

佐賀県産酒のブランド力向上を目指した技術体系の構築（第2報）

食品コスメ部
澤田和敬

次世代シーケンサーを用い、佐賀はがくれ酵母5菌株（F4株、F7株、F401株、SAWA-1株、SGH株）の全ゲノム解析を行った。得られたデータから、*FAS2* 遺伝子と *AWA1* 遺伝子の SNP について比較を行った。その結果、*FAS2* 遺伝子では、佐賀はがくれ酵母の中でカブロン酸エチル高生産である F7 株及び SAWA-1 株に SNP が見られた。また、*AWA1* 遺伝子では、F7 株、F401 株、SGH 株にストップゲイン変異が確認された。しかし、SAWA-1 株は他の菌株と異なる SNP を有していたことから、その他の菌株と異なる機構で高泡を形成していないことが示唆された。

1. はじめに

佐賀県は、県産酒の原産地呼称管理制度や GI 佐賀を取得し、官民一体となった需要開発やブランド構築に取り組んでいる。

佐賀県の清酒の特徴として、「濃醇甘口」「ふくよかな米の旨味」などが挙げられる。これらの味わいが消費者に評価され、佐賀県の特定名称酒の比率は約 74%と全国の特定名称酒比率約 33%を大きく上回っている。国内外の市場では、オリジナリティの高い商品や地域固有の文化を活かしたような商品が求められている。

佐賀県は技術的支援の一環として、県が開発した酵母を「佐賀はがくれ酵母」として商標登録を行い、県酵母のバリエーション強化と共にブランド構築に取り組んでいる。

佐賀はがくれ酵母には、熊本酵母 KA-1 を親株に用い分離した F4 株、F4 株を親株とし分離・育種した F7 株、F401 株、SAWA-1 株がある。その他に、県産品種のいちごから分離した SGH 株、SAWA-1 株と SGH 株の 1 倍体を交雑育種して取得した StyP 株、StyG 株、StyY 株がある。これら 8 菌株の香味のタイプはそれぞれ異なり、清酒メーカー各社の商品設計と醸造特性を鑑み、酵母の使い分けを行っている。

現在、佐賀はがくれ酵母は県内 24 社のうち、19 社が使用している。2023 年度に工業技術センターが頒布した酵母培養液量から、本県で課税出荷している特定名称酒のうち約 25%に佐賀はがくれ酵母が使用されている計算となる。このことから佐賀はがくれ酵母の特徴は県産酒の特徴を構成する重要なファクターであり、県産酒のより一層の高品質化には各酵母への知見を深めるとともに、酵母の安定的な維持管理が不可欠である。

当センターでは頒布前に佐賀はがくれ酵母の小仕込み試験を行い、醸造特性を指標に菌株の維持管理を行っている。より精度よく微生物を管理するためには酵母の判別技術が不可欠であり、生理的性質を利用した培地組成の異なるプレートでの生育や単一

炭素源としての糖の資化性等により菌株の判別を行ってきた。清酒酵母間では、 β -アラニン培地による協会7号酵母の判別などがある^{1,2)}。

さらに、PCRを用いた醸造用酵母の判別のほか清酒酵母の菌株間で多型が報告されている遺伝子を用いて各機関が開発した酵母ときょうかい酵母の判別を行う手法の開発が各地で行われている³⁾。佐賀はがくれ酵母においては、菌株そのものの生理的性質や PCR による判別技術の確立は今後の検討課題である。

一方、バイオインフォマティクス技術の革新に伴い、次世代シーケンサー（以下、NGS）による各生物種の全ゲノム解析が可能になった。清酒酵母では、赤尾らが NGS を用いて実験室酵母と清酒酵母の比較ゲノム解析を行い、清酒酵母特有の染色構造等や清酒酵母間での塩基置換（以下、SNP）による系統分化と醸造特性の関連性について様々な検討を行っている。

全ゲノム解析では菌株の特性だけでなく菌株の保護に有用な情報が得られる。そこで、本研究では佐賀はがくれ酵母の全ゲノム解析を行い、佐賀はがくれ酵母の特徴的な遺伝子の探索に取り組んでいる。本報では佐賀はがくれ酵母5菌株間で *AWA1* 遺伝子と *FAS2* 遺伝子について比較した結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 実験材料

佐賀はがくれ酵母のうち、F4 株、F7 株、F401 株、SAWA-1 株、SGH 株を用いた。

2.2 佐賀はがくれ酵母のゲノム解析

きょうかい酵母7号をリファレンス配列とした佐賀はがくれ酵母の全ゲノムリシーケンス解析を行った。シーケンスは 2×150 ペアエンド (PE) 構成を用い、Illumina NovaSeq X Plus (イルミナ株式会社) で実施した。

データ解析はシーケンスリードの品質確認を Fast QC ver 0.11.7, トリミングは Trimmomatic ver 0.38 を用い、クオリティの低い塩基やアダプター配列

を除去し、その結果極端に短くなったリードを除外した。その後、BWA ver 0.7.17を用いてトリミング後のシーケンスリードをリファレンスゲノムへマッピングし、Picard ver 2.18.11を用いて重複リード及びN塩基を除去した。freebayesを用いてDuplicationリードを除去したbamファイルを作成した。bamファイルからShort Variant (1~10塩基程度のゲノム変異)を抽出した。Short Variantとして、SNVs (single nucleotide variant), small indels (insertions・deletions), MNVs (multi-nucleotide variants), 複合的なイベント (composite insertion・substitution events)を抽出した。検出された変異について、リファレンスゲノム上の位置とその変異の内容などをVCFファイルとして作成し、SnPEff ver4.3tを用いて遺伝子、アミノ酸情報等のアノテーションを付与し、全サンプルのVCFファイルを統合した。また、IGV 2.19.1を用いてSNPの可視化を行った。

3. 結果及び考察

3.1 FAS2遺伝子の比較

図1にIGVで可視化したFAS2遺伝子領域を、表1にそれぞれの菌株の変異について示した。

FAS2遺伝子は脂肪酸合成酵素複合体のサブユニットをコードしており、カプロン酸エチルの前駆体であるカプロン酸などの細胞内の合成に関与する。カプロン酸エチル高生産酵母はFAS2遺伝子に変異を持つことが多く、酵母の育種ではセルレニンへの耐性を指標に選抜されることが多い⁴⁾。

FAS2遺伝子には3箇所のSNPが存在した。①はすべての菌株に、②はF7株とSAWA-1株に、③はF7株が有していた。佐賀はがくれ酵母のうち、F7株とSAWA-1株はカプロン酸エチル高生産酵母であることから、②の変異がカプロン酸エチル高生産に寄与していることが推測される。

一方、①の変異はカプロン酸エチル高生産能に関わらず変異を有しており、リファレンスゲノムのきょうかい7号と佐賀はがくれ酵母の違いを明確に分ける際に使用できる可能性がある。F7株のみに見られたSNPはF7株を判別する際に使用できる可能性が示された。

表2 各菌株のAWA1遺伝子の変異

	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
F4株	-	-	G→A	G→A	-	-	-
F7株	-	C→A	G→A	G→A	-	A→T	-
F401株	G→A	C→A	-	-	A→G	-	-
SAWA-1株	-	-	-	-	A→G	-	T→C
SGH株	G→A	C→A	-	-	-	-	-

3.2 AWA1遺伝子の比較

図2にIGVで可視化したAWA1遺伝子領域を、表2にそれぞれの菌株の変異について示した。

AWA1遺伝子は清酒酵母の高泡形成能に関与する遺伝子として知られており、実験室酵母や一般的な酵母株には存在しない清酒酵母に特有の遺伝子である⁵⁾。

AWA1遺伝子には7箇所のSNPが存在した。このうち、高泡を形成しないF7株、F401株、SGH株に変異が確認された⑤にはストップゲイン変異が確認され、AWA1タンパク質に変異が生じていることが明らかになった。一方、高泡を形成しないSAWA-1株は、⑤にSNPがなく、⑧及び⑩に変異が生じており、F401株等と異なる機構で高泡を形成していないことが示唆された。



図1 FAS2遺伝子領域周辺

表1 各菌株のFAS2遺伝子の変異

	①	②	③
F4株	A→G	-	-
F7株	A→G	G→A	G→T
F401株	A→G	-	-
SAWA-1株	A→G	G→A	-
SGH株	A→G	-	-

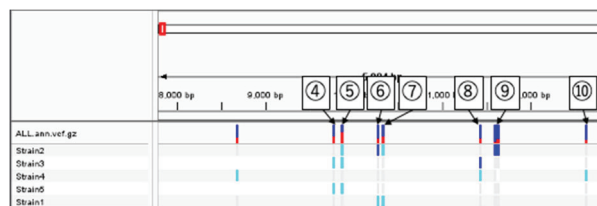


図2 AWA1遺伝子領域周辺

4. おわりに

本研究では、*FAS2*、*AWA1* 遺伝子の2つの遺伝子について報告したが、今回取得した5菌株のゲノム情報にはきょうかい7号と異なる SNP が染色体全体で確認された。今後、これらの変異について詳細な解析に取り組む予定である。また、F7 株、F401 株、SAWA-1 株の親株である F4 株は熊本酵母 KA-1 株したものである。KA-1 株をリファレンスゲノムに用いた遺伝学的アプローチにより、佐賀はがくれ酵母の特徴的な醸造特性を見出せることが期待される。さらに、2023 年以降に頒布を開始した StyP 株、StyG 株、StyY 株は SAWA-1 株と SGH 株の交雑により育種した酵母であり、自然界から分離した酵母を用いて交雑育種した報告が少ないことから興味深い知見が得られることが期待される。丸山らは遺伝学的特性と醸造学的特性を三重酵母の包括的な評価として報告している⁶⁾。当センターにおいても、佐賀はがくれ酵母の醸造学的データの取得と遺伝学的特性の関連について検討を進めたい。

参考文献

- 1) 渡辺誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 大野剛. 色素含有平板培地を用いた清酒酵母の判別と酵母混合発酵. 日本醸造協会誌, 104(9), 712-721,(2009).
- 2) 野白喜久雄. 清酒醸造微生物学の進歩 (2). 日本醸造協会雑誌, 79(2), 106-110, (1984).
- 3) 福田央. "PCR 法による清酒酵母の判別." 202-211, (2014)
- 4) 吉田清: 日本醸造協会誌, 101, p910-922 (2006)
- 5) 下飯仁. 清酒酵母の高泡形成に関与する遺伝子 *AWA1*. 日本醸造協会誌, 97(7), 474-480, (2002)
- 6) 丸山裕慎, 小澤敦揮, 山崎栄次, 赤尾 健. 日本醸造協会. 三重県清酒酵母の遺伝的及び醸造特性の包括的評価. 日本醸造協会誌/日本醸造協会, 日本醸造学会 [編], 118(2), 115-127,(2023).