



Title	多階層の解析技術を用いた清酒酵母の高発酵性メカニズムの株間比較
Author(s)	森, 光太郎
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105507
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

多階層の解析技術を用いた
清酒酵母の高発酵性メカニズムの株間比較

提出先 大阪大学情報科学研究科

提出年月 2025 年 12 月

森 光太郎

内容梗概

代謝とは、生体内で起こる一連の化学反応で、高分子の段階的な分解過程でエネルギーを取り出したり、得られたエネルギーから細胞構成成分などを合成する生命活動を指す。生物がエネルギーの獲得や物質生産を効率的に行うためには、代謝を柔軟かつ迅速に制御することが重要である。生物の体内で行われる代謝は無数の化学反応によって構成され、個々の反応が複雑に制御される。複雑に制御される生物の代謝理解には情報科学的な解析が有効である。

生物の代謝は複数の階層を跨いだ多層的な制御システムと解釈することができる。生物の代謝の階層を大きく分けると、DNA・RNA・タンパク質・代謝物の4つの階層に分割することができる。各階層の活性制御は基本的にはその上位の階層によって行われる。すなわち、DNAの配列によってRNA量が、RNA量によってタンパク質量が、タンパク質量によって代謝物の量が制御される。各階層はそれぞれ異なる情報を有し、異なる計測技術によって測定が行われる。また、代謝物によるタンパク質の活性制御やタンパク質によるRNAの制御など、生成物による上位階層の制御も存在する。従って、代謝の理解には層を超えた制御をも解析対象に含める必要がある。

本研究では清酒製造に利用される清酒酵母の高い発酵性に着目し、その代謝理解に努める。清酒酵母とは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の株のうち清酒醸造に利用される酵母のことを指す。清酒は米・米麹・水・酵母を混ぜあわせた醪を数日間発酵させ、発酵終了後に醪を圧搾することで製造される。製造の過程で酵母が米に由来するグルコースを解糖系と呼ばれる代謝経路を介してエタノールへと変換する。清酒製造に使用する酵母株の発酵性は原料利用率の観点から重要である。清酒酵母は系統樹上で Modern 型と Classical 型の2つのグループに分類される。清酒酵母の先行研究は Modern 型清酒酵母を対象とした研究が大半で、Classical 型清酒酵母についての研究は存在しない。Classical 型清酒酵母や野生酵母などの Modern 型清酒酵母とは異なる酵母株の利用が近年注目されており、これらの発酵性理解または発酵性向上のための手法開発が求められている。

清酒酵母の高い発酵性の理解には①細胞壁合成の異常をもたらすシグナル伝達の異常の原因と、②高い解糖系フラックスの二点を解明する必要がある。前者については、Modern 型清酒酵母の研究を通してこれまでに報告が多数存在する。対して、後者については Modern 型清酒酵母でもこれまで実施されたことがない。また、Classical 型清酒酵母についてはこれら両方の知見が存在しない。本研究では、オミクス解析などの情報解析手法を駆使して、多階層に跨って解析することで清酒酵母の高発酵性に資する代謝制御の解明に取り組む。第2章で Classical 型清酒酵母 Km67 株の高い発酵性に資するシグナル伝達経路を

Modern 型清酒酵母 K701 株と実験室株 X2180 株と比較することで明らかにする。第 3 章では K701 株と Km67 株における高い解糖系フラックスの原因となる反応をメタボローム解析によって同定する。

第 2 章では K701 株で知られる細胞壁強度が低下するシグナル伝達の異常が Km67 株でも同様に起こっているかの検討を行った。まず、全ゲノム解析を実施することで Km67 株と K701 株の遺伝的系統関係を明らかにした。表現型解析と RNAseq 解析によって、Km67 株が K701 株と同様に休眠期に入りにくいことを明らかにした。そのメカニズムは K701 株と Km67 株では非常に類似していた。すなわち、Msn2p の活性低下が細胞壁合成に関連する遺伝子 *UGPI* の発現低下を招いていることが二株で共通していることが分かった。一方で、Msn2p の活性を制御する P2A^{B556} の破壊に対する表現型が二株で異なり、Km67 株は K701 株が保有しない未同定因子を介して Msn2p の活性を低下させていることが分かった。

第 3 章では、解糖系を構成する 13 個の反応のうち、清酒酵母の高い解糖系フラックスに寄与する反応の同定に取り組んだ。解糖系の解析にはメタボローム解析が有効であるが、清酒醪から酵母を分離しメタボローム解析することは困難である。そこで、メタボローム解析を実施可能で清酒醪を模倣した疑似清酒培地を作成することで、清酒醸造環境における酵母のメタボローム解析を実施可能とした。疑似清酒培地で実施したメタボローム解析の結果から、解糖系の反応のうち GLK, PFK, PYK 反応が清酒酵母では共通して活性化していることが分かった。PYK 反応は代謝物によるアロステリック制御を受けること、GLK, PFK 反応はリン酸化による活性制御を受ける可能性が示唆された。

第 2 章と第 3 章で清酒酵母におけるシグナル伝達の異常と解糖系の活性化メカニズムを明らかにした。本研究は Modern 型清酒酵母と Classical 型清酒酵母高発酵性メカニズムの共通点と相違点を明らかにした。得られた知見は、発酵性向上のための育種法開発に応用できると考えられる。Modern 型清酒酵母とは代謝が大きく異なる野生酵母や Classical 型清酒酵母は、香りや味わいに多様性があり新しいタイプの清酒製造への応用が期待される反面、発酵性が低いことが問題となる。本研究で得られた DNA から代謝物の階層に至って得られた高発酵性のメカニズムは菌株育種の着眼点となり、様々な育種方法の開発に期待される。

学位取得に関わる業績

1. 査読論文

Kotaro Mori, Seike T, Akao T, Takao Y, Yamada T, Takahashi T, Okahashi N, Matsuda F. “Locus heterogeneity in the mechanism underlying the superior fermentation performances of phylogenetically distant sake yeasts.” J. Biosci. Bioeng., Volume 140, Issue 5, 2025, Pages 306-313 (博士論文第 2 章)

Kotaro Mori, Seike T, Okahashi N, Takahashi T, Matsuda F, “Comparative metabolome analysis of sake yeast with enhanced fermentation performance in sake fermentation conditions“, J. Biosci. Bioeng., Volume 140, Issue 1, 2025, Pages 28-35 (博士論文第 3 章)

2. 国際学会

Kotaro Mori, Seike T, Okahashi N, Takahashi T, Matsuda F, “Comparative metabolome analysis of budding yeasts under sake fermentation environment.“, Metabolomics 2024, Osaka

目次

1 章 緒言	7
1-1 生物の代謝	7
1-2 生物の代謝の多層的制御	7
1-3 清酒酵母とは	9
1-4 Modern 型および Classical 型清酒酵母.....	10
1-5 清酒酵母の高発酵性に資するシグナル伝達異常	11
1-6 解糖系の多階層に跨る制御	12
1-7 本論文の目的と構成	14
2 章 Km67 株の高発酵性メカニズムの遺伝学的解明.....	16
2-1 緒言	16
2-1-1 第 2 章の位置づけ	16
2-1-2 Modern 型清酒酵母と Classical 型清酒酵母	17
2-1-3 清酒醸造の原理と製造方法	17
2-1-4 発酵性とストレス応答の関係	18
2-1-5 目的	20
2-2 材料・方法	21
2-2-1 系統樹の作成	21
2-2-2 用いた菌株	24
2-2-3 遺伝子操作	24
2-2-3 Rapamycin 感受性テスト	25
2-2-4 清酒小仕込み試験	26
2-2-5 細胞内貯蔵糖量の測定	26
2-2-6 RNAseq	26
2-2-7 RT-qPCR.....	27
2-3 結果	32
2-3-1 Km67 株の全ゲノム解析と細胞周期の調査.....	32

2-3-2 RNAseq 解析	35
2-3-3 Km67 株の Rim15p が伝達するシグナル経路の検証	39
2-3-4 Km67 株の <i>RIM15</i> の発酵抑制機能の調査	41
2-3-5 Km67 株の <i>RIM15</i> 破壊と過剰発現の発酵性への影響	44
2-3-6 Km67 株の Rim15p の下流の経路の調査	45
2-4 結言	49
2-4-1 Km67 株に存在が推定される第三の因子	49
2-4-2 清酒酵母の高発酵性と系統関係	51
2-4-3 Classical 型の清酒酵母と Modern 型の清酒酵母の共通点と相違点	52
3 章 メタボローム解析による清酒酵母の代謝メカニズムの解明	54
3-1-1 第 3 章の位置づけ	54
3-1-2 メタボローム解析とは	55
3-1-3 メタボローム解析における前処理	56
3-1-4 清酒酵母のメタボローム解析	56
3-1-5 清酒醸造条件でのメタボローム解析の難しさ	58
3-1-6 目的	58
3-2 材料・方法	59
3-2-1 疑似清酒培地の作成	59
3-2-2 用いた株と培養条件	59
3-2-3 清酒小仕込み試験	59
3-2-4 細胞数の計測	59
3-2-5 細胞外代謝物濃度の測定	60
3-2-6 メタボローム解析	60
3-2-7 <i>14C</i> 解析	60
3-2-8 多変量解析	60
3-3 結果	61
3-3-1 清酒醪における清酒酵母の発酵特性の特徴付け	61

3-3-2	メタボローム解析に使用可能な培地の選定	62
3-3-3	メタボローム解析による培地間の酵母の代謝の比較	65
3-3-4	メタボローム解析による K701 株の解糖系代謝物濃度の解析	69
3-3-5	Δ1G 解析による K701 株の解糖系の熱力学的解析	70
3-3-6	Classical 型の清酒酵母 Km67 株のメタボローム解析	72
3-3-7	解糖系酵素活性の代謝物制御についての考察	73
3-3-8	解糖系酵素遺伝子の遺伝情報解析	74
3-4	結言	76
3-4-1	疑似清酒培地における代謝変化の考察	76
3-4-2	本研究の課題	77
3-4-3	家畜化が与えるメタボロームへの影響	77
3-4-4	まとめ	78
4 章	結言	80
4-1	本研究のまとめ	80
4-2	本研究の課題	81
4-3	本研究で得られた知見の基礎的および応用的展開	83
	参考文献	85
	謝辞	94

1 章 緒言

1-1 生物の代謝

生物は膜によって外界と隔絶した細胞内空間において、様々な化学反応を行い生命活動を維持する。代謝とは、生体内で起こる一連の化学反応で、高分子の段階的な分解過程でエネルギーを取り出したり、得られたエネルギーから細胞構成成分などを合成する生命活動を指す。生物がエネルギーの獲得や物質生産を効率的に行うためには、代謝を柔軟かつ迅速に制御することが重要である。生物の体内で行われる代謝は無数の化学反応によって構成され、個々の反応が複雑に制御される。複雑に制御される生物の代謝理解には情報科学的な解析が有効である。すなわち、代謝を情報処理とそれを構築するネットワークシステムとして解釈することで、種々の情報解析技術を適用させることができる (Shimizu & Toya, 2021)。情報解析技術の具体例としてはオミクス解析が挙げられる。オミクス解析とは対象の分子種を網羅的に補足し数値化する技術である。オミクス解析で得られたビッグデータから相関や類似性を検出することで、複数の因子を統合的に支配する上位因子の同定が可能となる。例えば、RNAseq 解析で得られた発現変動遺伝子のプロモーター領域から統計的に高頻度で出現する転写因子結合サイトを同定する Enrichment 解析は上位因子の同定に有用であると考えられる。この手法を用いることで、RNAseq 解析を実施した時点で活性が高い転写因子を同定することができ、階層を超えた制御を明らかにすることができる。代謝を理解することは代謝の人為的な改変へとつながり、バイオモノづくりなどの産業分野へ活用することができる (Imada et al., 2023; Ishii et al., 2007; Nugroho et al., 2015)。

1-2 生物の代謝の多層的制御

生物の代謝は複数の階層を跨いだ多層的な制御システムと解釈することができる。生物の代謝の階層を大きく分けると、DNA・RNA・タンパク質・代謝物の 4 つの階層に分割することができる。各階層の活性制御は基本的にはその上位の階層によって行われる。すなわち、DNA の配列によって RNA 量が、RNA 量によってタンパク質量が、タンパク質量によって代謝物の量が制御される。各階層はそれぞれ異なる情報を有し、異なる計測技術によって測定が行われる (Fig. 1-2-1)。

DNA の階層にはタンパク質の活性を左右する遺伝子の配列情報や、タンパク質の発現量を規定するプロモーター領域の活性についての情報が含まれる。DNA 配列に人為的な操作を加えることでタンパク質の活性や発現量を変化させることができる。このことから、人為的に代謝のデザインを行う際には DNA へ

の変異導入が行われる。次世代シーケンサーを用いることで、対象とする生物の塩基配列を決定することができる (Fig. 1-2-1 DNA の階層)。

RNA は DNA を鋳型にして合成される。合成された RNA はタンパク質合成の材料となる。RNA の階層にはタンパク質の発現量についての間接的な情報が含まれる。細胞が環境変化に応答する際、代謝を変化させるに先立って、遺伝子発現量を変化させる。そのため細胞内の RNA の組成は、その時点で細胞が感知しているストレスや環境変化へ細胞がどのように応答しているかを反映する。細胞内の RNA の組成を調べることで、分析時点で細胞が受けた摂動の種類やどのように代謝を調整しようとしているか、その後の細胞の代謝状態がどのように変化していくかを間接的に推定することができる。次世代シーケンサーを用いることで、分析時点で細胞内に含まれる RNA の組成や量についての定量的なデータを取得することができる (Fig. 1-2-1 RNA の階層)。

タンパク質の階層には、分析時点での細胞構成成分の活性についての情報が含まれる。タンパク質の一つである酵素は化学反応を触媒する働きを有し、酵素の細胞内における活性は化学反応の速度を決定する。従って、細胞内の酵素の活性を調べることで、注目している化学反応の速度についての間接的な示唆を得ることができる (Fig. 1-2-1 タンパク質の階層)。

代謝物の階層には、分析時点での細胞の代謝状態についての情報が含まれる。生物の細胞内では、代謝物は酵素の触媒作用により、様々な中間代謝物を経ながら最終産物へと変換される。経路全体の中間代謝物の存在量を測定することで、注目している代謝経路の活性や反応の滞りなどを調べることができる。質量分析装置や核磁気共鳴を用いることで、細胞内代謝物を網羅的に定量することができる (Fig. 1-2-1 代謝物の階層)。

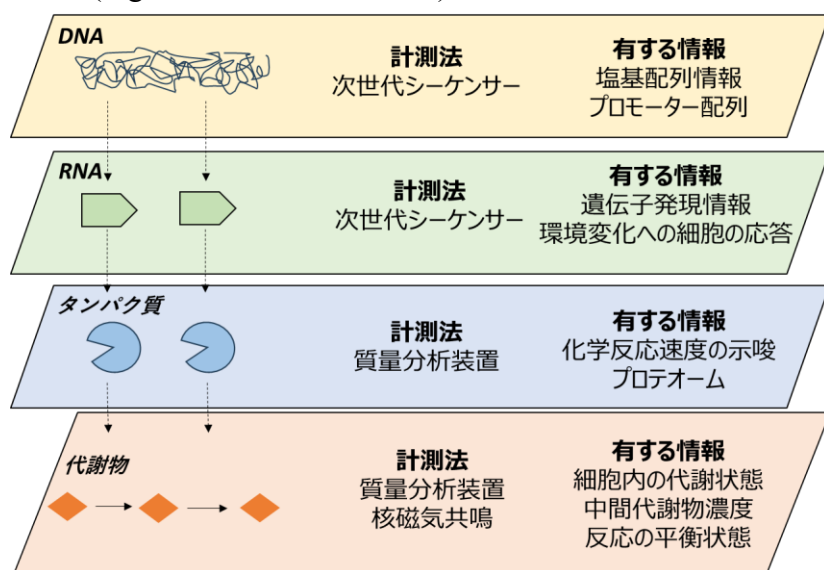


Figure 1-2-1. DNA・RNA・タンパク質・代謝物の階層が保有する情報とその計

測方法

このように、代謝は上位の層が下位の層を制御する階層構造によって制御される。一方、代謝の制御には上述した 4 つの階層を逆行するような制御が存在する。例えば、タンパク質である転写因子は遺伝子のプロモーター領域に結合することで、RNA の発現量を規定する (Fig. 1-2-2)。他にも、代謝物が酵素の活性を阻害するアロステリック阻害といった現象も報告されている (Fig. 1-2-2)。従って、生物の代謝を理解するためには、階層を超えた制御をも解析対象に含める必要がある。

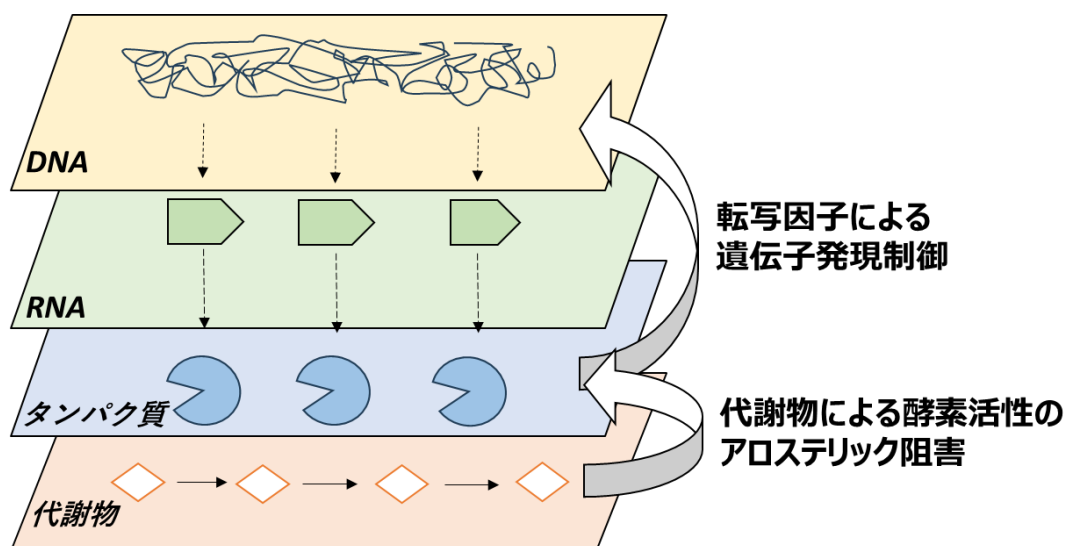


Figure 1-2-2. 代謝の多層的制御

1-3 清酒酵母とは

本研究では清酒製造に利用される清酒酵母の高い発酵性に着目し、その代謝理解に努める。清酒酵母とは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の株のうち清酒醸造に利用される酵母のことを指す。清酒は米・米麴・水・酵母を混ぜあわせた醪を数日間発酵させ、発酵終了後に醪を圧搾することで製造される。清酒に含まれるエタノールは、米のでんぷんに由来するグルコースが酵母によって変換されることで生成する。この過程はエタノール発酵と呼ばれる。

清酒製造に使用する酵母株の発酵性は原料利用率の観点から重要である。酵母が発酵を完了させた時点での清酒醪のアルコール度数は最大 21.9%に達する。一般的な清酒は加水によってアルコール度数を 14~15%程度に薄めて出荷される。従って、発酵が完了した時点の最終的なアルコール度数が高いほど、製品にできる清酒の量は増える。

アルコール度数が高い清酒を製造するためには発酵性が高い酵母株を利用することが重要である。清酒酵母は発酵性が高いことが知られ、最も盛んに研究が行われている K701 株は、発酵が迅速で清酒醪のアルコール度数が 20%を超えても発酵を停止させない。一方、出芽酵母の研究でモデル株として利用される実験室株 X2180 株は清酒醪での発酵が非常に緩慢で、発酵を長く続けてもアルコール度数 15%程度で発酵が停止する。近年、多様な酒質の清酒が求められ、異なる遺伝的系統の酵母菌株を清酒醸造に用いる試みが注目される。例えば花から分離した「花酵母」は長年利用されてきた清酒酵母とは異なる香りや味わいが期待され、近年利用されるケースが増えてきた。「花酵母」の利用にあたっては発酵性の低さが問題となることがある。これら新規酵母の活用には発酵性の向上などの育種プロセスを要する場合が多い。K701 株に限られた清酒醪における発酵性の理解を、他の菌株へと拡張することができれば、発酵性向上のための新たなスクリーニング方法の開発につながると期待される。

1-4 Modern 型および Classical 型清酒酵母

清酒酵母のうち特に優れた醸造特性を有する菌株は「きょうかい酵母 (以下、協会酵母)」と名付けられ、醸造協会によって管理され、現在に至るまで広く使用されている。清酒酵母は系統樹上で Modern 型と Classical 型の 2 つのグループに分類される (Azumi & Goto-Yamamoto, 2001; Ohya & Kashima, 2019; Watanabe et al., 2012)。

Modern 型に分類される代表的な清酒酵母は協会 6, 7, 9 号およびそれ以降の酵母である。協会 6 号酵母は 1930 年に秋田県の『新政』で、協会 7 号酵母は 1946 年に長野県の『真澄』で単離された清酒酵母である。協会 6 号および 7 号酵母の醸造特性は『低温発酵性で (中略)よく糖を食い切ってアルコールを生産する。特に落泡以降の発酵力も強く (中略)香りは 6 号は温和であり 7 号はそれよりややはややかさを示す。』(笠原, 1973)といわれ、吟醸造りに適した低温での発酵性と醪末期での高い発酵力を併せ持つ。

Classical 型に分類される代表的な清酒酵母は協会 1~5 号の清酒酵母である。清酒酵母は 1895 年に矢部らによって清酒醪から初めて単離・同定されて以降、様々な株が単離されている (Ohya & Kashima, 2019)。なかでも、1906 年に兵庫県の『櫻正宗』にて発見された清酒酵母は特筆した醸造特性を有することから、協会 1 号酵母と名付けられ、日本醸造協会によって菌株の管理と全国の酒蔵への頒布が大々的に行われるようになった。その後も全国の酒蔵の清酒醪から優良酵母として清酒酵母は単離され、1936 年までに協会 5 号酵母まで順次単離された (塚原, 1961)。協会 1~5 号酵母は遺伝系統解析から Classical 型の清酒酵母に類型される (Ohya & Kashima, 2019)。近年では、多様な酒質への需要が高まり

Modern 型とは異なる系統の酵母を用いた清酒製造の関心が高まっている。清酒酵母 Km67 株は菊正宗酒造の清酒醪から単離された ATCC32694 株に由来する清酒酵母であり、菊正宗酒造にて現在に至るまで長年使用されている。

1-5 清酒酵母の高発酵性に資するシグナル伝達異常

協会 7 号酵母の泡なし株である K701 株は清酒酵母の研究のモデル株として現在に至るまで多数の研究で利用されてきた (Fig. 1-5-1)。K701 株は清酒酵母では初めて全ゲノム配列が決定された株である (Akao et al., 2011)。これまでの先行研究では遺伝学や生理学的手法を用いた解析によって、K701 株の発酵性が高まる原因となるシグナル伝達異常が報告されている。マイクロアレイをもちいた網羅的発現解析によって、清酒醪における清酒酵母の経時的な遺伝子発現パターンの変動が調べられた (Wu et al., 2006)。種々の生理学的解析によって K701 株は実験室酵母と比べて清酒醪で G₀ 期に入りにくいことが報告された (Urbanczyk et al., 2011)。転写因子 Msn2/4p によるストレス応答関連遺伝子の発現低下および機能低下は細胞壁合成能を低下させ、その結果として清酒酵母は発酵性を向上させることが報告された (Watanabe et al., 2011)。また、K701 株における *RIM15* 遺伝子の機能欠失変異が Msn2/4p の活性低下を招くこと (Watanabe et al., 2012)、*RIM15* 遺伝子の機能欠失変異が細胞壁合成に必須の *UGPI* 遺伝子の発現低下と細胞壁強度の低下を招き、その結果として高発酵性に関わることが示された (Watanabe et al., 2016)。Rim15p は Greatwall family protein であり、高等生物に至るまで保存されるタンパク質である。動物細胞では Greatwall family protein が α -endosulfine (ENSA) と呼ばれる小分子タンパクをリン酸化し、制御サブユニット B55 δ を有する protein phosphatase 2A (PP2A^{B55 δ}) の活性を制御することが知られる (Gharbi-Ayachi et al., 2010; Mochida et al., 2010)。Greatwall-ENSA-PP2A^{B55 δ} 経路は酵母にも存在し、*RIM15* の下流に位置する PP2A^{B55 δ} の恒常的な活性は細胞壁強度の低下を引き起こし、細胞壁強度と発酵力が逆相関することが報告された (Watanabe et al., 2019; Watanabe et al., 2023)。これらの先行研究から清酒酵母の発酵性は細胞壁強度とトレードオフの関係にあり、シグナル伝達の異常によって細胞壁強度が低く保たれることが発酵性が高くなる原因であると考えられている (Fig. 1-5-1)。

清酒酵母 Km67 株は *RIM15* 遺伝子と *MSN4* 遺伝子に機能欠失を有さない点、*PPT1* 遺伝子にトランスポゾンの挿入がみられない点などから、協会 1~5 号酵母と同じ Classical 型のグループに属すると推測されている。Km67 の高発酵性についての研究は少なく、K701 株で報告される知見のうち Msn2p の活性が低下している以外の知見は報告されておらず、細胞壁強度についても知見が存在しない。また、Km67 は *RIM15* 遺伝子への機能欠失変異を持たないにもかかわらず、K701

株と同程度の高い発酵性を示す (Takao et al., 2018)。このことから、Km67 株の高発酵性に資するシグナル伝達の異常は K701 株における異常と異なる可能性が示唆される (Fig. 1-5-1)。Km67 株と同様に Classical 型清酒酵母には機能型 *RIM15* を有する株が存在する。前述の通り、Classical 型清酒酵母は株ごとの特性が大きく異なり、多様な酒質を有する清酒の製造への利用が期待される。Km67 株の高発酵性の理解を深めることで、Classical 型清酒酵母の利活用促進が期待される。

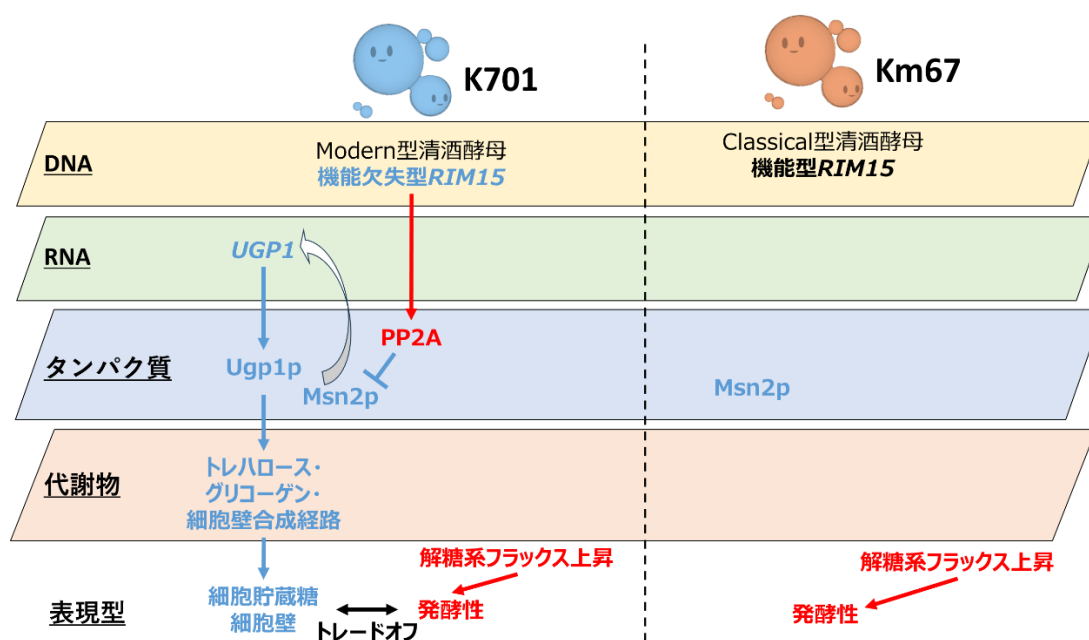


Figure 1-5-1. K701 株と Km67 株の高発酵性に資するシグナル伝達経路について
 先行研究から分かっていること 白の矢印は階層を逆方向に跨いだ制御を示唆する 赤字および青字はそれぞれ X2180 株よりも上昇または低下している制御または反応

1-6 解糖系の多階層に跨る制御

清酒酵母の高い発酵性を理解するためには、1-5 節で述べたシグナル伝達の異常に加えて、解糖系の高い活性の原因を解明する必要がある (Fig. 1-5-1)。清酒酵母におけるシグナル伝達の異常が招く細胞壁強度の低下は間接的に発酵性を低下させるが、解糖系のどの反応に影響を与えることでエタノール生成能を高めているかの知見は存在しない。したがって、清酒酵母の高発酵性を理解するためには、解糖系フラックス上昇がどのようなメカニズムで生じているかを明らかにする必要がある。

解糖系とはグルコースをエタノールへ変換する代謝経路である。解糖系は 13

個の酵素反応で構成され、異性化反応や補酵素を介した酸化還元反応を含む。解糖系の制御は非常に複雑で、多階層に跨って制御されることが知られる (Fig. 1-6-1)。一般に、化学反応の速度は酵素の量と反応基質の量に比例することが知られる (Conn et al., 1988)。細胞内の酵素の合成量は、対応する mRNA の量やタンパク質品質管理機構によるターンオーバーの程度に依存する。反応基質の量は酵素の量や活性によって変化する。また、解糖系の酵素活性は代謝物によるアロステリック阻害を受ける。例えば、ヘキソキナーゼは、トレハロース 6 リン酸によって負に制御を受ける (Hohmann et al., 1996)。トレハロース 6 リン酸の合成を触媒する酵素 Tps1p は栄養や熱などのストレスに応じて RNA レベルで発現量が変わり、活性が変化することが知られる (Winderickx et al., 1996)。ホスホエノールピルビン酸 (PEP) をピルビン酸 (Pyr) へと変換するピルビン酸キナーゼ (PYK) はフルクトース 1,6 ビスリン酸 (FBP) によるフィードフォワード制御を受ける。解糖系はエタノール生産に直接関与する反応であるため、解糖系の制御機構の知見はエタノール生産能の改善に役立つと考えられる。本研究で清酒酵母の清酒醸造環境における解糖系の高いフラックスを解明することができれば、花酵母などの清酒醸造環境で高い発酵性を示さない株の清酒醸造環境における発酵性を高める育種法の開発につながると期待される。

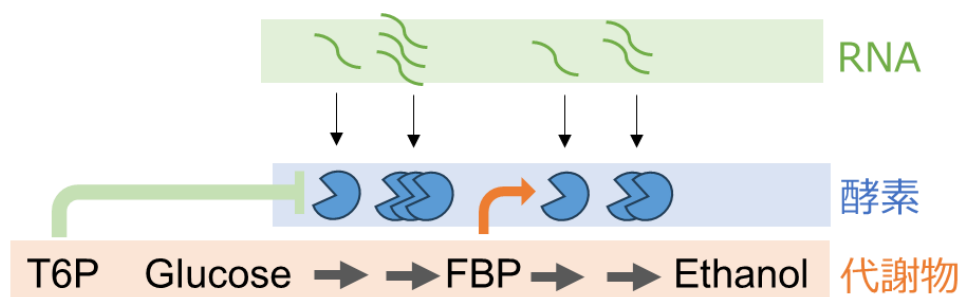


Figure 1-6-1. 解糖系の多層的制御 緑は RNA 階層、青はタンパク質階層、オレンジは代謝物階層を意味する RNA 層とタンパク質層をつなぐ矢印は mRNA の翻訳を意味する オレンジの矢印は促進を意味し、緑の矢印は抑制を意味する 代謝物間の矢印は反応の進行を意味する

清酒醪における清酒酵母の高発酵性についての先行研究は、1-5 節で述べた遺伝学的手法を用いたシグナル伝達に注目した研究に限られていた。その原因は解糖系の代謝を研究することの技術的な難しさに起因すると考えられる。解糖系の代謝を解析するためにはメタボローム解析等の分析技術を用いる必要がある。メタボローム解析を実施するためには、酵母細胞を迅速に回収する必要がある。米と水が混ざり合った清酒醪から酵母細胞を迅速に回収することは困難で

あり、この技術的な難しさのために清酒製造環境での酵母の解糖系の研究がこれまで行われなかった。

1-7 本論文の目的と構成

本論文では、多階層の解析によって清酒酵母の高発酵性メカニズムの解明に取り組む。清酒酵母の高発酵性メカニズムの解明には、細胞壁強度低下を招く多階層に跨る清酒酵母のシグナル伝達の異常を明らかにすることと、多階層に跨って制御される解糖系の高い活性の原因を特定することが必要である。前者については第2章で、後者については第3章で解析に取り組む (Fig. 1-7-1)。

第2章では、Modern型およびClassical型の清酒酵母の代表株としてそれぞれK701株とKm67株を取り上げ、各株のシグナル伝達における異常の類似性と相違点を見つけることを目的とした。これまでの高発酵性に資するシグナル伝達の先行研究は、X2180株を対象区として、K701株のシグナル伝達の異常を報告したものが中心であった (Watanabe et al., 2019; Watanabe et al., 2016)。Km67株含むClassical型清酒酵母の細胞壁強度やシグナル伝達についての知見は存在しない。また、Km67株ではK701株の高発酵性に重要な役割を果たす*RIM15*遺伝子の機能欠失変異が見られない。にもかかわらず、Km67株はK701株と同程度の高い発酵性を示すことが報告されている (Takao et al., 2018)。このことから、両株ではシグナル伝達経路に相違点が存在すると考えられた。第2章ではDNA・RNA・表現型の多階層に着目してKm67株の高発酵性に資するシグナル伝達経路の解析を行った。*RIM15*遺伝子の遺伝子型はK701株とKm67株で異なっていたが、G₀期に入りにくい表現型は類似していた。このことから*RIM15*遺伝子が下流へとシグナルを伝える経路に異常があることが分かった。*RIM15*遺伝子以外の因子が*RIM15*機能欠損と同様の表現型をもたらすことが分かった。

第3章では、多階層に跨って制御される解糖系について、清酒酵母で観察された高いフラックス活性の原因となる反応を同定することを目的とした。解糖系フラックスの研究にはメタボローム解析が有効と考えられるが、技術的な障壁のため清酒醸造における解糖系の代謝を研究した例は存在しない。本研究では清酒醸造環境を模した疑似清酒培地を作成することでメタボローム解析による解糖系の代謝解析を実施可能とした。メタボローム解析と $\Delta\Delta G$ 解析によって代謝物・タンパク質の階層を多階層に渡って解析することで、解糖系を構成する13個の反応から清酒酵母の高い解糖系フラックスの原因となる反応を同定した。

第4章では、各章で得られた高発酵性についての多層的な知見を統合して解釈し、本研究で明らかとなった清酒酵母の高発酵性メカニズムを整理した。多階層に跨って解析したことで明らかとなった高発酵性についての新たな制御の示

唆や今後の課題を述べた。最後に、本研究で得られた高発酵性についての知見に基づき清酒醸造への応用を述べた。

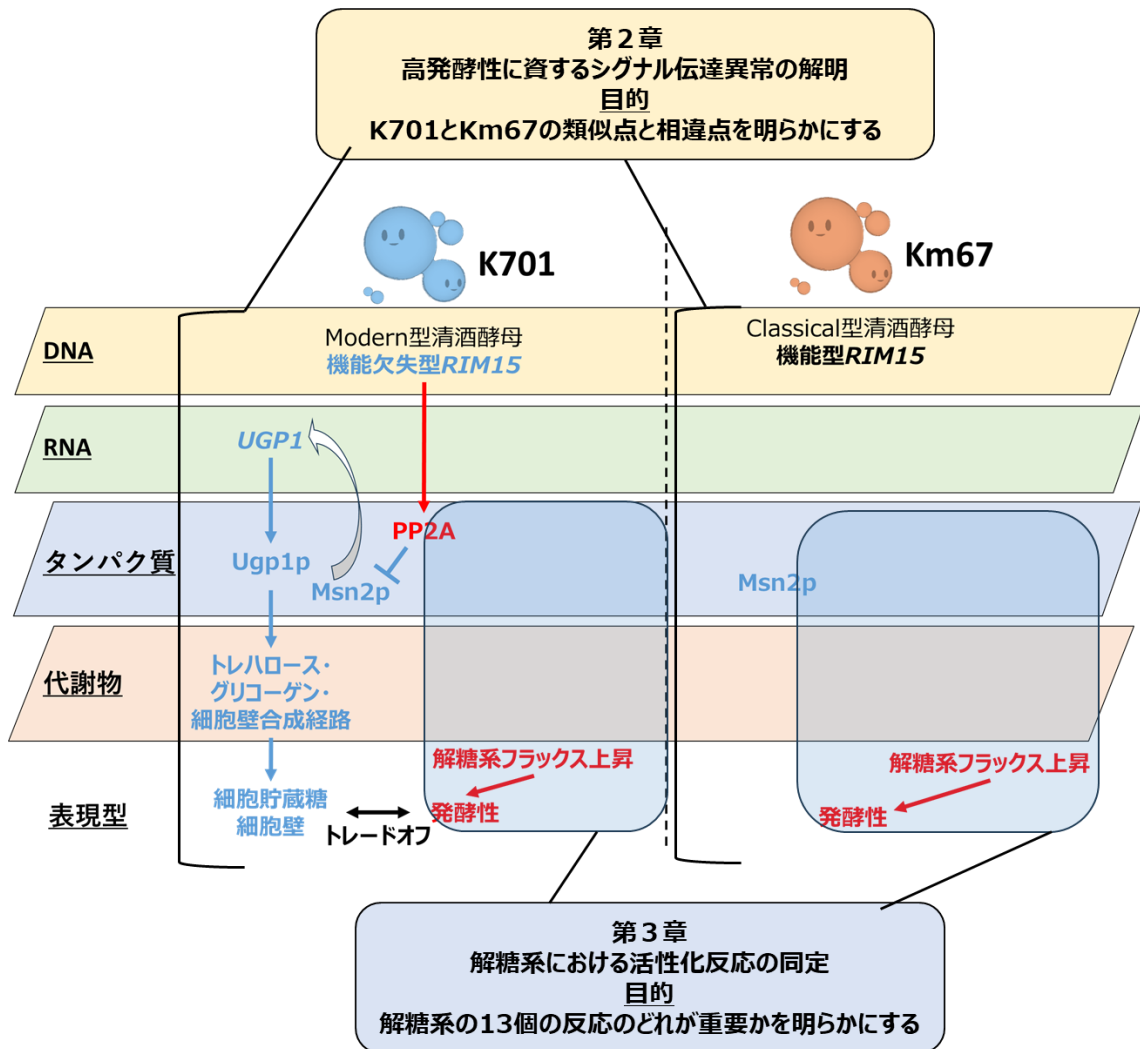


Figure 1-7-1. 本論文の概要 赤字および青字はそれぞれ X2180 株よりも上昇または低下している制御または反応

2 章 Km67 株の高発酵性メカニズムの遺伝学的解明

概要

背景と目的

- K701 株と Km67 株における高発酵性に資するシグナル伝達の異常の類似性と相違点を明らかにする

方法

- ゲノム編集によって DNA に変異を加えた変異株の発酵試験を行った。
- RNAseq によって網羅的な遺伝子発現解析を実施した。
- 清酒醪における酵母の細胞内代謝物を酵素法によって定量し、細胞状態の示唆を得た。

結果

- 全ゲノム解析により K701 株と Km67 株は系統樹上で異なる clade に属することが分かった。
- RNAseq 解析および代謝解析によって Km67 株は K701 株と同様に G₀ 期に入らないことが分かった。
- Rim15p 上流へ遺伝学的な摂動を加えたが Km67 株の発酵能は低下させなかった。一方、Rim15p 下流への摂動は発酵能低下させた。
- Km67 株と K701 株の高発酵性のメカニズムは RIM15 遺伝子とその周辺経路の異常に起因することが分かった。ただし、その原因となる DNA 上の変異は両者で異なる可能性が示唆された。
- CDC55 遺伝子破壊と MSN2 過剰発現による Rim15p 下流への摂動は X2180 株の発酵能を大きく低下させたが、Km67 株への発酵能低下は比較的にながかった。

2-1 緒言

2-1-1 第 2 章の位置づけ

第 1 章でも述べた通り、清酒酵母の高発酵性メカニズムを解明するためには、清酒酵母における高発酵性に資するシグナル伝達の異常を特定することと、解糖系の高い活性の実現に寄与する解糖系の反応を同定することが必要である。第 2 章では前者の清酒酵母におけるシグナル伝達の異常に着目する。先行研究

から K701 株は *RIM15* 遺伝子の機能欠失によってシグナル伝達が正常に行われず、結果として高い発酵性を示すことが報告される (Watanabe et al., 2012; Watanabe et al., 2016)。一方、Km67 株は *RIM15* 遺伝子が機能型であるにもかかわらず、K701 株と同程度の高い発酵性を有する (Takao et al., 2018)。この事実は Km67 株における高発酵性に資するシグナル伝達が、K701 株と相違している可能性を示唆する。そこで第 2 章では先行研究の知見をもとに、K701 株と Km67 株のシグナル伝達の類似点と相違点を明らかにする。そのための方法として、多階層の解析を行う。シグナル伝達は DNA の変異が階層を超えた制御を介して表現型に影響を与える代謝の命令系統であり、それらを調べるためには DNA から表現型まで幅広い階層を対象とした解析が必要である。

2-1-2 Modern 型清酒酵母と Classical 型清酒酵母

清酒はアルコール度数が 20%を超える醸造酒である。清酒醸造には出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が使用され、特に清酒醸造に使用される株は清酒酵母と呼ばれる。ゲノム解析より、清酒酵母は系統的に Modern 型と Classical 型の 2 つの系統に分類されることが知られる (Takao et al., 2018; Watanabe et al., 2012)。Modern 型清酒酵母のうち、高泡形成能をなくした K601、K701、K901 などの株は、現在に至るまで広く清酒醸造に利用されている。Km67 株は菊正宗酒造の酒造タンクから分離された ATCC32694 株に由来し、複数の遺伝子の DNA 配列から Classical 型の酵母に属すると推定されている。先行研究にて Km67 株は K701 株と同程度の優れた発酵性能を示すこと、また Km67 株によって醸造した清酒は固有の味わいを有することが示されている (Takao et al., 2018)。

2-1-3 清酒醸造の原理と製造方法

醸造酒の発酵は「単発酵」「単行複発酵」「並行複発酵」の 3 つの様式に区分される。「単発酵」はワインなどの果実酒の製造方法を指し、原料の果実に含まれるグルコースが原料となりエタノールが生成する。「単行複発酵」はビールの製造方法を指し、麦芽をあらかじめ糖化させて麦汁を生成し、麦汁に含まれる糖を原料としてエタノールが生成する。「並行複発酵」は清酒の製造方法を指し、米に含まれるでんぷんのグルコースへの糖化と、酵母によるエタノール発酵が同時に起こるという性質がある。

清酒の醸造においては糖化と発酵のバランスが重要である。糖化を担う麹の酵素力価が高すぎたり、醪に投与した麹の量が多すぎたりすると、糖化が進みすぎて醪中のグルコース濃度が高まる。高いグルコース濃度は濃糖ストレスや浸透圧ストレスとなって酵母の発酵を阻害する。その結果、最終エタノール濃度が下がってしまうことがある。一方、糖化力が弱すぎた場合、醪のグルコース濃度

が低い状態で維持され、酵母の発酵が非常に早くなる。原料となる米の融解が進まないうちにエタノール発酵が止まり、原料使用率の低下、清酒製造歩合の低下が生じる。糖化と発酵のバランスは糖化力だけでなく、投与する水の量やタイミング、発酵温度、攪拌の有無、酵母の発酵力など多数のパラメータによって変化する。

並行複発酵では最終的なアルコール度を蒸留無しで 20%以上に高めることができる。これは単発酵や単行複発酵では達成が困難な高さである。その理由として、単発酵や単行複発酵では発酵に使用される糖が培養開始時点ですべて供給されることにありと考えられる。単発酵や単行複発酵でアルコール度を 20%とするには培養開始時のグルコース濃度を 40%程度まで高める必要があるが、果汁や麦汁のグルコース濃度をそれほどまで高めることはできない。また 40%という高いグルコース濃度は酵母に濃糖ストレスをあたえ、仮にできたとしても発酵期間が非常に長くなってしまう。並行複発酵においては、低い濃度を保ちながらグルコースが逐次供給されることで、短い発酵期間で高いアルコール度数を実現することができる。

2-1-4 発酵性とストレス応答の関係

清酒酵母の高発酵性についての研究は主に K701 株を対象として実施されてきた。Watanabe らは清酒醪における清酒酵母 K701 株のトランスクリプトーム解析によって、ストレス関連遺伝子の発現が低下していることを見出した (Watanabe et al., 2011)。その原因は転写因子 *MSN4* への変異であることを見出し、人工的に *MSN4* の発現量を高めることで、K701 株の発酵が低下することを示した。同時に、実験室酵母において *MSN4* を破壊すると発酵能が上昇することを示した。これらの結果から酵母の発酵性はストレスに対する応答を弱くすることで高めることができると示された。

Urbanczyk らは、清酒酵母が定常期および清酒醪において G_0 期へと入りにくい形質を示すことを明らかにした (Urbanczyk et al., 2011)。同時に種々のストレスに対して耐性が低いことを示した。さらに、Watanabe らは清酒酵母において *RIM15* 遺伝子に機能欠失変異を有することを見出した (Watanabe et al., 2012)。*RIM15* 遺伝子は G_0 期への導入を誘導するマスターレギュレーターとして知られ、欠損によって G_0 期への導入ができなくなる (Cameroni et al., 2004) (Pedruzzi et al., 2003)。機能型 *RIM15* 遺伝子の導入によって K701 株では G_0 期に入らない表現型がレスキューされることを見出した。また、実験室酵母において *RIM15* 遺伝子を破壊すると清酒醪における発酵性が大幅に高まることを示した。*RIM15* 遺伝子の破壊による発酵能の向上はビールやバイオエタノール生産に使用される酵母においても確認されている (Inai et al., 2013; Oomuro et al., 2016; Watanabe et al.,

2012; Watanabe et al., 2016)。

Watanabe らは *RIM15* の上下流の経路に着目し、清酒酵母の高発酵性の遺伝学による解明に取り組んだ (Watanabe et al., 2019)。K701 株にて Rim15p の活性を負に制御する TORC1 活性が高まっていることを示した (Fig. 2-1-1)。TORC1 活性を恒常的に高めた変異株では発酵が高まることを示し、*RIM15* の上流から連なるシグナルの適切な伝達が発酵を制御していることを明らかにした。また、Watanabe らは Rim15p の下流のシグナルについても調査を行った (Watanabe et al., 2019)。Rim15p は上流のシグナルに応じて、細胞内局在を変化させ、核へ移行することでストレス応答や細胞周期の制御を行う (Plank, 2022)。Rim15p の下流に位置し、間接的に活性を負に制御する PP2A^{B55δ} に着目し、その破壊株についての解析を実施した。PP2A^{B55δ} は Rim15p によって不活化され、その結果、転写因子 Msn2/4p や Gis1p の活性化を通じて、ストレス応答遺伝子の発現誘導を誘導する (Swinnen et al., 2006)。PP2A^{B55δ} の活性を人工的に低下させると K701 株では発酵が大きく低下することを明らかにした (Fig. 2-1-1)。これらの結果から、K701 株においては PP2A^{B55δ} 活性が恒常的に高まることで高い発酵性が保たれることを明らかにした。

Watanabe らは PP2A^{B55δ} 活性低下に伴う発酵低下は Msn2/4p の活性に依存することを明らかにした (Watanabe et al., 2023)。Msn2/4p を破壊すると PP2A^{B55δ} 活性低下による発酵低下がレスキューされることを示した。このとき発酵能と細胞壁強度が負に相関を示すことから、細胞壁強度と発酵能はトレードオフの関係にあることを明らかにした。細胞壁強度低下による発酵能上昇は発酵速度の変化によってもたらされると考えられる。前述の通り、清酒醪では麴による糖化と酵母による発酵が同時に起こる。糖化が先行すると、酵母が濃糖ストレスを受けるためアルコール度数が上がりきらずに発酵が停止してしまう。そのため清酒のアルコール度数を高めるためには、麴の糖化に負けない程度に、酵母の発酵速度が高い必要がある。細胞壁強度の低下は炭素フラックスを解糖系へ向けることで、発酵速度の上昇に寄与し、それらが清酒酵母の高い発酵性に寄与すると考えられる。

これらの知見から *RIM15* 遺伝子及びその経路によって制御される細胞壁強度を始めとするストレス応答が発酵性に深く関連することが示された。K701 株における高発酵性は *RIM15* 遺伝子の機能欠失にともなう PP2A^{B55δ} 活性の恒常的な活性化によるストレス応答の欠如によって説明される (Fig. 2-1-1)。

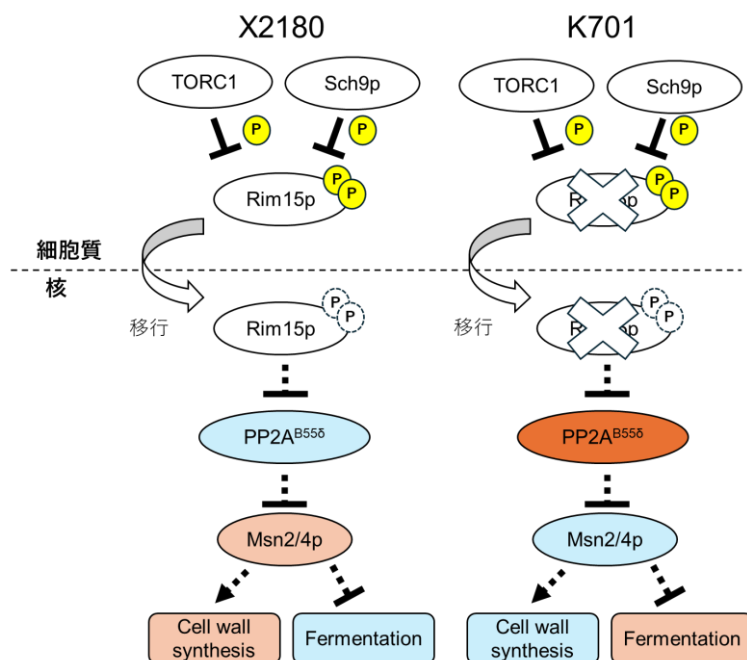


Figure 2-1-1. X2180 株と K701 株の *RIM15* 関連経路の制御 実線は直接的な制御、点線は間接的な制御を意味する 赤および青はそれぞれ活性の上昇および低下を意味する 黄色の P はリン酸化を意味し、透明の P はリン酸化が外れたことを意味する

2-1-5 目的

上述のように Modern 型の清酒酵母である K701 株の高発酵性についての研究は盛んに行われてきたのに対し、Classical 型の清酒酵母の高発酵性についての知見はほとんど存在しない。K701 株における高発酵性は *RIM15* 機能欠失によって生じたシグナル伝達の異常に起因するのに対して、Km67 株を含む一部の Classical 型清酒酵母は機能型 *RIM15* を有している。この事実は Km67 株における高発酵性に資するシグナル伝達が K701 株とは異なる可能性を示唆する。そこで 2 章では Km67 株を Classical 型の酵母の例の一つとして取り上げ、その高発酵性に資するシグナル伝達を K701 株と比較し、類似点と相違点を明らかにすることを目的とする。高発酵性に資するシグナル伝達を調べることは DNA の変異が階層を超えた制御を介して表現型に与える影響を調べることであり、これらを明らかにするためには多階層に渡る解析が必要となる。そのためのアプローチとして、遺伝学を用いた生理学的解析と、DNA や RNA を網羅的に解析する情報科学的解析を用いる。それらを統合的に解釈し、産業上重要な清酒酵母の高発酵性についての理解を Classical 型清酒酵母へと拡張する。

2-2 材料・方法

2-2-1 系統樹の作成

Km67 株の全ゲノム配列は Hiseq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いて 2×100 bp paired-end シーケンスによって取得した。得られたリードは Burrows–Wheeler Aligner (BWA v.0.7.4-r385)を用いた *S. cerevisiae* S288C 株の reference genome (version R64-1-1)にマッピングした (Li & Durbin, 2009)。ヴァリアントコールは GATK (v.3.3-0)によって行った (McKenna et al., 2010)。系統樹作成に用いた VCF ファイルは、Km67 の VCF ファイルを先行研究から得た GVCF ファイル (Peter et al., 2018)に bcftools (Danecek et al., 2021)を用いて結合することで得た。得られた VCF ファイルは R (Version 4.3.2)のパッケージ SNPrelate (Zheng et al., 2012)の snpgdsDiss を用いて個別類似度を計算した。系統樹は Bionj アルゴリズムによって作成し、R パッケージ ggtree (version 3.10.0) (Yu et al., 2017) を用いて可視化した。系統樹の作成には Table 2-1-1 の株を使用した。

Table 2-1-1 系統樹作成に使用した菌株		
ID	Strain Name	Clade
Km67	Km67	Sake
CMK	Sake yeast Kyokai No.5	Sake
CMI	Sake yeast Kyokai No.4	Sake
CMH	Sake yeast Kyokai No.3	Sake
CMG	Sake yeast Kyokai No.2	Mosaic region 3
CMF	Sake yeast Kyokai No.1	Sake
	Sake yeast AA-6Non-forming mutant of	
CME	RIB1011	Sake
CMD	Sake yeastMaihime	Sake
CMC	Sake yeastKikukawa	Sake
CMB	Sake yeast Kyokai No.13	Sake
CLV	Sake yeast Kyokai No.12	Sake
CLT	Sake yeast At-7-1-M7 6-4-C	Sake
CLS	Sake yeast Kyokai No.11	Sake
CLR	Sake yeast Kyokai No.10	Sake
CQR	Sake yeast Kyokai No.901	Sake
CQQ	Sake yeast Kyokai No.9	Sake
BTS	Sake yeast Kyokai No.8	Sake
APF	Sake yeast Kyokai No.701	Sake

APE	Sake yeast Kyokai No.7	Sake
APD	Sake yeast Kyokai No.601	Sake
APC	Sake yeast Kyokai No.6	Sake
CMN	<i>S. cerevisiae</i> yedo NBRC0249	Sake
APA	<i>S. cerevisiae</i> sake NBRC0309	Sake
ANV	<i>S. cerevisiae</i> sake NBRC0308	Sake
ANT	<i>S. cerevisiae</i> sake NBRC0306	Sake
ANS	<i>S. cerevisiae</i> sake NBRC0305	Sake
ANR	<i>S. cerevisiae</i> sake yabe kozai	Sake
AGL	CBS4458	Wine/European
BKI	DBVPG1554	Wine/European
BPB	DBVPG1795	Wine/European
BPT	DBVPG1960	Wine/European
ABM	CBS3093_1b	Alpechin
AHM	CBS3093	Alpechin
AQA	CBS4903	Alpechin
AQD	CBS5378	Alpechin
AFR	CBS7959	Brazilian bioethanol
BVC	RP.10.14	Brazilian bioethanol
AEG	CBS7962	Brazilian bioethanol
AGM	CBS7961	Brazilian bioethanol
BTG	ZP_567	Mediterranean oak
CLC	sample 50	Mediterranean oak
CLB	sample 40	Mediterranean oak
CLD	sample 33	Mediterranean oak
AQM	CBS420	French dairy
BFN	EXF-7145	French dairy
ARS	CBS2421	French dairy
AFL	CBS4456	African beer
AEN	CBS4454	African beer
ASC	CBS4455	African beer
ANL	A-6	African beer
CPI	LCBG-3D6	Mexican agave
CPM	LCBG-3D2	Mexican agave
CPK	LCBG-Mosca3	Mexican agave
CPL	LCBG-4Y3	Mexican agave

CPQ	LCBG-3D4	Mexican agave
CPN	LCBG-3Y3	Mexican agave
CPR	LCBG-3Y8	Mexican agave
BNB	CEY651	French Guiana human
BDR	CEY617	French Guiana human
BMV	CEY649	French Guiana human
BNA	CEY650	French Guiana human
CFC	4.5_WLP530	Ale beer
AGB	CBS6308	Ale beer
ATV	CECT1462	Ale beer
AAC	CBS2165a	Ale beer
CBR	NCYC_1187	Ale beer
CQC	MTF2546	West African cocoa
CQD	MTF2547	West African cocoa
CQG	MTF2550	West African cocoa
CQI	MTF2552	West African cocoa
BAB	DJ68	African palm wine
AVV	DJ65	African palm wine
BAA	DJ66	African palm wine
BAD	DJ71	African palm wine
BAM	HN10	CHNIII
BAQ	HN19	CHNIII
BAG	SX1	CHNII
BAH	SX3	CHNII
BAL	HN6	CHNI
CCQ	Ksc2-2B	Far East Asia
CCR	Ksc40-8A	Far East Asia
CCS	Ksc73-2D	Far East Asia
BMA	UWOPS03-429.1	Malaysian
AKM	UWOPS03-461.4	Malaysian
BMB	UWOPS03-433.3	Malaysian
BMC	UWOPS03-459.1	Malaysian
BAN	HN15	CHN V
BAP	HN16	CHN V
CMP	YPS615	Ecuadorean
CCH	CLQCA_20-314	Ecuadorean

ACC	YPS1000_1b	Ecuadorean
CCC	CLQCA_20-156	Ecuadorean
CDF	N22.00-5D	Far East Russian
CDG	N3.00-7A	Far East Russian
CDH	N159.01-2B	Far East Russian
CDI	N163.01-5A	Far East Russian
AVI	YPS163	North American oak
ACD	YPS163_1b	North American oak
ANF	YPS139	North American oak
ANH	YPS142	North American oak
ARH	CBS1592	Asian islands
ARI	CBS1593	Asian islands
AFK	CBS2992	Asian islands
AHH	CBS3000	Asian islands
AHQ	CBS440	Asian fermentation
AEP	CBS1508	Asian fermentation
AFH	CBS1509	Asian fermentation
AGG	CBS1480	Asian fermentation

2-2-2 用いた菌株

S. cerevisiae の一倍体実験室酵母として S288C (*MAT α SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6*)を用いた。二倍体実験室酵母としては S288C 株の二倍体株である X2180 を用いた。協会系清酒酵母は高泡形成能を欠損させた K701 を用いた。Km67 株は清酒醸造タンクから単離された ATCC32694 株に由来する株である。全ての株は菊正宗酒造の研究所に保存された菌株を使用した。

2-2-3 遺伝子操作

CDC55 と *SCH9* と *RIM15* の遺伝子破壊はゲノム編集によって行った。プラスミドはそれぞれ pCas-KanMX-SCH9、pCas-KanMX-CDC55、pTS746 を用いた。pCas-KanMX-SCH9、pCas-KanMX-CDC55 の sgRNA 領域および SNR52 遺伝子の terminator 領域の結合カセットの増幅には pCas-KanMX (Shibata et al., 2024)を template に使用し、それぞれプライマーセット sgRNA Fw_SCH9 と sgRNA_Rv ならびに sgRNA Fw_CDC55 と sgRNA_Rv を使用した。sgRNA の発現には tRNA のプロモーターを用い、pCas-KanMX-SCH9、pCas-KanMX-CDC55 それぞれについてプライマーセット tRNA_pro_Fw と tRNA pro Rv_SCH9 ならびに

tRNA_pro_Fw と tRNA pro Rv_CDC55 を用いた。得られた断片は inFusion cloning (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて制限酵素 SpeI で切断した pCas-KanMX と結合させ、大腸菌に形質転換しプラスミドを得た。pTS746 は pGAL1-Cas9-tADH1-pGAL1-2BsaIsgRNAFE(RIM15D)-HDV-tCYC1-CU を鋳型にプライマーセット oTS1513 と oTS1514 を用いて inverse PCR で得られた DNA 断片と、BYP1463 を鋳型にプライマーセット oTS1511 と oTS1512 から得られた KanMX カセットを Gibson assembly kit (NEB, Hitchin, UK)によって結合し、大腸菌に形質転換することで得た。ゲノム編集の操作は先行研究に従って実施した(Shibata et al., 2024)。SCH9、CDC55、RIM15 破壊のリペア DNA はそれぞれプライマーセット SCH9-repair-F、SCH9-repair-R および CDC55-repair-F、CDC55-repair-R および RIM15-repairF、RIM15-repairR を用いて二本鎖 DNA を調製して使用した。SCH9 と RIM15 の二重破壊株の構築は Km67 と X2180 株の RIM15 破壊株に SCH9 破壊を導入することで獲得した。

RIM15 の過剰発現プラスミド pMK006 はプラスミド BYP9692 を鋳型にプライマーセット RIM15 - F no tag と RIM15-BYP9692tag-R を用いて増幅した断片と、X2180 のゲノム DNA を鋳型にプライマーセット RIM15 - F no tag と RIM15-BYP9692tag-R を用いて増幅した RIM15 領域と、X2180 のゲノム DNA を鋳型にプライマーセット ADH1-BYPtag-F と ADH1-RIM15tag-R で増幅した ADH1 プロモーター領域を InFusion cloning (Takara, Japan)で結合し大腸菌に形質転換した。

pMK001, pMK002, pMK003, pMK004, pMK005 は制限酵素 KpnI で切断した pAUR101 に種々のプロモーター領域と ORF とターミネーター領域を導入した。プロモーター領域は目的株のゲノム DNA を鋳型にプライマーセット pAUR101-F と Prom-R を用いて増幅した。ORF 領域は目的株のゲノム DNA を鋳型にプライマーセット RIM15-F と RIM15-R を用いて増幅した。ターミネーター領域は S288C のゲノム DNA を鋳型に用いてプライマーセット Ter-F2 と pAUR101-R で増幅した。得られた断片は InFusion cloning (Takara, Japan)で結合し大腸菌に形質転換した。

酵母の形質転換は先行研究にしたがって実施した (Shibata et al., 2024)。実験に使用したプライマーは Table 2-2-2 に記載した。実験に使用したプラスミドは Table 2-2-3 に記載した。

2-2-3 Rapamycin 感受性テスト

前培養には YPD 培地 (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone and 2% glucose, and 1.5% agar)を使用した。本培養には Rapamycin を 0, 1, 2 nM 含む YPD20 培地(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone and 20% glucose, and 1.5% agar)を使用した。Rapamycin は培養開始時に添加した。培養は 30℃静置培養で実施した。炭酸ガ

ス減量は経時的に瓶重を測定することで算出した。

2-2-4 清酒小仕込み試験

前培養には YPD 培地を用いた。一段仕込みは 31 g の α 化米 AA-70 (精米歩合 70%, 徳島製麹) と 8 g の乾燥麹 (精米歩合 70%, 徳島製麹)、0.068 g の乳酸、71 g の水を用いて実施した。三段仕込みに、上記の各種原料の 5 倍量を 4 日間で 3 回に分けて増量して容器に加えた。発酵は 15°C 静置培養で実施した。

2-2-5 細胞内貯蔵糖量の測定

酵母細胞は Miracloth (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) を用いて清酒醪から分離した。氷冷水で洗浄後、懸濁液の細胞数を顕微鏡で数えた。108 個の細胞を 2 mL のチューブに入れ、遠心後、沈殿を 125 μ L の 0.25 M Na₂CO₃ に懸濁した。95°C で 90 分培養後、0.2 M 酢酸バッファー (pH 5.2) を 375 μ L 加えた。培養液は二分し、それぞれグリコーゲンとトレハロースの測定に供した。

グリコーゲン濃度の測定は、 α アミログルコシダーゼを 20 mg/mL となるように懸濁した 0.2 M の酢酸ナトリウム 10 μ L を二分した培養液に添加し 57°C で一晩培養した。培養後 95°C で加熱し酵素を失活させ、遊離したグルコース濃度をグルコース C-II test (Wako, Osaka, Japan) で測定した。

トレハロース濃度の測定は二分した培養液に 15 μ L の 0.2 M 酢酸ナトリウム (pH 8.0) を添加し、3.27 μ L のトレハラーゼ (Merck) を添加した。37°C で一晩培養後、遊離したグルコース濃度をグルコース C-II test (Wako, Osaka, Japan) で測定した。

2-2-6 RNAseq

酵母細胞からの total RNA の抽出は、Miracloth (Merck Millipore) を用いて清酒醪から収集した後、ホットフェノール法により抽出した。mRNA は、KAPA mRNA キャプチャーキット (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いた polyA tail 濃縮法によって精製した。ストランド特異的な RNA シーケンスライブラリーは、MGIEasy RNA Direction Library Prep Set (MGI, Shenzhen, China) を用いて調製した。ペアエンドシーケンシング (150 bp) は、Genome-Lead Co., Ltd. により DNBseq G-400RS (MGI) を用いて実施され、各サンプルあたり最低 300 万リードを得た。得られた生データは、FASTP (version 0.22.0) (Chen et al., 2018) を用いて、最小リード長 30 bp、Phred スコア 30 を閾値に設定し、アダプターや低品質リードを除去した。その後、STAR (version 2.7.10b) (Dobin et al., 2013) を用いて、*S. cerevisiae* のリファレンス配列 (R64-1-1) にマッピングした。並べ替えおよびインデックス化した BAM ファイルを用いて、RSEM (version 1.3.3) (Li & Dewey, 2011) によりリー

ドカウントを行った。RSEM で算出された TPM 値は、edgeR (version 3.40.2)(Chen et al., 2025)にインポートし、発現変動遺伝子 (DEGs)の検出に使用した。主成分分析 (PCA)は、Python version 3.8.20 で scikit-learn パッケージ (version 0.24.1)を用いて実施した。GO term の Enrichment 解析は、ClusterProfiler ソフトウェア (version 4.6.2)(Wu et al., 2021)を用いて行った。

2-2-7 RT-qPCR

RNA は、PrimeScriptRT reagent Kit (Takara Bio, Shiga, Japan)を用い、Oligo-dT プライマーとランダム 6mer プライマーの両方を使用して逆転写した。RT-qPCR は、Thermal Cycler Dice® Real Time System II (TaKaRa)および TB Green™ Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus, TaKaRa)を用いて実施した。Reference 遺伝子には *ACT1* をは使用した。*ACT1* の発現定量にはプライマーセット ACT1-RT-F と ACT1-RT-R を用い、*RIM15* の発現定量にはプライマーセット RIM15_reg4-F と RIM15_reg4-R を用いた。実験に使用したプライマーは Table 2-2-2 に記載した。

Table 2-2-2 使用したプライマー		
Primer Name	Sequence	Purpose
pAUR101-F	ACTCTAGAGGATCCCCGGGTATGTAGT CTTTTTTCTCTCTGCTCTGG	PC amplification of the promoter region of <i>RIM15</i> for constuctions of pMK001, pMK002, pMK003, pMK004, pMK005
Prom-R	CTGTCTTCCTCTACTGGGCTTATC	
RIM15-F	GCCCAGTAGAGGAAGACAGATGTTCAA TAGAAGTAACACC	PCR amplicfication of <i>RIM15</i> ORF region for constructions of pMK001, pMK002, pMK003, pMK004, pMK005
RIM15-R	CTTTATCTTAAAATTTATCAGTGCGTTT CATCAGAATC	
Ter-F2	TAAATTTTAAGATAAAG	PC amplification of the terminator region of <i>RIM15^{WT}</i> for constuctions of pMK001, pMK002, pMK003, pMK004, pMK005
pAUR101-R	CGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTTACA AAATATGAAATTAGGGACTTC	
tRNA_pro_Fw	ATCCATCGATACTAGGTATATGTGTTAT GTAGTA	PCR amplification of tRNA promoter region using X2180 genomic with a reverse primer

		specifically designed to target interested genes.
sgRNA_Rv	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	PCR amplification of SNR52 terminator region using X2180 genomic with a forward primer specifically designed to target interested genes.
sgRNA Fw_SCH9	CATCGATGATGACGGGGACGGTTT TAG AGCTAGAAATAGC	PCR amplification of tRNA promoter region with sgRNA_Rv for construction of pCasKanMX-SCH9
tRNA pro Rv_SCH9	CGTCCCCGTCATCATCGATG TCTCCCGGGGCGAGTCGAA	PCR amplification of SNR52 terminator region with tRNA_pro_Fw for construction of pCasKanMX-SCH9
SCH9-repair-F	ACCCACTCTCACATAATCACCTAAGGG CATCTATTTAATAAGGTACAGTC TGAATAATTG	Preparation of repair DNA for construction of <i>SCH9</i> deletion mutant
SCH9-repair-R	CAGTGATTATGAGACGTGATAAACTAG AAATTTGCAGGAACAATTATTCA GACTGTACCT	
RIM15_reg4-F	AACGGACCAATTCCAGTGATC	RT-qPCR
RIM15_reg4-R	GCCACTACGCCTCCTGTTTC	
ACT1-RT-F	GGTTGCTGCTTTGGTTATTGA	
ACT1-RT-R	TTTTGACCCATACCGACCAT	
ADH1-BYPtag-F	CCCCGGGCTGCAGGAACCTCCCTAACAT GTAGGTGG	PCR amplification of <i>ADH1</i> promoter region with a overhag to EcoRI-digested BYP9692 for construction of pMK006
ADH1-RIM15tag-R	GTTACTTCTATTGAACATTGTATATGAG ATAGTTGATTGTATGC	
RIM15 - F no tag	ATGTTCAATAGAAGTAACACCGCAGGC GGATCTCAG	PCR amplification of <i>RIM15</i> ORF-terminator region with a overhag to

RIM15-BYP9692tag-R	AAGCTTGATATCGAATACAAAATAT GAAATTAGGGACTTC	EcoRI-digested BYP9692 for construction of pMK006
sgRNA Fw_CDC55	AAGCTGACAAAACAGCGTTCGTTTTAG AGCTAGAAATAGC	PCR amplification of tRNA promoter region with sgRNA_Rv for construction of pCasKanMX-CDC55
tRNA pro Rv_CDC55	GAACGCTGTTTTGTCAGCTTTCTCCCGG GGGCGAGTCGAA	PCR amplification of SNR52 terminator region with tRNA_pro_Fw for construction of pCasKanMX-CDC55
CDC55-repair-F	GAATATACAAACGCATTCTAGAAGAAT TCGATTACGTCAATTAGGCTCTCTTATA ATAAT	Preparation of repair DNA for construction of <i>CDC55</i> deletion mutant
CDC55-repair-R	GGGAAGATATGGGATAAAAAAAGTA AGGGAAAATAAGGAATTATTATAA GAGAGCCTAA	
oTS1511	AGAGTGCACCATAACCACCTTGACATGG AGGCCCAGAATACC	Preparation of KanMX cassette using BYP1463 as a template
oTS1512	TTTACTTATAATACAGTTTTTCAGTATAG CGACCAGCATTACATAC	
oTS1513	AAAACGTATTATAAGTAAATGCATGT ATACTAACTCACAAATTAGAG	Inverse PCR amplification of pGAL1-Cas9-tADH1-pGAL1-2BsaI-sgRNAFE(RIM15D)-HDV-tCYC1-CU to replace <i>URA3</i> with KanMX cassette
oTS1514	AAGGTGGTATGGTGCACCTCTCAG	
RIM15-repairF	TTTCTCTTGCCTCATTTGATAGAATAGA TAAGCCAGTAGAGGAAGACAGTAAAT TTTAAGATAAAGATAATTAaaaaaaAT AACTGAATAAAAACTTTG	Preparation of repair DNA for construction of <i>RIM15</i> deletion mutant
RIM15-repairR	CAAAGTTTTTATTCAGTTATTTTTTTTA ATTATCTTTATCTTAAAATTTACTGTCT TCCTCTACTGGGCTTATCTATTCTATCA AATGAGGCAAGAGAAA	

Table 2-2-3 使用したプラスミド		
Plasmids	Description	Ref.
pAUR101	A YIP plasmid containing aureobasidin A resistance gene	Purchased from Takara Bio.
pMK001	pAUR101 inserted with <i>RIM15</i> of S288C expressed from the promoter of <i>RIM15</i> of S288C	This study
pMK002	pAUR101 inserted with <i>RIM15</i> of K701 expressed from the promoter of <i>RIM15</i> of K701	This study
pMK003	pAUR101 inserted with <i>RIM15</i> of Km67 expressed from the promoter of <i>RIM15</i> of Km67	This study
pMK004	pAUR101 inserted with <i>RIM15</i> of Km67 expressed from the promoter of <i>RIM15</i> of S288C	This study
pMK005	pAUR101 inserted with <i>RIM15</i> of X2180 expressed from the promoter of <i>RIM15</i> of Km67	This study
pCas-KanMX	A plasmid used for gene deletion by genome editing	(Shibata et al., 2024)
pCas-KanMX-SCH9	A plasmid used for gene deletion by genome editing introduced with gRNA targeting <i>SCH9</i>	This study
pCas-KanMX- CDC55	A plasmid used for gene deletion by genome editing introduced with gRNA targeting <i>CDC55</i>	This study
BYP9692	A YCP plasmid containing KanMX	Purchased from National Bio Resource Center (NBRP)

pMK006	BYP9692 inserted with <i>RIM15</i> ^{X2180} expressed from <i>ADH1</i> promoter and its native terminator	This study
pMK007	BYP9692 inserted with <i>MSN2</i> expressed from <i>ADH1</i> promoter and its native terminator	This study
pGAL1-Cas9-tADH1-pGAL1-2BsaI-sgRNAFE(RIM15D)-HDV-tCYC1-CU	A plasmid used for gene deletion by genome editing introduced with gRNA targeting <i>RIM15</i>	(Sugimura et al., 2023)
BYP1463	pUG6 harboring loxP and KanMX	Purchased from National Bio Resource Center (NBRP)
pTS746	pGAL1-Cas9-tADH1-pGAL1-2BsaI-sgRNAFE(RIM15D)-HDV-tCYC1-CU harboring KanMX cassette	This study

2-3 結果

2-3-1 Km67 株の全ゲノム解析と細胞周期の調査

本研究では実験室酵母として X2180 株、Modern 型の清酒酵母として K701 株、Classical 型の清酒酵母として Km67 株を研究対象とした。Km67 株が Classical 型の酵母であるという知見は、先行研究でのいくつかの遺伝子の配列の比較からの推定に基づいていた (Takao et al., 2018)。いくつかの遺伝子の配列情報のみを用いた解析は、系統関係の推定には不十分であると考えられる。そこで、Km67 株の全ゲノム解析を実施し、全ゲノム配列を用いることで、より厳密に系統関係を反映する系統樹の作成を行った。系統解析には全ゲノム配列がすでに取得された 108 株の出芽酵母のゲノム配列 (Peter et al., 2018) を含めて系統樹を作成した (Fig. 2-3-1)。



Figure 2-3-1. 全ゲノム上の biallelic SNP を用いた系統樹 紫色で記載した菌株は Modern 型清酒酵母、オレンジ色で記載した菌株は Classical 型清酒酵母とそ

れ以外の清酒酵母を意味する。

結果、Km67 株は協会 1, 3, 4, 5 号酵母と同じ clade、すなわち Classical 型の酵母に分類されることが分かった。一方、K701 株は K6, K9 といった Modern 型の酵母と同じ clade に属することが分かった。これらの結果は先行研究をよく再現した (Ohya & Kashima, 2019)。

続いて三段仕込みによって清酒醪における二倍体実験室酵母 X2180 株、K701 株、Km67 株の発酵能を比較した。培養開始 15 日目時点でのアルコール濃度を測定した (Fig. 2-3-2)。結果、K701 株と Km67 株は X2180 株よりもそれぞれアルコール濃度が 1.81 倍および 1.83 倍高いことが分かり、清酒酵母 2 株の高い発酵性が本研究において再現されることを確認した。

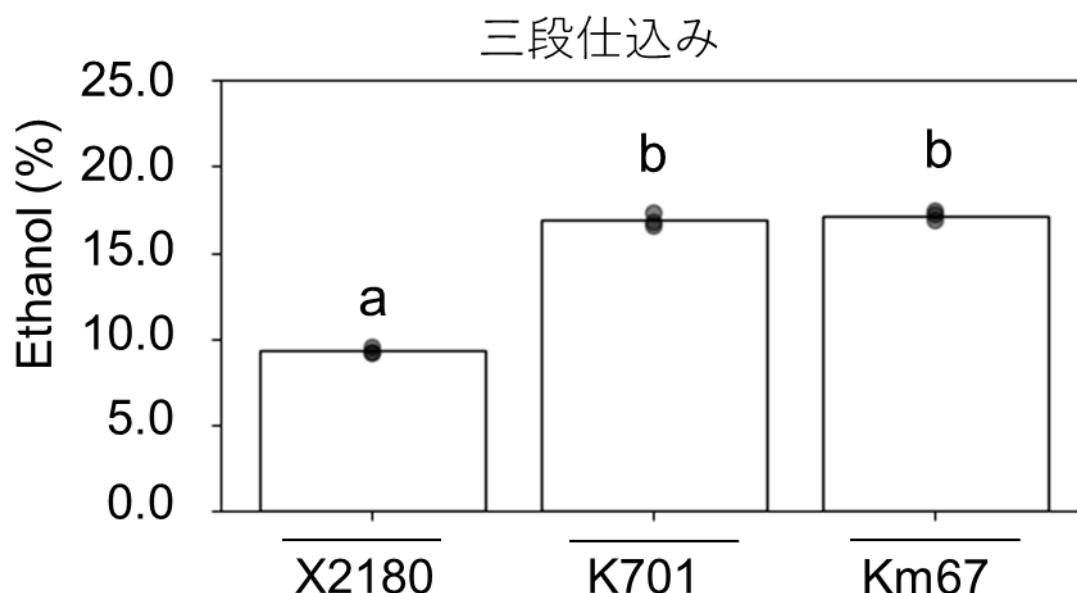


Fig. 2-3-2 三段仕込みでの発酵能の比較 異なるアルファベットは Tukey-Kramer HSD 試験によって統計的に有意な差が検出された組み合わせ ($p < 0.05$) 異なるアルファベットの組み合わせは群が統計的に有意に異なる群に属することを意味する

続いて、清酒醪における Km67 株の細胞周期を調査した。K701 株は G_0 期に入りにくく (Urbanczyk et al., 2011)、それが高発酵性に関連していると報告されている (Watanabe et al., 2012)。 G_0 期への導入とその制御には *RIM15* 遺伝子が関与し、実験室酵母では *RIM15* の欠損によって G_0 期への導入が見られなくなることが報告されている (Cameroni et al., 2004)。K701 株は *RIM15* 遺伝子に機能欠失変

異を有するため G_0 期への正常な誘導が行われないと推測されるが、実験室酵母と同様に機能型の *RIM15* 遺伝子を有する Km67 株において G_0 期への導入が行われるかどうかの検討はいまだ行われていない。

G_0 期への導入の是非は、細胞壁強度と細胞内貯蔵糖量を測定することで推定される (Urbanczyk et al., 2011)。 G_0 期の細胞は細胞壁強度と細胞内貯蔵糖量が上昇することが知られる。そこで、清酒醪で培養した X2180 株、K701 株、Km67 株の細胞壁強度を Zymolyase への耐性によって調べた。Zymolyase は細胞壁分解酵素であり、Zymolyase 存在下で細胞を培養したとき、細胞壁の強度に応じて細胞が溶解し、培養液の吸光度が低下する。経時的に吸光度を測定することで細胞の細胞壁強度を調べることができる。X2180 株、K701 株、Km67 株を清酒小仕込み試験に供し、培養開始後 4, 8, 12 日目の細胞を清酒醪から回収し、Zymolyase 耐性試験に供した。結果、K701 株では X2180 株と比べて相対吸光度の低下が早く、K701 株の細胞壁強度が X2180 株よりも低いことが分かった。その傾向は発酵期間を通して観察された。この結果は、K701 株と X2180 株の G_0 期への導入是非と符合し、先行研究を再現した (Urbanczyk et al., 2011)。Km67 株についても同様の試験を実施したところ、X2180 株よりも相対吸光度の低下が早く、その程度は K701 株と同程度だった。このことから Km67 株の細胞壁強度は G_0 期へ入らない K701 株と同程度であることが分かった (Fig. 2-3-3)。

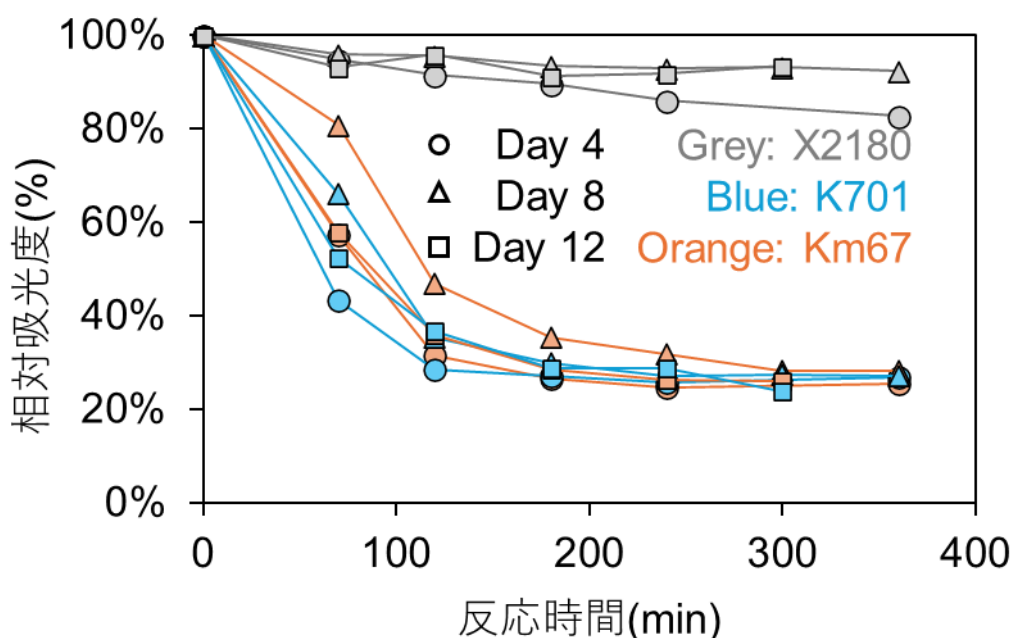


Figure 2-3-3. 清酒醪の酵母の細胞壁強度。清酒醪の培養開始後 4(○), 8(△), 12(□)日目の醪からサンプリングした X2180 株 (灰)と K701 株 (青)と Km67 株 (オレンジ)の Zymolyase 耐性。実験は一連で実施した。

続いて、細胞内貯蔵糖であるグリコーゲンとトレハロースの細胞内濃度を測定した。G₀期の細胞はこれらの細胞内含量が高まることが知られる(Watanabe et al., 2012)。清酒醪で培養した X2180 株、K701 株、Km67 株を清酒醪から分離し、それぞれの濃度を測定した (Fig. 2-3-4)。トレハロース濃度は 4, 8 日目で K701 株および Km67 株で X2180 株よりも低いことが分かった。これは先行研究の結果と一致した (Watanabe et al., 2012)。グリコーゲン濃度は三株で統計的には有意な差は見られなかった。一方、X2180 株では培養開始後 8 日目以降にグリコーゲン濃度が増加傾向にあるのに対して、清酒酵母では培養開始後 4 日目とほぼ同程度の濃度で発酵が進み、清酒酵母でグリコーゲン濃度が低く保たれる傾向が見られた。グリコーゲンは清酒醪にも含まれていると考えられ、清酒醪から酵母を分離する過程である程度の持ち込みが生じる。培地から持ち込んだグリコーゲンが測定のベースラインに含まれると考えられ、その影響で三株の含量に有意な差が見られなかった可能性が考えられる。

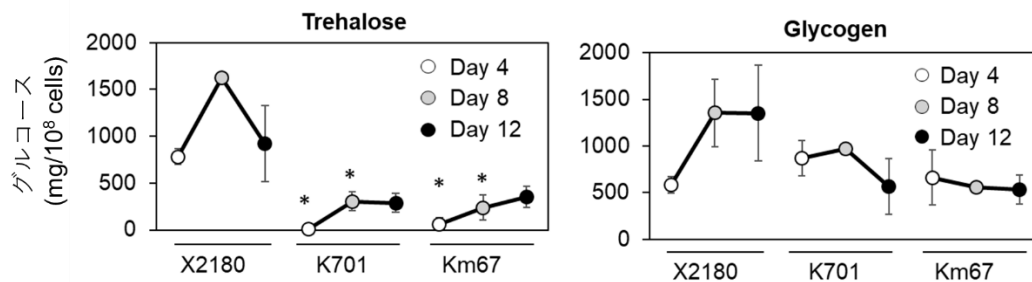


Figure 2-3-4. 清酒醪の酵母の細胞内貯蔵糖濃度 清酒醪の培養開始後 4(白), 8(灰), 12(黒)日目の醪からサンプリングした酵母の細胞内トレハロース濃度 (左)とグリコーゲン濃度 (右)。実験は三連で実施した。アスタリスクは Tukey-Kramer HSD 試験によって統計的に有意な差が検出されたことを意味する ($p < 0.05$)

細胞壁強度および細胞内貯蔵糖量の測定結果から、Km67 株は K701 株と同様に清酒醪において G₀ 期に導入した細胞に特有の代謝的表現型を示さないことが分かった。

2-3-2 RNAseq 解析

続いて、Km67 株の G₀ 期への導入の是非を RNA の観点から調べた。RNAseq 解析は次世代シーケンサーを用いて細胞内の mRNA 分子種を網羅的に定量する技術である。清酒醪で培養した X2180, K701, Km67 の三株から RNA を抽出し RNAseq 解析を実施した。培養開始後 4, 8, 12 日目の酵母を解析対象とし、6692

遺伝子の発現定量解析を実施した(Fig. 2-3-5)。6692 遺伝子について、主成分分析をおこない、トランスクリプトームの全体の特徴を可視化した。結果、清酒酵母二株のトランスクリプトームはそれぞれの日数でグループ化した。対して X2180 株のトランスクリプトームは一つのグループにクラスター化した。このことから、清酒酵母二株の発現の傾向は類似しており、X2180 株の発現の傾向とは大きく異なることが分かった。

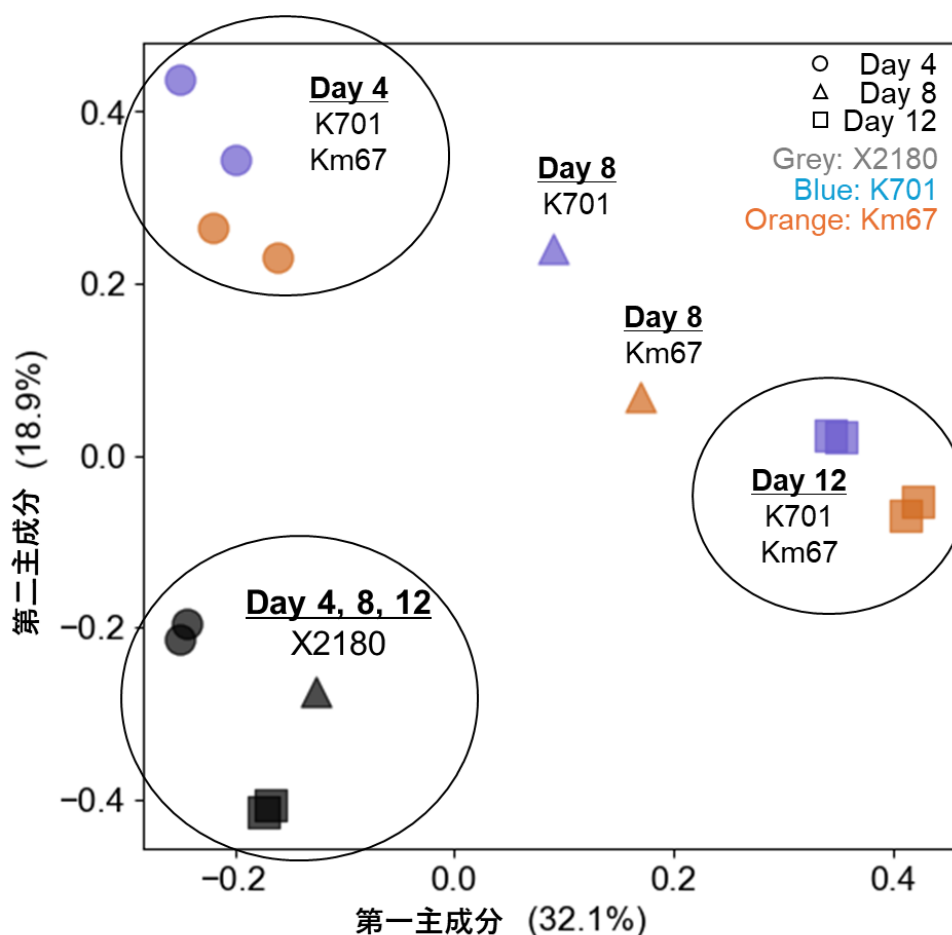


Figure 2-3-5. トランスクリプトームの主成分分析

清酒醪の培養開始後 4(○), 8(△), 12(□)日目の醪からサンプリングした X2180 株 (灰)と K701 株 (青)と Km67 株 (オレンジ)のトランスクリプトーム

続いて、発現変動遺伝子のプロモーター領域に統計的に有意に出現する転写因子結合サイトを ShinyGO (version 0.80) を用いて検出した (Ge et al., 2020)。K701 株では細胞壁などのストレス応答関連遺伝子の発現量が低下しており、ストレス応答が弱いことが間接的に発酵性の上昇に寄与すると報告されている (Watanabe et al., 2011)。そこで培養開始後 4 日目において X2180 株よりも発現が低下している遺伝子を対象にエンリッチメント解析を実施した。 (Fig. 2-3-6)。

転写因子 *MSN2*, *SOK2*, *ADR1*, *MIG1*, *HAP1*, *GIS2*, *GAT4*, *NRG2* は K701 と Km67 の両方で共通して検出された。*MIG1*, *NRG2*, *HAP1* はグルコース抑制や呼吸に関連する転写因子であり (Karunanithi & Cullen, 2012; Pfeifer et al., 1989; Vyas Valmik et al., 2005)、清酒酵母におけるグルコース抑制関連遺伝子の発現低下および呼吸の抑制が示唆された。出芽酵母におけるグルコース抑制は糖新生、ガラクトースなどの糖類の利用、呼吸の抑制を行う代謝機構で、グルコース抑制によってグルコースのエタノールへの変換が促進される (Kayikci & Nielsen, 2015)。*MSN2* と *GIS1* は Rim15p の制御下にある転写因子で、その機能は細胞壁やストレス応答などの G₀ 期に関連する遺伝子の発現制御である (Lee et al., 2013)。K701 株と Km67 株における発現低下遺伝子のプロモーター領域に *MSN2* と *GIS1* 結合サイトが検出されるということは、*MSN2* と *GIS1* の転写誘導活性が低いことを意味する。この結果は K701 株と Km67 株で G₀ 期特有の表現型が見られない結果と一致した (Fig. 2-3-3, Fig. 2-3-4)。このことから、Km67 株が K701 株と同様に G₀ 期へと入っていない可能性が RNA の観点からも示唆された。

K701 株のみに検出された転写因子のうち、*MSN4*, *CIN5*, *RLM1*, *HOT1*, *MOT3* はストレス応答に関わる転写因子であり、*GCR2*, *MIG2*, *MIG3*, *NRG1* はグルコース抑制に関わる転写因子であった。これらから K701 株では Km67 株よりもストレス応答が弱く、グルコース抑制がより強くかかっている可能性を示唆する。*FHL1*, *ELP4*, *BAS1* は転写・アミノ酸関連の転写因子であり発酵性との関連は不明であった。Km67 株のみで検出された転写因子 *HAC1* はタンパク質品質維持管理機構に関連する遺伝子で発酵性との関連は不明であった。

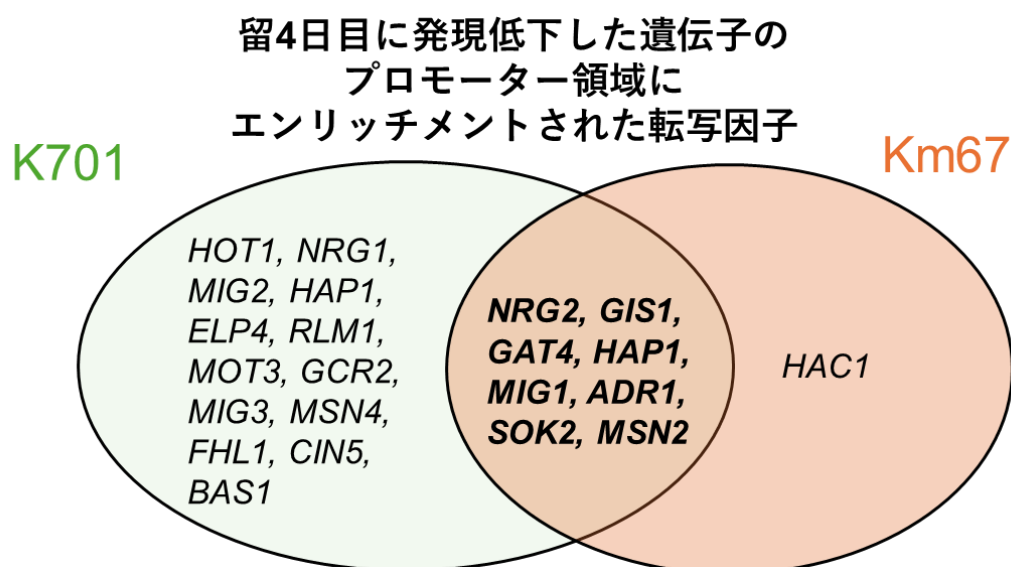


Figure 2-3-6. エンリッチメント解析で検出された転写因子

K701 株と Km67 株で発現量が上昇した遺伝子についても同様の解析を実施した。細胞周期・転写・翻訳に関する転写因子が検出され、清酒酵母において細胞周期・転写・翻訳が盛んなことがわかった (data not shown)。一方で、これらが高発酵性の原因であるか結果であるかの判別はできなかった。

先行研究から K701 株では *UGPI* の発現量が低下していることが知られる。*UGPI* は細胞壁や細胞内貯蔵糖を生合成する経路の UDP-glucose pyrophosphorylase をコードする遺伝子である (Watanabe et al., 2016)。*UGPI* の発現量は環境ストレスに応じて変化し、G₀ 期細胞で見られる細胞壁強度や細胞内貯蔵糖量の上昇において重要であると考えられている。K701 株における *UGPI* の低発現はストレスへの緩慢な応答を示唆し、細胞壁強度および細胞内貯蔵糖量低下に伴う炭素フラックスの解糖系への流入が高発酵性をもたらしているのではと推測されている (Watanabe et al., 2016)。RNAseq の結果から、*UGPI* の発現量が K701 株と Km67 株で X2180 株よりも低下していることが分かった (Fig. 2-3-7)。この結果は Km67 株における *UGPI* の発現量低下が、K701 株と同様にストレス応答が正常に誘導されないこと及び細胞構成成分へ炭素フラックスが回らないことを示唆し、K701 株と同様のメカニズムで高発酵性に寄与している可能性が示唆された

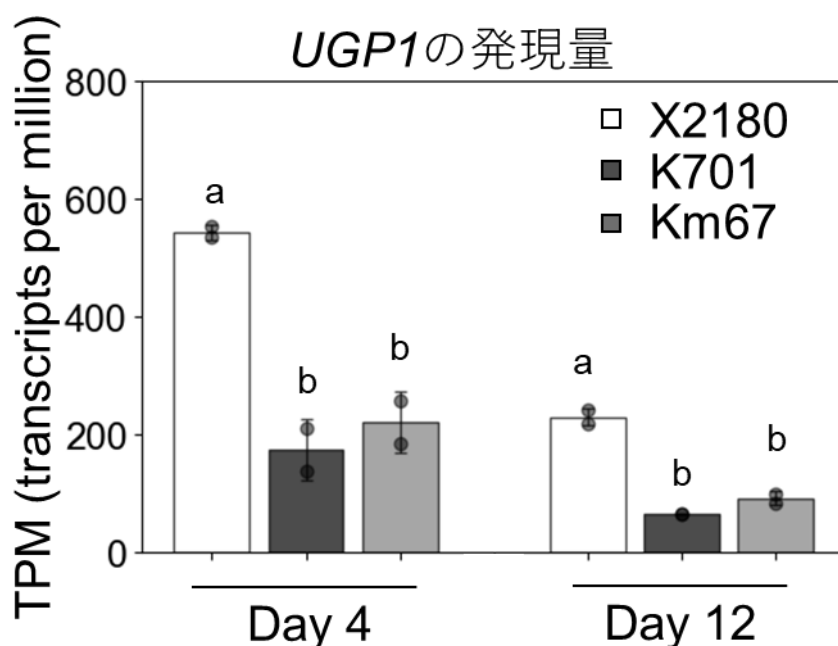


Figure 2-3-7. *UGPI* の発現量 X2180 株 (白)と K701 株 (黒)と Km67 株 (灰)の RNAseq によって推定された発現量 異なるアルファベットは Tukey-Kramer HSD 試験によって統計的に有意な差が検出された組み合わせ ($p < 0.05$)

2-3-3 Km67 株の Rim15p が伝達するシグナル経路の検証

これまでの結果から Km67 株では K701 株と同様に G₀ 期に入りにくいことが分かった。G₀ 期への導入には Rim15p が重要な役割を担う。Rim15p は栄養源を感知するシグナルが集約するハブとして働くことが知られ、外部の栄養状態に応じて G₀ 期の導入やストレス応答を誘導する (Pedruzzi et al., 2003)。TORC1 および PKA はそれぞれ外部環境のグルコース濃度および窒素源の量に応じて、Rim15p をリン酸化することで外部環境の栄養状態を細胞の代謝に反映させている (Fig. 2-1-1)。Km67 で Rim15p によるストレス応答が起こらないことの原因として、これらの Rim15p の上流の経路の不全により Rim15p へとシグナルが伝達されていない可能性が考えられる。そこで、TORC1 の活性を阻害する Rapamycin 処理下での発酵能を X2180 株、K701 株、Km67 株で比較した (Fig. 2-3-8)。Rapamycin 処理を細胞に行うと、外部環境の栄養が枯渇し TORC1 活性が低下する状態を人工的に模倣することができる。X2180 株では TORC1 活性の低下に応じて Rim15p が機能し発酵が抑制される。K701 株では Rim15p が機能欠失しているため、TORC1 活性が低下しても Rim15p が機能せず、発酵低下が起こらない。Km67 株は Rim15p が機能型であるため、Rapamycin 処理によって X2180 株と同様に発酵能が低下する可能性が考えられる。

K701 株、X2180 株、Km67 株の三株をグルコースを 20% 含んだ YPD20 培地での培養試験に供し、Rapamycin 処理の有無で発酵性の変化を調べた (Fig. 2-3-8)。Rapamycin は培養開始時点で培養液に添加した。Rapamycin 添加の有無で細胞数に差がないことを確認した (data not shown)。X2180 株では Rapamycin 濃度が高まるにつれて発酵力が低下することが分かった。一方で、K701 株と Km67 株では Rapamycin 濃度が高まっても発酵性には影響がないことが分かった。この結果は、Km67 株における Rim15p の不活化を示唆する。Km67 株の Rim15p の不活化の原因としては、Rim15p の下流に機能変異が存在する、あるいは Rim15p の機能を妨げる因子が存在し、Rim15p が活性化しても発酵抑制が行われないことなどが考えられる。一方、この結果だけで Rim15p の不活化を決定することができない。Rapamycin の Km67 株への浸潤のしにくさや、Rapamycin が作用する TORC1 への構造変異による Rapamycin の作用低減といった、Rapamycin を使用したことに起因する薬剤特異的な株間の感受性の違いが Km67 株の発酵低下を抑制した原因であるとも考えられる。

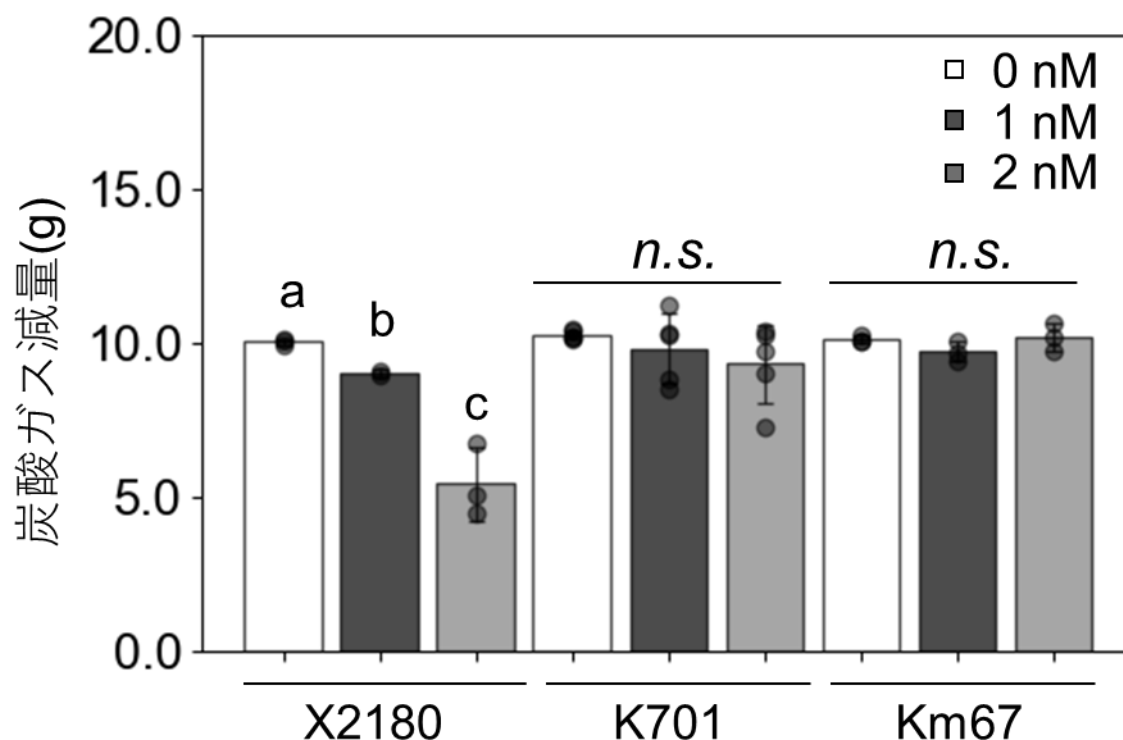


Figure 2-3-8. Rapamycin 感受性試験 0 nM (白)と 1 nM (黒)と 2 nM (灰)の Rapamycin 存在下での発酵試験。実験は三連で行った。異なるアルファベットは Tukey-Kramer HSD 試験によって統計的に有意な差が検出された組み合わせ ($p < 0.05$)

そこで、Rapamycin などの薬剤に依存しない方法で Rim15p の上流へ摂動を加える実験に取り組んだ。Sch9p は PKA や TORC1 によって働きが制御されるリン酸化酵素で、TORC1 と同様に Rim15p の機能を負に制御する。実験室酵母では欠損によって Rim15p の機能が向上し、Rapamycin 処理と同様のメカニズムで発酵性が低下すると考えられる。そこで、Km67 株の SCH9 破壊株の作成および発酵試験を実施した。

X2180 株の SCH9 破壊株は清酒醪にて発酵性が野生型株に比べて 45%低下した (Fig. 2-3-9)。X2180 株の SCH9 破壊株に RIM15 破壊の二重破壊を導入すると、発酵低下がレスキューされ、野生型株と比べて発酵がむしろ 11%上昇した。この結果から SCH9 破壊によって生じる発酵低下は Rim15p に依存的であることが分かった。一方で、Km67 株では SCH9 単破壊や、RIM15 と SCH9 の二重破壊を導入しても野生型株との発酵性に有意な差が生じなかった。この結果は、Km67 株において Rim15p が機能していない、または Rim15p の下流の変異によって Rim15p を介して伝達される発酵制御が機能しない可能性を示唆した。

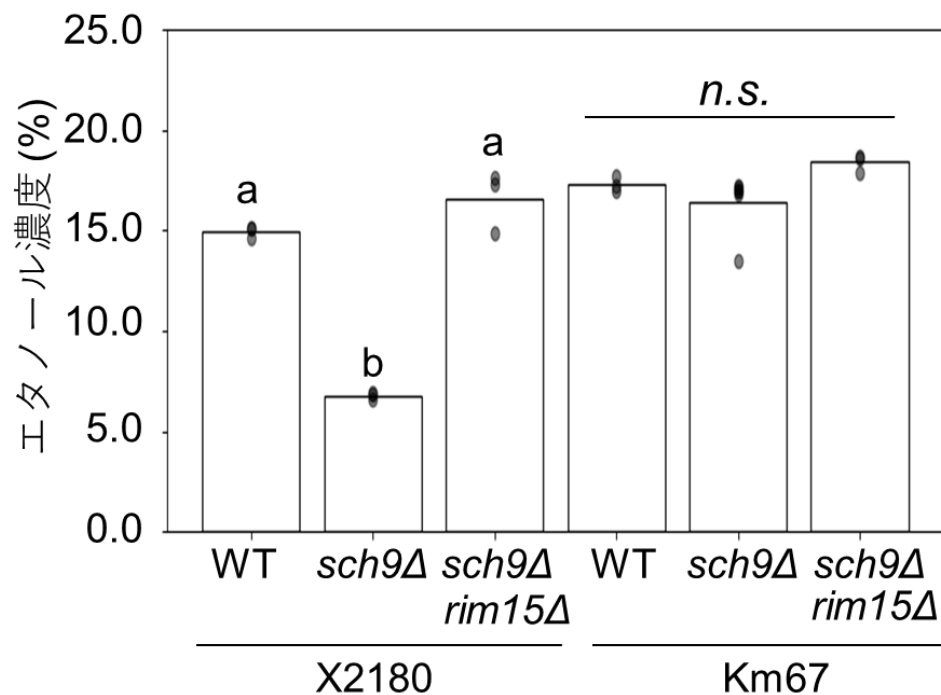


Figure 2-3-9. X2180 株と Km67 株の発酵性試験 清酒小仕込み試験の培養開始後 15 日目のエタノール濃度を示す。実験は少なくとも三連で実施した。異なるアルファベットは Tukey-Kramer HSD 試験によって統計的に有意な差が検出された組み合わせ ($p < 0.05$)。n.s は not significant の略

2-3-4 Km67 株の *RIM15* の発酵抑制機能の調査

続いて、Km67 株の *RIM15* (*RIM15^{Km67}*) の配列に注目し、その機能を調査した。*RIM15^{Km67}* の塩基配列には K701 株の *RIM15* (*RIM15^{K701}*) に見られるフレームシフトなどの機能欠失変異は存在しないが、実験室酵母の *RIM15* (*RIM15^{X2180}*) には見られない非同義置換がいくつか存在する (Fig. 2-3-10A) (Takao et al., 2018)。それらの非同義置換が発酵性に影響を与えるかどうかを調べるために、遺伝子相補試験を実施した。ゲノム編集によって一倍体実験室酵母 S288C 株の *RIM15* 遺伝子を欠損させ、S288C $\Delta rim15$ 株を作出した。続いて様々な株由来の *RIM15* を異なる株由来のプロモーター領域と結合させたカセットを導入したプラスミド pMK001, pMK002, pMK003, pMK004, pMK005 を作出した (Table 2-3-1)。

Table 2-3-1 プラスミドに挿入した断片の組み合わせ

Plasmid name	Promoter	ORF	Terminator
pMK001	<i>RIM15</i> ^{X2180}	<i>RIM15</i> ^{X2180}	<i>RIM15</i> ^{X2180}
pMK002	<i>RIM15</i> ^{K701}	<i>RIM15</i> ^{K701}	<i>RIM15</i> ^{X2180}
pMK003	<i>RIM15</i> ^{Km67}	<i>RIM15</i> ^{Km67}	<i>RIM15</i> ^{X2180}
pMK004	<i>RIM15</i> ^{Km67}	<i>RIM15</i> ^{X2180}	<i>RIM15</i> ^{X2180}
pMK005	<i>RIM15</i> ^{X2180}	<i>RIM15</i> ^{Km67}	<i>RIM15</i> ^{X2180}

得られたプラスミドを S288C $\Delta rim15$ 株に導入することで、それぞれの株由来の *RIM15* とそのプロモーター配列が発酵性に与える影響を調べた。全てのカセットのターミネーター領域には S288C 株の *RIM15* のターミネーター領域を用いた。発酵性は清酒小仕込み試験の培養開始後 15 日目における炭酸ガス減量で比較した (Fig. 2-3-10B)。

変異を導入していない野生型の S288C 株と S288C $\Delta rim15$ 株を比較すると、S288C $\Delta rim15$ 株において炭酸ガス減量が 17%高まっていることが分かった (Fig. 2-3-10B)。*RIM15* 破壊による発酵性の向上は先行研究により報告されており、この結果はその報告を再現した (Watanabe et al., 2012)。S288C $\Delta rim15$ 株に空ベクター pAUR101 を相補した MK001 株と S288C $\Delta rim15$ 株では発酵能に有意な差はなかった。すなわち、空ベクターの導入は発酵に影響を与えないことが分かった。

RIM15^{X2180} を X2180 株の *RIM15* のプロモーター領域に結合させたプラスミド pMK001 を導入した MK101 株では、MK001 株に比べて発酵性が 20%低下し、変異を導入しない野生型の S288C 株と同程度の発酵性を示した (Fig. 2-3-10B)。この結果はベクターによる外部からの *RIM15*^{X2180} 導入が、欠失した当該遺伝子の機能を相補できることを示す。

RIM15^{K701} を K701 株の *RIM15* プロモーター領域に結合させたプラスミド pMK002 を導入した MK002 株の発酵性は空ベクターを導入した MK001 株と同程度であることが分かった (Fig. 2-3-10B)。前述のとおり *RIM15*^{K701} には機能欠失変異が挿入されているため、発酵抑制機能が失われている (Watanabe et al., 2012)。MK002 株の発酵能が MK001 株と同程度に高いのは *RIM15*^{K701} の機能が欠失しており、*RIM15*^{K701} を相補しても親株 S288C $\Delta rim15$ において失われた *RIM15* の発酵抑制機能を相補できなかったと考えられた。

一方、*RIM15^{Km67}* を Km67 株のプロモーターに結合させた断片を有する pMK003 を S288C $\Delta rim15$ に導入すると、発酵性が大きく低下し、空ベクターを有する MK001 株よりも発酵が低下することが分かった (Fig. 2-3-10B)。この結果は MK003 株で *RIM15* の発酵抑制機能が *RIM15^{X2180}* と同程度またはそれ以上に強く機能していることを意味している。また、Km67 株の *RIM15* のプロモーター領域と *RIM15^{X2180}* を結合させたカセットを有する pMK401 を導入した MK401 株の発酵性は MK101 株と同程度であった (Fig. 2-3-10B)。この結果は Km67 株の *RIM15* のプロモーター領域は発酵性を低下させる要因ではないことを意味する。また、X2180 株の *RIM15* のプロモーター領域と *RIM15^{Km67}* を結合させたカセットを有する pMK501 を導入した MK501 株の発酵性は MK301 株と同程度であった (Fig. 2-3-10B)。これらの結果から *RIM15^{Km67}* に存在するいくつかの非同義置換は *RIM15* の機能に影響を与える変異ではなく、また Km67 株の Rim15p の元来の発酵抑制機能には影響がないことが分かった。

これらの結果から、野生型の Km67 株細胞内においては発酵抑制機能を喪失していない Rim15p が存在することが分かった。にもかかわらず Rapamycin や Sch9p の破壊に対して発酵能が変化しないことから、Rim15p の活性を Km67 株細胞内で負に制御する因子または Rim15p の下流に位置する因子への機能変異の存在が示唆された。

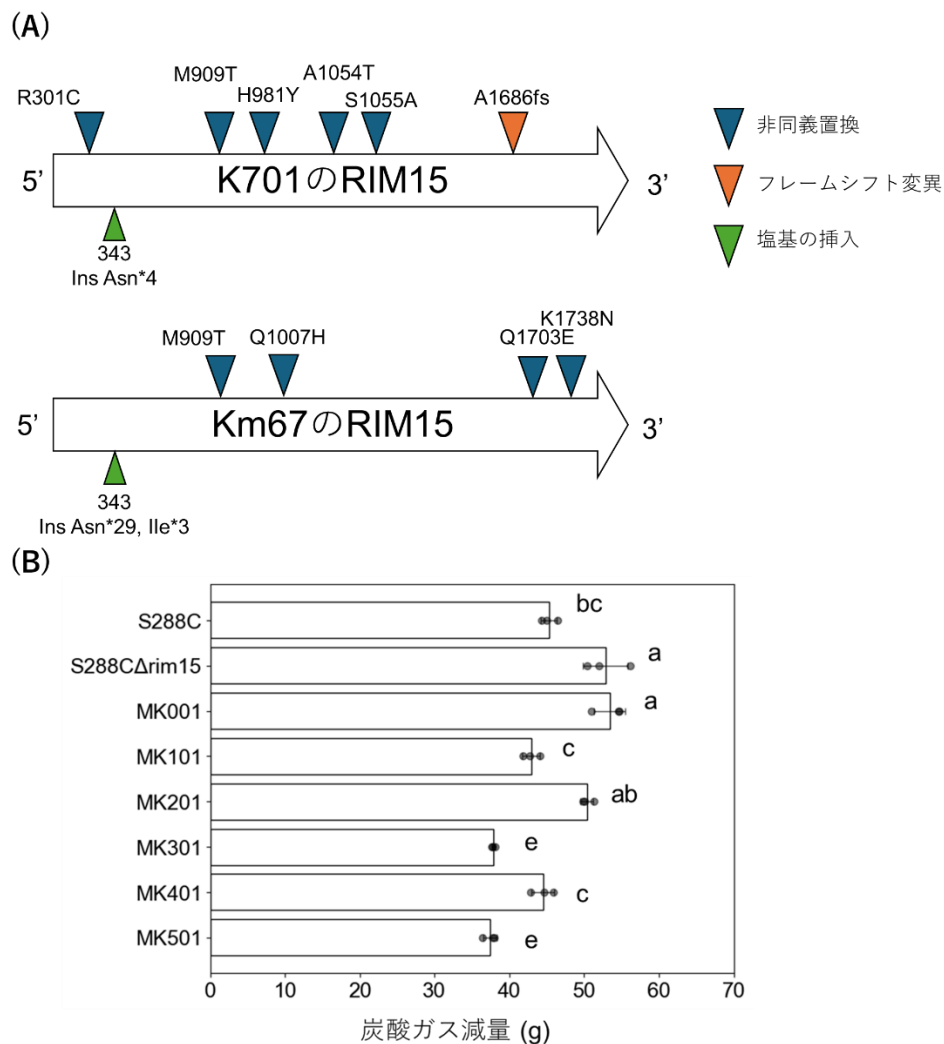


Figure 2-3-10. (A) K701 株と Km67 株の *RIM15* 遺伝子配列の比較 X2180 株の *RIM15* 遺伝子との相違箇所を示す。(B) ベクターによる *RIM15* 相補試験 異なるアルファベットは Tukey-Kramer HSD 試験によって統計的に有意な差が検出された組み合わせ ($p < 0.05$)。実験は少なくとも 3 連で実施した。

2-3-5 Km67 株の *RIM15* 破壊と過剰発現の発酵性への影響

続いて、Km67 株の *RIM15* の破壊株を作成し発酵能を比較した。Km67 株細胞内で *RIM15* の発酵抑制機能が維持されているとすれば、遺伝子破壊によって発酵性がさらに高まることが期待された。一段小仕込み試験によって発酵性を比較すると、*RIM15* 破壊の導入による発酵性の向上は見られなかった (Fig. 2-3-11)。この結果から、*RIM15* による発酵制御は野生型の Km67 株で既に機能していないもしくは機能が抑制された状態にある可能性が示唆された。

続いて Rim15p の過剰発現が Km67 株の発酵性にもたらす影響を調べた。YCp

ベクターBYP9692 に構成的な発現を誘導する *ADHI* プロモーターと *RIM15*^{X2180} を結合したカセットを導入したプラスミド pMK006 を作成した。Km67 株に BYP9692 と pMK006 を相補した株を作成し、一段仕込みにて発酵性を比較した。結果、発酵性に変化は見られなかった。この結果から、Km67 株では Rim15p の働きを阻害する因子の存在、あるいは Rim15p の下流の経路への変異の存在が、Rim15p の発酵抑制機能の伝達を阻害し、Km67 株における高い発酵性をもたらしたと考えられる。また、これらの結果から Km67 株内での *RIM15* 遺伝子の発現量は発酵性に影響を与えないことが分かった。

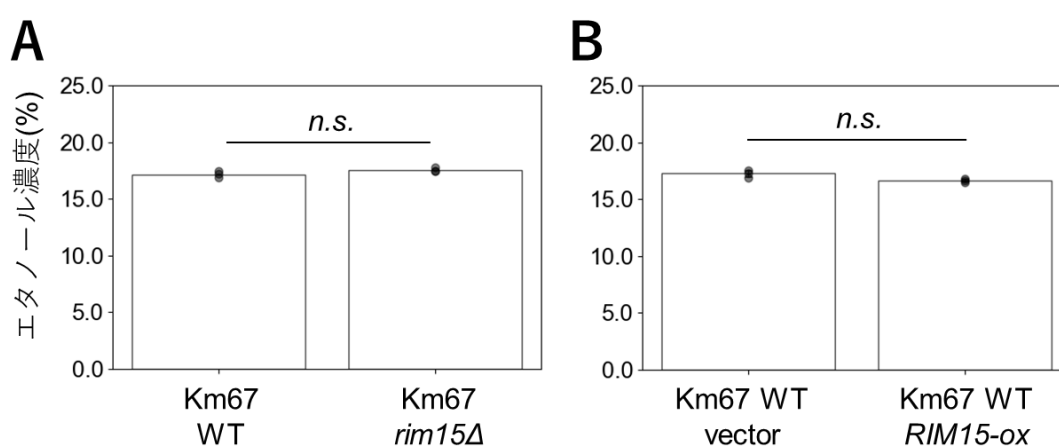


Figure 2-3-11. *RIM15* と Km67 株の発酵性の関係 (A) *RIM15* の有無での Km67 株の発酵性の比較 (B) *RIM15* 過剰発現株と空ベクター導入株の発酵性の比較
n.s.は not significant の略で、Student's *t*-test によって有意な差が検出できなかったことを意味する。実験は 3 連で実施した。

2-3-6 Km67 株の Rim15p の下流の経路の調査

続いて、Rim15p の下流の経路への摂動が Km67 株の発酵性にどのような影響をあたえるかを調べた。Rim15p は貧栄養などの外部環境の変化に応じて核内へ移行し、様々なタンパク質をリン酸化する。Rim15p に間接的に制御をうける因子として、PP2A^{B55δ} が挙げられる。PP2A^{B55δ} はタンパク質脱リン酸化複合体であり、Msn2p などのストレス応答に関わるタンパク質 (Lee et al., 2013) や Sic1p などの細胞周期に関わるタンパク質の制御 (Moreno-Torres et al., 2017) に関与する。PP2A^{B55δ} の活性は Cdc55p によって制御される。PP2A^{B55δ} は発酵制御に非常に重要であり、K701 で Cdc55p を破壊し PP2A^{B55δ} の活性を低下させると発酵性が著しく低下することが知られる (Watanabe et al., 2019)。そこで、Km67 株の CDC55 破壊株を作成し、PP2A^{B55δ} の活性低下に伴う発酵性の変化を調べた。

先行研究より PP2A^{B55δ} の破壊は実験室酵母において細胞周期の異常を誘発し、G2 arrest した細胞に特異的な伸長した形態を示すことが知られる (Healy et al., 1991)。そこで、Km67 株と Km67 $\Delta cdc55$ 株の細胞形態を顕微鏡で観察した (Fig. 2-3-12)。結果、X2180 株と同様に Km67 株においても CDC55 破壊によって伸長した細胞形態を示すことが分かった。

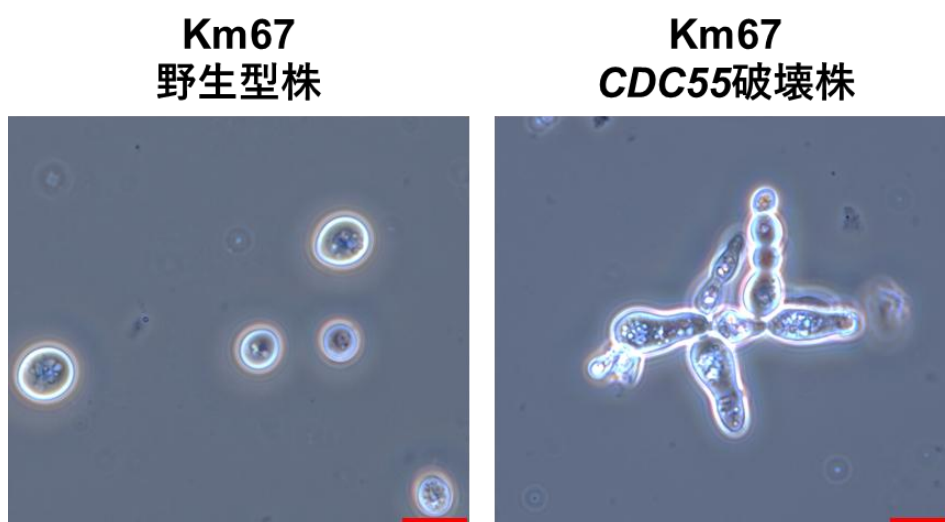


Figure 2-3-12. Km67 株と CDC55 破壊株の形態観察 画像中の赤線は 10 μ m に相当する。

続いて、X2180 株および Km67 株の CDC55 破壊株を一段小仕込み試験に供し、発酵能を比較した (Fig. 2-3-13)。結果、X2180 株では CDC55 破壊によって発酵性は野生型株の 51%に低下した。一方、Km67 株では CDC55 破壊株の発酵力は野生株の 81%程度にしか減少せず、減少幅が実験室酵母よりも小さかった。三段小仕込み試験によって再度発酵性の比較を実施したが、Km67 株の CDC55 破壊株の発酵力は野生型株の 83%程度であった。この結果は、Km67 株の発酵性は PP2A^{B55δ} によって制御を受けるが、その程度は実験室酵母程ではないことが分かった。一方、Rim15p 自体の過剰発現やその上流への摂動は発酵に影響を与えなかったのに対して、Rim15p の下流の経路への摂動は Km67 株の発酵を多少なりとも低下させることが分かった。この事実は、Rim15p の下流の経路は Km67 株の発酵制御効果を保持していることを示唆する。すなわち、Rim15p 上流への摂動や Rim15p の過剰発現が発酵性に影響を与えなかったのは、それらのシグナルが PP2A^{B55δ} へと伝わらなかったことが原因の一つと考えられた。ただし、細胞形態に異常を生じるほど大幅に PP2A^{B55δ} が低下した状態でも、Km67 株は発酵性が大きく低下しなかったことから、Rim15p 上流から PP2A^{B55δ} へシグナルが伝わりにくいことが Km67 株における高い発酵性をすべて説明したとも考えに

くい。

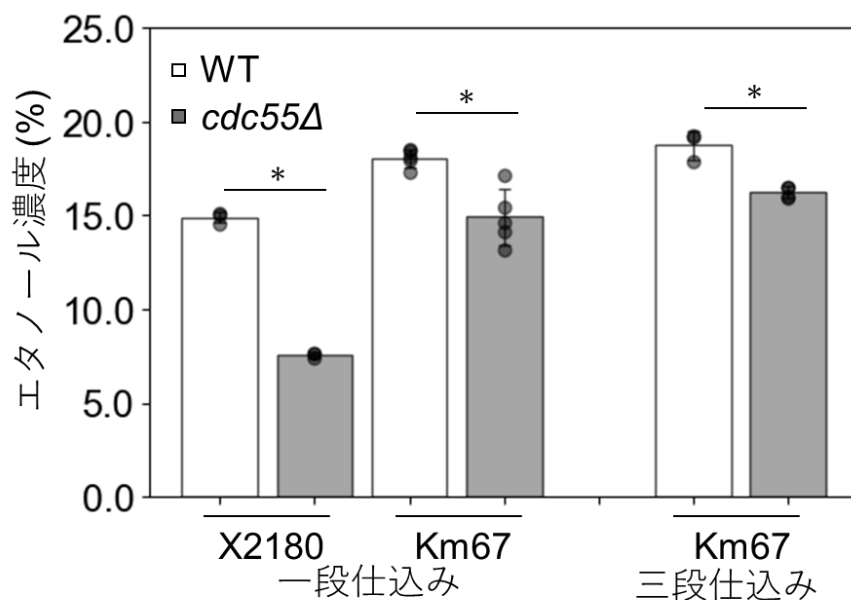


Figure 2-3-13. Km67 株と *CDC55* 破壊株の発酵試験 アスタリスクは Student's *t*-test によって統計的に有意な差が検出されたことを意味する ($p < 0.05$)

Rim15p 上流から PP2A^{B558}へシグナルが伝わりにくいことの原因を調べるために、*RIM15* の下流で PP2A^{B558} までにシグナルを伝えるタンパク質への SNP を調べた (Table 2-3-2)。結果、Km67 株の各種遺伝子には K701 株と同様の変異しか存在せず、これらの遺伝子機能欠損が PP2A^{B558} へのシグナルの伝わりにくさの原因ではないことが分かった。

Table 2-3-2 *RIM15* 関連遺伝子の SNP 一覧

ORF 名	遺伝子名	株名	非同義置換		
YGL190C	<i>CDC55</i>	K7	Asp141Ala	Asn119fs	Ala2Val
		Km67	Asp141Ala	Ala2Val	
YNL157W	<i>IGO1</i>	K7			
		Km67			
YHR132W-A	<i>IGO2</i>	K7			
		Km67			
YAL016W	<i>TPD3</i>	K7	Asn33Lys		
		Km67			

※fs はフレームシフト機能欠失変異を意味する。

Km67 株の *CDC55* 破壊株において発酵低下が実験室酵母ほど大きくなかった原因を調べるために、細胞壁強度に着目した。*CDC55* 破壊による *PP2A^{B55δ}* の活性低下がもたらす発酵力の低下は細胞壁の肥厚化を伴うことが先行研究より知られる。細胞壁の肥厚化が起こらない変異株においては *PP2A^{B55δ}* の活性低下に伴う発酵低下が抑圧される (Watanabe et al., 2023)。Km67 株の *CDC55* 破壊株における発酵力低下が細胞壁の肥厚化を伴うかを調べるために、Zymolyase 感受性試験を実施した (Figure 2-3-14)。結果、*CDC55* 破壊によって Km67 株は細胞壁強度が高まることが分かった。さらに細胞壁の肥厚化を促進するために *Msn2p* の過剰発現プラスミドである *pMK007* を Km67 株の *CDC55* 破壊株に導入し、同様に Zymolyase 感受性試験を実施した。結果、野生型株、*CDC55* 破壊株、*CDC55* 破壊株に *Msn2p* の過剰発現プラスミドを導入した株の順に細胞壁強度が高まることが分かった。

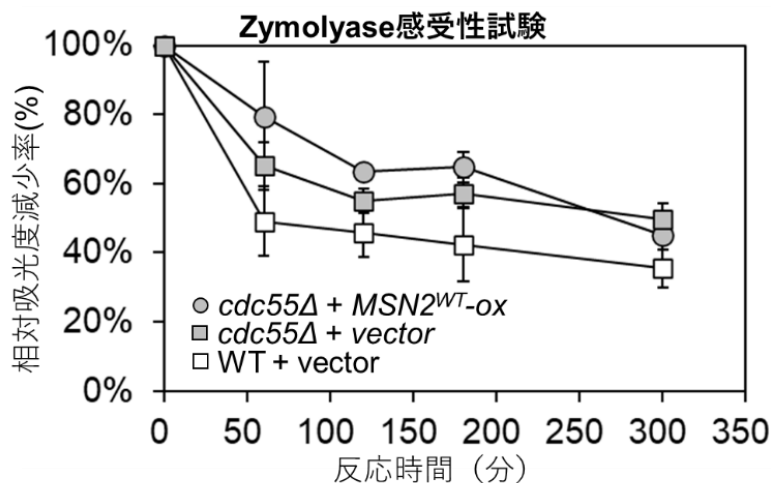


Figure 2-3-14. Km67 株とその変異株の Zymolyase 感受性試験

また、野生型 Km67 株とその *MSN2* 過剰発現株、Km67 株の *CDC55* 破壊株とその *MSN2* 過剰発現株を一段小仕込み試験に供し、発酵性を比較した (Fig. 2-3-15)。結果、野生型 Km67 株では、*MSN2* 過剰発現によって発酵力の低下が統計的に有意ではないが観察された。Km67 株の *CDC55* 破壊株は *MSN2* 過剰発現によって発酵力が有意に低下することがわかった。

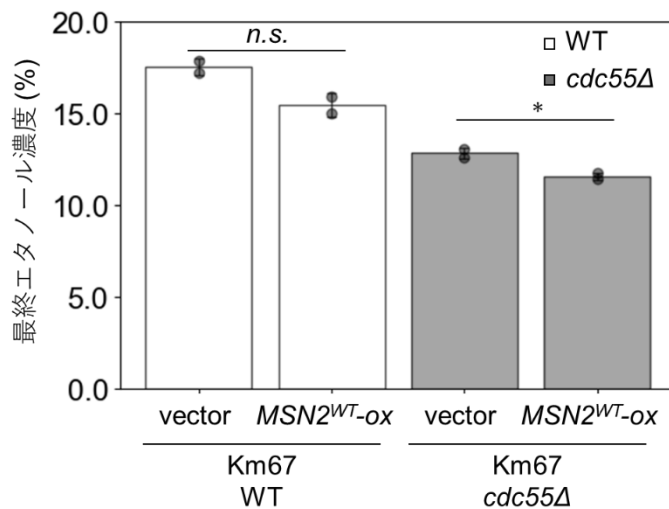


Figure 2-3-15. Km67 株とその変異株の清酒小仕込み試験

これらの結果をまとめると、*CDC55* 遺伝子を破壊し $PP2A^{B558}$ 活性が大幅に低下しても、Km67 株では発酵が大きく低下しないことが分かった。一方で、多少なりとも *CDC55* 破壊で発酵能が低下した事実は、Km67 株の Rim15p の下流経路の発酵制御機能が完全に喪失していないことを示唆した。人工的に細胞壁強度を高めたところ、段階的な細胞壁の強化に伴い、発酵が段階的に低下することが分かった。細胞壁強度と発酵性は負の相関を示すことが報告されており (Watanabe et al., 2023)、Km67 株でも同様に高発酵性が細胞壁強度の恒常的な低下に起因すると推測された。

2-4 結言

2-4-1 Km67 株に存在が推定される第三の因子

本研究で分かった Km67 株の発酵制御機構を Fig. 2-4-1 に示す。遺伝子上流への摂動として、Rapamycin 処理および *SCH9* 破壊を実施したところ Km67 株の発酵性には影響を与えないことが分かった。*RIM15^{Km67}* に存在するいくつかの非同義置換の発酵性への影響を調べたところ、*RIM15^{Km67}* は発酵抑制機能を欠失していないことが分かった。*RIM15^{Km67}* のプロモーター領域は発酵性へ影響がないことを確認した。また、Rim15p の過剰発現や欠損は Km67 株の発酵性に影響を与えないことが分かった。一方、Rim15p の下流への摂動として *CDC55* 遺伝子の破壊を行ったところ、Km67 株では発酵力が低下することが分かった。この結果は、Km67 株において Rim15p の下流は発酵制御のための機能を喪失していないことを意味する。ただし、*CDC55* 破壊によって細胞形態に異常をきたすほど $PP2A^{B558}$ 活性が低下しても実験室酵母ほど大きく発酵力が低下しないことから、

Km67 株の発酵性を高く保つ因子は他にも存在すると考えられた。Rim15p の過剰発現や PP2A^{B558} 活性の人工的な低下でも Km67 株は発酵性が大きく低下しなかったことから、その因子は Rim15p の制御化にはない独立した因子であることが示唆された。その因子の機能としては 2 通り考えられる。第一の候補が PP2A^{B558} と同じ機能を有し Msn2p の活性を低下させるという機能で、第二の候補が Msn2p と真逆の機能を有し Msn2p の活性低下を模倣した状態を作り出すという機能である。

その因子の同定方法としては遺伝学的なスクリーニングと RNAseq データの探索が有効であると考えられる。Km67 株には機能欠失変異や非同義置換が挿入された遺伝子が複数存在し、それらの変異によって遺伝子機能に変化し発酵性に影響を与えた可能性が考えられる。それらの変異のうちから、発酵性に影響を与える因子を同定するには遺伝学的なスクリーニングが有効と考えられる。遺伝学的なスクリーニングはその因子の性質によって異なる。当該因子が何か新しい性質を酵母に付与する因子 (Gain-of-function 型) であると仮定する。この場合、Km67 株のゲノムライブラリーまたは mRNA ライブラリーを X2180 株の CDC55 破壊株に導入し、発酵能が高まった株を取得すると当該因子を同定できる。一方、当該因子が何かのブレーキに該当し、その機能が Km67 株内で欠失していた (Loss-of-function 型) と仮定する。この場合、Km67 株の CDC55 破壊株に X2180 株の CDC55 破壊株のゲノムライブラリーまたは mRNA ライブラリーを相補し、発酵性が低下する株を取得すると当該因子を同定することができると考えられる。

RNAseq データの探索による第三の因子特定には、Fig. 2-3-6 で実施した転写因子の Enrichment 解析が有効である。K701 株には検出されず、Km67 株でのみ検出された転写因子である HAC1 は第三の因子の候補となる。HAC1 はタンパク質品質維持管理機構に関連する遺伝子のプロモーターに結合する転写因子である。発酵性との関連性はこれまでの研究では見いだされていないが、Km67 株でのみその機能が低下していることから、HAC1 の機能低下が Km67 株において機能が保持される RIM15 の発酵抑制機能を打ち消す効果が期待される。これらを明らかにするためには、HAC1 の人工的な機能強化による発酵性への影響をしらべることで、発酵性との関連性を明らかにすることができる。また、本稿では触れなかったが、発現上昇遺伝子のプロモーター領域で Km67 株に固有に存在する転写因子も検討の対象となる。また、Km67 株では X2180 株と比べて発現量が上下した遺伝子が多数存在する。それらの発現変動が発酵性に影響を与えた可能性は考えられるが、そのうちどの遺伝子の発現変動が発酵性に影響をあたえたかを同定するには遺伝学的なスクリーニングを組み合わせる必要があると考えられる。

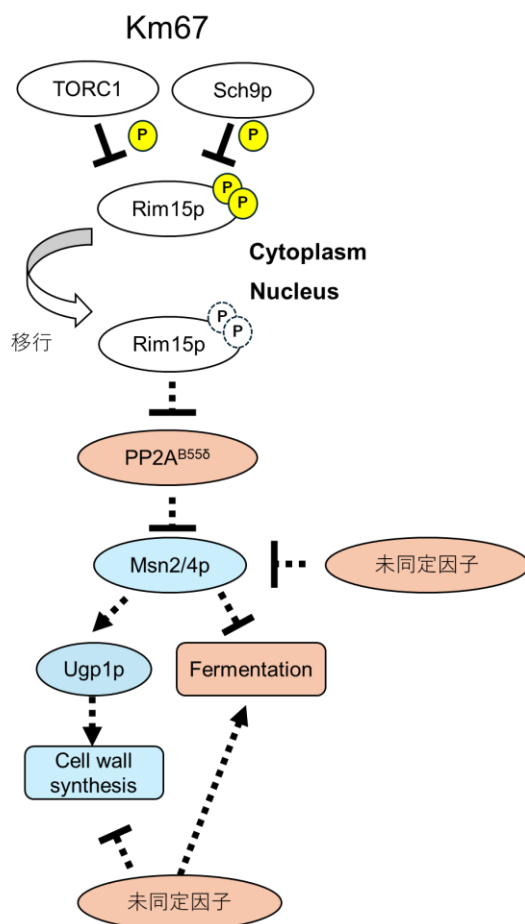


Figure. 2-4-1 Km67 株の発酵制御機構

2-4-2 清酒酵母の高発酵性と系統関係

K701 株と Km67 株はそれぞれ長野県と兵庫県において単離された酵母であり、前述のとおりゲノムレベルでの系統解析から異なる **clade** に属することが分かっている。両株は人工的に作り出された濃糖・低 pH・低温の清酒醸造環境において、優れた発酵性を指標に選抜されてきたという点で株取得の経緯が類似している。元々は異なる生息地にいた異なる系統の酵母であったが、清酒製造環境へ適応する過程で、それぞれ異なる遺伝子への変異によって G₀ 期に入りにくいという同一の形質を獲得したと推測される。

先行研究にて日本で単離された出芽酵母は遺伝的多様性が非常に低いことが知られる (Peter et al., 2018)。顕著に低い遺伝的多様性は、日本が海に囲まれた島国であるという地理的条件によって生じたボトルネック効果に起因するのではと推測される。従って、Modern 型の清酒酵母も Classical 型の清酒酵母も、共通祖先は非常に近縁であると考えられる。また、清酒酵母は産業利用が繰り返され

る過程で家畜化され、その痕跡がゲノム配列に存在する (Peter et al., 2018)。本研究で見られた現象は収斂進化のような現象であるが、そのことを証明するためには、統計的な手法に基づいた更なる系統解析が必要である (Stayton, 2015)。ただし遺伝統計学的手法をゲノム配列に家畜化の形跡を有する生物に適用することは難しく、更なるデータの蓄積が必要となる。本研究では Modern 型と Classical 型の清酒酵母に共通する表現型が多様な遺伝的背景によって生じうることを示すことができた。

2-4-3 Classical 型の清酒酵母と Modern 型の清酒酵母の共通点と相違点

本研究の目的は Km67 株を Classical 型の清酒酵母の代表例として取り上げ、その高発酵性に資するシグナル伝達を Modern 型清酒酵母 K701 株と比較し、類似点と相違点を明らかにすることであった。K701 株と Km67 株は発酵性のシグナル伝達に重要な *RIM15* 遺伝子の配列が異なるにもかかわらず、発酵性が同程度に高いという表現型を示す。この遺伝子型と表現型の相違は両株のシグナル伝達における相違を示唆する。本章では、K701 株と Km67 株の高い発酵性を生化学・遺伝学的手法と遺伝情報学的手法を組み合わせ、多階層に渡って比較解析することで、高発酵性に資するシグナル伝達の共通点と相違点を明らかにした。本研究で分かったことを図に示すと以下のようなになる (Fig. 2-4-2)。

第 2 章では初めに、清酒小仕込み試験によって二倍体実験室酵母 X2180 株と比べて K701 株と Km67 株は高い発酵性を有することを確認した (Fig. 2-3-2)。全ゲノム解析によって清酒酵母の系統関係を全ゲノムレベルで解析したところ、Km67 株と K701 株は遺伝的系統が異なることを明らかにした (Fig. 2-3-1)。RNAseq 解析によって Km67 株と K701 株のトランスクリプトームは類似していることが分かった (Fig. 2-3-5)。転写因子のエンリッチメント解析によって G₀ 期の遺伝子発現誘導に必要な転写因子の活性が両株で低下していることが分かった (Fig. 2-3-6)。また、グルコース抑制関連転写因子が清酒酵母二株に共通して検出され、グルコース抑制が X2180 株よりも強くかかっていることが分かった。グルコース抑制が強くなることで、呼吸や糖新生、グルコース以外の炭素源の利用が抑制され、これらが解糖系のフラックス上昇に寄与すると考えられた。細胞壁や貯蔵糖合成に必須である *UGPI* 遺伝子の発現量が両株で共通して低下していることが分かった (Fig. 2-3-7)。G₀ 期細胞特有の表現型である細胞壁強度と細胞内貯蔵糖量の上昇がみられるかを調べたところ、K701 株と同様に Km67 株では X2180 株よりも細胞壁強度と細胞内貯蔵糖量が低下していることが分かった (Figs. 2-3-3, 2-3-4)。Rim15p の上流への摂動は、Km67 株の発酵性を低下させず、K701 株と同様に Rim15p が細胞内で機能していないことがわかった (Figs. 2-3-9, 2-3-10)。一方、Rim15p の下流への摂動である PP2A^{B558} 活性の人工的な低

下は、Km67 株の発酵性を低下させた。ただし、その程度は K701 株で知られるほど大きな発酵低下ではなかった。(Watanabe et al., 2019) (Figs. 2-3-13, 2-3-15)。Km67 株において PP2A^{B558} 活性の低下に加え Msn2p の人工的な機能強化を施すと、細胞壁強度が高まると同時に発酵性が低下することがわかった (Figs. 2-3-14, 2-3-15)。このことから Km67 株における高い発酵性は細胞壁強度が低く保たれることによって実現すると考えられた。PP2A^{B558} 活性が低下しても Km67 株では大きく発酵が低下しなかったことから、Rim15p とは独立した未同定因子によって Msn2p 活性が低下した状態が模倣され、細胞壁強度が低く維持され、高発酵性が実現していると考えられた。この未知の因子が K701 株と Km67 株におけるシグナル伝達の相違点であった。

第 2 章では、系統が異なる Modern 型と Classical 型の清酒酵母の高発酵性に資するシグナル伝達を多階層解析によって比較し、類似点と相違点を明らかにした。Modern 型と Classical 型の清酒酵母である K701 株と Km67 株は、原因となる遺伝子変異は異なるが、共通のシグナル伝達の異常によって生じる細胞壁強度の低下が発酵性を高めることが分かった。加えて、清酒酵母ではグルコース抑制が強く引き起こされていることがわかり、強いグルコース抑制が解糖系のフラックス上昇に寄与していると考えられた (Fig. 2-4-2)。

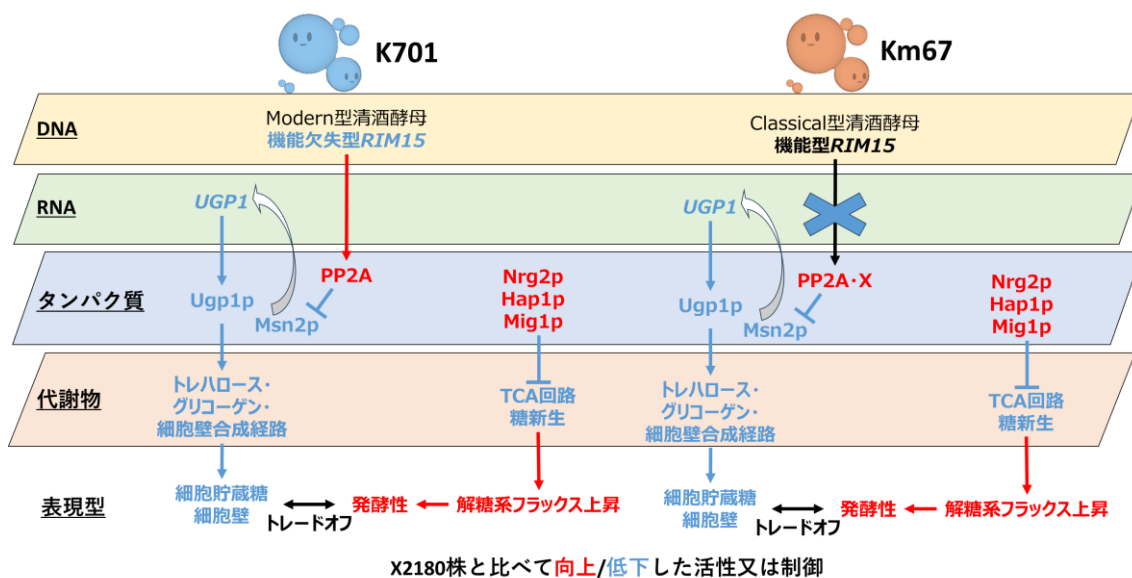


Figure 2-4-2. 第 2 章で得られた知見のまとめ

3 章 メタボローム解析による清酒酵母の代謝メカニズムの解明

概要

背景と目的

- 清酒酵母は解糖系フラックスが高い
- 解糖系の 13 個の反応から解糖系フラックス上昇に寄与している反応を同定する

方法

- メタボローム解析を実施できる疑似清酒培地を作成した。
- メタボローム解析は LC-MS/MS を用いて実施した。
- 実験室酵母 X2180 株と清酒酵母 K701 株と Km67 株の細胞内代謝物濃度を相対比較した。
- $\Delta\Delta G$ 解析によって、解糖系の各反応について株間での平衡の偏りを調べた。

結果

- 培地プロファイルの解析から疑似清酒培地での培養は清酒醪での培養を再現できることが分かった。
- 清酒酵母株では二株に共通してグルコース 6 リン酸とフルクトース 6 リン酸の濃度が高いことが分かった。
- $\Delta\Delta G$ 解析によって、清酒酵母株では GLK, PFK, PYK 反応が活性化している可能性が示唆された。

3-1 緒言

3-1-1 第 3 章の位置づけ

第 2 章では清酒酵母の高発酵性に資するシグナル伝達を調べ、K701 株と Km67 株での類似点と相違点を明らかにした。K701 株と Km67 株では原因変異は異なっていたが、細胞壁強度の低下を介して高発酵性の実現している点が共通していることを明らかにした。一方で、細胞壁強度の低下がどのようにして発酵性の上昇につながるかの知見は存在しない。すなわち、高い発酵性を示す清酒酵母に

において、グルコースをエタノールへと変換する代謝経路である解糖系が、どのように活性化しているかは不明である。解糖系は 13 個の反応で構成され、それぞれの反応は多階層に跨って複雑に制御される (Fig. 3-1-1)。清酒酵母の高発酵性メカニズムを解明するためには、解糖系の 13 個の反応のどの反応が活性化しているかを同定する必要がある。1-1-6 節でも述べた通り、解糖系は多階層に跨る複雑な制御を受ける。従って、解糖系の 13 個の反応から活性箇所を同定するには、解糖系の多階層に跨る制御を理解する必要がある。清酒酵母における解糖系の高いフラックスの原因を特定できれば、より発酵性の高い酵母株の育種に応用することができると考えられる。そのための方法としては、メタボローム解析による代謝物の網羅的な分析が有効である。第 3 章ではメタボローム解析を用いて、第 2 章の解析では得られなかった清酒酵母の解糖系についての知見を獲得する。

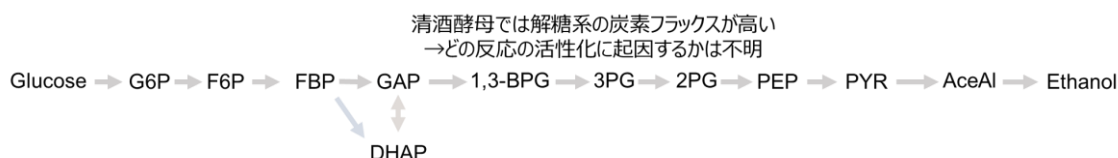


Figure 3-1-1. 解糖系の 13 個の反応

3-1-2 メタボローム解析とは

メタボローム解析とは代謝物の濃度を網羅的に測定する測定技術である。代謝物を網羅的に分析するメタボローム解析を役立てる試みは functional genomics の分野で 1990 年代から活用されるようになった (Sailwal et al., 2020)。すなわち遺伝子の欠損や過剰発現によって変化する代謝物の量や種類を調べ、対象の遺伝子の機能を推定しようという試みである (Oliver et al., 1998)。その後、代謝物データを蓄積して活用する試みが取り組まれるようになり、2012 年には酵母の代謝物を網羅的に収集したデータベースが構築された (Jewison et al., 2012)。また、メタボローム解析を物質生産効率の向上を目的として代謝解析に活用される例も多数存在する (Martien & Amador-Noguez, 2017; Zha et al., 2014)。

メタボローム解析は質量分析装置あるいは NMR によって測定が行われる。NMR を用いたメタボローム解析の利点は非破壊で分析が実施できる点や高い再現性、化合物の構造について情報を得られる点が挙げられる。一方で、デメリットとしてはターゲット分析に向かないことや定量性の低さ、使用の難しさなどが挙げられる (Sailwal et al., 2020)。質量分析装置を用いたメタボローム解析は 1980 年代から行われており、高い選択性および感度を有する (Sailwal et al., 2020)。質量分析装置をもちいた代謝物の測定においては、試料中の化合物を物理化学的性質に基づいてクロマトグラフィーで分離してから順次質量分析装置へと導

入することが多く、高い選択性と定量性を有することが特徴である。化合物は質量分析装置内でイオン化され、質量対電荷比 (m/z) の強度から観察対象分子種の存在量が推定される (Villas-Bôas et al., 2005)。

3-1-3 メタボローム解析における前処理

質量分析装置を用いたメタボローム解析においてはサンプルの前処理が重要である。細胞内における代謝物量は環境状態の変化に対して、核酸やタンパク質に先立って、その組成を変化させる。従って、メタボローム解析における最初のステップは細胞を回収 (サンプリング) して速やかに代謝反応を停止 (クエンチング) させ、細胞内の代謝物濃度の変化を固定させることである。先行研究によって多種多様なサンプリングおよびクエンチング方法が提案されている (Mashego et al., 2007)。

サンプリングは迅速であることが重要であり、一例として培養液からクエンチまでを 0.3 秒以下で完了する自動化デバイスを開発したといった報告も存在する (Schaefer et al., 1999)。サンプリング方法は細胞培養のやり方や用いる微生物によっても大きく異なり、ゴールドスタンダードとなる手法は存在しない。

クエンチングも同様であり、出芽酵母では液体窒素を使用した方法 (Sácz & Lagunas, 1976)、氷冷した 60% メタノールを使用する方法 (Koning & Dam, 1992)、 -40°C のメタノールを使用する方法 (Canelas et al., 2008) などが報告されている。これらの手法はクエンチングの際に細胞内部から代謝物が漏出することがデメリットとして知られる。クエンチングに先立ってフィルター法でのサンプリングを行い、フィルターごとメタノールへ浸漬させてクエンチを行う方法も報告されている (Sugimura et al., 2023; Thorfinnsdottir et al., 2023)。この手法は細胞内代謝物の漏出は抑えられ、培地からの持ち込みも抑えられるという利点がある。欠点として、マニホールドや吸引ろ過を使用した手動によるフィルトレーションにはクエンチングまでに数秒を要することが挙げられる。

メタノールでクエンチングされた代謝物は脂溶性成分と水溶性成分の分離を目的として抽出作業に供される。メタノールとクロロホルムと水を混合し、遠心分離によって目的の代謝物を分離する手法が知られる (Bligh & Dyer, 1959)。解糖系などの中心炭素経路の代謝を調べる研究では水溶性代謝物が解析の対象となるため、この抽出方法が適していると考えられる。

3-1-4 清酒酵母のメタボローム解析

第 2 章でも詳述したように清酒酵母は実験室酵母に比べて高い発酵性を有する。遺伝学的なアプローチによって清酒酵母の高発酵性を調査する試みは多数存在するが、代謝に着目して清酒酵母の高発酵性を調べた研究は少ない。解糖系

は 13 個の反応から成り立ち、その制御は酵素量や基質濃度だけでなく、代謝物によるアロステリック阻害や遺伝子発現量によって複雑に制御される (Romeo & Snoep Jacky, 2005)。清酒酵母の解糖系の高いフラックスが、解糖系のどの反応の活性化に起因するかは不明である。メタボローム解析によって解糖系の代謝物を網羅的に測定し、解糖系のフラックスが比較的に低い実験室酵母と比較するといった解析は非常に有用であると考えられる。

先行研究において清酒酵母の細胞内代謝物を測定し、実験室酵母と比較した研究はいくつか存在する。Sugimura らは K701 株を含む様々な酵母株の細胞内代謝物濃度をメタボローム解析によって測定した (Sugimura et al., 2023)。エタノール発酵性と細胞内代謝物濃度の相関から、ピルビン酸からエタノールを変換するまでのギブス自由エネルギー変化 (ΔG) が正に相関を示すことを明らかにし、ピルビン酸消費が高いことがエタノール発酵速度に重要であることが示唆された。また、K701 株のメタボローム解析の結果、G6P、F6P、FBP、DHAP、GAP の細胞内濃度が実験室酵母よりも高いことがわかった。一方で、この研究で実施されたメタボローム解析は合成培地にて実施された解析であり、培養方法や培地成分が清酒醪とは大きく異なる。従って、当研究で得られた知見が清酒醸造環境における酵母の代謝をそのまま説明するとは考えにくい。

Watanabe らは実験室酵母 BY4741 と清酒酵母 K701 株とそれぞれの CDC55 破壊株を YPD 培地にて培養し、メタボローム解析を実施した (Watanabe et al., 2019)。BY4741 株と K701 株は両株ともに、CDC55 破壊によって培養開始一日目の時点でのフルクトース 1,6 二リン酸 (FBP) の濃度が下がり、ホスホエタノールピルビン酸 (PEP) の濃度が高まっていることが分かった。これらの結果は CDC55 破壊がもたらす発酵遅延が解糖系のどの反応の遅延や変化によってもたらされたかを明らかにした。一方で、実験株と清酒酵母での比較は論文内では行われおらず、清酒酵母の高い発酵性の代謝についての示唆は得られていない。また、これらの検討は YPD 培地で実施されたものであり、清酒醸造環境での酵母の代謝について同様であるかは不明である。

Watanabe らは 20% グルコースを含む YPD 培地で RIM15 を欠失させた実験室酵母のメタボローム解析を実施した (Watanabe et al., 2016)。清酒酵母の発酵性は RIM15 遺伝子の機能と深く関連する。RIM15 遺伝子は発酵のブレーキとして機能し、外部の栄養状態に応じて発酵を抑制する (Pedruzzi et al., 2003)。欠損によってストレス応答が欠如し、細胞周期が G₀ 期へと入りにくくなり、結果として発酵能が大幅に上昇する (Urbanczyk et al., 2011; Watanabe et al., 2011)。清酒酵母 K701 株は RIM15 遺伝子へ機能欠失変異を有しており、その高い発酵性との関連が示唆されている。欠損株では、野生型株に比べて G6P、2-ホスホグリセリン酸 (2PG)、PEP の細胞内濃度が上昇していた。これらの結果から、RIM15 遺伝子破

壊によって生じる代謝の活性化は G6P、2PG、PEP の細胞内プールが高まることによって引き起こされると示唆された。清酒酵母の高発酵性は *RIM15* 遺伝子の欠損と深く関連するが、代謝の活性化が同一のメカニズムであるかは不明である。

3-1-5 清酒醸造条件でのメタボローム解析の難しさ

前述の通り、清酒酵母の高い発酵性を代謝の観点から理解する取り組みは重要であり、解析が行われているが、清酒醪を用いて解析が行われた例は存在しない。その理由としては、清酒醪から酵母細胞を迅速にサンプリングすることの難しさが技術的障壁になっていると考えられる。清酒醪は米と水が混ざり合った半固体の培地であり、米の固形分が多く残存する。そのため、液体培地でよく利用されるフィルター法での酵母菌体のサンプリング手法を適用できず、迅速なサンプリングが困難である。

3-1-6 目的

第 3 章では、前述したメタボローム解析実施にあたっての技術的障壁を克服するための手法として、清酒製造に使用する米・米麴をあらかじめ糖化することで液化した疑似清酒培地を作成した。清酒醪における培養と疑似清酒培地における培養を比較し、疑似清酒培地が清酒醪での培養をよく再現できていることを明らかにした。疑似清酒培地におけるメタボローム解析で得られた清酒酵母の代謝物濃度の網羅的な情報を活用し、代謝物階層とタンパク質階層を跨ぐ多階層解析を行った。これらの解析を通して、解糖系の 13 個の反応から清酒醸造環境における清酒酵母の高い解糖系フラックスに寄与する反応を同定することを目的とする。

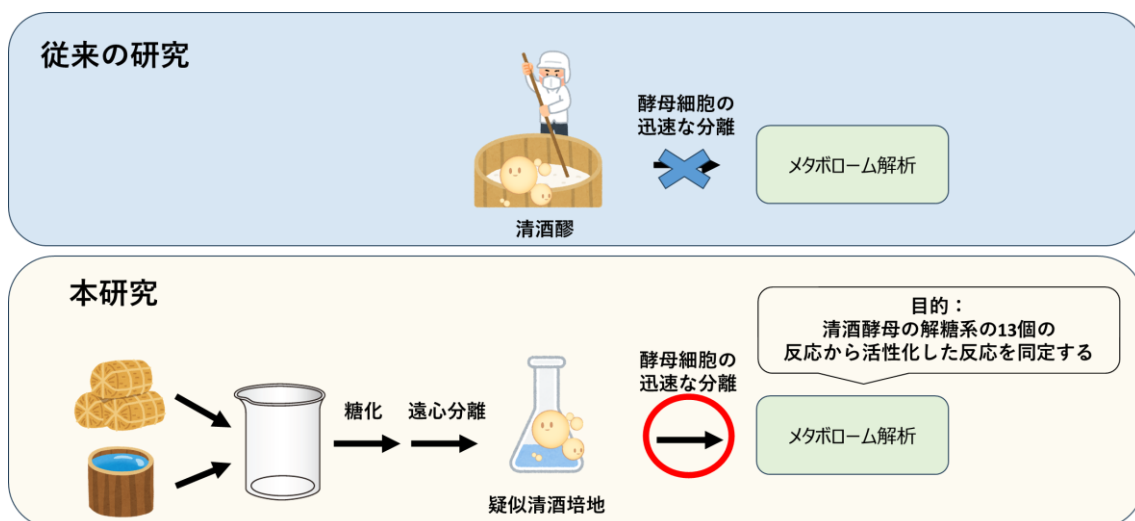


Figure 3-1-2. 本研究の概要

3-2 材料・方法

3-2-1 疑似清酒培地の作成

疑似清酒培地は清酒小仕込み試験に利用される α 化米 AA-70 (精米歩合 70%, 徳島製麹)と乾燥麹 (精米歩合 70%, 徳島製麹)を使用して作成した。 α 化米は 763 g、乾燥麹は 202 g、水は 1729 g、糖化酵素グルク 100G (天野エンザイム)を 300 mg 混ぜ合わせて糖化させることで得た。糖化反応は梅酒瓶 (東洋ガラス)に材料を入れ、58°C、70 rpm に設定した培養器 (BR-22M, タイテック株式会社)にて一晩培養することで実施した。反応終了後の培養液は 6,000 rpm で 10 分間遠心分離することで、透明な遠心上清を得た。遠心上清は日本酒度が-100 となるように加水し、酸度が 2 となるように乳酸を添加した。その後、フィルターろ過して培養に使用した。

3-2-2 用いた株と培養条件

二倍体実験室酵母 X2180 株、清酒酵母 K701 株、清酒酵母 Km67 株は菊正宗酒造に保存された菌株を使用した。実験で使用した SD2 培地の組成は 2%グルコース、0.67% yeast nitrogen base without amino acids である。SD20 培地の組成は 20%グルコース、0.67% yeast nitrogen base without amino acids、1.8%乳酸である。SD2 培地および SD20 培地での培養について、YPD 培地 (1 % yeast extract, 2 % bacto-peptone, 2 % グルコース)で 30°C, 130 rpm で一晩前々培養を行い、SD2 培地へ継代し 15°C 静置で 24 時間前培養を行った。全培養後の菌体は 50 mL の SD2 培地および SD20 培地へと $OD_{660} = 0.1$ となるように植菌した。SD2 培地および SD20 培地での本培養は 15°C 静置で行い、それぞれ 120 時間、144 時間培養を行った。疑似清酒培地での培養は、YPD 培地で 30°C, 130 rpm で前々培養した菌体を 50 mL の YPD 培地へ継代し、30°C, 130 rpm で 24 時間前培養を実施した。全培養後の菌体は $OD_{660} = 0.1$ となるように疑似清酒培地へ植菌し、15°C で 240 時間静置培養した。

3-2-3 清酒小仕込み試験

清酒小仕込み試験は第 2 章, 2-2-4 項と同様の方法で実施した。

3-2-4 細胞数の計測

清酒小仕込み試験における細胞数の計測は、システム生物顕微鏡 BX53 (オリンパス株式会社)でトーマ血球計算盤 (エルマ販売株式会社)を用いて実施した。液体培地での細胞数の測定は吸光度から推定した。 $OD_{660} = 1.0$ を 2×10^7 細胞に

相当すると近似して細胞数を決定した。

3-2-5 細胞外代謝物濃度の測定

培地中のエタノールとグルコースの濃度は、Agilent 1200 Series high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Technology) を用い、RID 検出器と配位子交換カラム KS-802 を用いて測定した。カラム温度は 80°C に設定し、流速 0.5 mL/min の水を移動相に用いた。

3-2-6 メタボローム解析

細胞内代謝物の濃度測定は先行研究 (Sugimura et al., 2023) に変更を加えて実施した。すなわち、培養液中の酵母細胞は pore size 0.45 μm の PTFE フィルター (Omniport, Merck Millipore) を用いて回収し、内部標準として 20 μM の D-カンファースルホン酸を含む氷冷したメタノール 1.6 mL にて素早くクエンチした。クロロホルム、水をそれぞれ 1.6 mL、0.64 mL ずつ加え Vortex にて混合することで代謝物の抽出を行った。混合液は 3,700 rpm、4°C で 20 分間遠心することで、上清とフィルターを分離した。上清は真空濃縮を行い乾固した後、超純水に溶解して LC-MS/MS での分析に供した。

代謝物の分析は PFPP カラムを使用した PFPP LC-MS/MS とイオンペア試薬を使用し C18 カラムを使用した Ion pairing LC-MS/MS によって測定した。分析は先行研究の条件をもとに実施した (Sugimura et al., 2023)。

3-2-7 $\Delta\Delta G$ 解析

計算は先行研究に倣って実施した (Matsuda et al., 2025)。ギブス自由エネルギー変化は反応商を Q とすると以下の式で表される。

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q$$

ここで ΔG^0 は標準ギブスエネルギー変化を指し、 R は気体定数 (8.314 J [K mol]⁻¹)、 T は温度 (K) を表す。X2180 株と K701 株間でのとある反応の ΔG の差分 $\Delta\Delta G_{K701/X2180}$ は以下のように計算される。

$$\Delta\Delta G_{K701/X2180} = \Delta G_{K701} - \Delta G_{X2180}$$

X2180 株と K701 株の反応商を Q^{K701} 、 Q^{X2180} とすると $\Delta\Delta G_{K701/X2180}$ は以下で計算される。

$$\Delta\Delta G_{K701/X2180} = -RT \ln(Q^{K701}/Q^{X2180})$$

3-2-8 多変量解析

主成分分析 (PCA) は Python 3.8.8 の Scikit-learn package (version 0.24.1) を用いて実施した。図の作図には Python の Matplotlib package を使用した。

3-3 結果

3-3-1 清酒醪における清酒酵母の発酵特性の特徴付け

初めに、実験室酵母 X2180 株と清酒酵母 K701 株を清酒醪で培養することで、K701 株の高発酵性の代謝的性質を特徴づけた。清酒三段仕込みによって X2180 株と K701 株を培養し、培養上清と細胞数を経時的に測定した。清酒醪でのエタノール濃度とグルコース濃度の経時的推移を以下に示す (Fig. 3-3-1)。

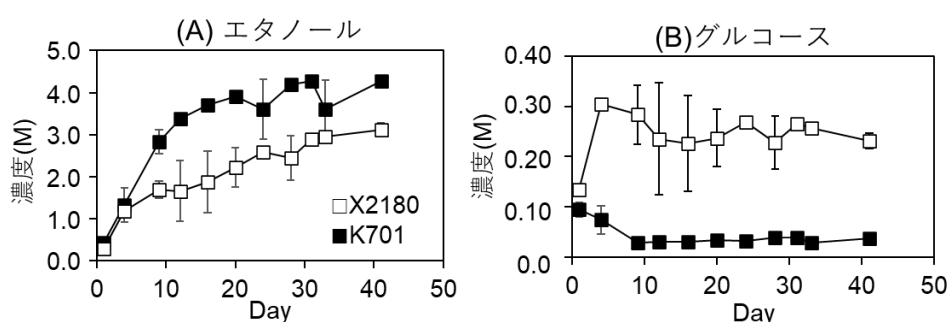


Figure 3-3-1. 清酒醪における X2180 株と K701 株の培養上清の (A)エタノールと (B)グルコースの経時的濃度変化 横軸日数は培養開始後日数をしめす。

清酒三段仕込みにおいては原料となる米を 4 日間で 3 回に分けて容器へと投入する。3 回目の米投入が完了し、材料がすべて揃った植菌後 4 日目を培養開始 1 日目とした。アルコール発酵は最初に米と酵母を混ぜあわせた日から始まる。Fig. 3-3-1 の 1 日目は培養開始 1 日目に相当し、ここでエタノール濃度が 0 M でないのは培養開始 1 日目までに丸 3 日間の培養期間が存在するためである。

培養開始 1 日目における K701 株のエタノール濃度は 0.43 M であった。K701 株の醪のエタノール濃度は培養開始 20 日目近辺で増加がなだらかになった。最終的に培養開始 41 日目時点でエタノール濃度は 4.3 M となった。X2180 株の清酒醪におけるエタノール濃度は培養開始 9 日目以降で K701 株との差が顕著となった。この結果から X2180 株は培地中のエタノール濃度が 1.2~1.6 M 程度に達すると発酵能が低下することが分かった。

K701 株の清酒醪ではグルコース濃度は発酵期間を通して 0.1 M 以下に保たれた。一方で X2180 株の清酒醪では培養開始 8 日目以降、グルコース濃度が 0.2~0.4M に維持された。この結果は X2180 株のグルコース消費速度が低いことを意味する。清酒醸造過程では麴による米の糖化と、酵母による発酵が同時に起こるため、グルコースの生成と消費が同時に進行する。また、麴の糖化酵素アミラーゼは環境中のグルコース濃度に応じてその活性を低下させる。高いグルコ

ース消費速度を有する K701 株ではグルコース生成と消費が 0.1 M 以下の濃度で釣り合い、グルコース消費速度が遅い X2180 株では、グルコース生成と消費のつり合いが 0.2~0.4 M の範囲になったのではと考えられる。

清酒醪における酵母の細胞数は顕微鏡で計測した。培養開始 1 日目の K701 株の細胞は $1.8 \times 10^8 \text{ cells (mL)}^{-1}$ であり、これは X2180 株の細胞数より 2.45 倍高かった (Fig. 3-3-2A)。前述の通り、培養開始 1 日目は植菌してから 4 日目に相当し、初期植菌量は両株で同じ菌数に統一したが、培養開始 1 日目までの間に差がついたと考えられた。両株の細胞数は培養開始 4 日目にはプラトーに達し、4 日目から 20 日目までの K701 株の平均細胞数は $4.2 \times 10^8 \text{ cells (mL)}^{-1}$ であり、これは X2180 株の平均細胞数よりも 94% 高かった。続いて、細胞数とエタノール濃度から両株のエタノール比生産速度を算出した (Fig. 3-3-2B)。K701 株のエタノール比生産速度は $2.8 \times 10 \text{ mM (} 10^8 \text{ cells} \cdot \text{h)}^{-1}$ であり、X2180 株よりも 27% 高いことが分かった。

これらの結果から、K701 株は 4 つの優れた発酵特性を有することが分かった。すなわち、①高いエタノール比生産速度 ②グルコース比消費速度 ③高い細胞密度 ④高いエタノール濃度下での高いエタノール生産能の維持 の 4 つである。

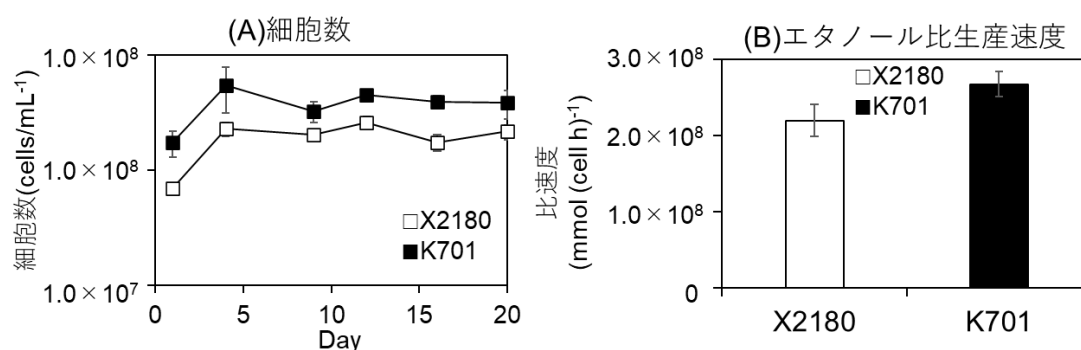


Figure 3-3-2. 清酒醪における X2180 株と K701 株の (A)細胞数と (B)エタノール比生産速度

3-3-2 メタボローム解析に使用可能な培地の選定

酵母細胞内の代謝物濃度を正確に測定するためには、迅速なサンプリングおよびクエンチングが必須である。しかし、固形の米と水が混ざり合った清酒醪から酵母を迅速にサンプリングすることは困難であり、清酒醪の酵母を対象としてメタボローム解析を実施するのは困難であると考えられる。そこで、フィルター法での迅速な菌体回収が可能な 3 種類の液体培地 (SD2 培地、SD20 培地、疑似清酒培地) で酵母細胞を培養した。それらの培地において、3-3-1 で示した清酒醪における清酒酵母の優れた発酵性を各培地で再現するかどうかを調べ、度の

培地を清酒醪のモデルに使用するか選定を試みた。

X2180 株と K701 株を 3 種類の液体培地で 15℃ 静置にて培養をおこない、グルコースとエタノールと細胞数に相当する OD₆₆₀ の変化を経時的に測定した。SD2 培地では両株ともエタノール生産を植菌後 24 時間以降に開始した (Fig. 3-3-3A)。植菌後 48 時間で両株ともにグルコースをすべて消費した。96 時間を除いて K701 株は X2180 株よりも細胞数が多いことが分かった (Fig. 3-3-3B)。両株ともに植菌後 24 時間経過してからエタノールの生成を開始した。最終的なエタノール濃度には両株に差がなかった。

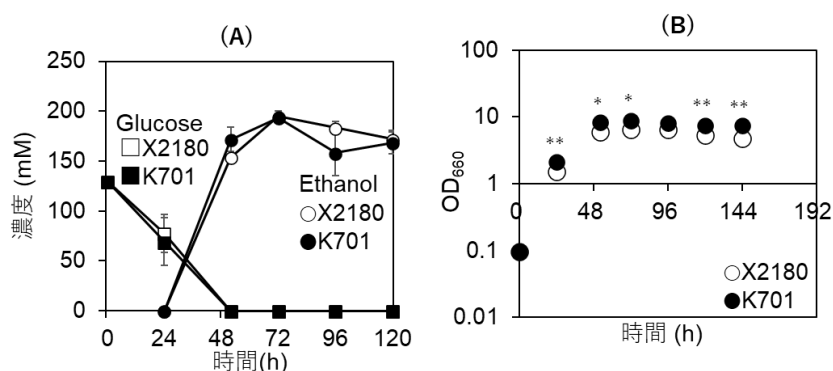


Figure 3-3-3. SD2 培地における X2180 株と K701 株の (A)エタノール濃度とグルコース濃度の推移と (B)細胞密度の推移 *は統計的に有意な差があったことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 3$)

SD20 培地では両株ともに植菌後 24 時間以内にエタノール生産を開始した (Fig. 3-3-4A)。ばらつきが大きかったが、K701 株の培養上清における培養終了時点のエタノールとグルコースの濃度は X2180 株に比べてそれぞれ 24%低く、39%高かった。細胞数は 48 時間以降で K701 株の方が高く推移することが分かった (Fig. 3-3-4B)。

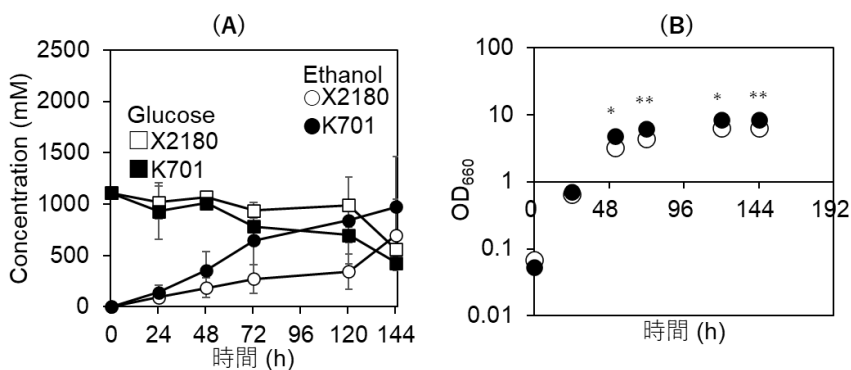


Figure 3-3-4. SD2 培地における X2180 株と K701 株の (A)エタノール濃度とグ

ルコース濃度の推移と (B)細胞密度の推移 *は統計的に有意な差があったことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 3$)

疑似清酒培地では K701 株はグルコースを 240 時間時点でほぼすべて消費したのに対して、X2180 株ではまだ残存していた (Fig. 3-3-5A)。エタノール濃度は K701 株では 240 時間時点で 1.8 M に達し、これは X2180 株のエタノール濃度の 133%に相当した。X2180 株のエタノール生産能は 168 時間以降に大幅に低下した。この時点のエタノール濃度は 1.2M であり、清酒醪で見られたエタノール生産能の大幅な低下を再現した。K701 株の細胞数は 24, 72, 96, 120, 144, 168 時間時点で X2180 株よりも高いことが分かった (Fig. 3-3-5B)。

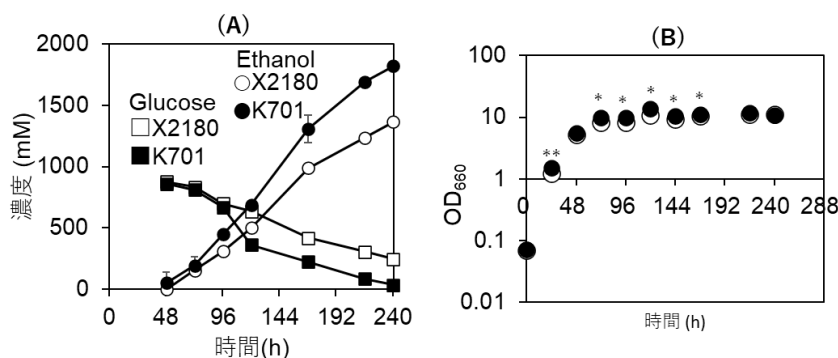


Figure 3-3-5. 疑似清酒培地における X2180 株と K701 株の (A)エタノール濃度とグルコース濃度の推移と (B)細胞密度の推移 *は統計的に有意な差があったことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 3$)

3 種類の液体培地でのエタノール比生産速度とグルコースの比消費速度を測定計算した。SD2 培地では K701 株の方がエタノール比生産速度とグルコース比生産速度が低かった (Fig. 3-3-6A)。これは K701 株と X2180 株でほぼ同量のグルコースがエタノールへと変換されたとき、K701 株の方が高い細胞密度を有するためと考えられた。SD20 培地においては K701 株と X2180 株間でエタノール比生産速度とグルコース比消費速度に差が見られなかった。疑似清酒培地では K701 株がエタノール比生産速度とグルコース比消費速度の両方で X2180 株よりも高い比速度を示した (Fig. 3-3-6B)。疑似清酒培地における X2180 株と K701 株の細胞数の差は、清酒醪で観察された差よりも小さいと考えられるが (Fig. 3-3-2A)、この差分は清酒醪における「見かけの細胞密度」が高いことが原因と考えられる。疑似清酒培地は液体培地であるため菌体が沈殿しフラスコ底面でしか菌が増殖できないが、清酒醪は半固体培地であるため培地全体で増殖するこ

とができる。清酒醪と疑似清酒培地を同じ体積で培養したときに、菌密度とは関係なく清酒醪では培地中の細胞数が増えるために「見かけの細胞密度」が上昇する。見かけの細胞密度は培地の性質上生じる違いであり、菌体の代謝を反映した違いではないため、清酒醪と疑似清酒培地における細胞密度の差分の大きさの違いは無視することができると考えられる。これらの結果から、前述した清酒醪での K701 株の 4 つの優れた発酵特性を疑似清酒培地ですべて再現できることが分かった。

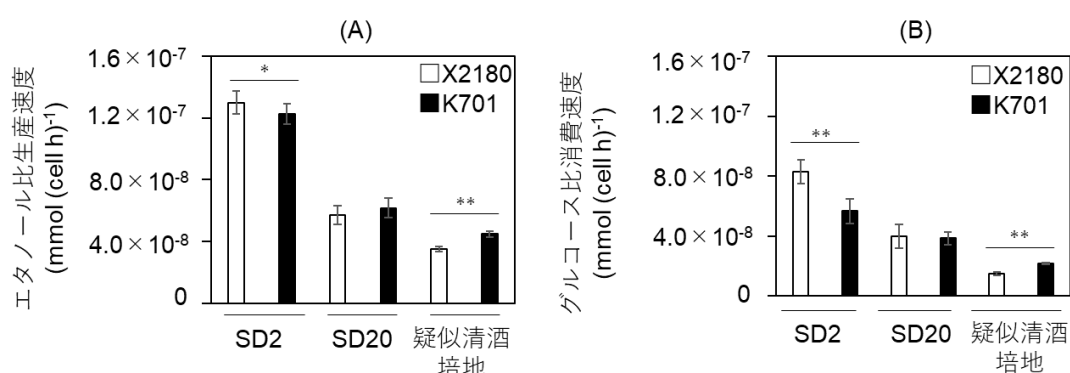


Figure 3-3-6. SD2 培地、SD20 培地、疑似清酒培地における X2180 株と K701 株の (A)エタノール比生産速度と (B)グルコース比消費速度 *は統計的に有意な差があったことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 3$)

3-3-3 メタボローム解析による培地間の酵母の代謝の比較

SD2 培地、SD20 培地、疑似清酒培地で培養した酵母から細胞内代謝物を抽出し、LC-MS/MS にて相対濃度を測定した。それぞれの培地について対数期と定常期の細胞をサンプリングした。すなわち、SD2 培地では 24 時間と 120 時間、SD20 培地では 48 時間と 120 時間、疑似清酒培地では 96 時間と 168 時間でサンプリングを行った。酵母菌体内の代謝物はクロロホルム・メタノール・水法で抽出し、LC-MS/MS によるターゲット分析に供した。結果、70 個の代謝物が測定された。

まず、先行研究との比較を実施した。先行研究にて清酒酵母は細胞内の *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の濃度が高いことが知られている (Kanai et al., 2017)。また、トレハロースの細胞内濃度が清酒酵母では低く維持されることが分かっている (Watanabe et al., 2012)。メタボローム解析の結果、全ての培地において、K701 株は X2180 株よりも SAM 含量が高く、トレハロース含量が低いことが分

かった (Fig. 3-3-7AB)。これらの結果は先行研究の結果と一致した。

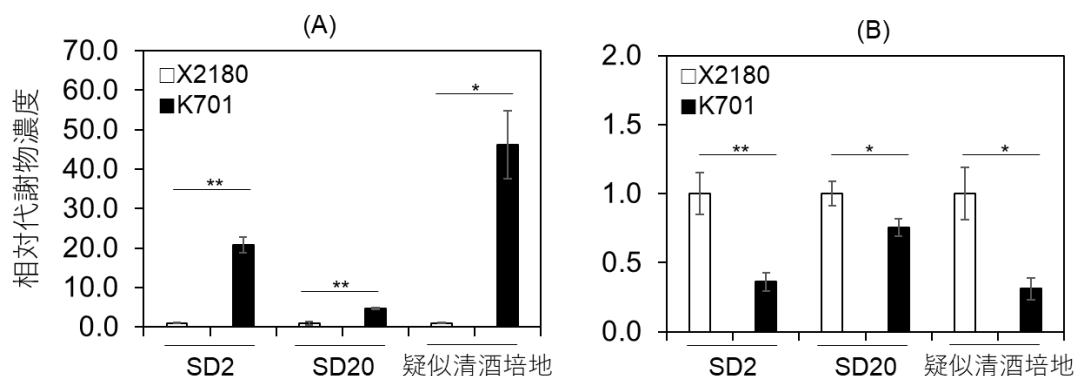


Figure 3-3-7. SD2 培地、SD20 培地、疑似清酒培地における X2180 株と K701 株の (A)SAM と (B)トレハロースの細胞内濃度。X2180 株の濃度を 1 としたときの相対値を示す。*は X2180 株に対して、統計的に有意な差があったことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 3$)

主成分分析 (PCA)によって、SD2 培地、SD20 培地、疑似清酒培地でのメタボロームを可視化した (Fig. 3-3-8)。第一主成分 (PC1)および第二主成分 (PC2)の寄与率は 34.0%および 18.6%であった。SD20 培地と疑似清酒培地はそれぞれ対数期と定常期で一つの二次元プロット上の近くに位置することから、メタボロームが類似していることが分かった。一方、SD2 培地のメタボロームはそれ以外の培地のメタボロームとは異なるグループに属することが分かった。

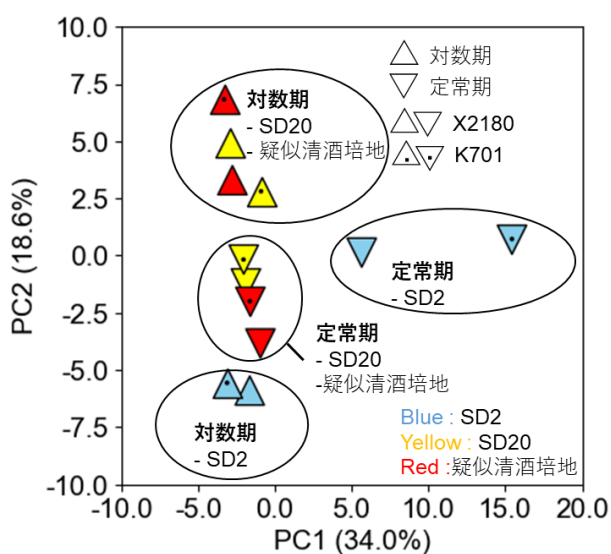


Figure 3-3-8. SD2 培地、SD20 培地、疑似清酒培地における X2180 株と K701 株

のメタボローム解析の主成分分析

SD20 培地と疑似清酒培地のメタボロームを詳細に比較するために、Volcano プロットによって K701 株と X2180 株の代謝物の相対量を可視化した (Fig. 3-3-9A)。相対濃度が 2 倍以上かつ t テストによる有意差検定の p 値が 0.05 以上の代謝物は図上に代謝物名を表記した。つづいて、それらの代謝物が、SD20 培地と疑似清酒培地で共通しているかどうかを調べるために、Venn 図によって代謝物を可視化して比較した (Fig. 3-3-9B)。

対数期の SD20 培地と疑似清酒培地で K701 株で有意に濃度が高かった代謝物はそれぞれ 4 個、14 個あり、そのうち、両株で共通して濃度が高かった化合物は FBP の 1 個だけであった。同様に SD20 培地と疑似清酒培地で K701 株で有意に濃度が低かった代謝物はそれぞれ 8 個、1 個あり、そのうち、両株で共通して濃度が低かった化合物はコハク酸の 1 個だけであった。

定常期の SD20 培地と疑似清酒培地で K701 株で有意に濃度が高かった代謝物はそれぞれ 5 個、7 個あり、そのうち、両株で共通して濃度が高かった化合物は SAM と NAD の 2 個だけであった。同様に SD20 培地と疑似清酒培地で K701 株で有意に濃度が低かった代謝物はそれぞれ 7 個、10 個あり、そのうち、両株で共通して濃度が低かった化合物はコハク酸、グルタチオンジスルフィド (GSSG)、リジン (Lys) の 3 個だけであった。

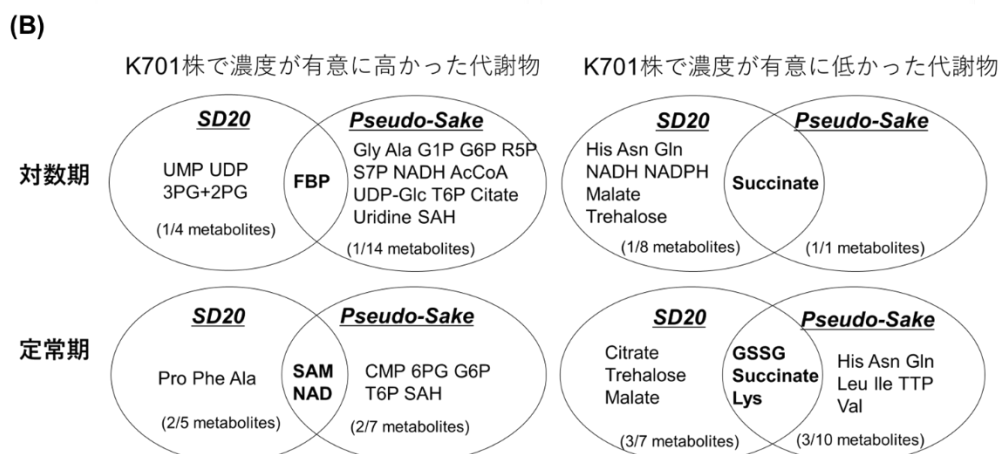
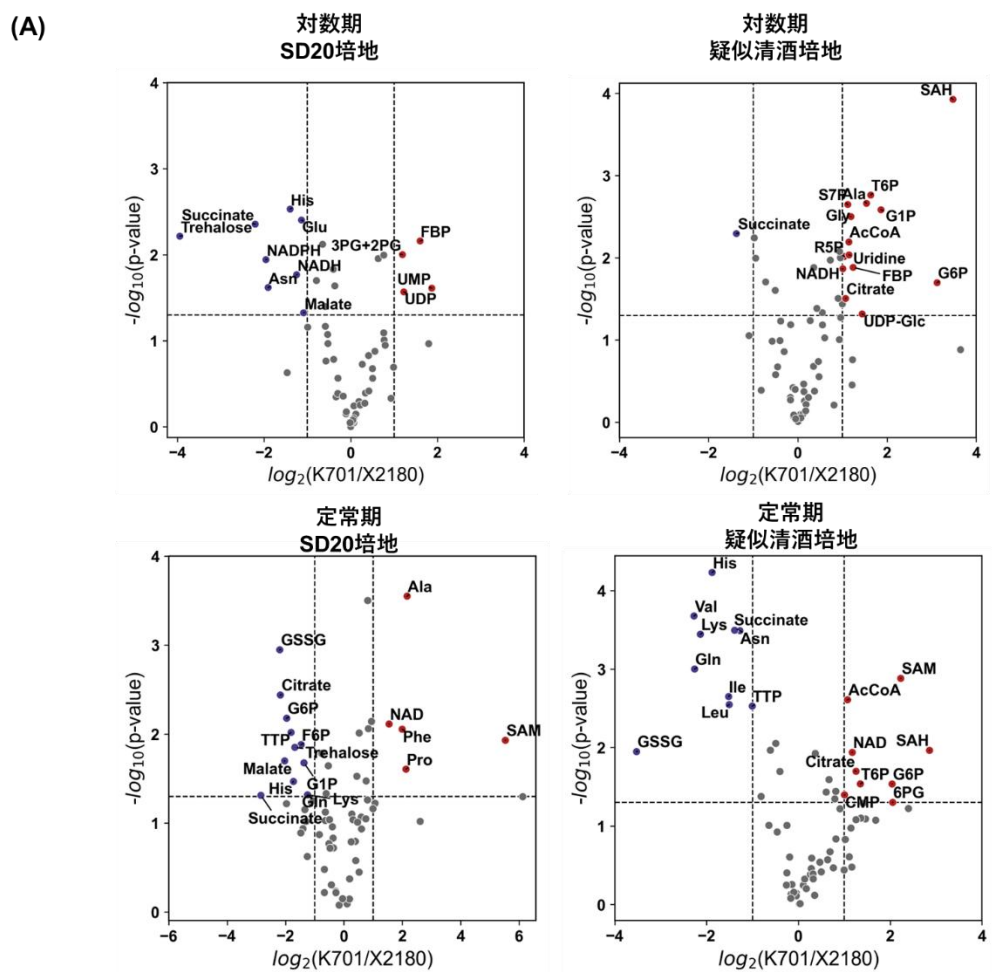


Figure 3-3-9. メタボローム解析の結果。(A)Volcano plot による X2180 株と K701 株のメタボロームの可視化。SD20 培地と疑似清酒培地の対数期と定常期をそれぞれ可視化した。(B)Venn 図による K701 株で有意に細胞内濃度が変化した代謝物の可視化。SD20 培地と疑似清酒培地における対数期と定常期の代謝物をそれぞれ比較し、共通して変化した代謝物は太字で示した。

これらの結果から、SD20 培地と疑似清酒培地において、K701 株と X2180 株で有意に濃度が異なる代謝物の種類は大きく異なることが分かった。PCA では SD20 培地と疑似清酒培地でのメタボロームは類似していると結論付けられたが、個別の代謝物の増減を調べると、両者には違いがあることが分かった。3-3-2 節で実施した培養プロファイルの比較解析から、疑似清酒培地は清酒醪における K701 株の優れた 4 つの発酵特性を再現できていたのに対して (Figs. 3-3-5, 3-3-6)、SD20 培地では一部しか再現できなかったことを示した (Figs. 3-3-4, 3-3-6)。これらの結果から、X2180 と K701 株の清酒醸造環境での代謝の違いを議論するためには疑似清酒培地を用いるのが適していると考えられた。また、SD20 培地などの合成培地は清酒醸造環境における酵母の発酵を調べるのに適さないことが分かった。

3-3-4 メタボローム解析による K701 株の解糖系代謝物濃度の解析

解糖系の制御はエタノール発酵の制御に重要である。X2180 株と K701 株の解糖系の相対代謝物濃度を以下に示す (Fig. 3-3-10)。

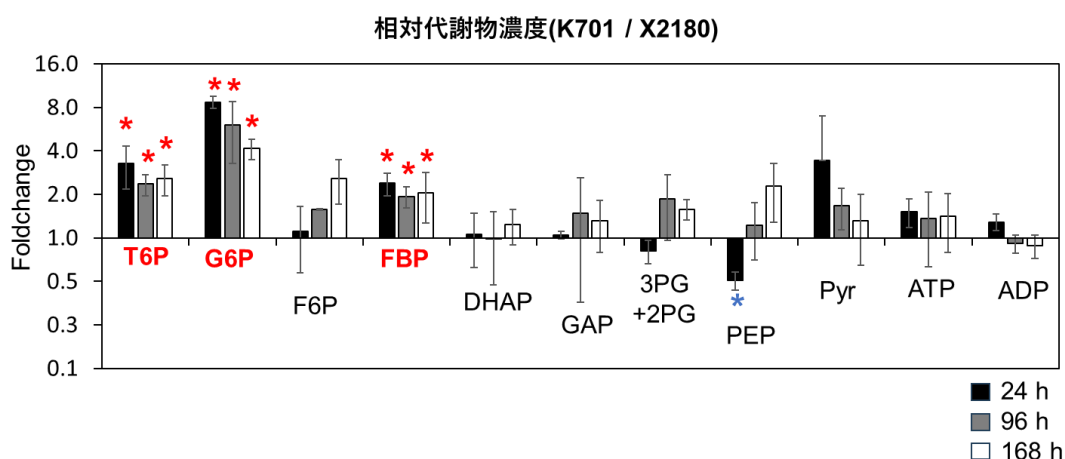


Figure 3-3-10. X2180 株に対する K701 株の解糖系代謝物の相対濃度 *は X2180 株に対して、統計的に有意な差があったことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 3$)

K701 株で有意に増加した代謝物には、24 時間、96 時間、168 時間でのグルコース-6-リン酸 (G6P)、96 時間でのフルクトース-6-リン酸 (F6P)、および 24 時間、96 時間、168 時間でのフルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP)が含まれていた。G6P と FBP を生成する反応は、解糖系における律速反応であると知られる (Conn et al., 1988)。G6P と FBP のプールサイズの増加は、これらの律速反応の K701 株での活性化を示唆し、K701 株における解糖系の炭素フラックスの増加に寄与する

可能性が示唆された。一方、解糖系中間代謝物で有意に減少した代謝物には、24 時間時点でのホスホエノールピルビン酸 (PEP) があげられ、X2180 株と比較して 49% 低い値であった。PEP はピルビン酸 (Pyr) へと変換する過程で ATP を生成する。24 時間時点では K701 株は X2180 株よりも細胞数が多く、また G6P や FBP、SAM といった ATP を消費して生成する代謝物の細胞内濃度が高い。このことから、24 時間時点で K701 株は ATP の需要が高く ATP を生成する反応である PEP の消費が高まったのではと推測された。また、ヘキソキナーゼをアロステリック阻害することが知られるトレハロース 6 リン酸 (T6P) の濃度も全ての時点で有意に高まっていることが分かった。

そこで、疑似清酒培地における細胞内の ATP と ADP の比を X2180 株と K701 株で比較した (Fig. 3-3-11)。X2180 株と K701 株の細胞内の ATP と ADP の比をそれぞれ $\text{ATP/ADP}_{\text{K701}}$ 、 $\text{ATP/ADP}_{\text{X2180}}$ としたとき、 $\text{ATP/ADP}_{\text{K701}}$ に対する $\text{ATP/ADP}_{\text{X2180}}$ の比を $\text{ATP/ADP}_{\text{K701/X2180}}$ とし、以下に示した。結果、24 時間時点では K701 株では ATP/ADP 比が X2180 株よりも有意に低いことがわかった。この結果は K701 株内で ATP の消費が X2180 株よりも盛んである可能性を示唆する。

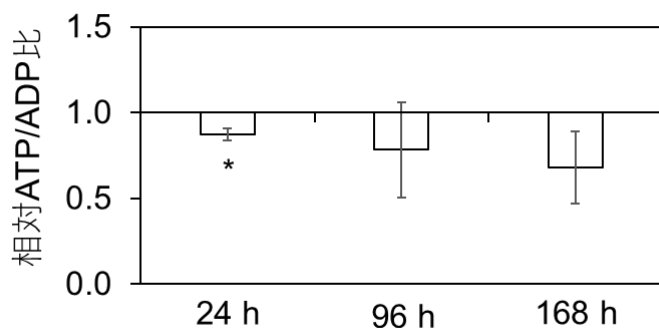


Figure 3-3-11. X2180 株に対する K701 株の ATP/ADP 比 *は X2180 株に対して、統計的に有意な差があったことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 3$)

3-3-5 $\Delta\Delta G$ 解析による K701 株の解糖系の熱力学的解析

ΔG は化学反応において反応物と生成物の熱力学的なエネルギーの差である。 $\Delta\Delta G$ は比較したい二条件の ΔG の差分を意味し、LC-MS/MS によって得られた代謝物の相対濃度から計算することができる (詳細は 3-2-8 項)。 $\Delta\Delta G$ の計算は反応商の割り算で計算されるため、 ΔG の算出では必要だった代謝物の絶対濃度は $\Delta\Delta G$ の計算には不要で、LC-MS/MS で測定された代謝物濃度の Area 値など

の相対値で計算することができる。この計算によって、比較対象となる二条件における平衡反応の相対的な偏りを推定することができる。

本実験条件は培地のグルコース濃度が高く、解糖系の逆向きの反応である糖新生は抑制され、炭素フラックスはグルコースからエタノールへと一方向に進んでいると仮定することができる。この条件において、ある反応の $\Delta\Delta G$ が正の値を示すとき、その反応は対象と比べて進みやすく、高い炭素フラックスへ寄与していると考えることができる。K701 株は X2180 株に比べてエタノール比生産速度とグルコース比消費速度が高く、従って解糖系のフラックスが X2180 株よりも高いことが推測される。K701 株において $\Delta\Delta G$ が正を示す反応は高い反応フラックスへの寄与が考えられる。

解糖系の各反応について、X2180 株に対する K701 株の $\Delta\Delta G_{K701/X2180}$ を算出し解糖系の代謝マップにて可視化した (Fig. 3-3-12)。GLK は細胞内グルコース濃度は未測定であるため、グルコース取り込み反応とグルコースのリン酸化反応を縮合した反応である。TDH-ENO は 1,3-BPG、3PG、2PG が未測定なため GAP と PEP 濃度を利用して計算した反応である。PDC-ADH1 は細胞内のエタノール濃度を測定できないため、培地中のエタノール濃度を用いて算出した。

結果、解糖系の反応のうち、24 時間時点において GLK, PFK, PYK が正の値を示した。GLK, PFK, PYK は解糖系の律速反応であることが先行研究で報告される (Conn et al., 1988)。一方、PGI が大きく負の値を示すことがわかった。これは K701 株の G6P の濃度が高いことが原因であると考えられた。 $\Delta\Delta G$ 解析では代謝物の絶対濃度を計算に使用しないため、計算で得られた値から反応がどちらの方向に進んでいるかを推定することはできない。本研究での分析条件では培地のグルコース濃度が高く、酵母は盛んにエタノール生成を行っており、PGI 反応が F6P から G6P へと逆向きに進んでいるとは考えにくい。ここで PGI の $\Delta\Delta G$ が負の値を示すことは、X2180 株と比べて K701 株では PGI 反応の平衡が G6P 側に寄っていることを示唆する。解糖系を流れるフラックスは K701 株の方が大きいいため、PGI 反応の平衡が G6P 側に寄っても、全体のフラックスには影響を及ぼしていないと推定される。

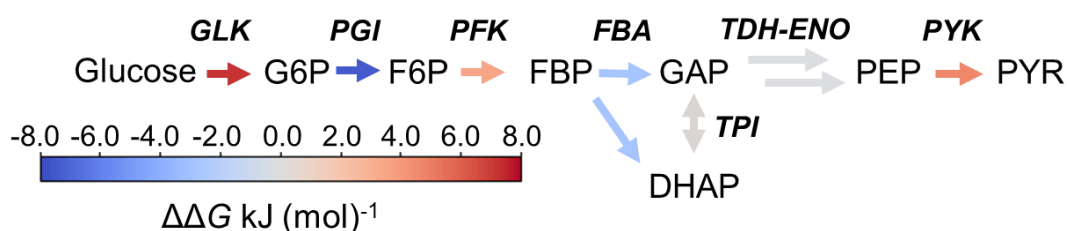


Figure 3-3-12. 疑似清酒培地における $\Delta\Delta G_{K701/X2180}$ 。計算には培養後 24 時間時点の代謝物濃度を用いた。

3-3-6 Classical 型の清酒酵母 Km67 株のメタボローム解析

続いて、K701 株で見られた代謝の活性化が Km67 株においても見られるかを調べた。同様に Km67 株を米糖化液で培養し、サンプリングを行い LC-MS/MS によって細胞内代謝物濃度を測定した。結果、K701 株と同様に Km67 株でも G6P、FBP、T6P の細胞内濃度が X2180 株よりも有意に高まっていることが分かった (Fig. 3-3-13)。

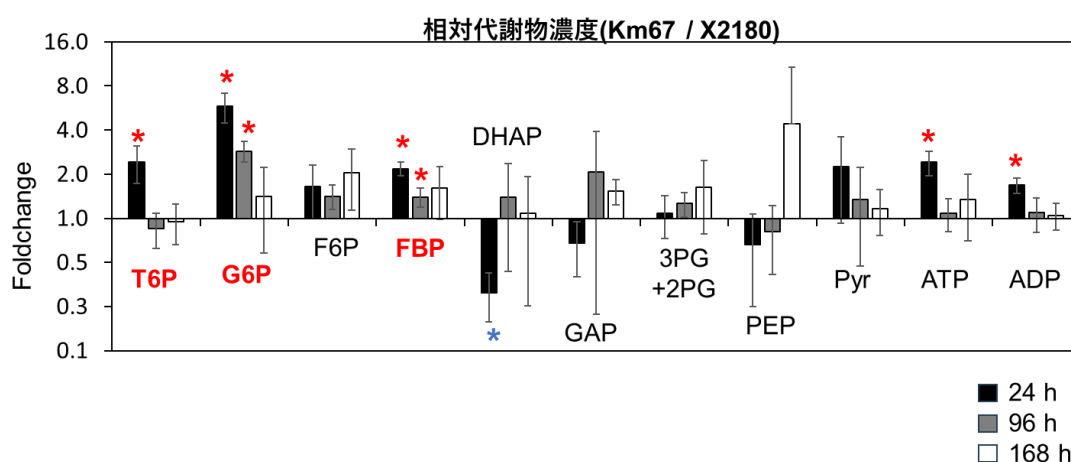


Figure 3-3-13. X2180 株に対する Km67 株の解糖系代謝物の相対濃度 *は X2180 株に対して、統計的に有意な差があったことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 3$)

また、相対代謝物濃度から $\Delta\Delta G_{Km67/X2180}$ を算出し解糖系の代謝マップに可視化した (Fig. 3-3-14)。結果、Km67 株でも K701 株と同様に GLK, PFK, PYK が正の値を示すことが分かった。加えて、TPI, THD-ENO も正の値を示すことが分かった。THD-ENO は前述の通り複数の反応を縮合した反応であり、そのうちのどの反応の活性化を示唆するかを推定することは難しい。Km67 株では FBA が大きく負の値を示した。その原因としては、Km67 株では FBP の濃度が高く DHAP の濃度が低いため、計算上大きく負の値を示したと考えられる。解糖系を流れるフラックスは X2180 株よりも高く、また逆向きの反応が起こっていないことを考えると、FBA の $\Delta\Delta G$ が負の値を示すことは解糖系全体のフラックスに影響を与えないと考えられる。

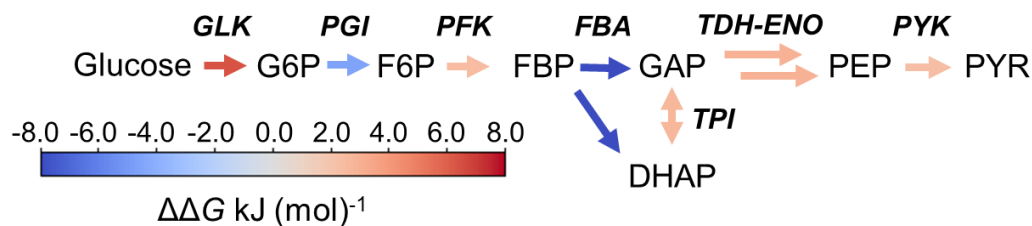


Figure 3-3-14. 疑似清酒培地における $\Delta\Delta G_{Km67/X2180}$ 。計算には培養後 24 時間時点の代謝物濃度を用いた。

3-3-7 解糖系酵素活性の代謝物制御についての考察

K701 株と Km67 株では共通して、GLK, PFK, PYK 反応の $\Delta\Delta G$ が正の値を示した。これらの反応は解糖系の律速酵素であり、解糖系代謝物や補酵素によってアロステリック制御を受けることが知られる。ここでは GLK, PFK, PYK 反応のアロステリック制御の有無を考察する。

GLK 反応の主要酵素である Hxk2p は T6P と ATP によって負の制御を受ける (Blázquez et al., 1993; Grüning et al., 2025)。本研究では K701 株と Km67 株で GLK 反応が高い培養 24 時間時点で G6P と T6P と ATP 濃度がすべて X2180 株よりも上昇していた (Figs. 3-3-10, 3-3-13)。この結果は GLK 反応に対する T6P と ATP による負の制御と矛盾する。清酒酵母の Hxk2p の塩基配列には非同義置換がないため、T6P や ATP の結合サイトに変異が生じアロステリック制御が行われなくなったとは考えにくい。GLK 反応はリン酸化によって活性が制御されることから、リン酸化状態が X2180 株と清酒酵母では GLK 反応に資する酵素のリン酸化状態が異なっている可能性が示唆された。また、3-3-6 節で述べたように本研究で定義する GLK 反応にはグルコース取り込み反応が含まれる。グルコース取り込み反応の活性化が GLK 反応全体を高めた可能性も考えられる。

PFK 反応はフルクトース 2,6 リン酸 (F2,6BP) と AMP によってアロステリック制御を受けることが報告されている (Betz et al., 1975; Heinisch et al., 1996)。本研究では F2,6BP は測定できておらず、AMP は株間で濃度差がなかった (data not shown)。他の生物種では ATP や ADP による制御も報告されているが、K701 株と Km67 株の ATP と ADP の濃度差は小さいことから、PFK 反応への影響は小さいと考えられた (Fig. 3-3-15, 3-3-16)。PFK 反応も活性化について代謝物による明確な制御の示唆は見いだせなかった。

PYK 反応は FBP によってフィードフォワード制御を受ける (Xu et al., 2012)。疑似清酒培地における培養開始 24 時間時点で FBP 濃度の上昇および PYK の活性上昇は K701 株と Km67 株の両株で示唆されており、この現象は先行研究の知見と一致することが分かった。

3-3-8 解糖系酵素遺伝子の遺伝情報解析

これまでの結果から、K701 株と Km67 株では共通して、GLK, PFK, PYK 反応が活性化している可能性が示唆された。PYK 反応の活性化は FBP によるフィードフォワード制御で説明されると考えられた。一方、K701 株と Km67 株における GLK, PFK 反応の活性上昇については代謝物による制御では説明できないと考えられた。そこで、GLK, PFK 反応を触媒する酵素の遺伝子配列に塩基置換が存在するかどうかを調べた。H XK1, H XK2, GLK1, PFK1, PFK2 の塩基配列を対象として第 2 章で実施した次世代シーケンサーデータを用いて配列解析を行った。結果、H XK1, GLK1, PFK1, PFK2 において非同義置換が確認された (Table 3-3-1)。H XK2 には非同義置換は確認されなかった。H XK1, GLK1, PYK1 への塩基置換は K701 株と Km67 株で同様であった。PFK1 について K701 株では Lys847Glu がみられ、Km67 株では Leu672Phe がみられた。Table 3-3-1 で示した全ての置換について、変異による活性への影響と翻訳後修飾の有無を SGD にて検索した (Engel et al., 2025)。結果、これらの残基置換が酵素活性に影響を与えるという先行研究の報告はなかった。また、非同義置換が生じた残基のなかで翻訳後修飾の存在が報告された残基はなかった。従って、これらの変異が酵素活性に影響を与えている可能性は低いと考えられた。これらの変異の酵素活性への影響を明らかにするためには、更なる遺伝学実験による検討が必要であると考えられる。

Table. 3-3-1 解糖系酵素の SNP 解析

遺伝子名	K701	Km67
<i>H XK1</i>	Ser100Gly	Ser100Gly
	Ile217Val	Ile217Val
	Ser334Thr	Ser334Thr
<i>H XK2</i>		
<i>GLK1</i>	Ser344Leu	Ser344Leu
	Arg360His	Arg360His
<i>PFK1</i>	Ala473Val	Ala473Val
	Leu672Phe	
		Lys847Glu
<i>PFK2</i>	Glu122Val	Glu122Val
	Glu162Lys	Glu162Lys
	Leu192Ser	Leu192Ser
	Lys880Glu	Lys880Glu

続いて、第2章で実施した RNAseq 解析データを用いて、K701 株と Km67 株の GLK, PFK 反応を触媒する酵素の遺伝子発現量を調べた。培養開始後 4, 12 日目の GLK, PFK 反応に関する遺伝子の発現量を以下に示す (Fig. 3-3-15)。遺伝子発現量が高まっていた遺伝子は培養開始後 4 日目の K701 株における *PFK1* のみであった。

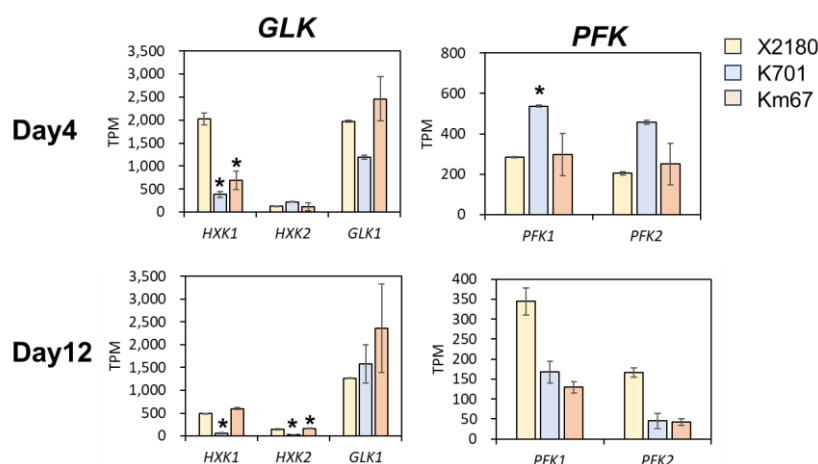


Figure 3-3-15. 清酒醪培養 4 日目における遺伝子発現量 *は X2180 株に対して、統計的に発現量が上昇したことを意味する (two-sided *t*-test, $p < 0.05$, $n = 2$) 赤および青の*はそれぞれ発現上昇と発現低下を示す。

本研究で定義する GLK 反応はグルコース取り込み反応とグルコースリン酸化反応を縮合した反応である。そのため、グルコース取り込み反応の活性上昇が GLK 反応を上昇させた可能性も考えられる。そこで、グルコース取り込み遺伝子の発現量を第2章の RNAseq の結果から抜粋した (Fig. 3-3-16)。酵母にはグルコースグル取り込み活性が異なるグルコーストランスポーターが多数存在する。RNAseq で遺伝子発現量を定量することができた 16 個のトランスポーターの発現量を Heatmap によって以下に示した (Fig. 3-3-16)。結果、遺伝子によって株間の発現量は大きく異なっていることが分かった。清酒酵母の方が発現量が高い遺伝子もあれば逆に低い遺伝子もあった。これらの遺伝子発現の結果からは、清酒酵母のグルコース取り込み能が実験室株と比べて高いかどうかを判断することはできなかった。

	X2180			K701			Km67		
	Day4	Day8	Day12	Day4	Day8	Day12	Day4	Day8	Day12
HXT1	102	157	135	56	124	72	114	378	157
HXT2	210	12	54	301	789	494	116	545	222
HXT3	5326	7414	4073	464	468	1211	238	1568	1517
HXT4	1068	1087	676	2281	2243	1552	2509	4234	2773
HXT5	1172	2811	2091	34	335	914	11	1103	2291
HXT6	1940	792	288	540	177	233	169	751	737
HXT7	2213	2802	1634	0	0	0	462	1236	1419
HXT8	1	0	1	0	1	0	0	2	2
HXT9	13	17	11	33	156	124	1005	1144	494
HXT10	2	5	8	0	1	0	1	3	5
HXT11	3	4	2	5	51	30	300	344	128
HXT13	1	1	1	37	21	14	13	16	4
HXT14	17	21	14	14	6	1	14	11	2
HXT15	1	1	0	0	0	0	0	0	0
HXT17	2	2	3	19	13	6	9	11	3
GAL2	4	5	5	1	4	3	1	11	6

Figure 3-3-16. RNAseq で発現量を推定できたグルコーストランスポーターの遺伝子発現量 表中の数字は TPM を表す 図中の赤色の濃淡は発現強度に対応する

3-4 結言

3-4-1 疑似清酒培地における代謝変化の考察

本研究では清酒醪を模倣した疑似清酒培地での各種株の代謝の比較を行った。清酒酵母 K701 株は実験室酵母 X2180 株と比較して、清酒醪において 4 つの優れた代謝特性を示した：高いエタノール比生成速度および高いグルコース比消費速度、高い細胞密度、高濃度エタノール下での持続的なエタノール生成。酵母株を SD2、SD20、疑似清酒培地の 3 種類の液体培地で培養し、メタボローム解析に適用可能で、かつ清酒発酵を模倣できる代替培地を探索した。発酵プロファイルと培地中の細胞内代謝状態の解析により、疑似清酒培地が清酒発酵の代替として最も適していることがわかった。疑似清酒培地における酵母の代謝は合成培地での代謝とは異なることが分かった。先行研究で行われた SD2 培地での 30℃振盪培養での K701 株のメタボローム解析の結果では、K701 株において G6P、F6P、FBP の細胞内濃度上昇が観察されたが、その上昇幅は 1.5~2 倍程度で、疑似清酒培地で見られたほど大きくはなかった (Sugimura et al., 2023)。また、本研究で実施した SD20 培地での培養ではそれらの代謝物の濃度上昇は観察されなかった (Fig. 3-3-9)。疑似清酒培地は米・米麴を用いて作成された培地であり、合成培地とは成分の組成が大きく異なる。この成分の違いが代謝の変化を生み出したのではと考えられる。

疑似清酒培地にて酵母の代謝変化をもたらした化合物の候補として、疑似清酒培地には不飽和脂肪酸やエルゴステロールを多く含むことがその原因の一つ

と推測できる。清酒醪や静置培養のような低酸素条件において、酵母はこれらの酸素を要求する化合物を生合成できない (Rosenfeld et al., 2003)。清酒醪においては不飽和脂肪酸は米に由来し、エルゴステロールは米麴に付着した麴菌体由来し、酵母の増殖に十分量存在すると推定される。一方、SD 培地にはこれらの化合物が含まれず (Sherman, 1991)、低酸素条件における増殖ではこれらが律速となる可能性が考えられる。不飽和脂肪酸とエルゴステロールによる解糖系への直接の関与は報告されていないが、不飽和脂肪酸とエルゴステロールの不足は関連遺伝子の発現を誘導し、それらの影響で細胞内の代謝が変化した可能性は考えられる。

3-4-2 本研究の課題

清酒醪と疑似清酒培地では、培養開始時のグルコース濃度に顕著な違いがある。清酒発酵では、米の糖化によってグルコースが継続的かつ徐々に供給されるため、発酵期間中のグルコース濃度は常に 0.3 M 未満に保たれるが (Fig. 3-3-1)、疑似清酒培地では、培養前に米が完全に糖化されており、培養開始時点で豊富なグルコースが存在する (Fig. 3-3-5)。出芽酵母は、細胞外グルコース濃度に応じて活性や発現量が異なる複数のグルコース輸送体を持つことが知られる (Özcan & Johnston, 1999)。グルコース濃度が代謝に与える影響を評価するには、清酒醪で培養された酵母細胞の細胞内メタボローム状態を直接測定する新しい方法論の検証が必要と考えられる。

また、GLK 反応の計算方法にも課題がある。グルコースから G6P への変換は、グルコースの取り込み反応とリン酸化反応の 2 つの過程で構成される。これらの反応はどちらも、解糖系における既知の律速であり、解糖系全体のフラックス活性と高い相関があることが知られている (Ernandes et al., 1998; Galazzo & Bailey, 1990; Ye et al., 1999)。本研究では上記二つの反応を縮合して一つにして考えている。そのため、二つのうちどちらの反応がより清酒酵母の高発酵性に寄与しているかを判定することができていない。GFP センサーを用いた細胞内グルコース濃度測定データ (Bendrioua et al., 2014) や、グルコースリン酸化活性に関する定量データが得られれば、これら 2 つの反応をそれぞれ分けて考えることができる。

3-4-3 家畜化が与えるメタボロームへの影響

清酒酵母と同様にワイン酵母も高い発酵性を示す (Harsch et al., 2010; Viana et al., 2014)。Quantitative trait loci analysis (QTL 解析)により、ワイン酵母の優れた発酵能力に寄与する複数の遺伝子が特定されている (Ambroset et al., 2011; Walker et al., 2014)。清酒酵母やワイン酵母を含む産業用酵母株は、人為的に容易

された環境に適応した結果として、優れた発酵能力を示す。これらの産業用酵母株は、ゲノム配列に家畜化特有の構造的変化を有しており (Peter et al., 2018)、酵母の代謝変化に寄与していると考えられる (De Guidi et al., 2023; Marsit et al., 2017)。

家畜化による産業用酵母の遺伝子型および表現型への影響は多数報告されている。酵母のイソマルトースの利用はマルトトリオースに対する高親和性トランスポーターである *MAL11* によって可能となるが、*MAL11* はビール酵母のサブグループで収斂的に出現したと報告されている (De Guidi et al., 2023)。ワイン酵母や花酵母の果糖利用は、ヘキソーストランスポーター遺伝子 *HXT3* におけるアミノ酸置換によって促進される (Guillaume et al., 2007; Zuchowska et al., 2015)。

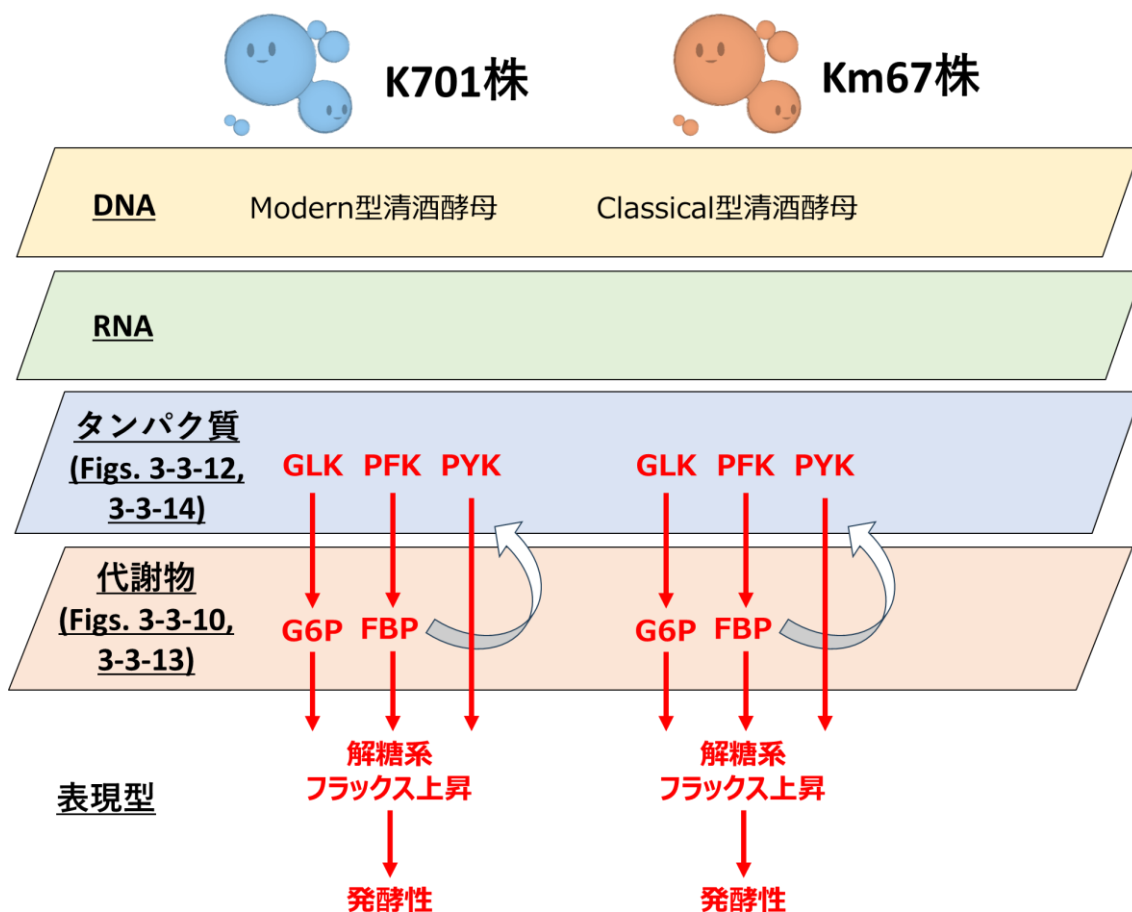
家畜化は遺伝子や表現型だけでなく、細胞内代謝物濃度すなわちメタボロームにも影響を与えることが知られる。系統的に離れた家畜化酵母は共通してロイシンやフェニルアラニンといった発酵飲料の香味成分の前駆体物質の細胞内濃度が高いことが報告されている (Tengölics et al., 2024)。このような産業条件の酵母で見られたメタボロームに対する収斂的な現象は、K701 株および Km67 株で見られた G6P や FBP 濃度の上昇が、清酒醸造環境への適応形質である可能性を示唆する。他の家畜化酵母株について、糖リン酸を網羅的に分析し比較した研究は存在しない。これらを明らかにすることで、観察された G6P や FBP の上昇が清酒酵母に特有の性質であるか、家畜化酵母株に共通して見られる性質を明らかにすることができると考えられる。

3-4-4 まとめ

第3章では、清酒醸造条件下における清酒酵母の高い解糖系フラックスの原因となる反応を、メタボローム解析を用いて同定することを目的としていた。疑似清酒培地を用いたメタボローム解析では、K701 株において G6P、F6P、FBP の細胞内濃度が X2180 株よりも高いことが分かった (Fig. 3-3-10)。 $\Delta\Delta G$ 解析によって、K701 株では GLK, PFK, PYK 反応活性の上昇が示され、これらが K701 の優れた発酵能力に寄与している可能性が示唆された (Fig. 3-3-12)。また、Classical 型に分類される清酒酵母 Km67 株においても同様に G6P と FBP の細胞内濃度が高まっていることが分かった (Fig. 3-3-13)。 $\Delta\Delta G$ 解析によって Km67 株でも GLK, PFK, PYK 反応活性の上昇が示された (Fig. 3-3-14)。これらの結果から、清酒酵母は遺伝的系統によらず GLK, PFK, PYK 反応を高めることで高い発酵性を実現していることが分かった (Fig. 3-4-1)。PYK 反応の活性化は FBP の濃度上昇によるフィードフォワード制御に起因すると考えられた。一方、GLK 反応と PFK 反応の活性化の原因は、代謝物によるアロステリック制

御や遺伝子情報解析からは見いだせなかった (Fig. 3-3-15, 3-3-16, Table 3-3-1)。リン酸化などのタンパク質翻訳後修飾が関与すると推察される。

本研究で得られた清酒酵母の清酒醸造条件での解糖系活性化の知見は、清酒に利用する酵母菌株の育種に応用することができると考えられる。本研究では清酒酵母で GLK 反応が活性化していることを明らかにした。この結果から GLK 反応を活性化することができれば発酵性を高めることができると考えられた。例えば、グルコースとグルコースアナログであるグルコサミンを含んだ培地で感受性を指標にスクリーニングを行えば、グルコース取り込み速度が高い候補株を選抜することができるかもしれない。



x2180株と比べて**向上/低下**した活性又は制御

Figure 3-4-1. 第3章で得られた知見のまとめ

4 章 結言

4-1 本研究のまとめ

本研究では多階層の解析によって清酒酵母の高発酵性メカニズムの解明に取り組んだ。清酒酵母の高発酵性メカニズムの解明には、細胞壁強度低下を招く清酒酵母のシグナル伝達の異常を明らかにすることと、解糖系の高い活性の原因となる反応を特定することが必要である。高発酵性に資するシグナル伝達と解糖系の制御はそれぞれ DNA から代謝物までの多階層に跨って制御されるため、本研究では多階層に跨る解析を行い、階層を跨いだ制御の解明に取り組んだ。

第 2 章では遺伝的系統が異なる Modern 型清酒酵母と Classical 型清酒酵母について、高発酵性に資するシグナル伝達異常の類似点と相違点を明らかにした。DNA の階層に着目した全ゲノム解析によって清酒酵母の系統関係を明らかにした (Fig. 2-3-1, Fig. 4-1 の DNA の階層)。表現型解析により X2180 株よりも清酒酵母の方が優れた発酵性を有すること (Fig. 2-3-2)、細胞壁および細胞内貯蔵糖量が X2180 株よりも清酒酵母の方が少ないことを示した (Fig. 2-3-3, 2-3-4, Fig. 4-1 の表現型の階層)。RNAseq 解析によって、清酒酵母では細胞壁強度細胞合成に必須の *UGPI* の発現量が低いこと (Fig. 2-3-7, Fig. 4-1 の RNA の階層)、G₀ 期およびストレス応答に関連する転写因子の活性低下およびグルコース抑制に関わる転写因子の活性上昇を明らかにした (Fig. 2-6-3, Fig. 4-1 のタンパク質の階層)。先行研究から細胞壁強度と発酵能はトレードオフの関係にあることが知られ、細胞壁強度を低く保つことが高い発酵性につながることを示されている (Watanabe et al., 2023; Watanabe et al., 2016)。Modern 型清酒酵母と Classical 型清酒酵母はどちらも G₀ 期に入りにくく、細胞壁強度が低く保たれることで高発酵性が実現していることが分かった。一方で、その原因となる遺伝子変異は両者で異なる可能性が示唆された。

第 3 章では Modern 型清酒酵母と Classical 型清酒酵母の高い解糖系フラックスの原因となる解糖系の反応の特定を目的として、メタボローム解析を用いた多階層の解析に取り組んだ。清酒酵母では解糖系の代謝物のうち X2180 株と比べて G6P と F6P の濃度が有意に高まることを示した (Fig. 3-3-10, 3-3-13, Fig. 4-1 の代謝物の階層)。 $\Delta\Delta G$ 解析によってタンパク質の階層に着目し、清酒酵母では GLK, PFK, PYK 反応が活性化している可能性を示した (Fig. 3-3-12, 3-3-14, Fig. 4-1 のタンパク質の階層)。活性化の原因として、PYK はアロステリック制御で説明できたが、GLK, PFK は遺伝子発現やアロステリック制御では説明できずリン酸化などの翻訳後修飾の影響が考えられた (Figs. 3-3-15, 3-3-16)。

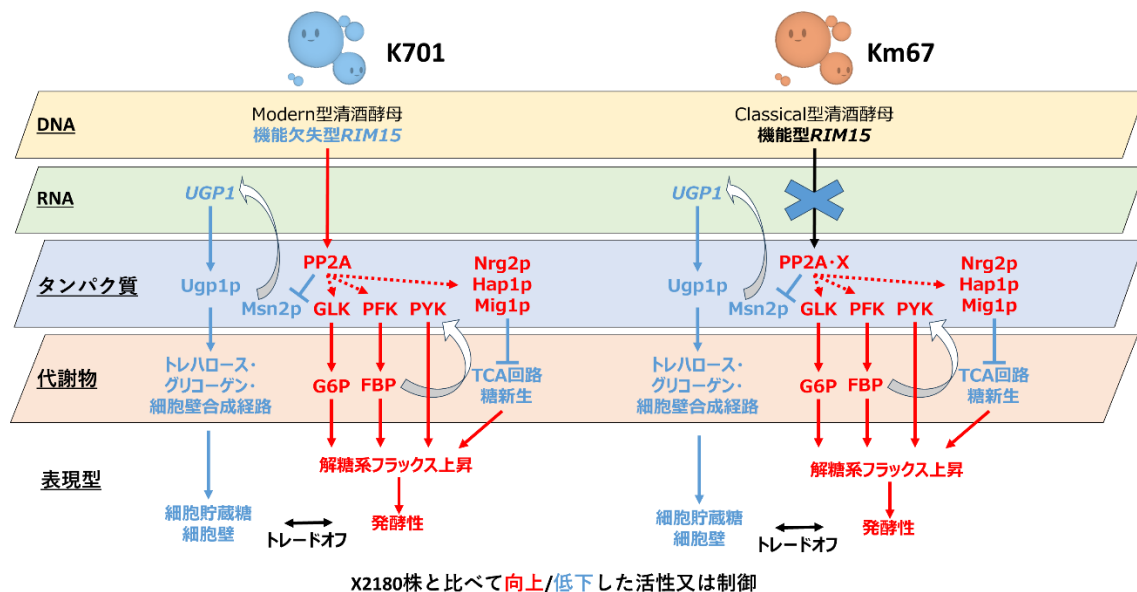


Figure 4-1. 多階層解析によって各株で得られた知見のまとめ 実線は本研究または先行研究で確立された制御 点線は本研究結果から推定される制御

4-2 本研究の課題

本研究では多階層解析技術を用いることで、清酒酵母の高発酵性メカニズムの解明に取り組んだ。多階層に跨る解析に取り組むことで、本研究では様々な課題および未知の制御の存在が明らかとなった。現状の課題としては、第2章では転写因子 Nrg2p, Hap1p, Mig1p 活性化の原因および Km67 株における高発酵性に資する未同定因子の特定ができなかったこと、第3章では清酒酵母の GLK, PFK 反応の高い活性の原因を特定できなかった点が挙げられる。

第2章では、グルコース抑制や呼吸に関連する転写因子 Nrg2p, Hap1p, Mig1p の活性化の原因を特定出来なかった。Nrg2p と Hap1p はグルコース濃度の低下に応じて遺伝子発現を抑制するリプレッサーであり、糖濃度が高い清酒醪においてこれらの転写因子の活性上昇はグルコース抑制の強化を意味する。Mig1p の活性化は Hxk2p によって促進されることが知られ、リン酸化によって活性が制御される (Vega et al., 2016)。Hap1p は呼吸に関わる転写因子であるが、その転写活性がどのように制御されるかの知見は存在しない。Nrg2p の活性は NRG2 の Ccr4p-NOT 複合体などの因子による mRNA の分解の程度によって制御されるが、本研究のデータからこれらを検証することができなかった (Lo et al., 2012)。これら転写因子の活性上昇の原因に PP2A^{B55δ} の関与が考えられる。一般的に、転写因子はリン酸化によって活性が制御される。本研究では Modern 型清酒酵母も Classical 型清酒酵母も PP2A^{B55δ} 活性が向上していることがわかり、PP2A^{B55δ} の

高い活性が転写因子のリン酸化状態に影響を与え、活性上昇に寄与した可能性が考えられた。

Km67 株における高発酵性に資する未同定因子の同定方法については第 2 章 2-4-1 節で詳細は述べた。当該因子は酵母株の発酵性を高める因子として期待され、同定によって酵母株の発酵性向上への応用が期待できる。酵母は清酒醸造だけでなく、バイオエタノールなどの工業分野にも利用されるため、当該因子の同定は幅広い分野での技術進歩に貢献する可能性を秘めている。

第 3 章では、GLK, PFK 反応の活性上昇の原因を同定できなかった。本研究で活性化が示唆された GLK 反応は培地から細胞へのグルコースを取り込み反応と、グルコースを G6P へと変換する二つの反応を縮合した反応である。従って、本研究で定義される GLK 反応の活性化は、グルコース取り込み活性の上昇、グルコースのリン酸化反応の活性化、またはその両方の活性化と解釈できる。これらを解明するためには、グルコース取り込み活性とグルコースリン酸化活性を分けて測定する必要がある。

細胞内グルコース濃度の測定には蛍光タンパク質を利用したセンサー (Bermejo et al., 2010) や安定同位体の内部標準を使用した GCMS による測定法 (Li & Heinemann, 2023) が提案されている。これらの解析を追加することでグルコース取り込み活性を調べることができる。

グルコースリン酸化酵素について、Hxk2p の活性はトレハロース 6 リン酸 (T6P) によってアロステリック阻害を受けることが知られている (Blázquez et al., 1993; Ernandes et al., 1998)。清酒酵母では X2180 株に比べて T6P 濃度は高かった (Fig. 3-3-10, 3-3-13)。このことから、清酒酵母の GLK 反応は T6P によるアロステリック阻害をうけない可能性が考えられた。あるいは Hxk2p 活性は低下しているが、グルコース取り込み反応の向上やその他アイソザイムの活性上昇によって GLK 反応全体として清酒酵母では活性が上昇している可能性が考えられた。

また、GLK 反応の酵素 Hxk2p と PFK 反応の酵素 Pfk2p はリン酸化による活性制御を受ける (Oliveira et al., 2012; Vega et al., 2016)。GLK 反応及び PFK 反応におけるリン酸化制御の違いが清酒酵母での高い酵素活性をもたらした可能性が考えられる。酵素のリン酸化状態についての情報は本研究では得られなかったため、ウェスタンブロッティングやリン酸化プロテオミクス解析等の更なる別個の解析が必要である。一方、Rim15p によって制御を受ける PP2A^{B55δ} は脱リン酸化酵素であり、清酒酵母では恒常的な活性化が示唆される。PP2A^{B55δ} によって Hxk2p や Pfk2p の脱リン酸化が促進されることで、解糖系フラックスが上昇した可能性が考えられる。

4-3 本研究で得られた知見の基礎的および応用的展開

本研究で得られた清酒酵母の高発酵性に関する知見は、未知の解糖系制御機構の解明につながる示唆をもたらす。解糖系は、ヒトから酵母に至る多くの生物に保存されている代謝の中心的な経路である。酵母は、解糖系の制御を調べる研究に頻繁に用いられ、ヒトにも保存される多様な制御機構の解明に貢献してきた。一方で、酵母を用いた解糖系研究に広く使われている実験室酵母は、実験環境に適応した特殊な株であり、その制御機構には実験室酵母特有の特徴が含まれている可能性がある。したがって、実験室酵母とは異なる酵母株の代謝を調べることで、これまで知られていなかった解糖系制御の新たな側面が明らかになる可能性がある。

本研究で得られた清酒酵母の高発酵性の多層的な理解は、応用研究への展開にも有用である。近年、自然環境から単離された酵母を用いた清酒製造が注目を集めている。自然由来酵母を用いることで、清酒酵母では得られないような特徴的な味や香りを持つ清酒の製造が期待されている。一方で、清酒酵母と同等の優れた発酵性を持つ酵母を自然から単離するのは困難であり、発酵性の低さが製造への応用における障壁となる場合がある。このような背景から、酵母の発酵性を向上させるスクリーニング手法の開発が求められている。発酵性を高めるスクリーニング方法はいくつか提案されているが (Watanabe et al., 2023; 中瀬舞, 2022)、遺伝的・代謝的に多様性を持つ自然由来酵母株すべてに適用可能な汎用的手法は存在しない。したがって、異なる制御機構に着目した多角的なスクリーニング方法の確立が必要とされている。本研究で明らかとなった清酒酵母の高発酵性に関する多層的な制御の知見は、様々な層に着目した新たなスクリーニングアプローチの可能性を示唆する。例えば DNA 層に注目すると、Rim15p の機能が低下するようなスクリーニングに取り組むことで、発酵性の改善が期待される。RNA 層に着目すると、清酒酵母ではグルコース抑制が強く働いており、G₀ 期特有の表現型を示さないことが分かった。これらの結果から、グルコース抑制を強化した株を取得するスクリーニングや、G₀ 期特有の表現型である細胞壁強度の低い酵母を選択的に取得するスクリーニングなどが提案される。タンパク質層に着目すると、清酒酵母では GLK 反応が活性化していたことから、グルコースアナログに対する感受性が高まった株を取得するスクリーニング方法などが考えられる (Fig. 4-2)。

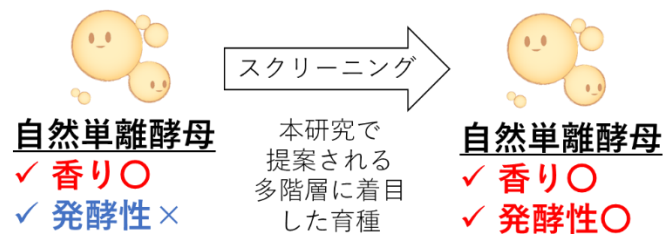


Figure. 4-2. 本研究で得られた育種の知見を適用した例

参考文献

- Akao, T., Yashiro, I., Hosoyama, A., Kitagaki, H., Horikawa, H., Watanabe, D.,...Shimoi, H. (2011). Whole-Genome Sequencing of Sake Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7. *DNA Res.*, 18(6), 423-434. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsr029>
- Ambroset, C., Petit, M., Brion, C., Sanchez, I., Delobel, P., Guérin, C.,...Blondin, B. (2011). Deciphering the molecular basis of wine yeast fermentation traits using a combined genetic and genomic approach. *G3 (Bethesda)*, 1(4), 263-281. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000422>
- Azumi, M., & Goto-Yamamoto, N. (2001). AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast*, 18(12), 1145-1154. <https://doi.org/10.1002/yea.767>
- Bendrioua, L., Smedh, M., Almquist, J., Cvijovic, M., Jirstrand, M., Goksör, M.,...Hohmann, S. (2014). Yeast AMP-activated Protein Kinase Monitors Glucose Concentration Changes and Absolute Glucose Levels *. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12863-12875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.547976>
- Bermejo, C., Haerizadeh, F., Takanaga, H., Chermak, D., & Frommer, Wolf B. (2010). Dynamic analysis of cytosolic glucose and ATP levels in yeast using optical sensors. *Biochemical Journal*, 432(2), 399-406. <https://doi.org/10.1042/BJ20100946>
- Betz, A., Röttger, U., & Kreuzberg, K. H. (1975). Allosteric activation and competitive inhibition of yeast phosphofructokinase by d-fructose. *Archives of Microbiology*, 103(1), 123-126. <https://doi.org/10.1007/BF00436338>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Blázquez, M. A., Lagunas, R., Gancedo, C., & Gancedo, J. M. (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Letters*, 329(1-2), 51-54. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80191-V](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80191-V)
- Cameroni, E., Hulo, N., Roosen, J., Winderickx, J., & De Virgilio, C. (2004). The novel yeast PAS kinase Rim15 orchestrates G₀-associated antioxidant defense mechanisms. *Cell Cycle*, 3(4), 460-466. <https://doi.org/10.4161/cc.3.4.791>
- Canelas, A. B., Ras, C., ten Pierick, A., van Dam, J. C., Heijnen, J. J., & van Gulik, W. M. (2008). Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. *Metabolomics*, 4(3), 226-239. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0116-4>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Chen, Y., Chen, L., Lun, Aaron T. L., Baldoni, Pedro L., & Smyth, Gordon K. (2025). edgeR v4: powerful differential analysis of sequencing data with expanded functionality and improved support for

- small counts and larger datasets. *Nucleic Acids Res.*, 53(2), gkaf018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf018>
- Conn, E. E., Stumpf, P. K., Bruening, G., Doi, R. H., 田宮信雄, & 八木達彦. (1988). コーンスタンブ 生化学第5 版.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O.,...Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, 10(2), giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- De Guidi, I., Legras, J. L., Galeote, V., & Sicard, D. (2023). Yeast domestication in fermented food and beverages: past research and new avenues. *Curr. Opin. Food Sci.*, 51, 101032. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101032>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S.,...Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Engel, S. R., Aleksander, S., Nash, R. S., Wong, E. D., Weng, S., Miyasato, S. R.,...Cherry, J. M. (2025). Saccharomyces Genome Database: advances in genome annotation, expanded biochemical pathways, and other key enhancements. *Genetics*, 229(3), iyae185. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyae185>
- Ernandes, J. R., De Meirsmann, C., Rolland, F., Winderickx, J., De Winde, J., Brandão, R. L., & Thevelein, J. M. (1998). During the initiation of fermentation overexpression of hexokinase PII in yeast transiently causes a similar deregulation of glycolysis as deletion of Tps1. *Yeast*, 14(3), 255-269. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199802\)14:3<255::AID-YEA228>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199802)14:3<255::AID-YEA228>3.0.CO;2-N)
- Galazzo, J. L., & Bailey, J. E. (1990). Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 12(3), 162-172. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90033-M](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90033-M)
- Ge, S. X., Jung, D., & Yao, R. (2020). ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, 36(8), 2628-2629. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Gharbi-Ayachi, A., Labbé, J.-C., Burgess, A., Vigneron, S., Strub, J.-M., Brioude, E.,...Lorca, T. (2010). The Substrate of Greatwall Kinase, Arpp19, Controls Mitosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *Science*, 330(6011), 1673-1677. <https://doi.org/10.1126/science.1197048>
- Grüning, N.-M., Agostini, F., Caldana, C., Hartl, J., Heinemann, M., Keller, M. A.,...Ralsler, M. (2025). The return of metabolism: biochemistry and physiology of glycolysis. *Biological Reviews*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/brv.70104>
- Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J. M., & Blondin, B. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A mutated *HXT3* allele enhances fructose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(8), 2432-2439. <https://doi.org/10.1128/AEM.02269-06>

- Harsch, M. J., Lee, S. A., Goddard, M. R., & Gardner, R. C. (2010). Optimized fermentation of grape juice by laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 10(1), 72-82. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00580.x>
- Healy, A. M., Zolnierowicz, S., Stapleton, A. E., Goebel, M., Depaoli-Roach, A. A., & Pringle, J. R. (1991). CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* Gene Involved in Cellular Morphogenesis: Identification, Characterization, and Homology to the B Subunit of Mammalian Type 2A Protein Phosphatase. *Mol. Cell. Biol.*, 11(11), 5767-5780. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.11.5767-5780.1991>
- Heinisch, J. J., Boles, E., & Timpel, C. (1996). A Yeast Phosphofructokinase Insensitive to the Allosteric Activator Fructose 2,6-Bisphosphate: GLYCOLYSIS/METABOLIC REGULATION/ALLOSTERIC CONTROL *. *Journal of Biological Chemistry*, 271(27), 15928-15933. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.15928>
- Hohmann, S., Bell, W., Neves, A. M. J., Valckx, D., & Thevelein, J. M. (1996). Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and -independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis. *Molecular Microbiology*, 20(5), 981-991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02539.x>
- Imada, T., Yamamoto, C., Toyoshima, M., Toya, Y., & Shimizu, H. (2023). Effect of light fluctuations on photosynthesis and metabolic flux in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology Progress*, 39(3), e3326. <https://doi.org/10.1002/btpr.3326>
- Inai, T., Watanabe, D., Zhou, Y., Fukada, R., Akao, T., Shima, J.,...Shimoi, H. (2013). Rim15p-mediated regulation of sucrose utilization during molasses fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. *J. Biosci. Bioeng.*, 116(5), 591-594. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.015>
- Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A.,...Tomita, M. (2007). Multiple High-Throughput Analyses Monitor the Response of *E. coli* to Perturbations. *Science*, 316(5824), 593-597. <https://doi.org/10.1126/science.1132067>
- Jewison, T., Knox, C., Neveu, V., Djoumbou, Y., Guo, A. C., Lee, J.,...Wishart, D. S. (2012). YMDB: the Yeast Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D815-D820. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr916>
- Kanai, M., Kawata, T., Yoshida, Y., Kita, Y., Ogawa, T., Mizunuma, M.,...Iefuji, H. (2017). Sake yeast *YHR032W/ERC1* haplotype contributes to high S-adenosylmethionine accumulation in sake yeast strains. *J. Biosci. Bioeng.*, 123(1), 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.07.007>
- Karunanithi, S., & Cullen, P. J. (2012). The Filamentous Growth MAPK Pathway Responds to Glucose Starvation Through the Mig1/2 Transcriptional Repressors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 192(3), 869-887. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.142661>
- Kayikci, Ö., & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov068. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>
- Koning, W. d., & Dam, K. v. (1992). A method for the determination of changes of glycolytic metabolites

- in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 204(1), 118-123. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90149-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90149-2)
- Lee, P., Kim, M. S., Paik, S.-M., Choi, S.-H., Cho, B.-R., & Hahn, J.-S. (2013). Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 587(22), 3648-3655. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.004>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinf.*, 12(1), 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, X., & Heinemann, M. (2023). Quantifying intracellular glucose levels when yeast is grown in glucose media. *Scientific Reports*, 13(1), 17066. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43602-z>
- Lo, T. L., Qu, Y., Uwamahoro, N., Quenault, T., Beilharz, T. H., & Traven, A. (2012). The mRNA Decay Pathway Regulates the Expression of the Flo11 Adhesin and Biofilm Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(4), 1387-1391. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.141432>
- Marsit, S., Leducq, J. B., Durand, É., Marchant, A., Filteau, M., & Landry, C. R. (2017). Evolutionary biology through the lens of budding yeast comparative genomics. *Nat. Rev. Genet.*, 18, 581-598. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.49>
- Martien, J. I., & Amador-Noguez, D. (2017). Recent applications of metabolomics to advance microbial biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.006>
- Mashego, M. R., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., & Heijnen, J. J. (2007). Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters*, 29(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9218-0>
- Matsuda, F., Kamiyama, A., Yamasaki, K., Seike, T., & Okahashi, N. (2025). $\Delta\Delta G$ Method for Elucidating Key Control Reactions from Relative Quantification Metabolome Data: Comparative Analysis of Yeast Glycolysis. *Analytical Chemistry*, 97(12), 6391-6398. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c04480>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A.,...DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.*, 20(9), 1297-1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Mochida, S., Maslen, S. L., Skehel, M., & Hunt, T. (2010). Greatwall Phosphorylates an Inhibitor of Protein Phosphatase 2A That Is Essential for Mitosis. *Science*, 330(6011), 1670-1673. <https://doi.org/10.1126/science.1195689>
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., Péli-Gulli, M.-P., Nicastro, R., & De Virgilio, C. (2017). TORC1 coordinates the conversion of Sic1 from a target to an inhibitor of cyclin-CDK-Cks1. *Cell Discov.*, 3(1), 17012-17012. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.12>

- Nugroho, R. H., Yoshikawa, K., & Shimizu, H. (2015). Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(4), 396-404. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.02.011>
- Ohya, Y., & Kashima, M. (2019). History, lineage and phenotypic differentiation of sake yeast. *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, 83(8), 1442-1448. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1564620>
- Oliveira, A. P., Ludwig, C., Picotti, P., Kogadeeva, M., Aebersold, R., & Sauer, U. (2012). Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Molecular Systems Biology*, 8(1), MSB201255. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.55>
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., & Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 373-378.
- Oomuro, M., Kato, T., Zhou, Y., Watanabe, D., Motoyama, Y., Yamagishi, H.,...Aizawa, M. (2016). Defective quiescence entry promotes the fermentation performance of bottom-fermenting brewer's yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, 122(5), 577-582. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.04.007>
- Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., & De Virgilio, C. (2003). TOR and PKA Signaling Pathways Converge on the Protein Kinase Rim15 to Control Entry into G₀. *Mol. Cell*, 12(6), 1607-1613. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00485-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00485-4)
- Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J.-X., Pflieger, D., Bergström, A.,...Schacherer, J. (2018). Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556(7701), 339-344. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>
- Pfeifer, K., Kim, K.-S., Kogan, S., & Guarente, L. (1989). Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell*, 56(2), 291-301. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90903-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90903-3)
- Plank, M. (2022). Interaction of TOR and PKA Signaling in *S. cerevisiae*. *Biomolecules*, 12(2), 210.
- Romeo, T., & Snoep Jacky, L. (2005). Glycolysis and Flux Control. *EcoSal Plus*, 1(2), 10.1128/ecosalplus.1123.1125.1121. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.5.1>
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., & Salmon, J.-M. (2003). Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 113-121. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.113-121.2003>
- Sailwal, M., Das, A. J., Gazara, R. K., Dasgupta, D., Bhaskar, T., Hazra, S., & Ghosh, D. (2020). Connecting the dots: Advances in modern metabolomics and its application in yeast system. In *Biotechnol. Adv.* (Vol. 44): Elsevier Inc.
- Schaefer, U., Boos, W., Takors, R., & Weuster-Botz, D. (1999). Automated Sampling Device for Monitoring Intracellular Metabolite Dynamics. *Analytical Biochemistry*, 270(1), 88-96. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4048>
- Sherman, F. (1991). [1] Getting started with yeast. In *Methods in Enzymology* (Vol. 194, pp. 3-21). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94004-V](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94004-V)

- Shibata, Y., Yamada, T., Ikeda, Y., Kanai, M., Fujii, T., Akao, T.,...Takahashi, T. (2024). Effect of S-adenosyl-methionine accumulation on hinea odor in sake brewed with a non-Kyokai yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, 137(4), 268-273. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2024.01.004>
- Shimizu, H., & Toya, Y. (2021). Recent advances in metabolic engineering—integration of in silico design and experimental analysis of metabolic pathways. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132(5), 429-436. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.08.002>
- Stayton, C. T. (2015). What does convergent evolution mean? The interpretation of convergence and its implications in the search for limits to evolution. *Interface Focus*, 5(6), 20150039. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2015.0039>
- Sugimura, M., Seike, T., Okahashi, N., Izumi, Y., Bamba, T., Ishii, J., & Matsuda, F. (2023). Improved 2,3-Butanediol Production Rate of Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* by Deletion of *RIM15* and Activation of Pyruvate Consumption Pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 16378. <https://doi.org/10.3390/ijms242216378>
- Swinnen, E., Wanke, V., Roosen, J., Smets, B., Dubouloz, F., Pedruzzi, I.,...Winderickx, J. (2006). Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Division*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-3>
- Sáez, M. J., & Lagunas, R. (1976). Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 13(2), 73-78. <https://doi.org/10.1007/BF01837056>
- Takao, Y., Takahashi, T., Yamada, T., Goshima, T., Isogai, A., Sueno, K.,...Akao, T. (2018). Characteristic features of the unique house sake yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Km67 used for industrial sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, 126(5), 617-623. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.008>
- Tengölics, R., Szappanos, B., Mülleder, M., Kalapis, D., Grézel, G., Sajben, C.,...Papp, B. (2024). The metabolic domestication syndrome of budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 121(11), e2313354121. https://doi.org/10.1073/PNAS.2313354121/SUPPL_FILE/PNAS.2313354121.SD12.XLSX
- Thorfinnsdottir, L. B., García-Calvo, L., Bø, G. H., Bruheim, P., & Røst, L. M. (2023). Optimized Fast Filtration-Based Sampling and Extraction Enables Precise and Absolute Quantification of the *Escherichia coli* Central Carbon Metabolome. *Metabolites*, 13(2).
- Urbanczyk, H., Noguchi, C., Wu, H., Watanabe, D., Akao, T., Takagi, H., & Shimoi, H. (2011). Sake yeast strains have difficulty in entering a quiescent state after cell growth cessation. *J. Biosci. Bioeng.*, 112(1), 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.03.001>
- Vega, M., Riera, A., Fernández-Cid, A., Herrero, P., & Moreno, F. (2016). Hexokinase 2 Is an Intracellular Glucose Sensor of Yeast Cells That Maintains the Structure and Activity of Mig1 Protein Repressor Complex *. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7267-7285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711408>

- Viana, T., Loureiro-Dias, M. C., & Prista, C. (2014). Efficient fermentation of an improved synthetic grape must by enological and laboratory strains of *saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 4(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/S13568-014-0016-0/FIGURES/3>
- Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., & Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(5), 613-646. <https://doi.org/10.1002/mas.20032>
- Vyas Valmik, K., Berkey Cristin, D., Miyao, T., & Carlson, M. (2005). Repressors Nrg1 and Nrg2 Regulate a Set of Stress-Responsive Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1882-1891. <https://doi.org/10.1128/ec.4.11.1882-1891.2005>
- Walker, M. E., Nguyen, T. D., Liccioli, T., Schmid, F., Kalatzis, N., Sundstrom, J. F.,...Jiranek, V. (2014). Genome-wide identification of the Fermentome; genes required for successful and timely completion of wine-like fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 15(1), 552. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-552>
- Watanabe, D., Araki, Y., Zhou, Y., Maeya, N., Akao, T., & Shimoi, H. (2012). A Loss-of-Function Mutation in the PAS Kinase Rim15p Is Related to Defective Quiescence Entry and High Fermentation Rates of *Saccharomyces cerevisiae* Sake Yeast Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(11), 4008-4016. <https://doi.org/10.1128/AEM.00165-12>
- Watanabe, D., Kajihara, T., Sugimoto, Y., Takagi, K., Mizuno, M., Zhou, Y.,...Takagi, H. (2019). Nutrient signaling via the TORC1-Greatwall- PP2A^{B55δ} pathway is responsible for the high initial rates of alcoholic fermentation in sake yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85(1), e02083-02018. <https://doi.org/10.1128/AEM.02083-18>
- Watanabe, D., Kawashima, M., Yoshioka, N., Sugimoto, Y., & Takagi, H. (2023). Rational design of alcoholic fermentation targeting extracellular carbon. *NPJ Sci. Food* . 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00215-0>
- Watanabe, D., Wu, H., Noguchi, C., Zhou, Y., Akao, T., & Shimoi, H. (2011). Enhancement of the Initial Rate of Ethanol Fermentation Due to Dysfunction of Yeast Stress Response Components Msn2p and/or Msn4p. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(3), 934-941. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.01869-10>
- Watanabe, D., Zhou, Y., Hirata, A., Sugimoto, Y., Takagi, K., Akao, T.,...Shimoi, H. (2016). Inhibitory role of greatwall-like protein kinase Rim15p in alcoholic fermentation via upregulating the UDP-glucose synthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(1), 340-351. <https://doi.org/10.1128/AEM.02977-15>
- Winderickx, J., de Winde, J. H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P., & Thevelein, J. M. (1996). Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Molecular and General Genetics MGG*, 252(4), 470-482. <https://doi.org/10.1007/BF02173013>

- Wu, H., Zheng, X., Araki, Y., Sahara, H., Takagi, H., & Shimoi, H. (2006). Global Gene Expression Analysis of Yeast Cells during Sake Brewing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(11), 7353-7358. <https://doi.org/10.1128/AEM.01097-06>
- Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z.,...Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, 2(3), 100141. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>
- Xu, Y.-F., Zhao, X., Glass, David S., Absalan, F., Perlman, David H., Broach, James R., & Rabinowitz, Joshua D. (2012). Regulation of Yeast Pyruvate Kinase by Ultrasensitive Allostery Independent of Phosphorylation. *Molecular Cell*, 48(1), 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.013>
- Ye, L., Kruckeberg, A. L., Berden, J. A., & Van Dam, K. (1999). Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *J. Bacteriol.*, 181(15), 4673-4675. <https://doi.org/10.1128/JB.181.15.4673-4675.1999/ASSET/0664F308-6890-46AE-ABD2-62132A3C2E05/ASSETS/GRAPHIC/JB1590192001.JPEG>
- Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., & Lam, T. T.-Y. (2017). ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 28-36. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>
- Zha, Y., Westerhuis, J. A., Muilwijk, B., Overkamp, K. M., Nijmeijer, B. M., Coulier, L.,...Punt, P. J. (2014). Identifying inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates using an exometabolomics approach. *BMC Biotechnology*, 14(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-22>
- Zheng, X., Levine, D., Shen, J., Gogarten, S. M., Laurie, C., & Weir, B. S. (2012). A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics*, 28(24), 3326-3328. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts606>
- Zuchowska, M., Jaenicke, E., König, H., & Claus, H. (2015). Allelic variants of hexose transporter Hxt3p and hexokinases Hxk1p/Hxk2p in strains of *Saccharomyces cerevisiae* and interspecies hybrids. *Yeast*, 32(11), 657-669. <https://doi.org/10.1002/yea.3087>
- Özcan, S., & Johnston, M. (1999). Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(3), 554-569. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.554-569.1999/ASSET/7007B4FC-716F-4969-A293-F057A848F2D8/ASSETS/GRAPHIC/MR0390027005.JPEG>
- 中瀬舞. (2022). *Bafilomycin A1* 耐性による高発酵性清酒酵母の育種および諸性質解析 清酒酵母・麴研究会,
- 塚原, 寅. (1961). 清酒酵母の分類学的研究 (1)
- 清酒酵母とは何か. 日本醸造協会雑誌, 56(9), 890-888. <https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan1915.56.890>

笠原，秀．(1973). きょうかい酵母．日本醸造協會雜誌，68(9)，659-661.
<https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan1915.68.659>

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官である松田史生教授から熱心なご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

博士論文審査員として、有益なご指導、ご助言を頂きました清水教授、瀬尾教授、岡橋准教授、戸谷准教授に心より感謝申し上げます。

実験手法や研究方針、論文執筆など、本研究を進める上で多数のご指導、ご助言を賜りました九州工業大学の清家泰介准教授に感謝申し上げます。

研究のご指導から博士課程進学への相談まで乗っていただき、博士号取得に全面的に協力していただいた菊正宗酒造株式会社の高橋俊成様、山田翼様、高尾佳史様および総合研究所の皆様に心より感謝申し上げます。

博士後期課程の仲間として、切磋琢磨しながら活発に議論していただいた谷口赳夫先生、佐藤源気氏、岩倉崇文氏に心より感謝申し上げます。

LC-MS を使用させていただきました大阪大学/島津分析イノベーション協働研究所の方々に深く御礼申し上げます。

最後に、バイオ情報計測学講座のスタッフの皆さま、諸先輩方、後輩の皆様、またこれまで支えてくださった家族に感謝いたします。