

## 酵母を美味しくする麴菌が選ばれてきた？ 麴菌のゲノム進化解析と清酒メタボローム解析

岩下 和裕 (独立行政法人酒類総合研究所)

### はじめに

麴菌 (*Aspergillus oryzae*) の全ゲノムシーケンスが報告されてから来年で 10 年を迎える。麴菌のゲノムシーケンスが解析された最大の理由は、麴菌が日本の伝統的発酵食品産業に欠かせない微生物であるためである。麴菌ポストゲノム研究では、これらの産業の中での麴菌の役割や影響について解析することが期待されている。その一方でゲノムシーケンスが明らかになると、麴菌の遺伝子の大半が機能を予測することの出来ないことが明らかになった。また、麴菌は、出芽酵母等と異なり、有性世代が見つかっておらず、1 細胞内に複数の核を保持する多核という性質を有する。これらの性質により麴菌の研究手法が限られ、酵母と比べると圧倒的に知見が少ない。また、清酒産業の中では、麴菌は複数の菌株が混合された「種もやし」として販売、供給されるため、清酒の味に対する麴菌株の違いについては、あまり研究がなされていない。さらに、麴菌の近縁種には、*A. flavus* というアフラトキシンを生産する糸状菌があり、この *A. flavus* との分類も重要なテーマである。このように、醸造における麴菌の研究は、ポストゲノム研究という以前に、知見が不十分なところも多く、菌株レベルの違いでさえ、十分に認識されていなかった。以上のことから、様々な麴菌株のゲノム進化について解析することから研究をスタートした。

### 麴菌株のゲノム進化

酒類総合研究所の菌株ストックから 33 株、新たに米麴や種もやしから単離した 22 株の計 55 株を用いてゲノムアレイ解析を行った。その結果、麴菌株にはゲノムの欠失が頻繁に見られ、RIB40 株 (シーケンス株) と比較すると 4% 程度の遺伝子のシグナルを欠失している株が多く見られた。さらに、全遺伝子のシグナル値を用いて進化系統解析を行ったところ、麴菌株は大きく 13 の系統に別れ、各系統と麴菌の用途には相関関係がみられた。特に、昭和 30-40 年代に使用されていたと考えられる菌株群 (Sake/Miso 系統) と、最近の米麴、種もやしから単離した菌株群 (New Sake 系統) とは大きく異なる系統に別れた。また、各系統で欠失のパターンは大きく異なっていた。そこで、系統の異なる菌株を複数選抜し、全ゲノムシーケンス解析を行ったところ、欠失に加え各系統で固有のゲノム配列があることも明らかとなった。さらに、複数の染色体間組換えが観察されたことから、パルスフィールドゲル電気泳動により染色体サイズの比較を行ったところ、菌株間での各染色体のサイズは大きく異なっていた。以上のことから、麴菌の進化上、染色体の欠失と挿入、染色体間組換えが高頻度に生じていることが示唆された。麴菌では、Non-homologous end joining (NHEJ) の活性が高いことが知られている。麴菌は通常 1 倍体の生活環であることから、NHEJ によりゲノムを修復し、かつ多核であることで致死性の組換えを排除するとともに、遺伝的な多様性を確保してきたのではないかと考えられる。しかし、染色体間組換えが高頻度に生じると染色体構造が大きく変わり、減数分裂での相同遺伝子の整列、キアズマの形成が難しくなることが予想される。つまり、減数分裂時の染色体の等分配に不都合が生じる恐れがあり、これが麴菌では有性世代が発見されていない理由なのかもしれない。

## 麴菌株と米麴の性質

製麴中の麴菌遺伝子発現を調べると、高発現する上位 2000 遺伝子のうち約 40% は機能未知遺伝子である。このことから、麴菌には未解明の分子機能が多くあると推察され、清酒醸造、清酒メタボライトへの関与についても未解明のことが多いと思われる。また、先述の通り各菌株の米麴としての性質や清酒メタボライトとの関連については、ほとんど比較解析されていなかった。そこでまずアレイ解析に使用した麴菌株を用いて、実験室スケールで製麴を行い米麴の各酵素活性、菌体量について解析を行った。その結果、米麴の性質は系統ごとに違いが見られた。醤油関係の麴菌を含む菌株群では、アミラーゼ系の酵素力価が低く、プロテアーゼ系の酵素活性は比較的高いという醤油製造に適した特徴を有していた。さらに、Sake/Miso 系統の麴菌株群では、グルコアミラーゼの活性が高いのに対し、New Sake 系統の麴菌株群では低かった。近年の米麴の性質としてはグルコアミラーゼ活性が高いことが求められていることは異なる性質を示した。

## 清酒メタボライトへの寄与

そこで、作成した米麴を用い、きょうかい 7 号酵母を使用して小仕込みを行い、発酵経過と製成酒のアルコール、日本酒度などの一般成分、アミノ酸組成、有機酸組成、香気成分について解析を行った。得られた各種成分値を用いて、クラスター解析を行ったところ、成分値から得られた系統樹とゲノムアレイ解析の結果から得られた系統樹は類似をしていた。このことから、麴菌の菌株は米麴の性質に影響するとともに、清酒の酒質（メタボライト）に大きく影響することが明らかとなった。さらに、興味深いことに Sake/miso 系統で作成した清酒に比べ、New sake 系統で作成した清酒では、アルコール生産量は低いものの、酢酸イソアミルやカプロン酸エチル等の吟醸香が 1.5-2 倍高かった。つまり、以前は発酵の効率を重視した麴菌の選抜がなされていたのに対し、最近では酵母がより良い香味を生産する麴菌が選抜され使用されていると考えられる。これまでに、清酒の並行複発酵により高いアルコール濃度が得られるのは、麴菌の酵素生産と酵母の高発酵性によるものと考えられ、この過程で高いエタノール生産性を示す清酒酵母が選抜されてきたと考えられている。しかし、現在はこの酵母をさらに活かす麴菌が選抜され、使用されていると考える事ができる。

## 麴菌の機能未知遺伝子の研究

これまでに述べたとおり、麴菌のゲノムと麴菌の性質、製成酒の性質には明らかに相関がある。では、どのような遺伝子がこれらの性質に関連しているのか？という疑問が浮かび上がる。しかし、アレイ解析やゲノムシーケンス解析の結果では、Sake/miso 系統の麴菌株群と New sake 系統の菌株群では、約 600 遺伝子の有無に差があり、これらのうち 70% 以上は機能未知遺伝子である。さらに、両菌株群の米麴中での遺伝子発現を比較したところ、違いのあった遺伝子の 80% 以上が機能未知遺伝子であった。以上のことから、麴菌の研究において、機能未知遺伝子は避けて通れない。そこで、酵母で保存されておらず、糸状菌で保存され、かつ米麴で高発現している遺伝子について、140 破壊株を作成したところ、分化や固体培養での生育に異常が見られるものが数多くみられた。さらに、薬剤感受性になるものも多く見られた。以上のことから、麴菌の研究には広大な未知の領域が広がっており、応用研究のためにもこれらの機能未知遺伝子の基礎的な解析を着実に進めることが必要である。