

特別賞

ピルビン酸低減酵母の育種と
低アルコール清酒製造への応用

佐賀大学農学部准教授

北垣 浩志

天山酒造株式会社

七田 謙介 後藤 潤

佐賀県工業技術センター

柘植 圭介 澤田 和敬

緒 言

長年酒類業界の懸案になってきた、酒類発酵中のピルビン酸の低減という技術課題を、ミトコンドリア醸造学という独自の学術・技術分野を開拓し、ミトコンドリア輸送をターゲットとするという画期的な発想によりピルビン酸低減清酒酵母を育種することで解決し、産学官連携によりその酵母を使った低アルコール清酒の実用化・上市にも成功した。

1 國酒である日本酒の消費低迷はアルコール濃度が高すぎるのが原因のひとつである

近年、國酒である清酒の消費が低迷している。清酒産業は1000年近く存続してきた日本の伝統文化のひとつであり、地域の雇用を支えてきた。酒類の市場は市場原理に任せればよいという考えもあるかもしれないが、市場原理に任せれば人件費の安い海外で造った酒類が普及して日本の伝統醸造産業はなくなってしまう。伝統発酵食品は世界で最も健康的と言われる日本人の食生活の基盤であり、このような伝統醸造産業が消え去ることは、長い目で見れば日本全体の損失であると考えている。清酒の需要が減少した原因のひとつが、清酒の高いアルコール濃度である。清酒のアルコール濃度は15-16%と世界の醸造アルコール飲料の中で最も高い。昔は酒に酔うことが一種の社会慣習になっていたことや高温多湿な日本では微生物的な保存性を高める必要があったため、清酒を高いアルコール濃度にすることにメリットがあった。しかし微生物の制御技術が発達し、また消費者は健康を気にして高いアルコール濃度の酒類を敬遠している現在、ここまで高いアルコール濃度を達成する社会的・経済的メリットはほとんどなくなっている。それにも関わらず、現在、低アルコール清酒の製造に関してきちんとした学術的研究がないため、低アルコール清酒の製造技術はこの40年間程ほとんど高度化していない。約30~40年前、低アルコール清酒の品質の高度化が清酒業界の最大の課題だとして、「ソフト清酒の開発」として産学官挙げての研究開発が行われたが(1)、当時の技術レベルの限界があったことなどが障害となり、目ぼしい成果を挙げられずに自然消滅した。時は経て現在、低アルコール清酒の研究で科研費を獲得しているのは現在、佐賀大学の北垣が唯一であり(科研費データベース <http://kaken.nii.ac.jp/> 参照)低アルコール清酒の研究者は日本から消滅したと言っていいだろう。そのため依然として低アルコール清酒の製造は多くの清酒醸造企業にとって難しく、全体に品質は安定しておらず、低アルコール清酒全体が市場の信頼を得られないでいる。困難でうまく行かず、みな困っているようなテーマにこそ、研究者は取り組むべきだと考え、清酒業界の将来にとってのキー技術である低アルコール清酒の技術開発を産学官連携で行うことにした。

2 産業的なアルコール発酵における世界で初めての酵母ミトコンドリアの発見

佐賀大学の北垣は、20代の頃に5年間、大阪国税局鑑定官室で鑑定官として約1000場の清酒蔵を醸造指導して醸造技術を体得した後、34歳で米国サウスカロライナ医科大学に留学してミトコンドリアの研究を行い、米国生化学・分子生物学会誌などに第一著書論文を発表した(2,3)。それらの経験を通じて佐賀大学の北垣は、ミトコンドリア研究と醸造酵母の育種を組み合わせることで低アルコール清酒の技術課題を解決できるのではないかと思いついた。

ミトコンドリアは酸素呼吸のための細胞内小器官であるため、佐賀大学の北垣が研究に着手するまで、産業的なアルコール発酵で酵母のミトコンドリアの存在や構造、役割を調べた

研究は世界でもなかった。そこで佐賀大学の北垣は、分子生物学的・細胞生物学的な手法を取り入れることで清酒酵母のミトコンドリアを可視化して観察することに成功し、産業的なアルコール発酵で世界で初めて酵母ミトコンドリアの存在と構造を明らかにした(4)。

3 酵母ミトコンドリアが育種のターゲットになることを実証

北垣はさらにこの成果を元に、上記で観察される清酒醸造中の清酒酵母ミトコンドリアが代謝上活性化構造体として役割を持っているかを明らかにすることに取り組んだ。北垣は、ミトコンドリアの形態を遺伝的に変化させた後、有機酸の生産性を解析するという発想のアプローチにより、清酒酵母のミトコンドリアの形態がリンゴ酸の生産性を制御していることを実証した。これらの研究成果により、ミトコンドリアが醸造酵母育種の新たなターゲットになることが初めて明らかとなった(5)。

4 オルガネラの輸送をターゲットとした世界で初めての育種スキームを考案

上記の研究から、酵母ミトコンドリアは日本酒の醸造の最後まで存在し、物質代謝の重要な育種ターゲットになることが明らかとなった。一方、ミトコンドリアには各種物質の輸送体が多く報告されていた。そこで、ミトコンドリアの物質輸送をターゲットにした育種が可能ではないかと思い付いた。それまで、醸造微生物の育種は酵素阻害剤耐性や栄養要求性などにより行われており、そもそもオルガネラの輸送をターゲットとするという発想自体が醸造微生物の育種の歴史で全くないものであった。

5 ミトコンドリア輸送をターゲットとするピルビン酸の低減酵母育種と醸造試験

ピルビン酸は酒類醸造中、残存すると α アセト乳酸に変換され、その一部が細胞外に漏出する。酵母の活性が盛んな時期には α アセト乳酸は分岐アミノ酸の生合成に使われているが、発酵が終了して酵母が発酵液から切り離されると、非酵素的酸化的脱炭酸によりジアセチルに変換されてしまう。ジアセチルの官能閾値は低く、容易にオフフレーバー(つわり香)として認識されてしまう。ピルビン酸は α アセト乳酸と似た挙動を取ることがわかっており、ピルビン酸を低減させることでジアセチルの生成を抑制することができると考えられる。それまでにピルビン酸のアナログ物質を用いてピルビン酸の低減酵母を育種した研究はあった(6)が、発酵能も減耗してしまっていた。そこで、佐賀大学の北垣は、ピルビン酸のミトコンドリアへの取り込みを活性化してやることで、ピルビン酸の低減が実現できるのではないかと考えた。ごく最近、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送体が発見されScienceで発表された(7)(我々の論文がこの研究の著者らによって引用されている)が、この育種を行った時点ではまだこの輸送体は発見されていなかった。また遺伝子組換えはまだpublic acceptanceの面では難しい面がある。そこで、このピルビン酸のミトコンドリアへの輸送を活性化する育種を通常の突然変異で実現することにした。ミトコンドリア代謝の研究で、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送阻害剤として、Ethyl α -transcyanocinnamateが一部のグループにより使われていた。Ethyl α -transcyanocinnamateを清酒酵母に投与したところ、生育阻害が起きた。従って、耐性株を取得することができる。この阻害剤に耐性である株の中には、ピルビン酸のミトコンドリアへの取り込みが活性化していたり、ピルビン酸の代謝が変化した株が含まれているのではないかと考えた(図1)。すなわち、低減したピルビン酸のミトコンドリアへの取り込みを、輸送体の活性化により補償したり、細胞質での代謝

を上昇させることで補償している株があるのではないかと予想した。

清酒醸造中の 清酒酵母ミトコンドリアの構造を初めて発見



ミトコンドリア輸送をターゲットとするという画期的な発想でピルビン酸低減清酒酵母を育種

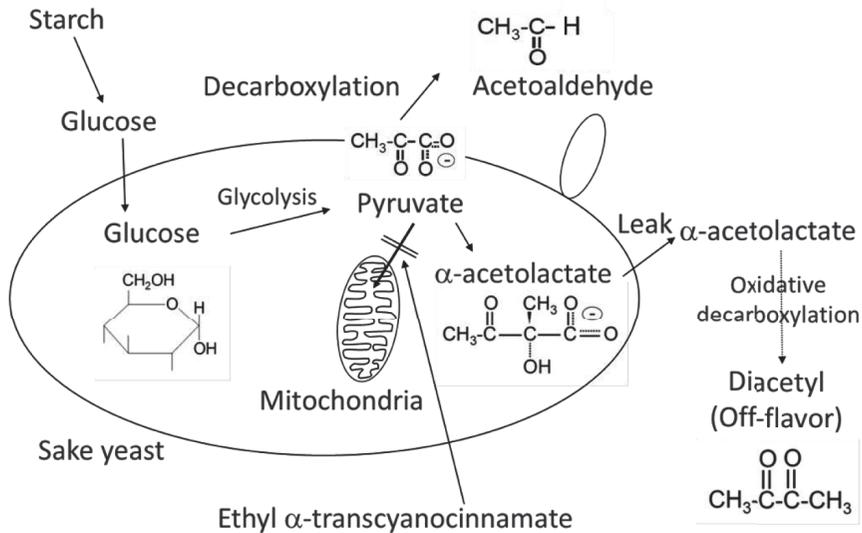


図1 清酒酵母ミトコンドリアの発見とそのピルビン酸低減酵母育種への応用

6 Ethyl α -transcyanocinnamate 耐性株ではピルビン酸が実験室スケール・パイロットスケール・工場スケールで低減している

上記の仮説に基づき、Ethyl α -transcyanocinnamate 耐性株を取得するため、自然突然変異を誘起させた清酒酵母協会7号を Ethyl α -transcyanocinnamate を含む培地に塗布した結果、10株の Ethyl α -transcyanocinnamate 耐性株を取得することができた。そこでこれらの株で清酒を醸造してみたところ、いくつかの株ではピルビン酸が低減していた。親株である協会7号と TCR7株を用いて各々6連の独立した前培養から清酒を仕込み酵素法でピルビン酸を測定すると、有意にピルビン酸が低減しており ($p < 0.005$)、14日の発酵期間で2-3日発酵を短期化できることが示された(図2)(8, 9)。このことから、TCR7株ではピルビン酸が低減していることが確認できた。同じくこの手法を使って育種した Ethyl α -transcyanocinnamate 耐性清酒酵母を使ってパイロットスケール及び工場スケールの清酒を醸造し、佐賀県工業技術センターの柘植と澤田が解析したところ、発酵全期間にわたってピルビン酸が顕著に減少していること及びジアセチルの直接の前駆体である α アセト乳酸が8割低減している(発酵9日目:親株0.28 mg/l、育種株0.05 mg/l)ことを確認できた(10, 11)。これらの結果から、本研究により、発酵力が減少しないでピルビン酸の低減を可能にする酵母が初めて育種された(12, 13)。日本においては微生物育種の長い伝統があるが、これまでミトコンドリアを初めオルガネラへの物質輸送をターゲットとするという育種スキーム自体がなく、まったく新しい育種スキームを提案することとなった。

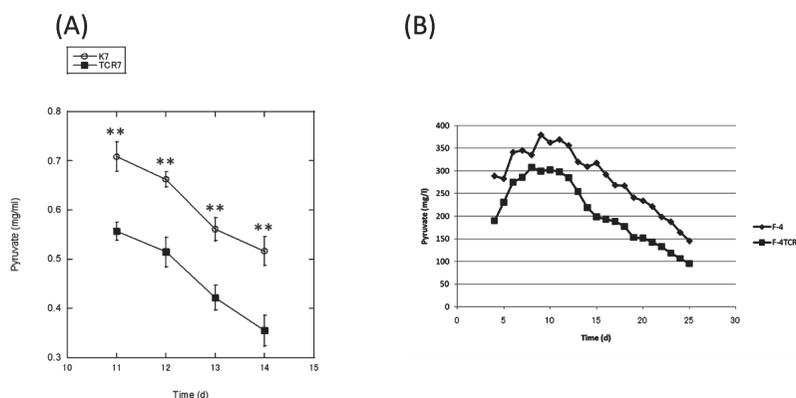


図2 育種株による清酒醸造時のピルビン酸濃度推移

(A) 実験室スケール総米83gで清酒を仕込みピルビン酸濃度を測定した。K7は親株の清酒酵母、TCR7はその ethyl α -transcyanocinnamate 耐性株を表す。** ; $p < 0.005$, $n=6$ (B) 工場スケール 総米1トンで清酒を仕込みピルビン酸濃度を測定した。F-4は親株の清酒酵母、F-4TCRはその ethyl α -transcyanocinnamate 耐性株を表す。

7 育種株を使った清酒醸造の実産業への展開

以上のように育種した清酒酵母は工場スケールで実用上良好な醸造特性を示すことがわかったので、実際の清酒醸造産業での技術課題の解決に、企業と共に挑んでいる。佐賀県の天山酒造株式会社の子田と後藤は佐賀大学の北垣や佐賀県工業技術センターの柘植や澤田と

技術情報を交換しながら醸造試験を繰り返すことによって、この育種酵母を使った低アルコール清酒の完成にこぎつけた。現在、この育種酵母を使って天山酒造において低アルコール清酒に使用して製造を行っており、「岩の蔵13」として2012年度から販売を開始し、市場で好評を得ている。これから日本醸造協会など全国的な酵母の頒布機関でも頒布を予定している。

8 今後の展望

本育種は、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送が活性化していることを想定して行ったが、ミトコンドリアの輸送を *in vivo* で測ることは現在の科学技術では非常に困難であり、その測定にはまだ成功していない。そのため、遺伝学的なアプローチで現在解析を行っている。次世代シーケンサーで育種酵母のゲノム解析を行い、親株と比較することで遺伝子変異の候補を13個にまで絞り込んだ。これらの遺伝子変異を含む断片を親株の清酒酵母に形質転換してピルビン酸の生産性・Ethyl α -transcyanocinnamate 耐性を調べることで、ピルビン酸の低減をもたらす遺伝子変異を明らかにできると考えている。また Ethyl α -transcyanocinnamate 耐性株のメタボローム解析も行っており、これらの解析によりどの代謝経路が影響を受けているのかが明らかになってくると期待される。これらのアプローチはこれまでの発酵学・醸造学の研究者は使えないものであったため、本研究を遂行することで、今回の育種株に関するだけでなく、低アルコール清酒の製造技術全般に援用可能な多くの有用な情報が得られ、低アルコール清酒製造技術のレベルアップにつながると期待される。

9 おわりに

これまでに低アルコール清酒の技術開発は多くの研究者によって40年以上行われてきたが、その困難さにより皆あきらめてしまっていた。今回、佐賀大学の北垣がミトコンドリア学の理解や、ミトコンドリア輸送をターゲットとするという、これまでの発酵・醸造学にはまったくなかった新たな発想を持ち込んだことで、低アルコール清酒技術の研究開発は新たな局面を迎えつつある。発酵・醸造学にミトコンドリア研究を創造的なアイデアで取りこみ実用的な技術の開発に結び付けてきたその独創的な研究スタイルは、関連の学会で極めてインパクトのあるものとして受け取られている(科学技術分野の文部科学大臣表彰(若手科学者賞)、農学会・日本農学進歩賞、日本生物工学会・生物学奨励賞(江田賞)、日本農芸化学会トピックス選定、日本生物工学会トピックス選定等)。さらに進取の気性を持った醸造企業や確かな分析技術を持った地域の公設試験場との共同研究により、実用化にまで持ち込むことができた。今後、本研究で開発した技術をキーにして、日本の伝統文化である清酒を発展させるための低アルコール清酒の高度化が行われていくことが期待される。

参考文献

1. 日本酒造組合中央会東京支部銘酒研究委員会
ソフトタイプ清酒の開発
日本醸造学会誌、74, 1, 61-63 (1979)
2. Hiroshi Kitagaki, Lauren Cowart, Nabil Matmati, David Montefusco, Jason Gandy, Silvia Vaena de Avalos, Sergei Novgorodov, Jim Zheng, Lina Obeid, Yusuf Hannun.
ISC1-dependent metabolic adaptation reveals an indispensable role for mitochondria in induction of nuclear genes during the diauxic shift in *S. cerevisiae*.
Journal of Biological Chemistry, 284, 16, 10818-10830 (2009)
3. Hiroshi Kitagaki, Lauren Cowart, Nabil Matmati, Silvia Vaena de Avalos, Sergei Novgorodov, Youssef Zeidan, Jacek Bielawski, Lina Obeid, Yusuf Hannun
Isc1 regulates sphingolipid metabolism in yeast mitochondria.
Biochimica Biophysica Acta Biomembranes, 1768, 11, 2849-2861 (2007)
4. Hiroshi Kitagaki* and Hitoshi Shimoi.
Mitochondrial dynamics of yeast during sake brewing.
Journal of Bioscience and Bioengineering, 104, 3, 227-230 (2007)
5. Hiroshi Kitagaki*, Taku Kato, Atsuko Isogai, Shigeaki Mikami and Hitoshi Shimoi.
Inhibition of mitochondrial fragmentation during sake brewing causes high malate production in sake yeast.
Journal of Bioscience and Bioengineering, 105, 6, 675-678 (2008)
6. 福田和郎、宮本ともこ、粕谷亘慶、大内弘造、特許公開平10-179131
アルコール飲料および発酵調味料の製造方法
7. Ajit Divarkaruni and Anne Murphy.
Cell biology. A mitochondrial mystery, solved.
Science, 337, 6090, 41-43 (2012).
8. Kenta Horie, Takahiro Oba, Saori Motomura, Atsuko Isogai, Takashi Yoshimura, Keisuke Tsuge, Kazuyoshi Koganemaru, Genta Kobayashi and Hiroshi Kitagaki*.
Breeding of a low pyruvate-producing sake yeast by isolation of a mutant resistant to ethyl alpha-transcyanocinnamate, an inhibitor of mitochondrial pyruvate transport.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74, 4, 843-847 (2010).
9. 北垣浩志、特願2010-111263
ピルビン酸低生産酵母の育種方法

10. 佐々木真、大場孝宏、末永光、稲橋正明、佐藤真佐恵、鶴田裕美、小林元太、柘植圭介、吉村臣史、小金丸和義、北垣浩志*

吟醸酒製造用清酒酵母からのピルビン酸低生産株の育種と実製造でのピルビン酸および α - アセト乳酸の低減

生物工学会誌, 89, 5, 222-227 (2011)

11. 平田みよ、元村沙織、佐々木真、堀江健太、大場孝宏、柘植圭介、吉村臣史、小金丸和義、北垣浩志*

ピルビン酸のミトコンドリア輸送阻害剤耐性酵母の小規模及び中規模パイロットスケールでの低アルコール清酒醸造特性

日本醸造学会誌, 106, 5, 323-331 (2011)

12. Hiroshi Kitagaki*

Mitochondrial-morphology-targeted breeding of industrial yeast strains for alcohol fermentation.

Biotechnology and Applied Biochemistry, 53, 3, 145-153 (2009).

13. Hiroshi Kitagaki* and Katsuhiko Kitamoto.

Breeding researches of sake yeasts in Japan: History, recent technological advances, and future perspectives.

Annual Review of Food Science and Technology, 4, 215-235 (2013)