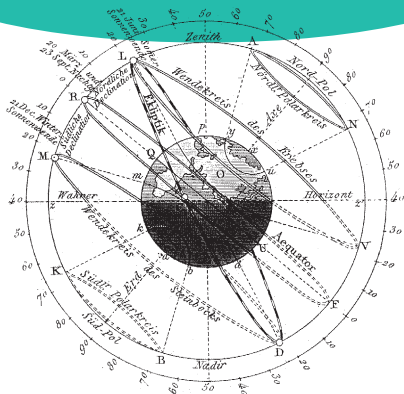


【解説】



赤尾 健

についても同様であって、発酵プロファイルや最終的なエタノール濃度、生成するアルコールの総量も菌株により異なる。これらは、官能特性（エタノールは清酒の味の構成成分としても重要である）、工程管理、製造コストなどの面で、常に製造現場の関心事である。こうしたことからわかるように、酵母の菌株選択は、清酒製造における最重要ファクターの一つとなっている⁽¹⁾。

今日、優良菌株として広く利用されているものは、

清酒中の主要な香味成分の多くは、発酵工程中に酵母が生成するものである。これらの生成量のバランスは、酵母の菌株によって異なるので、酵母が違えば得られる清酒の香味特性も違ったものとなる。発酵特性や発酵力

化学と生物 Vol. 52, No. 4, 2014

表1 ■ 主なきょうかい清酒酵母の菌株とその由来

菌株	実用年	分離源, 由来等	備考	醸造特性
K1	1906	兵庫・桜正宗	酒造環境分離株／頒布中止	濃醇強健, 低温発酵 (20℃)
K2	1912	京都・月桂冠	酒造環境分離株／頒布中止	くい切りよく濃い酒
K3	1914	広島・酔心	酒造環境分離株／頒布中止	
K4	1924	広島県内	酒造環境分離株／頒布中止	経過良好
K5	1925	広島・賀茂鶴	酒造環境分離株／頒布中止	果実様芳香
K6	1935	秋田・新政	酒造環境分離株	発酵力が強く, 香りはやや低くまろやか, 淡麗な酒質に最適
K7	1946	長野・真澄	酒造環境分離株	華やかな香りで広く吟醸用および普通醸造用に適す
K8	1960	K6変異株	頒布中止 (実際はK6変異株でなく, 別系統の野生清酒酵母)	やや高温性, 多酸, 濃醇酒向き
K9	1953	熊本酵母 (熊本・香露保有株)	酒造環境分離株	短期もろみで華やかな香りと吟醸香が高い
K10	1952	明利・小川酵母 (東北地方もろみ)	酒造環境分離株	少酸性, 低温発酵で吟醸酒向き
K11	1975	K7のエタノール耐性変異株	自然変異体	やや多酸, リンゴ酸多い, もろみが長期になっても切れがよく, アミノ酸が増えない
K12	1966	宮城・浦霞	K9系添加もろみ由来の自然変異体／頒布中止	芳香高く吟醸酒向き, 低温発酵
K13	1981	K9とK10の交配株	変異処理なし／頒布中止	K9とK10の長所をあわせもつ
K14	1991	金沢酵母 (金沢国税局保有株)	K9系添加もろみ由来の自然変異体	酸少なく低温中期型もろみの経過をとり特定名称清酒に適す
K1501	1990	秋田流・花酵母 AK1 (秋田県醸造試験場)	K7添加もろみ由来の自然変異体	低温長期型もろみ経過をとり, 酸が少なく, 吟醸香の高い特定名称清酒に適す
K1601	1994	K7とK1001の交配株	変異処理あり	エステル (カブロン酸エチル) 高生産性かつ少酸性
K1701	1995	K1001の変異株	変異処理あり	エステル (酢酸イソアミル, カブロン酸エチル) 高生産性で発酵力が強い
K1801	2006	K1601とK9の交配株	変異処理あり	エステル高生産性, 少酸性で発酵力が強い
K701	1969	K7の泡なし変異株	自然変異体	もろみで高泡を形成しないK7
K901	1975	K9の泡なし変異株	自然変異体	もろみで高泡を形成しないK9
K1001	1984	K10の泡なし変異株	自然変異株	もろみで高泡を形成しないK10
KT901	2009	K901の多酸性変異株	自然変異体	K901よりリンゴ酸, コハク酸が多い
KArg7	1993	K7の尿素非生産性変異株	自然変異体	尿素を生産しないK7
KArg9	1992	K9の尿素非生産性変異株	自然変異体	尿素を生産しないK9

K1～K5, K8以外はK7グループと呼ばれる。

文献2, 10, 日本醸造協会のパンフレットの記載などを基に作成。

K6, K7, K9, K10およびこれらの菌株からの派生株である。これらは、互いに明確な識別が困難なほど近縁で^(1, 3), また、清酒醸造環境での低温発酵能や高いアルコール生産力, 優れた香味生成能などの醸造特性の基本的な側面においても互いに共通しており, 優良清酒酵母の代表格であるK7の名から「K7グループ」としてくくられることが多く⁽³⁾, 本稿でもそれを踏襲する。K7グループの菌株は、総じて、低温での高い発酵力, 高いエタノール生成能 (>20%) を備え, 香味成分をバランスよく生成する。これらの菌株は極めて近縁であるものの, それぞれに特徴的な醸造特性 (発酵特性や製品の官能特性をまとめてこのように表現することが多い) を有しており, そのために製造現場では目的に応じて使い分けられている。これらの菌株では、互いに遺伝子構成もほとんど同じと推察され, 遺伝的な差は主として一塩基

レベルの多様性にあると考えられるが実態は不明である⁽¹⁾。

清酒酵母の育種の現状

清酒製造において使用する酵母の菌株の選択は、製品の官能特性や工程管理, 経済性などを左右する大きな要因であることははじめに記したとおりである。現状でも数多くの優れた菌株を利用することは可能だが, 製品の高付加価値化, 多様化, 差別化の観点から, 新しい酵母菌株への期待は常に存在すると言っても過言ではない。育種を行う機関としては, 地方公設試験研究機関 (産業技術センターなど), 日本醸造協会, 大手の酒造会社などである。

実際の育種のターゲットとしては, 大きく2つの方向

性がある。一つ目は、特定の成分の増減や特定の表現型の獲得を目標とするものである。例としては、吟醸香成分であるカプロン酸エチルや酢酸イソアミルなどの有機酸エステルの高生産性、さわやかな酸味のリンゴ酸の高生産性、製品の劣化原因となるピルビン酸の低生産性などが挙げられる^(4~7)。これらの場合、変異処理を行った後に、薬剤耐性などの明確な指標によって初期選抜を行うことが多いようである。一方で、好ましくない変異が入るおそれや、人為的な変異処理そのものへのネガティブイメージから、変異処理を行わずに自然突然変異体として目的の性質を有する菌株を選抜できた例もある^(8,9)。

もう一つの方向性は、清酒酵母、あるいは醸造用酵母ならではのものと思われるが、特定の成分や特定の表現型に着目せず、トータルの醸造特性に基づいて選抜を行うものである。清酒のおいしさには、曰く言い難い要素があり、特定の成分の増減だけではニーズを満たせない場合も多い。清酒の官能特性は、酵母の細胞の枠を越えた高次の表現型といえる。育種目標として、酒質のタイプや成分バランスを決めておいて、変異処理を行わずに系統分離（クローンを分離しないケースも多いと思われる）を行った後に、仕込試験などの結果に基づく総合的な判断で菌株の選抜を行うことが多い。なかには、育種の目標を定めずに仕込試験と官能試験の結果、使えそうな株として「結果オーライ」で見いだされた株や、優良菌株を添加した清酒もろみから新たな特徴を有する菌株を分離したケースも多い。このように自然突然変異を利用して分離された菌株は意外なほど多く、育種手法の一つとして古くから定着している⁽¹⁰⁾。

方法論としては、変異導入、自然変異の利用のほかに、交配もありうるが、清酒酵母の多くは孢子形成能をほとんど失っており、一倍体の取得効率が極めて低い。多様な菌株を生み出すポテンシャルは高いのでいくつかの事例が見られるが⁽⁴⁾、多大な手間と時間を必要とするため、あまり広く行われていないのが現実である。

育種の親株としては、ほとんどのケースでK7グループのうちの、酒造場分離株であるK6, K7, K9, K10がこれらの泡なし変異体（もろみで高泡を形成をしない変異体）である。これまでに全国でいろいろな個性を有する酵母菌株が育種、実用化されているが、系統的にはそのほとんどがK7グループということになる。

に、代を経るごとにその醸造特性が少しずつ変化していくことが知られている。もともと「同じ菌株」でも、独立したストックとして継代を繰り返すうちに、それらの間に少しずつ差が生じていくのは別に不思議なことではない。菌株の特性が変遷していくとき、集団内では増殖のたびにあちこちで自然突然変異が起こり蓄積しているはずである。このことは、清酒酵母を利用していくうえで、2つの側面においてそれぞれ別の意味をもつ。

清酒酵母の菌株の維持管理においては、その菌株のもつ個性、つまり固有の醸造特性を保っていく必要がある。そのために、多くの菌株分譲機関では、「同じ菌株」の保有するさまざまなストックから毎年試験醸造と選抜を行って、その菌株を名乗るのに相応しい、その年に分譲するためのストックを決定している。また、ときにはコロニー分離を行い、再選抜を行うこともある。

逆に、菌株の集団内で起こる自然突然変異を積極的に利用するという考え方もあり、前項で述べたような育種の際に人為的に変異処理を行わないケースは、これに相当する。集団内に含まれる自然変異体のなかに目標とする性質の菌株が存在することを期待した戦略と言える。

清酒酵母では表現型に影響する自然突然変異の頻度は、菌株の管理において醸造特性の維持に努力を要するほど、また、育種において積極的に利用できるほどに高い。このことは、清酒酵母を扱う者が経験的には受け入れてきたことではある。しかし、それがなぜなのか、どんな変異が生じているのかということについては、これまで積極的かつ十分に検討がなされてきたとはいい難く、ブラックボックスとして捉えてきた側面があることは否めない。

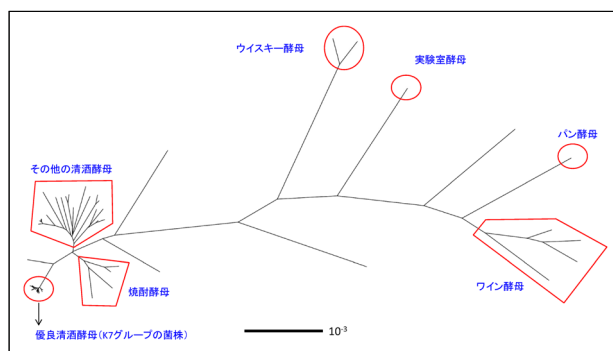


図1 ■ 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の系統関係

K7を参照配列として、次世代シーケンサーによるゲノム配列解読結果から各菌株のSNPの位置を求め、菌株間の塩基配列の不一致率（置換率）に基づいて系統樹を作成した。

自然突然変異による醸造特性の変化

一度確立した清酒酵母の系統は、その後、培養ごと

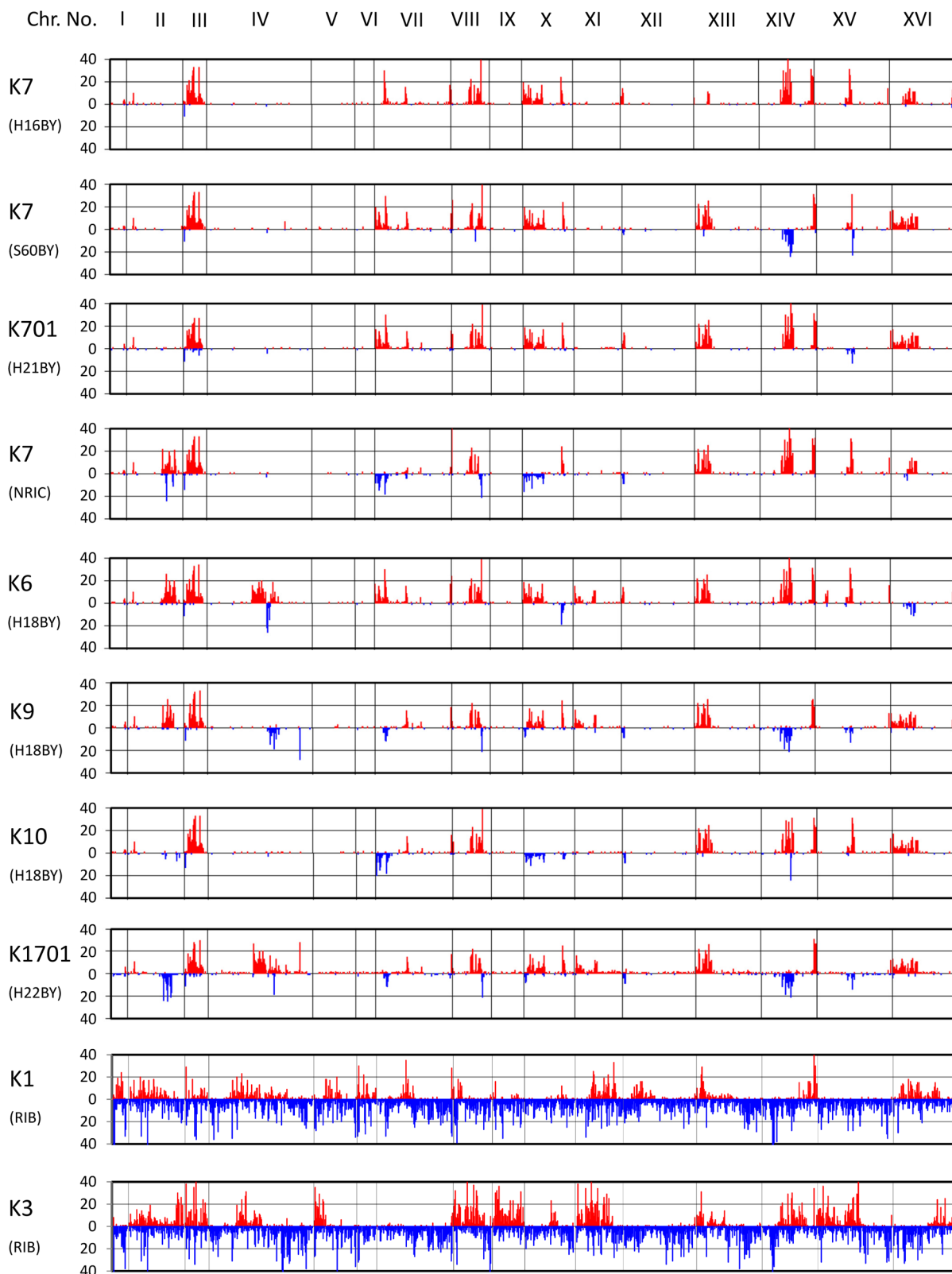


図2 ■ 清酒酵母菌株のゲノムワイドなSNPの分布パターン

グラフの左側に菌株名を示した。カッコ内は、たとえばH18BYの場合は日本醸造協会の平成18年の頒布株を示す。RIBは酒類総合研究所、NRICは東京農大保存株を示す。横軸は16本の染色体をタンデムにつなげた染色体座標を、縦軸は10 kbあたりのSNPの個数を示す。中央のゼロ点から上側がヘテロザイガスなSNPであり、下側がホモザイガスなSNPである。K7の全ゲノム解析^(1,11)によるコンセンサス配列(K7はヘテロ二倍体なので多型がある部分は2本の相同染色体のどちらかの塩基が多数決で採用されたキメラ状になっている)が参照配列となっているため、K7のリシーケンス結果をマッピングした場合は、ヘテロSNPが検出される。

清酒酵母菌株の網羅的なゲノム変異解析：菌株間の差の解析から系統分化のゲノミクスへ

清酒酵母，特に非常に近縁な関係にあるK7グループのような菌株群を産業的に取り扱ううえで，それぞれの菌株が有する個性的な醸造特性の原因となる遺伝的な要因，あるいは醸造特性の異なるそれぞれの菌株の系統が生じてきたメカニズム（換言すれば，菌株が変異し醸造特性が変化していくメカニズム）については，遺伝学上の興味深い問題である．いずれも菌株間の遺伝情報のゲノムワイドな違いを明らかにすることがこれらを理解するための端緒となるはずである．

このような近縁の系統間のゲノムの塩基レベルの違いを明らかにする方法として，この数年，次世代シーケンサー（NGS）を利用したゲノム変異解析が広く利用されるようになってきている．ゲノム変異解析とは，すでにあるゲノム配列をリファレンスとして利用し，NGSで解析して得られた近縁の系統のゲノムのリードを，リファレンス配列の対応する部分にマッピングし，リファレンス配列に対する塩基レベルのミスマッチ部分を変異点として抽出する方法であり，NGSの最も基本的なアプリケーションである．

本稿で述べる取り組みを開始した当時は，折良く代表的な菌株であるK7の全ゲノム情報がサンガー法によって解読され，*de novo* アセンブリによるコンセンサス配列が利用可能となって間もない時期であった⁽¹¹⁾．そこで，イルミナ社の次世代シーケンサー（NGS）を利用し

て，清酒酵母を中心とした菌株を対象にゲノム変異解析を行い，K7のコンセンサス配列をリファレンス配列とした菌株ごとのSNPのリストを得た．

まず，これらの情報から，菌株間のゲノム全体の塩基の不一致率を計算し，系統樹を作成したところ，清酒・焼酎酵母，ワイン酵母はそれぞれおおむねひとかたまりのクラスターを形成した．特に，清酒・焼酎酵母の系統的な分布の散らばりは一定の範囲に及んでいたが，K7グループでは，全体として極めて狭い範囲に集中して分布しており，遺伝的に極めて近縁であることが改めて確かめられた（図1）．

ところで，清酒酵母はいずれもヘテロザイガスな二倍体である．したがって，リファレンス配列に対してリードをマッピングした場合，検出される変異はホモザイガスな場合（リードのすべてがリファレンスにマッチしない）とヘテロザイガスな場合（リードの約半分がリファレンスにマッチしない）とがある．ヘテロなSNPは相同染色体間のヘテロザイゴシティを意味する．

各菌株のSNPを集計したところ，K7グループの大部分の菌株では，ホモSNPは200～500個，ヘテロSNPは1,500～2,000個程度，といずれも少数だった．これらの染色体座標上での分布について，10 kb ほどのSNP密度として，ゲノムワイドな可視化を行った（図2）．興味深いことに，K7グループの各菌株のSNPの染色体上の分布は均一ではなく，大多数が一部の領域に偏っていた．さらに，これらのSNPの分布には菌株間で高い共

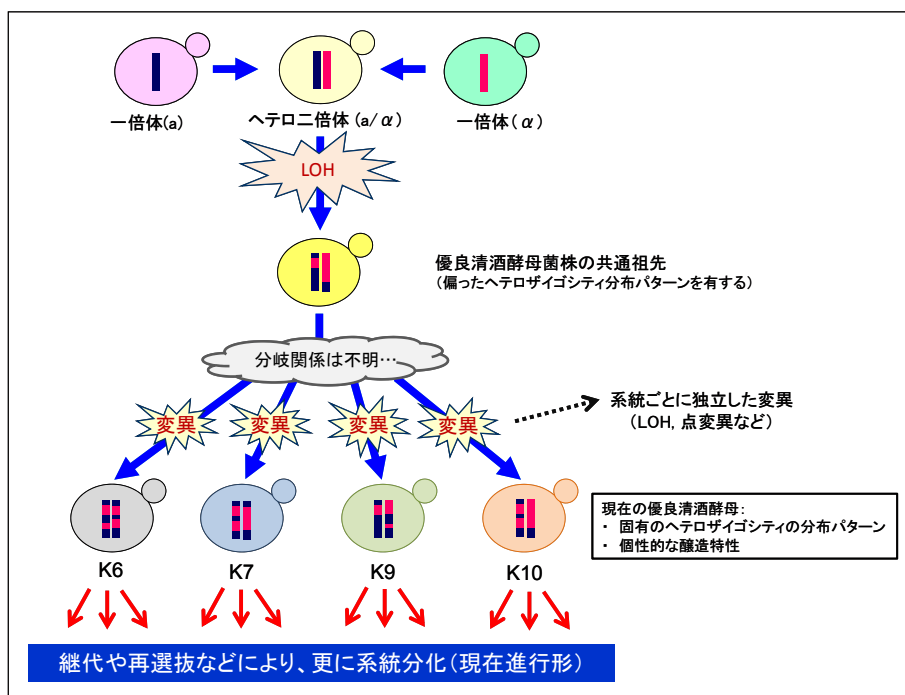


図3 ■ 優良清酒酵母の系統分化

K7グループの菌株は共通祖先から，系統ごとに独立したLOHが起こり，あるいは点突然変異が導入されることで，ヘテロザイガスな領域の組合せと固有なSNPが異なる菌株（K6, K7, K9, K10）が生じたと考えられる．これらの菌株についても，継代を繰り返すごとに同様の変異が蓄積することで，さらなる系統分化が現在進行で起こっている．なお，K7グループは直近の接合が異なる一倍体間で起こったとするとその時点では染色体全体がヘテロザイガスであり，同系の一倍体間で起こったとするとその時点ですでに部分的にホモザイガスだったはずである．そこから共通祖先に至るまでにはLOH繰り返し起こったと考えられる．

通性が見られたが、ある領域のSNP群がホモかヘテロかは菌株によって異なっており、菌株により固有のパターンを有していた⁽¹²⁾。

このような菌株ごとに似て非なる分布パターンが生じてきた理由については、次のように考えることができる。①はじめに異系交配により2つの一倍体が接合してヘテロ二倍体が生じ、そこからヘテロザイゴシティの喪失 (Loss of Heterozygosity; LOH) が繰り返して生じて起こることで部分的なホモザイガス化が徐々に進行し、結果的に虫食いの跡のようにヘテロザイガスな領域が不均一に残った株が生じた。②この株を共通祖先として、そこから隔離された系統ごとに独立してLOHが起こったことにより、領域は共通するがヘテロSNPとホモSNPの組合せにおいて固有のSNP分布パターンを有する菌株が形成された (図3)。

②の過程でのLOHの寄与については、同じ原株からの継代により生じたことが明らかなK7 (泡なし変異体K701も含む) のストック違いの菌株間のSNPパターンを比較することでよく理解できる。念のため付言すれば、ヘテロザイゴシティが減少する原因としては、LOH以外にも同系交配も考えられる。K7グループも二倍体である以上は、さかのぼれば交配によって生じたはずであるので、①の過程においては、LOHだけでなく同系交配の寄与もあったのかもしれない。しかし、K7グループのいずれもが孢子形成能が極めて低いことや、交配の場合もっと大規模なヘテロザイゴシティの減少が見込まれることから、②の系統分化の原因とは考えにくい⁽¹⁾。

なお、共通祖先からの分化による系統の形成過程では、LOHのほかにも、菌株あるいはストックごとに固有の点突然変異が導入されていることは言うまでもないだろう。図2からは少しわかりにくいだが、SNPが多く分布する領域の狭間に孤立して存在するSNPの多くがこれらに相当すると考えられる (図2)。

清酒酵母の変異の諸様式とその意義

変異の様式として見ると、点突然変異とLOHはいずれも酵母にSNPレベルの変化をもたらすものである。ここで、酵母の遺伝的変異におけるそれぞれの意義について改めて整理しておくと、まず、点突然変異では、DNAの複製ミスや変異原の存在によって生じる塩基レベルの置換、欠失、挿入である。1度のイベントで生じる変異は1カ所であり、頻度として塩基・世代当たり 10^{-9} 程度⁽¹³⁾と低い。アミノ酸置換やフレームシフトが起こる可能性はさらに低い。しかし、新たな遺伝子型が導入される点で、LOHとは本質的に異なっている。

一方、LOHは、文字どおり相同染色体間に存在するヘテロザイゴシティがなくなる現象を指す。LOHは二倍体細胞であればどのような生物でも起こりうる現象であるが、細胞レベルの現象ゆえ、多細胞生物ではがんのようなケースを除いて個体の全体に対しては影響しにくい。しかし、単細胞生物である酵母にとっては、細胞＝個体であり、そのまま子孫すべてに影響を及ぼすという点ではるかに大きな意味をもつ。その原因となるイベン

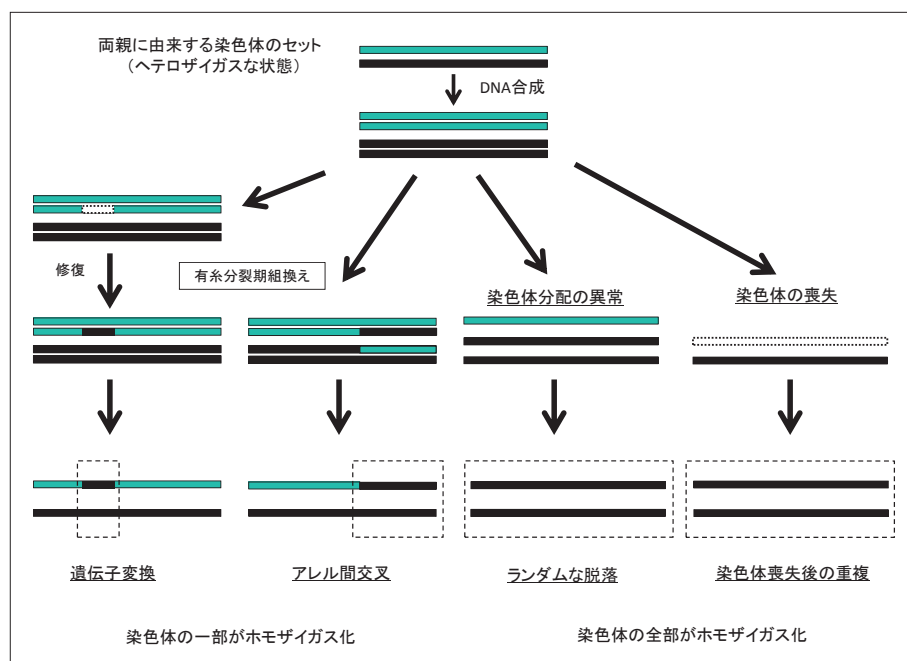


図4 ■ Loss of Heterozygosity (LOH) の諸様式

さまざまな細胞内イベントの結果としてLOHが起こる。原因となるイベントが、ヘテロザイガスな領域で生じるからこそLOHを招く。ホモザイガスな領域で同じイベントが生じても、当然ながら接合度への影響はない。

トの様式は、遺伝子変換、アレル間交差、染色体分配の異常などさまざまであり、その規模も原因により数kb程度から染色体全域まで多様である(図4)。また、LOHは変異処理を経ずとも一定の確率(遺伝子座当たり $10^{-5} \sim 10^{-4}$ 程度)で自発的に生じるが、DNAの損傷を修復する側面があることから、薬剤やUVなど変異処理でも誘発されることが知られている⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。多くの場合に点突然変異の頻度上昇を期待してこれらの変異処理を行っていると思われるが、同時にLOHの頻度も増加させていることになり、変異誘発時にも自然突然変異の利用時のいずれにおいても考慮が必要とわかる。

酵母を用いたLOHの研究は従来から数多く報告されている。しかし、それは、がん化の原因としてのLOHに着目し、そのモデルとして扱ったもの、あるいは、実用酵母の2本の相同染色体へ効率良く外来遺伝子を導入するためのツールとして取り扱ったものが主であり、特定のマーカー遺伝子のLOHが検討の対象となっていた^(14, 15, 17-20)。LOHをゲノムワイドなディプロタイプの再構成の要因としては捉えた例は、わずかに *Candida* 属酵母の感染性に関して報告がなされているのみである^(21, 22)。

さて、LOHの発生頻度は遺伝子・世代当たり 10^{-5} 程度と見積もられている^(14, 15)。しかし、LOHの原因となるイベントは領域レベルで生じ、その規模は小さくても数kb程度以上であり、細胞に対するインパクトは頻度を超えた大きさがあると言える。そのとき、その領域では、ハプロタイプの選択が起こり、その位置の存在した遺伝情報のうち一方が失われ、もう一方に置換される。このとき、どちらのハプロタイプが選択されるかによって、その領域のディプロタイプも異なることとなる。LOHが発酵力や香味特性などに関する遺伝子座を含む領域で起こった場合には、菌株の醸造特性にも影響があるケースも少なくないだろう。実際、優良菌株はこのようにして生じてきたと考えられる(図4)。

清酒酵母のように有性生活環をほぼ失った系統にとっては、ディプロタイプの再構成という観点からは、交配に代わり、LOHが菌株の多様化、分化を促す大きな推進力だといえる。しかし、その一方で、LOHの進行によって、個々の系統ではホモザイガス化が進行していく。その結果として究極的に行き着く先は、ゲノム全体がホモザイガスとなった、つまりは「純系」の状態である。ただ、細胞の集団として考えると、さまざまなディプロタイプをもつ無数のヘテロ二倍体の系統に分化していくことであり、酵母にとっては、(その有用性を認めたヒトの家畜としての道も含めた)ニッチへの適応に賭

けた集団の遺伝的な多様化の方策として有効なのだろう。そのようななかから、好ましい系統を選抜していく行為は、菌株の家畜化と考えることができる。

まとめると、二倍体酵母の遺伝的な変異における点突然変異とLOHのそれぞれの重要な点は、前者については比較的低頻度ながら新たな多型の導入という点であり、後者については多型の喪失という側面を有するものの、比較的高頻度で起こり、遺伝子型の組み合わせの多様化に寄与するという点であろう。また従来十分に認識されてこなかったことではあるが、変異の頻度と規模を考慮すると、菌株の継代によって醸造特性の変化が無視できないほどの頻度で起こる原因としてLOHが大きな位置を占めるのは間違いないといえる。菌株の遺伝的变化は現在進行形であり、菌株の維持管理に際して、あるいは自然変異を利用した育種に際しては、このことを絶えず念頭に置く必要があるだろう(図4)。

育種への新しい視点

育種とは、遺伝的な変異が生じた集団から、優れた実用特性を有する系統を探し出して利用することと言える。これまでの清酒酵母の育種では、優れた系統を探し出すことに重きが置かれ、どのような変異が集団内で生じているのかという点には、あまり注意が払われてこなかったように見える。少し踏み込んだ表現をすれば、清酒酵母の育種を考えるうえで重要な視点が欠落していたとも言える。最近まで、主に経験知の伝承に依存して成り立ってきた伝統産業ゆえの盲点があったのかもしれない。二倍体である清酒酵母の育種における遺伝的な変化の主な要因として、点突然変異のほかにLOHを明確に意識することで、菌株の育種について、これまで手探りで進んできたところに広く視界が開けてくる、あるいは、何か新しい側面が見えてくることはないだろうか。こうした期待から、点変異、LOH、そして交配の面から、清酒酵母の育種について、演繹的に考えてみたい。

ここで議論の単純化のため、2アレル間の関係について、一方が他方に対して完全優性の場合を想定し、ある系統で、自発的に(変異処理を経ずに)LOHが起こったことで、何か新しい表現型が現れたとする。このとき原因となる変異点の遺伝子型は劣性ホモである。この劣性変異をもつアレルは、LOHが生じる前の菌株にもすでに存在したものであり、アレルの機能がLOHにより顕在化したに過ぎない。同じ劣性アレルをヘテロでもつ株であれば、同様の表現型をもつ変異体の分離が可能ということになる。K7グループのように極めて近縁な関

係であれば、アレルは大部分が共通であり、K7を親株として用いて、ある性質をもつ変異体を分離できた場合、別の菌株を親株として用いても同様の変異体を分離できるケースが多いと期待される。仮に（貴重な）変異株を失った場合でも、実は、さほど労多くなく取り直しが効くということでもある。ただ、同じ劣性変異をもつかどうかの判別については、原因変異がわからないと調べることはできない。しかし、原因変異が既知ならば、その変異をヘテロでもつかどうか調べることで育種の可能性を予測できるということである。一方、経験的に同様の変異体がいくつも取れるような場合は、同じ劣性変異が原因であると考えることができ、原因変異の効率的なスクリーニングに有効な場合もある⁽²³⁾。

ここで逆を考えてみると、求める表現型の原因となる変異が元のゲノム中にもともと存在しない場合や、逆方向のLOHにより失われている場合などには、いくら大量にスクリーニングを行っても目的は達せられないことになる。つまり、LOHだけを変異の原因として捉えた育種の場合、育種のための原因変異は手持ちの札の範囲内（もちろん量的形質や、アレルの組合せも考えると膨大ではあるが）に限られるということであり、これがLOHを利用した育種の限界である。特に、変異処理を嫌い、自然変異体からの分離を企図する場合は、貴重な研究資源を浪費しないため、この点を考慮すべきである。

一方でこのようなLOHの限界を補完するのが、点突然変異であるといえる。LOHが起こるごとに多型が失われていく二倍体酵母にとって、新たな表現型の獲得には、確率的には低いながらも新たな多型の導入は必須である。極めて近縁の関係にあるK7グループでも、それぞれの系統に固有な点突然変異が多数導入されているはずであり（実際、菌株に固有ないくつかの変異がすでに明らかになっている）。頻度的にはLOHの影響が大きいのは確かだが、点突然変異の意義も忘れてはならない。ある系統が長年にわたり維持されてきたことの育種における真の価値は、固有の点変異の蓄積にあると言ってもよいのではないだろうか。

点突然変異による新たな多型の導入は、まずは相同染色体の一方で起こり、その結果新たなヘテロSNPが生じることになる。このヘテロSNPを含む領域でLOHが起こった場合、ヘテロSNPはホモSNPとなって系統内に固定されるか、失われるかのどちらかであり、その命運は偶然によって左右される。したがって、点突然変異導入によって育種を行う場合には、目的の菌株を取得した後の維持管理が重要となる。目的とする表現型をもた

らす変異以外にも、醸造特性に好ましくない変異が導入されることも珍しくないが、こうした変異が点変異であったならば当初はほぼヘテロサイガスであるはずなので、目的とする表現型が失われないように継代しながら再選抜を行えば、LOHによって不要な変異がゲノム中から脱落した系統を得ることも可能であると考えられる。ここで、変異処理をもう少し客観的に捉えるため、K7グループの菌株に変異処理を行って育種された菌株としてK1701のSNP分布を例示した（図2）。この菌株に顕著な欠点があるというわけではないのだが、SNPの分布パターンを見ると、ほかのK7グループの菌株と共通の領域にSNPが集中するが、これらの領域以外にも低密度ながら一様に分布しており、実際に変異処理により多数の点突然変異がランダムに生じたことがうかがえる。K1701に限定せずに考えると、こうした変異のなかには、株の特性の原因となる変異のほかに、好ましくない変異、ニュートラルな変異、意外な特性をもたらす変異などさまざまな可能性が考えられる。変異処理による積極的な点突然変異の導入については、予想外の変異の悪影響が懸念される傾向が大きいですが、再選抜を繰り返していく必要性はあるものの、育種方法としてのポテンシャルの高さを認識し直すことは無駄ではないだろう。

次に、「同じ菌株」のストックごとの違いについて、K7を例にとりて考えてみたい。現在この菌株は、日本醸造協会から頒布が続けられているが、醸造特性の観点から、「K7の名にふさわしい株」として毎年選抜をされながら適切に維持管理されている（毎年の頒布株も保管されている）。一方、国内外の多数の菌株保存機関でもK7がストックされている。いわば株分けであるが、別のストックとなった後は、独立した系統として独自に進化していると考えられる（このことはK6, K9, K10なども同様である）。古いものでは東京農大のNRIC株（図2）のようにK7が分離されてからさほど時間が経っていない昭和20年代に株分けされたものもある。これらのK7のさまざまなストックは、図2に示したものの以外も含めてK7として保存はされてきたが、それぞれSNPの分布パターンも異なり、事実上別の株と言って差し支えないのではないかと。これら、日本醸造協会以外のK7のストックを親株として再選抜や育種を行うことで、高発酵性やバランス良い香味成分の生成など、K7あるいはK7グループにもともと存在する優れた特性を有しながらも⁽²⁴⁾、従来にはない特徴もあわせもった菌株も得られるのではないかと期待される。

ここまでは主にK7グループの菌株を念頭に議論してきたが、もっと古い菌株に目を転じてみる。K1からK5

は清酒酵母ながら、それぞれK7とは系統を異にする菌株であり、図1では、「そのほかの清酒酵母」の枠内に位置している。図2にK1とK3についてSNPの分布図を示した。それぞれK7に対するホモSNPの密度がK7グループと比較して格段に多いが、これはK7やK7グループとは系統的に異なることを示している。また、ヘテロSNPについては、K7グループ同様に一部の領域に偏って分布しており、これらもLOHにより生じてきた可能性をうかがわせる。ただ、K1とK3ではK7グループよりもヘテロSNPの数も多く、分布範囲も広範である。データは示さないがK2、K4、K5についても同様である。K1からK5は、明治末期から大正期にかけて清酒醸造環境から優良菌株として分離・実用化されたものだが、これらが実際に使用された期間は短く、すべて昭和初期には頒布されなくなった⁽²⁵⁾。その理由はいずれも保存中に変性したためとされている。一方でよりヘテロSNPの少ないK7グループについては、最も古いK6が昭和5年、K7が昭和21年に分離されて以来、半世紀以上にわたり安定的に使用されている。LOHの原因となるイベントが、ゲノム上でランダムに生じると仮定すると、ヘテロSNPがより広範囲に分布している菌株において、LOHはより起こりやすいということになり、これらの菌株が短期間で変性してしまったことについて、部分的にでも説明がつくのではないだろうか。ここでも別の面から考えると、K1からK5の株のヘテロSNPの多さは、これらの株がLOHにより遺伝的に変わっていく余地が多く残されていることを示しているとも言える。かつては実際にどのような醸造特性をもっていたのか今となってはわからないが、元が優良菌株として分離された株であるので、これらの継代（または変異処理）と再選抜により、好ましくない性質が抑圧されるなどして、再び実用に耐える菌株が得られるかもしれない。実用清酒酵母はほぼK7グループという現状にあって、K7とは別の系統の優良清酒酵母へのニーズへ応えるための一つの選択肢と考えられる。

交配育種については、本稿の前半で、K7グループの胞子形成能の低さなどから、一倍体の取得に手間と時間が掛かり、あまり行われていないと述べた。しかし、潜在的には交配育種へのニーズは存在しており、以前から清酒酵母の胞子形成能を向上させようとする試みはいくつもなされてきたが⁽²⁶⁾、顕著な成功例はなかった。しかし最近になり、薬剤（ラパマイシン）処理によって、K7をはじめとするいくつかの醸造用酵母菌株で胞子形成能が回復し、発芽率の良好な胞子を得られることが示された⁽²⁷⁾。すべての菌株にとって有効というわけでも

なく、また詳細な機作は不明ながら、清酒酵母の育種にとって大きなブレイクスルーとなると期待される。清酒酵母における交配の効果についても、SNP分布パターンやLOHとの関連などの観点から整理しておきたい。K7グループ内の同系交配の遺伝的な効果については、SNPが高密度で存在する領域のハプロタイプの組合せの再構成という意味合い、そして親となる系統に固有のSNPの導入という意味合いが大きい。前者については、親株の組合せによってSNPが多く分布領域のディプロタイプが変わる。ヘテロザイガスからホモザイガスとなる組合せはLOHと同様の効果がある。組合せによっては一度に広範な領域のホモザイガス化が進む可能性もあり、LOHによる分化を加速させる効果と考えることもできる。逆にホモザイガスからヘテロザイガスへなる組合せは、継代に伴うLOHとは逆向きの変化で、親となる系統の双方で失われた遺伝子型を補完し合って回復する効果がある。進化的に逆行させる効果と考えることもできる。

他方、K7グループを片方の親として、別の系統との異系交配を行う場合には、相互に新しい多型がゲノム全域に導入され、ヘテロザイゴシティの度合いの高い状態になる。その時点での醸造特性は優れていたり、意外性に満ちたものであったり、まるでダメだったりするかもしれない。しかし、LOHの原因となるイベントが発生するたびに、ゲノム上のどこかでLOHが起こってディプロタイプが変化していくこととなり、醸造特性は安定しないと予想される。継代を続けたり、あるいは戻し交配を行ったりして、ホモザイガス化が進んだ段階で、改めて選抜を行うのが現実的かもしれない。

多様な菌株の創出へ向けて

本稿では清酒酵母の育種について、改変対象の遺伝子や目的とする醸造特性という観点からではなく、点変異とLOHを中心とした遺伝的変化の様式に着目し、育種の際にどんなことが起こりうるのかということを述べてきた。実際の育種を行う際には、それぞれの方法論の可能性と限界とを絶えず念頭に置くことで、従来よりも格段に良好な視界が得られるのではないかと考えている。また、ここでの議論は、育種だけでなく、継代、維持、保存などにも菌株管理全般に関連するものであるし、また、清酒酵母ばかりでなく、同様に二倍体であるほかの実用酵母にも拡張できるだろう。

ただ、現時点での大きな課題だが、遺伝的変異の様式については見通すことができたとしても、表現型と関連

づけられた遺伝的多型に対するDNAマーカーが絶対的に不足している。時間が掛かっても、遺伝子型と表現型の関連づけを進めていく必要性は極めて大きい。また、だいたい先になるかもしれないが、将来的な育種においては、目指す菌株の遺伝子型、ディプロタイプをあらかじめデザインするような方法もいずれ現実的な射程圏内に入ってくると思われる。酵母1株のゲノム情報を得るための費用は日々小さくなっており、親株がどのような株なのか、系統、ヘテロザイゴシティ、固有の点変異などゲノム情報を知ることから育種がスタートするようになるだろう。交配育種のためのゲノム情報既知の一倍体ライブラリーの整備なども実現すれば、いま以上に多様な清酒酵母が生まれることとなり、それらが酒質の多様化や工程改善などに大きく寄与するものと期待している。

謝辞：本研究の遂行にあたり、共同研究者の下飯 仁博士（現 岩手大学農学部）、渡辺大輔博士（現 奈良先端科学技術大学院大学）をはじめとする皆様より多くのご助言、ご示唆をいただきました。この場を借りまして厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) 赤尾 健：醸協，**107**, 366 (2012).
- 2) 吉田 清：“清酒酵母の研究—80年代の研究—”，清酒酵母研究会，1992, p. 100.
- 3) 後藤奈美：“清酒酵母の研究—90年代の研究—”，日本醸造協会，2003, p. 63.
- 4) 吉田 清：醸協，**101**, 910 (2006).
- 5) 溝口(藤城)弘子，渡辺 睦，永井英雄，西村 顕，近藤恭一：醸協，**93**, 665 (1998).
- 6) 大場孝宏：醸協，**103**, 510 (2008).
- 7) K. Horie, T. Oba, S. Motomura, A. Isogai, T. Yoshimura, K. Tsuge, K. Koganemaru, G. Kobayashi & H. Kitagaki: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 843 (2010).
- 8) 原 昌道：醸協，**73**, 701 (1978).
- 9) 北本勝ひこ，宮崎佳緒子，山岡 洋，五味勝也，熊谷知栄子：醸協，**87**, 598 (1992).
- 10) 石川雄章：“清酒酵母の研究—90年代の研究—”，日本醸造協会，2003, p. 194.
- 11) T. Akao, I. Yashiro, A. Hosoyama, H. Kitagaki, H. Hori-kawa, D. Watanabe, R. Akada, Y. Ando, S. Harashima, T. Inoue *et al.*: *DNA Res.*, **18**, 423 (2011).
- 12) 赤尾 健，渡辺大輔，石川雄章，下飯 仁：“平成22年度日本生物工学会大会講演要旨集”，2010, p. 43.
- 13) M. Lynch, W. Sung, K. Morris, N. Coffey, C. R. Landry, E. B. Dopman, W. J. Dickinson, K. Okamoto, S. Kulkarni, D. L. Hartl & W. K. Thomas: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9272 (2008).

- 14) M. Hiraoka, K. Watanabe, K. Umezu & H. Maki: *Genetics*, **156**, 1531 (2000).
- 15) A. Kotaka, H. Sahara, A. Kondo, M. Ueda & Y. Hata: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 387 (2009).
- 16) Y. Yamamoto, K. Endo, E. Watanabe, T. Ono & K. Yamamoto: *Mut. Res.*, **556**, 183 (2004).
- 17) K. Umezu, M. Hiraoka, M. Mori & H. Maki: *Genetics*, **160**, 97 (2002).
- 18) 小高敦史：生物工学，**90**, 66 (2012).
- 19) S. Hashimoto, M. Ogura, K. Aritomi, H. Hoshida, Y. Nishizawa & R. Akada: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 312 (2005).
- 20) S. Hashimoto, K. Aritomi, T. Minohara, Y. Nishizawa, H. Hoshida, S. Kashiwagi & R. Akada: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 689 (2006).
- 21) D. Diogo, C. Bouchier, C. d'Enfert & M.-E. Bournon: *Fungal Genet. Biol.*, **46**, 159 (2009).
- 22) A. Forche, P. T. Magee, A. Selmecki, J. Berman & G. May: *Genetics*, **182**, 799 (2009).
- 23) 森中和也，赤尾 健，渡辺大輔，渡辺 守，下飯 仁：“第65回日本生物工学会大会講演要旨集”，2013, p. 198.
- 24) 渡辺大輔：化学と生物，**50**, 723 (2012).
- 25) 灘酒研究会編：“改訂 灘の酒用語集”，灘酒研究会，1997, p. 104.
- 26) 水津哲義：“清酒酵母の研究—90年代の研究—”，日本醸造協会，2003, p. 99.
- 27) N. Nakazawa, S. Nijima, Y. Tanaka & T. Ito: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 491 (2012).

プロフィール



赤尾 健 (Takeshi AKAO)

＜略歴＞1991年筑波大学第一学群自然科学類化学専攻卒業／1993年東京工業大学大学院総合理工学研究科修士／同年国税庁入庁／1994年高松国税局／1997年国税庁醸造研究所微生物研究室研究員／2001年酒類総合研究所微生物研究室／2002年国税庁／2004年酒類総合研究所遺伝子工学研究室主任研究員／2006年同醸造技術基盤研究部門／2012年同研究企画財部門主任研究員，現在に至る＜研究テーマと抱負＞オモテ：清酒酵母のゲノム情報の収集・解析・利用（当初思ったよりも酒造現場に活かせるようなものが多く，少し驚いている）。ウラ：醸造考古学（時間ができたら，醸造の古い教科書や文献をきちんと読んで，そもそもの部分をいろいろ考えてみたい）＜趣味＞休日によその街を一人でうろろろすること。塩ビ製円盤漁り