

第7期（2023年度）第2回創発セミナー
第10回酵母コンソーシアム（ハイブリッド開催）
「ビール業界における酵母研究の課題」

千葉大学大学院理学研究院
教授 松浦 彰

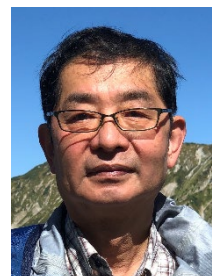
大隅基礎科学創成財団は2023年11月22日午後4時から、「ビール業界における酵母研究の課題」というテーマのもと創発セミナーを開催しました。講演者を含むビール関係企業からの参加者9名と大隅良典理事長ならびに酵母コンソーシアムフェローなど財団関係者10名は東京工業大学すずかけ台キャンパス会議室に集合し、一般参加者はオンライン（Zoom）にて参加するというハイブリッド方式による開催となりました。

冒頭、大隅良典理事長からの挨拶の後、世話人である九州大学竹川薫氏から、酵母コンソーシアムセミナーはこれまで大学と企業の研究者が協力して酵母を含む真核微生物の基礎研究の発展を図ることを目的として開催されており、今回はビール業界の方に発酵現場での課題、問題点に関する話題を提供していただき、研究により蓄積されてきた酵母に関する知見をビール醸造における現象の理解や解決に繋げることを目指して意見交換するという、このセミナーの趣旨に関する説明がありました。続いて、財団理事（酵母コンソーシアム担当）の京都大学阪井康能氏より、酵母コンソーシアムの今後の活動計画に関する報告がありました。その後ビール業界の4人の講演者による講演があり、約100人の登録参加者との間で約2時間半に亘る活発な討論が行われました。以下にその要旨を報告します。

「酵母コンソーシアムの新しい試み」

京都大学大学院農学研究科教授
財団理事 阪井 康能

基礎科学の振興に向けたアカデミアと企業の研究者の連携が以前に比べて希薄になっており、企業の人材育成という点でも交流が重要になっている。酵母コンソーシアムという枠組みの中では、創発セミナーという公開の場で業界や現場では旧知であってもアカデミアは知らない現象や直面している問題を紹介していただき（未知の生命現象のアカデミアへのフィードバック）、そこで明確化された課題を引き続き開催する非公開の懇話会により深掘りしていく。懇話会の参加者は、理事長、運営委員3名、および財団の研究助成を受けた酵母基礎研究者（リサーチフェロー）21名と法人・財団会員に属する民間企業研究者とする。気軽な話題提供と活発な議論のために、懇話会ではアメリカのアカデミア会議であるゴードン会議の運営方式に倣って秘密保持および参加者制限のルールを定める。



懇話会では、民間企業の研究者が特定の課題についてデータに則って発表し、複数のフェローからのコメントを発端として、アカデミアと企業との間で課題解決への取り組みへと繋げていきたい。場合によっては、財団の活動からスピンアウトして個別の共同研究へと発展することもありうる。若手研究者の内地短期留学や機器共同利用の支援、論文作成支援のための枠組みも設ける予定であり、参加企業には若手の育成や研究員の成長の場が提供されるというメリットがある。未知の生理現象に触れることによる知識の広がりや自身の研究の新たな気づきが得られ、新たな交流とネットワーク形成へと繋がるという点で、懇話会はアカデミア研究者にとってもメリットがある。

「ビール業界における酵母研究の課題」

講演 1

「ビール類製造における酵母の栄養源飢餓ストレスと発酵制御」

キリンホールディングス株式会社

善本 裕之

ビール類醸造における発酵工程の主役は酵母であり、酵母の働きがよい（酵母活性が高い）状況ではエステル等の香味バランスが良く、泡持ちが良く、酵母の複数回の再利用が可能となり、美味しいビール類が製造される。一方、酵母の働きが悪い（酵母活性が低い）状況では、糖消費速度が低下し、好ましくない香味成分が生じ、回収酵母量が減少するなど、ビール類は低品質となる。

発泡酒や新ジャンルは、麦芽使用比率が低いか、或いは、麦芽不使用のために、栄養源が不足した状態で発酵させており、酵母は栄養源飢餓ストレスを受けている。不足する糖を補うために液糖が添加され、糖と糖以外の栄養源とのバランスが崩れることで、発酵遅延やオフフレーバーが生じる。これは糖以外の栄養源が欠乏した状況で酵母の死滅率が増大する現象、糖誘導細胞死（SICD）が原因であると考えられる。実際、糖以外の栄養源の割合を段階的に減少させると、生存率がそれに応じて減少し、細胞の直径が減少する様子が観察される。

培地にグルコースのみを含む場合の遺伝子発現を調べると、解糖系の前半は発現するが後半は発現抑制されていること、また細胞周期関連遺伝子が部分的に発現していることが確認された。また、細胞内に解糖系のフルクトース 1,6-ビスリン酸以降の物質が蓄積していることも観察している。SICD は好気・嫌気条件で差はなく、ミトコンドリア DNA が欠損した rho-株でも観察されることから、この現象に酸素およびミトコンドリアは関係しない。また、イソロイシン、ヒスチジン、アルギニンをそれぞれ 1 つずつ添加した場合に糖誘導細胞死が抑制されることが見出されているが、そのメカニズムは不明である。酵母コンソーシアムでは、SICD のメカニズム、不足する栄養源添加以外に SICD を回避する方法に関して議論できれば幸いである。



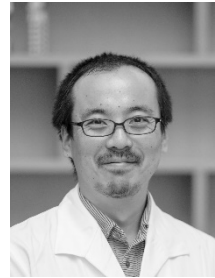
講演 2

「マルトース輸送体の糖選択性からみるビール酵母の適応進化」

サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社

小埜 栄一郎

醸造産業の中心で働く酵母の形質は人為選抜の結果であると考えられる。低温発酵ビール酵母は樹立後わずか 400 年程度であり、その過程で人為選抜されてきた商業形質をもつ酵母は、異数体であり、発酵能、増殖能、浸透圧耐性が高いという形質の他、ニッチ競合が弱く、胞子形成能が低下している。高い糖資化性も家畜化した酵母がもつ特徴の一つである。



ビールの原料である麦汁に多量に含まれているマルトースは専用のトランスポーターを介して取り込まれる。また、そのトランスポーターは異なる糖に対する特異性も獲得している。酵母の糖資化性にはプリファレンスがあり、炭素源としてグルコース（単糖 G1）、マルトース（二糖 G2）、マルトトリオース（三糖 G3）のいずれかを含む培地で実用エール酵母 W-184 株を培養すると、好気条件では同程度の増殖を示すが、嫌気条件では G1、G2、G3 の順で増殖が遅くなる。この原因は、それぞれの糖の取り込みにかかる時間の違いにあり、このことは自然界に分布にする糖の割合に応じて糖の資化性が進化してきたことを示している。また、糖の資化性には順序があり、麦汁中に同時存在するこれらの糖のうち、まず G1 の資化がおき、その後 G2、G3 が取り込まれるようになる。この現象はグルコースリプレッションとして知られている。

マルトース輸送体 (MALT) はプロトンシンポート型のトランスポーターであり、輸送時に流入する水素イオンをその後汲み出すためにエネルギーが必要となる。グルコース輸送体はファシリテーター型であるためその必要がなく、マルトース輸送に比べてエネルギー効率が良い。これが、酵母がグルコースを先に利用するメリットとなっている。MALT は 12 回膜貫通型の細胞膜局在タンパク質であるが、二次構造からは輸送する糖の選択性は予測できない。MALT は転写調節因子 MALR、マルトース加水分解酵素 MALS とともにセットで MAL 遺伝子座にコードされており、この遺伝子座はサブテロメア領域に存在するためコピー数にバリエーションが生じやすい。人がマルトースを多く含む穀物を酵母に資化させてきた歴史を反映して、家畜化された酵母では MAL 遺伝子群のコピー数が増加している一方、麴菌との複発酵によりマルトース資化性への選択圧がかからなかった清酒酵母では MAL 遺伝子に変異が見られる。

W-184 株から輸送活性を指標に 2 種の MALT 遺伝子をクローニングし、#2 は G3 特異的、#5 は G2 と G3 を共に輸送できることを見出した。構造モデルから糖選択性に関わるアミノ酸残基を特定し変異導入を行ったところ、ヘリックス 7 の 2 アミノ酸の置換で G3 型から G2 型へ変換され、このような輸送活性の変化は他のさまざまな置換によっても生じた。逆に、一方、G2 型から G3 型への変換体は数個のアミノ酸置換によっては得られず、この活性の獲得には多重アミノ酸置換が必要だと考えられる。一方、G2 と G3 型を共に輸送できる G2/G3 型から G3 型への変換は、ヘリックス 11 の複数個のアミノ酸置換により達成された。興味深いことに、G2/G3 型の輸送体

を持つ状態から、G2 のみもしくは G3 のみを輸送できるよう輸送体を改変し特異性を高めると、酵母の増殖性が向上した。このことは、複数の糖を輸送する bifunctional な糖選択性は輸送活性とトレードオフの関係にあることを示しており、家畜化の過程では MALT のコピー数を高めて機能を特化させる方向の進化が起きたと考えられる。また、G3 型から G2 型への変化は機能の喪失であるため容易におこるが、その一方で G2 型から G3 型への機能進化は生じにくく、機能獲得過程では遺伝子間組換えや遺伝子水平伝播が起きたことが示されている。

最後に小埜氏から、現在行なっている、酵母がたどってきた糖資化性の適応進化を実験的に再現する研究に関する話題提供があった。麦汁を模した培地での増殖を繰り返す実験を行うと、グルコース存在下での G2, G3 資化性が向上した状態を経て、グルコース非存在下で G2, G3 が資化できる形質を獲得していくという、興味深い現象が観察されている。

講演 3

「ビール製造における酵母の醸造特性の変化」

アサヒクオリティアンドイノベーションズ株式会社

高橋 朋子

下面発酵酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、ビール醸造で使用されている主要な酵母の一種であり、発酵終了後に凝集して沈降する性質を有する。この酵母は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* の交雑で生まれた異質倍数性四倍体由来し、醸造環境下で染色体再編成や異数性が生じて現在の複雑なゲノム構造へと変化し、異質倍数性・異数性故に染色体変化を生じやすいと言われている。下面発酵酵母を用いるビール醸造では、沈降した酵母はタンク底から回収されて再利用され、この使用法は環境にやさしく低コストで製造効率がよく、高い品質を維持できるというメリットがある。一方、デメリットとしては他の微生物が混入するリスクがあること、また醸造特性の好ましくない方向への変化、例えば糖消費の遅延、オフフレーバーの生成、凝集性の悪化の可能性がある。微生物リスクに対しては、徹底的な QC により対策しているが、ビール醸造における安定的な品質管理のためには、このような醸造特性変化に対する取り組みが必要である。



発酵スケールまで酵母を培養するには時間を要する一方で、酵母特性の変化は実際に発酵してみなければわからず、これまで醸造特性の変化が見られた場合には製造現場のノウハウによって対処してきた。そこで、醸造特性の変化が生じる酵母の早期検出技術を開発することを目的に、工場から繰り返し使用中の酵母を収集して遺伝子発現、ゲノム変化、代謝物などの網羅的な解析を実施し、醸造特性の変化が生じる酵母の指標を探索した。全ゲノム解析レベルでは、繰り返し使用後も明らかな変化をもつ酵母は稀であり、ごく一部の酵母でのみコピー数変化が観察された。複数のサンプルにおいて、*S. cerevisiae* 由来 III 番染色体左腕のコピー数減少、VIII 番染色体右腕および VX 番染色体右腕のコピー数増加という、共通の変化が検出された。そのうち、ScIII 番染色

体コピー数減少領域は共通であり、その境界には MAT 遺伝子座が存在した。この染色体変化をもつ酵母は早期凝集する性質を有しており、早期凝集は発酵遅延による醸造効率の低下、残糖やオフフレーバーの増加による品質の低下の原因となりうるため、対策が必要となる。実際に工場の発酵データから早期凝集が起きていることを示す酵母を探索、収集したところ、いずれも ScIII のコピー数が減少していた。このことは ScIII のコピー数減少が繰り返し使用による早期凝集の指標となる可能性を示唆している。工場から早期凝集性をもつものとして収集された酵母はラボスケールでも早期に凝集し、発酵酵母の酵母密度が通常よりも低くなった。

早期凝集酵母に特徴的な性状として、通常酵母よりも高い増殖能と、通常は阻害されるマルトース存在下での凝集が挙げられる。酵母集団から単一細胞由来株を複数取得して解析すると、集団中には異なる増殖能を持つ株が混在し、早期凝集酵母集団には増殖性の高い株が通常よりも高頻度に含まれていた。各株のもつ増殖能と凝集性は相関しており、両者が高い細胞株は ScIII のコピー数が低くなっているグループであった。早期凝集性を示す集団では、一部の酵母でこのコピー数変化が起こっていると考えられる。ScIII 欠損単一細胞由来株を使って発酵試験を実施すると、実際に酵母は早期に凝集して醸造が遅延した。これらの成果に基づき、ScIII 番染色体量変化が早期凝集酵母と通常酵母を識別する指標として活用できるという内容の特許が認められている。科学的には、ScIII のコピー数減少が早期凝集をもたらすメカニズムが未だ不明である。また、ScIII の特定の領域が欠落する原因や、コピー数減少が起きる条件はわかっていない。酵母コンソーシアムではこれらの点を議論していただけると幸いである。

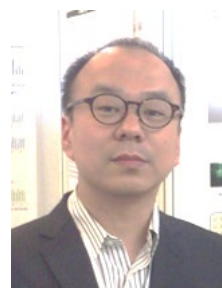
講演 4

「ハーブや果汁など様々な原料を用いた「新しいビール醸造」と酵母研究の役割」

サッポロビール株式会社

谷川 篤史

1516 年に公布されたビール純粋令があるドイツでは、現在もビールの原料は麦芽、ホップ、水のみという原則が概ね守られており、一方ベルギーでは原料にコリアンダーシードやオレンジピールなどを使ったビールが作られているなど、国によってビールの定義は異なる。日本では、2018 年の酒税法改正前はビールは麦芽、ホップ、水、その他政令で定める物品を原料として発酵させたものとして定義されており（一部例外を除く）、原料中の麦芽の重量が原料の 2/3 以上と決められていた。2018 年の酒税法改正施行は、麦芽の使用量は 50% 以上となり、加えて果実、香りまたは味を付けるための香辛料、ハーブなどの使用が認められるようになった。この改正の背景にはクラフトビールブームがある。



クラフトビールブームは従来のピルスナー、ラガータイプだけではなく様々な特徴のビールを生み出そうとするムーブメントから生まれた 1990 年代から世界的なクラフトビールブームがあり、日本でも 2000 年代から盛んになった。IPA というビアスタイルは 18 世紀末にイギリスからイン

ドにビールを輸送する際に劣化を防ぐためにホップを多量に使用して作られたビールに由来しているが、ホップの苦味と柑橘系の香りが特徴であるアメリカンスタイル IPA がブームを牽引している。ビール原料のホップは、殺菌作用の他、ビールの清浄化、泡の形成、苦味などが役割の中心であったが、クラフトビールブーム以降ホップが生み出す香りが注目されている。これは、ブームと同時期にさまざまなフレーバーのホップが登場したことと関係がある。フレーバーホップの香り成分は、チオール類やテルペン化合物が主体であり、ホップに含まれる成分とホップの成分が酵母によって変換された成分の組み合わせによって作られる。例えばレモングラスを用いたビール醸造におけるテルペン化合物の変化を調べてみると、レモンの香りの主成分である化合物（ゲラニアルなど）からライムの香りの化合物（シトロネロール）への変化が起きる。また、ミントを材料とすると、酵母による発酵におけるエステル化反応により通常はみられない酢酸メンチルが生じて、特徴的な香りとなる。

ダイアセチル（DA）は酵母や乳酸菌より生成される香りであり、ビールでは代表的なオフフレーバーである。DA はピルビン酸からバリンへの合成過程に作られる 2-アセト乳酸が細胞外に放出され、そこで非酵素的な酸化反応を受けて生じる。DA はその後酵母に取り込まれて還元され、匂いがしない物質へと変換される。ビール醸造過程には発酵後に DA の還元が主目的の熟成期間があり、この過程にはユーティリティーなどのコストがかかっている。

DA は赤ワインに多く白ワインには少ないが、赤ワインで DA が高い理由は乳酸菌発酵の影響であると考えられていた。麦汁に黒ブドウ果汁を添加してビールを醸造すると、DA の量が増加する。ワイン醸造では、乳酸菌を添加する前に DA の増加が観察されることから、黒ブドウ果汁を用いた際に DA が多くなる要因は酵母による発酵にあると考えられる。

黒ブドウ果汁を分画したものを白ブドウ果汁に加え、DA 生産量を増加させる成分を調べたところ、アントシアニンの一種が見出された。実際、試薬として入手できる 4 種類のアントシアニンを原料に添加すると、DA 含有量が有意に高くなる。アントシアニンを含むことが知られている黒米、ハイビスカスを原料に添加して行なったビール醸造でも DA 量は増加した。アントシアニン存在下での酵母の遺伝子発現変化を調べたところ、DA の還元を行う BDH1 遺伝子の発現がアントシアニンにより抑制されていることが示された。

ビール醸造が目指すのは、様々な原料からオフフレーバーを生じることなく原料の特徴を活かすような商品を作ることである。アントシアニンは酵母が生育している自然環境に多く存在しているため、アントシアニンに対する酵母の応答の生理的意義や、BDH1 の役割にも興味がある。また、分子量の大きなアントシアニンを含むバタフライピーを添加したビールでは DA が増えないことも不思議である。

酵母コンソーシアムの新しい試みに沿った創発セミナーにふさわしく、講演後の総合討論ではリサーチフェローのそれぞれの専門の立場からの質問やコメントがあり、活発な議論が交わされました。このセミナーを出発点として、アカデミアと企業との連携がさらに深まることを予感させる、有意義な会となりました。