

ワイン酵母が自発的にブドウを発酵するための条件を解明

—ワイン誕生の謎に迫る発見—

概要

京都大学大学院農学研究科 渡辺大輔 准教授（研究当時、現：奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科准教授）と橋本渉 教授は、ワイン作りに欠かせない酵母^{*1} という微生物がブドウ果皮に適応する現象を実験室内で再現することに成功しました。

ワインをはじめとする酒類の製造では、原料に由来する糖分をエタノールに変換するアルコール発酵^{*2}が行われ、アルコール発酵を行う微生物である酵母の存在が必要不可欠です。現代の醸造産業では、あらかじめ調製した酵母を大量に添加することで安定的にアルコール発酵を開始させるのが一般的ですが、酵母の存在が広く知られていなかった近世以前には、外界から酵母が原料中に混入し自発的にアルコール発酵を引き起こすのに任せていました。では、その酵母はそもそもどこからやって来たのでしょうか。本研究では、ワインの原料であるブドウに由来する微生物叢^{*3}の解析を行い、高いアルコール発酵能を有する酵母は検出されないことを示しました。一方、ブドウを乾燥貯蔵させることで生じるレーズンには高頻度でアルコール発酵能を有する酵母が存在し、レーズンを復水することで優占的な生育を示しました。この「レーズン酵母」^{*4}こそがワインの原型の一つと呼べるものかもしれません。本来ブドウに常在していない酵母が自発的にアルコール発酵を行うためには、レーズン作製時に見られるように、周囲の環境などからブドウ果皮に付着した酵母がうまく適応し生育する必要があります。そこで、ブドウ果皮常在菌に着目した結果、植物表層成分を分解・消費する多彩な特性を有することが見いだされ、酵母のブドウ果実内部の糖分へのアクセスをサポートしていることを実験的に明らかにしました。

本研究は、発酵食品において、発酵原料・発酵微生物だけでなく原料に元々住み着いている常在菌も加えた3者間相互作用の意義を解明したものであり、醸造の起源や成り立ちを考える上で重要な示唆を与えるものです。自然界における微生物生態系の構築原理の解明にも貢献することが期待されます。

本成果は、2023年6月20日に英国の国際学術誌「*Scientific Reports*」にオンライン掲載されました。

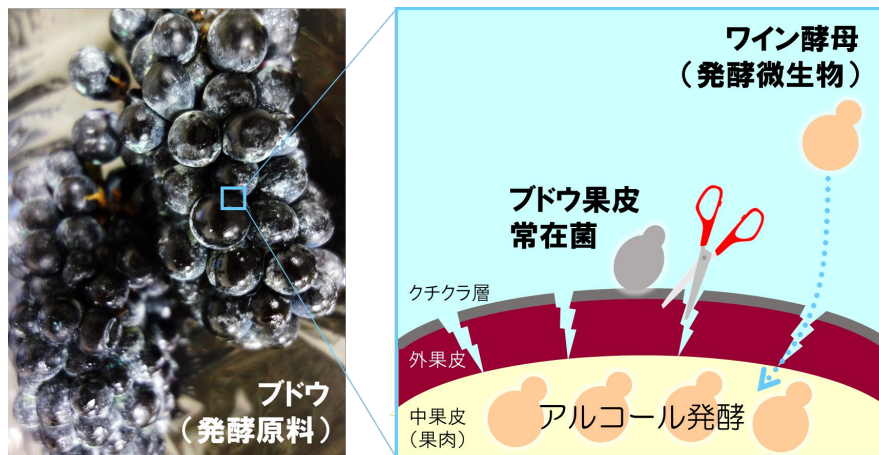


図. ワインの起源において想定される微生物間相互作用

1. 背景

ワインは、新石器時代に醸造が始まったとされるきわめて歴史の古い酒類です。人類がどのようにワインを醸造できるようになったのかについては現在でも多くの謎が残されています。通説では、ワインの原料であるブドウの果皮にアルコール発酵を行うことのできるワイン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*^{*5} およびその近縁種) が存在するとされ、ブドウを搾汁する過程でワイン酵母が果汁中に移行し、自発的にアルコール発酵が開始されると信じられてきました。一方、近年のより精密な解析の結果、傷のない健全なブドウの果皮にはワイン酵母がほとんど生育しておらず、アルコール発酵能のないまたは低い常在性の微生物からなる生態系が形成されていることが明らかとなってきました。したがって、ワインの起源と考えられる自発的な発酵プロセスにおいて、ワイン酵母がブドウ果皮に適応するためのメカニズムの解明が課題でした。

2. 研究手法・成果

本研究では、まず伝統的な自家製パン生地用に用いられる「レーズン酵母」に着目しました。パン作りに用いられるパン酵母も、ワイン酵母と同じ *S. cerevisiae* という微生物であり、アルコール発酵によって生じる二酸化炭素ガスによってパン生地を膨らませます。現在のようにパン酵母をドライイーストなどの形で簡単に入手することが難しかった時代には、ブドウ果実を乾燥させて作られるレーズンに水を加えて数日間保温することで生じる「レーズン酵母」がパン種として用いられていました。実際に市販のレーズンから「レーズン酵母」を作製し、その中の微生物叢をメタゲノム解析^{*6}と呼ばれる手法により調べたところ、高確率で *S. cerevisiae* をはじめとする高いアルコール発酵能を有する酵母がレーズンに存在し、優占的な生育を示しました(図1)。酵母はレーズン中の糖分を使ってアルコール発酵を行うことができるため、この「レーズン酵母」こそがワインの原型の一つである可能性が考えられました。

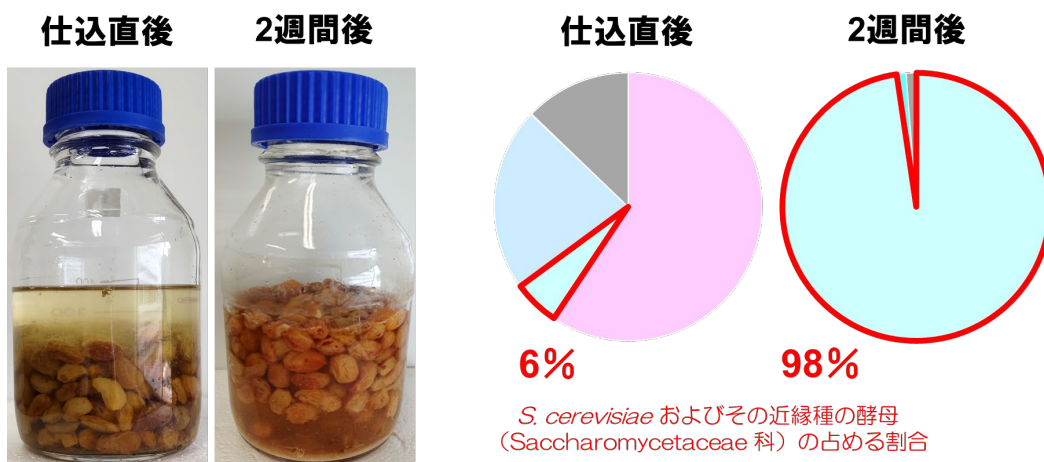


図1. 「レーズン酵母」の作製(左)とメタゲノム解析(右)の例

このことから、ワイン酵母がほぼ存在しないブドウからレーズンへと変化する過程で、果皮においてワイン酵母が生育するという仮説を考え、検証実験を行いました(図2)。実験室内で無菌のオープンを用いてブドウ果実を乾燥させレーズンを製造し、果皮に存在する微生物叢をメタゲノム解析により調べました。その結果、実験室内のレーズン製造では *S. cerevisiae* およびその近縁種の酵母は生育せず、あらかじめブドウ果皮に少量の *S. cerevisiae* を人為的に付着させた場合にのみ生育が認められました。周囲の環境や虫・鳥などの動物に由来する外来性のワイン酵母がブドウ果皮に付着することがきっかけとなって生育し、ワイン酵母を含むレーズンが形成されると推察されます。

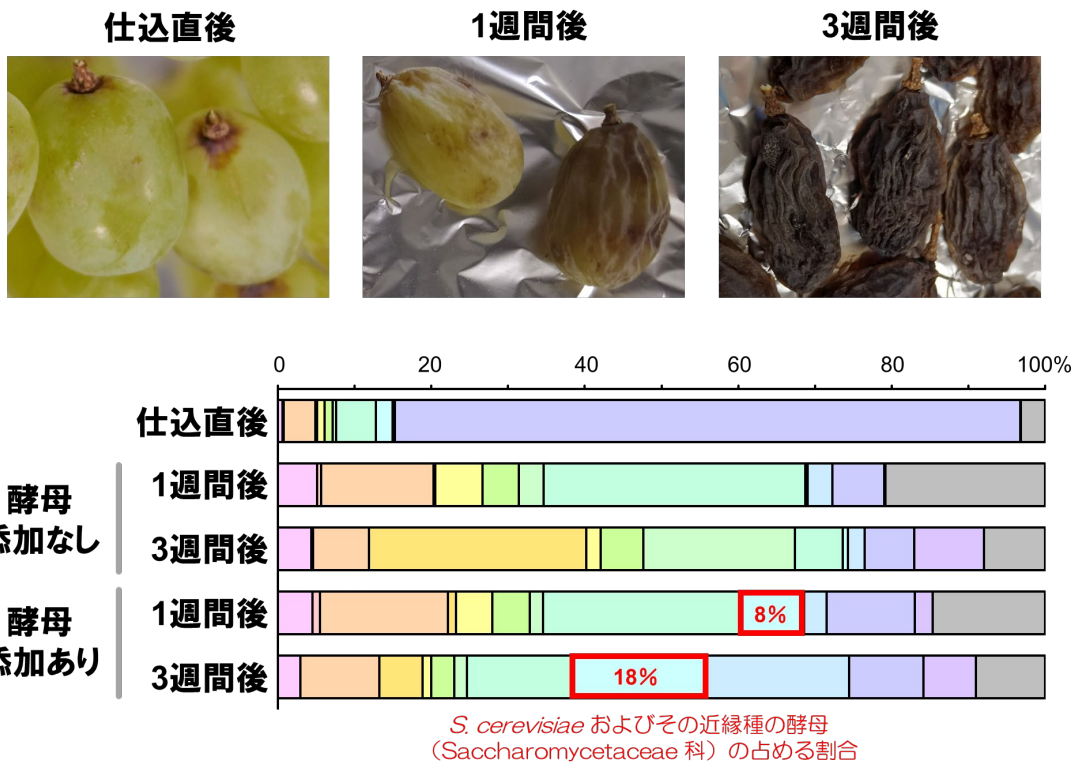


図2. レーズンの作製（上）とメタゲノム解析（下）の例

ではなぜブドウ果皮においてワイン酵母は常在することが難しいのでしょうか。本研究では、代表的なブドウ果皮常在菌^{*7}の一種として報告されている *Aureobasidium pullulans* という微生物（真菌）を国産のブドウから単離し、多くのワイン酵母が属する *S. cerevisiae* との比較を行いました。ブドウ果実は、他のあらゆる陸上植物の地上部と同様に、堅い細胞壁^{*8}をもつ果皮に覆われ、最も外側はクチクラ層^{*9}という脂質ポリマーによって保護されています。*S. cerevisiae* は細胞壁やクチクラ層に対して作用する能力をもちませんが、*A. pullulans* は細胞壁やクチクラ層を分解するための酵素を細胞外に分泌することができます（図3）。

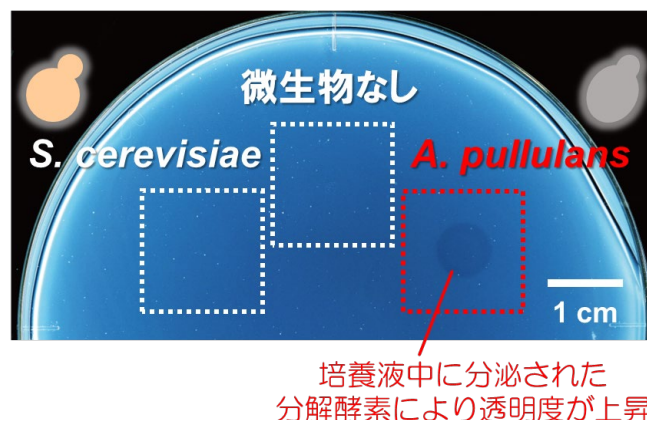


図3. クチクラ層中の脂質を模したポリカプロラク톤の分解試験

さらに、*S. cerevisiae* は細胞壁やクチクラ層の分解産物を栄養源として利用することはできませんが、*A. pullulans* はセロビオース^{*10}、ガラクトuron酸^{*11}、 ω -ヒドロキシパルミチン酸^{*12}といった多様な植物表層由来成分を単一の炭素源として利用し生育できることを見いだしました（図4）。特に、クチクラ層の分解産物である ω -ヒドロキシパルミチン酸を利用できる微生物は、本研究においてブドウ果皮からは初めて発見されました。ブドウ果皮常在菌は、植物表層の細胞壁やクチクラ層を分解し、その分解産物を自らのエネルギーに変換する能力によってブドウ果皮に常在できると考えられます。このような能力をもたないワイン酵母がブド

ウ果皮で生育することは困難であり、ブドウ果皮にワイン酵母が常在しづらい理由を実験的に証明することができました。

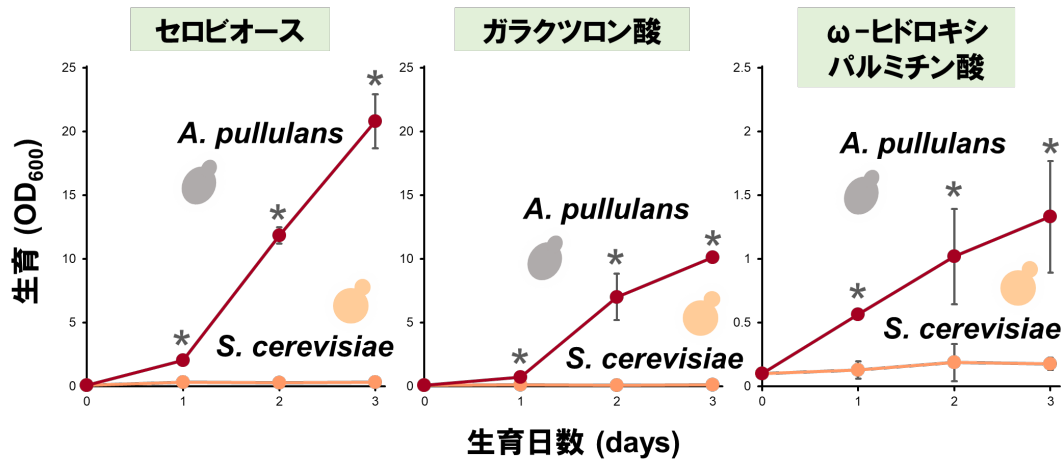


図4. 植物表層由来成分を単一炭素源とした生育試験

ワインの起源におけるブドウ果皮常在菌の意義を調べるために、ワインの自発的な発酵プロセスを模した条件での試験を実施しました(図5)。まず、発酵しやすいグルコース^{*13}を最少培地に添加した条件でのアルコール発酵に伴う二酸化炭素の発生速度を調べた結果、*S. cerevisiae*は高い発酵性を示したのに対し、*A. pullulans*はほとんど発酵性を示しませんでした。2種の微生物を混合培養すると、*S. cerevisiae*単独の場合と同程度の二酸化炭素発生速度を示し、*A. pullulans*の効果は認められませんでした。次に、最少培地にグルコースの代わりに傷のない生のブドウ果実を添加した条件での二酸化炭素発生速度を調べた結果、*S. cerevisiae*はグルコースを用いた場合と比べてアルコール発酵の立ち上がりが遅延することがわかりました。*A. pullulans*はほとんど発酵性を示しませんでしたが、*S. cerevisiae*と混合培養すると、*S. cerevisiae*単独の場合と比べて顕著に高い二酸化炭素発生速度を示すことを見いだしました。以上の結果から、*S. cerevisiae*がブドウ果実内部の糖分にアクセスしてアルコール発酵を行う上で、植物表層の細胞壁やクチクラ層が障壁となっている可能性が示唆されました。*A. pullulans*自身はアルコール発酵性を有しませんが、細胞壁やクチクラ層を分解して消費する能力を介して*S. cerevisiae*の糖分へのアクセスを促進しアルコール発酵に貢献していると考えられます。

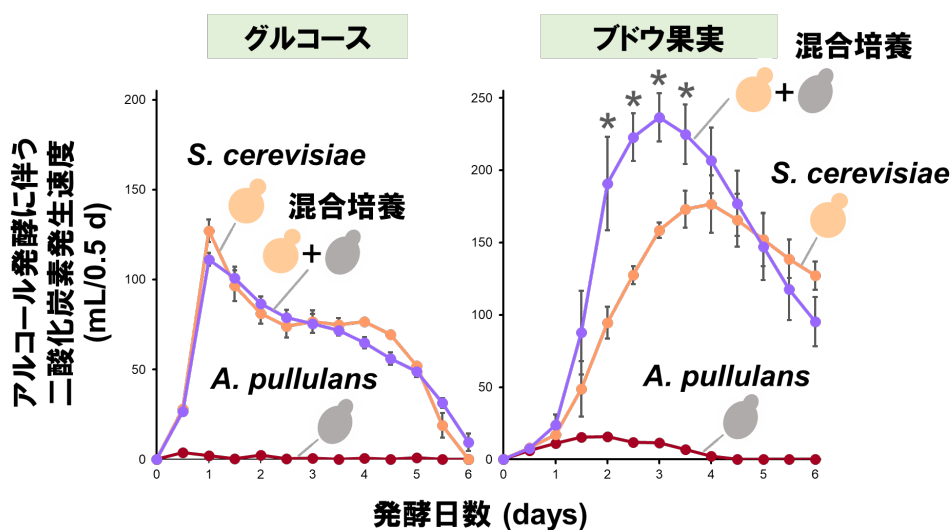


図5. ワインの自発的な発酵プロセスを模した発酵試験

本研究により、ブドウ果皮にはワイン酵母が常在しづらいことを明確にし、その理由として、ワイン酵母はブドウ果皮常在菌とは異なり、植物表層の細胞壁やクチクラ層を分解し、その分解産物を自らのエネルギーに変換する能力をもたないことを突き止めました。ワイン酵母が自発的に発酵を行うためには、ワイン酵母が周

困る環境などからブドウ果皮に付着することと、ブドウ果皮常在菌のサポートによりブドウ果実内部の糖分にアクセスすることが鍵を握ることを実験的に明らかにしました。ワインの誕生時には、乾燥貯蔵したレーズンのような状態から復水する「レーズン酵母」を作製することで、ワイン酵母の優占的な生育を実現していた可能性が提唱されました。実際に、干しぶどうからワインを製造するワイナリーが存在します。

3. 波及効果、今後の予定

本研究における発見は、ワイン醸造ひいては食品発酵の起源や成り立ちを考える上で重要な示唆を与えるものです。本研究成果から、ブドウをレーズンにするなどのプロセスを経てワイン酵母をブドウ果皮に適応させる必要性が明らかになりました。またその適応プロセスでは、発酵原料（ブドウ）・発酵微生物（ワイン酵母）に加えて原料に元々住み着いている常在菌との3者間相互作用を解析する意義が示されました。異なる生物間の相互作用によって生み出される発酵食品とは、人類が長年の歴史をかけて編み出してきた生態系であるとも言えます。本研究成果は、発酵食品に限らず自然界における様々な微生物生態系の構築原理の解明にも貢献することが期待されます。今後は、ワイン誕生の謎に関する探究を続けると共に、ワイン以外の発酵食品の起源についても研究を進めることで、発酵醸造文化および食品製造技術の源泉に迫る発見につなげていきます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究（C）20K05958 および新学術領域研究（研究領域提案型）22H04885）の支援を受けて実施されました。

<研究者のコメント>

発酵・醸造の起源に関して証明が難しい様々な通説がありますが、本研究では実験的手法によりワイン誕生の謎に迫る発見が可能となりました。我々の研究は、原材料を発酵食品へと変換する微生物の力を見いだした人類の足跡を辿る旅であり、現代の発酵技術にも応用可能な知見を再発見する意義を有しています。（橋本 渉）

アルコール発酵を行う酵母は人類にとって馴染み深い微生物ですが、その生きざまについてはいまだに多くの謎が残されています。本研究によってワイン酵母はブドウに住み着いていないことが明確になりましたが、本来の住処はどこなのかという新たな謎が生まれました。解明に向けて今後も挑戦を続けます。（渡辺 大輔）

<用語解説>

※1 **酵母**：単細胞性の真菌類の総称で、イースト菌とも呼ばれます。ワイン作りに用いられるワイン酵母、パン作りに用いられるパン酵母などが代表例です。

※2 **アルコール発酵**：糖を分解してエタノールと二酸化炭素を生成し、エネルギーを得る代謝プロセスです。

※3 **微生物叢**：生態系における微生物の集団のことです。

※4 **レーズン酵母**：レーズンと水を混合し保温することによって作られる伝統的な自家製酵母液です。現代でも天然酵母パンの製造に用いられています。

※5 ***Saccharomyces cerevisiae***：酵母の代表的な種の一つであり、高いアルコール発酵能を示す有用微生物です。ワイン酵母やパン酵母の多くがこの種に属しています。

※6 **メタゲノム解析**：微生物叢に含まれるすべてのゲノム DNA を混合物として抽出し解析する手法です。存在する微生物の種類や比率を推定するために用いられます。

※7 **ブドウ果皮常在菌**：ブドウ果皮に常時存在し、ブドウにとって強い病原性を示さない微生物です。酵母様真菌 *Aureobasidium pullulans* や担子菌酵母などが報告されています。

※8 **細胞壁**：細胞外に位置し細胞内部を保護する構造です。植物の細胞壁はセルロースやペクチンなどから構成されています。

※9 **クチクラ層**：陸上植物の地上部の表皮の外側を覆う透明な膜で、脂質ポリマーから構成されています。

※10 **セロビオース**：セルロースの分解産物である二糖です。

※11 **ガラクトuron酸**：ペクチンの主要構成成分である酸性糖です。

※12 **ω -ヒドロキシパルミチン酸**：クチクラ層の主要構成成分である脂肪酸です。

※13 **グルコース**：天然に存在する代表的な単糖です。ブドウにも多く含まれブドウ糖とも呼ばれます。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Adaptation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to grape-skin environment

(酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のブドウ果皮環境への適応)

著者：Daisuke Watanabe & Wataru Hashimoto

掲載誌：Scientific Reports

DOI：10.1038/s41598-023-35734-z