

公益財団法人 高木俊介パン科学技術振興財団 2023 年度助成研究報告書

研究課題名：研究課題名：脳情報を含めたパン類の感覚特性 (脳情報に基づくパンのおいしさの男女・年代間比較)

広島大学大学院人間社会科学研究科 富永美穂子
広島大学 脳・こころ・感性科学研究センター 町澤まろ

1. 目的

国内においてはパンへの支出額が米への支出額を上回り、パン食のニーズが増加している。パンは、その種類が非常に豊富であり、パンの好みや選択は、購入方法も含め、個々人の生活スタイルやTPPOにより多様であると考えられる。広島大学町澤グループ・富永グループとアンデルセングループは、文部科学省・JST事業「COISTREAM」において、2020年度より本研究テーマの試金石となる「石窯パンのおいしさ」について、石窯以外の焼成パンとの比較を、視覚・実食と質問紙により行ってきた。その研究の一部を2021年度の卒論研究としても取り組み、パンに対する大学生の意識に関する調査の成果として、①大学生は、自身の居住場所において朝食時にスーパーで購入した食パンを食べる割合が高い。②もちもち感のあるしっとりとしたパンを好み、焼き立ての香りや食感、パン選択購入時には大きさや見た目を重視している。③女性の方が男性よりもパンに対して、お腹や心が満たされる満足感や幸福感を感じる割合が高く、パンに対する消費選択行動や価値意識に男女差があること、などを明らかにした¹⁾が、対象が大学生のみにとどまっている。

通常、食品のおいしさは実食により、判断・評価されてきたが、近年、ネット通販やSNSを通じて、食品を画像で見る機会が増えており、提示された画像のみから味覚や食感などの感覚特性をイメージして評価し、最終的に購入に至っていると考えられる。また、これまでパンのおいしさ等にかかわる評価については、人による主観評価（香ばしさ、甘さ、硬さなど）、機器測定による成分評価（糖度、味覚応答）、表面・内相の色や物理的評価（保水性、もろさ、付着性）などの指標で行われてきた。パンの購入者が実食した際の感動や味覚体験の評価は、回答者の意識的な主観評価反応はわかるものの無意識的な生理反応までは読み取ることができず、リアルタイム性にも欠けるという点で課題があったといえる。そのような課題を解決するためには、生理反応の一種であり、脳細胞の活動によって生じる電位変化を記録した脳波を用いることが有効であると考えられた。そこで、18歳以上の幅広い年代を対象にパンに対する意識や摂取頻度、食生活へのこだわり、パン画像から受ける印象をWebアンケートにより評価してもらい、20歳以上の女性を中心に脳波を測定し、複合解析できるデータを収集している。本報告では異なるパン種の実食による官能評価と画像評価に基づき、人のパンに対する感覚特性を捉えることとした。その際、実食評価においては、実物情報の有無も含めて、比較検討した。また、20代女性を主対象にパン種、アングルが異なるパン画像視覚評価中の事象関連電位の経時変化を分析した。

2. 調査内容および方法

(1) 実物情報の有無による市販パンの実食評価

朝食に喫食される可能性が高い5種の市販パン（石窯山型トースト、石窯モーニングフランス、ひとつちフランス、朝の食パン、国産小麦と米粉のロール）を外層、内層を含み2cm角に

切断したものをサンプルとした。サンプル5種をランダム配置し、大学生50名（男性14人、女性36人）を対象に実物を見ながらの有無（各25名）により、試食してもらい、かたさ、もちもち感、甘味、高級感などの9項目について、7件法および総合的な好みを順位法で評価してもらった。

（2）市販パン画像による印象評価

8種の市販パン（4パターン（ケースもの（食パン）、ロールパン、直焼き、菓子パン）×2種）を外観、内層が見えるアングルで撮影した画像を使用し、webアンケートを実施した。18歳以上、20代を中心に、1006人（男性301人、女性700人、その他：5人、10代：297人、20代：481人、30～40代：140人、50代以上：88人）を対象に、各パンのかたさ、甘さ、苦さ、朝または夜の食べたさ、高級感の6項目をVAS（Visual Analogue Scale）法（0（全くそうでない）～100（とてもそうである））により評価してもらった。

（3）市販パン画像による印象評価と脳波計測

8種の市販パン（4パターン（ケースもの（食パン）、ロールパン、直焼き、菓子パン）×2種）を外観、内層が見える、真横、スライスなど、6アングルで撮影した画像を使用した。ランダム表示されるパン画像に対して、画像提示4秒後に甘さ、苦さ、食べたさの何れかをVAS法により評価してもらった。これら評価項目別にパン画像評価課題中の脳波を多チャンネルドライ脳波計（CGX社製Quick30）を装着してもらい、測定した。

（4）分析方法

実食評価については、パン種間および実物情報の有無により、各パンの評価項目の平均値を算出し、分散分析またはt検定により比較した。

Webアンケートによる画像評価については、調査項目の単純集計ならびに全体、男女別、年代別（10代、20代、30～40代、50代以降の4段階）にt検定、分散分析等を行った。

脳波データについては、それぞれの味覚評価時に脳内においてどの程度のインパクトを受けているのか評価した。視覚ワーキングメモリ容量を反映する脳波指標を用いて特定可能であることが報告されている³⁾。本研究では、特に事象関連電位（event-related potential）の一成分である脳内イメージ量を反映するNegative Slow Wave（NSW）⁴⁾を計測した。

21名の脳波データはMATLAB（Mathworks社）およびEEGLAB v2022.0（University of California San Diego）を用いて、視覚の認知に関連する後頭部（側後頭葉及び、後頭頂葉周辺の電極：O1/2, PO7/8, PO3/4, ）を対象にNSWを算出した。全29電極を用いてそれぞれのtime-windowにおける頭皮上トポグラフィーを算出した。

調査の集計および解析には、統計用ソフトSPSS ver.28（日本IBM（株））を使用し、有意水準は5%とした。

（5）倫理的配慮

本調査において、Webアンケートへの回答内容は、本研究のみに使用し個人が特定されることなく、調査への協力は強制ではなく任意であり、回答をもって同意とした。なお、本研究は、本学大学院人間社会科学研究科倫理審査委員会（心理学専門領域部会）の承認（承認番号：HR-PSY-000370）を得て実施した。

3. 結果および考察

（1）実物情報の有無による市販パンの実食評価²⁾

実食評価において、実物情報なしでは、総合評価を除く、すべての項目、実物情報ありでは総合評価、高級感を除くすべての項目にパン種間で有意差が認められた（図表省略）。使用したロールパンはもちもち感やしっとり感、甘味が強く、フランスパンはかたく、香ばしく、苦味が強いと評価されるなど、パン種間でそれら感覚特性が区別されていた。実物情報の有無による差はほとんど見られなかつたが、高級感や苦味に影響する可能性が示唆された（Fig.1）。実食評価において、対象者は味覚、食感を中心とする各パンの感覚特性を区別していたが、総合評価においてはパン種による差が認められず、相対的に一致した味覚や食感の判断が総合評価には反映されず、嗜好のバラツキが大きいことが確認できた。実物情報の有無はそれほど評価に影響されない可能性が示唆されたが、同一の対象者で行っておらず、その影響は否定できない。

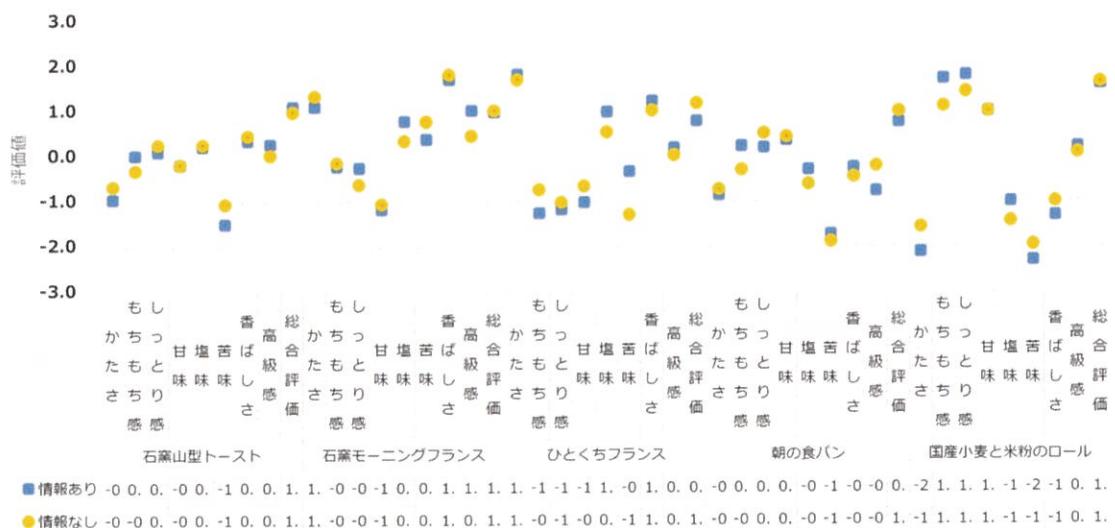


Fig.1 実物情報の有無による市販パンの実食評価（情報あり；N=25, 情報なし；N=25）

（2）市販パン画像による印象評価

8種の市販パン画像（Fig.2）について、各評価項目の平均値を集計したFig.3に示す。昨年度より調査人数を増やしてもパン種間におけるかたさ、甘さ、高級感の得点差が大きく、菓子パンであるサンライズ、あんパンは他のパン種よりも突出して甘く、石窯パンは他種よりもかたく、高級であると評価された。また、夜の食べたさ自体の平均値は高くはないが、石窯パンは他のパン種に比較し、夜に食べたいパンであることが示唆された。

調査人数に偏りがあるが、苦さやおよび菓子パン類の朝や夜の食べたさに男女差が認められ、男性の方が女性よりも苦味および菓子パン類の朝や夜の食べたさが高値であった（図表省略）。男女差よりも年代差の方が多く認められ、パン種により若干異なるが、特に甘さ、朝の食べたさ、夜の食べたさ、かたさの差が大で、10～20代の若年層の方が甘さ、かたさ、菓子パン類の朝の食べたさ、夜の食べたさが高値であった（Fig.4-1～Fig.4-4）。カントリーフランス、石窯フランスなどの直焼きパンの朝の食べたさは年代が高い方が高値であった（Fig.4-3）。各パンの評価項目に対する平均得点の標準偏差が20点以上ある項目がほとんどで、使用したパンサンプルの食経験の差も影響している可能性がある。さらに朝や夜の食べたさに対するバラツキが大きく、菓子パン2種は朝の食べたさの標準偏差が30点程度あり、朝食として、喫食したいパン種の個人差が大

きいと考えられ、評価人数を増やしても同じ傾向が認められた。さらに特に年代において、食品のかたさや甘さに対する感覚や受容性が異なっていた。個人の価値意識に加えて、食生活の変化なども関連している可能性が示唆され、甘く、やわらかい食品が近年増えている影響が推察された。

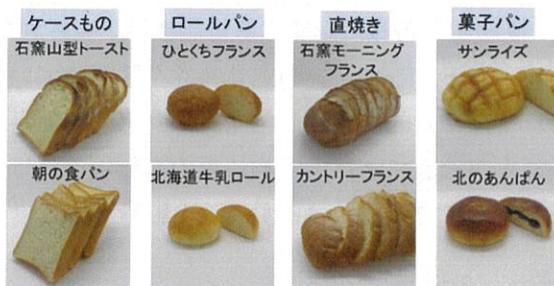


Fig.2 使用した市販パン画像

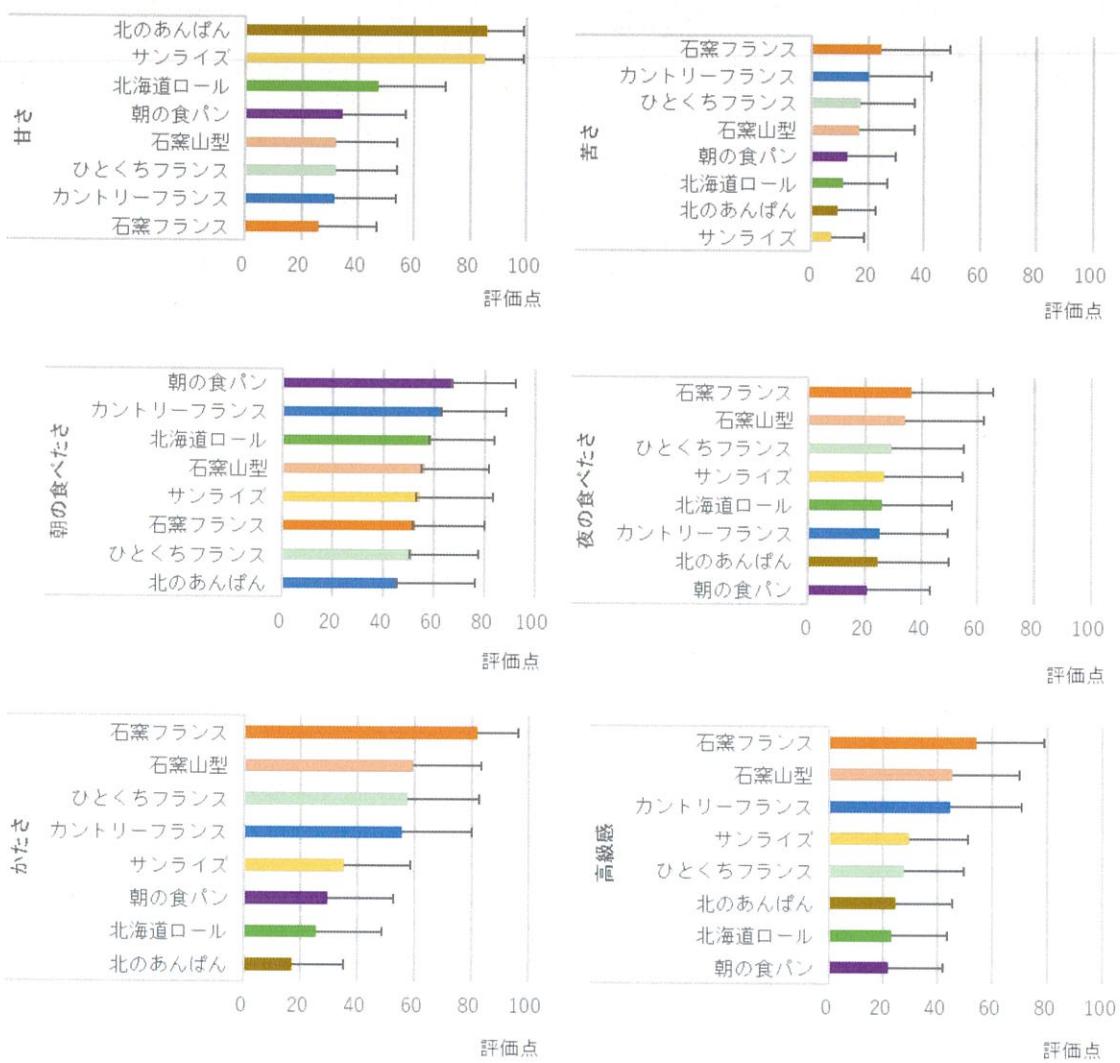


Fig.3 市販パン画像の印象評価 (N=1006)

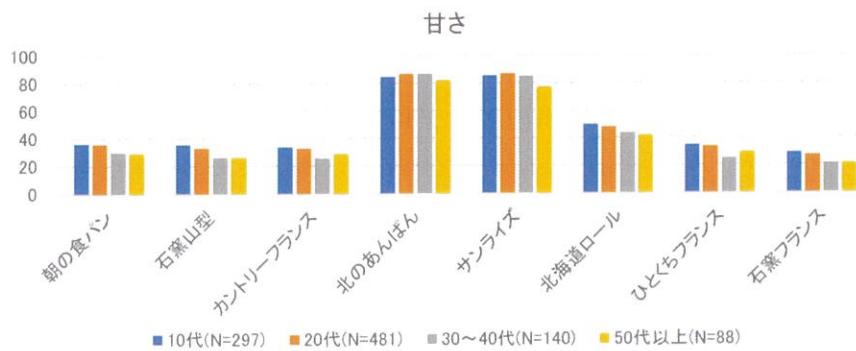


Fig.4-1 年代別市販パン画像の評価（甘さ）

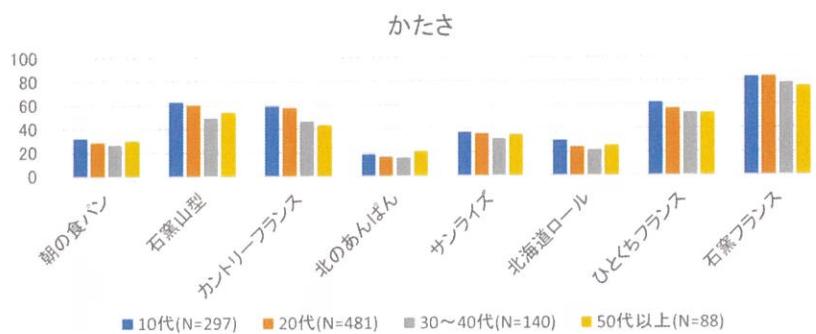


Fig.4-2 年代別市販パン画像の評価（かたさ）

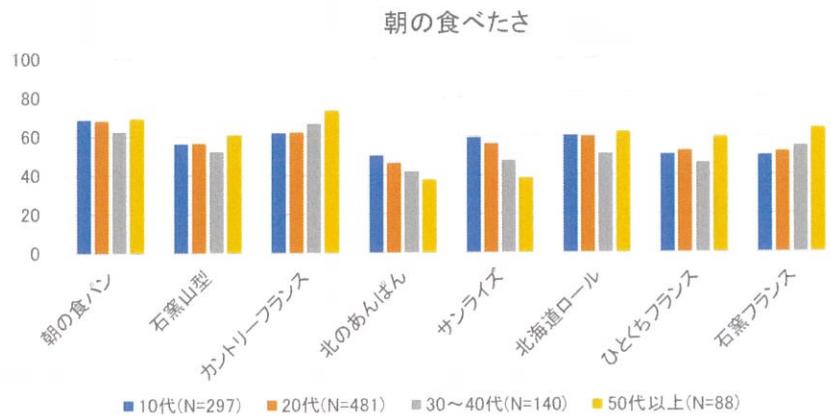


Fig.4-3 年代別市販パン画像の評価（朝の食べたさ）

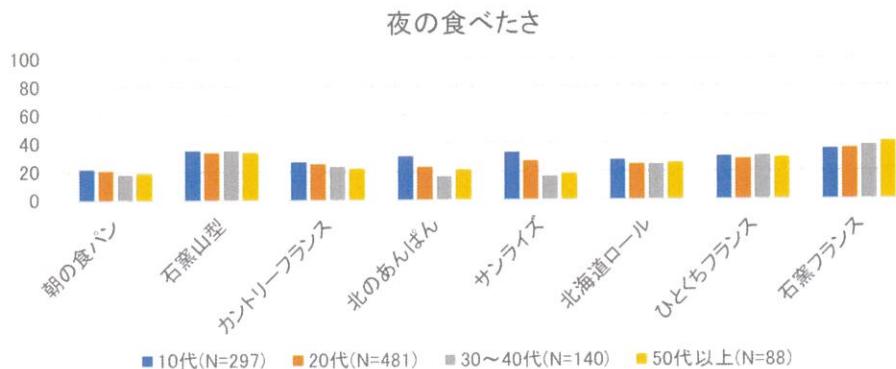


Fig.4-4 年代別市販パン画像の評価（夜の食べたさ）

(3) 市販パン印象評価時の脳波

脳波測定に関して、本年度は昨年度取得した 21 名の被験者のデータの追加解析を試みた。20代女性が中心であるが、これら被験者の平均の 400～1000, 1000～2000, 2000～3000 ミリ秒の頭皮上トポグラフィーの経時的変化と課題評価中の後頭頂葉及び側後頭葉領域 (P7/8, PO3/4, PO7/8, O1/2; 下図青枠円内の電極) における事象関連電位を示す (Fig. 5)。視覚評価の脳波データから、正常の脳波反応がみられることが確認され、また、食べたさ、甘さ、苦さ評価のそれぞれにおいて右島皮質付近の前頭部において異なる電位（脳活動）が起こっていることが確認された（前年度報告済）。また、それぞれの評価時において、見ている画像が視覚ワーキングメモリ（心的表象）に保持されている情報量に差はなく、同等にイメージを保持されていたことがわかった。前年度の結果も踏まえると、特に甘さ評価時の島皮質付近での脳活動が特異的に味覚評価の内容によって異なることがわかった。

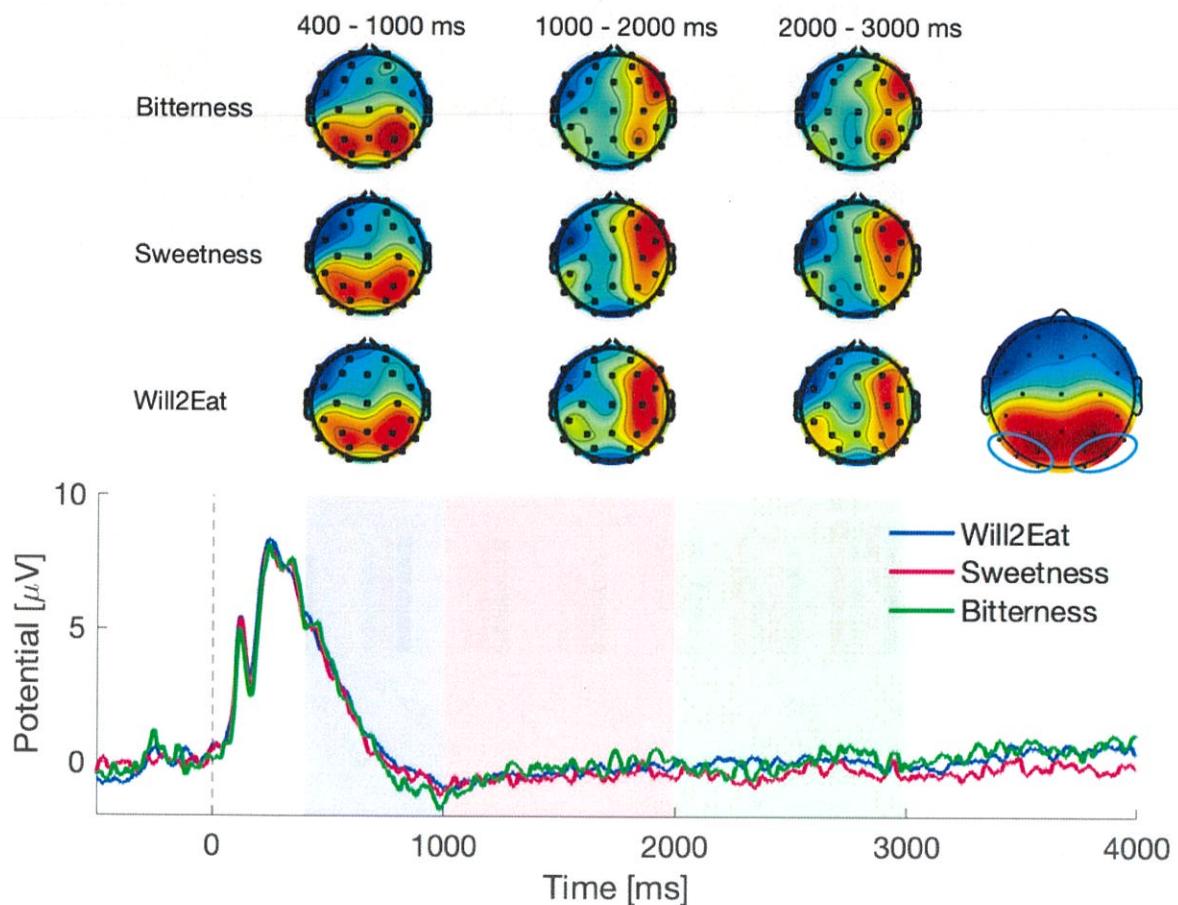


Fig.5 評価課題中の頭皮上トポグラフィーの変化と事象関連電位波形 (N=21)

甘さ、苦さ、食べたさについて VAS 法で評価してもらい、その際の個々人の回答値から、個人毎の中央値をもとに高得点試行 (Y) および低得点試行 (N) に分類し、パン画像を評価している際の ERP 経時的変化を分析したところ、いずれの評価時においても、高低の有意差はみられなかったが、甘さ評価時において食べたさ評価時よりもより脳内イメージ量が多い (NSW 振幅がより大きい) 傾向が確認された (Fig.6-1～6-3)。

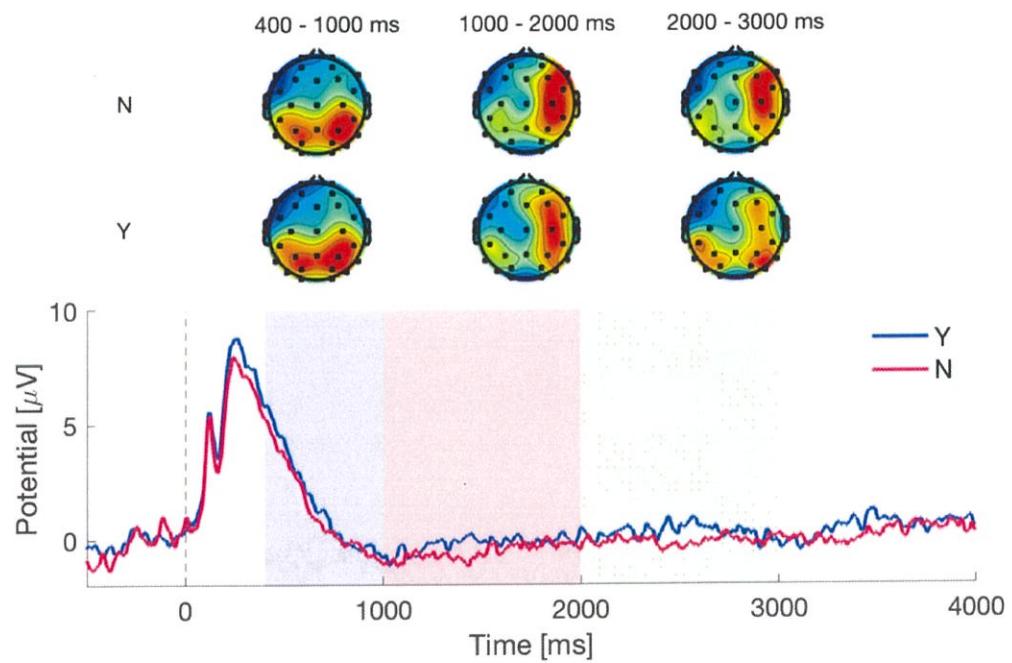


Fig.6-1 食べたさ評価中の頭皮上トポグラフィーの変化と事象関連電位波形 (N=21)

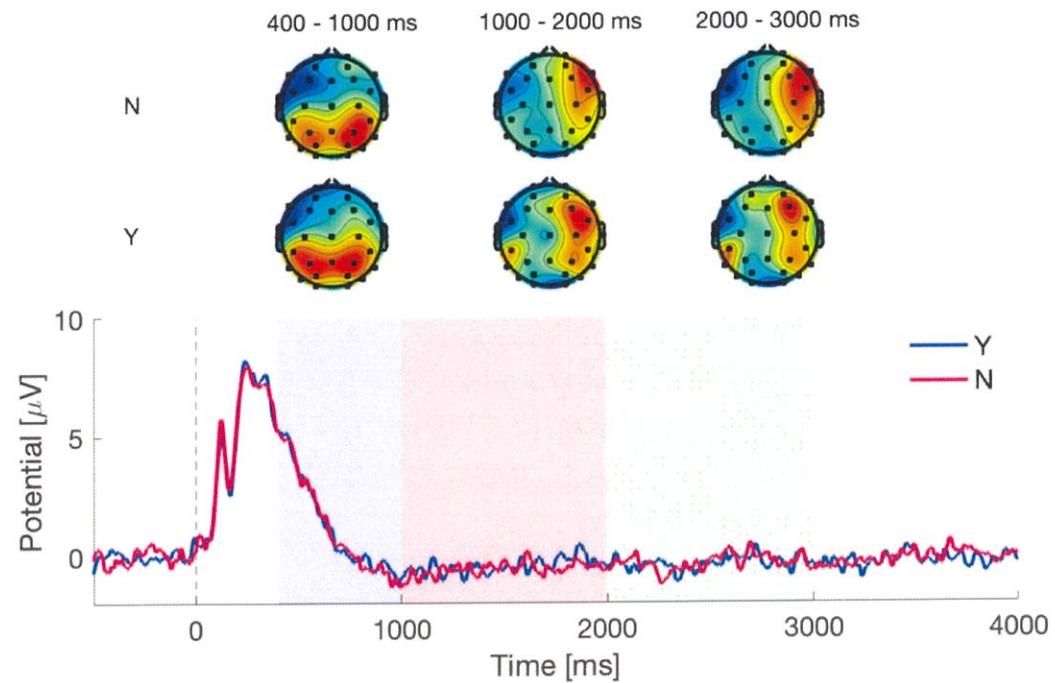


Fig.6-2 甘さ評価中の頭皮上トポグラフィーの変化と事象関連電位波形 (N=21)

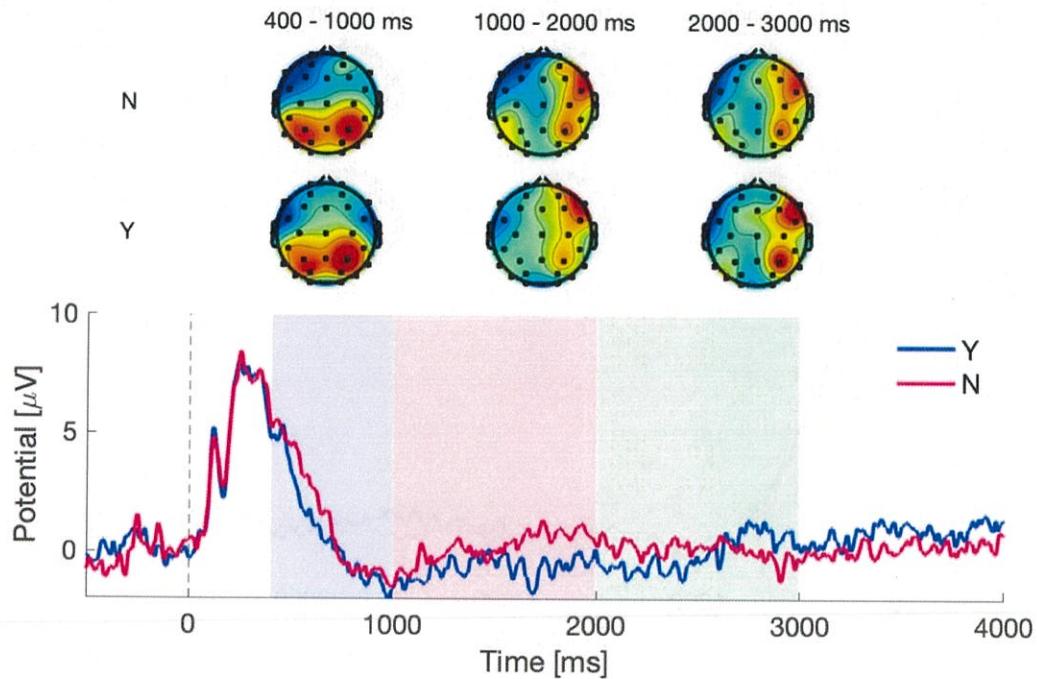


Fig.6-3 苦さ評価中の頭皮上トポグラフィーの変化と事象関連電位波形 (N=21)

また、同様に、パンの種類のみ主効果での比較（評価内容およびアングルを考慮せずに）では、NSW に有意差はみとめられなかった ($F_{7,140} = .740; p = .639$) が、パンの種類と時間との相互作用がみられた ($F_{7,303,146.060} = 2.347; p = .25$; partial $\eta^2 = 0.105$)。画像を見た直後の早いタイミング (400-1000 ミリ秒)において、朝の食パンがその他のパンの種類 (D 北のあんぱん, E カントリーフランス, F サンライズ, G ひとつくちフランス, H 北海道牛乳ロール) よりも NSW の振幅が大きく（より陰性）、脳内イメージの情報量が大きかった (Fig7-1; $p_{\text{uncorrected}} < .05$)。遅い時間帯ではその傾向は見られなかった ($p_{\text{uncorrected}} > .05$; 有意差なし)。

また、同様に行ったパンのアングルについての比較から、アングルの主効果が有意であった ($F(5,100) = 3.157; p = .11$; partial; partial $\eta^2 = 0.136$)。スライス 2 枚（アングル 3）およびスライス数枚のイメージ量（アングル 4）が真横（アングル 6）（ $p < .05$; **）および特に真横断面（アングル 2）(Fig7-2; $p < .001$; ***) よりも多く (NSW がより陰性)，スライスの方が心的インパクトが大きい提示方法かもしれない可能性がある。

脳波解析の結果から、食べたさの良し悪し評価には、今回検討したパンの種類においては、心的イメージの影響はなく、何れも同等に脳内インパクトを持って評価されていることがわかった。また、パン種類での比較では、食パンがインパクトが大きいことがわかった。また、石窯パンとの有意差はなかったため、その食パンと石窯パンとは同等の心的インパクトがあると考えられる。展示方法に関わると思われるアングルによる比較においては、2 枚以上のスライスを並べて見た時には、側面、特に真横から見る断面での提示よりも、心的インパクトを大きく与えられているということが分かった。これらの結果から、心的イメージ（インパクト）を考慮した展示方法の検討に寄与するかもしれない。また、本研究は脳科学的研究として心的イメージとパンのおいしさ評価において新しい知見が得られたと考えられ、今後のさらなる研究が期待される。

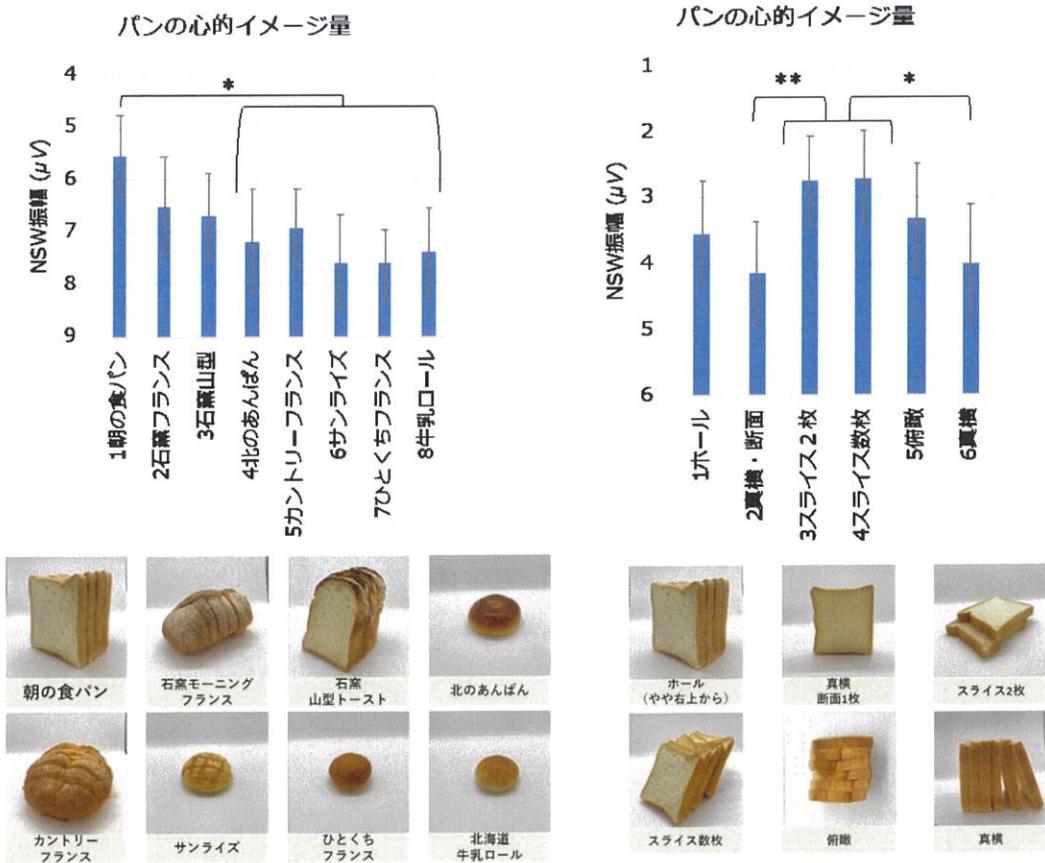


Fig.7-1 400-1000 ミリ秒でのパン種別 NSW 値 Fig.7-2 全時間帯でのアングル別 NSW 値

謝 辞

本研究実施にあたり、公益財団法人 高木俊介パン科学技術振興財団の助成をいただきました。心より御礼申し上げます。また、アンケートの作成やパン画像の印象評価の実施において、画像の提供やご助言等いただきました（株）アンデルセン・パン生活文化研究所 室長 三山雅代様および上田雅子様ならびに Web アンケートおよび脳波測定にご協力いただきました学内外の皆様に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 今井亜季, 三山雅代, 上田稚子, 町澤まろ, 富永美穂子. 大学生のパンに対する消費選択行動および価値意識の男女比較, 日本調理科学会研究発表要旨集, P-83 (2022).
- 2) 富永美穂子, 野村菜々子, 今井亜季, 三山雅代, 上田稚子, 町澤まろ. 市販パンの実食と画像視聴における官能評価の個人差, 日本心理学会第 87 回大会, 1C-059-PH (2023)
- 3) Vogel, E. K. & Machizawa, M. G. Neural activity predicts individual differences in visual working memory capacity. *Nature* **428**, 748–751 (2004).
- 4) Fukuda, K., Mance, I. & Vogel, E. K. α Power Modulation and Event-Related Slow Wave Provide Dissociable Correlates of Visual Working Memory. *Journal of Neuroscience* **35**, 14009–14016 (2015).

公益財団法人高木俊介パン科学技術振興財団
2023 年度研究助成成果報告書

酵母が生産する植物生育促進物質の同定

広島大大学院統合生命科学研究科
上田 晃弘

【背景】

近年、地球人口の増加に伴う食料需要の増大が食料安全保障上の課題となっている。一方で国際情勢の不安定さは肥料価格の高騰、ひいては植物生産コストの上昇を招いている。これら諸問題の解決には低肥料投入で生産性を維持しうる品種や生産性の高い品種の創出が有効であるが、育種には長い年月が必要となる。より短期的な解決方法の一つに植物の生育促進作用を持つ物質の同定が挙げられる。本研究では、酵母が放出するガス状物質のうち、植物の生育促進作用を持つものを同定する。閉鎖系温室や植物工場等で利用可能な気体ベースの植物成長調節剤の開発の素地を作り、植物の生育促進を促すことで栽培期間の短縮化や生産性向上に貢献できる技術開発の素地を作ることを目的とした。

【材料および方法】

本研究では、酵母が生産する植物生育促進作用を持つガス状物質を同定することを目的とした。そのためにはまず、植物生育促進効果を持つガス状物質を放出する酵母の選抜を行った。酵母の選抜には、2分割シャーレ（図1参照）を用い、閉鎖容器内の植物（シロイスナズナ）と酵母の隔離共培養を23°C、連続光照射下（光強度100 μmol/m²/s）で2週間行った。酵母非接種時のシロイスナズナの生育量（乾物重量）を基準として、シロイスナズナの乾物重量を増加させる酵母の選抜を行った。MS 培地上にはシロイスナズナを10個体生育させ、生育程度が平均的な5個体をサンプリングし、70°Cで72時間以上通風乾燥させてから乾物重量を測定した。

植物生育促進作用を持つ酵母由来のガス状物質はガスクロマトグラフー質量分析器により定性分析を行った。100 mL容三角フラスコに20 mL YPD 液体培地を作成して、30°C、150 rpm で酵母の培養を24時間行った。24時間後、三角フラスコ内上部の気相を固相マイクロ抽出法（SPME、Solid Phase Micro Extraction）により捕集濃縮して、ガスクロマトグラフー質量分析器（GC-MS、Gas Chromatography-Mass Spectrometry）による定性分析を行った。

【結果と考察】

2分割シャーレを用いた閉鎖容器内でシロイスナズナと69種類の酵母株との隔離共培養を行い、酵母が持つシロイスナズナへの間接的作用の影響を調査した。酵母を接種しなかった場合のシロイスナズナ地上部の生育量（乾燥重量）を100%とした際のそれぞれの酵母株接種時のシロイスナズナの乾物重量の比を図1に示した。使用した酵母69株がシロイスナズナの生育にもたらした影響は平均値として81.5±3.2%となっ

た。図 1 にみられるように、多くの酵母株はシロイヌナズナの生育を間接的に抑制するものが多かった。パン酵母である *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) のシロイヌナズナの生育への間接的な影響は約 82% であった。69 種類のうち、5 種類の酵母株はシロイヌナズナの生育を 2 週間で 10~36% 増加させることができた。これらの酵母株からはシロイヌナズナの生育を促進する作用を持つガス状物質が放出されていることが推測された。

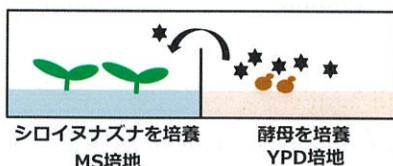


図 1. シャーレ内の片側で 1/2 濃度の MS (Murashige Skoog) 培地上にシロイヌナズナを、もう片側で YPD (Yeast extract, Polypeptone, Dextrose) 培地上に酵母を生育させる (上田ら, 2019)。

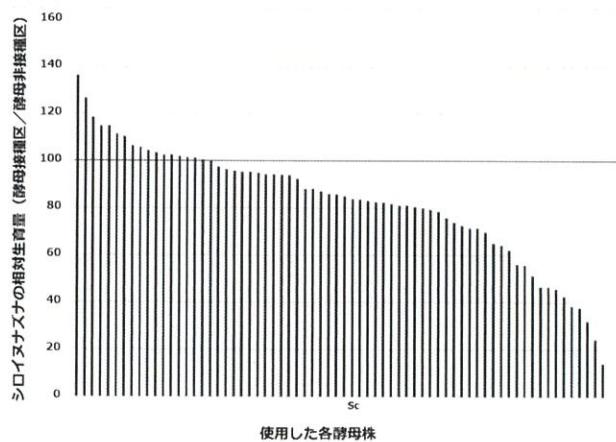
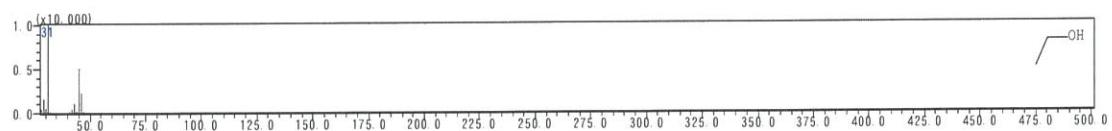


図 2. 酵母 69 種類が持つシロイヌナズナの生育への間接的な影響。Sc はパン酵母株のデータを示す。酵母非接種時のシロイヌナズナの生育量を 100%とした際の、それぞれの酵母株の影響を相対値で示した。

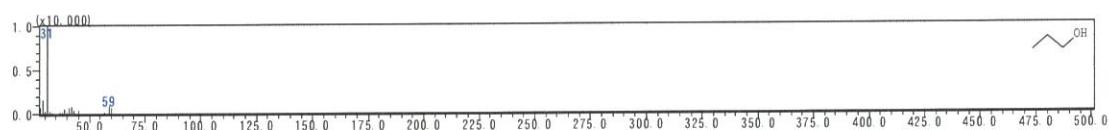
シロイヌナズナの生育を間接的に促進させた酵母株のうち、上位 3 株をさらなる解析に使用した。これら 3 株を用いて YPD 液体培養で放出された気相物質を SPME により捕集濃縮して GC-MS による定性分析に供試した。その結果、3 株から 1-プロパノールやエタノール、ギ酸エチル、酢酸イソアミルなどを含む計 51 種類の物質が同定された (図 3)。これらの物質中にシロイヌナズナの生育促進に資する物質が含まれると

考えられるため、今後はこれらの物質を単独で使用した際のシロイヌナズナの生育への影響やその至適濃度の評価を行う必要がある。

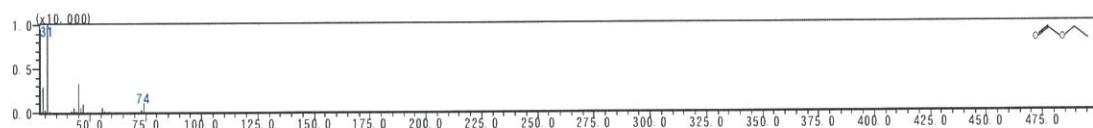
(A) エタノール (分子量 46 分子式 C₂H₆O)



(B) 1-プロパノール (分子量 60 分子式 C₃H₈O)



(C) ギ酸エチル (分子量 74 分子式 C₃H₆O₂)



(D) 酢酸イソアミル (分子量 130 分子式 C₇H₁₄O₂)

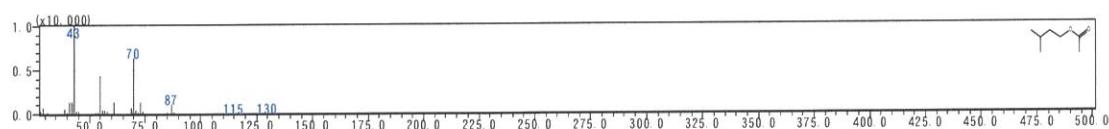


図3. 植物生育促進酵母から放出されたガス状物質の GC-MS による定性分析。(A) エタノール、(B) 1-プロパノール、(C) ギ酸エチル、(D) 酢酸イソアミルのマススペクトル、分子量、分子式を示す。

【謝辞】

本研究に対してご支援いただきました高木俊介パン科学技術振興財団に心より御礼申し上げます。本研究の精力的な実施に貢献した広島大学大学院統合生命科学研究科・久保裕一朗君、広島大学生物生産学部・梶原颯真君、ならびに植物栄養生理学研究室のメンバーに感謝申し上げます。

【引用文献】

上田晃弘、大戸貴裕、近藤もも、大村尚 (2019) 植物生育促進細菌の実用化に向けた試み. 土と微生物 73: 5-9.

公益財団法人 高木俊介パン科学技術振興財団 2023 年度助成研究報告書

研究課題名

「次世代シーケンス・ロングアンプリコン解析を用いた *S. cerevisiae* の菌株識別」

独立行政法人酒類総合研究所 成分解析研究部門
清水 秀明

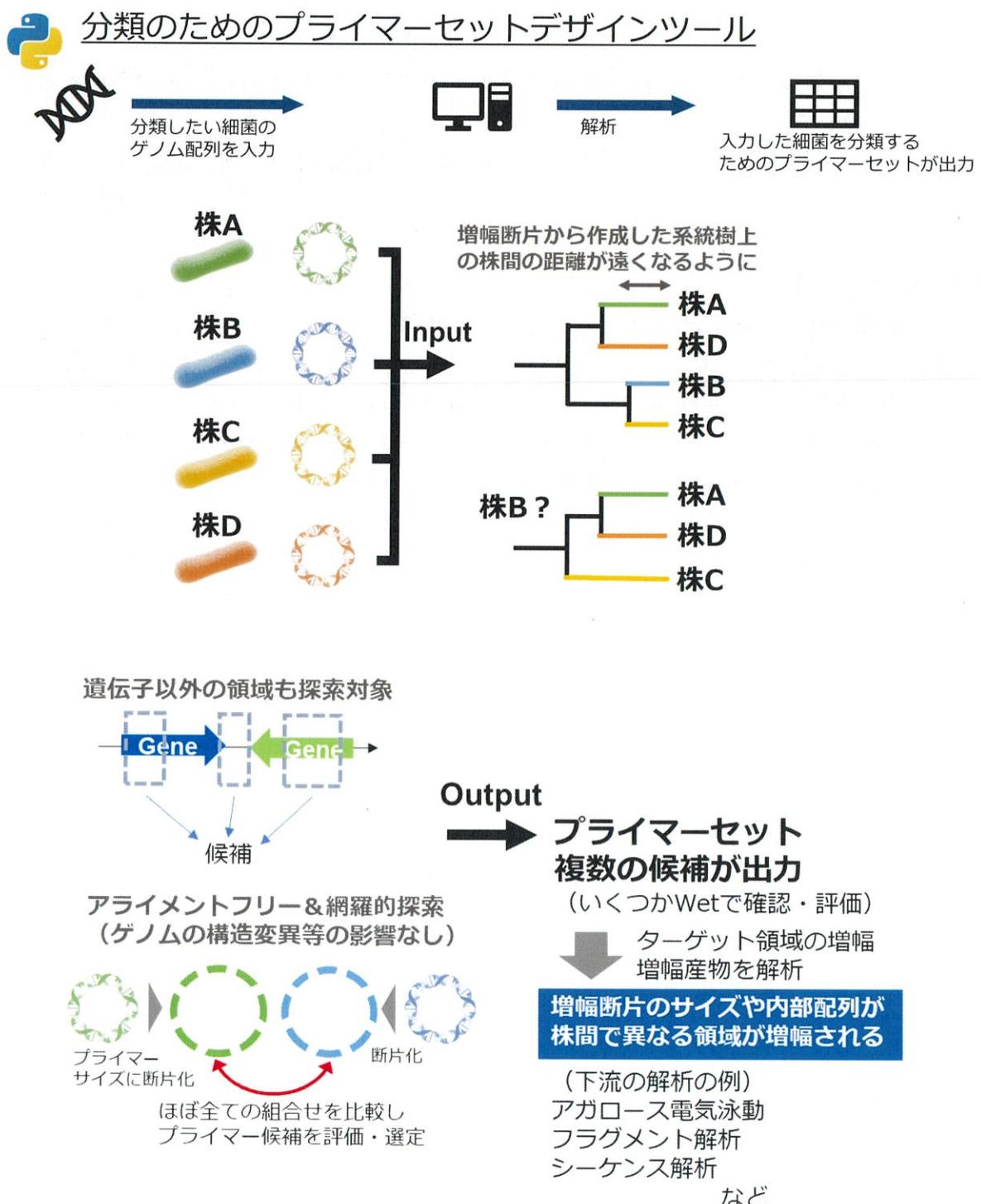
【目的と背景】

国内新規ワイナリーの増加とともに、近年、亜硫酸や市販ワイン酵母を添加しない、いわゆる自然発酵と呼ばれるワイン造りが一部で行われている。多様な酵母が発酵に関わり、発酵初期には *Hanseniaspora*、*Candida*、*Metschnikowia* などの non-*Saccharomyces* 酵母が優勢になり、アルコール発酵が進むと最終的には *S. cerevisiae* が優勢になるが、その *S. cerevisiae* も 1 種類ではなく複数菌株が関与しているとの報告もある(1, 2)。*S. cerevisiae* の菌株識別法としては、レトロトランスポゾンの反復配列を利用した δ sequencing typing (3) やミトコンドリア DNA の RFLP (制限酵素断片長多型) (4) を利用した方法で行われてきたが、プレートに生えた 20 個～100 個のコロニーから酵母を単離、培養、ゲノム抽出、PCR、ゲル電気泳動などをを行うため、かなりの労力と手間がかかる。近年進展目覚ましい次世代シーケンス・ショートアンプリコン解析では、酵母の属種レベルの菌叢解析は開発されているものの(5)、*S. cerevisiae* 種内の割合推定は知る限り未開発である。

そこで、本研究では、高橋らが開発した Short-length Homologous Region exhaustive Search algorithm (SHRS 法；図 1) (6) を用いて、検体中から酵母を単離することなく、次世代シーケンス技術を用いて直接 *S. cerevisiae* の菌株の種類・割合をモニターする技術を開発することを目的とする。つまり、ロングアンプリコンシーケンス用のプライマーを設計、PCR にて設計した断片を增幅後、ロングアンプリコンシーケンス解析を行い、ワインのアルコール発酵に関わる *S. cerevisiae* の割合推定に適した領域を探索する。また、同時にできるだけ安価に解析可能なショートアンプリコン解析に適したプライマーを設計することを目指す。

当該技術が開発できれば、最近一部で増加傾向の自然派ワイン発酵に関わる複数株の *S. cerevisiae* の割合推定とともに実態把握が容易となる。また、ワインに限らずパン酵母など各種酵母のタイピングが可能になることも期待され、食品のトレーサブルなど多岐に渡る波及効果が期待される。

図1 Short-length Homologous Region exhaustive Search algorithm (SHRS法) の概要



【実験方法及び結果】

1. ロングアンプリコン用プライマーの設計

データベースに公開されている *S. cerevisiae* 8 株のホールゲノム配列、547 株の XII 染色体のゲノム配列、57 株のミトコンドリアゲノム配列の情報を基に、SHRS 法(図 1) (6)により、*S. cerevisiae* の菌株識別に適したロングアンプリコンシークエンス解析用のプライマーを設計した。設計する際は、縮重塩基が少なく Tm 値の差が小さいプライマーセットを優先しつつ、できるだけゲノム中でシングルコピーである領域(同一微生物内多型の抑制)、及び断片長の差が少ない領域がターゲットとなるよう考慮した。設計されたプライマーセットは GenBank にある 659 株の内比較的クオリティが高く解析に支障が少ないとと思われた 39 株を用いて、種内のカバレッジ(39 株中何株で增幅産物が得られるか)、増幅断片のコピー数、増幅断片長、プライマーの縮重塩基数などの妥当性を検証し、候補プライマーセットを絞り込んだ。

その結果、多数の候補が設計された中で、VII 染色体から 1 領域、X 染色体から 4 領域、XI 染色体から 1 領域、XII 染色体から 11 領域、ミトコンドリアゲノムから 54 領域を PCR の検討に用いた(表 1)。

表 1 SHRS 法により設計された *S. cerevisiae* 菌株識別のための領域の候補、PCR 結果及びロングアンプリコン解析実施の有無

	染色体	位置*	予想される 増幅断片長(b)	PCR による目的断片長 増幅の有無	NGS ロングアン プリコン解析	管理 No.
1	VII	977521	9609±96	増幅	解析	71
2	X	24658	4775±154	増幅	解析	72
3	X	409000 付近	5347±57	増幅	解析	73
4	X	409000 付近	5311±20	増幅	解析	74
5	X	416013	6357±1139	増幅	解析	75
6	XI	14000 付近	9257±338	-	-	76
7	XII	94747 付近	4040±4	増幅	解析	77
8	XII	981769	10418±93	-	-	23
9	XII	981865	8559±47	増幅	解析	24
10	XII	981865	9366±41	増幅	-	25
11	XII	981865	9491±83	増幅	-	18
12	XII	981865	10383±45	-	-	20
13	XII	981865	11447±44	-	-	19
14	XII	1004059	5260±13	増幅	-	21
15	XII	1004059	5958±57	増幅	-	17
16	XII	1004059	6438±57	増幅	-	22
17	XII	1004059	6542±57	増幅	解析	26
18	mt	46495	6708±334	-	-	12
19	mt	46495	6658±335	-	-	13
20	mt	46839	6445±334	-	-	14
21	mt	46879	6405±334	-	-	15

22	mt	48190	5137±330	-	-	16
23	mt	61871	8891±204	-	-	1
24	mt	61871	7855±182	-	-	7
25	mt	61918	8737±203	-	-	55
26	mt	61938	8737±203	-	-	54
27	mt	61871	7839±182	-	-	9
28	mt	63878	6892±155	-	-	52
29	mt	64639	6172±140	-	-	51
30	mt	64790	7861±178	-	-	2
31	mt	64846	7813±178	-	-	3
32	mt	64846	7805±178	-	-	4
33	mt	66085	6556±130	-	-	6
34	mt	66210	10479±194	-	-	58
35	mt	67340	10174±221	-	-	53
36	mt	67479	5159±136	-	-	10
37	mt	66085	6548±130	-	-	11
38	mt	69843	2848±203	增幅	解析	m61
39	mt	69843	2856±203	增幅	解析	m62
40	mt	69843	9772±181	-	-	56
41	mt	70846	9106±185	-	-	57
42	mt	74092	5236±112	-	-	5
43	mt	74092	5468±112	-	-	8
44	mt	61918	8962	-	-	-
45	mt	61918	8982	-	-	-
46	mt	61918	10773	-	-	-
47	mt	61938	8922	-	-	-
48	mt	61938	8962	-	-	-
49	mt	61938	10753	-	-	-
50	mt	63878	7002	-	-	-
51	mt	63878	7022	-	-	-
52	mt	63878	8813	-	-	-
53	mt	63878	8821	-	-	-
54	mt	64639	8052	-	-	-
55	mt	64639	6221	-	-	-
56	mt	64639	6241	-	-	-
57	mt	64639	8060	-	-	-
58	mt	66210	4650	-	-	-
59	mt	66210	4670	-	-	-
60	mt	66210	4690	-	-	-
61	mt	66210	6489	-	-	-
62	mt	66210	6481	-	-	-
63	mt	67340	3520	-	-	-
64	mt	67340	3540	-	-	-
65	mt	67340	3560	-	-	-
66	mt	67340	5359	-	-	-
67	mt	67340	5351	-	-	-
68	mt	69843	7650	-	-	-
69	mt	69843	6950	-	-	-
70	mt	70846	6647	-	-	-
71	mt	70846	5947	-	-	-

※核ゲノムについてはS288C上の位置、ミトコンドリアゲノム(mt)についてはJAEVFD010000017上の位置を示す。

2. PCR による目的断片の増幅

PCR の鋳型としてワイン酵母 20 種（市販ワイン酵母 *S. cerevisiae* 19 種及び自然発酵醪由来酵母 *S. cerevisiae* 1 種）を用いた。各 *S. cerevisiae* を単独培養後、等量混ぜ合わせ、ゲノム抽出を行った。用いた市販ワイン酵母は以下のとおりである。CSM、RC212、ICV GRE、ICV D21、BM45、GHM、QA23、HPS、Cross Evolution、M1、CM、EC1118、ICV OPALE、uvaferm 43、W15、RP15、ブドウ酒用 1 号、ブドウ酒用 3 号、ブドウ酒用 4 号である。抽出、精製したゲノムを鋳型として、ロングリード用の酵素 KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase を用いて PCR 増幅を行った。増幅を試みた 71 領域のうち、目的領域の増幅が確認できたのは 15 領域であった。その内、10 領域について（表 1）、生物技研に外注、次世代シークエンサーによるロングアンプリコン解析を実施した（PacBio Revio を用いた HiFi リード）。

3. ロングアンプリコンシークエンス解析

ロングアンプリコンシークエンスで得られたリードについて、プライマー配列と一致しないリードやシングルトン（1 配列 1 リード）除去した後、99.9% 相同率の配列を 1 つの代表配列として出力した（表 2）。なお、リード数が 10,000 以下のサンプル（管理 No. 24, m61, m62）については、解析に供せる情報が得られなかつたため以降の解析では除いた。

表 2 ロングアンプリコンシークエンスで出力された領域情報

管理 No.	染色体	増幅断片長(b)	位置*	リード数
71	VII	9609	977521	30,963
72	X	4775	24658	22,455
73	X	5347	409000 付近	50,575
74	X	5311	409000 付近	48,341
75	X	6537	416013	60,472
77	XII	4040	94747 付近	53,731
24	XII	8559	981865	4,774
26	XII	6542	1004059	14,828
m61	mt	2848	69843	78
m62	mt	2856	69843	2,536

*核ゲノムについては S288C 上の位置、ミトコンドリアゲノム (mt) については JAEVFD010000017 上の位置を示す。

各サンプルにおける代表配列の割合を表3に示す。1つの代表配列の割合が90%を超える多様性に乏しい領域（管理No.74,77）がある一方、管理No.71のように50%程度の領域もあった。鋳型とした酵母20種類が、仮に各々異なる配列であれば、5%ずつの代表配列が得られることとなるが、そのような領域はなかった。ただ、得られた解像度の中でショートアンプリコン解析に適する領域があるのかを探査した。1つの代表配列の占める割合が90%を超える2領域（管理No.74,77）を除き、5領域（管理No.71,72,73,75,26）について、データベース上の配列と比較、SNPs塩基を抽出し、リード数に占める割合が1%を超える代表配列、そのリード数、リード数に占める割合を図2～6に示した。

表3 各領域における代表配列数とその割合

管理No.	染色体	代表配列1	代表配列2	代表配列3	代表配列4	代表配列5	代表配列6
71	VII	54%	23%	7%	4%	3%	3%
72	X	85%	10%	2%	2%	-	-
73	X	73%	21%	3%	1%	1%	1%
74	X	93%	2%	-	-	-	-
75	X	66%	16%	7%	6%	2%	2%
77	XII	99%	1%	-	-	-	-
26	XII	61%	16%	12%	7%	1%	1%

3.1. VII染色体 No. 71 領域

当該領域の断片長は9.6kbである。当該領域はSNPs塩基が少なく、2714bまで代表配列1～8は全て同じ塩基で、2715bが代表配列2と4がC（シトシン）、それ以外の代表配列は概してT（チロシン）、データベースはTであった（図2）。それ以降5657bまでは同じ塩基が続き、5658bは代表配列2がA（アデニン）、それ以外の代表配列はT（チロシン）、データベースはT/A（チロシン/アデニン）であった。8328bには主要な代表配列1～3が異なるSNPsもあった。ただ、ショートリードが読める300bの範囲に収まるSNPs塩基がほとんどなく、1組のプライマーでショートリードを行って得られる情報が少ない領域であった。

3.2. X染色体 No. 72 領域

断片長は 4.8kb である。この領域は、代表配列 1 が 85%を占めているが、前半 300b 付近までに代表配列 1～3 が区別できる塩基が集中している（図 3）。特に、主要な代表配列 1～2 が異なる SNP s 塩基が 4 か所あるので（80b, 82b, 90b, 344b）、70～360b を読むプライマーを設計すればショートリードで代表配列 1～3 を区別することが可能である。344b 以降に SNP s 塩基が集中している箇所は確認されなかった。

3.3. X染色体 No. 73 領域

断片長は 5.3kb である。4458b 以降に代表配列 1～3 が分かれる塩基が集中しており（図 4）、4773b 付近には 8b 程度の挿入欠失が存在していたので、4480～4780b を読むプライマーを設計すればショートリードで代表配列 1～4 を区別することが可能である。

3.4. X染色体 No. 75 領域

断片長は 6.4kb である。1311～1541b に代表配列 1～3 が識別できる SNP s 塩基が集中しており（図 5）、ショートリードで読むことが可能な長さである。その他 120b～680b に、337b 程度の挿入がある代表配列があったので（代表配列 3・4・5）、ロングリードで読めば、代表配列 1～5 の識別が可能である。

3.5. XII染色体 No. 26 領域

断片長は 6.5kb である。SNP s 塩基が多い領域で、中盤までは、代表配列 2 と 3 が同じで、代表配列 1 と区別できる（図 6）。4362b 以降になると、代表配列 2 と 3 が違う塩基だったので、例えば、4550～4880b を読むプライマーを設計するとともに、600～900b 又は 2900～3200b を読むプライマーを設計してショートリードを行えば、代表配列 1～4 を区別することが可能である。つまり、4584b～4779b で代表配列 1、2、3 を区別し、その他で代表配列 2 と 4 を区別することで代表配列 1～4 を区別する。

【まとめと今後の予定】

以上まとめると、X染色体には 8b 程の挿入欠失、340b 程の挿入があり、X染色体と XII 染色体に複数 SNP s 塩基が確認された。ショートアンプリコンシークエンスの候補として 6 か所程度あったが、ロングアンプリコン解析単独で鑄型をした *S. cerevisiae* 20 種を識別できる領域はなく、現状の解像度は高くないが、*S. cerevisiae* を単離せず効率的に菌株識別できる手法として活用できる可能性がある。

ただ、ワインのアルコール発酵に関わる *S. cerevisiae* の識別の解像度を高めるためには、ワイン発酵に関わる酵母のホールゲノムを読み、当該ゲノムシークエンス情報を基に、Takahashi らが開発した SHRS 法（4）を用いて、*S. cerevisiae* の菌株識別に適したロングアンプリコンシークエンス解析用のプライマーを再度設計し、ロングアンプリコンシーク

エンス解析を行う必要がある。

【謝辞】

本研究に対してご支援賜りました高木俊介・パン科学技術振興財団ならびに財団事務局の鍛治谷氏に心より感謝申し上げます。また、本研究にあたり、菌株識別に適したプライマーの設計をして頂きました独立行政法人酒類総合研究所の高橋正之博士、本研究全般について的確なご助言を頂きました岩下和裕部門長、実際のゲノム採取・PCR 試験を担当頂きました鎌田綾氏に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., Combina, M., 2007, Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years, *Food Microbiol.*, 24, 403–412.
2. Obata, R., Shimizu. H., Kamada A., Kanno. Y., Koyama K., Goto-Yamamoto N., Iwashita K., 2023, Monitoring *Saccharomyces cerevisiae* strain typing in spontaneous fermentation. *J. ASEV Jpn.*, 34, 144–145. (日本ブドウ・ワイン学会2023名古屋大会)
3. Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., Dulau, L., 1993, Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.*, 62, 89–94.
4. Querol, A., Barrio, E., Ramón, D., 1992, A comparative study of different methods of yeast-strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.*, 15, 439–446.
5. Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., Sato, H., 2012, High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLOS ONE*, 7, e40863.
6. Takahashi, M., Morikawa, K., Akao, T., 2022, Short-length Homologous Region exhaustive Search algorithm (SHRS): A primer design algorithm for differentiating bacteria at the species, subspecies, or strain level based on a whole genome sequence. *J. Microbiol. Methods*, 203, 106605.

図2 VII染色体 No. 71 領域のSNPs

代表配列	1	2	3	4	5	6	7	8	テ"タハ"ス
リード数	16684	7036	2073	1085	844	815	584	452	
b ^{※1}	54%	23%	7%	4%	3%	3%	2%	1%	配列 ^{※2}
2715	T	C	T	C	T	T	TC	T	T
5658	T	A	T	T	T	T	T	T	A
5861	T	T	T	A	T	T	A	A	A
6568	G	G	G	G	G	G	A	G	A
6801	G	G	A	G	G	G	G	G	A
8328-	TC	ATC	TCC	ATC	TC	TC	ATC	ATC	TC/ATC× 1/TCC×8
8979	-	A	A	A	A	A	A	G	G A

※1：断片長開始点を0bとした。※2：データベース配列30個を用い比較した。

リード数に占める割合が1%を超える代表配列を示した。5%を超える代表配列は太字で示す（以下同様）

図3 X染色体 No. 72 領域のSNPs

代表配列	1	2	3	4	テ"タヘ"ス
b ^{※1}	リード数 % 19155 85%	2167 10%	558 2%	512 2%	配列 ^{※2}
53	A A	G	A		G A
59	T T	C	T		C T
62	T T	C	T		C T
66	G G	A	G		A G
68	G G	A	G		A G
80	T C	T T			C T
82	T C	T T			C T
87	T T	G	T		G T
89	G G	A	G		A G
90	T C	T T			C T
101	C C	T	C		T C
107	C C	T	C		T C
116	G G	A	G		A G
122	G G	A	G		A G
125	A A	G	A		G A
132	T T	G	T		G T
137	C C	T	C		T C
146	G G	A	G		A G
164	T T	A	T		A T
182	C C	A	C		A C
200	G G	T	G		T G

216	G	G	A	G		
230	T	T	C	T	C	T
237	T	T	C	T	T	C
251	A	A	G	A	G	A
256	G	G	A	G	G	A
269	C	C	T	C	T	C
278	A	A	G	A	G	A
281	A	A	G	A	G	A
284	G	G	A	G	A	G
287	C	C	A	C	A	C
344	C	T	C	C	C	
1051	G	A	G	AG	G	
1220	T	T	G	T	G	T
1333	A	C	C	C	C	A
1898	A	A	G	A	G	A
1944	T	T	C	T	C	T
1972	A	G	G	G	G	
2996	G	T	G	G	G	
3670	-	-	G	-	G	-

※1：断片長開始点を0bとした。※2：データベース配列20個を用い比較した。

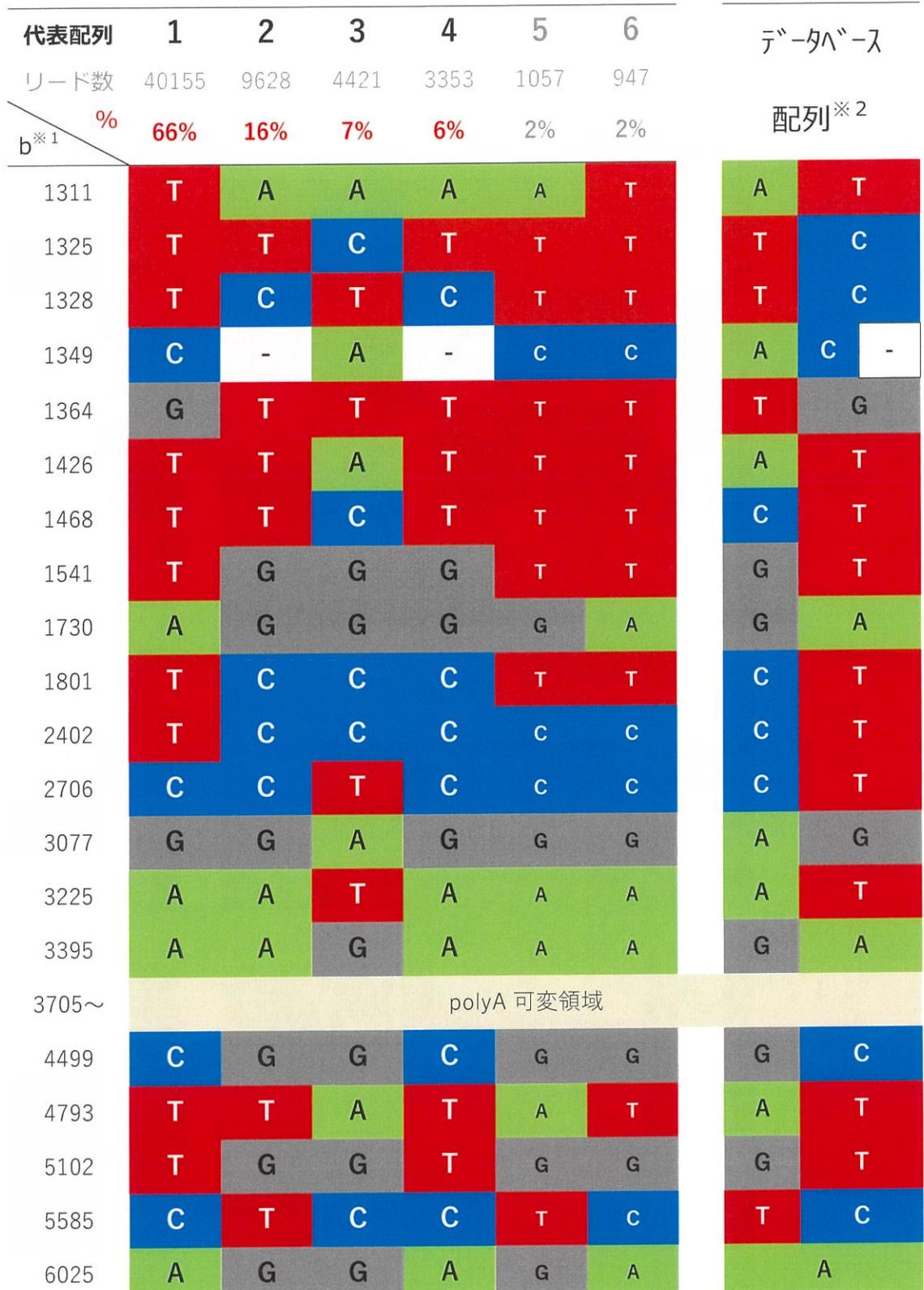
図4 X染色体 No. 73 領域のSNPs

代表配列	1	2	3	4	5	6	データベース 配列 ^{※2}
リード数	36843	10688	1499	301	296	260	
b ^{※1}	%	73%	21%	3%	1%	1%	1%
338	G	A	A	A	A	A	A
388	A	G	G	G	G	G	A
699	A	A	G	G	AG	G	G
738	C	T	T	T	T	T	T
1885	T	T	C	C	C	C	C
2130	C	C	T	T	T	T	T
2310	C	C	T	T	T	T	C
2445	G	G	T	T	T	T	T
3087	-	-	-	G	G	-	-
3303	G	G	A	A	A	A	A
4226	T	C	C	C	C	C	T
4234	C	A	C	C	C	C	C
4458	A	-	-	-	-	-	A
4466	A	C	C	C	C	C	A
4468	T	T	G	T	T	T	T
4493	C	T	T	T	T	T	C
4538	T	T	C	T	T	T	T
4773 ^{※3}	挿入	欠失	欠失	挿入	挿入	欠失	挿入 欠失
4938	C	T	T	T	T	T	C T
4958	A	G	A	G	G	A	A G
5031	C	C	C	CT	T	C	C
5247	G	G	G	T	T	G	G

※1：断片長開始点を0bとした。※2：データベース配列26個を用いて比較した。

※3：8b程度の挿入又は欠失があった。

図5 X染色体 No. 75 領域のSNPs



※1：断片長開始点を0bとした。※2：データベース配列25個を用いて比較した。

図6 XII染色体 No. 26 領域のSNPs

代表配列	1	2	3	4	5	テ"タヘ"ス	
b ^{※1}	リード数 %	9108 61%	2396 16%	1791 12%	1026 7%	201 1%	配列 ^{※2}
118	G	A	A	G	G	G	A
128	A	T	T	A	A	A	T
199	T	C	C	T	T	T	C
242	T	T	T	C	T	T	C
629	T	C	C	T	T	T	C
690	C	C	C	T	c	C	C
694	G	A	A	G	G	G	A
796	A	G	G	A	A	A	G
799	A	G	G	A	A	A	G
946	G	A	A	G	G	A	G
965	T	T	T	T	c	T	C
1825	C	T	T	C	c	C	T
1990	C	G	G	G	c	C	G
1991~	poly T 可変領域						
2013	A	-	-	A	A	A	-
2035	A	G	G	G	A	A	G
2092	C	T	T	T	T	C	T
2225	A	T	T	T	A	A	T
2235	C	T	T	T	c	C	T
2250	G	A	A	A	G	G	A

2280	-	A	A	A	-	-	A
2287	A	G	G	G	A	A	G
2292	T	T	T	A	T	T	T
2370	T	C	C	C	T	T	C
2571	A	G	G	G	A	A	G
2652	G	A	A	A	A	A	G
2709	A	T	T	A	A	A	T
2801	T	A	A	A	A	A	T
3009	A	T	T	A	A	A	T
3011	A	G	G	G	G	G	A
3026	G	A	A	A	A	G	A
3060	A	G	G	A	A	A	G
3144	T	T	T	G	G	T	G
3147	T	A	A	T	T	T	A
3160	A	-	-	A	A	A	-
3161	T	-	-	T	T	T	-
3231	A	G	G	A	A	A	G
3555	G	G	G	A	A	G	A
3632	T	G	G	T	T	T	G
3636	T	T	T	C	c	T	C
3672	G	C	C	G	G	G	C
3693	G	A	A	A	A	A	G
3990	A	G	G	A	A	A	G
4094	C	T	T	C	c	C	T
4362	C	C	A	C	c	C	A
4380	T	T	C	T	T	T	C

4584	G	A	G	A	A	G	A
4635	A	A	G	A	A	A	G
4646	G	A	A	A	A	G	A
4728	A	G	G	G	G	G	A
4779	A	A	G	A	A	G	A
4815	A	A	T	A	A	A	T
4998	C	C	T	C	c	C	T
5001	C	C	G	C	c	C	G
5118	C	C	T	C	c	C	T
5244	G	G	A	G	G	G	A
5420	C	T	T	T	T	T	C
5448	T	T	A	T	T	T	A
5478	G	G	A	G	G	G	A
5523	T	T	G	T	T	T	G
5550	T	T	C	T	T	T	C
5565	G	G	C	G	G	G	C
5639	T	T	C	T	T	T	C
5661	G	G	A	G	G	G	A
6099	T	C	C	C	T		C
6276	A	A	G	A	A	A	G

※1：断片長開始点を0bとした。※2：データベース配列26個を用いて比較した。