、アナログ耐性株やセルレニン耐性株の造成やそのその応用が元段階では実用的に期待されている。

そこで、東南アジアより分離した高温性酵母にこれらの香気成分の付与を目的に β -フェネチルアルコールや酢酸イソアミルアルコールを生成するアナログ耐性株を造成し、酢酸イソアミル生成株荷にセルレニン耐性を付与し、カプロン酸生成能を有する菌株の造成等新規焼酎酵母の開発や育種について述べる。これらの高温性酵母に UV 照射や EMS 処理を行うことにより、 β -フェネチルアルコール生成に関する L-フェニールアラニンノアナログ、p-FPA(p-fluoro-DL-phenylalanine)、酢酸イソアミル生成に関係する L-ロイシンのアナログ、TEL(5, 5, 5-Trifluoro-DL-leucine)の耐性株および酢酸イソアミル生産株に高カプロン酸に関係するセルレ耐性を付与した。

p-FPA 耐性株 H 葉焼酎酵母 *S. cerevisiae* MK021 の 5-10 倍の β -フェネチルアルコールアルコールを生成した (第 1 表、第 4 図)。TFL 耐性株は EMS 処理により宮崎酵母の 5 倍の酢酸イソアミルを生成した (第 2 表、第 5 図)。セルレニン耐性株は EMS 処理した TFL 耐性株 B6-T4 (酢酸イソアミル生産株) が宮崎酵母よりも高いカプロン酸生産性を示した (第 2 表、第 6 図)。

5. 焼酎用酵母遺伝育種のポストゲノム研究への展開

以上の我々の研究成果を通して酵母の遺伝育種の成果がポストゲノム研究との関係について考察する。醸造酵母の生成する主な香気成分は (1) アルコール、(2) カルボニル、(3) 酸、(4) エステル、(5) 含硫化合物および (6) アミンからなる。これらの芳香成分として酒類中に共通に含まれている重要な成分は C2-c5 アルコール類と、それらの酢酸エステル、さらに、C4-C8 脂肪酸エチルエステルである。これらの芳香エステルは酵母によって生合成されるが、1) C3-C5 アルコール (高級アルコール) の生合成と 2) アセチル CoA とアルコールがアルコールアセチルトランスフェラーゼの作用でエステルが生成される。酵母による高級アルコールの生合成はアミノ酸代謝と深く関わっている。その経路は

1) エールリッヒ経路でアミノ酸の脱アミノ反応により 2-オキシ酸 (α -ケト酸) が生成される。

2) 本来、糖からアミノ酸が生合成される経路で有り、その中間体として 2-オキシ酸が生成される。1) と 2) によって生成される 2-オキシ酸は、脱炭酸と還元反応によりアルコールになる。これは、解糖系によって生成される 2-オキシ酸であるピルビン酸がアセトアルデヒドを経てアルコールになる。

3) 焼酎の香りに重要なイソブチルアルコールやイソアミルアルコールの生成は培地中の窒素源に影響する。培地中にロイシンやバリン等のアミノ酸が不足すると、酵母はこれらのアミノ酸を経路 2) により生成される。生成した 2-オキシ酸へのアミノ基の付加す反応は、アミノ基の供給源である他のアミノ酸やアンモニウムイオン量の制限を受ける。

もし、アミノ基供給量が不足すれば、生成された過剰の 2-オキシ酸は高級アルコール煮生る。一方、培地中にロイシンやバリン等が十分に存在する場合には、経路 2) による糖からの 2-オキシ酸合成は、ネガティブフィードバックを受けて阻害される。一方、培

地から取り込まれたロイシンヤバリンから！)の経路でそれぞれ該当する高級アルコールが生成される。

また、脂肪酸エステル¹⁾の生合成は、エステラーゼやアルコールシアルトランスフェラーゼの触媒によって生成する。さらに、ロイシン酸エチルの生成には麹菌の関与が重要である(第7図)。このように代表的な香気成分、 β -フェネチルアルコール、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルの生成に関係する酵素の複雑さや生産物制御機構(フィードバック阻害やフィードバック抑制)が働き、遺伝子機能の発現は非常に複雑なことが明らかである(第1、234))。したがって、ポストゲノムの研究は遺伝子機能の解明であり、焼酎生成に関係する遺伝子産物の酵素系を明らかにすることが研究の基盤研究になる。その解明の手法は変異処理や遺伝子導入による遺伝子の改変や酵素の精製が大きなキーポイントとなる香気性生成に関する酵素と主な育種の概要を第3表に示す。酵母による香気成分の生成経路は複雑であり、関与する酵素系はさらに複雑である。

おわりに

上述の焼酎用微生物の酵母や麹菌の育種は遺伝子機能の開発であり、バイオテクノロジーの先端技術による遺伝子産物としての酵素系の改変が主な目的である。したがって、これらの酵素系の発現系を遺伝子レベルで解析する基盤研究が展開されることが望まれる。

文献

- 1) K. Ogawa, M. Tsuchimochi, K. Taniguchi and S. Nakatsu: Interspecific Hybridization of *Aspergillus usammii* mut. *shirousamii* and *Aspergillus niger* by protoplast Fusion, Agric. Biol. Chem., 53(11), 2873-2889 (1989)
- 2) 小川喜八郎・藤井昇・幸賢二・一の瀬英志・平原敏幸・片渕勇敬：プロトプラスト電気融合法による焼酎酵母の改良、
日本醸造協会誌、86巻、6号、447-452、(1991)
- 3) 小川喜八郎：プロトプラスト融合による糸状菌の雑種形成と遺伝育種、
日本醸造協会誌、86巻、10号、751-758 (1991)
- 4) 小川喜八郎・幸賢二・レキ ウィチャクソノアシャデイ・パラニータヤーナヌ
パッツ・日高輝夫：東南アジア由来高温性酵母の焼酎醸造への応用の可能性、
日本醸造協会誌、86巻、11号、826-828 (1992)
- 5) K. Ogawa, N. Fujii, K. Furukawa, Reki W. Ashadi, P. Thayananuphat and K. Tanaka: Transfer of Cellulolytic Character of *Aspergillus niger* into *Aspergillus kwachii* by Their Protoplast Fusion, J. Gen. Appl. Microbiol. 39, 443-452 (1993)
- 6) K. Ogawa : Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural applications ; Approaches to Hybridization and Applied Genetic by Protoplast Fusion, Kojis and Mushrooms (ed. Yoshikatu Murooka and Tadayuki Imanaka), Marcel Dekker, Inc, 581-603 (1994)

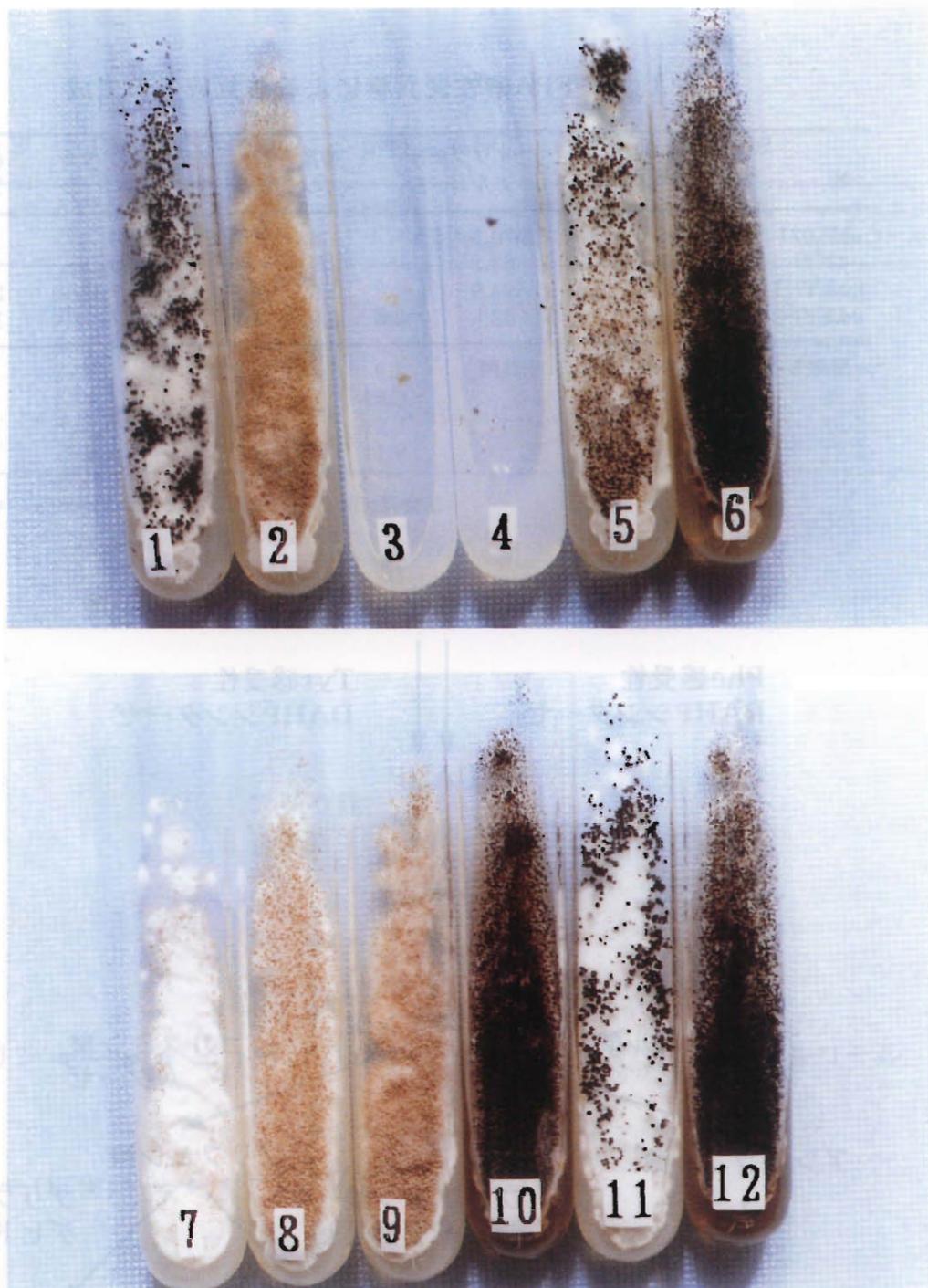


図3 細胞融合による新規焼酎麹菌の造成

- 1 黒麹菌
- 2 白ウサミ菌
- 3 黒麹菌の変異株
- 4 白ウサミ菌の変異株
- 5 融合株 (ヘテロカリオン)
- 6 融合株 (2倍体)
- 7-12 有用組み替え麹菌
(3と4は最小培地に生育しない)

表1 *p*-FPA耐性変異株による香気成分の生成

株	<i>n</i> -プロ パノール	イソブチル アルコール	酢酸 イソアミル	イソアミル アルコール	<i>o</i> -フェネチル アルコール
MK021	45.0	70.5	1.8	129.4	23.9
43(Y)	65.7	62.2	2.9	130.5	38.2
43(Y)-1	61.8	74.9	3.0	141.7	239.7
43(Y)-2	63.6	62.5	2.9	128.7	104.0

焼酎もろみの発酵条件：30℃、6日間

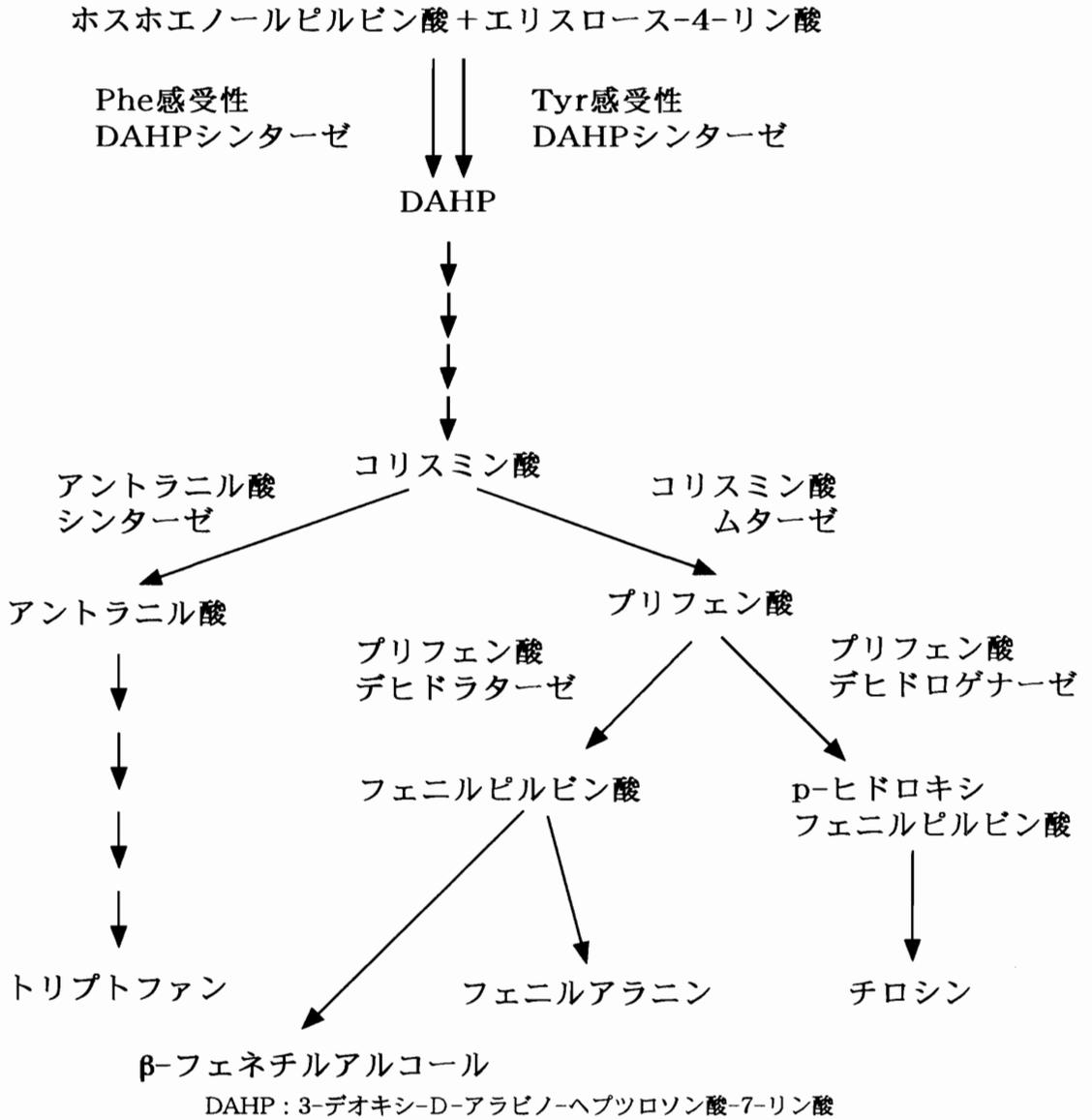


図4 酵母によるβフェネチルアルコールの合成経路

表2 TFLおよびセルレニン耐性変異株による香気成分の生成

株	n-プロパノール	イソブチルアルコール	酢酸イソアミル	カプロン酸エチル	イソアミルアルコール	o-フェネチルアルコール
MK021	65.8	102.9	2.5	ND	135.8	9.2
B6	76.2	107.1	5.2	0.8	191.4	22.8
B6-T4	98.3	94.4	5.2	0.7	435.1	33.0
B6-T4-1	77.6	108.9	6.3	2.2	367.1	11.8
B6-T4-2	62.7	97.2	13.0	0.8	580.1	30.3
B6-T4-3	89.0	98.3	12.7	2.6	409.2	24.2
B6-T4-4	76.5	102.6	11.9	1.1	381.8	17.3

焼酎もろみの発酵条件：20℃、6日間 ND:無検出

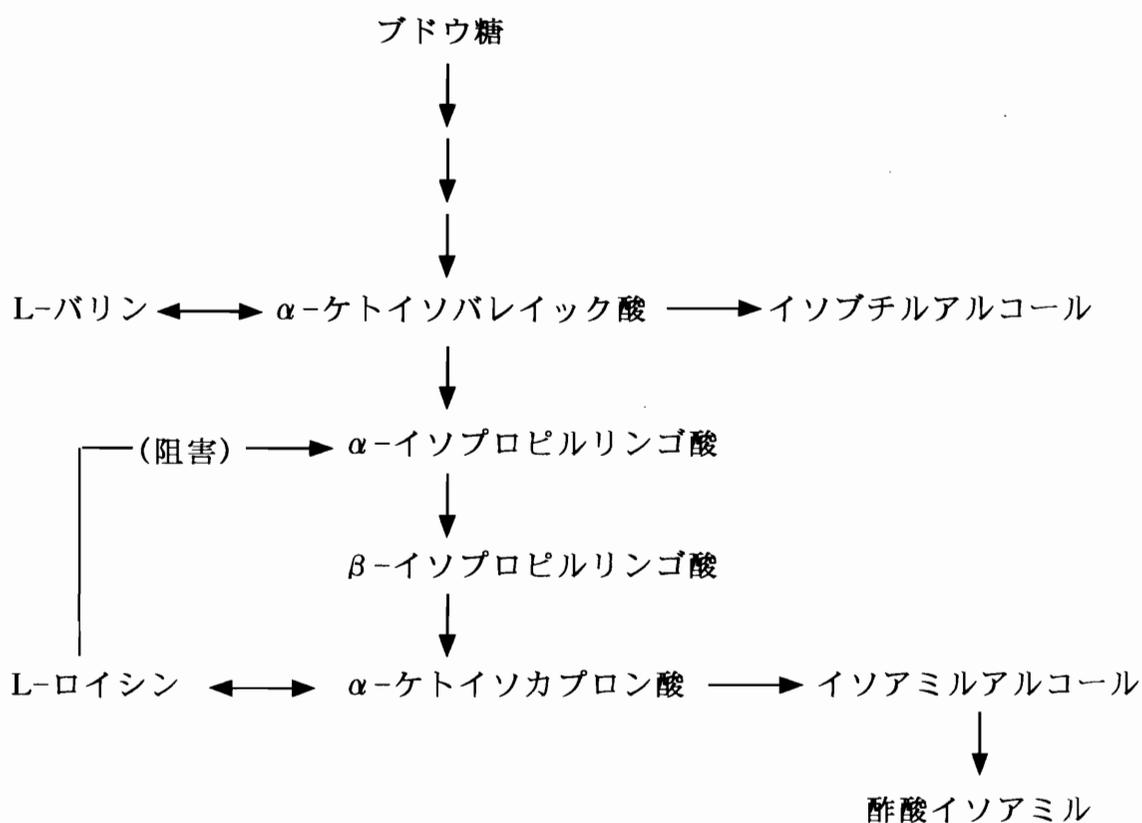
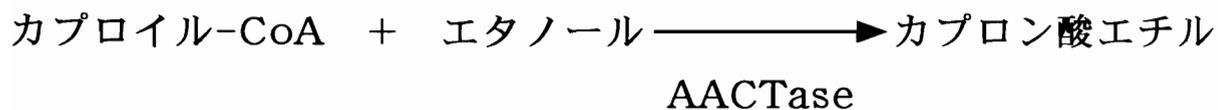
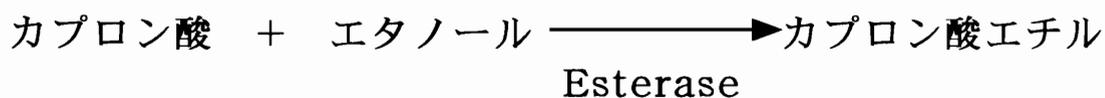


図5：酵母による酢酸イソアミルの生合成経路



AACTase (アルコールアシルトランスフェラーゼ)

図6：酵母によるカプロン酸エチルの合成

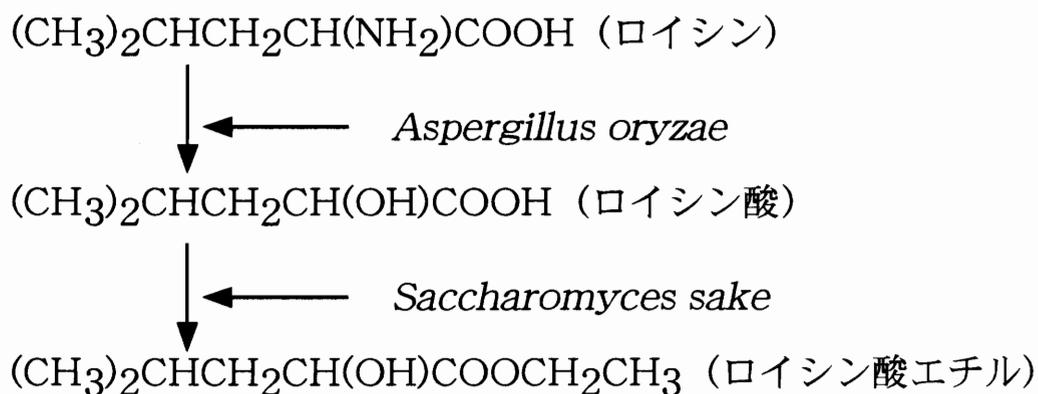


図7 ロイシン酸エチルの合成経路

表3 香気生成に関連する酵素と主な育種の概要

対象の香気成	関連酵素名 (遺伝子)	育種方法・酵素精製
イソアミルアルコール	・ α -イソプロピルリンゴ酸 シンターゼ(LEU 4)	突然変異：ロイシニアナログ耐性株 の分離
	・ 同上	遺伝子導入：LEU4遺伝子を多コピー ベクターで導入
β -フェネチルアルコール	・ プリフェン酸 デヒドロゲナーゼ(TYR1)	突然変異：フェニルアラニンアナログ 耐性株の分離
	・ 同上	変異遺伝子の導入：単離したTYR1 変異遺伝子をYCP型ベクターで導入
	・ DAHPシンターゼ (ARO4)	突然変異：フェニルアラニンアナログ 耐性株の分離
	・ 同上	変異遺伝子の導入：単離したARO4 変異遺伝子をYCP型ベクターで導入
酢酸イソアミル	・ アルコールアセチルトランス フェラーゼ (生成酵素)	単一蛋白までに精製
	・ エステラーゼ (分解酵素)	・ 酢酸イソアミル分解酵素を部分精製 ・ 分解活性の低い酵母を育種
カプロン酸エチル	・ アルコールアセチルトランス フェラーゼ	単一蛋白までに精製
	・ エステラーゼ	部分精製
	・ 脂肪酸合成酵素 (FAS2)	突然変異：酵素阻害剤のセルレニン 耐性株の分離
	・ 同上	セルレニン耐性遺伝子の導入