

## 高塩発酵食品の高塩条件が醸造微生物にもたらす影響について

尾形 智夫

前橋工科大学生命工学領域

**概要** 味噌、醤油は、塩を食品原料に大量投入した条件で発酵が進行する発酵食品で、高塩濃度下で耐塩性微生物である *Zygosaccharomyces* sp.酵母(味噌・醤油の実製造に利用されている酵母株は、*Z. rouxii* とその類縁種との自然交雑種がほとんどであるので、以後、自然交雑種は、*Zygosaccharomyces* sp.酵母と表記する。)が、主な醸造微生物である。高塩条件が、醸造微生物にもたらす影響と、それが発酵食品の品質に与える影響については、十分な考察がおこなわれていなかった。

味噌醤油の醸造微生物である *Zygosaccharomyces* sp.酵母が産生し、発酵食品の品質に深く影響を与える食品香気成分である 4-hydroxyl-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)等の香気性 furanone 化合物の産生に、高塩条件が、どのような影響を与えるのかを検討した。その結果、*Zygosaccharomyces* sp.酵母 NBRC1876 では、高塩条件で、有意に HEMF 産生量が増加していた。一方、NBRC1877 *ura3Δ* は、高塩条件で、HEMF 産生量の増加傾向があったが、有意差はなかった。高塩条件で食品香気 HEMF の産生量を増加させる遺伝的因子が、味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 に存在する可能性が示された。

これまで、ゲノム配列解読がおこなわれていなかった *Zygosaccharomyces* sp.酵母 NBRC1877 のゲノム解読を実施した。*Z. rouxii* CBS732 の配列と概ね同一である T subgenome 配列由来の染色体と、*Z. rouxii* 類縁菌由来の配列である P subgenome 配列由来の染色体が、概ね並列していたが、一部の染色体配列に欠失があると推定された。

味噌醤油の醸造微生物である *Zygosaccharomyces* sp.酵母の遺伝的安定性に影響をもたらすと予想される接合が、高塩条件で上昇することを我々は見出している。そこで、より高品質な塩高含有発酵食品製造に寄与する生物学的知見を得ることを目的とし、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性発現に関与する遺伝子群の発現を高塩条件で検討した。接合性 a 特異的遺伝子である *STE6* 遺伝子、接合性 alpha 特異的遺伝子である *STE3* 遺伝子ともに、高塩条件で遺伝子発現が上昇し、接合頻度が高塩条件下で上昇するとの我々の以前の報告と一致していた。

### 1. 研究目的

味噌、醤油は、塩を食品原料に大量投入した条件で発酵が進行する、我が国独自の伝統的発酵食品で、高塩濃度下で耐塩性微生物である *Zygosaccharomyces* sp.酵母(味噌・醤油製造における主な醸造微生物は、酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* であるとされてきたが、実製造に利用されている酵母株は、*Z. rouxii* とその類縁種との自然交雑種がほとんどであるので、以後、自然交雑種は、*Zygosaccharomyces* sp.酵母と表記する。)が、主な醸造微

生物として、発酵が進行する。高塩条件とする理由は、他の微生物の増殖を抑制することで、腐敗を防ぐことが考えられている。一方、高塩条件が、醸造微生物にもたらす影響と、それが発酵食品の品質に与える影響については、十分な考察がおこなわれていなかった。

本研究は、味噌醤油の醸造微生物である *Zygosaccharomyces* sp.酵母が産生し、発酵食品の品質に深く影響を与える食品香気成分である 4-hydroxyl-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)等の香気性 furanone

化合物の産生に、高塩条件が、どのような影響を与えるのか、醸造微生物である *Zygosaccharomyces* sp. 酵母の遺伝的因子の影響を検討し、より高品質な塩高含有発酵食品製造に寄与することを目的とした(本研究目的の第一)。遺伝的因子について検討するためには、ゲノム配列情報を正確に把握する必要がある。*Zygosaccharomyces rouxii* の type strain である、*Z. rouxii* CBS732 は、完全ゲノム配列解析がおこなわれ<sup>1)</sup>、NCBI (National Center of Biotechnology Information) にその詳細が掲載されている。しかし、味噌・醤油の実製造に利用されている酵母株は、*Z. rouxii* とその類縁種との自然交雑種がほとんどであるが、自然交雑種のゲノム配列解析は、1 株の味噌酵母と 1 株の醤油酵母の Draft genome 解析だけであった<sup>2,3)</sup>。さらに、完全ゲノム配列解析がおこなわれた *Z. rouxii* CBS732 の染色体は、接合遺伝子座 (*MAT* locus, mating type locus) で、組み換えが生じているとの報告もあり<sup>4,5)</sup>、*Zygosaccharomyces* sp. 酵母株のゲノム配列情報の取り扱いには、いまだ注意を要する(本研究目的の第二)。また、味噌醤油の醸造微生物である *Zygosaccharomyces* sp. 酵母の遺伝的安定性に影響をもたらすと予想される接合が、高塩条件で上昇することを我々は見出している<sup>6)</sup>。そこで、*Zygosaccharomyces* sp. 酵母の接合性発現に関与する遺伝子群の発現を高塩条件で検討し、より高品質な塩高含有発酵食品製造に寄与する生物学的知見を得ることを目的とした(本研究目的の第三)。

## 2. 研究方法

### 2.1 発酵食品の品質に深く影響を与える食品香気成分である、香気性 furanone 化合物 4-hydroxyl-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) の産生量に及ぼす高塩条件の影響の検討

酵母を、YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) で培養した後、Sugawara らの報告<sup>7)</sup>にあった Type I 培地 (ribose 2.5%, glycine 1%, glucose 7.5%, NaCl 10%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5%, yeast extract 0.5%) で、1 週間ないし、2 週間培養した後、培養上清に産生された HEMF を、HPLC を用いて、測定した<sup>8)</sup>。

### 2.2 食品香気 HEMF の産生量に高塩条件で影響に差異のある *Zygosaccharomyces* sp. 酵母のゲノム配列解析

ゲノム解読は、Illumina 社の HiSeqX を用い、平均インサート長 350 bp のライブラリーを作成し、ライブラリーの各 DNA の両側から 150 b の DNA 塩基を解読した。解析塩基数は、14 Gb を超えた。解読した DNA 塩基は、アセンブリソフトウェア Platanus<sup>9)</sup> を用いて、アセンブリした。(前橋工科大学 中村建介教授との共同研究)。*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 の染色体構造は、type strain である *Zygosaccharomyces rouxii* CBS732 の染色体構造を基に想定した。また、醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC110957 の全ゲノム配列解析結果<sup>2)</sup>も参考にした。

表 1 Primers used in this study

Primer	Sequence	Comments
BBQV01000332_636	5'-GTTTGATCACTTTCAATTATTGCAATGAGG-3'	BBQV01000332 636-665
BBQV01000332_914R	5'-ACCAATGGTGATTCTCCTACGTTTCCACGT-3'	BBQV01000332 885-914
Zygo STE6_up_600	5'-AGTGTAGCAACCACTTCTAGCACTACCGGT-3'	CU928179.1 168769-168798
Zygo STE6_up_1R	5'-ATCGAAGCGCAGCGGGGTGCCTATTAGTCT-3'	CU928179.1 169339-169368
LC221835 1332	5'-TGTGTACGAGGCAGTATTCATGGGAAGATA-3'	LC221835.1 1332-1361
LC221835 1675R	5'-ATCTCGATCACGACTTTATGTCAAATTGAT-3'	LC221835.1 1646-1675
Zygo STE3_up_600	5'-GGATCGTTTGATCAAATCCAATTTGATGCG-3'	CU928179.1 1555521-1555550
Zygo STE3_up_1R	5'-GGACGACCAACCGCTTTTAAGAGATCTGAT-3'	CU928179.1 1554951-1554980

### 2.3 味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合性発現関連遺伝子の遺伝子発現の高塩条件での検討

味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合性発現関連遺伝子の遺伝子発現は、接合性 a の発現に関与する遺伝子 *MATa2*, *STE6*, 接合性 alpha の発現に関与する遺伝子 *MATalpha1*, *STE3* の各遺伝子のプロモーターを、レポーター遺伝子である *lacZ* に接続させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定することでおこなった<sup>6)</sup>。各遺伝子のプロモーター領域のクローニングは、表 1 で示した PCR プライマーを用いてクローニングした。*MATa2* 遺伝子プロモーター領域のクローニングには、プライマーBBQV01000332\_636 と BBQV01000332\_914R, *STE6* 遺伝子プロモーター領域のクローニングには、プライマーZygo STE6\_up\_600 と Zygo STE6\_up\_1R, *MATalpha1* プロモーター領域のクローニングには、プライマーLC221835\_1332 と LC221835\_1675R, *STE3* 遺伝子プロモーター領域のクローニングには、プライマーZygo STE3\_up\_600 と Zygo STE3\_up\_1Rを用いた。

### 3. 研究結果

#### 3.1 発酵食品の品質に深く影響を与える食品香気成分である、香気性 furanone 化合物 4-hydroxyl-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) の産生量に及ぼす高塩条件の影響の検討

60 年前、日本の味噌から、米国の研究者によって分離された *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876, NBRC1877 *ura3Δ* (Watanabe et al.が NBRC1877 を基に作成した酵母株<sup>4)</sup>)の type I 培地の HEMF 産生量を調べた (Fig. 1)。NBRC1876 では、高塩条件で、有意に HEMF 産生量が増加していた。一方、NBRC1877 *ura3Δ* は、高塩条件で、HEMF 産生量の増加傾向があったが、有意差はなかった (Fig. 1)。この味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の2株を接合させ、その接合株の食品香気 HEMF の産生量を調べた (Fig. 2)。その結果、高塩条件下で、HEMF 産生量が増加する接合株 (NBRC1876/NBEC1877 *ura3Δ*-3) と、変化がない接合株 (NBRC1876/NBEC1877 *ura3Δ*-2) が存在した。このことから、高塩条件で食品香気 HEMF の産生量を増加させる遺伝的因子が、味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 に存在する可能性が示された (Fig. 3)。

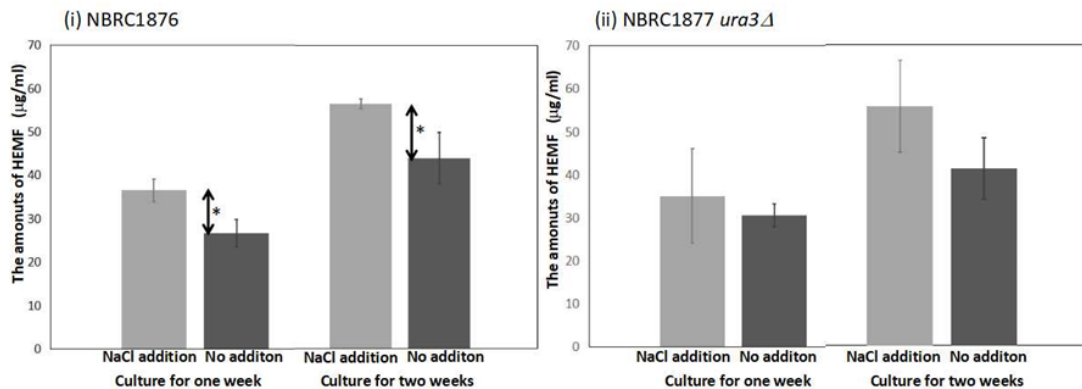
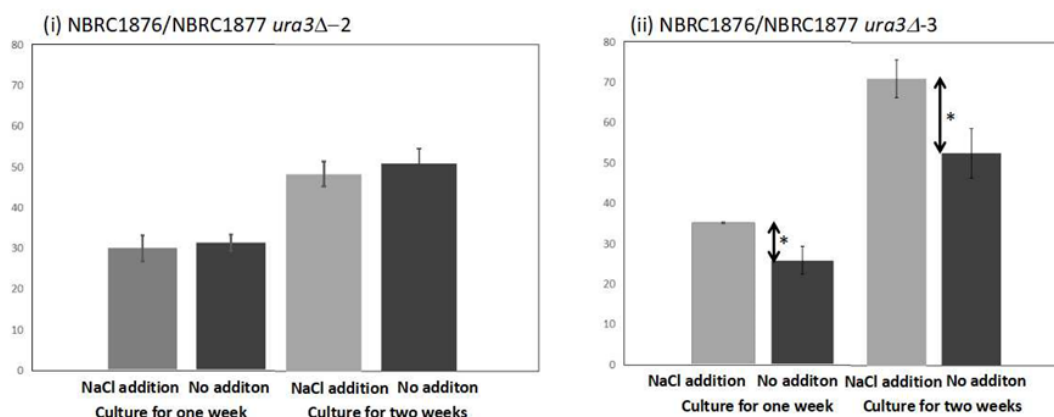


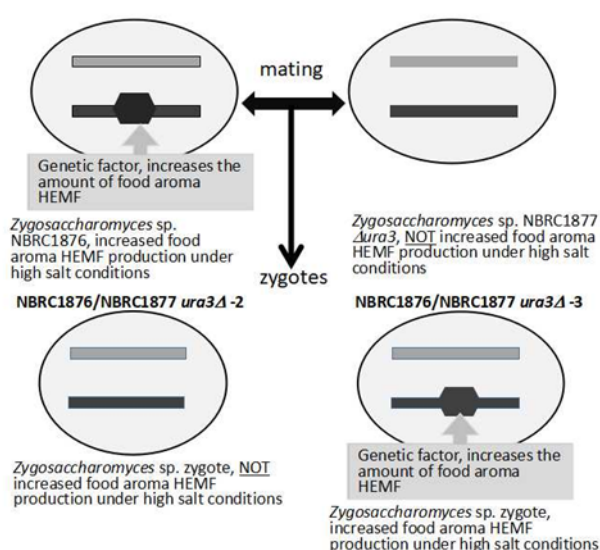
Fig. 1 Amounts of food aroma HEMF produced by miso soy sauce yeast *Zygosaccharomyces* sp.

\*: Significant difference ( $p < 0.005$ ).



**Fig. 2** Amounts of food aroma HEMF produced by miso soy sauce yeast zygotes.

\*: Significant difference ( $p < 0.005$ ).



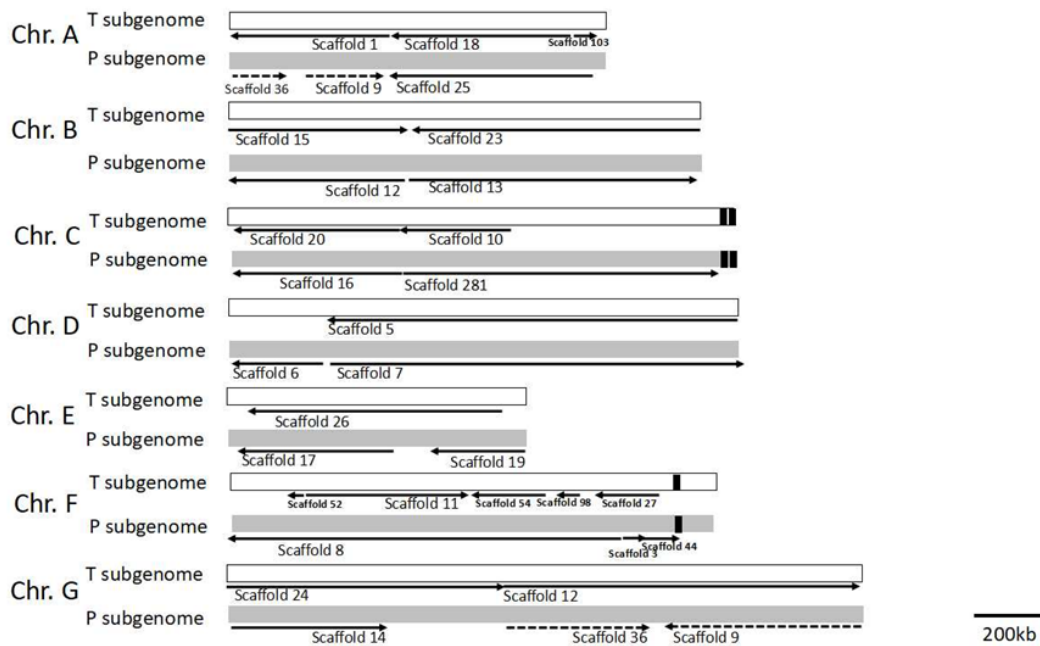
**Fig. 3** Existence of genetic factors that increase the amount of food aroma HEMF produced by miso, soy sauce yeast *Zygosaccharomyces* sp. under high-salt conditions.

### 3. 2 食品香気 HEMF の産生量に高塩条件で影響に差異のある *Zygosaccharomyces* sp. 酵母のゲノム配列解析

#### 3. 2. 1 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 のゲノム配列解析

*Zygosaccharomyces* sp. 酵母 NBRC1876 では、食品香気成分 HEMF の産生量が高塩条件で上昇し、NBRC1877 では高塩条件でも変化がなかった。その差異は、遺伝的因子、すなわち、ゲノム配列の差異に基づくことが考えられた (Fig. 3)。NBRC1876 は、既にゲノム配列解析がおこなわれていた。一方、NBRC1877 は、これまで、ゲノム配列解析がおこなわれていなかった。そこで、今回、NBRC1877 のゲノム解析を実施した。アセンブリの結果、548 個の

scaffold を得た。この scaffold の塩基数の総合計は、約 17 Mbp であった。NBRC1877 は、既にゲノム配列解析がおこなわれていた、味噌から分離された NBRC1876、あるいは、醤油から分離された NBRC110957 と同様に、*Z. rouxii* CBS732 と同じ配列からなる T subgenome 配列と、*Z. rouxii* 類縁菌の配列 P subgenome 配列からなる allodiploid であった。NBRC1876、あるいは、NBRC110957 のゲノム解析後の総塩基数は、概ね 18~19 Mbp であり、これらと比較すると、scaffold の塩基数の総合計は、1~2 Mbp 程小さかった。NBRC1877 の 548 個の scaffoldのうち、現在までに、33 個の scaffold の DNA 塩基配列を解析し、Fig. 4 に示す染色体構造を想定している。



**Fig. 4** The putative chromosome structure of *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 based on the chromosome structure of *Z. rouxii* CBS732 and *Zygosaccharomyces* sp. NBRC110957. The black box indicates mating type locus.

### 3. 2. 2 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 の染色体構造

*Zygosaccharomyces* sp. 酵母 NBRC1876 の想定している染色体構造は, **Fig. 4** に示したようになっていたことが予想された。*Z. rouxii* CBS732 の配列と概ね同一である T subgenome 配列からなる染色体と, *Z. rouxii* 類縁菌由来の配列である P subgenome 配列からなる染色体が並列しており, 既に, Draft Genome Sequence がおこなわれていた味噌酵母 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876, あるいは, 醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC110957 と同様の染色体構造であると考えられた<sup>2,3</sup>。一方, **Fig.4** に示されている Scaffold 9 のように, P subgenome 配列の Chromosome G から P subgenome 配列の Chromosome A にまたがる染色体の存在が, Platanus によるアセンブリで示された。さらに, *Zygosaccharomyces* sp. 酵母 NBRC1877 の一部の染色体領域 (Chromosome C T subgenome の右腕末端約 590 kbp, Chromosome D T subgenome の左腕末端約 300 kbp, Chromosome F T subgenome の左腕末端約 200 kbp, Chromosome G P subgenome の左腕部約 350 kbp) では, *Z. rouxii* CBS732, 味噌酵母 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876, あるいは, 醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC110957 と比較すると欠失があると想定された (**Fig. 5**)。

### 3. 3 味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合性発現関連遺伝子の遺伝子発現の高塩条件での検討

味噌醤油の醸造微生物である *Zygosaccharomyces* sp. 酵母の遺伝的安定性に影響をもたらすと予想される接合頻度が, 高塩条件で上昇したことを, 我々は見出した<sup>6</sup>。味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合性発現は, **Fig. 5** のような機序によって発現していると考えられる。すなわち, active *MAT* locus に, *Ya* 配列が挿入されていると, 転写因子をコードする遺伝子 *MATa2* が存在し, *STE6* 遺伝子等の接合性 *a* 特異的遺伝子群の発現が生じ, その細胞は, 接合性 *a* を発現する。転写因子 *Mata2* は, 接合性 *a* 特異的遺伝子群上流 (プロモーター) 配列にある UAS (upstream activation sequence, 転写因子結合配列) に結合する。この時, DNA 結合タンパク質である *Mcm1* と協奏的に (cooperative), 結合する。さらに, 転写活性化機能を有する, ゲノムグローバルな転写因子 *Ste12* も接合性 *a* 特異的遺伝子群の発現に寄与していると考えられている。接合性 alpha の発現も, active *MAT* locus に, *Yalpha* 配列が挿入されていること, コードされている転写因子が, *MATalpha1* 遺伝子であること以外は, 概ね同様である。

そこで, 本研究では, 接合性 *a* 特異的遺伝子である *STE6* 遺伝子, 接合性 alpha 特異的遺伝子である *STE3* 遺

伝子の発現を、そのプロモーター配列をレポーター遺伝子 *lacZ* に接続し、発現した $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を調べた。その結果は、Fig. 7 に示す。接合性 **a** 特異的遺伝子である *STE6* 遺伝子、接合性 **alpha** 特異的遺伝子である *STE3* 遺伝子ともに、高塩条件で遺伝子発現が上昇し、接合頻度が高塩条件下で上昇するとの我々の以前の報告<sup>6)</sup>と一致していた。細胞の接合性や接合性特異的遺伝子の発現は、active *MAT* locus にある *MATa2* 遺伝子、あるいは、*MATalpha1* 遺伝子がコードする転写因子によると考えられ

ている。そこで、これらの遺伝子発現も同様に、レポーター遺伝子 *lacZ* に接続し、測定した(Fig. 8)。*MATa2* 遺伝子の遺伝子発現は、高塩条件下で上昇傾向がみられたが、*MATa2* 遺伝子、あるいは、*MATalpha1* 遺伝子ともに、高塩条件での遺伝子発現の有意な上昇はみられなかった。したがって、転写因子である *Mata2*, *Matalpha1* のタンパク質量の増加が、接合性特異的遺伝子群である *STE6* 遺伝子、*STE3* 遺伝子の高塩条件下での遺伝子発現上昇をもたらしたのではないと考えている。

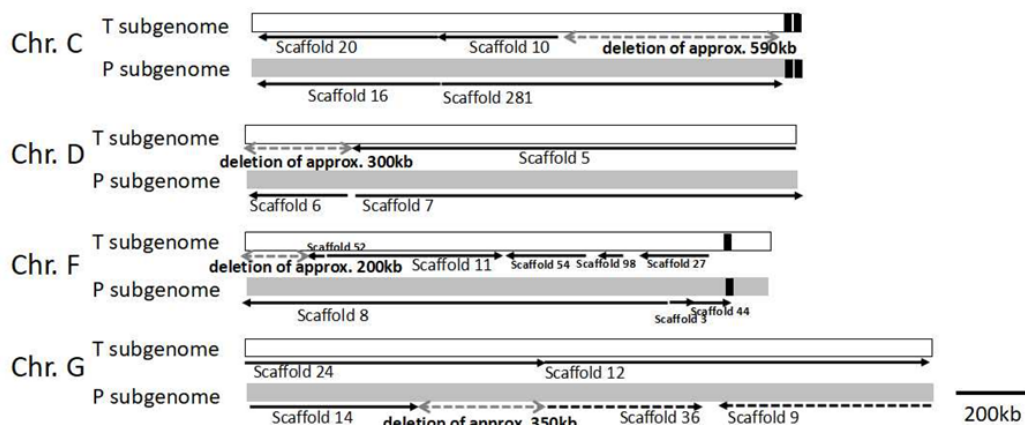


Fig. 5 The putative deletion sites in the putative chromosomal structure of *Zygosaccharomyces* sp. The black box indicates mating type locus.

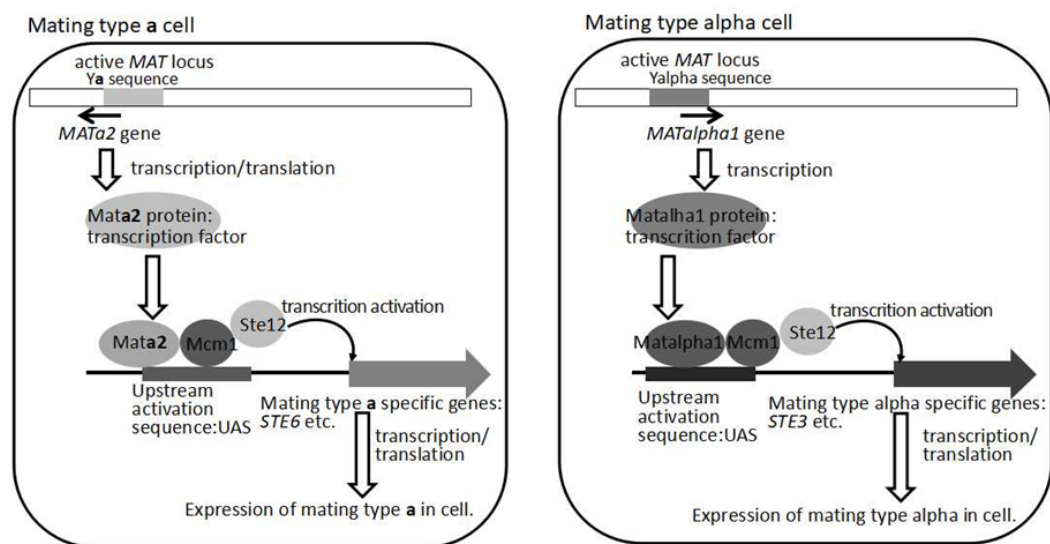
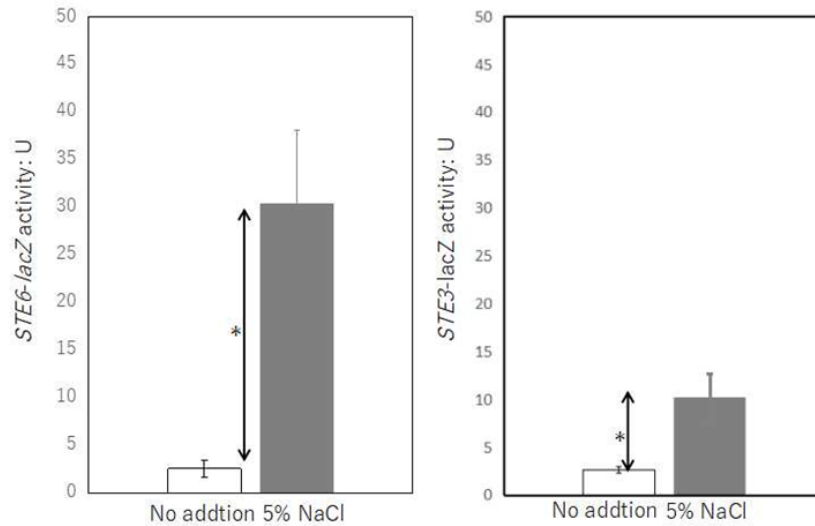
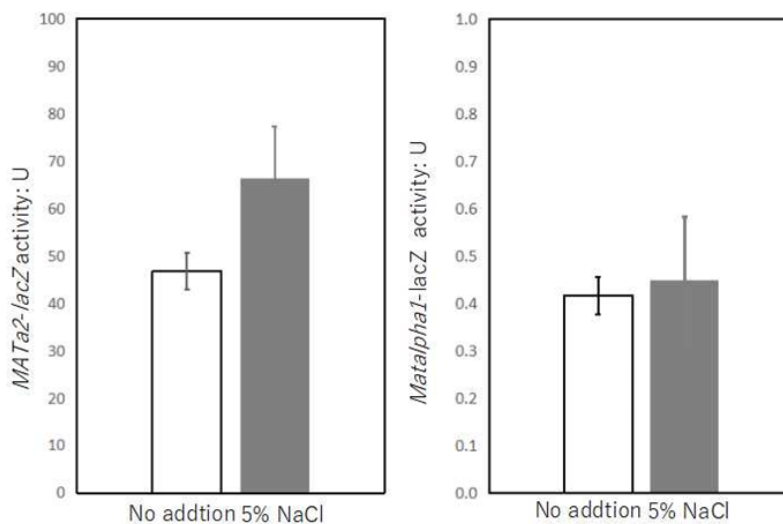


Fig. 6 A putative mating type expression mechanism of miso and soy sauce yeast *Zygosaccharomyces* sp.



**Fig. 7** Effects of high-salt conditions on gene expressions of mating type-specific genes.

\*: Significant difference ( $p < 0.005$ ).



**Fig. 8** Effects of high-salt conditions on gene expression of genes in the active *MAT* locus.

#### 4. 考察

発酵食品の品質に深く影響を与える食品香気成分である 4-hydroxyl-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) が、高塩条件で産生量が増加する酵母株 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 と、高塩条件でも産生量に変化がない酵母株 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 *ura3Δ* があり、両酵母株の接合酵母株の解析より、この差異は、遺伝的因子による可能性が示された。酵母株 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 の全ゲノム配列解析は既におこなわれている<sup>3)</sup>。一方、酵母株 *Zygosaccharomyces* sp.

NBRC1877 のゲノム配列解析は、いまだおこなわれていなかった。そこで、今回、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 のゲノム配列解析をおこなった。現在までの解析では、概ね、CBS732 の配列と概ね同一である T subgenome 配列からなる染色体と、*Z. rouxii* 類縁菌由来の配列である P subgenome 配列からなる染色体が並列していたが、一部の scaffold では、P subgenome 配列の Chromosome G から P subgenome 配列の Chromosome A にまたがる配列を示しており (Fig. 4, scaffold 9)、これが、実在する染色体の配列であるのか、バイオインフォマティクス処理での artifact であるかは、今後の

検討が必要である。さらに、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 のアセンブリ後の scaffold の総塩基配列数は、同じ allodiploid である、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876, NBRC110957 のゲノム解析後の総塩基数と比較すると、1~2 Mbp 程小さかった。*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 の染色体構造を検討すると、一部の染色体(Chromosome C T subgenome の右腕末端約 590 kbp, Chromosome D T subgenome の左腕末端約 300 kbp, Chromosome F T subgenome の左腕末端約 200 kbp, Chromosome G P subgenome の左腕部約 350kbp)では、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876, NBRC110957 の染色体と比較すると、欠失があると想定された(Fig. 4, 5)。このような染色体領域の一部欠失した酵母株の存在が、味噌・醤油製造にどのような影響を与えるかは、今後、考察を進める必要がある。

我々のこれまでの検討で、高塩条件下で、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合が促進されたことを見出している<sup>6)</sup>。今回の検討で、細胞に接合性をもたらす接合性特異的遺伝子群である *STE6* 遺伝子、*STE3* 遺伝子の遺伝子発現が、高塩条件下で上昇することを見出した。したがって、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合が高塩条件下で促進される要因として、高塩条件下で、接合性特異的遺伝子群の遺伝子発現が上昇し、細胞の接合性発現が強化されたことが考えられる。この接合性特異的遺伝子群は、active *MAT* locus にある *MATa2* 遺伝子、あるいは、*MATalpha1* 遺伝子がコードする転写因子によって、転写制御されている(Fig. 5)。今回の検討で、*MATa2* 遺伝子、あるいは、*MATalpha1* 遺伝子の遺伝子発現が、高塩条件下で有意に上昇していることは確認できなかった。したがって、active *MAT* locus にある *MATa2* 遺伝子、あるいは、*MATalpha1* 遺伝子がコードする転写因子の遺伝子発現が、高塩条件下で上昇し、接合性特異的遺伝子群である *STE6* 遺伝子、*STE3* 遺伝子の遺伝子発現が、高塩条件下で上昇したとは考えにくい。接合性特異的遺伝子群の発現には、ゲノムグローバルな転写因子である *Ste12* が関与していると考えられている。*Zygosaccharomyces* sp.酵母の *Ste12* は、C 末ドメインに、グルタミンとアスパラギンに富む領域(poly-Q, poly-N)がある。この領域は、天然変性領域(低複雑性領域)、あるいは、プリオン様領域になっている予想される。タンパク質、特に、転写因子のこのような領域は、細胞内外の環境変化にตอบสนองして、液滴(droplet)形成等をおこなうことで、細胞の適応に寄与していることが報告されている<sup>10)</sup>。味噌醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.

の転写因子 *Ste12* が、高塩条件等の環境変化にตอบสนองして、poly-Q, poly-N 領域を通じて、環境変化への応答を担っているとすると、我が国の伝統的な発酵食品である味噌、醤油製造にかかわる微生物の高塩条件適応に、転写因子の天然変性領域(低複雑性領域)、あるいは、プリオン様領域が関わっていることになり、興味深い。

## 5. 今後の課題

味噌、醤油は、我が国の誇るべき伝統的発酵食品であり、高塩条件下で、耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces* sp.が、発酵を進行させることが特徴である。高塩条件下で、発酵を進行される意義として、食品の品質を低下させる雑菌の増殖を抑制することが挙げられるが、主な発酵微生物である *Zygosaccharomyces* sp.酵母への高塩条件による影響は、あきらかにされていないことが多かった。我々は、以前の研究で、*Zygosaccharomyces* sp.酵母が、高塩条件下で、接合が上昇することを見出している<sup>6)</sup>。本研究では、その機構として、接合性特異的遺伝子群の遺伝子発現が、高塩条件下で上昇することを見出した(Fig. 6)。大きな一歩が踏み出せたと評価できる。耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の高塩適応機構の一部をあきらかにすることができた。今後の課題として、接合性特異的遺伝子群の遺伝子発現の高塩条件下で上昇する機構についての解明が待たれる。

発酵食品の品質に深く影響を与える食品香気成分である 4-hydroxyl-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) が、高塩条件下で産生量が増加する酵母株 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 と、高塩条件下でも産生量に変化がない酵母株 *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 *ura3Δ* との差異が、遺伝的因子による可能性が示されたので、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 のゲノム配列解析をおこなった。アセンブリソフトウェア Platanus によるアセンブリで、*Z. rouxii* CBS732 の Chromosome G から Chromosome A にまたがる配列の存在が示されたが、これが実在の配列であるのか、アセンブリの誤りであるのかは、今後の課題である。さらに、今回、ゲノム配列解析をおこなった *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 では、*Z. rouxii* CBS732, *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876, NBRC110957 の染色体と比較すると欠失した染色体領域があると推察された。このような酵母菌株の存在が、味噌・醤油製造に与える影響についても今後検討を進める必要があると考えられる。



## 6. 文献

1. The Génolevures Consortium Comparative genomics of protoploid Saccharomycetaceae. *Genome Res.*, 19, 1696–1709. (2009)
2. J. Watanabe, K. Uehara, Y. Mogi, Y. Tsukioka: Mechanism for Restoration of Fertility in Hybrid *Zygosaccharomyces rouxii* Generated by Interspecies Hybridization. *Appl. Environm. Microbiol.* Vol.83, e01187-17 (2017)
3. Sato, A., Matsushima, K., Oshima, K., Hattori, M., and Koyama, Y. (2017) Draft genome sequencing of the highly halotolerant and allopolyploid yeast *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC1876. *Genome Announcements*, 5, e01610-16.
4. Watanabe, J., Uehara, K., and Mogi, Y. Diversity of mating-type chromosome structures in the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* caused by ectopic exchanges between MAT-like loci. *PLoS ONE*, 8, e62121 (2013).
5. T. Ogata, K. Kuroki, K. Ito, A. Kondo, K. Nakamura: Variations in mating-type-like (MTL) loci direct PCR-based tracking of *Zygosaccharomyces* strains formed by mating. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 64, 127-135 (2018).
6. T. Ogata, K. Kuroki: Regulation of mating and mating-type-specific genes in *Zygosaccharomyces* sp. yeast. *Yeast* 38, 471-479 (2021).
7. E. Sugawara, M. Ohta, T. Kanazawa, K. Kubota, Y. Sakurai: Effects of the Amino-Carbonyl Reaction of Ribose and Glycine on the Formation of the 2(or 5)-Ethyl-5(or 2)-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone Aroma Component Specific to Miso by Halo-Tolerant Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol.71, pp1761-1763 (2007)
8. T. Dahlen, T. Hauck, M. Wein, W. Schwab: 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone as a secondary metabolite from D-fructose-1,6-diphosphate metabolism by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Biosci. Bioeng.* Vol.91, pp352-358 (2001)
9. R. Kajitani, K. Toshimoto, H. Noguchi, A. Toyoda, Y. Ogura et al. Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.*, 24, 1384– 1395 (2014).
10. B. R. Sabari, A. Dall’Agnese, A. Boija, I. A. Klein, E. L. Coffey, et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* 361, eaar3958 (2018).

## Effects of High-Salt Conditions on Fermenting Microorganisms in High-Salt Fermented Foods

Tomoo Ogata

Maebashi Institute of Technology

### Summary

Miso and soy sauce are fermented foods that are fermented under conditions where a large amount of salt is added to the food ingredients. *Zygosaccharomyces* sp. yeast, a salt-tolerant microorganism, is the main fermenting microorganism. Since most of the yeast strains used for the production of miso and soy sauce seeds are natural hybrids between *Z. rouxii* and related species, natural hybrids are hereinafter referred to as *Zygosaccharomyces* sp. yeast. Sufficient consideration has not been given to the effects of high-salt conditions on fermenting microorganisms and their effects on the quality of fermented foods.

HEMF (4-Hydroxyl-2(or 5-)-ethyl-5(or 2)-methyl--3(2H)-furanone) is a food aroma component produced by *Zygosaccharomyces* sp. yeast, and has a profound effect on the quality of fermented foods. We investigated how high-salt conditions affect the production of HEMF. As a result, *Zygosaccharomyces* sp. yeast NBRC1876 significantly increased HEMF production under high salt conditions. On the other hand, *Zygosaccharomyces* sp. yeast NBRC1877 *ura3Δ* tended to increase HEMF production under high salt conditions, but the difference was not significant. It was suggested that genetic factors that increase the production of food aroma HEMF under high-salt conditions may exist in miso-soy sauce yeast *Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876.

We have sequenced the genome of *Zygosaccharomyces* sp. yeast NBRC1877, which had not been sequenced until now. Chromosomes consisting of the T subgenome sequence, which are almost identical to the sequence of *Z. rouxii* CBS732, and chromosomes consisting of the P subgenome sequence, which are a sequence derived from *Z. rouxii* related species, were almost aligned. It was presumed that some chromosomal sequences were deleted when compared with previously whole-genome-sequenced yeast strains.

We have found that the mating of *Zygosaccharomyces* sp. yeast, the main fermenting microorganism for miso soy sauce, is increased under high salt conditions. Mating affects the genetic stability of yeast. Therefore, with the aim of obtaining biological knowledge that contributes to the production of higher-quality fermented foods with a high salt content, we investigated the expression of genes involved in mating expression in *Zygosaccharomyces* sp. yeast under high-salt conditions. Both the *STE6* gene, which is a mating type a-specific gene, and the *STE3* gene, which is a mating type alpha-specific gene, were upregulated under high salt conditions. This result was consistent with our previous report that mating frequency increased under high salt conditions.