

# 泡盛醸造における黒麹菌 4-ビニルグアヤコールの生成機構

眞榮田麻友美

(東京農業大学 応用生物科学部)

泡盛古酒の特徴香であるバニリンは原料米細胞壁にエステル結合しているフェルラ酸 (FA) に由来し、FA の脱炭酸反応によって生成される 4-ビニルグアヤコール (4VG) が、貯蔵中に非酵素的酸化によって生成されることが知られている。これまでに泡盛醸造中の FA から 4VG への変換は酵母や乳酸菌によるものだと考えられてきた。一方で、*Aspergillus luchuensis* のゲノムが公開された際に、細菌類のフェノール酸脱炭酸酵素と相同性のある遺伝子が存在することがわかった。これまでに、我々は *A. luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素遺伝子 (*alpad*) を大腸菌で発現させたリコンビナント AIPAD に、FA を 4VG に変換する活性 (FAD 活性) が十分にあることを報告している。本研究では、泡盛醸造中に実際に AIPAD が 4VG を生成しているのかを調べるために *alpad* 破壊株 ( $\Delta alpad$  株) を作製し、醸造試験を行い 4VG 生成への寄与率と醸造中の AIPAD による 4VG 生成がいつ行われているのか調べた。また、4VG 生成過程に関連する酵素であるキシラナーゼ (Xln)、フェルラ酸エステラーゼ (FAE) が醸造中のどの段階で活性を発現し、フェルロイルオリゴ糖 (FAO) および FA がどの段階で生成するのかを精米度合いの異なる原料米を用いて調べた。

はじめに  $\Delta alpad$  株と野生株を用いて醸造試験を行い、4VG 生成量を比較した。その結果、もろみにおいて野生株では製麹時間に伴い著しく FA が減少し、4VG 量は著しく増加した。 $\Delta alpad$  株においては、どの製麹時間においても FA および 4VG 量は一定で、野生株と比較して FA 量は多く、4VG 量は著しく低かった。蒸留液中の 4VG 量はもろみ中の 4VG 量と比例した。これらの結果を基に泡盛醸造中の 4VG 生成における AIPAD の寄与率を算出すると約 9 割であることがわかった。最後に 4VG 生成過程に関連する酵素について調べた結果、Xln および FAE は製麹初期の活性が最も高く、AIPAD は製麹後期に高かった。製麹中に発現・蓄積された Xln および FAE によって、FAO および FA の一部は製麹中に、多くはもろみ中で生成されたことが分かった。4VG は麹中ではほとんど生成されず、多くはもろみ中で生成されていた。製麹 30 時間の麹で仕込んだもろみ中では、遊離 FA が十分あるにも関わらず、4VG がほとんど生成されなかった。このことから、もろみ中では FA の有無に関わらず AIPAD の発現は誘導されず、製麹中に既に発現・蓄積されていた AIPAD によって、もろみ中の FA が 4VG に変換されることが示唆された。これらのことから、4VG 生成に関わる酵素は麹中でつくられ、各酵素の生成物はもろみ発酵中につくられることが分かった。

# 新潟清酒酵母の育種・改良とその実用化

栗林 喬

(新潟県醸造試験場)

新潟県は清酒の銘醸地として全国的に知られており、現在、県内には 89 の清酒製造場が立地している。酒処である本県には、全国でも唯一、清酒を専門とする地方公設試（地方自治体が設立した公設試験研究機関の略称）である「新潟県醸造試験場」が 1930 年（昭和 5 年）に創立され、以来、原料米や醸造用微生物など、様々な技術開発を通じて地域の清酒産業を支え続けてきた。

清酒製造において、清酒の品質を左右する重要な微生物は、清酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* である。現在、主に使用されている清酒酵母として、公益財団法人日本醸造協会から供給されている“きょうかい酵母”が一般的である。一方、地域の独自イノベーションを支える拠点としての地方公設試を中心に、地域単位における個性的な清酒酵母の開発にも注目が集まっている。特に、酒類の多様化や市場環境の変化に伴い、製造現場に密着した製品開発が求められる中で、地方公設試の重要性が増している。本県においても「新潟県醸造試験場」が中心となって、当試験場が保有する新潟清酒酵母（G9・G8・G74 など）を育種し、現場のニーズに対応した清酒酵母の開発を進めている。

近年、様々な地域で開発されているセルレニン耐性を有するカプロン酸エチル高生産性酵母は、清酒の品質を決定する“吟醸香”であるカプロン酸エチルの生成能が増大し、香りの高い高級感のある吟醸酒の生産が可能となる。本県においても、G9・G8 酵母を親株として、カプロン酸エチル高生産性酵母 S9・S8 株の開発に至った。これら酵母の開発にあたり、本県では、セルレニン培地よりカプロン酸エチル高生産性酵母の単離を目的としたハイスループットスクリーニング系を構築し、効率的に変異株を分離する技術を確立した [1]。さらに、本スクリーニング系を用いて分離された酵母の中から、パイナップル様香を有する吟醸香である“カプリル酸エチル”のみを高生産する変異株の単離に成功した。この変異株は、酵母の脂肪酸合成酵素（FAS2）の 1279 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンがチロシンに置換することにより、基質としてのカプリル酸の生成能が向上し、同時にカプリル酸エチル生産性も増大する [2]。また、酵母における吟醸香生成能の制御技術として、清酒酵母染色体の不分離に着目した育種法を確立し、香気生産性を飛躍的に向上させた新規酵母についても、現在開発を行っている [3]。

[1] 栗林喬ら：特許第 5963123 号（新潟県）。

[2] Kuribayashi, T. *et al.*: *Food Sci. Technol. Res.*, **28**, 217–224 (2022).

[3] 田中純平ら：伝統食品の研究, **50**, 55–60 (2023).

# 細胞形態変化から微生物の新たな性質を知る

加藤節

(広島大学 大学院統合生命科学研究科)

細胞の形態は、私たちの想像する以上に様々な情報を含んでいる。例えば、細菌細胞では増殖速度とその細胞サイズが相関することが知られており (Schaechter *et al.*, *J Gen Microbiol*, 1958)、細胞サイズを把握することはその細胞が置かれている環境条件の推測に役立つ。私たちの研究グループは微生物細胞の死に方、死に至る過程に興味を持ち研究を行っている。研究を行う中で、細胞の形態変化を追っていくことで新たな現象、微生物の性質を見つけることに成功した。本発表では出芽酵母と大腸菌を用いた異なる研究成果についてそれぞれ紹介したい。

出芽酵母は寿命研究に良く使われるモデル微生物であり、その寿命は分裂回数によって計測する複製寿命と回分培養での死菌率によって計測する経時寿命がある。私たちは栄養飢餓がどのようにして細胞死を引き起こすのかに興味を持っており、回分培養中の出芽酵母の形態について解析を行った。その結果、出芽酵母は回分培養時に、時間経過に伴いその細胞サイズ分布が小さくなる傾向にあることが明らかになった。このサイズ分布変化が何によるものかを知るためにタイムラプス観察を行ったところ、細胞は Propidium iodide 染色で定義される死のタイミングにおよそ 25% ほどその細胞サイズを小さくする様子が観察された (Kato *et al.*, *mBio*, 2021)。なぜ絶対量ではなく相対的なサイズ変化が起こるのかは不明であるが、この研究成果について未発表データも含めて議論したい。

大腸菌はその増殖速度の速さ、遺伝子組換えの容易さからモノづくりのホストとして良く使用される。一方で、大腸菌だけでなく微生物を用いたモノづくりには多くの課題があり、その一つは細胞自身の生産する物質による増殖阻害である。バイオ燃料に代表されるように、化石燃料に依存しないエネルギー物質の発酵生産に期待が高まっているが、エタノールやブタノールといったアルコールは大腸菌に対して高い細胞毒性を示すために発酵生産が難しい。この問題を乗り越えるためには、アルコールがどのような細胞毒性機構によって細胞を死滅させるかを理解し、その対応策を考える必要がある。私たちは 1-ブタノールを細胞に添加したところ、細胞内に不均一な構造体が形成されて細胞が死に至る様子を観察した。この表現型の詳細と細胞毒性との関係性について本発表で紹介したい。

# *Streptococcus thermophilus* SBC8781 株が豆乳中で産生する 菌体外多糖の免疫活性

仲田創

(ポッカサッポロフード & ビバレッジ株式会社 基盤技術研究所)

健康・宗教・環境などの観点から、近年豆乳やアーモンド、オーツなどの植物性ミルクが世界的に普及してきている。たとえば豆乳に含まれるイソフラボンは骨粗しょう症予防や更年期障害の軽減作用が報告されている (1)。また肉や魚、卵、動物性ミルクなどを除いたビーガン食は特に若者たちの間で年々普及してきている (2)。植物性ミルクはグラス 1 杯あたりのミルクを作るのに必要な、CO<sub>2</sub> ガスの排出量、作地面積、水の使用量が動物性ミルクより少なく (3)、環境負荷の少ないミルクとして知られている。このような社会的背景により、植物性ミルクおよびその発酵食品の健康機能は今後ますます重要になってくると考えられる。

一部の乳酸菌はミルク中に含まれる糖から菌体外多糖 (以下、EPS と略す) を産生し、その EPS は細胞やヒトにおいて、NK 活性や抗炎症活性などの免疫活性を示すことが知られている (4)。EPS は様々な糖から成る Repeating Unit が複数つらなった長鎖の多糖に、リン酸基などの修飾基が付与した構造をとっている。植物性ミルクは動物性ミルクとは異なったユニークな糖組成を有していることから、そこから産生される EPS の構造および各免疫活性の強さも異なっている可能性が考えられる。しかしこれまでの研究は、動物性ミルクまたは培地から調製した EPS の免疫活性を評価するものがほとんどであり、EPS の活性や構造に与えるミルクの種類の影響については調べられていなかった。

本発表では、ミルクの種類が *Streptococcus thermophilus* SBC8781 株の産生する EPS の免疫活性の強さに与える影響について報告するとともに、*S. thermophilus* SBC8781 株で発酵させた豆乳のヒトにおける免疫指標への影響についても紹介したい。

1. Potter S. et al., Am. J. Clin. Nutr., 1998, 68(6), 1375–1379
2. Craig W. J. et al., Am. J. Clin. Nutr., 2009, 89(5), 1627–1633
3. Poore J. et al., Science, 2018, 360(6392), 987–992
4. Makino S. et al., Br. J. Nutr., 2010, 104(7), 998–1006

# 酵母とバイオセンサーの融合が拓く分析技術

北口哲也

(東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所)

酵母はパン作りやビールやワインの製造など生活のさまざまな場面で活躍しているだけでなく、モデル生物として細胞周期や細胞内タンパク質輸送、オートファジーなど細胞生理機能のメカニズム解明に重要な役割を果たしてきた。当研究室では酵母そのものをバイオセンサーへと改造、およびバイオセンサー開発のツールとして酵母を利用する研究を行っている。

食品中の毒素やウイルス、細菌は、人間にとって深刻な脅威である。例えば、適切な保存がされていない食品ではカビが繁殖してアフラトキシンという毒素を産生し、肝臓がんのリスクを高める。また生の食品は O157 などの腸管出血性大腸菌によって汚染されていることがあり、摂取すると重篤な症状を引き起こす。これらの毒素や細菌を検出するこれまでの分析法は、高価な装置と熟練した技術者を必要とし、限られた場面でのみしか利用できなかった。そこで、低コストで誰もが簡単に実施できる分析法を確立することを目指し、頑強で乾燥化も可能な酵母を利用することを考えた。抗体の抗原認識部位をもつ受容体と膜型ツーハイブリッドシステムを酵母内で組み合わせ、細胞壁を部分的に取り除くことにより、最終的にレポーターの発光で抗原を検出する“パトロール酵母”を開発することに成功した。このパトロール酵母は、アフラトキシン、O157、カフェインの検出が可能で、さらに抗体を取り換えることで分析物を変更できるため、食品安全に大きく貢献する基盤技術として期待できる。

また、当研究室では抗体を蛍光色素で部位特異的に標識した Q-body と呼ばれる蛍光免疫センサーを開発している。このセンサーは抗原濃度依存的に蛍光強度が増大するため、臨床検査、環境調査、食品分析などへの応用が期待されている。しかしながら、抗体ごとにアミノ酸配列が異なることに由来する性質の違いによって、全ての抗体を蛍光免疫センサーにすることができないというデメリットがあった。そこで酵母の表面提示系と部位特異的標識法を組み合わせることで、蛍光免疫センサーとして機能できる抗体をハイスループットで選抜できる手法を開発した。さらにこの実験系を発展させ、タンパク質言語モデルを用いて一変異効果予測を行い、蛍光免疫センサーの応答を向上させることにも成功している。

このように酵母とバイオセンサーを融合させることで、分析技術を進展させることができおり、本発表ではそれらの成果について議論させていただきたい。