

令和5年度  
清酒酵母・麴研究会  
講演要旨集

日時 令和5年10月3日(火)

会場 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

- |             |  |        |
|-------------|--|--------|
| 13:10～13:40 | 酵母における TTC 染色性に寄与する遺伝子<br>東京農業大学応用生物科学部醸造学科  | 中山 俊一  |
| 13:40～14:10 | 静岡県における清酒酵母の開発について<br>静岡県工業技術研究所沼津工業技術支援センター | 鈴木 雅博  |
| 14:10～14:40 | 質量分析イメージングの米麴特性解析への応用<br>大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻  | 新聞 秀一  |
| 14:40～15:00 | ～休憩～   |        |
| 15:00～15:30 | 黄麴菌における mRNA の細胞内局在と分子制御機構<br>九州大学農学研究院      | 樋口 裕次郎 |
| 15:30～16:35 | 特別講演：酒造用種麴と麴の変遷<br>株式会社樋口松之助商店               | 山下 秀行  |

## 酵母における TTC 染色性に寄与する遺伝子

東京農業大学 中山 俊一

2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC)は酸化型では無色であるが還元されると赤色の 1,3,5-triphenylformazan (TPF)へと変化する性質を有し、この酸化還元状態の変化による呈色性の違いを利用して生体活性を比較する方法を TTC 染色法という。TTC 染色法の歴史は古く、平板培地で酵母の野生株と呼吸欠損株を生育させ形成したコロニーに TTC を重層したところ野生株のコロニーは赤色を呈し呼吸欠損株のコロニーは白色のままとなりこれらの株を区別することができたことにさかのぼる。わが国の醸造分野においては、醸造協会より頒布されている清酒酵母であるきょうかい酵母とそれ以外の野生酵母を区別する品質管理の方法の一つとして利用されている。

TTC 染色は呼吸欠損株の区別にも使われてきていることからミトコンドリア内での電子伝達系が重要ではないかと考えられており、生化学的な解析からクラミドモナスでは NADH dehydrogenase (Complex I)が、植物では Succinate dehydrogenase (Complex II) が TTC の還元を担うと報告されていた。この様に様々な生物種で異なる結果が得られており、酵母においても TTC 染色に関わる酵素に関する解析例は少なく、電子伝達系内のどの酵素が TTC 染色に関与するのかわからなかった。そこで遺伝子破壊株の取得が容易である実験室酵母 BY4741 において電子伝達系に関わる遺伝子の破壊株を用いた包括的な TTC 染色試験と酵素活性の比較によって、電子伝達系内のどの酵素が TTC 染色に関与するかを解析した研究結果を報告させていただきたい。

実験室酵母 BY4741 はヒスチジン、メチオニン、ロイシン、ウラシルの栄養要求性を示しこれを相補する遺伝子である *HIS3*、*MET15*、*LEU2*、*URA3* 遺伝子をマーカー遺伝子として用いることができる。マーカー遺伝子として *URA3* 遺伝子を用いミトコンドリア内膜のマトリックス側で機能する NADH dehydrogenase をコードする *NDII* 遺伝子をまず破壊したところ、驚くべきことに親株である BY4741 よりも TTC 染色性が上昇した。このことは *NDII* 自身は TTC 染色性に影響を及ぼさず、親株である実験室酵母 BY4741 は *URA3* が相補されたことが染色性の向上につながることを意味している。*URA3* によって TTC 染色性が向上したかどうかを確かめるために *LEU2* をマーカー遺伝子とし *NDII* 遺伝子を同様に破壊したところ、期待通り染色性は低いままであり、親株である BY4741 に *URA3* を相補した株 (BY4741U) でも TTC 染色性が向上した。また、TTC 下層培地にウラシルを 20 mg/L となるよう添加し培養した株に TTC 染色を行ったところ低い染色性を示していた BY4741 もウラシルを含む培地では染色性が高まった。この様にウラシル代謝に欠陥があると TTC 染色性が低下することが確かめられた。

電子伝達系に関する遺伝子破壊株の TTC 染色性を網羅的に比較するために、BY4741 を親株としてカナマイシン耐性遺伝子で遺伝子破壊された株を Open Biosystems 社から購入しウラシルを含む TTC 下層培地で培養した後 TTC 染色を行った。電子伝達系は各電子供与体からユビキノンに電子を集約する経路とそれ以降の経路に区別することができるが、ユビキノンに電子を集約する経路をコードする遺伝子である *NDII*、*NDE1*、

*NDE2*、*SDH1*、*GUT2*、*DLD1*、*CYB2* の各遺伝子破壊株では TTC 染色性は維持されたままであった。一方、還元されたユビキノンからシトクロームへと電子を伝達する Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (Complex III)のサブユニットをコードする *COR1*、*QCR7*、*RIP1*、*CYCI* の破壊株とシトクロームから酸素に電子を伝達する Cytochrome c oxidase (Complex IV)のサブユニットをコードする *COX4*、*COX7*、*COX9* の破壊株では TTC 染色性が極端に低下した。Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (Complex III)と Cytochrome c oxidase (Complex IV)のサブユニットをコードする遺伝子破壊によって TTC 染色性が低下するかどうかをさらに確認するために、*URA3* が相補された BY4741U を親株に *LEU2* をマーカー遺伝子として *COR1*、*COX4*、*CYCI* 遺伝子破壊株を改めて取得し TTC 染色に供したところ、予想通りこれらの破壊株は TTC 染色性が低下した。以上の様に、ユビキノンに電子を集約する複数の経路の内の遺伝子を一つ破壊しても TTC 染色性に影響を及ぼさないこと、Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (Complex III)か Cytochrome c oxidase (Complex IV)をコードする遺伝子破壊では染色性を失うことから、これらの酵素のいずれかあるいはその両方が TTC 染色に重要な役割を果たすことが示された。

次に、Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (Complex III)と Cytochrome c oxidase (Complex IV)のどちらが TTC 染色に寄与するかを明らかにすることを試みた。生理的には Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase と Cytochrome c oxidase は単独で機能するのではなく 2 つの複合体が合わさってスーパーコンプレックスとして機能しており、どちらかの機能が低下すればもう片方の酵素の機能も低下することが知られており、遺伝子破壊株の TTC 染色性の比較ではどちらがより重要かを明らかにすることは困難であった。そのためグリセロールを単一炭素源とした培地で BY4741U を振とう培養し呼吸条件下にて培養後、ミトコンドリアを分画後 TTC 還元に関する酵素活性を比較することでどちらの酵素がより重要であることを明らかにすることを試みた。

還元型のユビキノンであるユビキノールを電子供与体とし TTC を電子受容体として TTC から TPF への変化を 480nm の波長でモニターし Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase による酵素活性を測定したところ、 $90.8 \pm 8.5$  U/mg の酵素活性を示したのに対してこの酵素の阻害剤であるアンチマイシン A の添加によってその活性を失った。一方、還元型シトクロームを電子供与体とし TTC を電子受容体として Cytochrome c oxidase による酵素活性を測定したところ、TTC 還元活性は検出されずこの酵素の阻害剤である KCN の添加によっても TTC 還元活性は検出されないままであった。この様に、ユビキノールによる TTC 還元は可能であるが還元型シトクロームによる TTC 還元はできないこと、また Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase の阻害剤であるアンチマイシン A によって TTC 還元活性が低下することから、TTC 還元を直接的に担う酵素は Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase であることが示唆された。

以上の様に、TTC は電子伝達系においてユビキノンに集約された電子が Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (Complex III)を介して還元されており、TTC 染色法とは電子伝達系全体としての活性を反映させる手法であることが明らかとなった。

# 静岡県における清酒酵母の開発について

静岡県工業技術研究所  
沼津工業技術支援センター  
主任研究員 鈴木 雅博

## 1. はじめに

静岡県は、富士山や南アルプスからの湧水・伏流水に恵まれており、鉄分や有機物等の少ない軟水が豊富な地域である。一方で、一年を通して比較的温暖な地域であるため、低温での発酵管理が重要となる酒造りにおいては、無名県であった。こういった状況を打破するべく、静岡県工業試験場（現・沼津工業技術支援センター）では、静岡県酒造組合との共同研究により、酢酸イソアミルを香りの主体とする静岡酵母を開発し、現在に至るまでに様々な清酒酵母の開発に取り組んできた。

本講演では、静岡県における清酒酵母の開発状況について紹介する。

## 2. 静岡県オリジナル清酒用酵母『静岡酵母』の開発

昭和 50 年代に県内酒造メーカーの優良醪から SY-103、N0-2 及び HD-1 を分離したのが、本県における清酒用酵母の最初の開発事例である。中でも HD-1 は酢酸イソアミルを主体とした華やかな香気が特徴の酵母であり、現在においても県内で広く吟醸酒の醸造に用いられている。

しかし、HD-1 は麴の破精具合によっては、酸が高くなりやすい特徴を有しているため、昭和 50 年代後半には、HD-1 のハプロイドと N0-2 のハプロイドを交雑した New-5 を開発した。New-5 も酢酸イソアミル主体の軽く華やかな香りが特徴であるが、HD-1 と比較して酸生成が 0.2 程度低い酵母である。そのため、突き破精型の麴の醪には HD-1 を、破精回りの良い麴の醪には New-5 が使用されている。

その後も、特徴的な香気組成を有する酵母の開発や既存酵母の泡無し化等に取り組んでおり、当センターでは、現在、7 種類の静岡酵母を保存・管理し、県内酒造メーカーの要望に応じて分譲を行っている。

## 3. 静岡酵母以降の清酒酵母の開発に関する取組

近年は、県内酒造メーカーより、「地域性のある商品を製造するために、県内自然環境から分離した酵母等、より独自性の高い酵母を使用したい」という要望が当センターに多数寄せられている。そこで当センターでは、過去に静岡酵母を開発する際に、開発コンセプトの相違から選抜漏れした株や、新たに県内の自然環境から分

離した酵母について、清酒の醸造適性を評価した。

その結果、清酒醸造に活用できる可能性のある酵母をライブラリー化し、『しずおか有用微生物ライブラリー』として公開するとともに、管理・分譲を行っている。このライブラリーには、清酒用酵母以外にもビール製造用や醤油醸造用など、様々な発酵食品への活用が期待できる酵母や乳酸菌が登録されている。

#### 4. おわりに

このように静岡県では、継続して清酒用酵母の開発を進めていく一方で、近年は清酒用種麴や生酏用乳酸菌の開発などにも取り組んでいる。

国内での清酒の消費量が減少する中、今後は海外を含めた新しい販路の開拓も重要になってくることが想定されるが、これまで以上に多様化する消費者ニーズに対応するためには、更なる県産清酒の品質向上に加えて、全く新しい酒質の商品を生み出していくことも重要であると考えている。

今後も消費者ニーズに寄り添った、静岡県ならではの酒造りを県内業界と共に推進していきたいと考えている。

#### 5. 参考文献

- 1)河村伝兵衛:静岡県の吟醸酒造り.醸造協会誌,第83巻,第11号,723-728(1988).

## 質量分析イメージングの米麴特性解析への応用

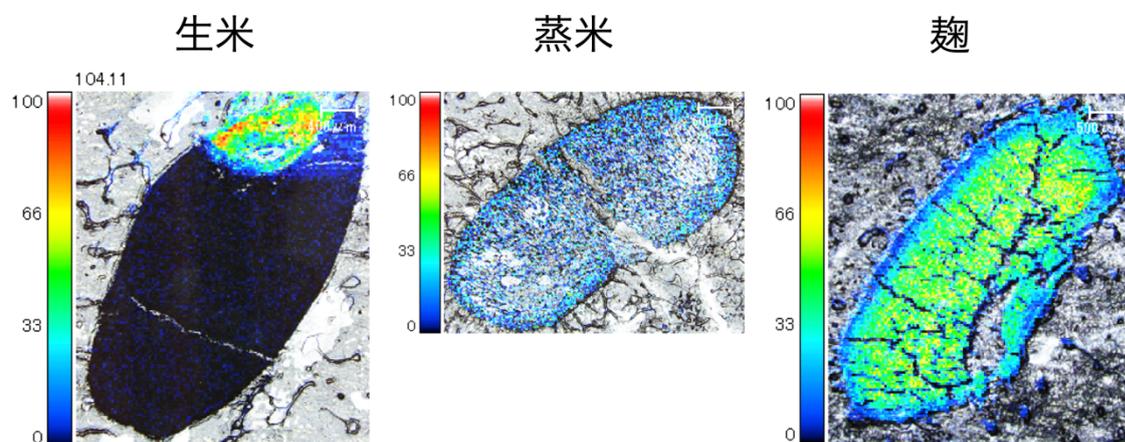
大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 新聞秀一

米麴は日本酒醸造の重要な原料である。蒸米に麴菌 *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) を接種し、製麴工程で麴菌の成長を促進し、様々な酵素を生産する。

米麴の品質は一般に、その酵素活性と清酒の品質に影響する成分によって決まる。杜氏による目視検査なども行われるが、その際の指標となる蒸米の表面に広がる破精(はぜ)と呼ばれる菌糸体を表す白い斑点は、米麴の出来を判断するのに使われている。

米麴の構造と品質の変化に焦点を合わせた研究は、これまでいくつか報告されている。その研究では、破精の形成と米麴の品質に関連する要因が報告されており、破精の成長と酵素活性の相関が示されている。別の研究では、米麴の一部の崩壊構造が菌糸体の存在を表していると考えられている。走査型電子顕微鏡を用いて破精を初めて可視化した吉井らの研究によると、麴菌の繁殖過程を直接可視化することにより、米麴中の *A. oryzae* の成長特性に関する考察が得られ、製麴の改善に貢献するという先行研究がある。

一方、米麴の品質を定量化する分析方法では、通常、米麴から対象となる成分を抽出するプロセスが必要である。この工程により、米麴内部における成分の空間情報は失われる。しかし、図1に示す通り、製麴過程において、内部に含まれる代謝物分布が劇的に変化するものが存在する。



### コリンは醗酵プロセスで分布が劇的に変化する

図1. 製麴におけるコリンの分布変化

したがって、破精込みのような麴菌の侵入の可視化と併せて、米麴成分の空間プロファイルを評価することが可能となれば、米麴研究に新たな視点を提供できるのではないかと期待される。本研究で用いた、質量分析イメージング(MSI: mass spectrometry imaging)は、図2に示すワークフローのように、標識なしで様々な試料に含まれる化合物を直接可視化することができる利点がある。現在では、医薬系の応用以外にも穀物、果物、加工食品な

ど、さまざまな食品関連の試料を可視化するために使用されている[1-4]. 本発表では、米麴における成分分布可視化について、近年、我々が開発した酵素活性イメージングも含めて紹介する[5].

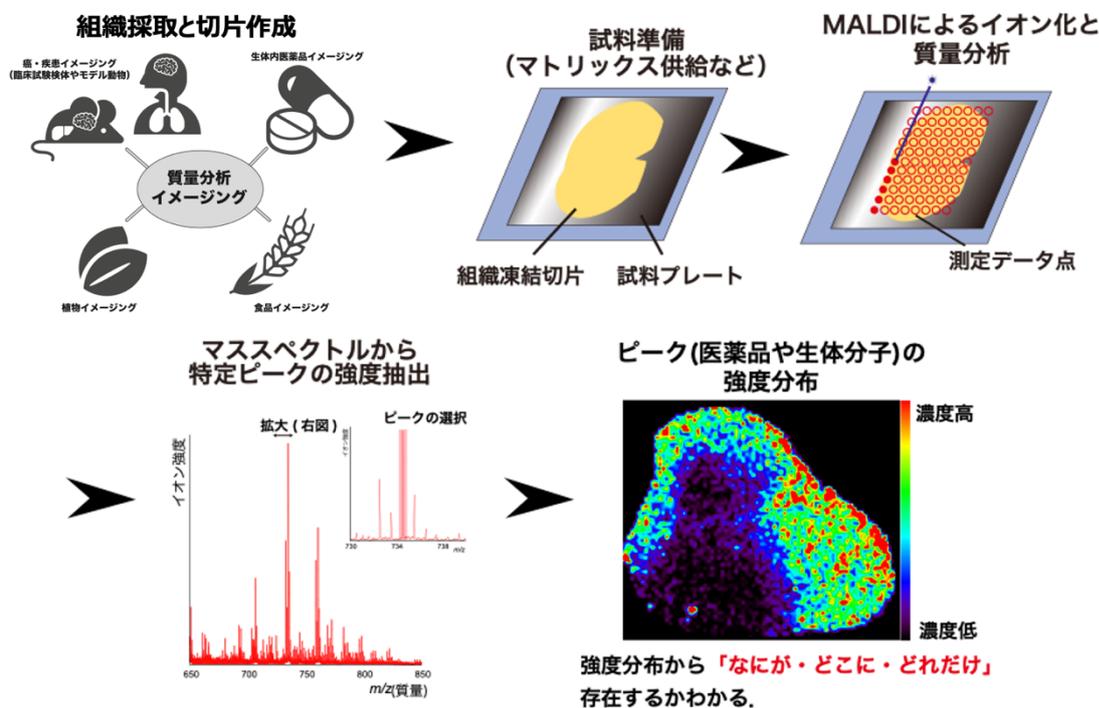


図 2. 質量分析イメージングのワークフロー. 試料採取後、薄切し表面分析を行う。

## 参考文献

1. Mass Spectrometry Imaging. Shimma S. Mass Spectrom (Tokyo). 2022;11(1):A0102.
2. Mapping haze-komi on rice koji grains using  $\beta$ -glucuronidase expressing *Aspergillus oryzae* and mass spectrometry imaging. Wisman AP, Tamada Y, Hirohata S, Gomi K, Fukusaki E, Shimma S. J Biosci Bioeng. 2020 Mar;129(3):296-301.
3. Metabolic Visualization Reveals the Distinct Distribution of Sugars and Amino Acids in Rice Koji. Putri Wisman A, Tamada Y, Hirohata S, Fukusaki E, Shimma S. Mass Spectrom (Tokyo). 2020;9(1):A0089.
4. Mass Spectrometry Imaging Reveals Localization of Secondary Metabolites in Red Yeast Rice Fermentation. Higa Y, Minami M, Fukusaki E, Shimma S. ACS Food Sci. Technol. 2021, 1, 10, 1814–1820.
5. Visualization of dipeptidyl peptidase B enzymatic reaction in rice koji using mass spectrometry imaging. Wisman AP, Minami M, Tamada Y, Hirohata S, Gomi K, Fukusaki E, Shimma S. J Biosci Bioeng. 2022 Aug;134(2):133-137.

# 黄麹菌における mRNA の細胞内局在と分子制御機構

九州大学大学院農学研究院 樋口裕次郎

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、穀類や豆類に生やすことで麹として利用され、酵素を含めた有用物質を多量生産する。そのため黄麹菌は、我が国の発酵醸造産業にとって必要不可欠な糸状菌であり、日本醸造学会においては黒麹菌と白麹菌とともに国菌に認定されている。本講演では、単核単細胞の酵母とは異なり、多核多細胞である黄麹菌に特徴的な mRNA の細胞内局在に関して、最近明らかになってきた分子制御機構を紹介したい。

## 1) mRNA の細胞内局在解析

多細胞で多核という特徴を有する黄麹菌において、どの核で遺伝子発現が起こり、また mRNA はどこで翻訳されるのかを含め、物質の生合成から輸送経路に至るまで、細胞内における時空間的な制御機構の全貌は未だ明らかになっていない。そこでまず、黄麹菌における主要な分泌タンパク質である  $\alpha$ -アミラーゼおよびその分泌に関与する細胞骨格であるアクチンの mRNA 局在を、それぞれの塩基配列特異的なプローブを用いて single-molecule fluorescence *in situ* hybridization (smFISH) により解析した<sup>1)</sup>。その結果、マルトースにより誘導される  $\alpha$ -アミラーゼ mRNA の発現が菌糸先端部に限らず観察されること、またアクチン mRNA は菌糸の先端に多く局在することを見出した。さらに、*egfp* 特異的プローブを用い、各 EGFP 融合タンパク質を発現した菌株を用いた smFISH 解析により、mRNA とタンパク質の同時可視化に成功した。これにより、各 mRNA 分子に特徴的な局在および安定性・分解に関わる機構の存在が示唆された<sup>2)</sup>。

## 2) 分泌型グルコアミラーゼの mRNA 動態解析

黄麹菌で多量に生成され、また発酵醸造分野において糖化の律速酵素として重要であるグルコアミラーゼ(遺伝子は *glaA*)の mRNA を生細胞において可視化するために、バクテリオファージ MS2 由来の RNA ループ (MBS, MS2 binding site) にコートタンパク質 (MCP, MS2 coat protein) を共発現させる MS2 システムを導入した。今回、36 コピーの MBS ループを *glaA* の終止コドンと 3'UTR の間に挿入し、また別途発現させた EGFP を付加した MCP が MBS に結合することで mRNA が可視化される。

*glaA* は  $\alpha$ -アミラーゼと同様に、グルコースを含む培地での培養では発現されず、マルト

ースを含む培地での培養で発現されることを確認した。また、グルコースからマルトースを含む培地に置換して培養すると、細胞質に多くのドット様構造が見られ、一部は動態を示すことがわかった。こうした動態の特徴として、これまでに黄麴菌を含む糸状菌において良く知られている微小管・モータータンパク質の作用であることが示唆された。さらに、動態の軌跡解析により、*glaA* mRNA がチューブ状構造に沿った様に観察され、おそらく微小管に沿ってかもしくは小胞体膜上を移動していることが示唆された<sup>3)</sup>。

今回導入した黄麴菌生細胞における mRNA 可視化系によって、時空間的な mRNA の動態解析が可能になった。今後は、黄麴菌におけるアミラーゼ酵素群が、いつ・どこで・どのように転写制御されているのかを明らかにしていきたい。また、*glaA* mRNA のような動態が、他の分泌酵素や細胞質タンパク質をコードする mRNA にも見られるのかについても現在解析を行っている。さらに重要なこととして考えられるのが、mRNA 動態の生理的意義や、動態の有無と関連して、どの mRNA 分子が実際に翻訳を受けているのかについてである。mRNA の可視化に始まる今後の研究を通じて、多核多細胞である黄麴菌における酵素の高分泌やその他の有用物質の高生産性を支える分子機構を一層理解し、実際に産業に有用な菌株の育種が進む将来に期待したい。

1) Y. Higuchi and K. Takegawa, *Front. Microbiol.*, **11**, 578862 (2020)

2) Y. Morita *et al.*, *Front. Fungal Biol.*, **2**, 721398 (2021)

3) 樋口ら, 九州大学中央分析センター報告, **40**, 23-28 (2022)

# 酒造用種麴と麴の変遷

株式会社 樋口松之助商店 山下 秀行

清酒は我々日本人に長年愛されてきた伝統的なアルコール飲料であり、繊細な味は杜氏や技術者による長年にわたる試行錯誤の繰り返しによって作り上げられてきた。その製法は、人々の嗜好、食生活、ライフスタイルの変化など時流に合わせた酒質とするための改良がなされ、原料処理や製麴機などのハード面の進歩も加わり大きく発展してきた。その間、特定名称酒などの品質を重視した造りへの流れも加速したことから、製造の双璧を担う麴菌と酵母に対する要望も増え、さまざまな特性を持つ菌株の育種・開発が行われてきた。

ここでは、時代と共に歩んできた清酒造りににおける種麴と麴の変遷についてお話しする。

## 1. 清酒醸造における麴の役割

麴の最も重要な働きは、製麴中に生産される多種多様の酵素によって米を分解することであり、その産物の違いは直接各社独自の風味に反映する。麴菌の酵素生成量は、原料米の精米歩合や蒸米水分そして種麴の種類、製麴品温経過などにより大きく変化する。麴菌の増殖に適した環境下では、アルファアミラーゼやグルコアミラーゼ活性とプロテアーゼ活性との間には、正の相関関係がみられる。清酒麴においてこの特性がそのまま発揮されると、糖化が先行する早涌き型となり、香気に乏しくアミノ酸などの雑味が多い酒となり、酒質が低下する。そのため、吟醸酒の製造においては、精米歩合を低くし、種麴の散布量を減らし、製麴中の乾湿差を多くとるなど、G/A（アルファアミラーゼに対するグルコアミラーゼ活性比）が高く、ACP/AP（酸性プロテアーゼに対する酸性カルボキシペプチダーゼ活性比）が低い麴造りが求められている。このように、清酒醸造が酒化率重視から酒質の多様化へと向かう中で、麴の酵素も絶対量に加え酵素間のバランスの良い麴が望まれるようになった。中でもグルコアミラーゼの役割は大きく、消費者の嗜好に合わせた甘い清酒造りには欠かせない。また、高いグルコース濃度は、カプロン酸エチル高生産酵母などの初期発酵を順調に進めるだけでなく、副産物として残存する苦み成分のマスクング効果も認められている。

## 2. 種麴の変遷

戦前の弊社の商品は、「酏用」と「醪用」のみであり、そこでは3菌株しか用いられていなかった。当時は、酒化率を重視した酒造りがなされて糖化力の強い種麴が

主であったが、戦後、「最高級品用」、「吟醸用」が追加され、品質向上にも目を向けた商品開発も行われるようになった。この間の急激な製造量の増加に対応した連続蒸し米機や大型自動製麴機に対応した粉状品、通風式の製麴法に適した短毛菌も発売された。また、高酵素活性麴が持つチロシナーゼによる黒粕を抑制するために、非褐変性菌株のスクリーニングや、それらを配合し黒粕が出ず酒化率も上がるような種麴の検討も盛んに行われた。一方、この時期に発売された清酒用酵素剤は、麴のばらつきを補強し酒質を安定させた。

また、麴の一部を代替することで淡麗化にも繋がり、清酒造りは新たなステージに入り、現在では酵素剤は清酒造りには欠かせないものとなっている。

その後、清酒の着色原因物質である DF（ディフェリフェリクリシン）非生産株が国税庁醸造試験所（現：酒類総合研究所）で取得されたのを機に、麴菌の人工変異による育種も行われるようになった。また、清酒の香り成分の前駆体を多く作る株なども選択され、吟醸酒への注目が高まるにつれ、これまで製麴操作の工夫で得られていた G/A が高い吟醸型の酵素バランスを持つ麴が容易に得られる種麴も開発された。

### 3. 麴菌の安全性の遺伝的証明

麴菌の祖先とも言われる *Aspergillus (A.) flavus* の一部に、カビ毒アフラトキシン産生能を持つ株の存在が報告されてから、本菌種と遺伝的に非常に近い

*A. oryzae* の安全性に関する問題は、長い醸造の歴史の中で最大の懸案事項となった。これに関しては、当時の研究者の方々のご尽力により、両者は異なる種であり、*A. oryzae* はアフラトキシンを生成しないことが証明された。近年、その分類の正確さが遺伝子の面からも裏付けされたが、古典的な手法ではあったがその精度の高さに驚くとともに、地道な努力に心から敬意を表したい。

### 4. 種麴のこれから

現在、弊社の酒造用種麴に使用している菌株は 10 数株に増えたが、その中には、販売当初から使用している株も含まれており、“国菌”として長年利用されてきた歴史の重みを感じる。一方で、麴菌の遺伝子解析が進むことで、麴菌の新たな可能性の広がり、有用な育種技術である遺伝子編集による、麴菌が持つカビ毒産生の可能性など負の因子の除去や、有用遺伝子の高発現など期待は高まる。また、近年の気候変動による高温障害米問題や、働き方改革など酒造を取り巻く環境も変わりつつあるが、そこにはどういった麴菌が必要となるのか、我々はこれまで通り造り手との会話を重ねながら開発に努め、安全で安定した良質の種麴を提供することを念頭に置き歩んでいきたい。